นิพนธ์ต้นฉบับ

การคัดเลือกแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้งสำหรับย่อยสลายสารอินทรีย์

เกวลี จันทร์พันธุ์[1] สรวิศ เผ่าทองศุข[2] และ วรพจน์ สุนทรสุข[3]

Abstract

Chanpun, K.[1], Powtongsook, S.[2] and Suntornsuk, W.[1]

Bacterial Selection from Shrimp Ponds for Degradation of Organic Matters

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(1) : 89-99

Accumulation of ammonia, nitrite and hydrogen sulfide in a shrimp pond is generally caused by incomplete degradation of residual organic matters from overfeeding and from organic wastes released by shrimps. The phenomenon affects shrimp growth and survival rate. The objectives of this investigation were to screen for a bacterial strain able to digest organic residues and to evaluate the changes of residues by bacterial activities under natural conditions. The results from this work showed that the isolated strain, *Bacillus cereus* S1, had the highest protease activity (57.1 U/ml) with the presence of glucoamylase and lipase activities (4.5 and 0.13 U/ml, respectively). Under an aseptic condition in 1-L flasks containing seawater with 0.1% shrimp feed, *B. cereus* S1 degraded organic matters and significantly reduced chemical oxygen demand (COD) (70.8%). An amount of ammonia-nitrogen was increased during the first 5 days of incubation due to the degradation of organic compounds in shrimp feed. However, it declined afterward with nitrate-nitrogen increase and unchanged nitrite-nitrogen content. Under natural conditions in 10-L glass jars containing seawater with 0.05% shrimp feed and 0.05% sediment, *B. cereus* S1 and a commercial bacterial product (Inpicin-G) could reduce COD (4.5% and 15.8%, respectively) and biochemical oxygen demand (BOD) (35.1 and 11.4%, respectively). However, similar changes of ammonia-nitrogen, nitrate-nitrogen and nitrite-nitrogen

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Tungkru, Bangkok, 10140 Thailand. [2]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok, 10330 Thailand.

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ [3]Ph.D.(Food Science) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ทุ่งครุ กรุงเทพ 10140 [2]Ph.D.(Molecular Biology and Biotechnology)หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

Corresponding e-mail: worapot.sun@kmutt.ac.th

รับต้นฉบับ 19 มกราคม 2549 รับลงตีพิมพ์ 18 กรกฎาคม 2549

contents in water samples were observed. The results indicate that this selected bacterium could reduce organic compound accumulations on a laboratory scale. In addition, the strain did not produce any enterotoxins compared to a toxin standard. Therefore, the bacterium, *Bacillus cereus* S1, could be applied to decrease organic matters accumulated in shrimp pond without any harm to shrimps or consumers.

Key words : bacteria, organic matters, degradation, shrimp pond

บทคัดย่อ

เกวลี จันทร์พันธุ์ สรวิศ เผ่าทองศุข และ วรพจน์ สุนทรสุข

การคัดเลือกแบคทีเรียจากบ่อเลี้ยงกุ้งสำหรับย่อยสลายสารอินทรีย์

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(1) : 89-99

การย่อยสลายสารอินทรีย์จากอาหารกุ้งและของเสียจากกุ้งในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่สมบูรณ์ ก่อให้เกิดแอมโมเนีย ไนไตรท์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญและการอยู่รอดของกุ้ง งานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และศึกษาการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ในระดับห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* S1 ซึ่งคัดเลือกจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงคือ 57.1 หน่วย/มล. และพบกิจกรรมกลูโคอะไมเลสและไลเปส (4.5 และ 0.13 หน่วย/มล. ตามลำดับ) เมื่อใช้ *B. cereus* S1 ย่อยอาหารกุ้ง 0.1% ในสภาพปลอดเชื้อในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตรที่มีน้ำทะเล พบว่าค่า COD ในน้ำลดลง 70.8% ขณะที่ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นในช่วง 5 วันแรก เนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์จากอาหารกุ้ง หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียจะลดลงและปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณไนไตรท์มีการสะสมและเปลี่ยนแปลงน้อยมาก สำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์จากอาหารกุ้ง 0.05% ในบ่อจำลองขนาด 10 ลิตรที่มีน้ำทะเลและตะกอนดิน 0.05% โดยเปรียบเทียบแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับจุลินทรีย์ที่จำหน่ายทางการค้า (อินพิชิน-จี) พบว่าแบคทีเรีย *B. cereus* S1 และอินพิชิน-จีสามารถลดค่า COD ในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งเท่ากับ 4.5 และ 15.8% ตามลำดับ ขณะที่แบคทีเรียทั้งสองลดค่า BOD 35.1 และ 11.4% ตามลำดับ แต่การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนมีค่าใกล้เคียงกัน จะเห็นว่าแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ที่คัดแยกได้สามารถลดการสะสมของสารอินทรีย์ในสภาพคล้ายบ่อเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้แบคทีเรียดังกล่าวไม่ผลิตสารพิษที่ไม่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในคนและไม่ก่อผลเสียต่อกุ้ง ดังนั้น *B. cereus* S1 น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งตามธรรมชาติได้

