

การเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีริโอซินจาก *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENHANCEMENT OF BACTERIAL PATHOGEN INHIBITION BY BACTERIOCIN FROM
BACILLUS LICHENIFORMIS ISOLATED FROM INTESTINAL TRACT OF SHRIMP



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีริโอซินจาก <i>Bacillus licheniformis</i> ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง
โดย	นางแพรทิพย์ คล้ายเจริญสุข
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

..... กรรมการ
(ดร.รัชนิพร ตียะวิสุทธิ์ศรี)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑา มุกดาสนิท)

แพรทีพม์ คล้ายเจริญสุข : การเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีริโอซินจาก *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง. (ENHANCEMENT OF BACTERIAL PATHOGEN INHIBITION BY BACTERIOCIN FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS* ISOLATED FROM INTESTINAL TRACT OF SHRIMP) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเป็นแหล่งอาหาร มีผลต่อความมั่นคงทางอาหารและโภชนาการของมนุษย์ โดยกุ้งทะเลจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา เนื่องจากเป็นสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศทั่วโลก แต่ในปี พ.ศ. 2555-2556 การเลี้ยงกุ้งเริ่มประสบปัญหาโรคระบาดอย่างหนักจากอาการตายด่วน เนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (Early mortality syndrome/ acute hepatopancreatic necrosis disease : EMS/AHPND) ทำให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรและส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรม รวมไปถึงสูญเสียส่วนแบ่งการตลาดและมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลเป็นอย่างมาก ต่อมาได้มีการพัฒนาจุลินทรีย์ ป.ม.1 ที่เป็นโพรไบโอติกในกลุ่มบาซิลลัส เพื่อลดอัตราการเกิดโรค ซึ่งเชื้อ *B. licheniformis* ที่รวมในกลุ่มโพรไบโอติกนี้ มีความสามารถสร้างแบคทีริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ มีคุณสมบัติทนความร้อน 100 °C ทำงานได้ดีในค่าความเป็นกรด-ด่างกว้าง จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อ *B. licheniformis* และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค จากการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth มีความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6 CFU/มิลลิลิตร ในสภาวะที่ปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ช่วงเวลา และความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกัน ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยวิธี Total plate count พบว่า ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Cell Free Supernatant: CFS) สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้แก่ เชื้อ *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือความเข้มข้น 2.5% และเมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* ร่วมกับเซลล์ของเชื้อทดสอบที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ จากนั้นตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ของเชื้อทดสอบมีลักษณะเป็นรู นอกจากนี้พบว่าสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงและจาก *B. licheniformis* ร่วมกับเซลล์ *V. alginolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน มีความสามารถทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบมีขนาดเล็กลง และลดการเกาะกลุ่มของเชื้อทดสอบได้ดี ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Cell-Free Supernatant) ที่ได้จากการคัดเลือกโปรตีนให้มีย่านหนักไม่เกิน 10 kDa และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) พบสายเปปไทด์ที่ค่า Denovo score ร้อยละ 70 ขึ้นไป จำนวน 617 ลำดับ โดยมีถึง 349 เปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็น antimicrobial peptide โดยมี 8 เปปไทด์มีคุณสมบัติคล้ายแบคทีริโอซินในกลุ่มแลนติโอบีโอติก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง โดยการเพิ่มประสิทธิภาพจากการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง และเทคนิคการเลี้ยงร่วม จึงเป็นที่น่าสนใจนำมาพัฒนาและปรับใช้เพื่อแก้ปัญหาโรคตายด่วนในกุ้งอย่างยั่งยืนด้วยวิธีการทางชีวภาพจากการใช้เปปไทด์ต้านจุลชีพ อีกทั้งเป็นการลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต

ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6176754937 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD:

Praetip Klaycharoensuk : ENHANCEMENT OF BACTERIAL PATHOGEN INHIBITION BY BACTERIOCIN FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS* ISOLATED FROM INTESTINAL TRACT OF SHRIMP. Advisor: Asst. Prof. Dr. KHAEMAPORN BOONBUMRUNG

Aquaculture as a food source affects food security and human nutrition. Marine shrimp has been ranked as the number one economic aquatic animal in Thailand since 1991. Due to this, it is a popular aquatic animal for consumption both domestically and internationally. However, shrimp farming began to be disrupted by severe disease outbreaks in 2013, including Early Mortality Syndrome (EMS) and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (EMS/AHPND), causing damage to farmers and affecting the industrial sector, including the loss of market share and the value of marine shrimp exports. For this reason, the Samut Sakhon Coastal Fisheries Research and Development Center has selected microorganisms to produce PM.1, a probiotic from the genus *Bacillus*, to reduce the incidence of such diseases. Bacteriocin, produced by *Bacillus licheniformis*, has inhibited pathogen growth. It was heat-resistant up to 100 °C and performed well in a wide pH range. In this study, *B. licheniformis* was cultured in Tryptic Soy Broth (TSB) at a 10⁶ CFU/ml concentration at various conditions that affect bacteriocin production, i.e., incubation time, temperature, and salt concentration in the medium. The cell-free supernatant was collected and tested for efficiency in inhibiting pathogens in shrimp, including *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*, by the Total plate count method. The cell-free supernatant (CFS) of *B. licheniformis* was shown to have the most effective inhibiting activity after 72 hours of cultured *B. licheniformis* at 30 °C in TSB liquid medium containing 2.5% salt concentration. The inhibition activity is demonstrated by the CFS of *B. licheniformis* co-cultured with the dead cells of *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. The cytotoxic effect of CFS was demonstrated by the formation of pores on the cell membrane of pathogenic bacteria, which was observed using a scanning electron microscope. Moreover, the CFS of *B. licheniformis* in co-culture with killed cells of *V. alginolyticus* affected *V. parahaemolyticus* by reducing the cell size and aggregation. The amino acid sequence analysis in cell-free supernatant was selected by molecular weight less than 10 kDa and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). The result found 617 peptide sequences, focusing on Denovo scores of more than 70%. The probable antimicrobial peptides were 379 peptide sequences, especially eight peptide sequences found to be lantibiotic-like bacteriocin sequences. In this study, the CFS of *B. licheniformis*, which was isolated from shrimp's intestine, found inhibition activity on EMS/AHPND pathogens. The efficiency of inhibitory activity was increased by adjusting the culture conditions and co-culture techniques. Therefore, it is interesting to develop and apply a biological method to solve the problem of EMS/AHPND in shrimp sustainably through a biological method using an antimicrobial peptide. It also reduces the antibiotic resistance issue associated with the aquaculture industry.

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Student's Signature

Academic Year: 2021

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดีจากการได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ จึงขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เขมาภรณ์ บุญบำรุง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ช่วยชี้แนะให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินงานวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. นิตติ ชูเชิด อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เชื้อก่อโรคในกุ้ง คุณเบญจมาศ บุญอุบธรรม นักวิชาการประมงปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 2 (สมุทรสาคร) กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่อนุเคราะห์เชื้อ B. licheniformis สายพันธุ์ ปม.1 คุณยอดยิ่ง ยิ่งชูตระกูล ผู้ช่วยวิจัยศูนย์โอมิกส์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์เปปไทด์ ขอขอบคุณภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย รวมถึงการสนับสนุนและทุกกำลังใจจากครอบครัว และเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกันทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในระหว่างการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

แพรวทิพย์ คล้ายเจริญสุข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย.....	5
2.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งและปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.....	7
2.3 อุบัติการณ์โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งและวิธีการแก้ไขปัญหาในปัจจุบัน.....	12
2.3.1 อุบัติการณ์ของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง.....	12
2.3.2 สาเหตุของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง.....	14
2.3.3 วิธีการแก้ไขปัญหาโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งในปัจจุบัน.....	16
2.4 โพรไบโอติกและแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส.....	18
2.4.1 โพรไบโอติก.....	18

2.4.2	แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส.....	19
2.4.3	คุณลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	22
2.5	แบคทีริโอซิน.....	26
2.5.1	แบคทีริโอซิน ประเภทของแบคทีริโอซิน และคุณสมบัติของแบคทีริโอซิน.....	26
2.5.2	การสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย และการตรวจวิเคราะห์	28
2.5.3	กลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีริโอซิน	33
2.5.4	การนำแบคทีริโอซินมาใช้ประโยชน์	34
2.5.5	แบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	36
2.5.6	การเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีริโอซิน.....	37
บทที่ 3	วัสดุ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	39
3.1	เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	39
3.2	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย.....	41
3.2.1	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยและแหล่งที่มาของเชื้อ	41
3.2.2	การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเก็บรักษาเชื้อ.....	41
3.3	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้ง ด้วยการหาลำดับเบส.....	42
3.3.1	การสกัดดีเอ็นเอด้วยความร้อน	42
3.3.2	การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	42
3.3.3	เทคนิค Gel Electrophoresis	43
3.3.4	วิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rRNA ของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ด้วยเทคนิค DNA sequencing.....	43
3.4	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้ง.....	43
3.5	การใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วม.....	45
3.6	ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอซิน	46

3.7 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	47
3.8 การทำแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและปริมาณของแบคทีริโอซิน	48
3.8.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน	48
3.8.2 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและปริมาณของแบคทีริโอซิน	48
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	50
บทที่ 4 ผลการทดลอง	51
4.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งด้วยการหาลำดับเบส	51
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคของ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้ง	52
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	58
4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและความน่าจะเป็นในการเป็นสารยับยั้งของแบคทีริโอซินที่เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> (CFS _(BI)) สร้างขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม	65
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ	72
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	72
5.2 สรุปผลการทดลอง	79
5.3 ข้อเสนอแนะ	80
บรรณานุกรม	81
ภาคผนวก	96
ประวัติผู้เขียน	109

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลผลิตการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งที่สำคัญในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 (2).....	6
ตารางที่ 2 ปริมาณกุ้งจำแนกตามวิธีประมง ปี พ.ศ. 2554 – 2560 (4).....	9
ตารางที่ 3 ปริมาณผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงชายฝั่งจำแนกตามชนิดของกุ้ง ปี พ.ศ. 2554 – 2560 (3, 4).....	9
ตารางที่ 4 เครื่องหมายการค้าของโพรไบโอติกที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสในอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์ (48).....	21
ตารางที่ 5 เครื่องหมายการค้าของโพรไบโอติกที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสในอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (48, 49).....	22
ตารางที่ 6 แสดงกลุ่ม กลุ่มย่อย โครงสร้างของแบคทีริโอซิน และตัวอย่างของแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซิน (53).....	31
ตารางที่ 7 แสดงแบคทีเรียและแบคทีริโอซินที่แบคทีเรียชนิดนั้นๆต่อต้านได้.....	34
ตารางที่ 8 ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่สร้างแบคทีริโอซินและการนำไปใช้ประโยชน์.....	35
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสารเคมีเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	43
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน 16s rRNA ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม Blast เทียบกับ <i>Bacillus licheniformis</i> ในฐานข้อมูลของ NCBI.....	52
ตารางที่ 11 แสดงผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> และ <i>Vibrio alginolyticus</i> ที่บ่มร่วมกับแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> (CFS _(Bl)) และสภาวะที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (CFS _(Bl+Vp)) และ <i>Vibrio alginolyticus</i> (CFS _(Bl+Va)) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก.....	65
ตารางที่ 12 แสดงลำดับกรดอะมิโนตามเป็นไปตามเกณฑ์การคัดเลือก.....	70
ตารางที่ 13 แสดงลำดับของกรดอะมิโนที่มีกรดอะมิโนอะลานีนเป็นส่วนประกอบ 2 ตัว.....	70

ตารางที่ 14 แสดงผลการศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide..... 97



สารบัญญภาพ

หน้า

รูปภาพที่ 1 ปริมาณการจับสัตว์น้ำทั้งหมด จำแนกตามวิธีการทำประมง ปี 2560 (2)	5
รูปภาพที่ 2 แผนที่จังหวัด เขตประมงต่างๆ และความหนาแน่นของคริวเรือนเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (20) 8	8
รูปภาพที่ 3 รูปร่างลักษณะของกุ้งแวนนาไม (22).....	10
รูปภาพที่ 4 วงจรชีวิตและถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของกุ้งแวนนาไม (22).....	11
รูปภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะปรากฏระหว่างกุ้งที่เป็นโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง (ชาย) กับ กุ้งปกติ (ขวา) (27).....	13
รูปภาพที่ 6 ข้อมูลการผลิตกุ้งตั้งแต่ปี 1988 ถึง 2014 ที่ได้รับผลกระทบจากโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งในประเทศไทย (28).....	14
รูปภาพที่ 7 รูปร่างลักษณะของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ (ชาย) และ <i>V. alginolyticus</i> (ขวา) ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) (36).....	16
รูปภาพที่ 8 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>B. anthracis</i> ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสี crystal violet เจริญอยู่ในน้ำไขสันหลัง และมีเซลล์เม็ดเลือดขาวล้อมรอบ (46).....	20
รูปภาพที่ 9 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>B. cereus</i> ที่เพาะเชื้อจากเลือด มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสี crystal violet (47)	20
รูปภาพที่ 10 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> ที่ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) (54).....	23
รูปภาพที่ 11 บทบาทของแบคทีริโอซินที่สร้างจากโพรไบโอติกในลำไส้ของมนุษย์ (67).....	27
รูปภาพที่ 12 การขนส่งแบคทีริโอซินที่พร้อมทำงานผ่านช่องโปรตีน ABC Transporter บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (79).....	30
รูปภาพที่ 13 การทำงานของแบคทีริโอซินกลุ่มที่ 2 ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (66).....	33
รูปภาพที่ 14 แสดงลำดับขั้นตอนการใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วม	46

รูปภาพที่ 15 ผลการตรวจสอบขนาดของยีนของ *Bacillus licheniformis* ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis พบว่ายีนมีขนาดประมาณ 332 bp เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม โดยเรียงลำดับตัวอย่างจากซ้ายไปขวา ดังนี้ ladder(1), ATCC14850(2), TISTR2144(3), TISTR2192(4), *Bacillus licheniformis* (5-7) และควบคุมเชิงลบ(8) ตามลำดับ 51

รูปภาพที่ 16 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) ที่บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก..... 53

รูปภาพที่ 17 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในระยะเวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก..... 54

รูปภาพที่ 18 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก 55

รูปภาพที่ 19 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น 2.5% ในสภาวะการเติมอากาศและไม่เติมอากาศ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก..... 56

รูปภาพที่ 20 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น 2.5% ในสภาวะการไม่เติมอากาศ โดยทดสอบกับสารส่วนใสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* ร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) และ *Bacillus licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก..... 57

รูปภาพที่ 21 แสดงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา) เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

(ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C) 58

รูปภาพที่ 22 แสดงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา) เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)..... 60

รูปภาพที่ 23 แสดงลักษณะทางกายภาพของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) (กลาง) และ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) (ขวา) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)..... 62

รูปภาพที่ 24 แสดงลักษณะทางกายภาพของ *Vibrio alginolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) (กลาง) และ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) (ขวา) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)..... 64

รูปภาพที่ 25 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ ตามความยาวของลำดับกรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor..... 66

รูปภาพที่ 26 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ตามประจุของโปรตีน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor..... 67

รูปภาพที่ 27 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ตามช่วงของน้ำหนักโมเลกุลเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor..... 67

รูปภาพที่ 28 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ตามช่วงของค่า Protein binding potential (Boman index) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor	68
รูปภาพที่ 29 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ ตามระดับ <i>De novo</i> score เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor.....	68
รูปภาพที่ 30 แสดงรูปร่างโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่น่าสนใจและมีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD3	71



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเป็นแหล่งอาหาร นับว่าเป็นความมั่นคงทางอาหารและโภชนาการของมนุษย์ (1) สถิติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2560 พบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งแบบชายฝั่งและน้ำจืด รวมกันคิดเป็นร้อยละ 37.4 จากการทำประมงทั้งหมด จัดเป็นการเพาะเลี้ยงกุ้งมากถึงร้อยละ 74.9 จากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งหมด คิดเป็นมูลค่ารวม 66,893.1 ล้านบาท (2) โดยกุ้งทะเลจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของไทย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2534 เป็นต้นมา เนื่องจากเป็นสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศทั่วโลก ซึ่งผลผลิตของกุ้งทะเลส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง (3) อย่างไรก็ตาม ในปีพุทธศักราช 2555-2556 เกิดวิกฤตการเพาะเลี้ยงกุ้งจากปัญหาการตายด่วนเนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (Early mortality syndrome/ acute hepatopancreatic necrosis disease : EMS/AHPND) เนื่องจากการระบาดของเชื้อแบคทีเรียเป็นวงกว้าง ส่งผลให้เกษตรกรบางส่วนหยุดพักการเลี้ยงกุ้งชั่วคราว จากปัญหาโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งที่เกิดขึ้น นอกจากจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรโดยตรงแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรม รวมไปถึงสูญเสียส่วนแบ่งการตลาดและมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลในตลาดโลกอย่างมาก เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ (4) และปัญหานี้ยังคงสืบเนื่องมาถึงปัจจุบัน เกษตรกรที่ยังคงเลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องหาวิธีแก้ปัญหาโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง โดยการปรับเปลี่ยนรูปแบบการเลี้ยงในหลากหลายวิธีเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรค เช่น ลดจำนวนบ่อเลี้ยงในแต่ละรอบการผลิต ปล่อยลูกพันธุ์กุ้งในอัตราความหนาแน่นต่ำ ลดจำนวนรอบการเลี้ยง จับกุ้งที่ไม่โตเต็มที่ เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวทำให้ผลผลิตของกุ้งลดลง

อาการตายในกุ้งที่เกิดจากโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน พบการระบาดทั้งในประเทศจีน เวียดนาม มาเลเซีย และประเทศไทย (5) มีสาเหตุจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างพลาสมิดที่สร้างสารพิษที่มีความรุนแรงในการก่อโรคในกุ้ง(6) ซึ่งโรคดังกล่าวทำให้ผลผลิตกุ้งขาวโดยรวมของประเทศลดลงกว่าครึ่งหนึ่งของผลผลิตที่ผลิตได้ และยังมีแนวโน้มของความเสียหายต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ทั้งนี้ นักวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงกุ้งให้ความเห็นว่า อาจเกิดจากการพัฒนาสายพันธุ์ที่เร่งการเจริญเติบโตของกุ้งมากเกินไป ทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอและมีอัตราการรอดต่ำ ทั้งนี้กรมประมงเสนอแนวทางแก้ไขโดยการจัดตั้งโรงเพาะฟักและปรับปรุงสายพันธุ์ให้ได้ลูกกุ้งที่แข็งแรง (7) นอกจากนี้ ในการเพาะเลี้ยงกุ้งจะมีการใช้ยาปฏิชีวนะในระยะตัวอ่อน และระยะเจริญเติบโต โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ออกซิเตตราไซคลิน (oxytetracycline)

ฟลอร์เฟนิคอล (florfenicol) ซาราฟลอกซาซิน (sarafloxacin) และเอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) จากการสำรวจในปีพุทธศักราช 2549 พบว่า ร้อยละ 74 ของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดการเกิดโรคในกุ้ง และลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำ (8) ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ รวมถึงส่งผลกระทบต่อคุณภาพทางชีววิทยาของดินตะกอนใต้บ่อเลี้ยง โดยการสะสมของยาปฏิชีวนะทำให้เกิดการสะสมตกค้างในเนื้อเยื่อของกุ้ง(9) และอาจทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยากับแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ หรือทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษและภูมิแพ้ได้ (10) นอกจากนี้ จากการศึกษาการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง ประเทศเวียดนาม ของ Le และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ระบุว่าเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะต่อเนื่องเป็นเวลานาน แบคทีเรียสกุล *Vibrio* มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุด และยาปฏิชีวนะจะสลายตัวเร็วขึ้นในกุ้งเนื่องจากแบคทีเรียมีกลไกการต้านทานยา (11) ต่อมาในปี ค.ศ. 2006 จากการศึกษา ของ นนทวิทย์ และคณะ เกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง พบว่าเมื่อใช้ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* จากลำไส้กุ้งลดค่าผสมกับอาหารให้กุ้งลดค่ากินเป็นเวลา 1 เดือน ในปริมาณเชื้อ 3 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้ดีขึ้น และทำให้กุ้งมีจำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ลดลง (12) ในปีพุทธศักราช 2551 ศุภย์วิชัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดสมุทรสาคร ได้คัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกในกลุ่มบาซิลลัส 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ มาใช้ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 เพื่อช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ตกค้างสะสมในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ช่วยบำบัดน้ำในบ่อเลี้ยง และลดการเกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง ซึ่งเชื้อ *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อราหลายชนิด (13) *B. licheniformis* มีความสามารถในการสร้างแบคทีริโอซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคชืดในกุ้ง และเป็นแบคทีเรียที่มีส่วนทำให้โรคตับวายในกุ้งลุกลามรุนแรงขึ้น อีกทั้งแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *B. licheniformis* มีคุณสมบัติทนความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 60 นาที และทำงานได้ในช่วง pH กว้างคือ 3.0-10.0 (14) นอกจากนี้สารดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas gessardii* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในกุ้ง (15) รวมถึง *B. licheniformis* สามารถเจริญร่วมกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ และเจริญครอบคลุมเชื้อดังกล่าวเพื่อช่วยจำกัดการแพร่กระจายได้ (16) ส่งผลให้แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *B. licheniformis* มีความน่าสนใจในการพัฒนาประสิทธิภาพและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *B. licheniformis* สำหรับยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการ

เพาะเลี้ยงกึ่ง และยังใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการติดเชื้อและลดโอกาสการเกิดโรคโคโรคดับ และตับอ่อนวายเฉียบพลันในกึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกึ่ง

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกึ่ง

1.2.3 ศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกึ่งด้วยวิธีการเลี้ยงร่วม

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 เชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกึ่งสามารถสร้างแบคทีริโอซินในสภาวะที่กำหนดได้

1.3.2 แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกึ่งได้

1.3.3 เทคนิคการเลี้ยงร่วมจะช่วยเพิ่มปริมาณในการสร้างสารยับยั้งและเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกึ่งได้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อ *B. licheniformis* สายพันธุ์ ปม.1 จากคุณเบญจมาศ บุญอบรม นักวิชาการประมงปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 2 (สมุทรสาคร) กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ นำเชื้อที่ได้มาใช้ในการศึกษาเนื่องจากเป็นหนึ่งในสามของหัวเชื้อ ปม.1 ที่เกษตรกรใช้ในการปรับสภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกึ่งเพื่อลดการเกิดอาการตายด่วนในกึ่ง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งและนำสารส่วนใสปราศจากเซลล์มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกึ่ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* ด้วยวิธี Total Plate Count และศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์เชื้อทดสอบหลังจากเลี้ยงร่วมกับสารยับยั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของสารยับยั้งที่เชื้อ *B. licheniformis* สร้างขึ้นด้วยเครื่อง LC-MS/MS

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากผลการศึกษการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง ด้วยสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ และเทคนิคการเลี้ยงร่วม ผู้วิจัยคาดหวังว่าแบคทีเรียโอสินจะมีปริมาณและประสิทธิภาพสูงขึ้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำเพื่อลดการเกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและเชื้อดื้อยา

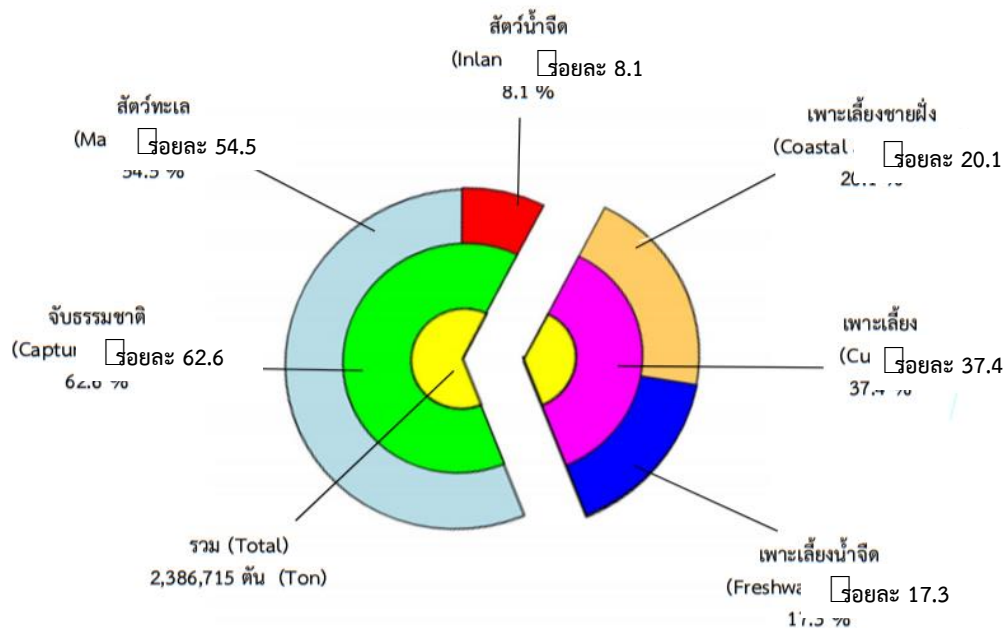


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งในประเทศผู้ผลิตสินค้าประมงที่สำคัญของโลก โดยผลผลิตจากภาคการประมงประกอบด้วยสัตว์น้ำที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติและสัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปภาพที่ 1



รูปภาพที่ 1 ปริมาณการจับสัตว์น้ำทั้งหมด จำแนกตามวิธีการทำประมง ปี 2560 (2)

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้จัดทำแผนแม่บทการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560-2564 โดยกำหนดวิสัยทัศน์ที่มุ่งพัฒนาและบริหารการเปลี่ยนแปลง เพื่อนำไปสู่การประมงที่ยั่งยืน ซึ่งการทำประมงอย่างยั่งยืน (Sustainable Fisheries) ตามคำนิยามของสภาพิทักษ์ทะเลหรือ Marine Stewardship Council : MSC (2017) หมายถึง การทำประมงในระดับที่สามารถควบคุมรักษาปริมาณสัตว์น้ำในท้องทะเลให้มีจับได้อย่างต่อเนื่อง และก่อให้เกิดความสมดุลต่อระบบนิเวศในทะเล ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และบริหารจัดการประมงอย่างมี

ประสิทธิภาพ (17) และการควบคุมกำกับดูแลการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสม (antimicrobial stewardship) ระมัดระวังและมีความรับผิดชอบ เพื่อลดการดื้อยาของแบคทีเรีย สอดคล้องกับแผนดำเนินการระดับโลกเรื่องการดื้อยาต้านจุลชีพ (global action plan on antimicrobial resistance) ที่ผ่านการรับรองในการประชุมสมัชชาอนามัยโลก สมัยที่ 68 ตามแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 (18) นอกจากนี้ยังกำหนดยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมพัฒนาให้เกษตรกรมีความรู้ความเข้าใจในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ยุทธศาสตร์ปลานิล และยุทธศาสตร์กุ้งทะเล ซึ่งโดยรวมแล้วนโยบายการพัฒนา การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ยังให้ความสำคัญในการพัฒนาเพื่อทำรายได้จากการส่งออกเป็นสำคัญ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยที่มีบทบาทสำคัญ คือ การเลี้ยงกุ้งซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ทำเงินรายได้หลักเข้าประเทศ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอื่นๆ เช่น ปลาน้ำกร่อย ปลาน้ำจืด และ หอย มักจะเป็นการเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก และทำกันในครัวเรือน (7) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลผลิตการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งที่สำคัญในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2560 (2)

ชนิดของสัตว์น้ำ	กุ้ง	ปลาน้ำกร่อย	หอย
รายการ			
จำนวนฟาร์ม (ราย)	21,561	10,592	5,055
เนื้อที่การเลี้ยง (ไร่)	294,683	13,529	66,614
ผลผลิต (ตัน)	359,697	22,455	98,256
ปริมาณการส่งออก* (ตัน)	111,411	207,365	45,839
มูลค่าการส่งออก** (บาท)	33,446,728,000	18,056,875,000	92,783

* ปริมาณการส่งออก หมายถึง ปริมาณการส่งออกสัตว์น้ำทั้งหมดทั้งการเพาะเลี้ยงและจับจากธรรมชาติ หน่วยน้ำหนักเป็น ตัน

** มูลค่าการส่งออก หมายถึง มูลค่าการส่งออกสัตว์น้ำทั้งหมดทั้งการเพาะเลี้ยงและจับจากธรรมชาติ หน่วยค่าเงินเป็น บาท

กรมประมงได้วิเคราะห์จุดแข็ง จุดอ่อน โอกาส และอุปสรรค ของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยไว้ดังนี้ จุดแข็งของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยอยู่ที่การมีที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของประเทศอยู่ในจุดที่เหมาะสม มีองค์ความรู้ด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เกษตรกรมีทักษะพร้อมที่จะปรับตัว มีอุตสาหกรรมต่อเนื่องที่เข้มแข็ง ภาครัฐและภาคเอกชนพร้อมที่จะปรับตัวตามมาตรฐานสากล ทั้งยังมีสัตว์น้ำหลายชนิดที่พัฒนาเป็นสัตว์เศรษฐกิจได้ แต่ก็ยังมีจุดอ่อนคือ ต้นทุนการ

ผลิตสูงขึ้น งบประมาณด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เพียงพอ เกษตรกรส่วนใหญ่เป็นรายย่อย เข้าถึงแหล่งเงินทุนได้ยาก ในส่วนของโอกาสจากปัจจัยภายนอก คือ แนวโน้มความต้องการบริโภคสัตว์น้ำของประชากรโลกเพิ่มขึ้น ต้องอาศัยผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทดแทนการจับสัตว์น้ำตามธรรมชาติ ในส่วนของอุปสรรค คือ การกีดกันทางการค้า ผลกระทบเชิงลบที่มีต่อระบบนิเวศที่อาจเกิดขึ้น ความผันผวนของราคา ภัยธรรมชาติ การระบาดของเชื้อก่อโรค (19) ซึ่งกรมประมงจะนำปัจจัยเหล่านี้มาประเมินเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาศักยภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไทยต่อไป

2.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งและปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

ในปี 2554 ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกกุ้งเป็นอันดับหนึ่งของโลก มีส่วนแบ่งการส่งออกในตลาดโลกเป็นร้อยละ 15 รายได้จากการส่งออกสัตว์น้ำของไทยกว่าครึ่งหนึ่งมาจากการส่งออกกุ้ง เฉพาะกุ้งที่มาจาก การเพาะเลี้ยงทำรายได้ส่งออกโดยรวมประมาณหนึ่งแสนล้านบาท กุ้งจึงเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของไทย

การเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยเป็นการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง ดังแสดงในรูปภาพที่ 2 โดยแบ่งเขตประมงออกเป็น 5 เขต ดังนี้ เขตประมง 1 ได้แก่ จังหวัดตราด จันทบุรี และระยอง

เขตประมง 2 ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี

สมุทรปราการ กรุงเทพมหานคร สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี

เขตประมง 3 ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี

เขตประมง 4 ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา พัทลุง ปัตตานี

นราธิวาส

เขตประมง 5 ได้แก่ จังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง สตูล

จากการสำรวจสถิติผลผลิตฟาร์มเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ชายฝั่งทะเลของประเทศไทยและในจังหวัดอื่นๆ ที่มีการเลี้ยงกุ้งทะเลในระบบความเค็มต่ำ เช่น จังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี เป็นต้น โดยในปัจจุบันกุ้งที่เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นกุ้งแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างมากนับตั้งแต่ปี 2531 เป็นต้นมา โดยมีเนื้อที่การเลี้ยงเพิ่มขึ้นจากปี 2530 ถึงร้อยละ 22.36 และผลผลิตเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 136.07 นับเป็นช่วงการเปลี่ยนแปลงสูงสุด ในปี 2559 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ปริมาณ 370,323 ตัน เป็นกุ้งจากฟาร์มเลี้ยง 334,434 ตัน เป็นกุ้งจากธรรมชาติ 35,889 ตัน คิดเป็นร้อยละ 90.31 และ 9.69 ของปริมาณกุ้งทั้งหมดที่ผลิตได้ตามลำดับ และในปี 2560 สามารถผลิตกุ้งได้ปริมาณ 382,933 ตัน เป็นกุ้งจากฟาร์มเลี้ยง 359,697 ตัน เป็นกุ้งจากธรรมชาติ 23,236 ตัน คิดเป็นร้อยละ 93.93 และ 6.07 ของปริมาณกุ้งทั้งหมดที่ผลิตได้ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณกุ้งจำแนกตามวิธีประมง ปี พ.ศ. 2554 – 2560 (4)

