รายงานการวิจัย

การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกราม

ศิริรัตน์ สีหานาท[1] ลือชัย บุตคุป[2] สมคิด แข็งกลาง[2] และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ[3]

Abstract

Seehanat, S.[1], Budtacup, L.[1], Kangklang, S.[1], and Leelavatcharamas, V.[2]

Growth inhibition of shrimp pathogens by isolated gastrointestinal microflora of *Macrobrachium rosenbergii* de Man

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 265-274

The useful bacteria which were isolated from the gastrointestinal tract of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man), cultivated in earthen pond at Maha Sarakham province, Thailand, consisted of 14 isolates of Bacillus ($B_1 - B_{14}$) and 18 isolates of Lactic acid bacteria ($LA_1 - LA_{18}$). The abilities of all isolated bacteria on growth inhibition of pathogenic bacteria (*Escherichia coli, Bacillus cereus, Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa*) were studied by paperdisc plate method.

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Muang, Maha Sarakham 44000, [2]Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002 Thailand.

[1]วท.ม. (เทคโนโลยีทางชีวภาพ) [2]วท.บ. (เทคโนโลยีทางชีวภาพ) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000 [3]Ph.D. (Chemical Engineering) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Corresponding e-mail : sirirat.d@msu.ac.th

วันรับต้นฉบับ 7 มกราคม 2547 วันรับลงตีพิมพ์ 2 กันยายน 2547

The results showed that the *Bacillus* B_2 and B_5 were unable to inhibit the growth of all of the tested pathogens. *Bacillus* B_1, B_{10} and B_{12} were capable of inhibiting the growth of 3 of 4 tested pathogen strains. Although all of the isolated lactic acid bacteria (LA_1–LA_{18}) could not inhibit the *E. coli* growth, all of them could inhibit the growth of *B. cereus*. The isolated lactic acid bacteria which were capable of inhibiting the growth of 3 tested pathogen strains (excluded *E. coli*) were LA_{12}, LA_{13}, LA_{14}, LA_{15}, LA_{16}, LA_{17} and LA_{18}. In order to select the high potential strain of bacteria for using as probiotics, *Bacillus* B_1, B_3, B_4, B_{10} and B_{12} and lactic acid bacteria LA_{12}, LA_{13}, LA_{14}, LA_{15}, LA_{16}, LA_{17} and LA_{18} were tested for their growth abilities in various growth conditions. The tested growth conditions included various concentrations of the bile salt and salt (NaCl) and various pH and temperatures. The results revealed that *Bacillus* B_1 and B_{10} and lactic acid bacteria LA_{13}, LA_{16} and LA_{18} exhibited high potential for using as probiotics. The results of biochemical test for identification of these high potential strains showed that *Bacillus* B_1 and B_{10} were possibly *B. licheniformis* and *B. thuringiensis* respectively. The lactic acid bacteria LA_{13}, LA_{16} and LA_{18} were possibly the same strain and belonged to the genus Pediococcus.

Key words : probiotic, lactic acid bacteria, *Bacillus* sp., giant fresh water prawn

บทคัดย่อ

ศิริรัตน์ สีหานาท ลือชัย บุตคุป สมคิด แข็งกลาง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ

การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกราม

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 265-274

จุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ซึ่งแยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกรามที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินบ้านดอนนา จังหวัดมหาสารคาม ประกอบด้วย บาซิลลัส (Bacillus) 14 ไอโซเลท (B_1-B_{14}) และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) 18 ไอโซเลท (LA_1-LA_{18}) จากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อที่แยกได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli* , *Bacillus cereus* , *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้เทคนิคการซึมผ่านกระดาษกรอง พบว่า *Bacillus* B_2 และ B_5 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทุกชนิดที่ใช้ทดสอบได้ มีเพียง *Bacillus* B_3 และ B_4 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้ และ *Bacillus* B_1, B_{10} และ B_{12} สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิด สำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 18 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{12}-LA_{18} สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด ยกเว้นเชื้อ *E. coli* เมื่อนำ *Bacillus* B_1, B_3, B_4, B_{10} และ B_{12} และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{12}, LA_{13}, LA_{14}, LA_{15}, LA_{16}, LA_{17} และ LA_{18} มาทดสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่าง ๆ เพื่อศึกษาศักยภาพของการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ความเข้มข้นของเกลือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่ระดับต่าง ๆ พบว่า *Bacillus* B_1 และ B_{10} และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{16} และ LA_{18} ให้ผลการทดลองดีที่สุด ซึ่งคาดว่าสามารถนำไปเป็นโพรไบโอติกได้ เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า *Bacillus* B_1 สัณนิษฐานว่าน่าจะใกล้เคียงกับ *Bacillus licheniformis* และ B_{10} สัณนิษฐานว่าใกล้เคียงกับ *Bacillus thuringiensis* ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{16} และ LA_{18} สัณนิษฐานว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกันและน่าจะอยู่ในสกุล *Pediococcus*