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งได้พัฒนาเป็นอาชีพโดยเลี้ยงมากในแถบจังหวัดตามแนวชายฝั่งทะเลเช่น ระยอง ฉะเชิงเทรา เพชรบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร นครศรีธรรมราช ชุมพร กระบี่และพังงา เป็นต้น การเลี้ยงกุ้งนำรายได้เข้าประเทศปีละไม่ต่ำกว่า 60,000 ล้านบาท คิดเป็นปริมาณ 360,000 เมตริกตัน/ปี เกิดการกระจายรายได้สู่เกษตรกรกว่า 33,000 ครัวเรือน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) เมื่อเกษตรกรมีความสนใจในด้านการเลี้ยงและการผลิตกุ้งเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาตามมาเช่น ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม มีการบุกรุกพื้นที่ป่าชายเลนการใช้ยาและสารเคมีในการเลี้ยงกุ้งและการปล่อยของเสีย (สารอินทรีย์ที่เหลือในบ่อเลี้ยงกุ้ง) จากบ่อสู่แหล่งน้ำ

ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมนับว่าเป็นปัญหาใหญ่ที่ควรได้รับการแก้ไขโดยเฉพาะปัญหาด้านการบำบัดของเสียภายในบ่อเลี้ยงกุ้ง เพราะของเสียที่เกิดขึ้นภายในบ่อจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง เมื่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงจะทำให้อัตราการเจริญและอัตราการอยู่รอดของกุ้งลดลง นอกจากนี้การปล่อยน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีของเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะของเสียในบ่อกุ้งมีปริมาณ BOD (biochemical oxygen demand) ปริมาณ TSS (total suspended solid) และมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูง มีผลต่อความเป็นพิษของสัตว์น้ำ (ประจวบ, 2527)

ในปัจจุบันวิธีการกำจัดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งมีหลาย

วิธี อาทิ การใช้สารเคมีช่วยกำจัดสารอินทรีย์ แต่วิธีนี้ทำให้เกิดการตกค้างและการสะสมของสารเคมี (Chanratchakool *et al*, 1994) การใช้ระบบการกรองและการบำบัดโดยวิธีออกซิเดชั่น (พุทธ, 2543) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับระบบปิดที่มีการนำน้ำกลับมาใช้ใหม่ การใช้แบคทีเรียในการบำบัดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งนับเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามแบคทีเรียดังกล่าวที่ขายตามท้องตลาดมักต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้ประเทศสูญเสียเงินตราเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ในประเทศจะช่วยลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ นอกจากนี้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้อาจมีคุณสมบัติที่ดีกว่าแบคทีเรียจากต่างประเทศ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีสภาวะการเจริญเติบโตเหมาะกับสภาวะแวดล้อมในประเทศไทย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบและอุปกรณ์

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง จำนวน 10 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ ดังนี้ บ่อบำบัดคุณภาพน้ำทะเลของระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดต่างๆของหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และบ่อเลี้ยงกุ้ง (ต.กระโสม อ.เมือง จ.พังงา)

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์เบื้องต้น

การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์เบื้องต้นโดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี total plate count บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม heterotrophic bacteria โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ (โปรตีน แป้ง และไขมัน) จากการเกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร skim milk agar และ starch agar (Atlas,1995) และเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีบนอาหาร Tween 80 agar (Atlas,1995) และศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Keay และ Wildi, 1970) (1 หน่วยกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (U) หมายถึงความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเคซีนได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ (37°C)) เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Bernfeld, 1955) 1 หน่วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (U) หมายถึงความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยแป้งได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ (50°C)) และเอนไซม์ไลเปส (Horani, 1996) (1 หน่วยเอนไซม์ไลเปส (U) หมายถึงความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยน้ำมันมะกอกได้เป็นกรดไขมันในรูปของกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ (30°C)) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารกุ้ง (CP 9004 S บริษัทโภคภัณฑ์อะควอเทค จำกัด) 1% ในน้ำทะเลที่ความเค็ม 20 ส่วนในพัน (ppt) ปริมาตร 200 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ในสภาพปลอดเชื้อเลี้ยงภายใต้สภาวะ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ โดยมีแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 (ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี) เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทำโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Sneath *et al*, 1986) และใช้ชุดทดสอบ API 50 (bioMerieux®,France) นอกจากนี้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของผลผลิต PCR ที่ได้จากการสกัด DNAของแบคทีเรีย โดยใช้ Forward primer GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3' และ Reverse primer คือ 5' -CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3' ด้วย PCR Amplification kit (Takara Mirus Bio, U.S.A.) และ Taq Dye Deoxyterminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) (Sambrook *et al*, 1989; Innis และ

Gelfand, 1990) เปรียบเทียบลำดับเบสดังกล่าวกับลำดับเบสอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

3. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะบ่อกุ้งจำลองโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.1. การทดสอบเบื้องต้นโดยใส่อาหารกุ้ง 0.1% ลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มล. ที่มีน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพัน ความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.0 ปริมาตร 500 มล. ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ อายุ 18 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหาร nutrient broth จำนวน $2x10^8$ CFU เลี้ยงในสภาวะ 30°C และให้อากาศ (ประมาณ 5-7 มก.O_2/ลิตร) ผ่านการกรองด้วยเยื่อเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน และปิดฝาสนิท เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน (แอมโมเนีย ไนเตรทและไนไตรท์) โดยการวิเคราะห์แอมโมเนียและไนไตรท์ ดัดแปลงจากวิธีของ Stickland และ Parsons (1972) โดยการวิเคราะห์แอมโมเนียใช้สารละลายตัวอย่าง 5 มล. ผสมกับสารละลาย phenol 10% ปริมาตร 0.2 มล.และสารละลาย sodium nitroprusside 0.5% ปริมาตร 0.2 มล.และสารละลาย oxidizing ปริมาตร 0.5 มล.แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนการวิเคราะห์ไนไตรท์ใช้สารละลายตัวอย่าง 5 มล. ผสมกับสารละลาย sulphanilamide 1% ปริมาตร 0.1 มล. และสารละลาย N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 0.1% ปริมาตร 0.1 มล. แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ การวิเคราะห์ไนเตรทใช้ชุดทดสอบ Spectroquant Nitrate Test (Merck, Germany) ปริมาณสารอินทรีย์ (COD; APHA, 1995) และทดสอบการผลิตสารพิษเบื้องต้นของแบคทีเรียในน้ำตัวอย่างด้วยชุดทดสอบ Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (TECRA International, Australia) ซึ่งใช้หลักการของ ELISA ในการตรวจวัด Enterotoxin ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นค่าที่วัดจากการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density) ที่ 414 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับค่าสารพิษมาตรฐาน พร้อมกันนี้ทำชุดควบคุมที่มีน้ำทะเลและอาหารกุ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่เติมแบคทีเรีย และมีสภาวะการทดลองอื่น ๆ เหมือนกันกับตัวอย่าง (ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ)

3.2. การทดสอบในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้โหลแก้วขนาด 10 ลิตรที่ใส่อาหารกุ้ง 0.05% และตะกอนดิน 0.05% (เตรียมโดยอบตะกอนดินจากบ่อกุ้งให้แห้งที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และบดให้ละเอียด) ในน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพัน ความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.0 ปริมาตร 5 ลิตร ใช้สภาวะการเลี้ยง 30°C และให้อากาศ (ประมาณ 5-7 มก.O_2/ลิตร) เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน $2x10^9$ CFU เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ทางการค้า (อินพิซิน-จี,บริษัท ซีเอมซี จำกัด) จำนวน $2x10^9$ CFU โดยมีชุดควบคุมคือน้ำทะเลที่มีตะกอนดินและอาหารกุ้งเหมือนกันแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุกวันเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบไนโตรเจน (แอมโมเนีย ไนเตรทและไนไตรท์) ปริมาณโปรตีน (Bradford, 1975) ปริมาณสารอินทรีย์ (COD) ค่า BOD (APHA, 1995) และการผลิตสารพิษเบื้องต้นของแบคทีเรีย (ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์เบื้องต้น

จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทะเลและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 10 ตัวอย่างมีปริมาณแตกต่างกันอยู่ในช่วงระหว่าง $1.4x10^2$- $9.5x10^3$ CFU/มล. หรือ CFU/กรัม ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อในธรรมชาติที่พบในบริเวณบ่อกุ้ง นอกจากนี้จำนวนแบคทีเรียยังขึ้นกับความสะอาดของบ่อเลี้ยงกุ้งอีกด้วย ถ้าปริมาณเชื้อในธรรมชาติที่พบในบริเวณบ่อกุ้งมีมากกว่านี้อาจแสดงถึงคุณภาพน้ำหรือดินของบ่อกุ้งไม่ดี ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งคืออาจส่งผลให้กุ้งเกิดโรคได้ (สรวิศ, 2541)

สำหรับการย่อยสลายโปรตีนบน skim milk agar การย่อยแป้งบน starch agar และการย่อยไขมันบน Tween 80 agar เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินทั้งหมด พบแบคทีเรียจำนวน 13 สายพันธุ์แสดงลักษณะที่ดีบนอาหารคัดเลือกดังกล่าว โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ S1

สร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร skim milk agar ได้ดีที่สุด แบคทีเรียสายพันธุ์ SK4 และ S5 สร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร starch agar ได้ดีที่สุด รวมทั้งสร้างตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีบนอาหาร Tween 80 agar นอกจากนี้ แบคทีเรียสายพันธุ์ PW1 และ S3 สร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร skim milk agar และ starch agar ได้ดี และสร้างตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีบนอาหาร Tween 80 agar (Table 1) ทั้งนี้แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงทั้งสองสายพันธุ์ (*B. subtilis* TISTR 008 และ *B.licheniformis* TISTR 1010) สร้างบริเวณใสและสร้างตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีบนอาหารได้เช่นกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ข้างต้นเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์ไลเปสในอาหารน้ำทะเลซึ่งมีอาหารกุ้ง 1% ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีการเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 6-24 หลังจากนั้นจะเข้าสู่ช่วง stationary phase จาก Table-2 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (57.1 หน่วย/มล.) สอดคล้องกับผลการย่อยโปรตีนบน skim milk agar แต่สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง *B. subtilis* TISTR 008 และ B. *licheniformis* TISTR 1010 ผลิตได้สูงกว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ผลิตได้ไม่ดีนัก เนื่องจากอาหารกุ้งมีปริมาณไขมันต่ำ (ยนต์, 2529) ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์หรือผลิตเอนไซม์น้อย ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดและกลูโคอะไมเลสสูง และสามารถผลิตไลเปสได้ จึงถูกเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การทดสอบสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ S1 มีลักษณะเซลล์เดี่ยว รูปท่อน ย้อมติดสีแกรม variable สร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ทั้งบริเวณปลายและกลางเซลล์ คาด