ปี พ.ศ.	ปริมาณรวม	จากธรรมชาติ		จากการเพาะเลี้ยง	
	(ตัน)	(ตัน)	(ร้อยละ)	(ตัน)	(ร้อยละ)
2554	653,428	42,234	6.46	611,194	93.54
2555	650,107	40,555	6.24	609,552	93.76
2556	362,308	36,913	10.19	325,395	89.81
2557	316,683	36,776	11.61	279,907	88.39
2558	322,918	28,178	8.73	294,740	91.27
2559	370,323	35,889	9.69	334,434	90.31
2560	382,933	23,236	6.07	359,697	93.93

ในปี พ.ศ. 2554 – 2555 ประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งในเขตประมงชายฝั่ง และสร้างผลผลิตได้มากกว่าหกแสนตันต่อปี ดังแสดงในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตาม ในปี พ.ศ. 2556 ปริมาณผลผลิตของกุ้งแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ลดลง และผลผลิตรวมของการเพาะเลี้ยงกุ้งชายฝั่งลดลงกว่าครึ่ง เนื่องจากประสบปัญหาโรคระบาดอย่างหนักคือเกิดอาการตายด่วนเนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (EMS/AHPND)

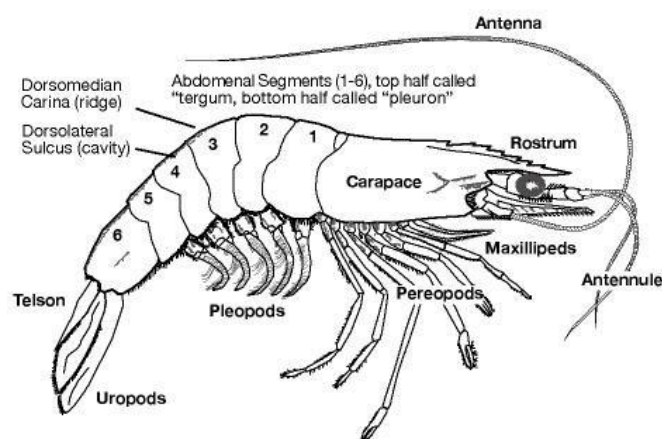
ตารางที่ 3 ปริมาณผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงชายฝั่งจำแนกตามชนิดของกุ้ง ปี พ.ศ. 2554 – 2560

(3, 4)

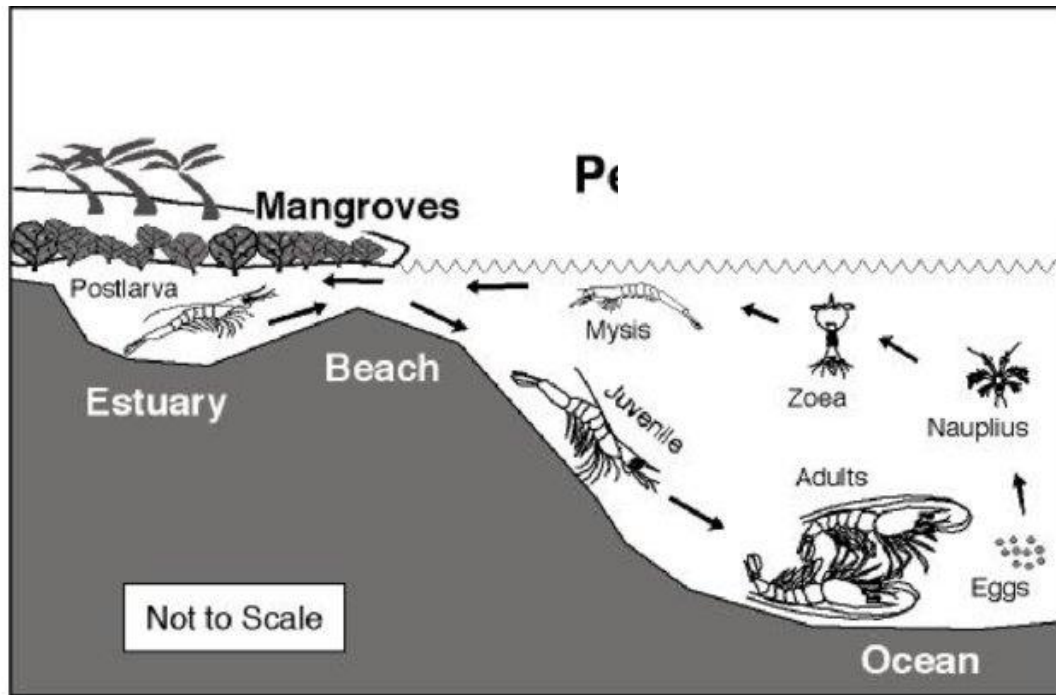
ปี พ.ศ.	ผลผลิตกุ้งชนิดต่างๆ (ตัน)					
	กุ้งแชบ๊วย	กุ้งกุลาดำ	กุ้งแวนนาไม	กุ้งโอตัก	กุ้งอื่นๆ	รวม
2554	271	6,514	603,227	516	666	611,194
2555	262	20,558	588,370	38	38	609,552
2556	222	14,279	310,705	154	35	325,395
2557	196	16,292	263,245	146	28	279,907
2558	237	12,098	281,918	450	37	294,740
2559	270	12,366	321,542	219	37	334,434
2560	129	12,962	346,309	111	186	359,697

ช่วงก่อนปี พ.ศ. 2540 กุ้งกุลาดำได้รับความนิยมในการเพาะเลี้ยงอย่างมากเนื่องจากจำหน่ายได้ราคาสูง ต่อมาเกิดโรคระบาดขึ้น จึงมีการนำเข้าพันธุ์กุ้งแวนนาไมเข้ามาทดลองเลี้ยงทดแทนกุ้งกุลาดำ

กุ้งแวนนาไมหรือกุ้งขาว เป็นกุ้งสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีถิ่นอาศัยในธรรมชาติอยู่ในทวีปอเมริกา ซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 20 °C และมีความเค็มประมาณ 35 ppt ลักษณะทั่วไปของกุ้งแวนนาไมจะมีสีขาวใส ทางมีสีแดง ขามีสีขาวยปลายขาสีแดง ขาวว่ายน้ำมี 5 คู่ มีความยาวตลอดตัวประมาณ 230 มิลลิเมตร มีลำตัว 6 ปล้อง หน้าอกใหญ่ สิ่งที่น่าสนใจได้ชัดเจนคือ จะเห็นลำไส้กุ้งชนิดนี้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวชนิดอื่นๆ น้ำหนักตัวเฉลี่ยอยู่ที่ 120 กรัม ดังแสดงในรูปภาพที่ 3 ในระยะโตเต็มวัยจะมีถิ่นอาศัยในทะเล แต่ในระยะที่ยังเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์จะอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง อย่างไรก็ตามไข่กุ้งจะฟักเป็นตัวอ่อนในทะเล และจะอยู่ในลักษณะของแพลงก์ตอนสัตว์ เมื่อเข้าสู่ระยะโพสลาวาจะอพยพเข้ามาอาศัยบริเวณชายฝั่ง หรือป่าชายเลนซึ่งเป็นบริเวณที่มีแหล่งอาหารและหลบภัยจากศัตรู และใช้เวลา 2-3 เดือนจะโตเต็มวัย และอพยพกลับสู่ทะเลอีกครั้ง ดังแสดงในรูปภาพที่ 4 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแวนนาไมจะเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเค็ม 10 – 22 ppt อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมอยู่ที่ 26 – 29 °C ค่าความเป็นกรด-ด่างควรอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 ซอบน้ำที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ลอกคราบบ่อย จึงต้องการแร่ธาตุสูงโดยเฉพาะแมกนีเซียมและแคลเซียม กุ้งชนิดนี้เคลื่อนไหวตลอดเวลาจึงต้องการออกซิเจนปริมาณมาก ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมีค่า 4-9 มิลลิกรัมต่อลิตร การกินอาหารของกุ้งชนิดนี้กินได้ทั้งพืช สัตว์ และซากของสิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณกลางน้ำ ต้องการอาหารที่มีโปรตีนประมาณ 35% ซึ่งน้อยกว่ากุ้งชนิดอื่น เช่น กุ้งกุลาดำ และกุ้งกุลาลาย (21)



รูปภาพที่ 3 รูปร่างลักษณะของกุ้งแวนนาไม (22)



รูปภาพที่ 4 วงจรชีวิตและถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของกุ้งแวนนาไม (22)

เมื่อกรมประมงอนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์มาเพาะฟักผลิตลูกพันธุ์กุ้งแวนนาไมได้ในประเทศ ผู้ประกอบการได้พัฒนาสายพันธุ์โดยให้ความสำคัญแก่การเพาะลูกกุ้งที่โตเร็ว ใช้เวลาเลี้ยงสั้น ทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งแวนนาไมทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้เกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงลูกกุ้งขายให้ประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคอาเซียนได้ รวมทั้งขายอาหารกุ้งได้ด้วย ทำให้ในปัจจุบันผลผลิตของกุ้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในไทยส่วนใหญ่จึงเป็นกุ้งขาวแวนนาไม ดังแสดงในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตามการพัฒนาสายพันธุ์ที่เร่งการเจริญเติบโตของกุ้งมากเกินไปทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอ และมีอัตราการรอดต่ำ(7) เนื่องจากกุ้งสายพันธุ์ที่โตเร็วจะลอกคราบบ่อย จึงมีความอ่อนแอ ถ้าสภาวะแวดล้อมในบ่อเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยกุ้งก็จะตายในระหว่างการลอกคราบ ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์ที่โตเร็วในสภาวะแวดล้อมที่มีเชื้อก่อโรคจึงทำได้ยากมาก

ในปี 2556-2557 เกิดปัญหาโรคระบาดอย่างหนักในกุ้ง คือเกิดอาการตายด่วนเนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (EMS/AHPND) ทำให้ผลผลิตลดลง นอกจากนี้ปัญหาเรื่องโรคระบาดแล้วในประเทศไทยมีข้อจำกัดด้านพื้นที่ ที่มีการนำมาใช้อย่างเต็มที่แล้วยากที่จะขยายพื้นที่ได้ การเพิ่มผลผลิตจึงต้องมาจากการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่เป็นสำคัญ ซึ่งก็มีข้อจำกัดด้านสภาพแวดล้อมและขีดความสามารถในการรองรับของพื้นที่ แม้จะมีการพัฒนาการเลี้ยงในระบบปิดแล้วก็ตาม อีกทั้งยังมีปัญหาสารเคมีตกค้างในกุ้งส่งออก และการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณมาก ดังนั้นเพื่อพัฒนาการ

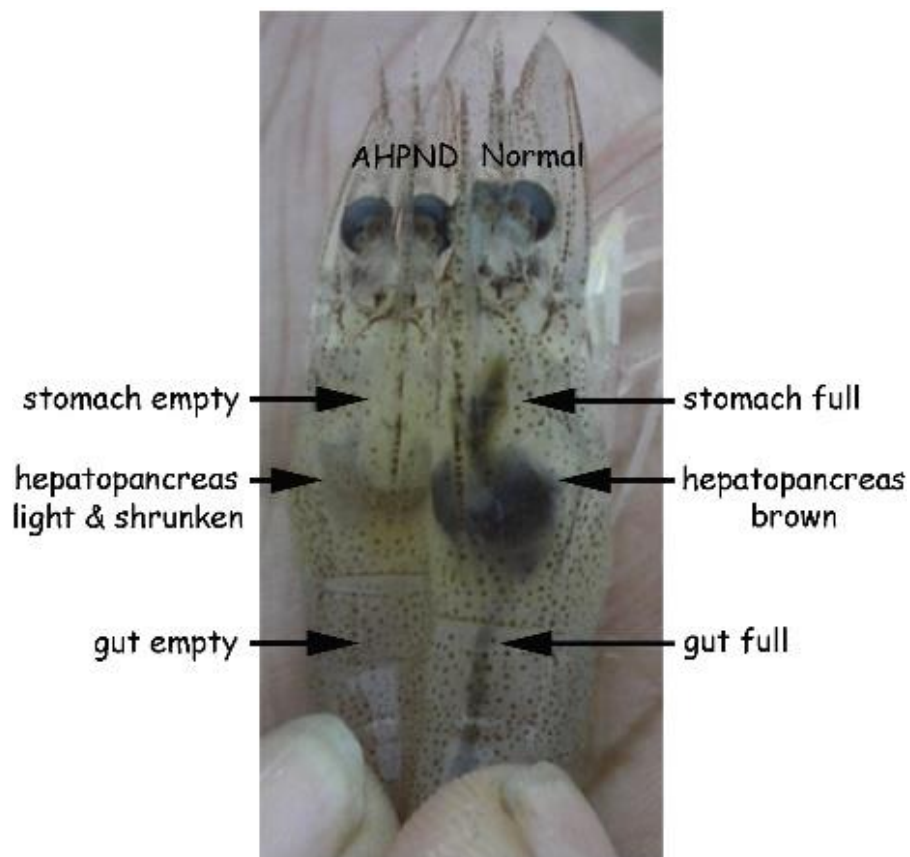
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยจึงควรส่งเสริมให้มีการ พัฒนาประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จัดระบบการเลี้ยงให้ปลอดภัยเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปลอดภัย (19)

2.3 อุบัติการณ์โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งและวิธีการแก้ไขปัญหาในปัจจุบัน

2.3.1 อุบัติการณ์ของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง

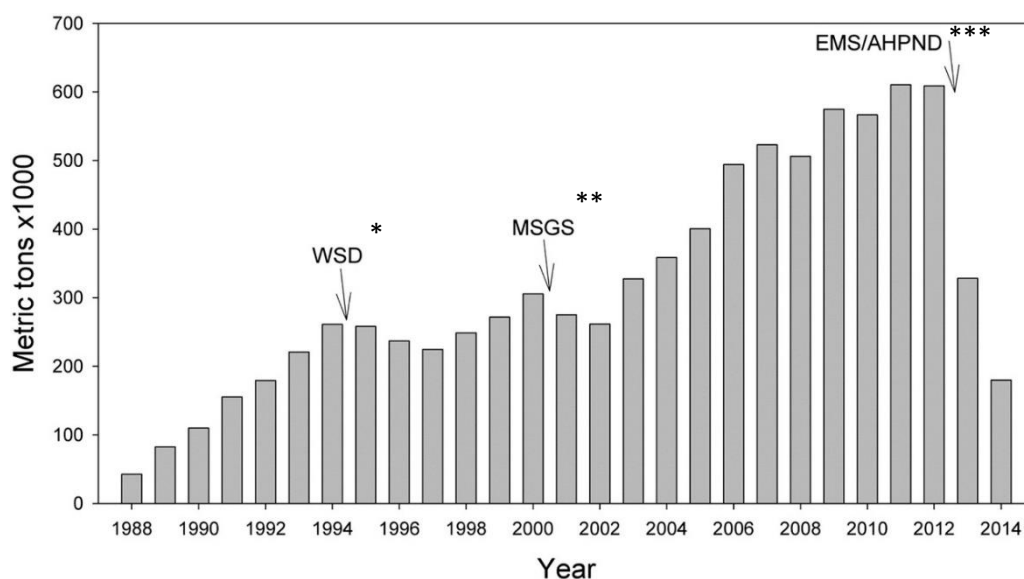
โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง พบครั้งแรกในประเทศจีนตอนใต้และเกาะ ไทหล่า เมื่อปี 2009 จากนั้นแพร่ระบาดไปยังประเทศเวียดนามตอนใต้ ในปี 2010 ประเทศมาเลเซีย ตะวันตก ในปี 2011 ประเทศไทยในปี 2012 (23) และประเทศเม็กซิโกในปี 2013 (24) ส่งผลให้มีกุ้ง ตายเป็นจำนวนมาก ทั้งกุ้งกุลาดำ กุ้งแวนนาไม และ กุ้งน้ำเงินตะวันตก (*Litopenaeus stylirostris*) และมีรายงานว่าพบในกุ้งเพิ่มอีกสามชนิดในทวีปอเมริกา ได้แก่ *Farfantepenaeus aztecus*, *Farfantepenaeus californiensis*, และ *Litopenaeus setiferus* (25) ในระยะแรกกุ้งที่ป่วยจะไม่ แสดงอาการของโรค ไม่พบการลอยหัวหรือเกยที่ขอบบ่อ อย่างไรก็ตามในบ่อเลี้ยงที่พบการติดเชื้อมาก พบว่ากุ้งมีอาการป่วยหลายแบบ เช่น การว่ายน้ำเฉื่อยช้าที่ผิวน้ำ เชื่องซึม ไม่ตอบสนองหรือกระโดดหนีเมื่อมีการกระตุ้น เริ่มกินอาหารน้อยลง เปลือกอ่อนนุ่มและมีสีซีด แต่จะเริ่มพบซากกุ้งลอยขึ้นที่ผิวน้ำ หรือทยอยตายที่ก้นบ่อภายใน 35-45 วันหลังจากติดเชื้อ อาการนี้จึงถูกเรียกว่าอาการตายด่วนใน กุ้ง หรือ Early mortality syndrome (EMS) อย่างไรก็ตาม การเรียกชื่อดังกล่าวอาจทำให้เกิดความ สับสนเนื่องจากการตายของกุ้งในระยะเริ่มเลี้ยงนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ ดังนั้นในปี 2012 เมื่อ D.V. Lightner นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยแอริโซนาสามารถหาสาเหตุของการตายของกุ้งในระยะเริ่มเลี้ยงนี้ ได้ โดยใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นกุ้งกุลาดำและกุ้งแวนนาไมจากประเทศจีนและเวียดนาม พบว่าเนื้อเยื่อ บริเวณตับและตับอ่อนของกุ้งหลุดลอกออกจากกัน เซลล์ของตับและตับอ่อนถูกทำลายรุนแรง และ สะสมไขมันลดลงอย่างมาก ส่งผลให้ oil droplet ลดลง ทำให้ตับและตับอ่อนของกุ้งที่ป่วยมีสีซีด (26) สังเกตจากภายนอกจะพบว่าหัวของกุ้งจะใสกว่ากุ้งปกติ กระทบอาหารและทางเดินอาหารใส ดังแสดงในรูปภาพที่ 5 (27) จึงมีการเรียกชื่อโรคนี้ตามพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับกุ้ง คือ โรคตับและตับ อ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง หรือ Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)

การระบาดของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งในประเทศไทย ส่งผลให้การ ผลิตกุ้งในประเทศไทยลดลงจาก 600,000 ตันในปี พ.ศ. 2555 เหลือเพียง 200,000 ตันในปี พ.ศ. 2557 ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปภาพที่ 6 นอกจากนี้ยังเกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ในไทย ไม่ใช้ระบบปิด และมีการถ่ายเทน้ำระหว่างบ่อทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้รวดเร็วยิ่งขึ้น ดังนั้น หากเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งยังคงใช้วิธีการเลี้ยงดังกล่าว อาจก่อให้เกิดการระบาดของโรคซ้ำได้



รูปภาพที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะปรากฏระหว่างกุ้งที่เป็นโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง (ซ้าย) กับ กุ้งปกติ (ขวา) (27)

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งระยอง รายงานสถานการณ์โรคสัตว์น้ำ ประจำเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2562 พบว่า ยังคงพบกุ้งแวนนาไมที่เกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (EMS/AHPND) ร้อยละ 16.67 และยังคงพบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครดดังกล่าวปนเปื้อนในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ร้อยละ 9.09



รูปภาพที่ 6 ข้อมูลการผลิตกุ้งตั้งแต่ปี 1988 ถึง 2014 ที่ได้รับผลกระทบจากโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งในประเทศไทย (28)

* WSD = เริ่มพบอาการซีดในกุ้ง (White spot disease)

**MSGs = กุ้งกุลาดำเริ่มเจริญเติบโตได้ช้าลง (Monodon slow growth syndrome)

*** EMS/AHPND = เริ่มพบการระบาดของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง

2.3.2 สาเหตุของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง

ในช่วงต้นปี ค.ศ. 2013 หน่วยพยาธิวิทยาสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเอริโซนา สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากกุ้งที่ติดเชื้อได้สำเร็จ และทำการทดลองเลี้ยงกุ้งในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นปมเชื้อที่คาดว่าเป็นสาเหตุร่วมกับกุ้งดังกล่าว พบว่า กุ้งกลุ่มดังกล่าวแสดงอาการของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน ร้อยละ 100 จากนั้นแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากกลุ่มตัวอย่างอีกครั้ง และทำการทดสอบทางชีวเคมี และหาเอกลักษณ์ของเชื้อโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16s rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกับ *Vibrio harveyi* และมีลำดับเบสของ 16s rRNA คล้ายกับ *Vibrio parahaemolyticus* มากที่สุด (6) จึงสามารถสรุปได้ว่า โรคนี้เกิดจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้ง (VP_{AHPND}) ซึ่งสายพันธุ์นี้มี พลาสมิด pVA1 ขนาดประมาณ 69 กิโลเบส พลาสมิดดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้เป็นข้อบ่งชี้ของ VP_{AHPND} เนื่องจากจะพบพลาสมิดชนิดนี้ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้งเท่านั้น (27) นอกจากนี้พบว่าในระยะท้ายของการติดเชื้อที่กุ้งเลี้ยงในบ่อตายเป็นจำนวนมากพบว่ากุ้งจะมีการติดโรคแบบติดเชื้อซ้ำอย่างรุนแรง โดยเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มฉวยโอกาสประกอบกับผลจากการตายของเซลล์ตับและตับอ่อนอย่างเฉียบพลันส่งผลต่อเนื่องจนกุ้งตายในที่สุด จากงานวิจัยของ Liu ในปี 2004 พบว่า กุ้งแวนนาไมได้หวนที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus* จะเกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันรุนแรงเพิ่มมากขึ้น

และจะเจริญเติบโตได้ไม่ดี เพื่้ออาหาร (29) หากกุ้งกุลาดำและกุ้งลายเสือ (*Penaeus japonicus*) ติดเชื้อดังกล่าวจะก่อให้เกิดอาการตัวซีด เพื่้ออาหาร และตายในที่สุด (30)

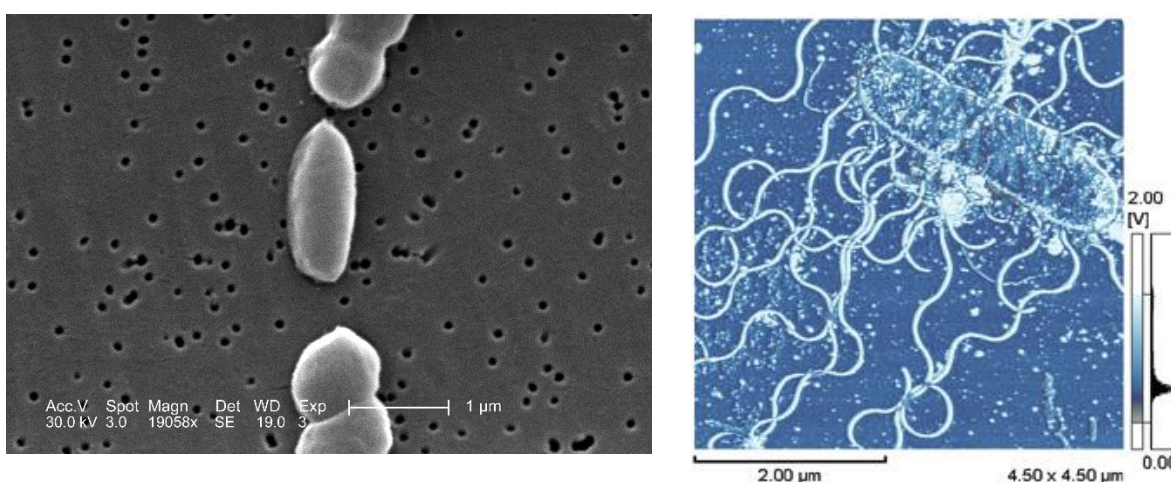
แบคทีเรียสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียก่อโรคซึ่งเป็นสาเหตุการตายของกุ้งและปลาจำนวนมาก พบทั่วไปในทะเลและบริเวณชายฝั่งรวมทั้งผิวน้ำและในลำไส้ของสัตว์ทะเลบางชนิดพบในแหล่งน้ำจืดหลายชนิดจะเป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนด้วย ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งโค้งหรือตรง ขนาด 0.5 - 0.8 x 1.4 - 2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เมื่ออยู่ในอาหารเหลวจะเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาเส้นเดียว (Monotrichous flagella) หรือแฟลกเจลลาหลายเส้น (Multitrichous flagella) เมื่อเจริญในอาหารแข็งจะสร้างแฟลกเจลลาด้านข้าง (Lateral flagella) ทุกสายพันธุ์ต้องการเกลือเป็นตัวกระตุ้นเพื่อการเจริญเติบโตด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมพบได้ในช่วงความเค็มกว้าง แบคทีเรียสกุลนี้สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดและสามารถเจริญได้ดีในอาหารเฉพาะ (selective media) คือ Thiosulfate Citrate Bile Salt agar (TCBS agar) เจริญได้ในสภาพที่มีช่วงกรด-ด่างระหว่าง 7 - 9 และก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบทุติยภูมิ (secondary infection) เมื่อร่างกายของสัตว์น้ำเช่นกุ้งหรือปลาเกิดภาวะเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตไม่เหมาะสมทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอแบคทีเรียชนิดนี้จะเข้ามาทำลายสุขภาพของสัตว์น้ำได้หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) (31)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น หรือ โค้งมีขนาดความกว้าง 0.4 - 0.5 ไมโครเมตร และความยาว 1-3 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปภาพที่ 7 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2-4 เปอร์เซ็นต์ มีจุดกลางโคลอนีสีเข้ม เชื้อเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ 5-45 °C และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37.5 °C ค่าความเป็นกรดต่างที่สามารถเจริญได้มีค่าตั้งแต่ 5-11 แต่มีช่วงที่เหมาะสมคือ 7.5 - 8.8 เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่ออกซิเจน พบในสภาพแวดล้อมบริเวณชายฝั่งทะเล เขตน้ำเกลือในตะกอนดิน รวมทั้งในตัวของสัตว์น้ำ ได้แก่ ปลาทะเล หอยและกุ้งหลายๆพื้นที่ทั่วโลก (32) และจากการศึกษาพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมากที่สุดในประเทศไทย (33)

V. alginolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น หรือ โค้ง ดังแสดงในรูปภาพที่ 7 เป็น ชนิด biotype 2 ของ *Vibrio parahaemolyticus* ทำให้รูปร่างและสภาวะในการเจริญคล้ายคลึงกัน สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (34) และจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *V. alginolyticus* เป็นเชื้อฉวยโอกาส จะพบเชื้อนี้หลังจากการติดโรคดับและดับอ่อนวายเฉียบพลัน เมื่อกุ้งอ่อนแอเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และทำให้กุ้งเกิดพยาธิสภาพของโรค เช่น กินอาหารลดลง เปลือกนึ่ม อาจมีดวงขาวที่เปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว ตัวกุ้งอาจมีสีแดง กล้ามเนื้อที่ตายพบว่ามีสีขาวขุ่น และมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เกิดก้อน (nodules) จำนวนมากล้อมรอบบริเวณของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายโดยมีเม็ดเลือด(hemocYTE) เข้ามารวมกลุ่มเพื่อกำจัดเซลล์ที่ถูกทำลายไป และมีการสะสมของเม็ดสี (melanization) บริเวณที่เกิดบาดแผล จึงทำให้กุ้งตาย (35)

นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับโปรโตซัว *Enterocytozoon hepatopenaei* ที่สามารถทำให้เกิดโรคในตับและตับอ่อนของกุ้ง ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัว (21) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวจึงนำไปสู่การค้นหาวิธีการแก้ไขปัญหและป้องกันการเกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง



รูปภาพที่ 7 รูปร่างลักษณะของ *V. parahaemolyticus* ที่ (ซ้าย) และ *V. alginolyticus* (ขวา) ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) (36)

2.3.3 วิธีการแก้ไขปัญหโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งในปัจจุบัน

วิธีการป้องกันและแก้ไขปัญหโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง ผู้เลี้ยงจำเป็นต้องหาแนวทางการเลี้ยงที่สามารถลดปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงปริมาณของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในบ่อเลี้ยงให้ได้มากที่สุดตลอดระยะเวลาการเลี้ยง และต้องสามารถควบคุมคุณภาพน้ำ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่ากรด-ด่าง และค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ของน้ำ ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมและเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดตลอดระยะเวลาการเลี้ยง (21) สำหรับแนวทางการเลี้ยงกุ้งเพื่อลดความเสี่ยงของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งที่เป็นที่นิยมของผู้ประกอบการส่วนใหญ่มี 4 แนวทาง ดังนี้

1. แนวทางการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบไบโอฟิล็อค ทำคอกขนาดเล็ก เพื่อเลี้ยงลูกกุ้งให้แข็งแรง ให้อาหารที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์และโพรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารของลูกกุ้ง โพรไบโอติก

สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในตัวลูกกุ้งได้ และเมื่อลูกกุ้งแข็งแรงและมีอายุ 22-28 วัน จึงย้ายและนำมาเลี้ยงในบ่อดิน

2. แนวทางการเลี้ยงกุ้งแบบน้ำใส เน้นการกำจัดของเสียออกจากระบบเลี้ยง ติดตั้งเครื่องดูดตะกอนที่กลางบ่อเลี้ยง เพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรคในบ่อเลี้ยง ซึ่งวิธีนี้สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดคือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการติดตั้งระบบ

3. แนวทางการเลี้ยงกุ้งแบบน้ำเขียว เน้นการรักษาสมดุลของแบคทีเรียและแพลงก์ตอนในบ่อเลี้ยงให้มีปริมาณที่เหมาะสม

4. แนวทางการเลี้ยงกุ้งร่วมกับปลานิลในพื้นที่น้ำจืด เพื่อให้ปลานิลช่วยกำจัดของเสีย และควบคุมคุณภาพน้ำ วิธีนี้มีข้อจำกัดคือใช้ได้ในพื้นที่น้ำจืดเท่านั้น

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประเทศไทย จัดตั้งโครงการกุ้งขาว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างประชากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดโรค สายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตดี และพัฒนาสายพันธุ์ที่ทนทานต่อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน เพื่อเพิ่มช่องทางให้เกษตรกรได้เข้าถึงลูกกุ้งคุณภาพ โดยมีระยะเวลาในการดำเนินโครงการในช่วงปี พ.ศ. 2561 – 2565 (37) นอกจากนี้มีการออกข้อกำหนด และแนวปฏิบัติให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง เป็นประจำทุกปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 จนถึงปัจจุบัน (38) โดยในปี พ.ศ. 2562 มีแนวทางให้แก่เกษตรกร ดังนี้

1. จัดการเลนกันบ่อ นำเลนออกจากกันบ่อ ตากบ่อให้แห้ง กรณีไม่เอาเลนออก ให้กระจายเลน โดยเติมน้ำ 30-40 เซนติเมตร ไถ พรวน หรือคราดโซ่ให้ทั่วบ่อ

2. บำบัดสารอินทรีย์ที่พื้นบ่อโดยการใส่จุลินทรีย์ย่อยสลายให้ทั่วบ่อ วัดแอมโมเนียให้ได้ประมาณ 0.5 – 1.0 ppm

3. คราดโซ่ทุกวัน เช้าและเย็น

4. ก่อนเติมน้ำเข้าบ่อเลี้ยง ให้กรองน้ำจากบ่อพักและเติมสารฆ่าเชื้อตามความจำเป็นในกรณีบ่อเคยติดเชื้อมาก่อน และปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำให้มีค่าพีเอชอยู่ที่ 7.8 – 8.2 ด้วยวัสดุปูน

5. ใช้จุลินทรีย์หมักกากน้ำตาลเพื่อรักษาระดับแอมโมเนียในบ่อ

6. ใช้ลูกกุ้งที่ผ่านการตรวจสอบสุขภาพตามมาตรฐานของกรมประมง หรือห้องปฏิบัติการที่เชื่อถือได้

7. ปล่อยลูกกุ้งไม่เกิน 120,000 ตัวต่อไร่

8. ควบคุมเชื้อแบคทีเรียในตัวกุ้งระหว่างการเลี้ยง ด้วยการเสริมอาหารกุ้งด้วยแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกที่ผ่านการหมักแล้ว รวมถึงเติมสมุนไพร เช่น ข่า กระเทียม หรือสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

จากแนวปฏิบัติข้างต้น แสดงให้เห็นว่า กรมประมงส่งเสริมให้เกษตรกรใช้วิธีการทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในกุ้ง และใช้ยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อเท่าที่จำเป็น