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีชื่อสามัญว่า Giant Freshwater Prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* de Man มีชื่อเรียกที่รู้จักกันอีกหลายชื่อคือ กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งแห และกุ้งใหญ่ เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีราคาแพง เนื้อมีรสชาติดี สามารถประกอบอาหารได้หลายรูปแบบ

ดำรงชีพได้ทั้งน้ำกร่อยและน้ำจืด ปัจจุบันความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติมีจำนวนลดลง เนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น การทำประมงผิดวิธี การระบาดของโรค ปัญหาจากมลภาวะต่างๆ ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงเพื่อชดเชยจากธรรมชาติ ทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอาชีพที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกร (ศุภชัย, 2543)

เนื่องจากว่าวิธีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในปัจจุบันยังคงเลี้ยงเหมือนเมื่อ 10 ปีก่อน ทำให้ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นไม่ได้รับการแก้ไข เช่น ปัญหาลูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำ กุ้งโตช้า ปัญหาโรค เป็นต้น (วิศณุ, 2541) ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามปัญหาใหญ่ที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือล้มเหลวคือ การป้องกันและควบคุมโรคส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่ม *Aeromonas* และ *Vibrio* (vibriosis) มีผลทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำ สำหรับการป้องกันนั้นเกษตรกรจะมีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นหลัก ซึ่งจะมีผลดีในระยะแรก ๆ ของการใช้เท่านั้น เมื่อใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะไปได้ระยะเวลาหนึ่งจะประสบปัญหาการใช้ยาไม่ได้ผล การรักษาทำได้ยากมากขึ้นจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะมากขึ้นกว่าที่เคยใช้ ซึ่งไม่สามารถรักษาอาการป่วยของกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียได้ ปัญหาดังกล่าวนี้เกิดจากการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค โดยเชื้อแบคทีเรียจะปรับตัวให้สามารถทนต่อสารเคมีและยาปฏิชีวนะได้มากขึ้น มีสาเหตุมาจากการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะไม่ถูกต้อง ใช้ในระยะที่กุ้งยังไม่ป่วยเพื่อป้องกันโรคหรือเร่งการเจริญเติบโตทำให้มีการใช้ยาบ่อยมากเกินไป อีกทั้งยังเกิดการปนเปื้อนในน้ำและสิ่งแวดล้อมซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อโรคมีการดื้อยาสูงขึ้น จนถึงขั้นรุนแรงไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ (เกรียงศักดิ์, 2535)

ปัจจุบันนี้ได้มีการหันมาใช้วิธีชีวภาพบำบัดซึ่งเป็นการควบคุมและป้องกันโรคโดยวิธีธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในสัตว์ การใช้เอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรคหรือกระตุ้นให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ช่วง ค.ศ. 1965-1974 ได้นำจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้กับคนและสัตว์อย่างแพร่หลาย โดยตั้งชื่อว่า "โพรไบโอติก" (Parker, 1974) และได้ให้คำนิยามของสารโพรไบโอติกไว้ต่างๆ กันดังนี้ เช่น

- โพรไบโอติก เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อเสริมในอาหารจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ที่ใช้ โดยไปปรับปรุงเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในระบบลำไส้ให้เกิดความสมดุลย์ โพรไบโอติก (probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า "เพื่อชีวิต" (for life) (Fuller, 1992) นำมาใช้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1907 โดย Metehnikoff
- สารที่หลั่งออกมาโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง (Lilley *et al*, 1965)
- จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือแบบผสม นำไปเสริมให้กับคนและสัตว์ แล้วมีผลประโยชน์ต่อคนและสัตว์นั้นๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Havenaar *et al*, 1992)