Table 1. Degradation of organic substrates on selective media by isolated bacteria

Isolate	Skim milk agar	Starch agar		Tween 80 agar[c]
	(clear zone ratio) [a]	I_2 [b]	Clear zone ratio [a]	(precipition)
T4	1:2.8	+	1:1.6	-
T1	1:5	+	1:3	-
S4	1:3.5	+	1:1.8	-
SK4	1:5	+	1:3	+
S1	1:8.5	+	1:1.2	-
SK1	1:6	+	1:1.5	-
S5	1:4	+	1:1.2	+
SK5	1:3.7	+	1:3	+
S3	1:5	+	1:1.2	+
SK3	1:5	+	1:1.3	-
PW1	1:4.2	+	1:1.7	+
SK PS2	1:4	-	-	-
SK PS1	1:3.2	-	-	-
B. licheniformis TISTR 1010	1:5	+	1:1.2	+++
B. subtilis TISTR 008	1:3.7	+	1:2	++

[a] colonial diameter : clear zone diameter

[b] - No clear zone + Clear zone

[c] - No precipitation + Precipitation ++ Good precipitation

+++ Very good precipitation

Table 2. Enzyme activities of isolated bacteria

Isolates	Enzyme activities [a] (U/ml)		
	Protease	Glucoamylase	Lipase
PW1	**56.5 (72 h)**	**0.4 (48 h)**	**0.33 (48 h)**
S1	**57.1 (66 h)**	**4.5 (48 h)**	**0.13 (18 h)**
S3	**48.9 (72 h)**	**1.9 (48 h)**	**0.15 (18 h)**
SK4	**52.7 (66 h)**	**3.3 (48 h)**	**0.33 (48 h)**
S5	**32.9 (72 h)**	**1.7 (48 h)**	**0.20 (48 h)**
B. subtilis **TISTR 008**	**34.7 (72 h)**	**16.5 (48 h)**	**0.13 (72 h)**
B. lichenifomis **TISTR 1010**	**23.1 (72 h)**	**6.0 (48 h)**	**-**

[a] **Activity (time period showing the highest activity), - no activity**

ว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จึงทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและชุดทดสอบ API 50 CHB (แปลผลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป API LAB) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 จัดเป็น *Bacillus cereus* ด้วย very good identification ที่ % ID 99.5 (ไม่ได้แสดงผล) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 จำนวน 1450 bp (Figure 1) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *B. cereus* strain J-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสาร polyvinyl alcohol ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) ประมาณ 93% ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 จึงจัดเป็น *B. cereus* โดยทั่วไปแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง โปรตีนและไขมันได้ โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ซึ่งสามารถนำไปผลิตเอนไซม์ทางการค้า อย่างไรก็ตามในแหล่งน้ำอาจพบแบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์อื่นๆ อาทิ *Aerobacter aerogenes, Staphylococcus* spp.และ *Pseudomonas* spp. (Bitton, 1994)

2. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์เบื้องต้นด้วยแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ในฟลาสก์ที่มีน้ำทะเลและอาหารกุ้ง 0.1% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นในช่วง 5 วันแรกของการเลี้ยงเนื่องจากการย่อยสารอินทรีย์ในอาหารกุ้งด้วยกิจกรรมของแบคทีเรีย *B. cereus* S1 หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียเริ่มลดลงเนื่องจากแบคทีเรียอาจใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตแทนอาหารกุ้งซึ่งหมดลง หรือแอมโมเนียอาจระเหยออกจากระบบ ในขณะที่ปริมาณของ ไนเตรทและไนไตรท์มีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกันคือมีปริมาณสูงขึ้นในวันที่ 1 หลังจากนั้นจะลดลงและเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (Figure 2) ขณะที่มีการสะสมไนไตรท์น้อยมากเพราะไม่มีกิจกรรมของแบคทีเรียที่สามารถใช้แอมโมเนียเพื่อเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท (ไม่มี nitrifying bacteria) ทั้งนี้ปริมาณสารไนโตรเจนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสารอินทรีย์มีค่าไม่สูงนักเมื่อเทียบกับปริมาณสารไนโตรเจนตามธรรมชาติในบ่อเลี้ยงกุ้งคือไม่เกิน 15 มก/ลิตร (Alcaraz *et al*, 1999) สำหรับชุดควบคุมปริมาณสารไนโตรเจนทั้ง 3 เปลี่ยนแปลงไม่มากนักหรือไม่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากไม่มีกิจกรรมของแบคทีเรียใดๆ เข้ามามีบทบาท สำหรับค่า COD ในน้ำตัวอย่างจากฟลาสก์ที่มีแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ในวันที่ 7 มีค่าลดลง 70.8% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเนื่องจากแบคทีเรียย่อยสารอินทรีย์ในอาหารกุ้ง (Figure 3) นอกจากนี้แบคทีเรียไม่ผลิตสารพิษเมื่อเทียบกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของมาตรฐานสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ (Table 3) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ซึ่งแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษโดยเฉพาะในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 20 ส่วนในพันและมีเพียงอาหารกุ้งเป็นสารอาหารหรือแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค

1	CGGCGTGCTA	TCATTGCAAG	TCGAGCGAAT	GGATTAAGAG	CTTGCTCTTA
100	TGAAGTTAGC	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG
150	ACTGGGATAA	CTCCGGGAAA	CCGGGGCTAA	TACCGGATAA	CATTTTGAAC
200	CGCATGGTTC	GAAAATGAAA	GGCGGCTTCG	GCTGTCCACT	TATGGATGGA
250	CCCGCGTCGC	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	ACGGCTCACC	AAGGCAACGA
300	TGCGTAGCCG	ACCTGAGAGG	GTGATCGGCC	ACACTGGGAC	TGAGACACGG
350	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCGC	AATGGACGAA
400	AGTCTGACGG	AGCAACGCCG	CGTGAGTGAT	GAAGGCTTTC	GGGTCGTAAA
450	ACTCTGTTGT	TAGGGAAGAA	CAAGTGCTAG	TTGAATAAGC	TGGCACCTTG
500	ACGGTACCTA	ACCAGAAAGC	CACGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT
550	AATACGTAGG	TGGCAAGCGT	TATCCGGAATT	ATTGGGCGTA	AAGCGCGCGC
600	AGGTGGTTTC	TTAAGTCTGA	TGTGAAAGCC	CACGGCTCAA	CCGTGGAGGT
650	CATTGGAAAC	TGGGAGACTT	GAGTGCAGAA	GAGGAAAGTG	GAATTCCATG
700	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	AGATATGGAG	GAACACCAGT	GGCGAAGGCG
750	ACTTTCTGGT	CTGTNAACTG	ACACTGAGGC	GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA
800	CAGGATTAGA	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA	GTGCTAAGTG
850	TTAGAGGGTT	TCCGCCCTTT	AGTGCTGAAG	TTAACGCATT	AAGCACTCCG
900	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA	GGCTGAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGGCC
950	CGCNCNANCG	GTGGAGCANG	TGGTTTAATT	TGNAGCAACG	NGAAGAACCT
1000	TNCCAGGTNT	TGACATNCTT	TGNCAACCCT	AGAGATAGGG	CTTTTNCTTT
1050	GGGAGCAGAG	TGACNGGTGG	TGCANGGTTG	TTGTNANCTT	GTGTTGTGAG
1100	ANGTTGGGTT	AAGTNCCGCA	ACGAGNGCNA	CCCTTGATTT	TAGTTGCCAT
1150	CANTTAGTTG	GGCNCTTTAA	GGTGNCTGCC	GGTGACNAAC	CGGAGGAAGG
1200	TGGGGANGNN	GTCAAATNAT	CATNCCCCTT	ATGNCCTNGG	NTACNCNCGT
1250	GNTNCAATGG	NCGGTACAAA	GANNTGCAAG	NCCNNGAGGT	GGANNTNATT
1300	TNATAAAACC	GTTTTCAGTT	TGGNTTGTAG	GNTGCAACTT	GCCTACANGN
1350	AGCNGGNATN	GNTNGTAATN	GNGGATNANC	NNGNCGCGGN	GAATNCGTTN
1400	CCGGGCCTTG	TACNCNCCGC	CCGTCNCNCC	NCGAGAGTTT	GTAACNCCCG
1450	AAGTNGGTGG	GGTAACCTTT	TTGGAGCCAG	CCGCCTAAGG	GGGACAGATG

Figure 1. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene of the isolate S1

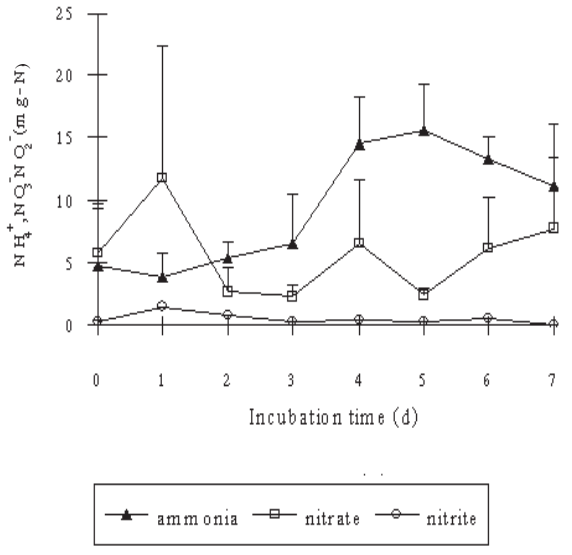

Figure 2. Amounts of nitrogen species dissolved in seawater samples from flasks containing 0.1% shrimp feed degraded by B. cereus S1 under aseptic condition