นอกจากนี้ยังสนับสนุนให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ใช้หัวเชื้อ ปม.1 ซึ่งคิดค้นโดยศูนย์วิจัยและพัฒนา ประมงชายฝั่ง สมุทรสาคร ร่วมกับ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่ง ผลการวิจัยให้คัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก กลุ่มบาซิลลัส 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย สารอินทรีย์ มาใช้ในการบำบัดสารอินทรีย์ที่ตกค้างในบ่อเลี้ยง โดยกรมประมงผลิตทั้งแบบผงและแบบ น้ำแจกจ่ายให้แก่เกษตรกรมาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งจะมีแนวทางการเลี้ยงเพื่อลดความเสี่ยงต่อโรคตับ และตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง แต่พบว่าเมื่อนำแนวทางต่างๆไปประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงบน พื้นที่จริงกลับไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (21) เห็นได้จากปริมาณผลผลิตของกุ้งในปี 2560 ยังมี แนวโน้มที่ลดลงเมื่อเทียบกับปี 2554 ซึ่งเป็นปีก่อนเกิดการระบาดของโรคตับและตับอ่อนวาย เฉียบพลันในกุ้ง จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาค้นคว้าวิธีการอื่นๆเพื่อช่วยในการแก้ปัญหา ดังกล่าว

2.4 โพรไบโอติกและแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

2.4.1 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์มีชีวิตซึ่งอาจเป็นชนิดเดี่ยวหรือชนิดผสม เซลล์จุลินทรีย์ที่ ตาย หรือส่วนประกอบของจุลินทรีย์ ที่เข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เหมาะสมแล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์ (39) เนื่องจากตัวเชื้อและสารที่เชื้อสร้างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) นอกจากนี้ยังสร้าง ประโยชน์ให้แก่เจ้าบ้าน (Host) อีกด้วย (40) ส่งผลให้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์ในทาง อุตสาหกรรมหลากหลายด้าน ได้แก่ อุตสาหกรรมการหมัก ซึ่งเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์เพื่อ เปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น ให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น ซีอิ๊ว น้ำปลา โยเกิร์ต และแหมม เนื่องจาก ร่างการของมนุษย์สามารถรับประทานได้ ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และไม่สร้างสารพิษ ช่วยยืดอายุของ อาหาร และเป็นการแปรรูปอาหารให้มีรสชาติที่แปลกใหม่ นอกจากนี้ยังพบการใช้โพรไบโอติกใน การเกษตร เช่น อุตสาหกรรมปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ ที่มีการเติมโพรไบโอติกลงไปเพื่อช่วยการย่อย สลายซากพืชและซากสัตว์ การใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อช่วยปรับความสมดุลของ จุลินทรีย์ในลำไส้ ปรับปรุงคุณภาพน้ำ ช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์อื่นๆ กระตุ้นการทำงานของ ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำอย่างเหมาะสม และช่วยลดการเกิดโรค เป็นต้น (41) อย่างไรก็ตาม การใช้ จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องมีเกณฑ์การคัดเลือก โดยทั่วไปจะพิจารณาคัดเลือกโดยมีแนวทาง ดังนี้

1. สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้นๆได้
2. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค
3. สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้

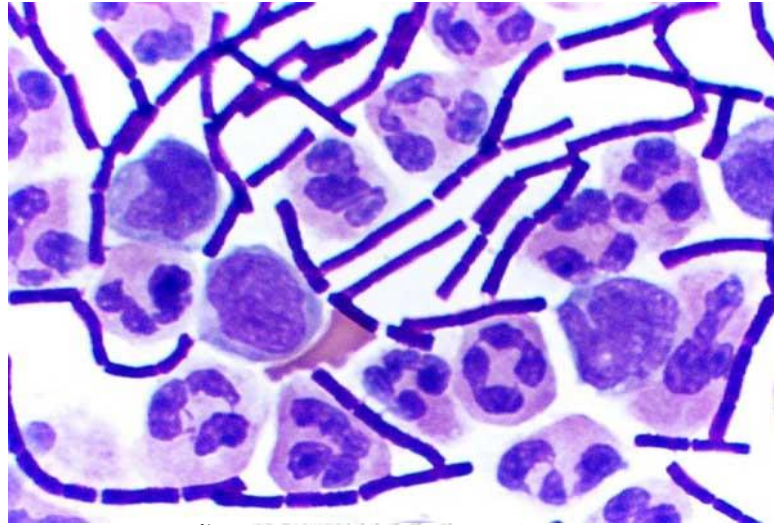
4. มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ

อย่างไรก็ตามเมื่อจะใช้โพรไบโอติกกับมนุษย์ จะพิจารณาถึงความปลอดภัยเป็นหลัก ต้องมีการศึกษาและทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูล ทั้งเรื่องคุณสมบัติ ประสิทธิภาพต่อสุขภาพ และความปลอดภัย ได้รับการรับรองจากสถาบันที่น่าเชื่อถือ เช่น ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded as Safe: GRAS) ในส่วนของการใช้โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมจะแบ่งประเภทของงานจากระดับความเสี่ยง (risk level) ของจุลินทรีย์เพื่อนำไปสู่การปฏิบัติตามขั้นตอนปฏิบัติในการทำงานที่ถูกต้องตรงตามแต่ละระดับความเสี่ยง ตลอดจนการเตรียมความพร้อมของบุคลากร และการเลือกใช้อุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่อย่างเหมาะสม (42) เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการปฏิบัติงานกับจุลินทรีย์

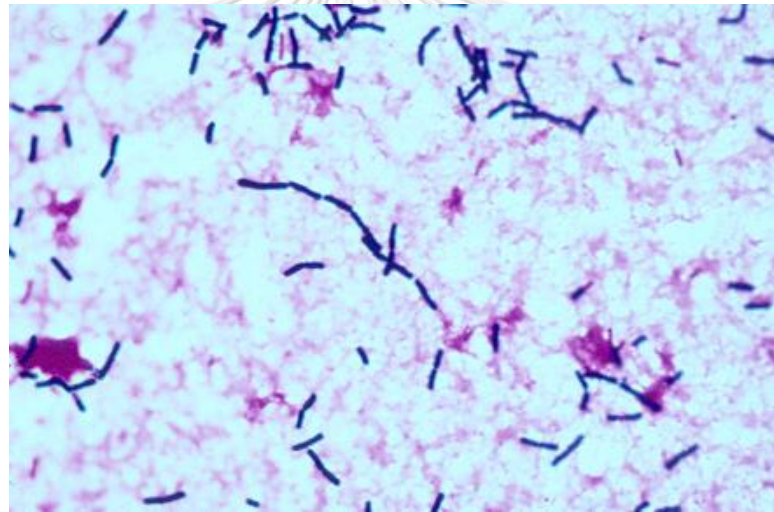
2.4.2 แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

แบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส จัดอยู่ในตระกูล *Bacillaceae* สามารถจำแนกแต่ละสายพันธุ์ได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นแท่ง มีทั้งสายพันธุ์ที่ต้องเจริญเติบโตในที่ที่มีออกซิเจน และสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่ในบางสปีชีส์สามารถเปลี่ยนไปเป็นแกรมลบได้เมื่ออายุมากขึ้น มีทั้งสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming cell) และสายพันธุ์ไม่สร้างสปอร์ สายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้จะมีความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิที่ร้อนจัด อุณหภูมิที่เย็นจัด รังสี สารฆ่าเชื้อ เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Bacillus anthracis* เป็นแบคทีเรียที่สร้างแคปซูล และสร้างสารพิษได้ ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ ดังแสดงในรูปที่ 8 *Bacillus cereus* สามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์ได้ ทำให้ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี จึงมักพบว่าปะปนมากับอาหารแห้ง เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ ดังแสดงในรูปที่ 9 (43)

นอกจากสายพันธุ์ที่ก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสยังมีบางสายพันธุ์ที่ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกด้วย โดยผลิตภัณฑ์แรกถูกจดทะเบียนเครื่องหมายการค้าในชื่อ Enterogermina ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสปอร์จาก *Bacillus clausii* ซึ่งมีบันทึกว่านำมาใช้งานตั้งแต่ปี 1958 (44) นอกจากนี้ยังมีการนำบาซิลลัสสายพันธุ์อื่นๆมาใช้ด้วย เช่น *Bacillus coagulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* เป็นต้น ซึ่งสายพันธุ์ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้ง ทนอุณหภูมิสูงได้ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้โพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากทนต่อการครูดในกระเพาะอาหารได้ (45) นอกจากนี้อุตสาหกรรมอาหารแล้ว ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ก็มีการนำแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสมาใช้เป็นโพรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 4



รูปภาพที่ 8 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *B. anthracis* ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสี crystal violet เจริญอยู่ในน้ำไขสันหลัง และมีเซลล์เม็ดเลือดขาวล้อมรอบ (46)



รูปภาพที่ 9 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *B. cereus* ที่เพาะเชื้อจากเลือด มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสี crystal violet (47)

ตารางที่ 4 เครื่องหมายการค้าของโพรไบโอติกที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสในอุตสาหกรรม
การเพาะเลี้ยงสัตว์ (48)

เครื่องหมายการค้า	สัตว์ที่เป็นกลุ่มเป้าหมาย	บริษัทผู้ผลิต	ส่วนประกอบ
AlCare™	สุกร	Alpharma Inc., Melbourne, Australia	สปอร์ของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> (NCTC 13123)
BioGrow®	สัตว์ปีก สุกร ลูกโค	Provita Eurotech Ltd., Omagh, Northern Ireland, UK	สปอร์ของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> และ <i>Bacillus subtilis</i>
BioPlus® 2B	ลูกสุกร ไก่วง	Christian Hansen Hoersholm, Denmark	เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> และ <i>Bacillus subtilis</i>
Esporafeed Plus®	สุกร ลูกโค	Norel, S.A. Madrid, Spain	เชื้อ <i>Bacillus cereus</i>
Lactopure	สัตว์ปีก สุกร	Pharmed Medicare, Bangalore, India	เชื้อ <i>Bacillus coagulans</i>
Neoferm BS 10	สัตว์ปีก สุกร ลูกโค	Sanofi Sante Nutrition Animale, France	เชื้อ <i>Bacillus clausii</i> 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CNM MA23/3V และ CNM MA66/4M
Toyocerin®	สัตว์ปีก สุกร ลูกโค กระต่าย สามารถ ประยุกต์ใช้ในการ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Asahi Vet S.A., Tokyo (Head Off.), Japan	เชื้อ <i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีการใช้แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสเป็นโพรไบโอติกอย่าง
แพร่หลาย โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เครื่องหมายการค้าของโพรไบโอติกที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสในอุตสาหกรรม
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (48, 49)

เครื่องหมายการค้า	บริษัทผู้ผลิต	ส่วนประกอบ
Biostart®	Microbial Solutions, Johannesburg, South Africa and Advanced Microbial Systems, Shakopee, MN, USA	เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> เชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> เชื้อ <i>Paenibacillus polymyxa</i> และเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>
BioPlus2B®	CHR Hansen	เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> และเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>
BaoZyme-Aqua	Sino-Aqua Corp., Kaohsiung, Taiwan	เชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ Wu-S and Wu-T ผสมกับ เชื้อ <i>Lactobacillus</i> และ <i>Saccharomyces spp.</i>
Promarine	Sino-Aqua company Kaohsiung, Taiwan	เชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>
Liqualive®	Cargill, Animal Nutrition Division	เชื้อ <i>Bacillus</i> ไม่เปิดเผยสายพันธุ์
Sanocare Sanolife Sanoguard	INVE Technologies nv Dendermonde, Belgium	เชื้อ <i>Bacillus</i> หลายสายพันธุ์

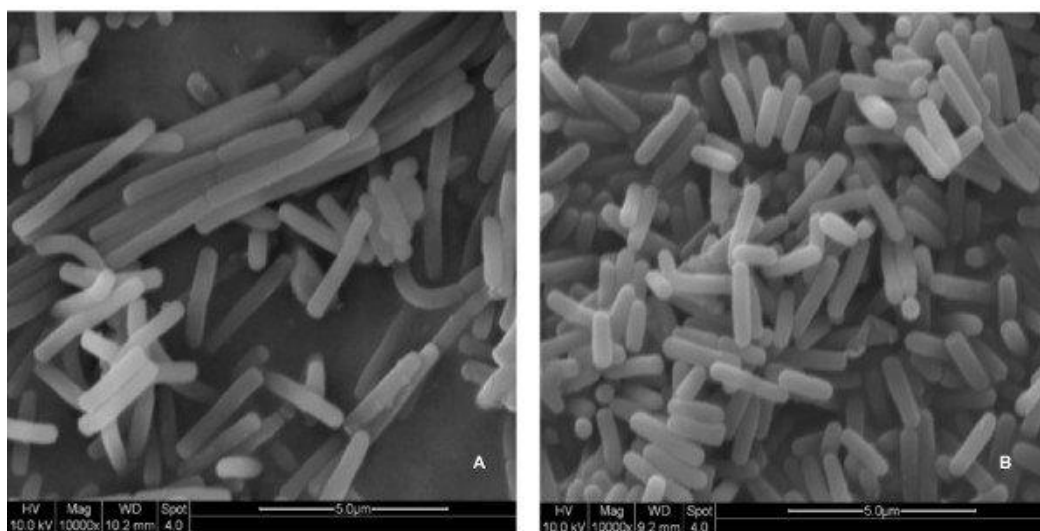
จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มบาซิลลัสถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกใน
อุตสาหกรรมต่างๆอย่างแพร่หลาย รวมถึงถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยหนึ่งในเชื้อที่ถูก
นำมาใช้มาก ได้แก่ *B. licheniformis*

2.4.3 คุณลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Bacillus licheniformis*

2.4.3.1 ลักษณะรูปร่างและคุณลักษณะทั่วไป

เชื้อ *B. licheniformis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งสายพันธุ์ที่สร้าง
สปอร์และไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นแท่ง ดังแสดงในรูปภาพที่ 10 ย้อมติดสี Crystal Violet ในการ
ย้อมแกรมแบคทีเรีย มีความทนต่อการเจริญในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จัดอยู่ในกลุ่ม
mesophilic bacterium อย่างไรก็ตามสามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิสูง โดยอุณหภูมิสูงสุดที่

พบว่าเจริญได้ คือ 57 °C และอุณหภูมิต่ำสุดที่พบว่าเจริญได้ คือ 11 °C สำหรับค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมกับการเจริญ คือ 8.1 และค่าความเป็นกรดต่างต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 4.6 (50) สำหรับค่า Water activity ต่ำสุดที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ คือ 0.915 (51) สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกระเพาะส่วนรุ่มนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีลักษณะเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ความยาว 12 ลำดับกรดอะมิโน คือ ISLEICXIFH DN มีมวลโมเลกุลประมาณ 1,400 ดาลตัน ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37-39 °C pH 6.8-7 (52) และในงานวิจัยของ Halami และคณะ (2019) พบว่า *B. licheniformis* ATCC2512^T มีคุณสมบัติสร้าง ซับแบคทีริโอซิน (sub-bacteriocin) ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่มีโครงสร้างคล้ายซับทิลิน (subtilin) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อดื้อยาในกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกได้ สารดังกล่าวมีลักษณะเป็นสายเปปไทด์ยาว 56 กรดอะมิโน (53)



รูปภาพที่ 10 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) (54)

ปัจจุบัน European Food Safety Authority (EFSA) และ Technical Rules for Biological Agents (TRBA) ประเทศเยอรมัน จัดให้เชื้อ *B. licheniformis* อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ และ สำนักงานความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA) จัดให้อยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่จัดว่าเป็นอันตราย เนื่องจากไม่ปรากฏว่าก่อให้เกิดโรคในคน (55)

2.4.3.2 การนำเชื้อ *B. licheniformis* มาใช้ประโยชน์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลในตารางที่ 5 พบว่า เชื้อ *B. licheniformis* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อให้ *B. licheniformis* สร้างสารที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่ใช้สร้างเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (56) มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *B. licheniformis* มาทดลองใช้ปรับปรุงพันธุกรรมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1983 โดย Barstow ได้ใช้เทคนิค genetic manipulation โดยใช้เชื้อ *B. licheniformis* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และนำ monomeric plasmid DNA ที่บรรจุยีน *thyP3* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ thymidylate synthetase บรรจุเข้าไปภายในเชื้อ และทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ดังกล่าวสำเร็จ (57) หลังจากนั้นจึงมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติโพรไบโอติกของ *B. licheniformis* โดย Fuller ในปี ค.ศ. 1997 ซึ่งได้นำเชื้อ *B. licheniformis* ผสมลงในอาหารของวัว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำนมของวัว พบว่าวัวผลิตน้ำนมได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับอาหารที่ผสมโพรไบโอติก (*Bacillus licheniformis*) นอกจากนี้พบว่าวัวมีระบบย่อยอาหารที่ดีขึ้น กระเพาะส่วนรุ่มมีสภาวะความเป็นกรดเบสเหมาะสมที่จะย่อยอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยโพรไบโอติกไม่รบกวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นชนิดเดิมที่อาศัยอยู่ที่กระเพาะส่วนรุ่ม เมื่อวัดอุณหภูมิของไส้ตรงของวัวพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *B. licheniformis* ไม่ทำให้วัวเกิดอาการท้องเสีย และสามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเพื่อเพิ่มการสร้างน้ำนมในวัวได้ (58) ในปี 2011 คณะวิจัยจากประเทศอินเดีย พบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ α -amylase (α -1, 4-glucan-glucan hydrolase) ของเชื้อ *B. licheniformis* สองสายพันธุ์ ได้แก่ MTCC 2617 และ MTCC 2618 โดยใช้สารตั้งต้น 4 ชนิด คือ แป้ง ข้าว ข้าวสาลี และ ข้าวฟ่าง พบว่า MTCC 2618 สร้าง α -amylase ได้มากกว่า และเอนไซม์ดังกล่าวย่อยข้าวได้ดีที่สุด และทำงานได้ดีที่สภาวะความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และ อุณหภูมิที่ 37 °C (59) หลังจากนั้นเริ่มมีงานวิจัยที่ให้ความสนใจเกี่ยวกับเชื้อ *B. licheniformis* เพิ่มมากขึ้น โดยในปี 2015 Ramesh และคณะ รายงานผลการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่แยกจากลำไส้ของปลาอีสกเทศ พบว่าส่วน โปรตีนที่ผนังเซลล์ (Cell wall proteins: CWPs) และ โปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Whole cell proteins: WCPs) ของ *B. licheniformis* มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาอีสกเทศให้ทำงานได้ดีขึ้น และทำงานได้ในสภาวะที่มีเกลือแร่ของปลาและสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำ หลังจากให้ *B. licheniformis* โดยการผสมเชื้อในอัตราส่วน 10^8 CFU ต่ออาหารปลา 1 กรัม และใช้เลี้ยงปลาอีสกเทศต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสามารถยับยั้งการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาอีสกเทศได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (60) ในปีเดียวกัน Ferreira และคณะ ได้รายงานการค้นพบ

แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่แยกจากกึ่งแวนนาไม และประสิทธิภาพการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งแวนนาไมเมื่อผสมแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสดังกล่าวลงในน้ำและอาหารกึ่ง โดยติดตามพัฒนาการของกึ่งแวนนาไมในระบบเลี้ยงเป็นเวลา 42 วัน พบว่า *B. licheniformis* รหัส CPQBA 571-12 DRM 07 เป็นไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* โดยออกฤทธิ์ยับยั้งกว้างประมาณ 20 มิลลิเมตรในการทดสอบแบบ agar well diffusion เมื่อผู้วิจัยเติม *B. licheniformis* ปริมาณ 10^7 CFU ต่อ น้ำ 1 มิลลิตร และฉีดยอดอาหารกึ่ง 400 กรัม และให้อาหารกับลูกกึ่งอายุ 7 วัน พบว่า เชื้อ *V. alginolyticus* ในระบบเลี้ยงกึ่งแวนนาไมมีจำนวนลดลง และ *B. licheniformis* ทำให้ลูกกึ่งแวนนาไมมีปริมาณโปรตีนในซีรัมเพิ่มขึ้น กิจกรรมของ phenol oxidase ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะการติดเชื้อ มีระดับลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการนำ *B. licheniformis* มาเป็นโพรไบโอติกผสมกับอาหารเลี้ยงกึ่งแวนนาไมเพื่อลดเชื้อก่อโรคในระบบเลี้ยงและเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้กึ่งแวนนาไมได้ (61) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในสัตว์น้ำอื่น เช่น ในปี ค.ศ. 2018 Gao และคณะ พบเชื้อ *B. licheniformis* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และการเกิดโรคของหอยเป่าฮื้อ ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยผู้วิจัยฉีดยอดเชื้อ *B. licheniformis* ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml, 10^5 CFU/ml และ 10^7 CFU/ml ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงหอยเป่าฮื้อ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่ฉีดด้วย *B. licheniformis* ทั้ง 3 กลุ่ม มีการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดฟาโกไซต์ (phagocyte) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เอนไซม์คะตะเลส (catalase) และการแสดงออกของ heat shock protein 70 มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ พบว่า หลังจากนั้นเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* สังเกตผลเป็นเวลา 14 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *B. licheniformis* ปริมาณ 10^5 CFU/ml มีการตอบสนองของเม็ดเลือดขาวต่อในระดับดี การเจริญของหอยเป่าฮื้ออยู่ในระดับปกติ แสดงให้เห็นว่า การฉีดพ่น เชื้อ *B. licheniformis* ผสมลงในอาหารเลี้ยงหอยเป่าฮื้อ ช่วยป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ (62) เมื่อปี 2019 Fernandes และคณะ ได้รายงานผลของกลุ่มโพรไบโอติกที่เจริญได้ในน้ำเค็มเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกึ่งแวนนาไม จากการศึกษาพบว่า *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* และ *Pseudomonas spp.* มีความสามารถในการเพิ่มน้ำหนักของกึ่งแวนนาไม และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส ในระบบย่อยอาหารของกึ่งแวนนาไมได้ จึงสามารถนำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป (63) และเริ่มมีรายงานการสร้างแบคทีริโอซินซึ่งเป็นสารยับยั้งเชื้อก่อโรค ที่วิจัยโดย Halami พบว่า *B. licheniformis* MCC 2512^T สามารถสร้างสาร Sub-lichenin ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ Subtilin เป็นสารยับยั้งเชื้อก่อโรคที่สร้างโดย *B. subtilis* นอกจากนี้สาร Sub-lichenin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและเชื้อดื้อยาในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกอีกด้วย (53)

ในปี ค.ศ. 2020 Chen และคณะได้ค้นพบกลไกการต้านเชื้อก่อโรคของเชื้อ *B. licheniformis* ที่เกิดจากการสร้างแบคทีริโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการก่อโรคของ *A. hydrophila* ในปลาม้าลาย พบว่าปลาม้าลายที่เลี้ยงในสภาวะที่มี *A. hydrophila* และ *B. licheniformis* มีอัตราการอยู่รอดมากถึง 70% และตรวจพบ quorum quenching ของ *B. licheniformis* โดยตรวจหายีน *ytnP* ซึ่งแปลรหัสแล้วจะได้เป็นโปรตีน acyl-homoserine lactone metallo- β -lactamase ซึ่งสารดังกล่าวช่วยลดความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อ *A. hydrophila* แสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อการรักษาการติดเชื้อในสัตว์น้ำ (64) รวมถึงการผนวกเทคนิคในการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อโพรไบโอติกของ Panigrahi และคณะ ที่ใช้ตะกอนจุลินทรีย์ (biofloc) เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มอัตราการอยู่รอดในกุ้งขาวอินเดีย โดยเลือกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส ประกอบด้วย *B. licheniformis*, *Bacillus sp.*, *B. megaterium* และ *Oceanobacillus sp.* พบว่ากุ้งขาวอินเดียที่เลี้ยงระบบที่มีการเติมตะกอนจุลินทรีย์ มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 80-95% มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์ปกติ คือ 10.89 ± 1.2 กรัม มีค่า Phagocytic activity สูงกว่ากลุ่มควบคุม 14.43% และมีการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสสามารถนำมาผลิตเป็นตะกอนจุลินทรีย์เติมลงในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวอินเดียได้ (65)

จากผลงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค และลดความรุนแรงของการเกิดโรคในสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างแบคทีริโอซิน ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกด้วย

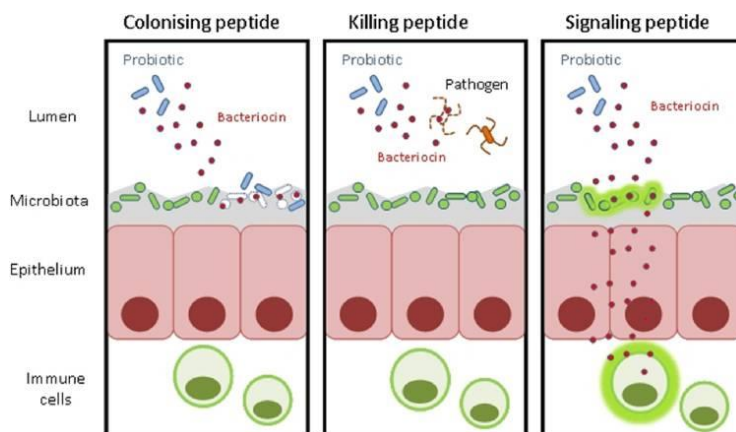
2.5 แบคทีริโอซิน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5.1 แบคทีริโอซิน ประเภทของแบคทีริโอซิน และคุณสมบัติของแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินเป็นสารประเภทโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียง (66) แบคทีริโอซินมีหลายชนิด โดยคุณสมบัติและกลไกการทำงานของแบคทีริโอซินแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน แบคทีริโอซินพบว่าถูกสร้างจากแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก โดยเฉพาะโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ แบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคส่งสัญญาณไปยังเซลล์ โพรไบโอติกอื่นเพื่อเพิ่มจำนวน หรือกระตุ้นให้สร้างแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถส่งแบคทีริโอซินเป็น signal peptide ไปยังเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อให้กำจัดเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย โดยบทบาทของแบคทีริโอซินที่สำคัญ ได้แก่ Colonizing peptide โดยกระตุ้นเซลล์โพรไบโอติกอื่นให้เพิ่มจำนวนและเจริญในตำแหน่งที่ต้องการ Killing peptide จะทำหน้าที่

ยับยั้ง ทำลายเชื้อก่อโรค และ Signal peptide เป็นสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดเชื้อก่อโรค ดังแสดงในรูปที่ 11 (67)



รูปภาพที่ 11 บทบาทของแบคทีริโอซินที่สร้างจากโพรไบโอติกในลำไส้ของมนุษย์ (67)

แบคทีริโอซินแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามโครงสร้างและคุณสมบัติของแบคทีริโอซิน (68) ดังแสดงในตารางที่ 6 อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินในกลุ่มที่ 4 เป็นสารยับยั้งที่มีส่วนประกอบทั้ง โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ทำให้ถูกเรียกว่า แบคทีริโอไลซิน (bacteriolysin) บางตำราจึงไม่จัดเป็นแบคทีริโอซิน ดังนั้นหากกล่าวถึงแบคทีริโอซินจะมีอยู่ 3 กลุ่มหลักๆ (69) ได้แก่

แบคทีริโอซิน กลุ่มที่ 1 เป็นเปปไทด์สายสั้น มีกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีน ทำให้กรดอะมิโนมีส่วนประกอบเพิ่มเติมที่แตกต่างออกไปจากแบคทีริโอซินในกลุ่มอื่นๆ เช่น lanthionine, β -methylanthionine, dehydrobutyrine, dehydroalanine และ labyrinthine เป็นต้น (70) แบคทีริโอซิน กลุ่มนี้ยังถูกแบ่งย่อยออกเป็นกลุ่ม Ia (lantibiotics), กลุ่ม Ib (labyrinthopeptins) และกลุ่ม Ic (sanctibiotics)

แบคทีริโอซิน กลุ่มที่ 2 เป็นเปปไทด์สายสั้น ทนความร้อน ไม่เกิดกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีน แบคทีริโอซิน กลุ่มที่ 2 ถูกแบ่งย่อยออกเป็นกลุ่ม IIa (bacteriocins-like pediocin) กลุ่ม IIb มีองค์ประกอบสองส่วน ต้องทำงานควบคู่กัน กลุ่ม IIc (Circular bacteriocins) และกลุ่ม IId ตัวอย่างแบคทีริโอซินที่มีความโดดเด่นในกลุ่ม IId คือ แบคโทเฟนซิน เอ (71) เป็นแบคทีริโอซินที่มีคุณสมบัติพิเศษคือ มีประจุบวกสูงเทียบเท่าประจุบวกที่พบในสารยับยั้งที่สร้างจากเซลล์ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต ประจุบวกดังกล่าวส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย และช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมายได้ โดยแบคทีริโอซินไม่จำเป็นต้องจับตัวกับเซลล์แบคทีเรีย (72)

แบคทีริโอซิน กลุ่มที่ 3 มีโครงสร้างเป็นก้อนโปรตีนขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน ซึ่งในกลุ่มนี้ยังไม่พบการศึกษามากนัก ตัวอย่างแบคทีริโอซินที่มีความโดดเด่นในกลุ่มนี้ คือ เฮลวิทิน เอ็ม มีคุณสมบัติในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ (73)

แบคทีริโอซินกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่มีขนาดเล็ก และเป็นเปปไทด์สายสั้นจึงจัดอยู่ในกลุ่ม Antimicrobial peptides (AMPs) ซึ่งเป็นเปปไทด์สายสั้น มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีการค้นพบและมีการศึกษาเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์มากกว่าร้อยชนิด (74) เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์มีโครงสร้างหลายรูปแบบ ได้แก่ α -helical, cysteine-rich และ β -sheet ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด histidine (his), arginine (arg), proline (pro) และ tryptophan (trp) เปปไทด์ต้านจุลินทรีย์จะมีฤทธิ์แบบกว้าง (broad spectrum) ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา และไวรัส แม้กระทั่งแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยกลไกในการทำลายเชื้อจะมาจากคุณสมบัติของเปปไทด์ ที่เป็น amphipathic ประกอบด้วยประจุบวกและความเป็น hydrophobic ซึ่งเหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา electrostatic interaction กับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยไขมันชนิดที่เป็นประจุลบ แบบไม่จำเพาะ แล้วจะทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ จนทำให้เชื้อตายในที่สุด ซึ่งกลไกในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์มีหลายรูปแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ หรือสะสมบนเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์บางลงจนเกิด membrane dissolution จากคุณสมบัติของเปปไทด์ที่มีเป้าหมายในทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว ทำให้ลดโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์จะติดต่อเปปไทด์ (75)

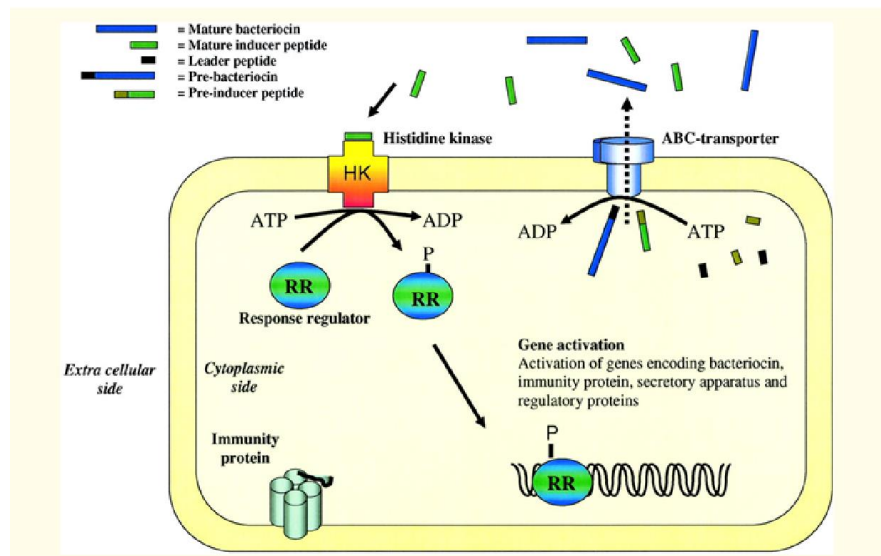
2.5.2 การสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย และการตรวจวิเคราะห์

ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินพบในโครโมโซมของแบคทีเรีย ใช้ Promoter และ Operon ร่วมกับยีนอื่นๆ มีลักษณะการรวมกันของยีนอยู่เป็นกลุ่มยีนภายใต้ Promoter และ Operon เดียวกัน (operon cluster) และต้องการการเหนี่ยวนำด้วยกลไก Quorum sensing ซึ่งกลไกดังกล่าวขึ้นอยู่กับ peptide pheromones หรือ auto-inducer peptide ซึ่งสารเหล่านี้จะสร้างได้ดีขึ้นกับสถานะในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ สถานะความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง สารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการพิเศษ เช่น เชื้อ *Bacillus licheniformis* ต้องการน้ำตาลแลคโตสเป็น inducer เนื่องจากยีนที่สร้างแบคทีริโอซิน อยู่ในกลุ่มยีนเดียวกันกับ lacZ gene ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง β -galactosidase และ Operator ของยีนดังกล่าวต้องการน้ำตาลแลคโตสกระตุ้น จึงจะเกิดการแสดงออก เป็นต้น (76) อีกทั้งการสร้าง auto-inducer peptide เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างแบคทีริโอซินยังเกี่ยวข้องกับสถานะการโตแบบแข่งขัน โดยสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์คู่แข่ง (competing microorganism) และเมื่อเชื้อสร้างแบคทีริโอซินแล้ว แบค

ทรีโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นจะทำหน้าที่เป็น auto-inducer กระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นอีก รวมถึงสารยับยั้งอื่นๆด้วย

กลไก Quorum sensing ควบคุมด้วย Operon ที่มีการแปลรหัสได้เป็นโปรตีน induction factor (IF) หรือ peptide pheromone (Pph) มีการแปลรหัสได้เป็นโปรตีน histidine kinase (HK) และ โปรตีน response regulator (RR) ปริมาณของโปรตีน IF มีความสัมพันธ์กับปริมาณของเซลล์ กล่าวคือเมื่อปริมาณโปรตีน IF มาก จะบ่งชี้ถึงความหนาแน่นของเซลล์มาก และโปรตีน IF ก็มีความสัมพันธ์กับโปรตีน HK หากมี โดยปริมาณโปรตีน IF ที่สูงนี้ จะส่งผลให้มีปริมาณโปรตีน HK สูงขึ้นตามมา ซึ่งหากมีโปรตีน IF และโปรตีน HK มากพอ จะเกิดการกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน RR แสดงออก กลไกเหล่านี้ทำให้เกิดการสร้างแบคทีริโอซิน การขนส่งแบคทีริโอซินและปล่อยออกมานอกเซลล์ รวมถึงการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแบคทีริโอซิน (77) ดังนั้นการสร้างแบคทีริโอซินขึ้นอยู่กับการสร้างโปรตีน IF ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความไวต่อสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อการสร้างโปรตีน IF ที่แตกต่างกัน เช่น *Lactobacillus sakei* Lb706 และ *Lactobacillus curvatus* LTH1174 ที่มีความสามารถในการสร้าง sakacin A มีความไวต่ออุณหภูมิ หรือ กรณียของ *Lactobacillus plantarum* NC8 จะสร้าง plantaricin NC8 (PLNC8) ได้ดีขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแกรมบวกบางสายพันธุ์ในอาหารเหลว หรือ เลี้ยงร่วมกับเซลล์แบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ถูกฆ่าให้ตายด้วยความร้อน

เมื่อแบคทีเรียสร้างแบคทีริโอซิน เริ่มแรกจะเป็นแบคทีริโอซินที่ยังไม่สามารถทำงานได้ จึงเกิดกระบวนการ post-translational modification ของโปรตีน และตัดแต่งโปรตีนจนได้เป็น mature protein ทำให้ได้แบคทีริโอซินที่พร้อมทำงาน (78) และจะถูกส่งออกนอกเซลล์ผ่านทาง ABC transporter และ sec-dependent exporters (79) ดังแสดงในรูปภาพที่ 12



รูปภาพที่ 12 การขนส่งแบคทีริโอซินที่พร้อมทำงานผ่านช่องโปรตีน ABC Transporter บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (79)

ตารางที่ 6 แสดงกลุ่ม กลุ่มย่อย โครงสร้างของแบคทีรีโอซิน และตัวอย่างของแบคทีเรียที่สร้างแบคทีรีโอซิน (53)

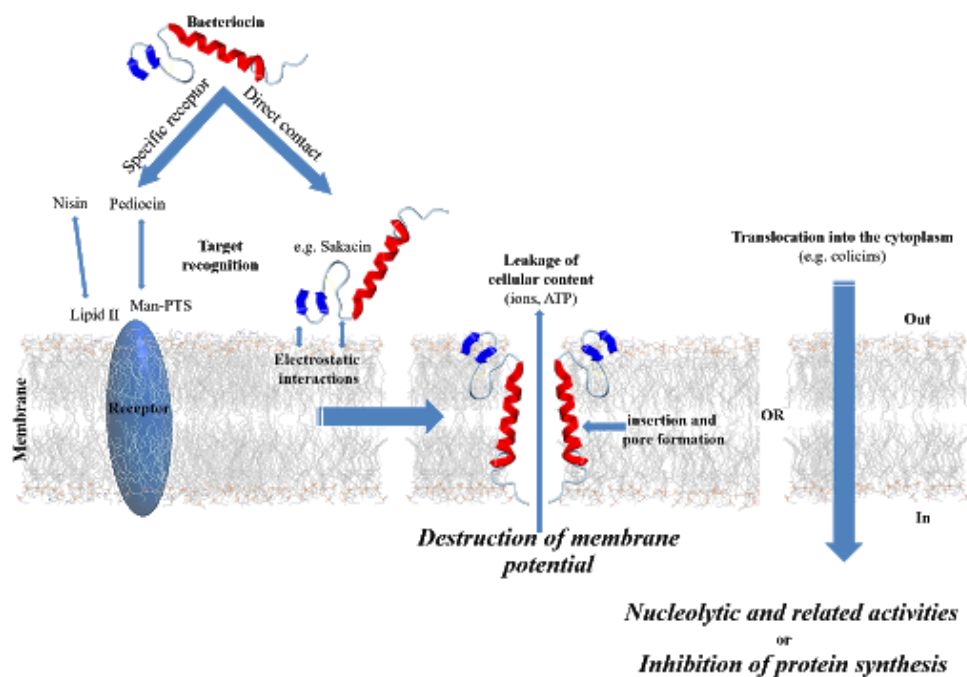
กลุ่ม	กลุ่มย่อย	โครงสร้าง	ตัวอย่างแบคทีรีโอซิน	แบคทีเรียที่สร้าง
I	Ia	สายเปปไทด์สั้น ทนความร้อน ขนาดน้อยกว่า 5 kDa มีแลนโธโอนินและ เบต้า-เมทิล แลนโธโอนิน เป็นองค์ประกอบ	ไนซิน ซัปทิลิน ไลเคนนิน ซับไลเคนนิน	เชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> เชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>
	Ib	สายเปปไทด์สั้น ทนความร้อน แลนโธโอนินเชื่อมกันเป็นวงกลม	ลาไบรินโทเพพทิน-เอ แลคติน	เชื้อ <i>Thimargarita namibiensis</i> เชื้อ <i>Lactococcus sp.</i>
	Ic	ภายในโครงสร้างมีหมู่ซัลเฟอร์ เชื่อมต่อกับแอลฟา-คาร์บอน	ทูริซิน ซีดี	เชื้อ <i>Bacillus thuringiensis</i>
II	IIa	สายสายเปปไทด์สั้น ทนความร้อน ที่ปลายด้าน N ของลำดับกรดอะมิโน มีลำดับของ YGNGV-C	พีดีโอซิน พีเอ-1	เชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i>
	IIb	มีองค์ประกอบสองส่วน ต้องทำงานควบคู่กัน	แลคโทคอกซิน จี	เชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> supsp. <i>Cremoris</i>
	IIc	โครงสร้างเป็นวงกลม	แกเซอร์ซิน เอ	เชื้อ <i>Lactococcus gasseri</i>
	IId	เป็นสายยาว โพรตีนไม่ถูกปรับแต่ง ก่อนส่งออกนอกเซลล์	แบคโทเฟนซิน เอ สร้างจาก	เชื้อ <i>Lactococcus salivarius</i>
III	-	โมเลกุลขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน	เฮลวิทิจิน เอ็ม	เชื้อ <i>Lactobacillus criptatus</i>
IIII	-	โมเลกุลมีบางส่วนเป็นคาร์โบไฮเดรตและไขมัน	ลิวโคโนซิน เอส แลคโตซิน	

การตรวจวิเคราะห์แบคทีรีโอซินที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีรีโอซิน หากเป็นแบคทีรีโอซินที่อยู่ในกลุ่ม 1 และ 2 จะใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และใช้เทคนิค Liquid chromatography/Mass spectrometry โดยหลักการทำงานของเครื่องเป็นการแยกโปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารชนิดหนึ่งโดยอาศัยหลักเกี่ยวกับ

การตรวจวัดเชิงมวลของสารในรูปของไอออน โดยสารตัวอย่างจะเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน (ion source) ของเครื่อง mass spectrometer เมื่อโมเลกุลของสารได้รับพลังงานจะทำให้เกิด ionization กลายเป็นไอออน จากนั้นไอออนต่างๆ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ซึ่งทำการแยกไอออน ทั้งหมดที่ได้จากการแตกตัวออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) ของไอออนแต่ละชนิด จากนั้นไอออนซึ่งผ่านการแยกมวลแล้ว จะถูกส่งผ่านเข้าไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) หากต้องการศึกษาเปปไทด์ที่ข้อมูลการค้นพบแล้ว สามารถนำเปปไทด์ที่ได้ ค้นหาชนิดและคุณสมบัติได้ในฐานข้อมูล เช่น Blast P NCBI MASCOT Uniprot เป็นต้น แต่หาก เปปไทด์ที่ศึกษาเป็นเปปไทด์ชนิดใหม่สามารถเลือกศึกษาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี *De novo* peptide sequencing ด้วยเครื่อง tandem mass spectrometer (MS/MS) ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการศึกษา ลำดับกรดอะมิโนชนิดใหม่สายสั้นๆและเกิดจากกระบวนการ post-translational modification โดย เครื่องจะประมวลผลเปปไทด์ที่มีค่า *de novo* score ซึ่งเป็นค่าแสดงความน่าเชื่อถือของการ ประมวลผล เนื่องจากความสามารถของซอฟต์แวร์ในการประมวลผลสเปกตรัมของ MS/MS ขึ้นอยู่กับ ปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความละเอียดและคุณภาพของเครื่องมือ การกระจายตัวของกรดอะมิโน ทิศทางการกระจายตัวของไอออน การแตกตัวที่ผิดปกติของกรดอะมิโน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะถูกคำนวณ และแปลผลออกมาในรูปของค่า *de novo* score (80)

2.5.3 กลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินมีบริเวณเป้าหมายคือบริเวณที่มีประจุลบที่เกิดจากสารประเภท phosphatidylethanolamine (PE) phosphatidylglycerol (PG) lipopolysaccharide (LPS) lipoteichoic acid (LTA) และ cardiolipin (CL) ซึ่งสารเหล่านี้มีอยู่ในบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้สารเหล่านี้กลายเป็นสารเป้าหมายของแบคทีริโอซิน (81) แบคทีริโอซินจะใช้ส่วนที่มีประจุบวกทำปฏิกิริยาดึงดูดทางประจุไฟฟ้า (Interact electrically) กับชั้น hydrophobic ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบ จากนั้นจะใช้ชั้นส่วนที่เหลื่อสอดแทงทะลุเข้าไปในชั้น Lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ (82) ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ประจุระหว่างภายในและภายนอกเซลล์เสียสมดุล เกิดการลดลงของพลังงาน ATP ภายในเซลล์ (83) จนเซลล์เป้าหมายตายในที่สุด ดังแสดงในรูปภาพที่ 13 ตัวอย่างกลไกการยับยั้งของแบคทีริโอซิน เช่น ไนซินที่สร้างจาก *L. lactis* จะทำให้เกิด D-alanylation ของ teichoic acid ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *S. pneumoniae* ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ไม่แข็งแรง นอกจากนี้ไนซินยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *L. monocytogenes* ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ไฮโทพลาสซึมไหลออกจากเซลล์ และเซลล์แตกตาย (84) การทำงานของแลนติไบโอติกต้องการโมเลกุลเชื่อมต่อ (docking molecules) เช่น lipid II หรือ mannose permease ในระบบ phosphotransferase เพื่อจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (85) นอกจากนี้การมีโมเลกุลเชื่อมต่อทำให้แลนติไบโอติกมีประสิทธิภาพในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดรูเพิ่มมากขึ้น (86) อย่างไรก็ตาม แบคทีริโอซินบางชนิดไม่ต้องการโมเลกุลเชื่อมต่อ เช่น Garvicin ML ที่สร้างจาก *Lactococcus garvieae* DCC43 ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินทรงกลม (87) เป็นต้น



รูปภาพที่ 13 การทำงานของแบคทีริโอซินกลุ่มที่ 2 ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (66)

อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียเป้าหมายบางสายพันธุ์มีความสามารถในการต่อต้านการทำงานของแบคทีริโอซิน ดังสรุปในตารางที่ 7 และแบคทีริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้เท่านั้น เนื่องจากคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ

ตารางที่ 7 แสดงแบคทีเรียและแบคทีริโอซินที่แบคทีเรียชนิดนั้นๆต่อต้านได้

แบคทีเรียเป้าหมาย	แบคทีริโอซินที่ต่อต้าน	ผู้ค้นพบ
<i>Listeria monocytogenes</i>	โนซิน ลิวโคซิน พีดีโอซิน	Harris, L.J. (1991) (88)
<i>Enterococcus faecium</i>	มันทีซิน	Sakayori, Y. และคณะ (2003) (89)
<i>Staphylococcus aureus</i>	โนซิน แลคติซิน	Piper C. และคณะ (2009) (90)
<i>Enterococcus faecalis</i>	พีดีโอซิน โนซิน แลคติซิน	Mona Osata และคณะ (2010) (91)

2.5.4 การนำแบคทีริโอซินมาใช้ประโยชน์

แบคทีริโอซินส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ โดยแบคทีริโอซินที่เป็นที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ โนซิน ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่สร้างจาก เชื้อ *L. lactis* โนซินมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมในช่วงกว้าง ซึ่งองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาให้การรับรองว่าปลอดภัย ใช้ถนอมอาหารได้ ทำให้โนซินได้รับความนิยมอย่างมากในการใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์นม นอกจากโนซินแล้ว ยังมีแบคทีริโอซินในกลุ่ม I และ กลุ่ม IIa ที่ได้รับการยอมรับด้านความปลอดภัยและถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารเช่นกัน เช่น ซับทีลิน ทูริซิน เป็นต้น (92)

แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสมีความสามารถในการสร้างแบคทีริโอซินที่มีความโดดเด่นเนื่องจากแบคทีริโอซินดังกล่าวถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และการเพาะเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย โดยตัวอย่างการนำแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มบациลัสที่สร้างแบคทีริโอซินและการนำไปใช้ประโยชน์

แบคทีเรียที่สร้าง	แบคทีริโอซิน	คุณสมบัติ	แบคทีเรียเป้าหมาย	การนำไปใช้ประโยชน์	ผู้วิจัย	แหล่งอ้างอิง
<i>Bacillus bifidum</i>	บีฟิโดซิน	ทนต่ออุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 60 นาที และทำงานได้ดีในช่วงความเข้มข้นต่าง 2-10	<i>Listeria</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.	ใช้ถนอมอาหาร	Yildirim Z และ Johnson MG (1998)	(93)
<i>Bacillus subtilis</i>	ซับทีลิน อีริเทรซิน	ทนต่ออุณหภูมิ 100 °C และทำงานได้ดีในสภาวะกรด	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	ใช้รักษาแผลที่เท้าของผู้ป่วยเบาหวาน ลดการติดเชื้อ	Joseph B และคณะ (2013)	(94)
<i>Bacillus licheniformis</i>	ไลเคนิน ซับไลเคนิน	ทนต่ออุณหภูมิ 100 °C และทำงานได้ดีในช่วงความเข้มข้นต่าง 1 - 12	<i>Pediococcus lolii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus doran</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	ถนอมอาหาร ลดปริมาณเชื้อก่อโรคอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์	Smitha S. และ Bhat SG. (2013) Halami (2019)	(53, 95)

2.5.5 แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis*

จากการที่แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *B. licheniformis* มีคุณสมบัติที่โดดเด่น ทนความร้อนได้สูงถึง 100 °C นอกจากนี้ยังทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง กว้าง จึงมีผู้สนใจศึกษาการสร้างและสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *B. licheniformis* โดย Cladera-Olivera และคณะ (2004) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* P40 ด้วยเวย์ซีสและวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology: RSM) พบว่าค่าความปั่นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 6.5-7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 26-37 °C ค่าความเข้มข้นของเวย์ซีสที่เหมาะสมในการเลี้ยงอยู่ที่ 70 กรัมต่อลิตร และพบว่ายิ่งเพิ่มเวย์ซีสมาก การสร้างแบคทีเรียโอซินของเชื้อก็จะมากตามไปด้วย (96) นอกจากนี้ เชื้อ *Bacillus licheniformis* ยังสามารถสร้างสารไลเคนินซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินอีกชนิดหนึ่ง โดย Pattnaik P และคณะ (2005) ได้ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างไลเคนินของเชื้อ *B. licheniformis* 26L-10/3RA ที่แยกจากกระเพาะส่วนรูเมนของกระบือ พบว่าเชื้อนี้จะสร้างไลเคนินได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะไร้อากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 39 °C และต้องเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ L-10 ที่มีการเติม 0.5% กลูโคส และ 20% inert thermocol beads และจะสร้างไลเคนินได้ดีที่สุดเมื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มี pH 6.8 บ่มนาน 72-96 ชั่วโมง (97)

Smitha S. และ Bhat SG. (2013) ได้รายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินทน ความร้อน BL8 สร้างจากเชื้อ *B. licheniformis* ที่แยกจากตะกอนใต้ทะเล พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ใน Zobell marine broth 2216 (HiMedia) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ที่สภาวะดังกล่าวส่งผลให้เชื้อ *B. licheniformis* สร้างแบคทีเรียโอซิน BL8 ได้ เมื่อทำ BL8 ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีน และ SDS PAGE นำมาหาปริมาณและศึกษาโครงสร้างของสารด้วย MOLDI-TOF Mass spectrometry พบว่า BL8 มีน้ำหนัก 1.4 กิโลดาลตัน มีความยาว 13 กรดอะมิโน พบคุณสมบัติพิเศษของ BL8 ที่ทนความร้อนได้ถึง 100 °C เป็นเวลา 30 นาที และทำงานได้ใน pH ช่วงกว้างตั้งแต่ 1-12 นอกจากนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นพบว่ามีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด (95) และในปี 2019 Halami พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* MCC 2512^T สามารถสร้างสาร Sub-lichenin ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ Subtilin ซึ่งเป็นสารยับยั้งเชื้อก่อโรคที่สร้างจาก *B. subtilis* นอกจากนี้สาร Sub-lichenin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและเชื้อดื้อยาในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกอีกด้วย (53)

จากงานวิจัยและข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Bacillus licheniformis* เป็นเชื้อโพรไบโอติกที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ และมีความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน จึงสามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ไม่ตกค้างในร่างกายของสัตว์ รวมถึงสารดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อฉวยโอกาสใน

ลำไส้สัตว์หลายชนิด เช่น เชื้อในลำไส้หมู ได้แก่ *Pediococcus lolii* เชื้อในลำไส้วัว ได้แก่ *Enterococcus doran* เชื้อในลำไส้ไก่และเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ในไส้กรอกไก่ ได้แก่ *Enterococcus faecalis* และเชื้อในลำไส้ไก่ ได้แก่ *Enterococcus faecium* นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่มีแนวโน้มที่จะติดต่อแบคทีเรียโชนชนิดอื่น ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อ *Bacillus licheniformis* มีความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในกุ้ง โดยเชื้อทั้งสองเป็นสาเหตุสำคัญของการระบาดของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง (53, 95, 97)

2.5.6 การเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีเรียโชน

การเพิ่มปริมาณและพัฒนาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโชนมีวิธีการที่หลากหลาย ซึ่งทุกวิธีเน้นการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อทำให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน IF เพื่อทำให้เกิดกลไก Quorum sensing โดยกลไกดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างแบคทีเรียโชนของเชื้อแบคทีเรีย ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 2.5.2 ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง การปรับสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีเรียโชน เช่น

การปรับอุณหภูมิ ซึ่งพบว่ามียผลต่อกลไกการควบคุมการสร้างแบคทีเรียโชนจาก Pheromone peptide ของเชื้อ *Lactobacillus sakei* Lb706 ที่จะสร้าง Sakacin A ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C และการผลิตจะลดลงและไม่ผลิตเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33.5-35 °C (98) และพบว่าอุณหภูมิยังมีผลต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียโชนที่สร้างจาก *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei2a* ซึ่งสร้างแบคทีเรียโชนได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงใน MRS broth ที่เติมกลูโคส 5.5 กรัมต่อลิตร และเติม 1.05% Tween 20 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C (99) แหล่งอาหารหรือสารเสริมพิเศษก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างแบคทีเรียโชน โดย Amar A. Telke และคณะ (2019) ได้ค้นพบสูตรอาหารที่เพิ่มปริมาณการสร้าง Garvicin KS (GarKS) ของเชื้อ *Lactococcus garvieae* KS1546 จากการเติมนมพาสเจอร์ไรส์และทริปโทน (PM-T) ทำให้ *Lactococcus garvieae* KS1546 สร้าง GarKS เพิ่มขึ้น 4 เท่า และมีการแสดงออกของ bacteriocin gene cluster (gak) เพิ่มมากขึ้น (100) หรืออาจจะใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วม (Co-culture) คือการเลี้ยงเซลล์สองชนิดร่วมกันในอาหารเลี้ยง เพื่อศึกษาและตรวจสอบผลของเซลล์หนึ่งที่มีผลต่อเซลล์อีกชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่ใช้ในการศึกษาเซลล์ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์สมอง เป็นต้น ซึ่งจะมีประโยชน์ในการตรวจสอบสารที่เซลล์หนึ่งหลั่งออกมาเมื่อมีการเลี้ยงร่วมกับอีกเซลล์หนึ่ง เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด (101)

เทคนิคการเลี้ยงร่วมในแบคทีเรียเริ่มมีการศึกษามากขึ้น โดยอ้างอิงจากการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis ที่ก่อให้เกิดสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ๆ เนื่องจากการกระตุ้นกันเองของเซลล์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (102) นอกจากนี้เทคนิคการเลี้ยงร่วมถูกนำมาใช้ในแบคทีเรียที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม

กระตุ้นให้เกิด cell-cell communication เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเคมีที่อุตสาหกรรมต้องการ เช่น การใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วมในกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มการสร้าง active enzyme และลดผลพลอยได้ (by product) เป็นต้น (103) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Rojo-Bezares B1 และคณะ (2007) พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* strain J23 ร่วมกับ inducing bacteria ในอาหารเหลว จะกระตุ้นให้เชื้อสร้างสาร plantaricin ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Onococcus oeni* และสารดังกล่าวทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 121 °C (104) งานวิจัยของ Carolina Gutiérrez-Cortés และคณะ (2018) พบว่าแบคทีเรียโอสินที่สร้างจาก *Pediococcus pentosaceus* 147 มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Lactobacillus plantarum* LE27 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Cheese Whey Broth (105)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 3

วัสดุ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet type A2)	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
2. เครื่องวัดความชื้นเชื้อ รุ่น Densimat	Labconco, สหรัฐอเมริกา
3. เครื่อง water bath รุ่น WNB 7	BioMerieux, ฝรั่งเศส
4. ตู้เย็น 4 °C	Memmert, เยอรมนี
5. ตู้แช่แข็ง -20 °C	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องเผา loop	สหรัฐอเมริกา
7. ตู้อบ (Incubator) รุ่น INE300	SANYO Electric, ญี่ปุ่น
8. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น Hiclace HVA-85	VWR, สหรัฐอเมริกา
9. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น ES-315	Memmert, เยอรมนี
10. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)	Hirayama, ญี่ปุ่น
11. เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น G560E	Tomy Tech, สหรัฐอเมริกา
12. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น CP2245	Memmert, เยอรมนี
13. เครื่อง Thermal cycler	Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
14. เครื่อง Electrophoresis	SARTORRES, เยอรมนี
14. ชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager Chemidoc XRS)	Biometra GmbH, เยอรมนี
15. เครื่อง Forma orbital Shaker	Labnet International Inc., สหรัฐอเมริกา
16. Solid-phase extraction (SPE)-C18 cartridges	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
17. เครื่อง TruView LC/MS vial	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
18. เครื่อง Orbitrap HF hybrid mass spectrometer	Waters, สหรัฐอเมริกา

19. เครื่อง NanoDrop™ รุ่น 2000 Spectrophotometers	ThermoFisher, สหรัฐอเมริกา
20. เครื่อง Critical Point Dryer	Leica, ออสเตรีย
21. เครื่อง Sputter coater	Balzers, เยอรมนี
22. เครื่อง SEM-EDS รุ่น IT-500HR	JEOL, ญี่ปุ่น
3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
1. จานเพาะเชื้อ (Petri dishes)	ZET, จีน
2. Microcentrifuge tube (ขนาด 1.5 มิลลิตร)	Axygen, สหรัฐอเมริกา
3. Pipette tip (ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร)	Fisherbrand, สหรัฐอเมริกา
4. Auto Pipette (ขนาด 0.1-2, 2-10, 20-100, 100-1000 ไมโครลิตร)	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
5. PCR tube	Axygen, สหรัฐอเมริกา
6. Syringe filter 0.22 µm	PALL Life science, อังกฤษ
7. หลอดฉีดยา ขนาด 5, 10 ml	NIPRO (Thailand) Corporation Limited, ไทย
8. Vivaspin-20	Sartorius, เยอรมนี
3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
1. Absolute Ethanol	Merck, เยอรมนี
2. TE buffer	Thermoscientific, อังกฤษ
3. Phosphate buffer	Thermoscientific, อังกฤษ
4. dNTP	Thermoscientific, อังกฤษ
5. Polymerase Taq enzyme	Thermoscientific, อังกฤษ
6. 10X TBE Electrophoresis buffer	Thermoscientific, อังกฤษ
7. Loading dye	Thermoscientific, อังกฤษ
8. Gel Agarose	1 st BASE, สิงคโปร์
9. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB)	OXOID, อังกฤษ
10. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)	OXOID, อังกฤษ
11. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)	OXOID, อังกฤษ

12. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)	Becton, Dickinson and company, ฝรั่งเศส
13. อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar	EIKEN CHEMICAL, ญี่ปุ่น
14. Poly-L-lysine	Sigma-aldrich, สหรัฐอเมริกา
15. Acetonitrile	Sigma-aldrich, สหรัฐอเมริกา
16. Formic acid	Sigma-aldrich, สหรัฐอเมริกา

3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยและแหล่งที่มาของเชื้อ

เชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากลำไส้กุ้ง ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางเบญจมาศ บุญอบรม นักวิชาการประมงปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง เขต 2 (สมุทรสาคร) กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประเทศไทย

เชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก สายพันธุ์มาตรฐาน รหัส ATCC 14850 รหัส TISTR 2144 และ รหัส TISTR 2192 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เชื้อก่อโรคที่นำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้ง เนื่องจากมีพลาสมิด pVA1 ซึ่งจะพบพลาสมิดชนิดนี้ในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้งเท่านั้น ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นิตติ ชูเชิด อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเก็บรักษาเชื้อ

3.2.2.1 *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากลำไส้กุ้ง เพาะเลี้ยงใน TSA และ TSB บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเจือ 1-2 โคโลนี เก็บรักษาที่ -20 °C ใน TSB และกลีเซอรอล 20%

3.2.2.2 *Bacillus licheniformis* ที่เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก สายพันธุ์มาตรฐาน รหัส ATCC 14850 รหัส TISTR 2144 และ รหัส TISTR 2192 เพาะเลี้ยงใน TSA และ TSB บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเจือ 1-2 โคโลนี เก็บรักษาที่ -20 °C ใน TSB และกลีเซอรอล 20%

3.2.2.3 เชื้อทดสอบ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ ที่ก่อโรคในกุ้ง เพาะเลี้ยงใน TSA ที่มีเกลือความเข้มข้น 1.5% บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ เชื้อ 1-2 โคโลนี เก็บรักษาที่ -20 °C ใน TSB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ กลีเซอรอล 20%

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของ กุ้งด้วยการหาลำดับเบส

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยความร้อน

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ในอาหารเหลว TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปั่น เหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อตกตะกอนเซลล์ แยกส่วนใสออก นำ ตะกอนมาละลายด้วย TE buffer จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 96-100 °C เป็นเวลา 15 นาที และ นำมาแช่ในน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ดูดสารละลายส่วนใส เติม absolute alcohol 1 ml จนตกตะกอน และนำไป แช่เย็นที่ -20 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ซับให้แห้ง และเติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอน นำไปปั่น ตกตะกอนที่ 12,000 rpm 4 °C เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ซับให้แห้ง เติม TE buffer 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ต่อไป (106)

3.3.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อหาเอกลักษณ์ของแบคทีเรียใน การทดลองนี้จะใช้ 16s rRNA sequence ซึ่งมีความจำเพาะกับ เชื้อ *Bacillus licheniformis* ได้แก่ Forward primer: CGC TCA CCA TAT GCA CAG CTC T และ Reverse primer: CGG TTT ATC GCT TGA GAC TCG G ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Almeida ในปี 2014 เติมสารเคมีในปริมาณที่ระบุ ในตารางที่ 9 ลงใน Micro tube โดยเติม DNA template เป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยตั้งค่าสภาวะของปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอน ดังนี้ ขั้น pre-Denature 94 °C เป็น เวลา 5 นาที ขั้น Denature 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ขั้น Annealing 60 °C เป็นเวลา 45 วินาที และ ขั้น Extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที (107)

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสารเคมีเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ลำดับ	สารเคมี	ปริมาตรที่ปีเปิด	หมายเหตุ
1	DNA template	1 µl/strain	
2	dNTP	2.5 µl	0.5 µl / tube
3	F primer	2.5 µl	0.5 µl / tube
4	R primer	2.5 µl	0.5 µl / tube
5	Buffer	12.5 µl	2.5 µl / tube
6	น้ำกลั่นปราศจากไอออน	95 µl	19 µl / tube
7	<i>Taq</i> DNA polymerase	5 µl	1 µl / tube

3.3.3 เทคนิค Gel Electrophoresis

ผสม PCR product กับ Loading dye ความเข้มข้น 1 เท่า จากนั้นปีเปิดดีเอ็นเอลงในหลุมเจลที่มีความเข้มข้นของ Agarose gel 1% การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis โดยใช้ 16s rRNA ของ *Bacillus licheniformis* ATCC14850 เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นกลุ่มควบคุมแบบลบ ผสม PCR product กับ Loading dye จากนั้นปีเปิด DNA ลงในหลุมเจล ตั้งค่าใช้สนามไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับ DNA ladder ขนาด 100 bp บันทึกผลที่เกิดขึ้นด้วยชุดถ่ายภาพเจล (Molecular Imager Chemidoc XRS)

3.3.4 วิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rRNA ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ด้วยเทคนิค DNA sequencing

นำ PCR product ที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากข้อ 3.3.3 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rRNA ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่ Bionics, Gangwon-do (Republic of Korea) จากนั้นใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ในการวิเคราะห์ผล

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้ง

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* บน TSA บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6

CFU/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 36, 48, 60, 72, 84, 96 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหาเวลาบ่มที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน จากนั้นทำการเก็บส่วนใสสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำส่วนใส (Cell Free Supernatant: CFS_(BL)) มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำ CFS_(BL) ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งในขั้นตอนต่อไป โดยใช้เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เป็นเชื้อทดสอบ ดังระบุในข้อ 3.2.2.3 ด้วยวิธี Total Plate Count (95) โดยมีลำดับขั้นตอน ดังนี้ เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* บน TSA นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อทดสอบ 1-2 โคโลนีเจือจางในน้ำเกลือ ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/มิลลิลิตร เพื่อให้ปริมาณตั้งต้นของเชื้อทดสอบให้เท่ากัน ปรับค่าความขุ่นโดยน้ำเกลือ เดิม CFS_(BL) จากข้อ 3.4 CFS_(BL+Vp) และ CFS_(BL+Va) จากข้อ 3.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง 10⁵ เท่า และนำมา Spread Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบน plate โดยมีกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ เชื้อทดสอบที่ไม่มี CFS ปรากฏจากเซลล์ของ *B. licheniformis* และกลุ่มควบคุมเชิงลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเกลือ 1.5% ที่ใช้เลี้ยง *B. licheniformis* (108)

เลือกเวลาบ่มที่ทำให้ส่วนใสมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด มาใช้ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* บน TSA บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 42 °C จากนั้นทำการเก็บส่วนใสสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำส่วนใส (Cell Free Supernatant: CFS_(BL)) มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำ CFS_(BL) ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งในขั้นตอนต่อไป โดยใช้เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เป็นเชื้อทดสอบ ดังระบุในข้อ 3.2.2.3 ด้วยวิธี Total Plate Count

เลือกเวลาบ่ม และอุณหภูมิในการบ่มที่ทำให้ส่วนใสมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด มาใช้ทดสอบหาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* บน TSA บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่เติมเกลือ 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5% โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/ml จากนั้นทำการเก็บส่วนใสสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่

อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำส่วนใส (Cell Free Supernatant: CFS_(BL)) มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำ CFS_(BL) ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งในขั้นตอนต่อไป โดยใช้เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เป็นเชื้อทดสอบ ดังระบุในข้อ 3.2.2.3 ด้วยวิธี Total Plate Count

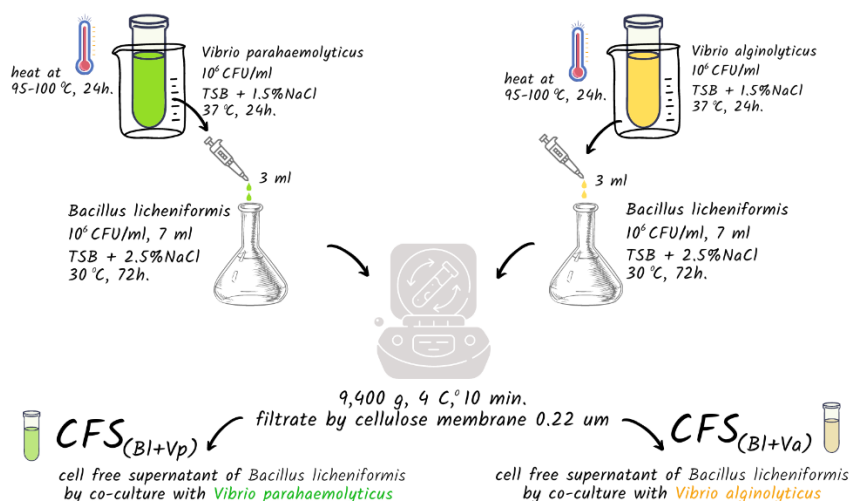
เลือกเวลาบ่ม อุณหภูมิในการบ่ม และความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้ส่วนใสมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด มาใช้ทดสอบหาสภาวะการเติมอากาศที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* บน TSA บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นำโคลนนี้มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/ml ภายใต้สภาวะการเขย่าด้วยเครื่อง Shaker incubator ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า (109) จากนั้นทำการเก็บส่วนใสสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำส่วนใส (Cell Free Supernatant: CFS_(BL)) มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำ CFS_(BL) ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งในขั้นตอนต่อไป โดยใช้เชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เป็นเชื้อทดสอบ ดังระบุในข้อ 3.2.2.3 ด้วยวิธี Total Plate Count

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง ผู้วิจัยทำการทดสอบ 3 ครั้งในแต่ละครั้งและทำการทดลอง 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

3.5 การใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วม

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/ml และเตรียม *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้งใน TSB ที่มีเกลือความเข้มข้น 1.5% ให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาต้มที่อุณหภูมิ 96-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม *Vibrio parahaemolyticus* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว TSB ที่มี *Bacillus licheniformis* และผสมด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) บ่มที่สภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างแบคทีริโอซิน จากนั้นทำการเก็บส่วนใสสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำส่วนใส (Cell Free Supernatant: CFS_(BL+VP)) มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย นำ CFS_(BL+VP) มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ด้วยวิธี Total Plate Count ดังระบุในข้อ 3.6

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6 CFU/ml และเตรียม *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้ง ใน TSB ที่มีเกลือความเข้มข้น 1.5% ให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6 CFU/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาต้มที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม *Vibrio alginolyticus* ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว TSB ที่มี *Bacillus licheniformis* และผสมด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) บ่มที่สภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างแบคทีริโอซิน จากนั้นทำการเก็บส่วนใสสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำส่วนใส (Cell Free Supernatant: CFS_(Bl+Va)) มาตรฐานที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย นำ CFS_(Bl+Va) มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ด้วยวิธี Total Plate Count ดังระบุในข้อ 3.6



รูปภาพที่ 14 แสดงลำดับขั้นตอนการใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วม

3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอซิน

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินด้วยวิธี Total Plate Count เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* บน TSA นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อทดสอบ 1-2 โคลนิจึงจางในน้ำเกลือ ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6 CFU/มิลลิลิตร เพื่อให้ปริมาณตั้งต้นของเชื้อทดสอบให้เท่ากัน ปรับค่าความขุ่นโดยน้ำเกลือ เติม CFS_(Bl) จากข้อ 3.4 CFS_(Bl+Vp) และ CFS_(Bl+Va) จากข้อ 3.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง 10^5 เท่า และนำมา Spread Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบน plate โดยมีกลุ่มควบคุมเชิงบวก

คือ เชื้อทดสอบที่ไม่มี CFS ของ *B. licheniformis* และกลุ่มควบคุมเชิงลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเกลือ 1.5% ที่ใช้เลี้ยง *B. licheniformis* (108)

3.7 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ในอาหารเหลว TSB ในสภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างแบคทีริโอซินตามข้อ 3.4 และ 3.5 และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำ CFS_(Bl) จากข้อ 3.4 CFS_(Bl+Vp) และ CFS_(Bl+Va) จากข้อ 3.5 มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* บน TSA นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อทดสอบ 1-2 โคโลนีเจือจางในน้ำเกลือ ปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/มิลลิลิตร เพื่อให้ปริมาณตั้งต้นของเชื้อทดสอบให้เท่ากัน ปรับค่าความขุ่นโดยน้ำเกลือ จากนั้นเติมส่วนใสปราศจากเซลล์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทดสอบมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อตกตะกอนเซลล์ แยกส่วนใสออก นำตะกอนมาละลายด้วยน้ำเกลือ จากนั้นใส่น้ำยา凍เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ จากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทดสอบภายหลังจากการเลี้ยงร่วมกับแบคทีริโอซิน ดังนี้

1. เตรียมกระจกสไลด์ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาดไม่เกิน 1 ตารางเซนติเมตร หยดสารละลาย Poly-L-lysine 1 หยด ลงบนกระจกสไลด์ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วซับสารส่วนเกินออก
2. หยดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ลงบนกระจกสไลด์ทิ้งไว้ 15 นาที
3. ล้างด้วย Phosphate Buffer 2 ครั้ง และน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
4. ล้างด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 30% 50% 70% 95% และ 100% โดยที่ความเข้มข้น 100% ล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
5. นำไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (Leica model EM CPD300, Austria)
6. ติดตัวอย่างบนแผ่นวางด้วยเทปกาวสองหน้า แล้วนำไปฉาบทอง (Sputter coater, Balzers model SCD 040, Germany)

ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM-EDS รุ่น IT-500HR (Scanning Electron Microscope and Energy Dispersive X-ray Spectrometer (JEOL, JSM-IT-500HR and JEOL, JED-2300)) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

3.8 การทำแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและปริมาณของแบคทีริโอซิน

3.8.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ในอาหารเหลว TSB ในสภาวะที่เหมาะสมกับการสร้างแบคทีริโอซิน และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,400 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกตะกอนออก นำ CFS_(BI) มากรองผ่านที่กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน ที่เชื่อมต่อกับไซริงค์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเซลล์แบคทีเรีย นำ CFS_(BI) ที่ได้มาคัดเลือกเพื่อให้ได้โปรตีนในขนาดที่ต้องการโดยใช้ Vivaspın-20 (molecular weight cut-off of 10 kDa) จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Solid-phase extraction (SPE)-C18 cartridges ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วย 20% acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และชะตัวอย่างด้วย 95% acetonitrile และน้ำปราศจากไอออน ระเหยสารชะด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยเครื่องนาโนดรอปที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างโปรตีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (110, 111)

3.8.2 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและปริมาณของแบคทีริโอซิน

3.8.2.1 การทำตัวอย่างโปรตีนให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างโปรตีนจากข้อ 3.8.1 มาทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนและปริมาณของแบคทีริโอซินด้วยเทคนิค Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ที่ศูนย์โอมิกส์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประเทศไทย โดยหลักการทำงานของเครื่องเป็นการแยกโปรตีนที่อยู่ในสภาวะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrometry ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารชนิดหนึ่งโดยอาศัยหลักเกี่ยวกับการตรวจวัดเชิงมวลของสารในรูปของไอออน โดยสารตัวอย่างจะเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน (ion source) ของเครื่อง mass spectrometer เมื่อโมเลกุลของสารได้รับพลังงานจะทำให้เกิด ionization กลายเป็นไอออน จากนั้นไอออนต่างๆ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ซึ่งทำการแยกไอออน ทั้งหมดที่ได้จากการแตกตัวออกจากรันตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) ของไอออนแต่ละชนิด จากนั้นไอออนซึ่งผ่านการแยกมวลแล้ว จะถูกส่งผ่านเข้าไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) โดยนำตัวอย่างโปรตีนมาละลายใน 2% acetonitrile/0.1% formic acid จากนั้นตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TruView LC/MS vial (Waters, UK) โดยใช้ reverse-phase C18 PepMap 100 trapping column และใช้ สารชะ A คือ 0.1% HCO₂H/H₂O สารชะ B คือ 0.1% HCO₂H/CH₃CN และตั้งค่าอัตราการไหลของสารที่ 300 นาโนลิตร/นาที และเก็บข้อมูล Spectrum ด้วยเครื่อง Orbitrap HF hybrid mass spectrometer และ UltiMate 3000 LC system (112)

3.8.2.2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็นในการเป็นสารยับยั้งของลำดับกรดอะมิโนที่เชื้อ *Bacillus licheniformis* สร้างขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม

นำผลลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากข้อ 3.8.2.1 ที่มีค่าพารามิเตอร์ *De novo* score มากกว่า 70% มาวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีแนวโน้มความน่าจะเป็น antimicrobial peptide โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Antimicrobial Peptide Database ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของเปปไทด์ในการเป็น antimicrobial peptide ซึ่ง APD server เป็นแหล่งรวบรวมข้อมูลของเปปไทด์ด้านจุลชีพทั้งในส่วนของโครงสร้างและหน้าที่ที่ได้มีการค้นพบจากสิ่งมีชีวิต (102) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เปิดหน้าโปรแกรม (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)
2. กดเลือกหัวข้อ Calculation and Prediction
3. ใส่ลำดับกรดอะมิโน (peptide sequence) ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์แล้วกดปุ่ม Submit
4. จากนั้นเข้าสู่ระบบการทำนายและวิเคราะห์สายเปปไทด์ของโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor ซึ่งในโปรแกรมจะแสดงรายละเอียด จำนวนของกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic และบอกความน่าจะเป็นของ peptide sequence ที่ถูกใส่เข้าไป ในระบบว่ามีแนวโน้มความน่าจะเป็น antimicrobial peptide หรือไม่
5. กดปุ่ม do alignment ในกรณีที่โปรแกรมทำนายว่ามีความน่าจะเป็น antimicrobial peptide เพื่อค้นหาเปปไทด์ที่คล้ายกันมากที่สุดในฐานข้อมูล ซึ่งในโปรแกรมจะให้เปปไทด์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดมาให้ 5 อันดับแรก โดยเรียงตามลำดับเปอร์เซ็นต์ที่มีความเหมือนมากที่สุดจากมากไปน้อยซึ่งสามารถตรวจสอบรายละเอียดของเปปไทด์แต่ละชนิดได้

ข้อมูลและคุณสมบัติของเปปไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ประกอบด้วย ความยาวของเปปไทด์ ประจุ มวลโมเลกุล และค่า Protein binding potential (Boman index) นำมาใช้ในการคัดเลือกเปปไทด์ที่สนใจ โดยนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของแบคทีริโอซินที่เชื้อ *B. licheniformis* ที่แยกได้จากลำไส้วัวสร้างขึ้น (52) โดยค่า Protein binding potential (Boman index) บ่งชี้ความสามารถของโปรตีนในการจับตัวกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งมีความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา Electrostatic interaction ของแบคทีริโอซิน จึงนำเฉพาะค่าที่ไม่ติดลบมาพิจารณา

3.8.2.3 การทำนายโครงสร้างของโปรตีนด้วยโปรแกรม PEP-FOLD3

โปรแกรม PEP-FOLD3 *De novo* peptide structure prediction เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการทำนายโครงสร้างในของเปปไทด์ที่มีความยาว 5-50 กรดอะมิโน โดยโปรแกรมจะทำนายลักษณะของโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนที่ใส่ข้อมูลเข้าในโปรแกรม และสร้างเป็นภาพสามมิติ โดย

อาศัยการจดจำการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเปปไทด์นั้นๆ (110) โดยการใช้โปรแกรม PEP-FOLD3 *De novo* peptide structure prediction มีขั้นตอนดังนี้

1. เข้าเว็บไซต์ PEP-FOLD3 server (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>)
2. ป้อนข้อมูลลงในช่องค้นหา “peptide sequence” จากนั้นกด RUN
3. เลือกโครงสร้างสามมิติ
4. คลิก Download Files

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง ใช้สถิติ Unpaired t-test ที่กำหนดนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 22 บริษัท SPSS: An IBM Company ประเทศสหรัฐอเมริกา

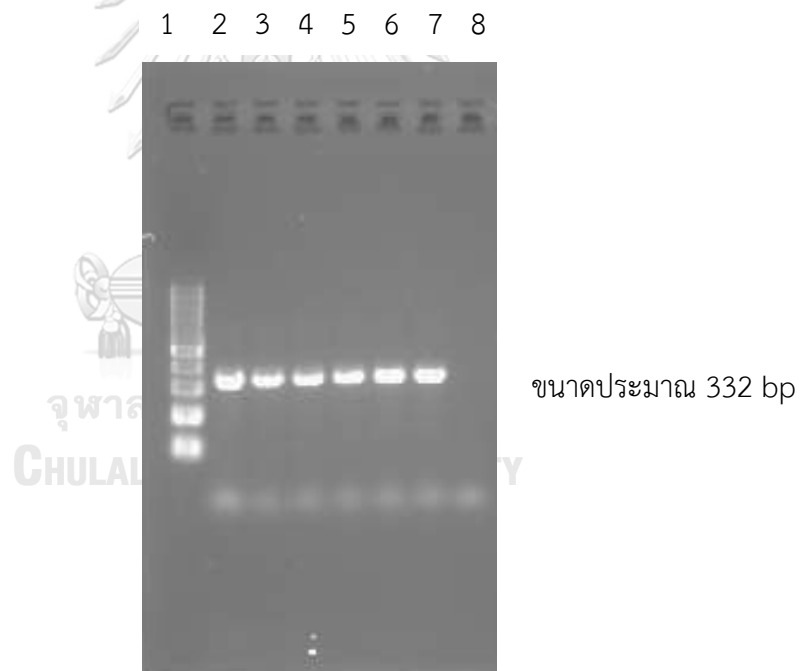


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งด้วยการหาลำดับเบส

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *B. licheniformis* ด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 96 – 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16s rRNA ด้วย Forward primer คือ CGC TCA CCA TAT GCA CAG CTC T และ Reverse primer คือ CGG TTT ATC GCT TGA GAC TCG G และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของยีนด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis พบว่ายีนมีขนาดประมาณ 332 bp เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. licheniformis* ปม.1 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเชื้อ *B. licheniformis*



รูปภาพที่ 15 ผลการตรวจสอบขนาดของยีนของ *Bacillus licheniformis* ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis พบว่ายีนมีขนาดประมาณ 332 bp เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม โดยเรียงลำดับตัวอย่างจากซ้ายไปขวา ดังนี้ ladder(1), ATCC14850(2), TISTR2144(3), TISTR2192(4), *Bacillus licheniformis* (5-7) และควบคุมเชิงลบ(8) ตามลำดับ

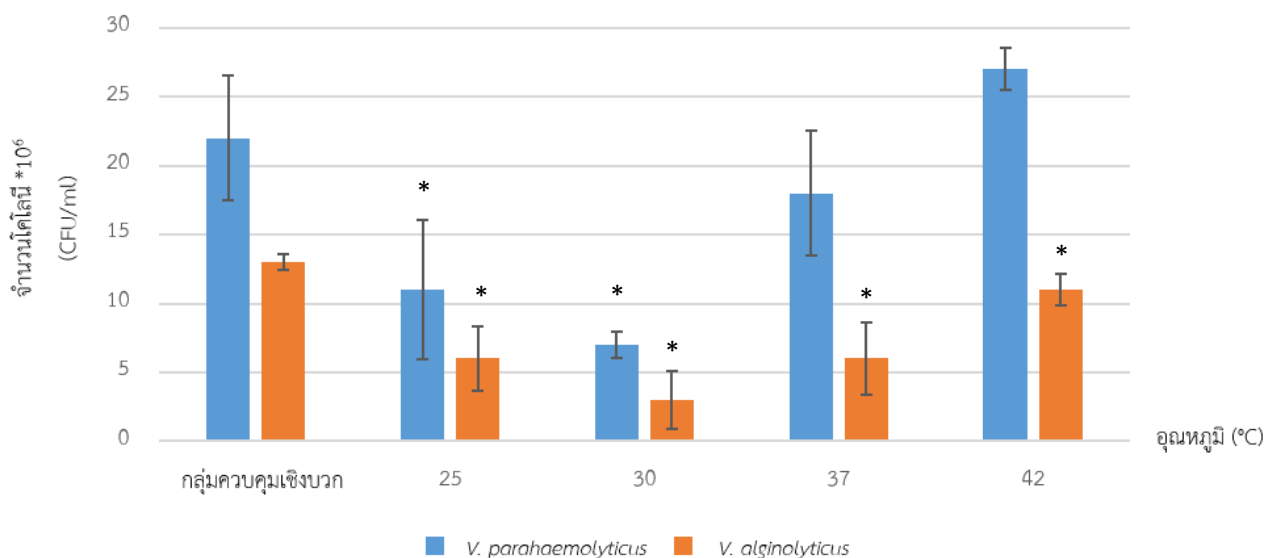
เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน 16s rRNA ได้ผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม Blast ว่าใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* strain ATCC 14580 chromosome และ complete genome ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน 16s rRNA ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม Blast เทียบกับ *Bacillus licheniformis* ในฐานข้อมูลของ NCBI

ตัวอย่าง	ขนาด (bp)	% Identification
TISTR 1109 (ATCC 14850)	315	80.95
TISTR 2144	315	81.23
TISTR 2192	312	89.49
<i>B. licheniformis</i> ปม.1	314	89.78

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

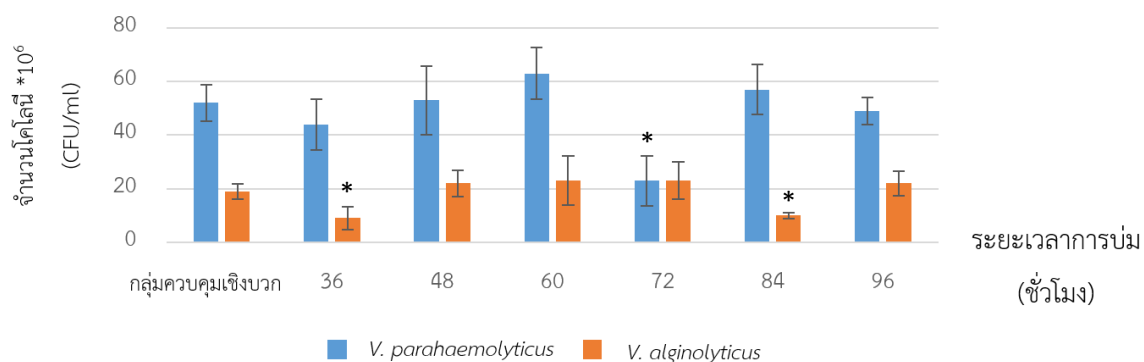
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในสภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้ง โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6 CFU/มิลลิลิตร ป่มที่อุณหภูมิ แตกต่างกันตั้งแต่ 25, 30, 37, 42 องศาเซลเซียส เมื่อนำ Cell free supernatant (CFS_(BT)) มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด ดังแสดงผลในรูปที่ 16



* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

รูปภาพที่ 16 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) ที่บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

ผลการทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้ง เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ CFS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10⁶ CFU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่า Cell free supernatant (CFS_(BL)) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อนาน 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* ได้ดีที่สุดในรูปที่ 17

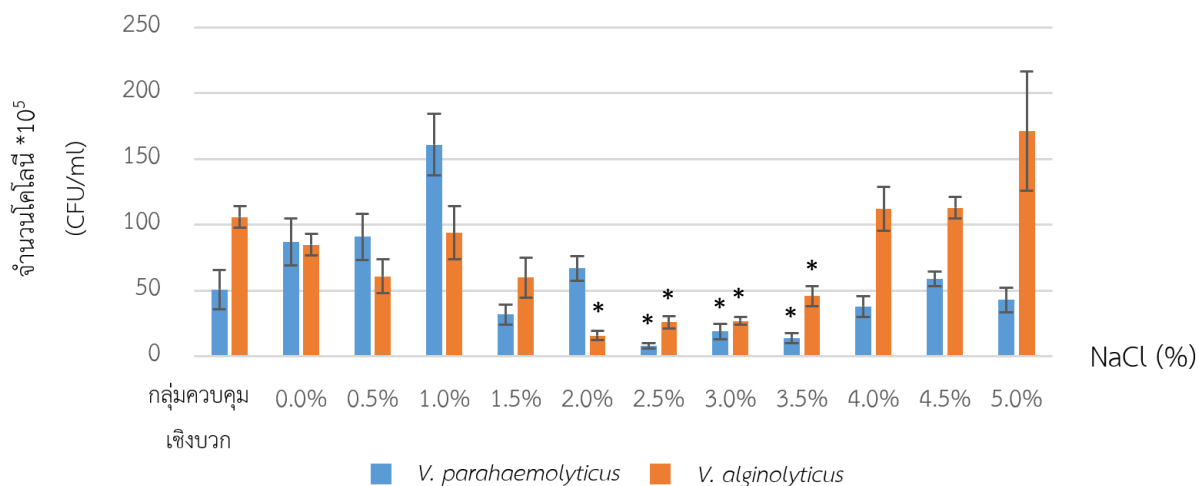


* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

รูปภาพที่ 17 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในระยะเวลาต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

ปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อการกระตุ้นให้เชื้อ *B. licheniformis* สร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งที่น่าสนใจคือความเข้มข้นของเกลือโดยในการทดลองนี้ได้รับความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.5% ถึง 5% พบว่า ที่ความเข้มข้นของเกลือ 2.5 % จะช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *B. licheniformis* สร้างสารยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* ได้ดีที่สุด ดังแสดงผลในรูปที่

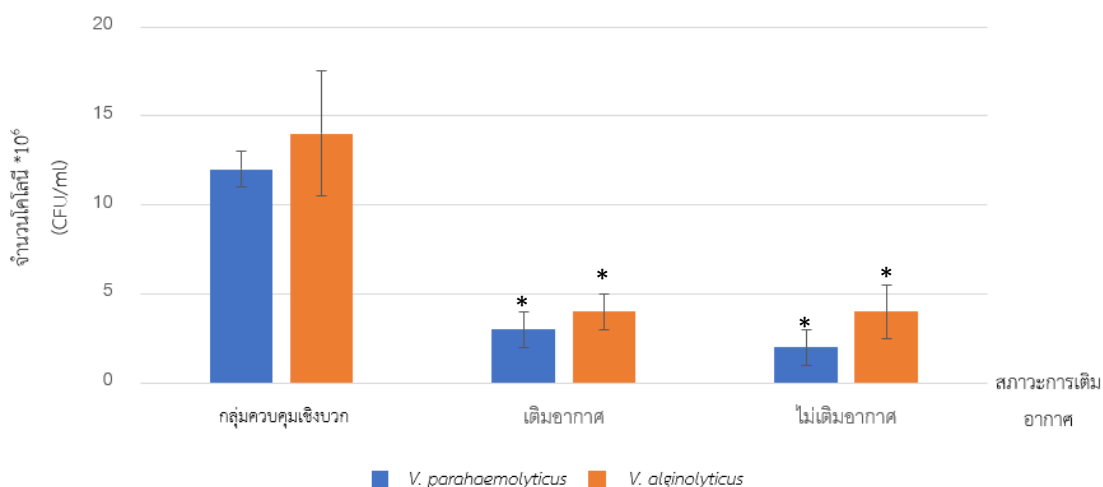
18



* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

รูปภาพที่ 18 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

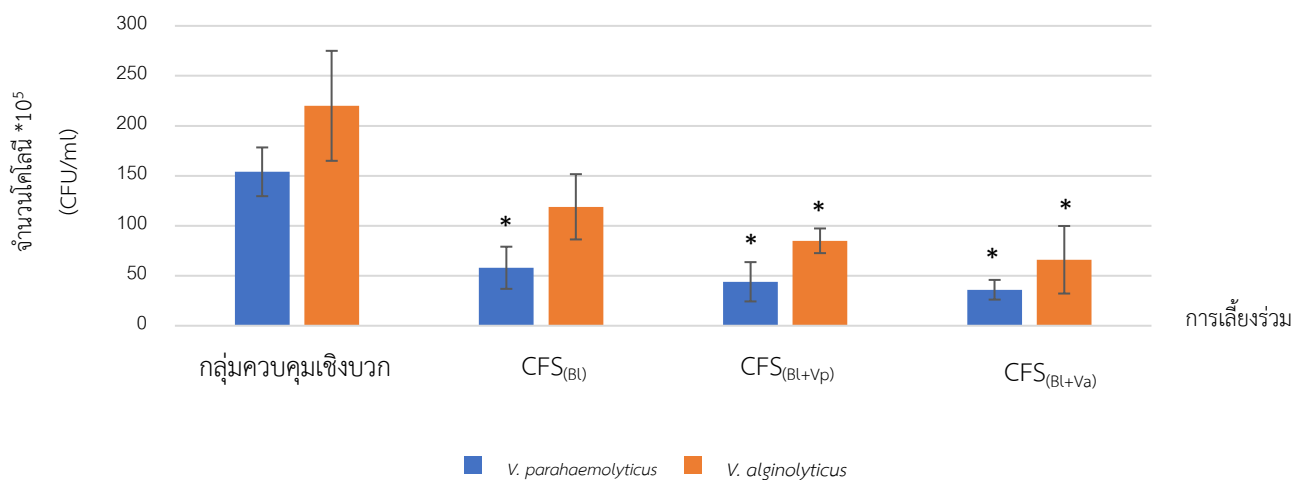
อีกปัจจัยหนึ่งที่คาดว่าจะมีผลกระทบต่อการกระตุ้นให้เชื้อ *B. licheniformis* สร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งที่น่าสนใจคืออากาศ โดยในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในสภาวะเติมอากาศด้วยการเขย่าที่ 150 รอบ/นาที และสภาวะไม่เติมอากาศด้วยการไม่เขย่า พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* สร้างสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ตัวอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 2 สภาวะ ดังแสดงผลในรูปที่ 19 ผู้วิจัยจึงเลือกเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ไม่สภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ เนื่องจากเป็นการลดต้นทุนของการใช้เครื่องเขย่าเพื่อเติมอากาศ



* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

รูปภาพที่ 19 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อป้อนกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(B1)) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่ป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น 2.5% ในสภาวะการเติมอากาศและไม่เติมอากาศ เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

นอกจากนี้ จากการศึกษาค้นคว้าการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อแบคทีเรียพบว่าการเลี้ยงร่วมมีผลต่อการกระตุ้นให้เชื้อสร้างแบคทีริโอซินเพิ่มมากขึ้น และในงานวิจัยของ Rojo-Bezarez B1 และคณะ (2007) พบว่าการเลี้ยงร่วมทำให้แบคทีเรียสร้างแบคทีริโอซินชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (104) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน และนำมาทดสอบหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับเชื้อทดสอบทั้งสองเชื้อ พบว่าแบคทีริโอซินยังคงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังแสดงผลในรูปที่ 20 อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อทดสอบแตกต่างจากแบคทีริโอซินที่ไม่ได้เกิดจากการเลี้ยงร่วมอย่างไม่มีนัยสำคัญ

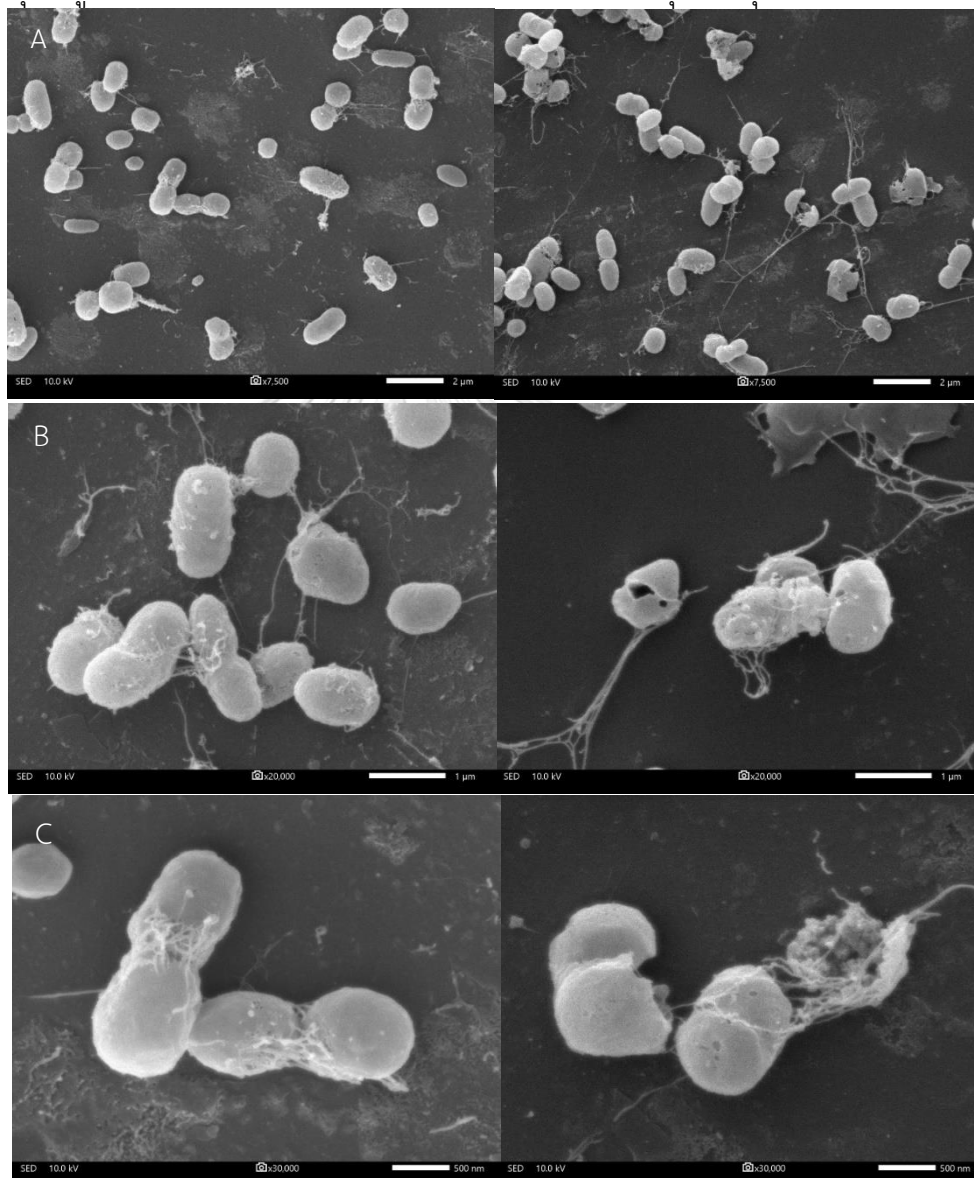


* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

รูปภาพที่ 20 แผนภาพแสดงจำนวนโคโลนีของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เมื่อบ่มกับสารยับยั้งที่สร้างจาก *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเติมเกลือที่ระดับความเข้มข้น 2.5% ในสภาวะการไม่เติมอากาศ โดยทดสอบกับสารส่วนใสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* ร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(BL+Vp)) และ *Bacillus licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(BL+Va)) เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4.3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนร่วมกับแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