ความหมายโดยรวม คือ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (Living microorganism) เมื่อผสมอาหารให้คนและสัตว์กินจะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ ทำให้เกิดผลดีต่อคนและสัตว์ แต่ให้ผลขัดแย้งต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

สนธิ และลิลา (2541) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้โพรไบโอติกซึ่งเตรียมได้จาก *Bacillus* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผิวดินบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยเปรียบเทียบอัตราการรอดตาย น้ำหนัก ความยาวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับไพรไบโอติกเป็นเวลา 12, 25, 35 และ 55 วันติดต่อกัน ผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าโพรไบโอติกที่เตรียมได้จาก *Bacillus* PO27 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพด้านการให้อัตรารอดตายได้สูงอย่างสม่ำเสมอในทุกชุดการทดลอง คือ 95.32, 92.00, 82.00, 76.66 และ 75.33% ตามลำดับ โดยมีอัตราสัมพันธ์รอดตั้งแต่ 25.00 - 53.26% สำหรับประสิทธิภาพในการเพิ่มน้ำหนักและการเจริญเติบโตนั้น พบว่า โพรไบโอติก สายพันธุ์ PO26 และ PO25 จะให้ผลสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ส่วนโพรไบโอติกจาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่นๆ มีประสิทธิภาพต่ำกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ วลัยพร (2544) ได้ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม พบว่า แบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantalum,*

Lactobacillus casei, Enterococcus faecium และ *Lactobacillus lactis* ที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้สัตว์น้ำจืด ไส้ไก่ มูลสุกร ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากเนื้อสัตว์และผักต่างๆ เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่มีผลต่อการเจริญของกุ้งก้ามกราม แต่มีผลต่ออัตราการรอดตายของลูกกุ้งก้ามกรามสูงกว่าการให้อาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียว และพบว่า *Lactobacillus lactis* F4 ให้อัตราการรอดตายของลูกกุ้งก้ามกรามสูงกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาหาชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ซึ่งอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามพร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ตามลักษณะของการเป็นโพรไบโอติก

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ

การแยกเชื้อ *Bacillus*

เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากบ่อดินของเกษตรกรบ้านดอนนา อ.เมือง จ.มหาสารคาม แบบสุ่ม จำนวน 20 ตัว นำกุ้งก้ามกรามมาทำความสะอาดและตัดเอาส่วนลำไส้ทั้งหมดมาบดให้ละเอียดด้วยแท่งจับใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำมาต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร Nutrient agar (NA) ใช้เทคนิค spread plate บ่มในตู้อบ (Incubator) นาน 24 ชั่วโมง คัดเอาเฉพาะแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้า มาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นำตัวอย่างลำไส้กุ้งก้ามกรามชั่งมา 1 กรัม นำมาใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 0.85% NaCl 2-3 หยด แล้วบดให้ละเอียดด้วยแท่งจับเข็มเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการเจือจาง (dilution) ที่อัตราเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} เท่า นำมาแยกโคโลนีเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิกการเทเพลท (pour plate) บนอาหาร de Man Ragosa and Sharpe (MRS) agar ที่มีการเติม Bromocresolpurple เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันและสามารถเปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลืองได้ มาทำการเขี่ยเชื้อเลี้ยงต่อไปเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธีการซึมผ่านกระดาษกรอง (disc diffusionassay)

วิธีการทดสอบดัดแปลงจาก วรรณิภา (2539) โดยนำเชื้อก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa* และ *Aeromonas hydrophila* มา spread plate บนอาหาร NA นำเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างอายุ 12 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มล. ในขวดรูปชมพู่ เขย่าเลี้ยงที่ 37°C ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 μm นำส่วนใสที่กรองได้ 100 μm มาหยดลงบนกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคไว้ บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดบริเวณใส (clear zone inhibition)

การทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างในการเจริญที่สภาวะต่าง ๆ

1. การทนต่อเกลือน้ำดี

นำเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร NB และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth โดยอาหารทั้งสองชนิดมีเกลือน้ำดี (bile salt) ผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7, 9, 10, 30 และ 50% แล้วบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

2. การทนต่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl

นำเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร NB และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth โดยอาหารทั้งสองชนิดนี้มีเกลือ NaCl ผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8% แล้วบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

3. การทนต่อความเป็นกรด-ด่าง

นำเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง มาเลี้ยง

ในอาหาร NB และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth โดยอาหารทั้งสองชนิดมี pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 แล้วบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