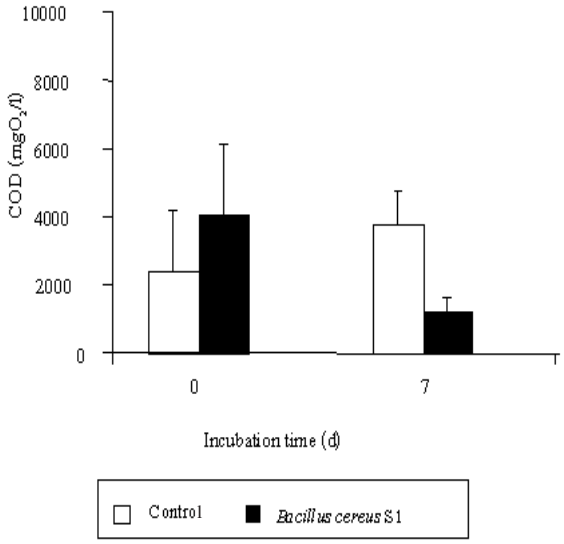

Figure 3. Chemical oxygen demand in seawater samples from flasks containing with 0.1% shrimp feed under aseptic condition

Table 3. Toxin production by *Bacillus cereus* S1 from seawater samples

Sample	Toxin level*
Toxin standard	0.86
Samples from flasks	0.07-0.10
Samples from glass jars	0.06-0.07

*** Toxin level was expressed as the measurement of optical density at 414 nm after the ELISA method using 200 µl sample mixed with 200 µl substrate. The level of 0.2 or less was considered as no toxin presence.**

(non-pathogenic strain) ซึ่ง Fritze (2002) รายงานถึงแบคทีเรีย *B. cereus* ที่จัดเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคอาจใช้เป็น probiotic ได้ นอกจากนี้ไม่พบอุบัติการของอาหารเป็นพิษจากแบคทีเรีย *B. cereus* ในอาหารประเภทกุ้งทั้งนี้ความเป็นพิษจากแบคทีเรียดังกล่าวมักพบในอาหารประเภทแป้ง ข้าว มันฝรั่ง สลัด ซ๊อส และพุดดิ้ง (Johnson, 1984; Granum and Baird-Parker 2000) อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการใช้แบคทีเรียนี้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งจริง พร้อมกับการเก็บข้อมูลการใช้อาหารของกุ้ง อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการตายของกุ้ง น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้ง จำนวนแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งการวิเคราะห์สารพิษในตัวกุ้งเพื่อความมั่นใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งและความปลอดภัยของผู้บริโภค

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียในบ่อจำลองโดยเปรียบเทียบการย่อยสลายอาหารกุ้งด้วยแบคทีเรีย *B. cereus* S1 และอินพิซิน-จี พร้อมกับชุดควบคุม (ไม่มีการเติมแบคทีเรียในอาหารกุ้ง 0.05% และตะกอนดิน 0.05% ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ) พบว่าปริมาณแอมโมเนียของทั้ง 3 ชุดการทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นคล้ายกันจนถึงวันที่ 7-8 เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนในอาหารกุ้งด้วยกิจกรรมของแบคทีเรีย จากนั้นปริมาณแอมโมเนียเริ่มลดลงเพราะการย่อยสลายโปรตีนดังกล่าวลดน้อยลงเนื่องจากจำนวนแบคทีเรียเริ่มลดลงเพราะปริมาณอาหารกุ้งเริ่มหมดและแบคทีเรียอาจใช้แอมโมเนียในการเจริญเติบโต ทั้งนี้ปริมาณแอมโมเนียของชุดอินพิซิน-จีถูกปลดปล่อยมากกว่าชุดแบคทีเรีย *B. cereus* S1 และชุดควบคุม อาจเป็นเพราะอินพิซิน-จีเป็นผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ผสมที่มีการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีกว่า *B. cereus* S1 ขณะที่ชุดควบคุมมีเพียงแบคทีเรียธรรมชาติในตัวอย่างน้ำทะเลและตะกอนดิน รวมทั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารกุ้ง (Figure 4 A) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียในการทดลองนี้มีค่าสูงเนื่องจากมีปริมาณสารอินทรีย์ในตะกอนดินสูง สำหรับปริมาณไนเตรทมีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนทั้ง 3 ชุดการทดลอง (Figure 4 B) ทั้งนี้ปริมาณไนเตรทที่มีการเปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียที่สามารถใช้แอมโมเนียเพื่อเปลี่ยนเป็นไนเตรทรวมทั้งกิจกรรมของแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรียธรรมชาติในตัวอย่างน้ำทะเลและตะกอนดินรวมทั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารกุ้ง ขณะที่ปริมาณไนไตรท์มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 ชุดการทดลองคล้ายคลึงกันเช่นกัน (Figure 4 C) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการย่อยอาหารกุ้งส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายอยู่ในน้ำในบ่อจำลองลดลงในแต่ละวัน (Figure 5) โดยโปรตีนนี้จะถูกแบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทำให้ในวันที่ 3 มีปริมาณโปรตีนลดลงและปลดปล่อยแอมโมเนียออกมา ปริมาณแอมโมเนียจึงเพิ่มสูงขึ้น เมื่อโปรตีนถูกใช้หมดปริมาณแอมโมเนียจะเริ่มคงที่ ชุดแบคทีเรีย *B. cereus* S1 สามารถลดปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ยได้มากกว่าอินพิซิน-จี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าจุลินทรีย์ในอินพิซิน-จี อาจกล่าวได้ว่าสามารถใช้ *B. cereus* S1 แทนอินพิซิน-จี สำหรับชุดควบคุมที่มีน้ำทะเลที่มีตะกอนดินและอาหารกุ้งเหมือนกันแต่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ปริมาณโปรตีนที่ละลายออกจากอาหารกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ปริมาณแอมโมเนียปล่อยออกมาในสารละลายน้อย เป็นเพราะจำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมมีปริมาณน้อยกว่าจึงเกิดปฏิกริยาต่าง ๆ ได้ช้ากว่าการใช้ *B. cereus* S1 และอินพิซิน-จี จะเห็นได้ว่าการเติมแบคทีเรียลงในบ่อจำลองช่วยเพิ่มการย่อยสลายสารอินทรีย์นอกเหนือจากแบคทีเรียตามธรรมชาติ นอกจากนี้แบคทีเรียจากธรรมชาติ (น้ำทะเล ดิน และอาหารกุ้ง) มีส่วนช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สำหรับค่า COD จากชุดแบคทีเรีย *B. cereus* S1 และอินพิซิน-จี พบว่าค่า COD ของทั้งสองชุดการทดลอง