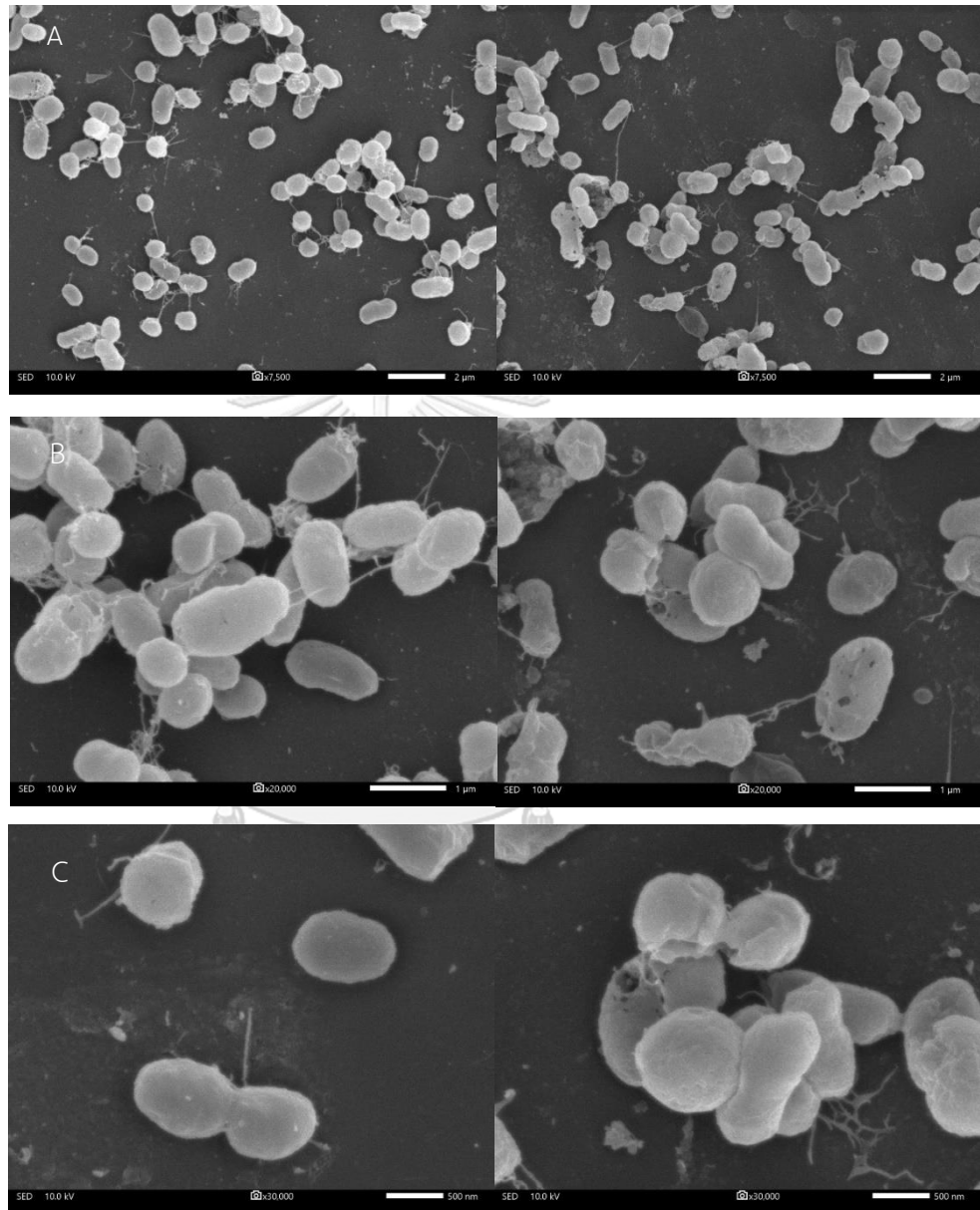


รูปภาพที่ 21 แสดงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนร่วมกับแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา) เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสิน พบว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบการบวมและแตกของเซลล์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 21



4.3.2 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

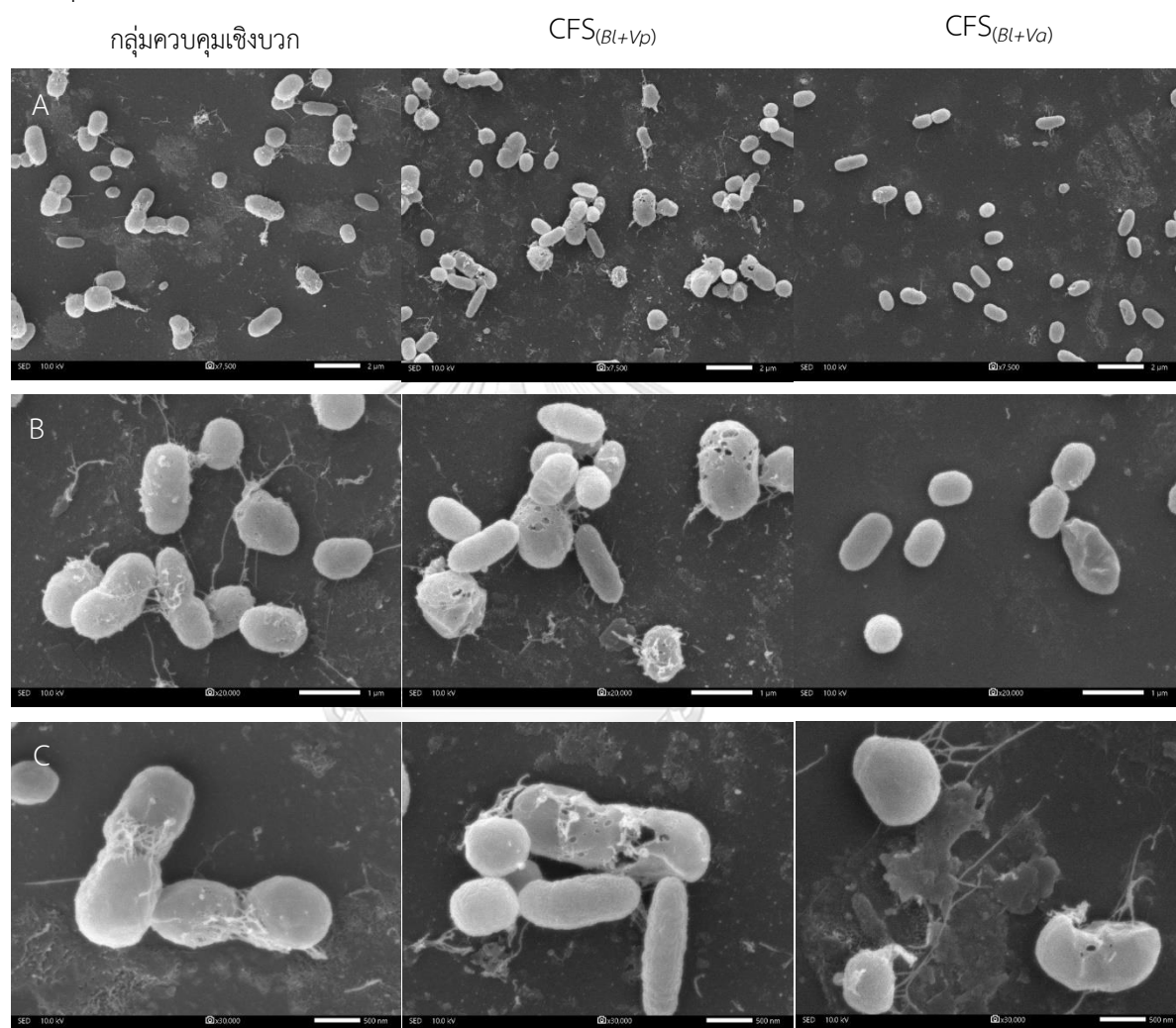


รูปภาพที่ 22 แสดงลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ขวา) เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(BL)) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้บ่มร่วมกับแบคทีริโอซิน พบว่า เชื้อ *Vibrio alginolyticus* มีรูปร่างผิดปกติ และผนังเซลล์เป็นรู ดังแสดงในรูปภาพที่ 22



4.3.3 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ($CFS_{(Bl+Vp)}$) และ *Vibrio alginolyticus* ($CFS_{(Bl+Va)}$) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

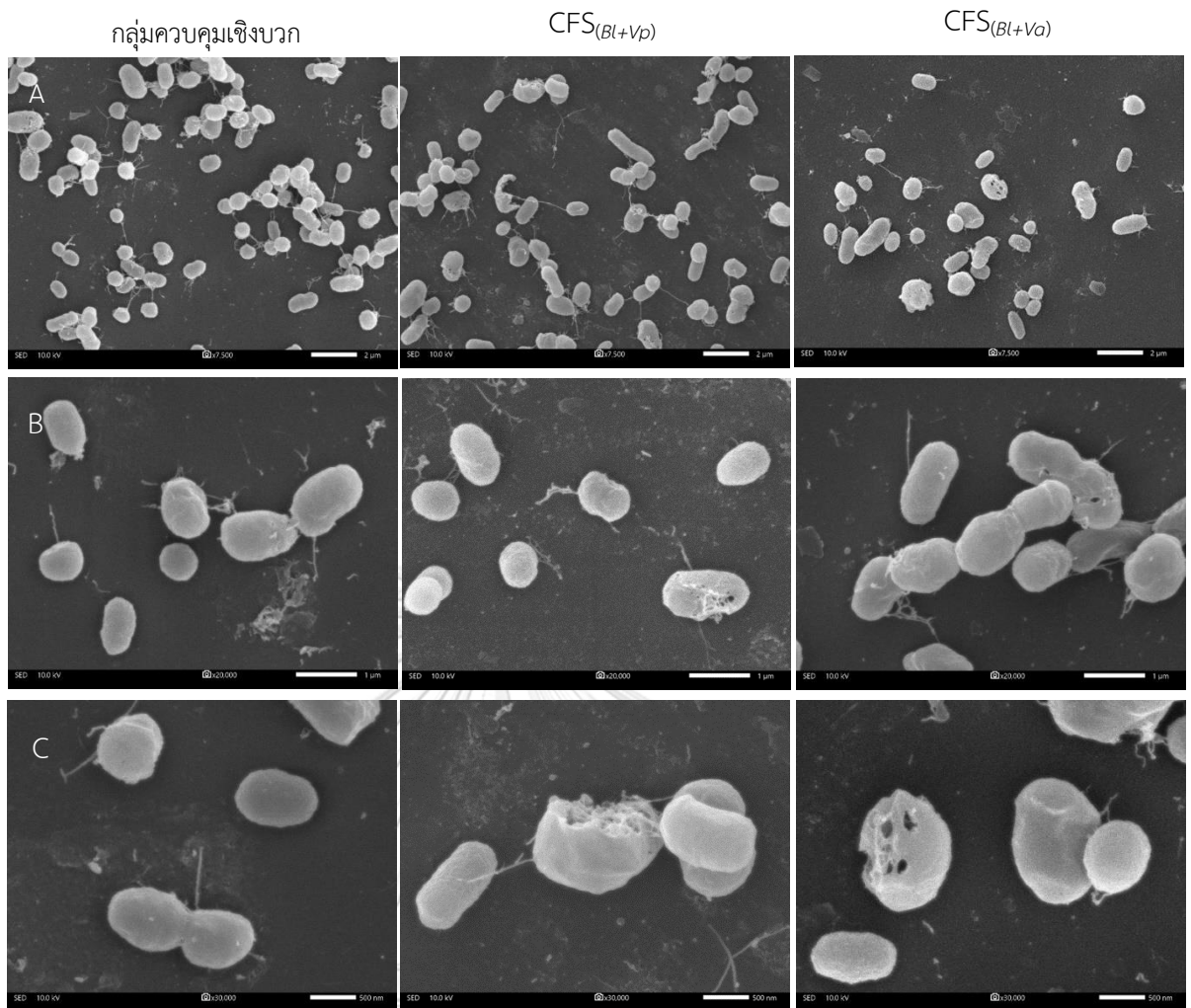


รูปภาพที่ 23 แสดงลักษณะทางกายภาพของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ($CFS_{(Bl+Vp)}$) (กลาง) และ *Vibrio alginolyticus* ($CFS_{(Bl+Va)}$) (ขวา) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) และ *Vibrio alginolyticus* ที่ (CFS_(Bl+Va)) ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้ปนเปื้อนกับแบคทีเรียโอสิน พบว่าแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) ทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบเกิดรูที่ผนังเซลล์ และเชื้อเกาะกลุ่มกันมากขึ้น ในขณะที่แบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) ให้ผลเหมือนกันคือทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบเกิดรูที่ผนังเซลล์ อย่างไรก็ตาม มีผลที่แตกต่างออกไป คือ ทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบลดการเกาะกลุ่มกันอย่างเห็นได้ชัด เชื้อมีขนาดเล็กและลดการสร้าง Extracellular matrix ของเซลล์

4.3.4 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่ปนเปื้อนร่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) และ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก



รูปภาพที่ 24 แสดงลักษณะทางกายภาพของ *Vibrio alginolyticus* ที่ปน่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ($CFS_{(Bl+Vp)}$) (กลาง) และ *Vibrio alginolyticus* ($CFS_{(Bl+Va)}$) (ขวา) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ซ้าย) ศึกษาและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า (A) 20,000 เท่า (B) 30,000 เท่า (C)

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่ปน่วมกับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ($CFS_{(Bl+Vp)}$) และ *Vibrio alginolyticus* ที่ ($CFS_{(Bl+Va)}$) ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงในสถานะเดียวกันแต่ไม่ได้ปน่วมกับ

แบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) ทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบเกิดรูที่ผนังเซลล์ และเซลล์เสียหายรูปร่าง ในขณะที่แบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) ให้ผลเหมือนกันคือทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบเกิดรูที่ผนังเซลล์ อย่างไรก็ตาม มีผลที่แตกต่างออกไป คือ ทำให้เซลล์ของเชื้อทดสอบลดการเกาะกลุ่มกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 11

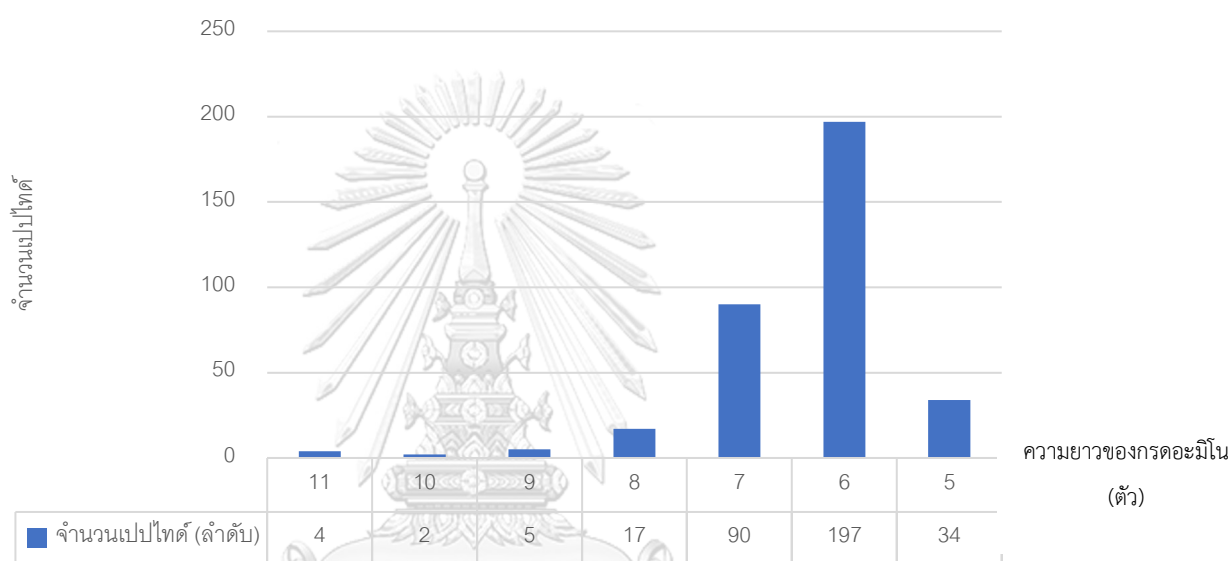
ตารางที่ 11 แสดงผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* ที่บ่มร่วมกับแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) และสภาวะที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (CFS_(Bl+Vp)) และ *Vibrio alginolyticus* (CFS_(Bl+Va)) ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือ 1.5% บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

แหล่งสร้าง Cell-Free Supernatant	ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ลักษณะทางกายภาพของเชื้อ <i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>B. licheniformis</i> (CFS _(Bl))	- เกิดรูที่ผนังเซลล์	- เกิดรูที่ผนังเซลล์
<i>B. licheniformis</i> เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>V. parahaemolyticus</i> (CFS _(Bl+Vp))	- เกิดรูที่ผนังเซลล์ - เซลล์เกาะกลุ่มกันมากขึ้น	- เกิดรูที่ผนังเซลล์
<i>B. licheniformis</i> เพาะเลี้ยงร่วมกับ <i>V. alginolyticus</i> (CFS _(Bl+Va))	- เกิดรูที่ผนังเซลล์ - ขนาดของเซลล์ลดลง - ลดการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ - สร้าง Extracellular ลดลง	- เกิดรูที่ผนังเซลล์ - ลดการเกาะกลุ่มกันของเซลล์

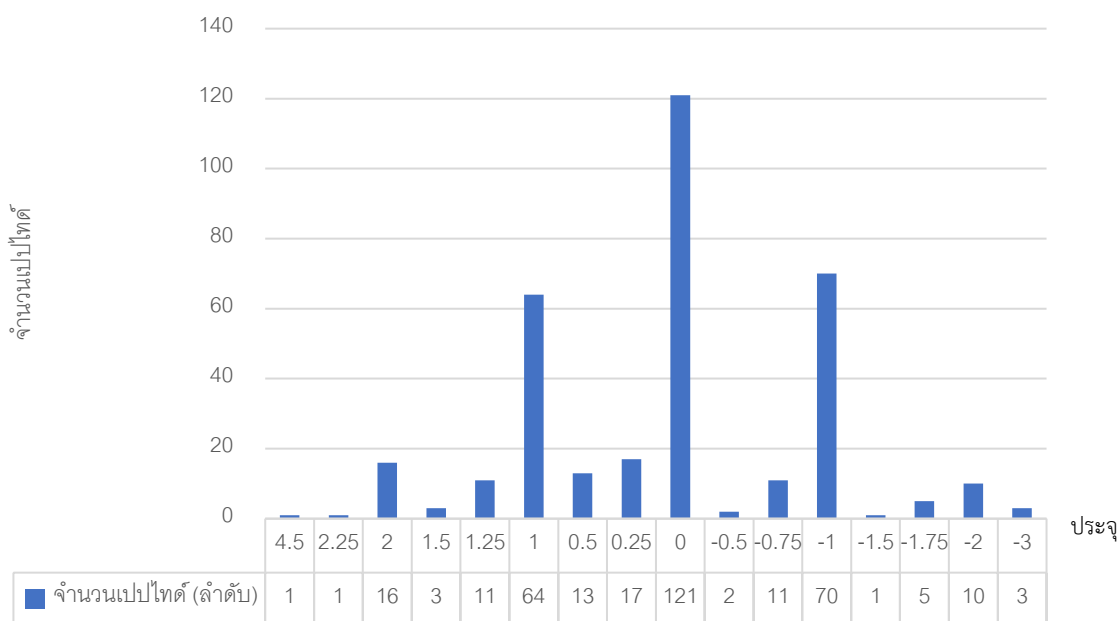
4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและความน่าจะเป็นในการเป็นสารยับยั้งของแบคทีริโอซินที่เชื้อ *Bacillus licheniformis* (CFS_(Bl)) สร้างขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (Cell-Free Supernatant) ที่ได้จากการคัดเลือกโปรตีนให้มีน้ำหนักไม่เกิน 10 kDa และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) พบว่าได้ peptide sequence ที่ไม่พบในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่ค่า *De novo* score มากกว่าร้อยละ 70 จำนวน 617 ชิ้น

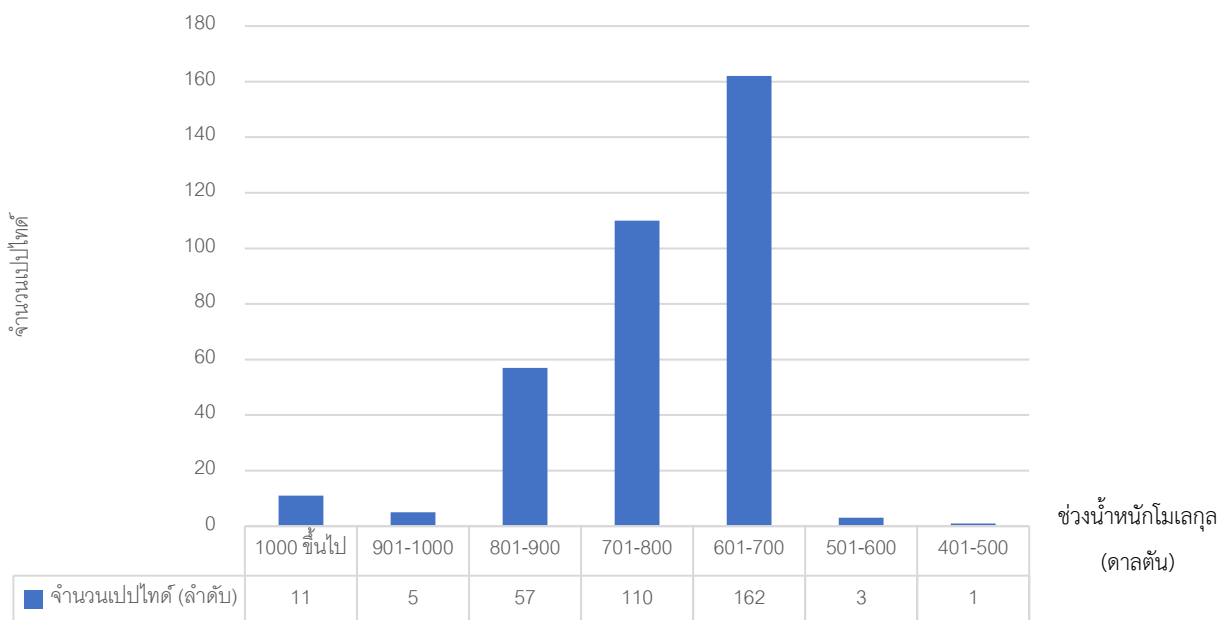
การศึกษาความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide ผู้วิจัยใช้โปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ ดังแสดงในภาคผนวก ตารางที่ 29 จัดจำแนกข้อมูลโดยพิจารณาจากลำดับความยาวของกรดอะมิโน ประจุของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล ค่า Protein binding potential และระดับ *De novo* score ได้ผลดังแสดงในรูปภาพที่ 25-29 ตามลำดับ



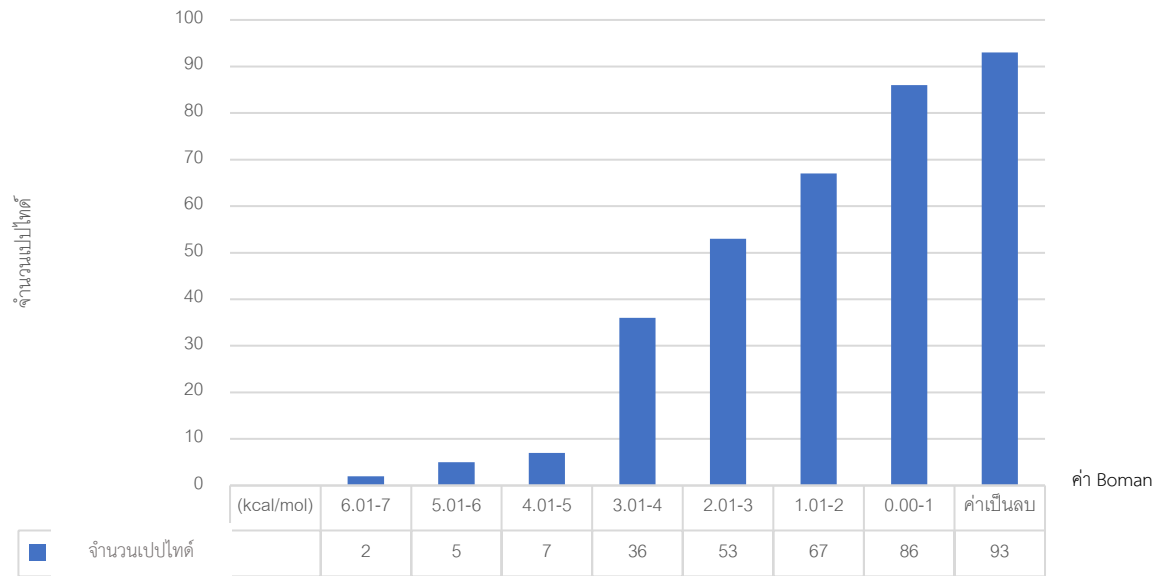
รูปภาพที่ 25 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ ตามความยาวของลำดับกรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor



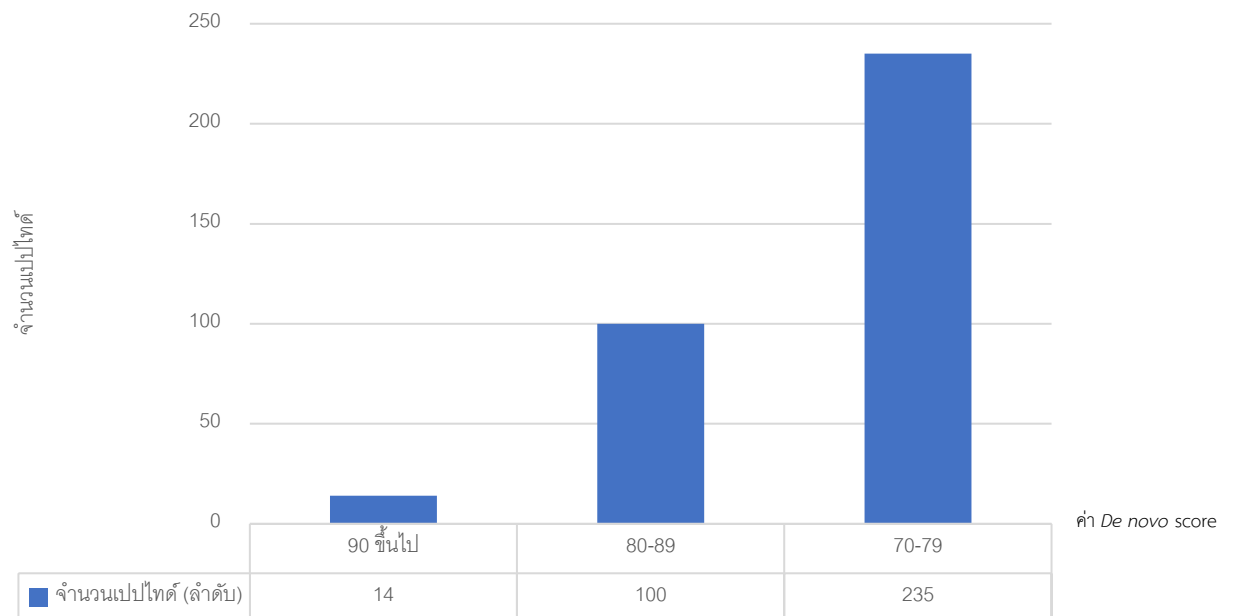
รูปภาพที่ 26 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ตามประจุของโปรตีน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor



รูปภาพที่ 27 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ตามช่วงของน้ำหนักโมเลกุลเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor



รูปภาพที่ 28 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ตามช่วงของค่า Protein binding potential (Boman index) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor



รูปภาพที่ 29 แสดงการจัดจำแนกเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 เปปไทด์ ตามระดับ De novo score เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor

เมื่อพิจารณาจากค่าความน่าเชื่อถือของระดับ *De novo* score ประจุของโปรตีน และค่า Protein binding potential (Boman index) ที่แสดงถึงความสามารถของโปรตีนในการจับกับสารอื่น ซึ่งอ้างอิงจากแบคทีริโอซินไลเคนินที่เชื้อ *B. licheniformis* ที่แยกได้จากลำไส้วัวสร้างขึ้น พบว่ามีค่าประจุของโปรตีน -1.75 และค่า Protein binding potential (Boman index) 0.52 kcal/mol จึงนำค่าดังกล่าวมารวมเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาคัดเลือกเปปไทด์ที่จะนำมาศึกษาต่อ โดยกำหนดให้ค่าประจุของโปรตีนเป็นลบ ค่า Protein binding potential (Boman index) อยู่ในช่วงกลาง คือ 0-2 kcal/mol รวมถึงพิจารณากรดอะมิโนอะลานีนที่เป็นส่วนประกอบในลำดับอะมิโน เนื่องจากเชื้อ *B. licheniformis* สร้างสารแบคทีริโอซินในกลุ่ม IA แลนไธโอนีน ซึ่งต้องมีกรดอะมิโนอะลานีนเป็นส่วนประกอบ ผู้วิจัยจึงเลือกเปปไทด์ที่มีความน่าสนใจในการศึกษา จำนวน 6 เปปไทด์ ดังนี้



ตารางที่ 12 แสดงลำดับกรดอะมิโนตามเป็นไปตามเกณฑ์การคัดเลือก

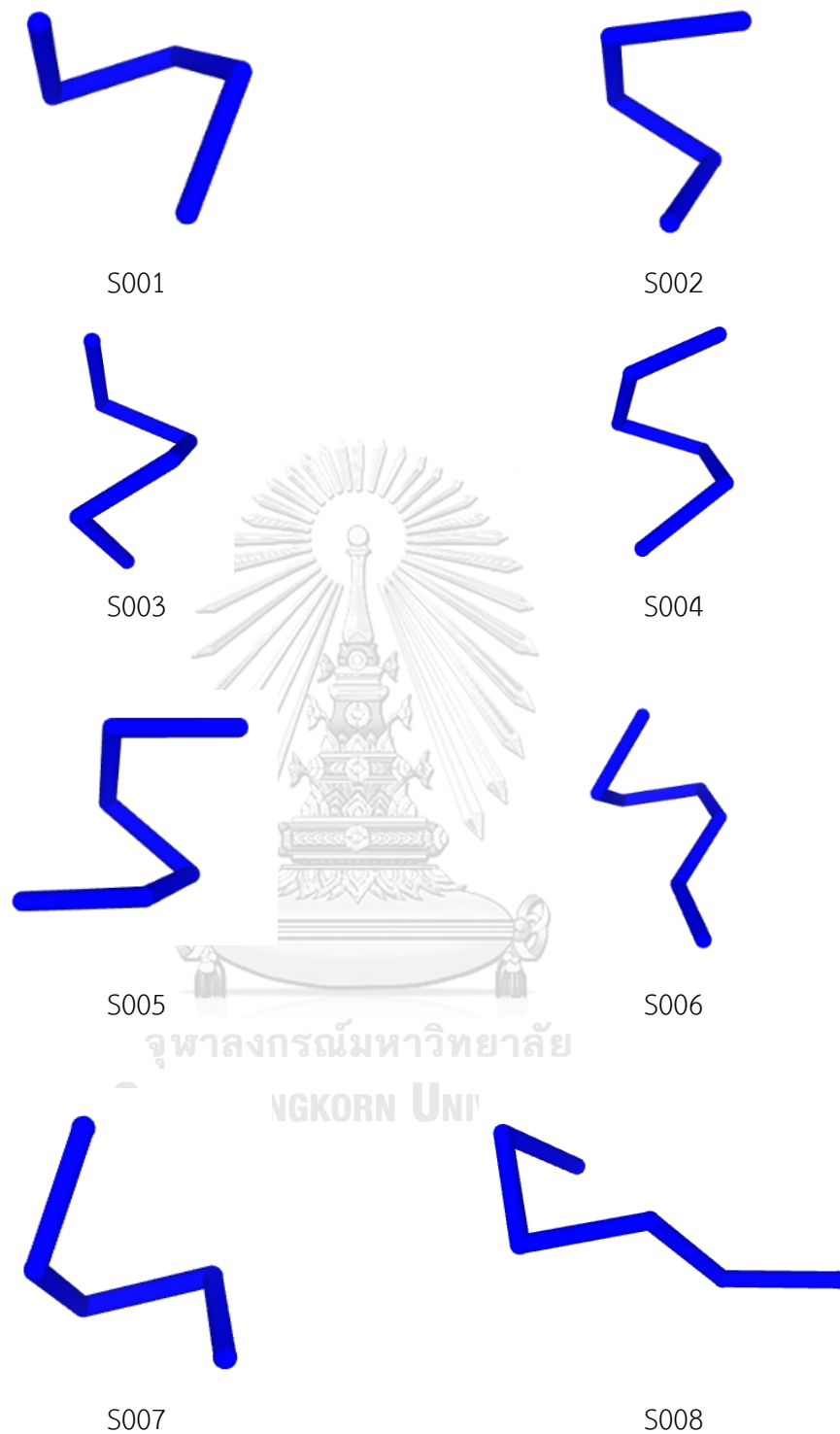
ลำดับ ที่	รหัส	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
1	S001	EAMECP	6	-2	678.787	1.36	84
2	S002	ETHMAM	6	-0.75	718.854	1.25	83
3	S003	TAALSDT	7	-1	677.71	1.24	83
4	S004	AANTLEP	7	-1	714.775	1.06	81
5	S005	SSDAFVP	7	-1	721.766	0.95	81
6	S006	EAPLTCST	8	-1	820.92	0.91	80

อย่างไรก็ตาม ยังมีเปปไทด์ที่น่าสนใจในการเป็นแบคทีริโอซินในกลุ่มแลนโธอิน เนื่องจากมีกรดอะมิโนอะลานีนเป็นส่วนประกอบ 2 ตัว สามารถเกิดเป็น Disulfide bridge ค่า Protein binding potential (Boman index) อยู่ในช่วงที่กำหนด และมีค่า *De novo* score สูง จำนวน 2 เปปไทด์ ดังนี้