4. การทนต่ออุณหภูมิ

นำเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุ 12 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร NB และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth แล้วบ่มไว้ที่ 20, 30, 37 และ 45°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

จากการทดลองแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่คาดว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้กุ้งก้ามกรามสามารถแยกได้เป็น 2 พวกคือ จุลินทรีย์ที่เป็น *Bacillus* ส่วนใหญ่ติดสีแกรมบวกลักษณะเป็นแท่งมีสปอร์ มีทั้งหมด 14 ไอโซเลท (B_1-B_{14}) และจุลินทรีย์ที่เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งติดสีแกรมบวกลักษณะเซลล์กลม อยู่เป็นกลุ่มๆ ละ 4-8 เซลล์ มีทั้งหมด 18 ไอโซเลท (LA_1-LA_{18})

1. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกราม เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *E. coli, B. cereus, P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* โดยวัดจากการเกิดบริเวณใสรอบๆ แผ่นกระดาษกรองพบว่า *Bacillus* B_2 และ B_5 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้ แต่ *Bacillus* B_3 และ B_4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้ (Table 1) และ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus* B_1, B_{10} และ B_{12} ดังนั้นจึงเลือก *Bacillus* B_1, B_3, B_4, B_{10} และ B_{12} ใช้สำหรับศึกษาความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ต่อไป

พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกไอโซเลทถึงแม้จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ (Table 2) แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ สำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้ ได้แก่ LA_{12}, LA_{13}, LA_{14}, LA_{15}, LA_{16}, LA_{17} และ LA_{18} ดังนั้นจึงเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านี้ไว้สำหรับศึกษาความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ต่อไป

2. การทนต่อเกลือน้ำดี

การทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีนี้เป็นส่วนหนึ่งที่จะใช้เป็นข้อพิจารณาในการคัดเลือกเชื้อ เนื่องจากเชื้อดังกล่าวจะต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายอิง เอเจนต์ (emulsifying agent) ช่วยให้ไขมันอยู่ในรูปสารละลายแขวนลอย เพื่อให้เอนไซม์ย่อยไขมันในลำไส้ได้สะดวกขึ้น การที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ในระดับสูงจึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดในสิ่งมีชีวิตนั้น จากการทดลองพบว่าเชื้อทุกตัวเจริญได้ดีเมื่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีไม่เกิน 3% ดัง Table 3 *Bacillus* ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้สูงได้แก่ *Bacillus* B_1, B_3 และ B_{10} สำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ต่ำกว่า *Bacillus* อย่างเห็นได้ชัด แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ ได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{16} และ LA_{18}

3. การทนต่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl

จุลินทรีย์โดยทั่วไปจะไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10-15% จากความสามารถนี้ สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ได้ โดยธรรมชาติของเกลือนี้จะเป็นสารช่วยลดความชื้นและดึงน้ำออกจากเซลล์ เนื่องจากแรงดันออสโมติกทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำอย่างรุนแรงและหยุดการเจริญ ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นของเกลือสูงๆ จึงเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง นอกจากนี้เกลือยังมีผลต่อการแพร่ของออกซิเจน ทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศใช้อากาศได้ยาก จุลินทรีย์ตัวอย่างที่ยังสามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 4% ขึ้นไปได้แก่ *Bacillus* B_3, B_{10} และ B_{12} แลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{12}, LA_{13}, LA_{15}, LA_{16} และ LA_{18} ดังแสดงใน Table 4

Table 1. Diameter of clear zone (mm) of pathogenic growth inhibition by supernatant of the isolated *Bacillus* spp..

Sample	Tested pathogenic bacteria			
	E. coli	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*A. hydrophila*
B_1	2.0	10.0	-	2.0
B_2	-	-	-	-
B_3	10.0	3.0	7.0	5.0
B_4	6.0	6.0	1.0	3.0
B_5	-	-	-	-
B_6	-	4.0	-	-
B_7	6.0	4.0	-	-
B_8	3.0	-	4.0	-
B_9	-	2.0	12.0	-
B_{10}	5.0	4.0	7.0	-
B_{11}	3.0	-	-	-
B_{12}	6.0	6.0	-	10.0
B_{13}	-	3.0	-	3.0
B_{14}	-	4.0	3.0	-

Note : - : no growth inhibition

Table 2. Diameter of clear zone (mm) of pathogenic growth inhibition by supernatant of lactic acid bacteria.