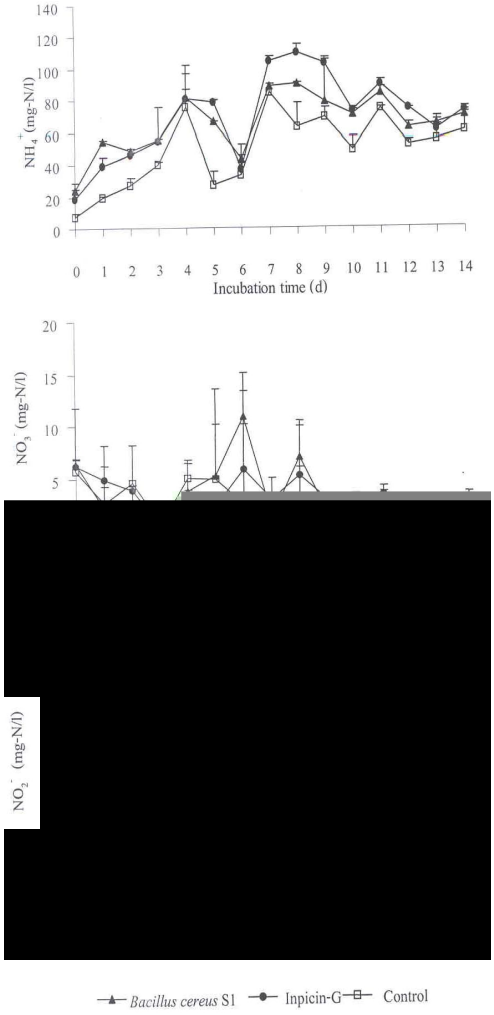

Figure 4. Amounts of nitrogen species dissolved in seawater samples from glass jars containing 0.05% shrimp feed and 0.05% sediment under natural conditions. A. ammonia B. nitrate C. nitrite

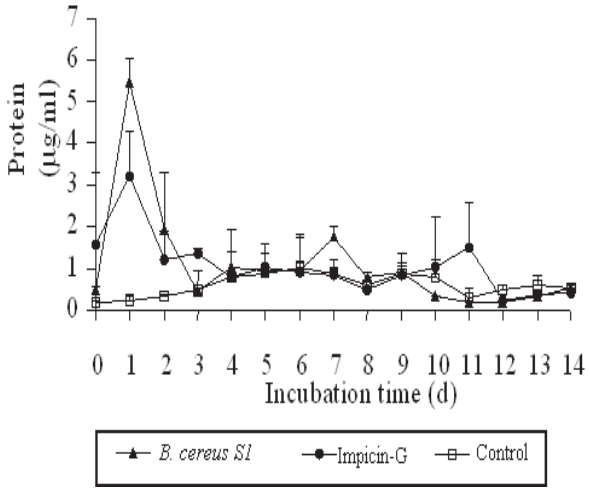

Figure 5. Changes of soluble proteins in seawater samples from glass jars containing 0.05 % shrimp feed and 0.05% sediment under natural condition

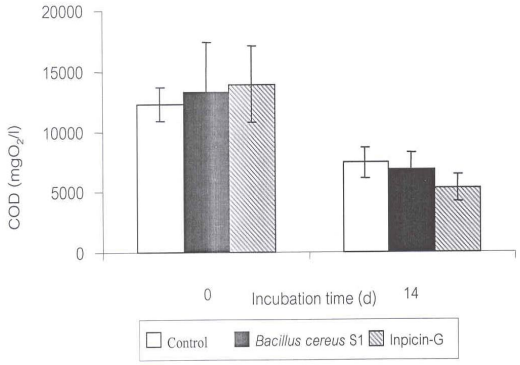

Figure 6. Chemical oxygen demand in seawater samples from glass jars containing 0.05 % shrimp feed and 0.05% sediment under natural condition

ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2-3 และลดเพียงเล็กน้อยในแต่ละวันจนถึงวันที่ 14 (ไม่ได้แสดงผล) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมค่า COD ในวันที่ 14 ของชุดอินพิซิน-จี ลดลงมากถึง 15.8% ขณะที่แบคทีเรีย *B. cereus* S1 ลดค่า COD ได้ 4.5% (Figure 6) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอินพิซิน-จีเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีเชื้อต่างชนิดผสมกันซึ่งอาจมีทั้งเชื้อกลุ่ม Heterotroph และ Nitrifying Bacteria อย่างไรก็ตามการลดลงของค่า BOD จากการย่อยสลายอาหารกุ้งของแบคทีเรีย *B. cereus* S1 มีค่ามากกว่าของอินพิซิน-จี (ในวันที่ 7) คือมีค่าเป็น 35.1% และ 11.4% ตามลำดับ (Table 4) ดังนั้นแบคทีเรีย *B. cereus* S1 สามารถลดค่า BOD ได้ดีกว่าอินพิซิน-จี นอกจากนี้ผลการทดสอบการสร้างสารพิษของแบคทีเรีย *B. cereus* S1 ในบ่อจำลองพบว่าไม่มีปริมาณสารพิษซึ่งผลใกล้เคียงกับการทดลองเบื้องต้น (Table 3)

สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีน แป้ง และไขมัน จากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินบนอาหารคัดเลือก พบว่าแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี คือสายพันธุ์ S1, SK4, S5, PW1 และ S3 โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุด พร้อมทั้งย่อยแป้งและไขมันได้ด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์ S1 จัดเป็น *Bacillus cereus*

ในการย่อยอาหารกุ้งในบ่อจำลอง พบว่าแบคทีเรีย *B. cereus* S1 สามารถลดค่า BOD ได้มากกว่าจุลินทรีย์

Table 4. Biochemical oxygen demand in seawater samples from glass jars containing 0.05 % shrimp feed and 0.05% sediment on day 7 under natural condition

Sample	BOD (mgO_2/ml)
Control	190.8[a]
B. cereus S1	101.7[c]
Inpicin-G	169.0[b]

[a, b, c] **Different letters in the same column indicate a significant difference (P<0.05)**

ทางการค้า (อินพิซิน-จี) และลดค่า COD ปริมาณแอมโมเนียและปริมาณไนเตรทได้ทั้งนี้แบคทีเรีย *B. cereus* S1 ผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะไมเลสและไลเปสเพื่อย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันในอาหารกุ้งหรือตะกอนดิน เกิดเป็นสารประกอบแอมโมเนียที่ปล่อยออกมาในน้ำ โดย *B. cereus* S1 ไม่มีการสร้างสารพิษ ขณะที่ชุดควบคุมสามารถลดสารอินทรีย์ในอาหารกุ้งและตะกอนดินได้เช่นกัน แต่ใช้เวลาการย่อยสลายนานกว่า เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียที่มีตามธรรมชาตินั้นมีปริมาณน้อยกว่า ดังนั้นแบคทีเรีย *B. cereus* S1 น่าจะนำไปใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งได้เนื่องจากคัดแยกจากบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยแบคทีเรียนี้สามารถทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในบ่อเลี้ยงกุ้ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากงบประมาณรัฐบาลสำหรับการวิจัยเพื่อมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ประจำปี 2547-2548 ขอขอบคุณ ดร. สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์ นักวิจัย 2 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการช่วยเหลือและให้คำแนะนำการพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

เอกสารอ้างอิง

ประจวบ หลำอุบล. 2527. กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2543. บอกเล่าเก้าสิบ. ริมบ่อ 28 : 8-28.

ยนต์ มุสิก. 2529. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2541.การศึกษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมในระบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในประเทศไทย. วารสารวาริชศาสตร์ 4 (1-2): 1-19.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548. Available Protocol: http://www.oae.go.th/OAE-WEB-SITE/profile/commodityPRo/index.htmlstage1=sec1.6&stage2=shimp.pdf [9 มกราคม 2549]

Alcaraz, G., Xavier, C.C., Verronica E. and Ceclilia V. 1999. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. J. World Aquaculture Soc. 30 (1): 90-97.

APHA, AWWA and WPCF. 1995. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington D. C.

Atlas, M. R. 1995. Handbook of Media for Environmental Microbiology. CRC Press, New York.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. Methods Enzymol. 1:149-158.

Bitton, G. 1994. Waste Water Microbiology. Library of Congress Cataloging, New York.

Bradford, M.M. 1975. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of pro-

tein utilizing the principle of protein-dry binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Chanratchakool, P., Turnbull, J.F., Funge-Smith, S.J. and Limsuwan,C. 1994. Health management in shrimp ponds. Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Bangkok, Thailand.

Fritze, D. 2002. *Bacillus* Identification-Traditional Approaches. In Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. eds. Berkeley, R., Heyndrickx, M. Logan N. and De Vos P. p100-122. Blackwell Publishing, Oxford.

Granum P.E. and Baird-Parker, T. C. 2000. *Bacillus* spp. In The Microbiological Safety and Quality of Food. eds Lund B. *et al*, pp 1029-1039. Aspen Publishers, Gaithersburg.

Horani, H.K. 1996. Thermotolerant strain of *B. licheniformis* producing lipase.World J. Microbiol. Biotechnol.12 : 399-401.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. In PCR Protocols eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. pp. 3-12. Academic Press, San Diego.

Johnson, KM 1984 *Bacillus cereus* foodborne illness-an update J. Food Protection 47: 145-153.

Keay, A.J. and Wildi, B.S. 1970. Proteases of the genus *Bacillus*-neutral proteases. Biotechnol. Bioeng. 12 : 179-211.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore.

Stickland, J.D.H. and Parsons, T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fisheries Research Board of Cananda, Ottawa.