ตารางที่ 13 แสดงลำดับของกรดอะมิโนที่มีกรดอะมิโนอะลานีนเป็นส่วนประกอบ 2 ตัว

ลำดับ ที่	รหัส	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
1	S007	KDLAAH	6	0.25	653.733	1.73	86
2	S008	AFKPDAG	7	0	704.778	0.96	81

ผู้วิจัยนำเปปไทด์ที่น่าสนใจและมีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide ทั้ง 8 ลำดับ มาทำนายรูปร่างสามมิติของโปรตีนด้วยโปรแกรม PEP-FOLD3 ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปภาพที่ 30 แสดงรูปร่างโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่น่าสนใจและมีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide ด้วยโปรแกรม PEP-FOLD3

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

แบคทีเรียโอสซินเป็นโปรตีนสร้างขึ้นจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งและมีผลกระทบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น การศึกษาสารกลุ่มแบคทีเรียโอสซินพบว่าส่วนมากถูกสร้างจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก โดยเฉพาะที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ที่แสดงคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (67) มีการนำแบคทีเรียโอสซินมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์เพิ่มมากขึ้น บางส่วนได้มีการรับรองความปลอดภัยในการใช้งานมาอย่างยาวนาน เช่น ไนซิน (92) เชื้อ *Bacillus* spp. เป็นจลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติการสร้างสารแบคทีเรียโอสซินหลากหลายชนิด โดยขึ้นกับสายพันธุ์ แต่เมื่อมีการนำแบคทีเรียโอสซินมาใช้งานในเชิงอุตสาหกรรมซึ่งมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันตามชนิดของอุตสาหกรรม เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง ความคงทนของแบคทีเรียโอสซินในสภาวะต่างๆ ดังนั้นในการเลือกใช้งานจึงจำเป็นต้องพิจารณาคูณสมบัติเหล่านี้ เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งาน จึงมีการค้นหาเชื้อโพรไบโอติกที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมที่ต้องการใช้งาน ดังเช่น จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดสมุทรสาคร ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ และนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 เพื่อมุ่งเน้นการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ตกค้างสะสมในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ช่วยบำบัดน้ำในบ่อเลี้ยง และยังพบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง โดยในกลุ่มหัวเชื้อ ปม.1 นี้มีเชื้อประกอบสำคัญ คือ *B. licheniformis* ซึ่งสามารถสร้างแบคทีเรียโอสซินที่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคซีดในกุ้ง และเป็นแบคทีเรียที่มีส่วนทำให้โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งลุกลามรุนแรงขึ้น และสารแบคทีเรียโอสซินที่สร้างจากเชื้อสายพันธุ์นี้ได้มีรายงานถึงคุณสมบัติเด่นที่ทนต่อความร้อนสูงถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที ทั้งยังมีประสิทธิภาพในสภาวะที่เป็นกรดต่ำ (3.0) จนถึงด่างแก่ (10.0) ได้ (14) จึงเป็นที่น่าสนใจในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งพร้อมกับทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสายพันธุ์นี้ที่พบในประเทศไทย เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับของสารพันธุกรรมในส่วน 16s rDNA จากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า เชื้อ *B. licheniformis* จากหัวเชื้อ ปม.1 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดสมุทรสาคร เป็นเชื้อ *B. licheniformis* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่เชื้อ *B. licheniformis* สายพันธุ์ ปม.1 นั้น โดยให้ความสำคัญกับการทดสอบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นลำดับแรก เนื่องจากเชื่อดังกล่าวเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง (27) และจากงานวิจัยของ

Liu (2004) พบว่ากึ่งแวนนาไมได้วันที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus* จะเกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันรุนแรงเพิ่มมากขึ้น และจะเจริญเติบโตได้ไม่ดี เบื่ออาหาร ส่งผลให้ในระยะท้ายของการติดเชื้อ กึ่งเลี้ยงที่ในบ่อจะตายเป็นจำนวนมาก และติดเชื้อซ้ำอย่างรุนแรง (29) จัดว่าเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มฉวยโอกาสที่ทำให้โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันมีความรุนแรงมากขึ้น จึงถูกนำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบร่วม โดยผลการทดสอบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าสารที่ผลิตและหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* สายพันธุ์ ปม.1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่เป็นสาเหตุของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกึ่งได้ดี

สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่ผู้วิจัยนำมาพิจารณาได้แก่ อุณหภูมิ ช่วงระยะเวลาในการบ่ม ความเข้มข้นของเกลือ สภาวะการเติมอากาศ และการเลี้ยงร่วม โดยพบ $CFS_{(BU)}$ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงผลการยับยั้งเชื้อทั้ง *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ได้ดีที่สุด จากการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ตั้งแต่ 25-42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมนี้มีความสอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานเกี่ยวกับอุณหภูมิของ Baril และคณะ (2012) และ Trunet และคณะ (2015) ซึ่งแสดงเป็นช่วงกว้างตั้งแต่ 11-59 องศาเซลเซียส (50, 51) ร่วมกับการศึกษาในระบบเลี้ยงกึ่งแวนนาไม และหอยเป่าฮือ ของ Ferreira และคณะ (2015) และ Gao และคณะ (2018) ที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* พบช่วงอุณหภูมิที่น่าสนใจการศึกษาคือ 25-42 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาในห้องทดลองจากงานวิจัยของ Cladera-Olivera และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* P40 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 26-37 °C (96) และงานวิจัยของ Pattnaik P และคณะ (2005) ได้ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อ *B. licheniformis* 26L-10/3RA ที่แยกจากกระเพาะส่วนรูเมนของกระบือ พบว่าเชื้อนี้จะสร้างแบคทีริโอซินได้ดีที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 39 °C (97) และในการงานวิจัยดังกล่าวยังแสดงถึงช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเพื่อให้เชื้อ *B. licheniformis* สร้างแบคทีริโอซินนั้น ควรบ่มเชื้อจนถึงช่วง stationary phase เนื่องจากเชื้อจะเริ่มสร้างแบคทีริโอซินในระยะการเจริญเติบโตดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่า $CFS_{(BU)}$ ที่ 72 ชั่วโมงแสดงผลการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด จากการทดสอบบ่มเชื้อ *B. licheniformis* ตั้งแต่ 36-96 ชั่วโมงและเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุหลักของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกึ่ง ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาการบ่มที่ 72 ชั่วโมงมาใช้ในการศึกษาต่อ สอดคล้องกับรายงานการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อ *B. licheniformis* 26L-10/3RA ที่แยกจากกระเพาะส่วนรูเมนของกระบือ เนื่องจากเชื้อนี้จะสร้างแบคทีริโอซินได้ดีที่สุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง นอกจากนี้ผู้วิจัยสนใจทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ที่ความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆ และสภาวะการเติมอากาศ เนื่องจากในสภาวะการเพาะเลี้ยงในธรรมชาติเชื้อ *B. licheniformis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ ปม.1 ที่แยกได้จากลำไส้ของกึ่งที่ถูกเลี้ยงในน้ำกร่อยจะต้องเจริญเติบโตในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆ รวมถึงจะอยู่ภายในสภาวะการเติม

อากาศ จากกิจกรรมการตื่นน้ำเพื่อเติมอากาศในบ่อกุ้งของเกษตรกร อีกทั้งจากการศึกษาของ Uzelac และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 พบว่า ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินพบในโครโมโซมของแบคทีเรีย ใช้ Promoter และ Operon ร่วมกับยีนอื่นๆ มีลักษณะการรวมกันของยีนอยู่เป็นกลุ่มยีนภายใต้ Promoter และ Operon เดียวกัน (operon cluster) และต้องการการเหนี่ยวนำด้วยกลไก Quorum sensing ซึ่งกลไกดังกล่าวขึ้นอยู่กับ peptide pheromones หรือ auto-inducer peptide ซึ่งสารเหล่านี้จะสร้างได้ดีขึ้นกับสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา สารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการพิเศษ เป็นต้น (76) และจากการศึกษาของ Amar และคณะ (2019) พบว่าการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกสร้างขึ้น (100) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจทั้งสภาวะที่มีเกลือแตกต่างกัน และการเติมอากาศในระบบเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *B. licheniformis* กระบวนการสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรียจำเป็นต้องอาศัย auto-inducer peptide ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างแบคทีริโอซิน ซึ่งสารดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสภาวะการโตแบบแข่งขัน โดยเกี่ยวข้องกับปริมาณและชนิดของ จุลินทรีย์คู่แข่ง (competing microorganism) หลังจากที่ได้สร้างแบคทีริโอซินแล้ว แบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นมาจะทำหน้าที่เป็น auto-inducer กระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นได้อีก รวมทั้งสารยับยั้งอื่นด้วย (76) ในการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งสองชนิดนั้น พบว่าปัจจัยในการเพาะเลี้ยงทั้งอุณหภูมิ ช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของเกลือ และการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ที่ทำให้ตายแล้ว มีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือความเข้มข้น 2.5% จะสามารถให้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในสภาวะการเติมอากาศและไม่เติมอากาศ พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* สร้างสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการเติมอากาศไม่ใช่ปัจจัยในการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อ *B. licheniformis* ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารยับยั้งเชื้อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาด้านเทคนิคการเลี้ยงร่วม โดยมีแนวคิดจากการอาศัยอยู่ร่วมกันในธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพแตกต่างจากเดิม เพื่อรักษาสสมดุลในการดำรงชีวิต (102) ทั้งนี้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับเซลล์ตายของเชื้อทดสอบทั้ง $CFS_{(Bl+Va)}$ และ $CFS_{(Bl+Vp)}$ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ($CFS_{(Bl)}$) แม้จะพบว่าประสิทธิภาพการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อทดสอบทั้ง *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* แต่ก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีหลากหลายวิธี เช่น วิธี Agar well diffusion (15) แม้ว่าวิธีการดังกล่าวมักจะถูกนำมาใช้ในงานวิจัยเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่เชื้อ *B. licheniformis* สร้างขึ้นเนื่องจากทดสอบได้ง่าย ประหยัดเวลาและทรัพยากรมากกว่าวิธี Total Plate Count อย่างไรก็ตามเมื่อผู้วิจัยได้ทดสอบด้วยวิธีการดังกล่าวพบว่าแสดงผลลัพธ์ที่ไม่ชัดเจนเนื่องจาก Clear zone มีขนาดเล็กมาก ไม่ชัดเจน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างสารยับยั้งในสถานะต่างๆได้ นอกจากนี้เชื้อก่อโรคที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง Biofilm (113, 114) ดังนั้นการใช้วิธีการวัดค่าความขุ่นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบ นอกจากนี้การใช้วิธี MTT assay อาจเกิดผลทดสอบที่ไม่ตรงกับความจริง เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและสารยับยั้งส่งผลต่อกระบวนการเกิดฟอร์มazan ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้ในการวัดเซลล์เป็น เซลล์ตายของวิธีการนี้ (115) ดังนั้นวิธีการ Total Plate Count จึงเป็นวิธีการที่ได้มาตรฐานได้รับการยอมรับและเหมาะสมในการทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่เชื้อ *B. licheniformis* สร้างขึ้น เนื่องจากเห็นผลการทดสอบชัดเจนที่สุด อีกทั้งเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาเพื่อหาความแตกต่างของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารยับยั้ง เช่น งานวิจัยของ Seleshe และคณะ (2021) ศึกษาสารยับยั้งเปปไทด์สายสั้นในโคมะรุ่ม และใช้วิธี Total Plate Count ในการหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคในเนื้อหมู (116) งานวิจัยของ Yousuf และคณะ (2020) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากมะนาวและโปรตีนถั่วเหลืองที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อที่ทำให้พืชตระกูลแตงเน่าเสีย (117) เป็นต้น

จากการศึกษาลักษณะ รูปร่าง ทางกายภาพภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในระดับกำลังขยายสูงของเชื้อทดสอบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เชื้อทดสอบที่ถูกบ่มร่วมกับ CFS_(BV) กับเซลล์ของเชื้อทดสอบในกลุ่มควบคุม คือเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ (ไม่มีสารยับยั้ง) ดังรูปแสดงที่ 21 และ 22 ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio alginolyticus* ตามลำดับ แสดงให้เห็นคุณสมบัติการทำให้เกิดรู (Pore formation) บนผนังเซลล์ของเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด เป็นไปตามกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีริโอซิน โดยแบคทีริโอซินมักจะออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์และจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง Electrostatic มีเป้าหมายคือบริเวณที่มีประจุลบที่เกิดจากสารประเภท phosphatidylethanolamine (PE) phosphatidylglycerol (PG) lipopolysaccharide (LPS) lipoteichoic acid (LTA) และ cardiolipin (CL) (71, 81) แบคทีริโอซินจะใช้ส่วนที่มีประจุบวกทำปฏิกิริยาดึงดูดทางประจุไฟฟ้า (Interact electrotically) กับชั้น hydrophobic ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบ จากนั้นจะใช้ชิ้นส่วนที่เหลือสอดแทงทะลุเข้าไปในชั้น Lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ (82) เหนี่ยวนำทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการ

รั่วไหลของไอออน ประจุระหว่างภายในและภายนอกเซลล์เสียสมดุล เกิดการลดลงของพลังงาน ATP ภายในเซลล์ และรบกวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (71, 83) จนเซลล์เป้าหมายตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของแบคทีเรียเป้าหมายได้อีกด้วย โดยกลไกการยับยั้งของแบคทีริโอซินนี้ได้มีการอธิบายศึกษาพบจากโนซินที่สร้างจาก *Lactobacillus lactis* จะทำให้เกิด D-alanylation ของ teichoic acid ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *Streptococcus pneumoniae* ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ไม่แข็งแรง นอกจากนี้โนซินยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Listeria monocytogenes* ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ไฮโทพลาสซึมไหลออกจากเซลล์ และเซลล์แตกตาย (84) ซึ่งเป็นกลไกที่พบได้ในแบคทีริโอซินกลุ่ม I ทั้งนี้ยังมีการรายงานถึงการสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อ *B. licheniformis* ที่เรียกว่า ไลเคนนิน (52) และ ซับไลเคนนิน (53) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับโนซิน มีลำดับกรดอะมิโนสายสั้นไม่เกิน 12 เปปไทด์ และมีขนาดไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน (97)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับ *V. parahaemolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เพื่อมุ่งหวังให้เกิดการกระตุ้นจากส่วนของเซลล์จากเชื้อทดสอบและมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อได้ดียิ่งขึ้น แม้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างจากการไม่เลี้ยงร่วม แต่ในการวิเคราะห์จากลักษณะที่การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในระดับกำลังขยายสูง ทำให้พบลักษณะของเชื้อทดสอบ *V. parahaemolyticus* มีผนังเซลล์ที่เกิดรูพรุนขึ้นจำนวนมาก และยังพบ *V. parahaemolyticus* มีการเกาะกลุ่มกันมากขึ้นเมื่อเทียบกับการบ่มเชื้อทดสอบที่มี CFS_(Bl+VP) กับกลุ่มควบคุม CFS_(Bl) ซึ่งขั้นตอนการเกาะกลุ่มกันของเซลล์แบคทีเรียพบเห็นได้ในกระบวนการเกิดไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้าง Extracellular Matrix ในกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มจะเริ่มจากแบคทีเรียมีการเข้ายึดเกาะพื้นผิว ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียชนิดอื่นเข้าร่วมเกาะพื้นผิวในบริเวณเดียวกันได้ ในระยะเริ่มต้นของการยึดเกาะกับพื้นผิว เซลล์จะเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นจึงเริ่มมีการเรียงตัวเป็นชั้นถัดขึ้นมาด้วยการเคลื่อนที่แบบคืบคลานไปบนชั้นเซลล์เดิม (twitching motility) เกิดจากการส่งสัญญาณประสานงานระหว่างเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียหรือ Quorum sensing (QS) โดยแบคทีเรียแกรมลบจะสร้างสารกลุ่ม acyl-homoserine lactones (AHL) เพื่อใช้ในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (118) ไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากคุณสมบัติของส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบที่ประกอบด้วย Lipopolysaccharide ก่อให้เกิดประจุบนผิวด้านนอกของแบคทีเรีย และปล่อยสารกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ออกมาเพื่อช่วยในการยึดเกาะ ทำให้เกิดไบโอฟิล์มหนาขึ้น (119) สอดคล้องกับลักษณะปรากฏของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ในสภาวะที่เหมาะสม และบ่มร่วมกับสารยับยั้งที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับ *V. parahaemolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน (CFS_(Bl+VP)) พบว่าเชื้อมีความหนืดมากกว่าเมื่อเทียบกับ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับ

สารยับยั้ง และบ่มร่วมกับสารยับยั้งที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อทดสอบ (CFS_(BI)) แสดงให้เห็นว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อชนิด CFS_(BI+VP) มีสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สารเหล่านี้ในบางครั้งเรียกว่า Auto inducer ได้แก่ กลุ่ม acylated homoserine lactones (AHL) พบในแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มสารประกอบเปปไทด์ ที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อแบคทีเรียสร้างสารเหล่านี้ขึ้น เสมือนเป็นการส่งสัญญาณไปยังเซลล์ข้างเคียง (Quorum sensing) จนทำให้เกิดการรวมตัวกันของแบคทีเรียเพื่อความอยู่รอดของเชื้อ (120) แม้ว่าการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะแสดงให้เห็นการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารยับยั้งที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับ *V. parahaemolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน (CFS_(BI+VP)) พบว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่เมื่อนำเชื้อทดสอบ *V. parahaemolyticus* มาเพาะเลี้ยงร่วมกับสารยับยั้งที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับ *V. alginolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน (CFS_(BI+VA)) ให้ผลการทดลองที่น่าสนใจคือ เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีขนาดเซลล์เล็กลง รูปร่าง โครงสร้างบิดเบี้ยว พบลักษณะ Extracellular Matrix ลดลง และไม่พบการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ ซึ่งโดยปกติเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีความสามารถในการจับกลุ่มกันของเซลล์เนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์ และสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้น การจับกลุ่มกันนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งในกลไกการก่อตัวของไบโอฟิล์ม จากงานวิจัยของ Quai Hui และคณะ (2020) พบว่าเมื่อกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อตัวของไบโอฟิล์มลดลง ส่งผลให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและสร้างสารพิษแสดงออกลดลงด้วย (121) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ลดการเกาะกลุ่มกันจะส่งผลให้การสร้างสารพิษของแบคทีเรียลดลง (122) กระบวนการสร้างไบโอฟิล์มจัดว่าเป็นการปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม โดยพบว่าการเกาะกลุ่มกันของเซลล์จนเกิดเป็นไบโอฟิล์มสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้สูงกว่าปกติ นอกจากนี้ยังป้องกันเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้าจับกินเมื่อเชื้อมีการเกาะกลุ่มรวมกัน อีกทั้งเชื้อที่อยู่รวมกันในไบโอฟิล์มอาจเอื้อให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนดื้อยาข้ามกลุ่มได้ (123, 124) จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับ *V. alginolyticus* ที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อนมีคุณสมบัติบ่งชี้ว่าสามารถทำลายเชื้อก่อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งได้โดยรบกวนกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มในขั้นตอนการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ ซึ่งเพิ่มเติมมาจากการทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุน อันเป็นคุณสมบัติที่พบได้จากแบคทีริโอซินของเชื้อ *B. licheniformis* อีกทั้งยังพบเซลล์ของเชื้อทดสอบมีขนาดเล็กลง จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาคุณลักษณะเพื่อพัฒนาสารที่สามารถป้องกันการเกิดโรคตายด่วนในกุ้งเนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน

จากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่พบในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* (CFS_(BI)) ที่เพาะเลี้ยงในสถานะที่เหมาะสม การศึกษาี้ได้จำกัดขนาดของโปรตีนโดยคัดเลือกที่น้ำหนักโมเลกุล

ขนาดน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน โดยใช้ Vivaspin-20 (molecular weight cut-off of 10 kDa) จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย liquid chromatography ที่เชื่อมต่อกับ Mass spectrometer (LC-MS/MS) และอ่านผลด้วยเครื่อง Orbitrap HF hybrid mass spectrometer และ UltiMate 3000 LC system ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความแม่นยำ แสดงค่าพารามิเตอร์ *De novo* score ที่มีความน่าเชื่อถือ เหมาะสมกับการศึกษาโปรตีนที่มีความยาวของกรดอะมิโนสายสั้น มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (125) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวพบลำดับกรดอะมิโนที่มีความยาว 5-12 เปปไทด์จำนวนมากถึง 617 ลำดับ จากการเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล Antimicrobial Peptide Database (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) แม้ว่าจะไม่พบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูล แต่เมื่อนำข้อมูลเปปไทด์ทำนายมาความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor พบเปปไทด์จำนวน 349 ลำดับ ที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จากตัวอย่าง CFS_(B) ที่แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด โดยการวิเคราะห์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่แสดงให้เห็นการเกิดรูพรุนบนผิวเซลล์ ร่วมกับการพิจารณาขนาดของเปปไทด์ที่มีขนาดไม่เกิน 10 kDa ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นคุณสมบัติที่สอดคล้องกับแบคทีริโอซินในกลุ่ม I (53) แบคทีริโอซินในกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น 3 subclass ได้แก่ Ia Ib และ Ic จากงานวิจัยของ Pattnaik และคณะในปี 2001 ศึกษาไลเคนิน ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *B. licheniformis* ที่แยกได้จากลำไส้วัว พบว่าไลเคนินมีลำดับกรดอะมิโน ดังนี้ ISLEICAI FHDN และเป็นแบคทีริโอซินในกลุ่ม Ia หรือที่เรียกว่า แลนติไบโอติก (lantibiotic) (126) มีเปปไทด์สายสั้น ขนาดไม่เกิน 5 kDa และมีกรดอะมิโนอะลานีนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างพันธะ Disulfide กับกรดอะมิโนในเปปไทด์เดียวกัน เรียกเปปไทด์ในลักษณะนี้ว่า แลนไธโอนิน (127) ผู้วิจัยจึงนำคุณสมบัติของไลเคนินมาเป็นคุณสมบัติตั้งต้นและกำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกเปปไทด์ที่น่าสนใจ ได้แก่ ค่า *De novo* score ร้อยละ 70 ขึ้นไป ค่า Protein binding potential (Boman index) อยู่ในช่วงกลาง คือ 0-2 kcal/mol รวมถึงพิจารณากรดอะมิโนอะลานีนที่เป็นส่วนประกอบในลำดับอะมิโน พบเปปไทด์ที่น่าสนใจ 8 เปปไทด์ เมื่อนำมาทำนายโครงสร้างสามมิติพบว่าเปปไทด์มีลักษณะโค้งงอและมีส่วนที่บิดเป็นเกลียวเล็กน้อย ซึ่งมีคุณสมบัติสอดคล้องกับแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้ง (126) เนื่องจากกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายของแบคทีริโอซิน คือ แบคทีริโอซินจะใช้ส่วนที่มีประจุบวกทำปฏิกิริยาดึงดูดทางประจุไฟฟ้า (Interact electrically) กับชั้น hydrophobic ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบ

จากนั้นจะใช้ชิ้นส่วนโค้งงอที่เหลือสอดแทงทะลุเข้าไปในชั้น Lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ (82) ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ประจุระหว่างภายในและภายนอกเซลล์เสียสมดุล เกิดการลดลงของพลังงาน ATP ภายในเซลล์ จนเซลล์เป้าหมายตายในที่สุด (83)

จากการศึกษาน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ที่แยกจากลำไส้กุ้ง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคตายด่วนเนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้ง ด้วยการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม รวมทั้งกระตุ้นการออกฤทธิ์โดยการใช้เทคนิคการเลี้ยงร่วม พบว่าสารที่หลั่งออกมาเชื้อ *Bacillus licheniformis* มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด ซึ่งพบว่าโรคตายด่วนเนื่องจากตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งยังคงเป็นปัญหาที่พบต่อการผลิตกุ้งขาว ทำให้ผลผลิตภาพรวมของประเทศลดลงกว่าครึ่งหนึ่งของผลผลิตที่ผลิตได้ เกิดความเสียหายต่อเกษตรกร อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรม รวมไปถึงสูญเสียส่วนแบ่งการตลาดและมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลในตลาดโลกเนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ (4) อีกทั้งยังพบการระบาดของโรคนี้นี้ในประเทศอื่นๆ ด้วย เช่น ประเทศจีน เวียดนาม มาเลเซีย เป็นต้น (5) การศึกษาค้นคว้าหาแนวทางในการแก้ไขปัญหาโรคตายด่วนในกุ้งอย่างยั่งยืนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ช่วยสนับสนุนการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งเท่าที่จำเป็น เพื่อนำไปสู่การลดแบคทีเรียดีดื้อยาในระบบเพาะเลี้ยง และลดการส่งต่อยีนดื้อยาของแบคทีเรียในกุ้งมาสู่แบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายของมนุษย์ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการศึกษา antimicrobial peptide ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและเชื้อดีดื้อยาต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *B. licheniformis* สร้างแบคทีริโอซินได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มีเกลือความเข้มข้น 2.5% ในสภาวะที่ไม่เติมอากาศ โดยใช้ *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันในกุ้งเป็นเชื้อทดสอบ โดยแบคทีริโอซินที่เชื้อ *B. licheniformis* สร้างขึ้นมีความสามารถทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อทดสอบเกิดรู ส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออก เซลล์ไม่สามารถรักษาคุณภาพของเซลล์ได้ ทำให้เชื้อทดสอบตายในที่สุด นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับเชื้อทดสอบที่ทำให้ตายด้วยความร้อน 95-100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *B. licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Vibrio alginolyticus* มีความสามารถในการลดการสร้าง Extra cellular matrix ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดี

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Cell-Free Supernatant) ที่ได้จากการคัดเลือกโปรตีนที่มีน้ำหนักไม่เกิน 10 kDa และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) พบว่าได้ peptide sequence ที่ไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ ที่ค่า *De novo* score ร้อยละ 70 ขึ้นไป จำนวน 617 ลำดับ ซึ่งมีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 ลำดับ คัดเลือกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไลเคนินที่เป็นแบคทีริโอซินที่เชื้อ *B. licheniformis* ที่แยกได้จากลำไส้วัวสร้าง ขึ้น โดยกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกให้เปปไทด์มีค่า *De novo* score ร้อยละ 70 ขึ้นไป ค่า Protein binding potential (Boman index) อยู่ในช่วงกลาง คือ 0-2 kcal/mol มีกรดอะมิโนอะลานีนที่เป็นส่วนประกอบในลำดับอะมิโน พบเปปไทด์ที่น่าสนใจ 8 เปปไทด์

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนในน้ำเลี้ยงเชื้อของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* (CFS_(BL)) ในสภาวะที่เหมาะสมโดยคัดเลือกศึกษาโปรตีนที่มีน้ำหนักไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน ที่ค่า *De novo* score ร้อยละ 70 ขึ้นไป พบว่าได้ลำดับกรดอะมิโนที่มีความยาวของกรดอะมิโน 5-12 เปปไทด์จำนวนมากถึง 617 ลำดับ และมีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide จำนวน 349 ลำดับ และมีลำดับกรดอะมิโนที่น่าสนใจ 8 ลำดับ เมื่อนำมาทำนายโครงสร้างแล้วพบว่าสอดคล้องกับโครงสร้างของแบคทีริโอซินกลุ่ม Ia ซึ่งกลไกการทำงานของแบคทีริโอซินนั้นต้องอาศัยแรงดึงดูดทางประจุไฟฟ้าระหว่างเปปไทด์กับผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ดังนั้นจากข้อมูลการศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่มีความน่าจะเป็นในการเป็น antimicrobial peptide สามารถนำไปต่อยอดเพื่อสังเคราะห์สายเปปไทด์ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบในรูปแบบต่างๆ เช่น ความสามารถในการยับยั้งที่อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ที่แตกต่างกัน การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อดื้อยาอื่นๆ ที่พบได้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง การทดสอบผลของเปปไทด์ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เป็นต้น

บรรณานุกรม

1. Rome F. The state of world fisheries and aquaculture. Rome: Food Agriculture Organization of the United Nations; 2016. p.200.
2. cooperatives Moaa. Fisheries statistic of Thailand 2017. Thailand: Department of fisheries; 2019.
3. cooperatives Moaa. Statics of Marine Shrimp Culture Survey 2013. Thailand: Department of fisheries; 2013.
4. cooperatives Moaa. Statics of Marine Shrimp Culture 2017. Thailand: Department of fisheries; 2017.
5. cooperatives Moaa. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp. Hanoi Vietnam; 2013.
6. Tran L NL, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, et al. . Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Organ 2013;105:45-55.
7. เรืองโร โตกฤษณะ, กุลภา บุญชูวงศ์, เบญจวรรณ คงชน, ฉันทธาดา มะวงศ์ไผ่. สถานภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไทยในบริบทของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน. กรุงเทพฯ: บริษัท ซีโน พับลิชชิ่ง แอนด์ แพคเกจจิ้ง จำกัด; 2558. 14-6, p.38-94.
8. Holmström K, Gräslund S, Wahlström A, Pongshompoo S, Bengtsson B-E, Kautsky N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. International Journal of Food Science & Technology. 2003;38(3):255-66.
9. M.C. Bermúdez-Almada AE-P. The Use of Antibiotics in Shrimp Farming. In: (Ed.) DEC, editor. Health and Environment in Aquaculture. Mexico: InTech; 2012. p. 199-214.

10. Gräslund S, Bengtsson B-E. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment — a review. *Science of The Total Environment*. 2001;280(1):93-131.
11. Le TX, Munekage Y, Kato S-i. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Science of The Total Environment*. 2005;349(1):95-105.
12. นนทวิทย์ อารีย์ชน. มาตรฐานการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2006.
13. Caulier S NC, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front Microbiol*. 2019;10(302).
14. Kayalvizhi N, Gunasekaran P. Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Letters in Applied Microbiology*. 2008;47(6):600-7.
15. Hamza F, Kumar AR, Zinjarde S. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus licheniformis* in protecting *Artemia salina* against *Vibrio alginolyticus* and *Pseudomonas gessardii*. *Microbial Pathogenesis*. 2018;116:335-44.
16. Chaiwut Sudthongkong CH, Panisara Aekjeen, Parawee Kingcha, Chanin Phiangthaisong, Watchapon Jumraschukiat, Kraiwut Pinkeaw. Effect of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* in pormor-1 product on virulence strain of *Vibrio parahaemolyticus* causing EMS/AHPND of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, boone (1931). Samutsakorn, Thailand: Samutsakorn Coastal Fisheries Research and Development Center; 2015.
17. ญัฐริยา เกียรติไพบูลย์. เป้าหมายการพัฒนาการประมงอย่างยั่งยืนของไทยภายใต้วาระการพัฒนาที่ยั่งยืน พ.ศ. 2573 (2030 Agenda for Sustainable Development). กรมประมง: กลุ่มเศรษฐกิจการประมง. กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง 2560. p. 10.
18. กระทรวงสาธารณสุข. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ 2560. p. 1-64.

19. กุลภา บุญชูวงศ์. สถานการณ์การเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของไทย. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ส่วนเศรษฐกิจการประมง; 2554.
20. สนิท อักษรแก้ว. ประชากรและทรัพยากรชายฝั่งทะเล: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2002.
21. นิตติ ชูเชิด, เต็มดวง สมศิริ, ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา, กัลยาณี ศรีธัญญ, ลักษา แดงดีบ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ แผนการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาโรคตายด่วน (อีเอ็มเอส) ในอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2559.
22. B R. World Shrimp Farming. Shrimp news international. 2003.
23. Joshi J, Srisala J, Truong VH, Chen IT, Nuangsaeng B, Suthienkul O, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 2014;428-429:297-302.
24. Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, Betancourt-Lozano M, Morales-Covarrubias MS. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp *Litopenaeus vannamei* in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(5):1689.
25. Melba G. Bondad-Reantaso SEM, J. East, R. P. Subasinghe Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. NACA/FAO 2001; 2001.
26. Donald V. Lightner RMR, C. R. Pantoja, B. L. Noble, Loc Tran. Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia. In: Arizona, editor. global aquaculture advocate. University of Arizona, USA2012. p. 40.
27. Thitamadee S, Prachumwat A, Srisala J, Jaroenlak P, Salachan PV, Sritunyalucksana K, et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*. 2016;452:69-87.