Sample	Tested pathogenic bacteria			
	E. coli	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*A. hydrophila*
LA_1	-	6.0	-	-
LA_2	-	4.0	-	-
LA_3	-	8.0	-	-
LA_4	-	5.0	-	-
LA_6	-	7.0	3.0	-
LA_7	-	6.0	-	-
LA_8	-	4.0	-	-
LA_9	-	14.0	-	-
LA_{10}	-	5.0	2.0	-
LA_{11}	-	5.0	3.0	-
LA_{12}	-	6.0	3.0	3.0
LA_{13}	-	5.0	9.0	5.0
LA_{14}	-	9.0	9.0	3.0
LA_{15}	-	11.0	10.0	1.0
LA_{16}	-	7.0	7.0	6.0
LA_{17}	-	15.0	12.0	4.0
LA_{18}	-	10.0	9.0	4.0

Note : - : no growth inhibition

Table 3. Growth ability of the selected isolates at various bile salt concentrations.

Isolate	Bile salt concentration (% w/v)								
	0	1	3	5	7	9	10	30	50
B_1	++++	++++	++++	++++	+++	++	+++	+++	+
B_3	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-
B_4	++++	+	++	+	+	++	++	++	-
B_{10}	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	-
B_{12}	++++	++++	++++	+++	++	++	++	-	-
LA_{12}	++++	++++	++++	+++	+	+	-	-	-
LA_{13}	++++	++++	++++	++	++	+	+	-	-
LA_{14}	++++	++++	++++	++	+	+	+	-	-
LA_{15}	++++	++++	++++	++	+	-	-	-	-
LA_{16}	++++	++++	++++	++	++	+	-	-	-
LA_{17}	++++	++++	++++	+	-	+	-	-	-
LA_{18}	++++	++++	++++	++	++	++	+	-	-

Note : ++++ : very well, +++ : good, ++ : fair, + : poor, - : no growth

4. การทนต่อความเป็นกรด-เบส

เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้น้อยหรือไม่เจริญเลยที่ pH ต่ำมีความเป็นกรดมากๆ เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ pH 6-8 หรือมีค่าความเป็นด่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เนื่องจากว่าเชื้อนี้จะสร้างกรดแลคติกออกมาทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ ดังนั้นที่ระดับ pH สูงๆ จะช่วยรักษาสมดุลทางเคมีของเซลล์ ทำให้เจริญได้ดีกว่าที่ pH ต่ำ จาก Table 5 จะพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญที่ pH ต่ำได้ดีกว่าพวก *Bacillus* แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ตั้งแต่ pH 4 ขึ้นไปได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{14}, LA_{15}, LA_{16} และ LA_{18} ส่วน *Bacillus* ที่สามารถเจริญได้ดีตั้งแต่ pH 6 ขึ้นไปได้แก่ *Bacillus* B_1, B_3, B_{10} และ B_{12}

5. การทนต่ออุณหภูมิ

เนื่องจากกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์เลือดเย็นสามารถปรับตัวตามอุณหภูมิที่กว้าง นอกจากนี้การนำเอาเชื้อที่อยู่ในลำไส้กุ้งก้ามกรามมาใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้ง อาจต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนไม่ทางใดก็ทางหนึ่ง ดังนั้นหากสามารถแยกเชื้อที่ทนต่ออุณหภูมิในช่วงกว้างได้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง จาก Table 6 จะเห็นว่าจุลินทรีย์ตัวอย่างเกือบทุกไอโซเลทยกเว้น *Bacillus* B_4 และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{12} สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 45°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิในช่วงกว้าง และเป็นคุณสมบัติที่ดีของเชื้อที่จะใช้เป็นโพรไบโอติก

Table 4. Growth ability of the selected isolates at various NaCl concentration.

Isolate	NaCl Concentration (% w/v)				
	0	2	4	6	8
B_1	++++	++++	++	++	+
B_3	++++	++++	++++	+++	++
B_4	++++	++++	++	+	+
B_{10}	++++	++++	++++	++++	+++
B_{12}	++++	++++	++++	+	++
LA_{12}	++++	++++	++++	+++	++
LA_{13}	++++	++++	++++	++++	+++
LA_{14}	+++	++	+	-	-
LA_{15}	++++	++++	++++	++++	+++
LA_{16}	++++	++++	++++	++++	+++
LA_{17}	++++	++++	+	-	-
LA_{18}	++++	++++	++++	++++	++

Note : ++++ : very well, +++ : good, ++ : fair, + : poor, - : no growth

Table 5. Growth ability of the selected isolates at various pH.

Isolate	pH						
	2	3	4	5	6	7	8
B_1	-	++	++	++	++++	++++	++++
B_3	+	+	+	+	++++	++++	++++
B_4	-	+	+	+	-	++	++++
B_{10}	-	+	+	+	++++	++++	++++
B_{12}	-	-	+	++	++++	++++	++++
LA_{12}	-	-	-	-	++	++++	++++
LA_{13}	-	-	+++	++++	++++	++++	++++
LA_{14}	+	-	++	++++	++++	++++	++++
LA_{15}	-	-	++	++++	++++	++++	++++
LA_{16}	-	-	+++	++++	++++	++++	++++
LA_{17}	-	-	-	-	++	++	-
LA_{18}	+	-	++	++++	++++	++++	++++

Note : ++++ : very well, +++ : good, ++ : fair, + : poor, - : no growth

Table 6. Growth ability of the selected isolates at various temperatures.

Isolate	Temperature (°C)			
	20	30	37	45
B_1	++	++++	++++	++++
B_3	+	+++	+++	++++
B_4	+	+	+	+
B_{10}	++	++++	++++	++++
B_{12}	+	++++	++++	++++
LA_{12}	+	+	-	+++
LA_{13}	+	++++	++++	++++
LA_{14}	++	++++	++++	++++
LA_{15}	+	++++	++++	++++
LA_{16}	++	++++	++++	++++
LA_{17}	+	++++	++++	++++
LA_{18}	++	++++	++++	++++

Note : ++++ : very well, +++ : good, ++ : fair, + : poor, - : no growth

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกรามเป็นแบคทีเรีย กลุ่ม *Bacillus* ส่วนใหญ่ ติดสีแกรมบวกลักษณะเป็นแท่งมีสปอร์ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *E. coli, B. cereus, P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* โดยผลการยับยั้งจากการเกิดบริเวณใสสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลการยับยั้งที่ดีมาได้ 5 ไอโซเลท คือ B_1, B_3, B_4, B_{10} และ B_{12} ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียติดสีแกรมบวกลักษณะเซลล์กลม อยู่เป็นกลุ่มๆ ละ 4-8 เซลล์ จากผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค สามารถคัดเลือกมาได้ 7 ไอโซเลท คือ LA_{12}, LA_{13}, LA_{14}, LA_{15}, LA_{16}, LA_{17} และ LA_{18} จากนั้นนำไอโซเลทที่ได้ทั้งหมดนี้ไปทดสอบความสามารถในการเจริญ ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือน้ำดี เกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือที่ระดับความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากว่าในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งก้ามกรามนี้จะมีเกลือน้ำดี เกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำย่อย ขณะอยู่ในกระเพาะอาหารมีฤทธิ์เป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย เมื่อผ่านเข้ามาในลำไส้จึงมีผลทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรด อีกทั้งกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์เลือดเย็น อุณหภูมิในร่างกายกุ้งจึงเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่ หรือในขั้นตอนการผสมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์นี้ในอาหารเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งนั้นอาจจะต้องผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น ความร้อน เป็นต้น ดังนั้นถ้าหากจุลินทรีย์สามารถทนต่อสภาพต่างๆ นี้ได้ ก็แสดงว่าจุลินทรีย์จะสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ในกุ้งก้ามกรามได้ จากผลการทดลองสามารถสรุปผลความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ (Table 7) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่อาจมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้แก่ *Bacillus* B_1, B_3 และ B_{10} และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{16} และ LA_{18} แต่เนื่องจาก *Bacillus* B_3 เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นพวกแกรมลบ อาจไม่ปลอดภัยในการนำมาใช้ ดังนั้นจึงนำเฉพาะ *Bacillus* B_1 และ B_{10} และแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{16} และ LA_{18} มาจำแนกสายพันธุ์โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Table 8) พบว่า *Bacillus* B_1 สัณนิษฐานว่าน่าจะเป็น *Bacillus licheniformis* และ B_{10} น่าจะเป็น *Bacillus thuringiensis* ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรีย LA_{13}, LA_{16} และ LA_{18} น่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกันและมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับจีนัส

Table 7. Conclusion of the growth ability of the selected isolates at various tested conditions.

Isolate	Conditions			
	Bile salt tolerance	NaCl tolerance	pH range	Thermo-tolerance
B_1	Good	Good	Good	Good
B_3	Good	Good	Good	Good
B_4	Poor	Poor	Poor	Poor
B_{10}	Good	Good	Good	Good
B_{12}	Fair	Fair	Fair	Good
LA_{12}	Fair	Good	Poor	Poor
LA_{13}	Fair	Good	Good	Good
LA_{14}	Fair	Poor	Good	Good
LA_{15}	Poor	Good	Good	Good
LA_{16}	Fair	Good	Good	Good
LA_{17}	Poor	Poor	Poor	Good
LA_{18}	Fair	Good	Good	Good

Table 8. The biochemical test of *Bacillus* B_1 , *Bacillus* B_{10} , lactic acid bacteria LA_{13}, LA_{16} and LA_{18}

Test	B_1	B_{10}	LA_{13}	LA_{16}	LA_{18}
Gram's strain	+	+	+	+	+
Shape	coccus	rod	coccus	coccus	coccus
Position of spore	-	central	-	-	-
Motility test	-	-	-	-	-
Gelatin test	+	-	-	-	-
Catalase test	+	+	-	-	-
Anaerobe	-	-	+	+	+
Utilization of					
- Sucrose	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
- Maltose	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-
- Glucose	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
- Lactose	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-
6.5% NaCl	+	+	+	+	+
18% NaCl	-	-	-	-	-
Growth at					
10°C	rare	rare	rare	rare	rare
40°C	+	+	+	+	+
Growth at					
pH 2	-	-	-	-	-
3	rare	rare	-	-	-
4	rare	rare	+	+	rare
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+

Note : + : positive, - : negative, rare : a little positive, +/+ : Fermentation and gas, +/- : Fermentation no gas, -/- : No fermentation no gas

Pediococcus จากผลการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นพวกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้จากลำไส้กุ้งเป็นครั้งแรก จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งส่วนใหญ่จะเป็นพวก *Bacillus* นอกจากนี้จะเป็นการใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ เช่นอาหารหมักดองต่างๆ หรือดินในบริเวณบ่อที่ใช้เลี้ยงกุ้งเพื่อเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งซึ่งอาจจะไม่สามารถอาศัยอยู่ในลำไส้กุ้งได้ ดังนั้นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

สำหรับขั้นตอนการศึกษาต่อไป จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญในอาหารที่ใช้ผลิต ศึกษาอัตราการรอดตายของเชื้อหลังจากการผสมในอาหาร และการนำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณพ่ออุดม เจ้าของอุดมฟาร์ม บ้านดอนนา จังหวัดมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกุ้งก้ามกราม และความสะดวกในการเก็บตัวอย่างตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กรมประมง สถานีกรมประมงน้ำจืด จ.มหาสารคาม ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาและขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์การทดลองตลอดจนความสะดวกในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2535. ตัวเสริมชีวนะ. ว.สัตว์เศรษฐกิจ. 10 (204) : 76-82.

วรรณิภา เพี้ยนภักดร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิศนุ บุญญาวิวัฒน์. 2541. โรคและความถดถอยทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกราม. จากการอภิปรายทางวิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติประจำปี 2541. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

ศุภชัย นิลวานิช. 2543. กลเม็ดสร้างอนาคตกับกุ้งก้ามกราม. มติชน, กรุงเทพฯ. ว.จาร์พา 42 : 54-57.

สนธิ แดงสกุล และ ลิลา เรืองแป้น. 2541. ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ว.การประมง 51(5) : 446-456.

Fuller, R. 1992. Probiotics The Scientific Basis. Chamman & Hall, London.

Havenaar, R. and Huis in't veld JMJ. 1992. Probiotics: a general views. **In:** Wood, B.J.W. (ed.), The lactic acid bacteria in health & desease. London: Elsevier Applied Science. 1 : 151-170.

Lilley, D.M. and Stillwell R.H. 1965. Probiotic : growth promoting factor produced by micro-organirms. Science. 147 : 747-788.

Parker, Rb. 1974. Probiotic, the other half of antibiotic story. Anim. Nutr. Health. 29 : 4-8.