28. Pakingking RVE, Tokmakova, Jesus-Ayson, de Acosta, Belen O., editor Current status and impact of early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) outbreaks on Thailand's shrimp farming. Addressing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other transboundary diseases for improved aquatic animal health in Southeast Asia; 2016.
29. Chun-Hung L, Winton C, Jung-Ping H, Jiann-Chu C. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2004;61(1-2):169-74.
30. Buller NB. *Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals 2*, editor. Australia: Department of Agriculture and Food Western Australia c/o Animal Health Laboratory; 2014.
31. Prosser JI, Killham K, Glover LA, Rattray EAS. Luminescence-Based Systems for Detection of Bacteria in the Environment. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1996;16(2):157-83.
32. Beuchat LR. Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Microbiol*. 1974;27(6):1075-80.
33. Chanratchakool P. Pathogenicity and prophylaxis of vibriosis in juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricuss). Scotland: University of Stirling; 1992.
34. Chart H. 30 - *Vibrio*, *mobiluncus*, *gardnerella* and *spirillum*: Cholera; vaginosis; rat bite fever. In: Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W, editors. *Medical Microbiology* (Eighteenth Edition). Edinburgh: Churchill Livingstone; 2012. p. 314-23.
35. Esteve M, Herrera FC. Hepatopancreatic Alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) Experimentally Infected with a *Vibrio alginolyticus* Strain. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2000;76(1):1-5.

36. Kogure D. *Vibrio alginolyticus* with many lateral flagella The University of Tokyo, Japan: Ocean Research Institute; 1999 [Available from: <https://www.shimadzu.com/an/surface/spm/data/oh80jt0000000qjt.html>.]
37. กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. โครงการกุ้งขาว ปทุมธานี ประเทศไทย: กรมประมง; 2016 [Available from: https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_blog/113/57352.]
38. ศูนย์วิจัยสัตว์น้ำสงขลา. แนวทางการเลี้ยงกุ้งให้ปลอดโรค EMS/AHPND สงขลา ประเทศไทย: กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง; 2020 [Available from: https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main/view_activities/1305/66130.]
39. ไชยวัฒน์ ไชยสุด. โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. นนทบุรี ประเทศไทย: สำนักการแพทย์ทางเลือก. กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. กระทรวงสาธารณสุข; 2556.
40. Otario L. Guidelines for the Evaluation of Probiotic in Food. Canada; 2002 30 April - 1 May 2002
41. Soliman WS, Shaapan RM, Mohamed LA, Gayed SSR. Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open Vet J.* 2019;9(3):190-5.
42. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2001;73(2):386s-92s.
43. PCB T. Bacillus. In: S B, editor. *Medical Microbiology.* Texas USA: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
44. Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews.* 2005;29(4):813-35.
45. Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, et al. On the fate of ingested Bacillus spores. *Research in Microbiology.* 2000;151(5):361-8.

46. John AJ, David SS, David AA, Carlos O, Martin ST, Mark G, et al. Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax: The First 10 Cases Reported in the United States. *Emerging Infectious Disease journal*. 2001;7(6):933.
47. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(2):382.
48. Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. 2011;28(2):214-20.
49. Raida MK, Larsen JL, Nielsen ME, Buchmann K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*. 2003;26(8):495-8.
50. Trunet C, Mtimet N, Mathot AG, Postollec F, Leguerinel I, Sohier D, et al. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(2):562-8.
51. Baril E, Coroller L, Couvert O, Leguérinel I, Postollec F, Boulais C, et al. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology*. 2012;30(1):29-36.
52. Pattnaik P, Kaushik JK, Grover S, Batish VK. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(4):636-45.
53. Halami PM. Sublichenin, a new subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512T with antibacterial activity. *Microbial Pathogenesis*. 2019;128:139-46.
54. Niu D, Zuo Z, Shi G-Y, Wang Z-X. High yield recombinant thermostable alpha-amylase production using an improved *Bacillus licheniformis* system. *Microb Cell Fact*. 2009;8:58-.

55. กรมโรงงานอุตสาหกรรม. คู่มือความปลอดภัยทางชีวภาพ สำหรับโรงงานที่ใช้จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม In: กรมโรงงานอุตสาหกรรม ส, editor. อุตสาหกรรมผลิตอาหารและอาหารสัตว์. 1. กรุงเทพฯ: บริษัท พี.เอ. ลีฟวิ่ง จำกัด; 2554. p. 9-27.
56. Grahame DAS, Bryksa BC, Yada RY. 2 - Factors affecting enzyme activity. In: Yada RY, editor. Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality: Woodhead Publishing; 2015. p. 11-55.
57. Barstow DA. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* as hosts for genetic manipulatior. London, UK: University of Warwick; 1983.
58. García Yu IA-L, Alavi F, Al-Ayadhi L, Albenzio M, Alférez MJM, Anadón A, et al. List of Contributors. In: Watson RR, Collier RJ, Preedy VR, editors. Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease: Academic Press; 2018. p. xi-xii.
59. Divakaran D, Chandran A, Pratap Chandran R. Comparative study on production of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Braz J Microbiol.* 2011;42(4):1397-404.
60. Ramesh D, Vinothkanna A, Rai AK, Vignesh VS. Isolation of potential probiotic *Bacillus spp.* and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology.* 2015;45(2):268-76.
61. Ferreira GS, Bolívar NC, Pereira SA, Guertler C, Vieira FdN, Mouriño JLP, et al. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 2015;448:273-9.
62. Gao X, Zhang M, Li X, Han Y, Wu F, Liu Y. Effects of a probiotic (*Bacillus licheniformis*) on the growth, immunity, and disease resistance of *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish & Shellfish Immunology.* 2018;76:143-52.
63. Fernandes S, Kerkar S, Leitao J, Mishra A. Probiotic Role of Salt Pan Bacteria in Enhancing the Growth of Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 2019;11(4):1309-23.

64. Chen B, Peng M, Tong W, Zhang Q, Song Z. The Quorum Quenching Bacterium *Bacillus licheniformis* T-1 Protects Zebrafish against *Aeromonas hydrophila* Infection. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020;12(1):160-71.
65. Panigrahi A, Das RR, Sivakumar MR, Saravanan A, Saranya C, Sudheer NS, et al. Bio-augmentation of heterotrophic bacteria in biofloc system improves growth, survival, and immunity of Indian white shrimp *Penaeus indicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2020;98:477-87.
66. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2019;128:171-7.
67. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(1):1-6.
68. Rea MC, Ross RP, Cotter PD, Hill C. Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. In: Drider D, Rebuffat S, editors. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 29-53.
69. Liu W, Pang H, Zhang H, Cai Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice* 2014. p. 103-203.
70. Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007;50(3):521-42.
71. Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006;70(2):564-82.
72. Shea EF, Connor PM, Sullivan O, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bactofencin A, a New Type of Cationic Bacteriocin with Unusual Immunity. *mBio*. 2013;4(6):e00498-13.

73. Sun Z, Wang X, Zhang X, Wu H, Zou Y, Li P, et al. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2018;45(3):213-27.
74. Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol*. 2011;162(4):363-74.
75. Fernebro J. Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resist Update*. 2011;14(2):125-39.
76. Uzelac G, Miljkovic M, Lozo J, Radulovic Z, Tosic N, Kojic M. Expression of bacteriocin *LsbB* is dependent on a transcription terminator. *Microbiological Research*. 2015;179:45-53.
77. Risøen PA, Brurberg MB, Eijsink VGH, Nes IF. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Molecular Microbiology*. 2000;37(3):619-28.
78. Morton JT, Freed SD, Lee SW, Friedberg I. A large scale prediction of bacteriocin gene blocks suggests a wide functional spectrum for bacteriocins. *BMC Bioinformatics*. 2015;16(1):381.
79. Chatterjee M, Raichaudhuri A. Bacteriocin in harmony with ABC transporter exhibits antimicrobial activity. *EC Microbiol*. 2017;8:3-10.
80. Hughes C, Ma B, Fau - Lajoie GA, Lajoie GA. De novo sequencing methods in proteomics. *Methods Mol Biol*. 2010;604:105-21.
81. López-Lara IM, Geiger O. Bacterial lipid diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(11):1287-99.
82. Shahnawaz M, Soto C. Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(15):11665-76.

83. Christensen DP, Hutkins RW. Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(10):3312-5.
84. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*. 2018;36(8):2187-200.
85. Héchard Y, Sahl H-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. 2002;84(5):545-57.
86. Moll GN, Konings WN, Driessen AJM. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. In: Konings WN, Kuipers OP, In 't Veld JHJH, editors. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1999. p. 185-98.
87. Gabrielsen C, Brede DA, Hernández PE, Nes IF, Diep DB. The Maltose ABC Transporter in *Lactococcus lactis* Facilitates High-Level Sensitivity to the Circular Bacteriocin Garvicin ML. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(6):2908-15.
88. Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection*. 1991;54(11):836-40.
89. Sakayori Y, Muramatsu M, Hanada S, Kamagata Y, Kawamoto S, Shima J. Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to mundticin KS, a class IIa bacteriocin. *Microbiology*. 2003;149(10):2901-8.
90. Piper C, Draper LA, Cotter PD, Ross RP, Hill C. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(3):546-51.

91. Opsata M, Nes IF, Holo H. Class IIa bacteriocin resistance in *Enterococcus faecalis* V583: The mannose PTS operon mediates global transcriptional responses. *BMC Microbiology*. 2010;10(1):224.
92. And HC, Hoover DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003;2(3):82-100.
93. Yildirim Z, Winters DK, Johnson MG. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*. 1999;86(1):45-54.
94. Joseph B, Dhas B, Hena V, Raj J. Bacteriocin from *Bacillus subtilis* as a novel drug against diabetic foot ulcer bacterial pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(12):942-6.
95. Smitha S, Bhat SG. Thermostable Bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114(3):688-94.
96. Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;21(1):53-8.
97. Pattnaik P, Grover S, Kumar Batish V. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. *Microbiological Research*. 2005;160(2):213-8.
98. Diep DB, Axelsson L, Grefslid C, Nes IF. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology*. 2000;146(9):2155-60.
99. Malheiros PS, Sant'Anna V, Todorov SD, Franco BDGM. Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*2a. *Braz J Microbiol*. 2015;46(3):825-34.

100. Telke AA, Ovchinnikov KV, Vuoristo KS, Mathiesen G, Thorstensen T, Diep DB. Over 2000-Fold Increased Production of the Leaderless Bacteriocin Garvicin KS by Increasing Gene Dose and Optimization of Culture Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(389).
101. Carter M, Shieh J. Chapter 14 - Cell Culture Techniques. In: Carter M, Shieh J, editors. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 295-310.
102. Adnani N, Rajski SR, Bugni TS. Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery. *Natural product reports*. 2017;34(7):784-814.
103. Jones JA, Wang X. Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018;53:33-8.
104. Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Navarro L, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Coculture-induced bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*. 2007;24(5):482-91.
105. Gutiérrez-Cortés C, Suarez H, Buitrago G, Nero LA, Todorov SD. Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(2952).
106. Jose Carlos Ribeiro Junior RT, Bruna Fritegato Soares, Aline Marangon de Oliveira, Fernando de Godoi Silva, Francine Fernandes da Silva, Nayara Assis Augusto, Vanerli Beloti. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Ciências Agrárias*. 2015;37(5).
107. Almeida MEMd. *Bacillus licheniformis* specific DNA markers for identification and culture-independent monitoring University Do Porto, Italy: Departamento de Biologia; 2014.

108. Brackett RE. CHAPTER 6 - MICROBIAL QUALITY. In: Shewfelt RL, Prussia SE, editors. Postharvest Handling. London: Academic Press; 1993. p. 125-48.
109. Cagri-Mehmetoglu A, Kusakli S, van de Venter M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(7):3643-9.
110. Krobthong S, Yingchutrakul Y. Identification and enhancement of antioxidant P1-peptide isolated from *Ganoderma lucidum* hydrolysate. *Food Biotechnology*. 2020;34(4):338-51.
111. Krobthong S, Yingchutrakul Y, Samutrtai P, Choowongkamon K. The C-terminally shortened analogs of a hexapeptide derived from Lingzhi hydrolysate with enhanced tyrosinase-inhibitory activity. *Archiv der Pharmazie*. 2021;354:e2100204.
112. Ma B, Zhang K Fau - Hendrie C, Hendrie C Fau - Liang C, Liang C Fau - Li M, Li M Fau - Doherty-Kirby A, Doherty-Kirby A Fau - Lajoie G, et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(20):2337-42.
113. Kimbrough JH, Cribbs JT, McCarter LA-O. Homologous c-di-GMP-Binding Scr Transcription Factors Orchestrate Biofilm Development in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*. 2020;6(1098-5530): e00723-19.
114. Zhang N, Zhang S, Ren W, Gong X, Long H, Zhang X, et al. Roles of rpoN in biofilm formation of *Vibrio alginolyticus* HN08155 at different cell densities. *Microbiol Res*. 2021;247:618-23
115. Benov L. Effect of growth media on the MTT colorimetric assay in bacteria. *PLOS ONE*. 2019;14(8):e0219713.
116. Seleshe SA-OX, Ameer AA-O, Kim BA-O, Kang SA-O. Ethanolic Extract of *Moringa stenopetala* Leaves Enhances the Quality Characteristics and Shelf-Life of Vacuum-Packed Pork Patty during Refrigeration Storage. *J Food Sci Technol*. 2021;57:3647-58.

117. Yousuf BA-O, Srivastava AK, Ahmad S. Application of natural fruit extract and hydrocolloid-based coating to retain quality of fresh-cut melon. *J Food Sci Technol*. 2020;57(10):3647-58.
118. Winzer K, Hardie Kr Fau - Williams P, Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(2):216-22.
119. Ruhal R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*. 2021;251:126829.
120. Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology (Reading)*. 2010;156(1465-2080):2271-82.
121. Qian H, Li W, Guo L, Tan L, Liu H, Wang J, et al. Stress Response of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* Biofilms to Different Modified Atmospheres. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11(23).
122. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(12):740-55.
123. von Eiff C, Jansen B Fau - Kohnen W, Kohnen W Fau - Becker K, Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*. 2005;65(2):179-214.
124. Shah CB, Mittelman Mw Fau - Costerton JW, Costerton Jw Fau - Parenteau S, Parenteau S Fau - Pelak M, Pelak M Fau - Arsenault R, Arsenault R Fau - Mermel LA, et al. Antimicrobial activity of a novel catheter lock solution. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1674-9.
125. Tribalat L, Paise O Fau - Dessalces G, Dessalces G Fau - Grenier-Loustalot M-F, Grenier-Loustalot MF. Advantages of LC-MS-MS compared to LC-MS for the determination of nitrofurantoin residues in honey. *Anal Bioanal Chem*. 2006;386(7-8):2161-8.

126. Dischinger J, Wiedemann I, Bierbaum G, Sahl H-G. Chapter 19 - Lantibiotics. In: Kastin AJ, editor. Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition). Boston: Academic Press; 2013. p. 119-28.
127. Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. International Journal of Medical Microbiology. 2014;304(1):51-62.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 14 แสดงผลการศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่มีความน่าจะเป็นของโปรตีนในการเป็น antimicrobial peptide

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
1	KDWLLTVDDK	11	-1	1379.57	1.87	78
2	KDSQKSPSVPT	11	+1	1173.281	3.09	76
3	EHQPHQPLPTP	11	-0.5	1280.408	2.25	75
4	KDDPLTPGPPT	11	-1	1137.253	2.02	75
5	TTFPLPACAT	10	0	1021.204	-0.5	74
6	KSPDVPDAPK	10	0	1053.174	2.6	88
7	KMTFACLTT	9	+1	1015.26	0	76
8	TTTAYFFPQ	9	0	1075.187	0.62	76
9	EEPFKPRK	9	+1	1127.303	4.07	75
10	PHQHQLPPLP	9	+0.5	1050.187	1.71	74
11	HGEETPPLP	9	-1.75	976.056	1.66	71
12	TTALVTAP	8	0	772.898	-0.6	71
13	EHALTTET	8	-1.75	900.942	2.4	85
14	AGPLHPPT	8	+0.25	788.903	-0.05	80
15	EAPLTCST	8	-1	820.92	0.91	80
16	EPOVLPPK	8	0	907.076	1.11	79
17	KHSRKHPK	8	+4.5	1017.19	5.53	79
18	TTALTVAP	8	0	772.898	-0.6	78
19	PLELMTTT	8	-1	905.082	0.29	77
20	TALTVTAP	8	0	772.898	-0.6	75
21	EPALTPPP	8	-1	820.943	0.33	75
22	ESAPPWPP	8	-1	879.969	0.75	74
23	AGGKPPGA	8	+1	653.733	-0.11	72
24	TAALGKAM	8	+1	761.938	-0.69	71
25	EPGLLPAP	8	-1	792.933	-0.72	71
26	EPGHVTTT	8	-0.75	840.889	1.77	71
27	ALFALCAP	8	0	805.011	-2.44	70
28	KPPLHALP	8	+1.25	872.076	-0.18	70
29	EMFPMPK	7	0	879.11	0.66	96

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
30	EEFPKK	7	0	873.998	3.1	95
31	KPPGMET	7	0	758.891	1.66	87
32	QPLGLYT	7	0	790.916	-0.36	86
33	LYVDDKH	7	-0.75	826.902	3.03	86
34	AGDLGMK	7	0	690.816	0.47	84
35	EAFAPGA	7	-1	661.714	-0.36	83
36	TAALSDT	7	-1	677.71	1.24	83
37	ECTLPPK	7	0	786.945	1.24	83
38	HLVHSTT	7	+0.5	793.878	1.27	83
39	KAVPYPO	7	+1	801.938	0.76	83
40	EYLLTAT	7	-1	809.916	0.06	83
41	KVPOHLQ	7	+1.25	848.998	1.76	83
42	KWGLDT	7	0	730.857	0.41	82
43	KMHLPOP	7	+1.25	792.998	0.16	82
44	LSQKFPK	7	+2	847.018	1.73	82
45	AGFAPTT	7	0	663.729	-0.34	81
46	KEMGPLP	7	0	770.946	0.59	81
47	TSSEWLS	7	-1	808.843	1.76	81
48	HQGLPQR	7	+1.25	834.935	3.54	81
49	EAAPKST	7	0	702.759	2.1	80
50	TPNPMPM	7	0	786.973	0.64	80
51	PDNQPFK	7	0	844.92	3.35	80
52	TGTSPTT	7	0	663.682	1.82	79
53	STTTSPK	7	+1	720.773	2.86	79
54	EFMPPKR	7	+1	904.099	3.13	78
55	LTVDSGV	7	-1	689.765	0.1	78
56	EPPVYLK	7	0	845.004	0.5	78
57	EFMMLPQ	7	-1	895.114	-0.03	78
58	AGHGVGF	7	+0.25	643.701	-0.99	77
59	AGFAECP	7	-1	693.78	-0.28	77
60	AFKPDAG	7	0	704.778	0.96	77

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
61	TTSLVER	7	0	804.9	3.04	77
62	TPPLYPE	7	-1	815.923	0.65	77
63	EMMMLPK	7	0	879.175	0.05	77
64	SLLAVAK	7	+1	700.874	-1.22	76
65	ALGHFLT	7	+0.25	757.889	-1.19	76
66	QLPKNLT	7	+1	812.962	1.49	76
67	KAVHHPQ	7	+1.5	815.927	2.07	76
68	FLPPKPK	7	+2	826.043	0.45	76
69	KVQLEPK	7	+1	841.012	2.06	76
70	YGAMYLQ	7	0	844.988	-0.6	76
71	DVMGGKT	7	0	706.815	1.22	75
72	QPPGLMT	7	0	742.896	-0.01	75
73	QPLGCHH	7	+0.5	790.902	1.1	75
74	NPPPLHH	7	+0.5	810.912	1.57	75
75	AVPYPQR	7	+1	829.956	2.1	75
76	KLMGWPK	7	+2	859.096	0.07	75
77	SSSSQTT	7	0	696.668	3.46	74
78	TLPAFDT	7	-1	763.847	0.59	74
79	KDKLGET	7	0	789.877	3.33	74
80	ESLAPER	7	-1	800.869	3.6	74
81	KYMLPPP	7	+1	845.071	-0.22	74
82	TNPLNVE	7	-1	849.897	2.55	74
83	QDAAPPT	7	-1	698.732	1.88	73
84	KDLAALT	7	0	730.857	0.48	73
85	TVSSLDQ	7	-1	748.789	2.09	73
86	STSFPPK	7	+1	762.857	1.7	73
87	EAQTQLP	7	-1	785.854	1.96	73
88	VDDAFPH	7	-1.75	799.84	1.89	73
89	ENASLLR	7	0	801.9	2.87	73
90	TESSWVT	7	-1	808.843	1.76	73
91	PPVLYPE	7	-1	813.951	-0.28	73

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
92	EESAGVT	7	-2	691.694	1.82	72
93	EMMPFPK	7	0	879.11	0.66	94
94	EEPFKPK	7	0	873.998	3.1	88
95	KNDNAGP	7	0	714.73	3.54	72
96	ALLSKTT	7	+1	732.872	0.34	72
97	TAPLMMT	7	0	763.979	-0.89	72
98	ERLGPPQ	7	0	795.896	3.05	72
99	QHGLPQK	7	+1.25	806.917	2.2	72
100	TVTKHQK	7	+1.25	809.917	2.4	72
101	LTVDDQH	7	-1.75	826.863	3.03	72
102	HGAGLPQ	7	+0.25	678.747	0.22	71
103	AGLVPPK	7	+1	680.843	-0.88	71
104	KPEAAST	7	0	702.759	2.1	71
105	QPTADYT	7	-1	794.817	2.53	71
106	KRNNVAP	7	+2	797.91	3.98	71
107	ETSSWWT	7	-1	808.843	1.76	71
108	TQVFVFTT	7	0	842.948	0.46	71
109	HLCAFLM	7	+0.25	834.076	-1.94	71
110	ACCAKTT	7	+1	696.843	0.64	70
111	AANTLEP	7	-1	714.775	1.06	70
112	SSDAFVP	7	-1	721.766	0.95	70
113	TSRVATT	7	+1	734.808	2.88	70
114	EATQLQP	7	-1	785.854	1.96	70
115	EALSKNK	7	+1	788.892	3.03	70
116	QPLLHAE	7	-0.75	806.91	0.76	70
117	OPTNQLM	7	0	830.962	1.86	70
118	HLSSFLM	7	+0.25	834.008	-0.53	70
119	AMEDLK	6	-1	705.828	2	97
120	LTVDDK	6	-1	689.761	2.76	95
121	EEPFKPK	6	-1	745.828	2.69	96
122	EYPMPK	6	0	763.91	1.69	95

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
123	KDLAAH	6	+0.25	653.733	1.73	87
124	KDLSDT	6	-1	677.706	4	87
125	TELDLP	6	-2	686.762	1.37	87
126	TYLVLM	6	0	738.948	-2.25	87
127	TLYLVF	6	0	754.926	-2.35	87
128	AFQPWQ	6	0	775.863	0.66	87
129	MFLDHH	6	-0.5	798.922	1.29	87
130	ENAPPT	6	-1	627.653	2.36	86
131	AFQPAM	6	0	718.811	-0.56	86
132	ETLDLP	6	-2	686.762	1.37	86
133	TTFKTH	6	+1.25	733.818	2.48	86
134	KQEETT	6	-1	734.758	4.97	86
135	TMYLYT	6	0	790.936	-0.3	86
136	PYFYPE	6	-1	814.894	0.68	86
137	TALPPK	6	+1	625.763	0.23	85
138	TAFVCT	6	0	640.759	-0.82	85
139	NTVDDK	6	-1	690.705	4.69	85
140	EPQLHP	6	-0.75	719.797	2.01	85
141	PPLSTT	6	0	614.697	0.6	84
142	TPLVPP	6	0	622.764	-1.06	84
143	SGPLRP	6	+1	625.727	2.07	84
144	RASPPT	6	+1	627.699	3.18	84
145	DNPPLP	6	-1	651.719	1.74	84
146	HQGLPQ	6	+0.25	678.747	1.64	84
147	HGFPPK	6	+1.25	681.789	1.04	84
148	EVNVPK	6	0	684.788	1.82	84
149	EVELEP	6	-3	714.773	1.91	84
150	LMEEPK	6	-1	745.893	1.98	84
151	EHLTLM	6	-0.75	742.896	0.3	84
152	SSHPVP	6	+0.25	622.679	1.23	83
153	ACFVGF	6	0	642.778	-2.33	83

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
154	EVPLP	6	-1	650.775	-0.35	83
155	PVEPLP	6	-1	650.775	-0.35	83
156	ETPVPL	6	-1	654.763	0.06	83
157	TTKLPT	6	1	659.777	1.39	83
158	QLLNDT	6	-1	702.764	2.27	83
159	QTMKDT	6	0	722.814	3.76	83
160	FPEEPK	6	-1	745.828	2.69	83
161	EVFPYP	6	-1	750.851	-0.01	83
162	KYVFPK	6	+2	780.958	0.7	83
163	TTVSVP	6	0	602.686	0.07	82
164	EALPPT	6	-1	626.709	0.44	82
165	ESMKTT	6	0	695.788	3.09	82
166	EHLMLT	6	-0.75	742.896	0.3	82
167	AELPPT	6	-1	626.709	0.44	81
168	TTLTPV	6	0	630.74	-0.2	81
169	TTNTVP	6	0	631.684	1.71	81
170	TPEVPL	6	-1	654.763	0.06	81
171	MALPPK	6	+1	655.857	-0.58	81
172	PPMPPK	6	+1	665.852	0.53	81
173	GHFPPK	6	+1.25	681.789	1.04	81
174	TLQVPQ	6	0	684.792	0.78	81
175	KMLLNQ	6	+1	745.939	0.92	81
176	YQKFPQ	6	+1	809.917	2.29	81
177	TVLLLPL	6	0	654.85	-2.7	80
178	TLNVPN	6	0	656.738	1.14	80
179	DSFLAF	6	-1	698.775	-0.09	80
180	HTLVPH	6	+0.5	702.812	0.48	80
181	TMLQDT	6	-1	707.804	2.02	80
182	KYQFPQ	6	+1	809.917	2.29	80
183	EARRWQ	6	+1	844.93	6.34	80
184	KGKVVP	6	+2	626.79	0.34	79

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
185	ATLKTT	6	+1	633.739	1.08	79
186	KDVDAT	6	-1	647.68	3.28	79
187	NDPPLP	6	-1	651.719	1.74	79
188	TAYCLT	6	0	670.785	-0.45	79
189	TVLDDK	6	-1	689.761	2.76	79
190	KDCQTT	6	0	694.76	3.94	79
191	THLVPH	6	+0.5	702.812	0.48	79
192	QPNCQQ	6	0	716.774	3.66	79
193	TFMLTM	6	0	742.96	-1.24	79
194	TFMLTF	6	0	758.938	-1.34	79
195	YAMLLH	6	+0.25	746.93	-1.53	79
196	EPYFPK	6	0	779.888	1.58	79
197	KDMFPK	6	+1	764.937	2.41	79
198	KALLVT	6	+1	643.822	-1.26	78
199	ALMLVT	6	0	646.851	-2.57	78
200	TMTFAP	6	0	666.797	-0.33	78
201	LKMGKT	6	+2	676.871	0.9	78
202	QLVPPK	6	+1	680.843	0.35	78
203	TTMPLR	6	+1	717.889	2.13	78
204	YKQFPQ	6	+1	809.917	2.29	78
205	TVMQVS	6	0	663.794	0.17	77
206	AYVMAP	6	0	650.798	-1.64	77
207	LLNPPK	6	+1	680.843	0.39	77
208	ENTKMT	6	0	722.814	3.63	77
209	EHLVY	6	-0.75	758.874	-0.23	77
210	KYLWLS	6	+1	808.972	-0.51	77
211	KQFYPO	6	+1	809.917	2.29	77
212	RTVGST	6	+1	619.676	3.08	76
213	SRAPPT	6	+1	627.699	3.18	76
214	LHATTT	6	+0.25	642.71	0.94	76
215	LSMPPK	6	+1	671.856	0.27	76

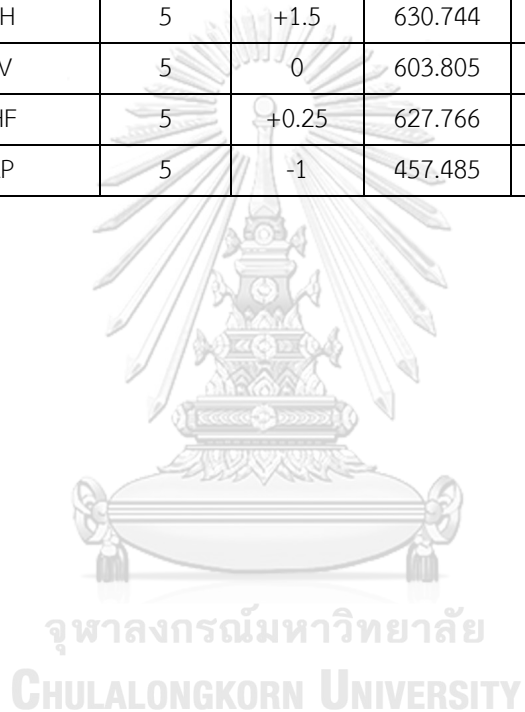
ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
216	HAMPPQ	6	+0.25	679.799	1	76
217	LVQPPK	6	+1	680.843	0.35	76
218	QTLVQP	6	0	684.792	0.78	76
219	TPYPLP	6	0	686.807	-0.36	76
220	EPELT	6	-2	688.734	2.3	76
221	HQHSPQ	6	+0.5	732.754	3.96	76
222	HLKELP	6	+0.25	735.879	1.19	76
223	DFKFPQ	6	0	780.876	2.3	76
224	FEQRET	6	-1	808.848	5.61	76
225	EGDEGP	6	-3	602.557	3.4	75
226	SHVCTT	6	+0.25	646.722	1.31	75
227	NPDPLP	6	-1	651.719	1.74	75
228	ETLVV	6	-1	658.795	-1.27	75
229	ETTPPK	6	0	671.745	2.91	75
230	LMLSDT	6	-1	678.806	0.41	75
231	EVDLDP	6	-3	686.719	2.54	75
232	KSLMSK	6	+2	692.87	1.77	75
233	FPMFLP	6	0	750.962	-2.2	75
234	TFFLYT	6	0	790.915	-0.93	75
235	TVTSVP	6	0	602.686	0.07	74
236	AVPPPK	6	+1	607.748	-0.04	74
237	TGFSSL	6	0	610.665	0.08	74
238	TAFTSL	6	0	638.719	-0.19	74
239	NMCKTT	6	+1	696.843	2.28	74
240	TFTSPF	6	0	698.774	0.42	74
241	EVENKP	6	-1	714.771	3.62	74
242	HSHTLQ	6	+0.5	721.771	2.65	74
243	TTMRLP	6	+1	717.889	2.13	74
244	KDHLLH	6	+0.5	761.876	2.29	73
245	HLMHLQ	6	+0.5	777.947	0.44	73
246	LLLGCT	6	0	618.797	-2.4	73

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
247	SSCVET	6	-1	624.67	1.8	73
248	KGVPPK	6	+2	624.774	1.01	73
249	AGWPPT	6	0	627.698	-0.41	73
250	TAFTVT	6	0	638.719	-0.18	73
251	TVFACT	6	0	640.759	-0.82	73
252	QQAVPL	6	0	654.766	0.05	73
253	KNCLLT	6	+1	690.859	0.6	73
254	TVKMSK	6	+2	692.87	1.78	73
255	EAMECP	6	-2	678.787	1.36	73
256	TVMQTT	6	0	679.793	1.14	73
257	KDPKDT	6	0	702.755	5.18	73
258	EECLK	6	-1	721.827	2.59	73
259	KYGVKH	6	+2.25	730.857	1.82	73
260	ETHMAM	6	-0.75	718.854	1.25	73
261	THHDEL	6	-1.5	750.767	3.75	73
262	HLELTM	6	-0.75	742.896	0.3	73
263	YAFLH	6	+0.25	762.908	-1.63	73
264	KLEQFK	6	+1	791.939	2.59	73
265	PPLTST	6	0	614.697	0.6	72
266	KQGPT	6	+1	626.707	2.12	72
267	ESTVVT	6	-1	634.685	1.21	72
268	EVRAAT	6	0	645.715	2.77	72
269	TTMMAP	6	0	650.819	-0.22	72
270	EVDVPQ	6	-2	685.734	2.16	72
271	TFTLAM	6	0	682.84	-1.15	72
272	LPVKPT	6	+1	653.817	-0.14	72
273	TTLTVP	6	0	630.74	-0.2	72
274	LVSVPK	6	+1	641.806	-0.67	72
275	EFPMPK	6	0	747.911	1.17	72
276	MEFPK	6	0	747.911	1.17	72
277	TLYLVM	6	0	738.948	-2.25	72

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
278	KVPPLP	6	+1	649.829	-0.56	72
279	EPVPLP	6	-1	650.775	-0.35	72
280	TPLPVP	6	0	622.764	-1.06	72
281	DPPFPK	6	0	699.802	1.88	72
282	TFELVF	6	-1	754.883	-0.92	72
283	PPPTLS	6	0	610.709	0.17	72
284	TTLSLP	6	0	630.74	-0.21	72
285	YAKPAV	6	+1	647.769	-0.32	72
286	EVPLPP	6	-1	650.775	-0.35	72
287	TLTLSP	6	0	630.74	-0.21	72
288	AMLPPK	6	+1	655.857	-0.58	72
289	QYVFPQ	6	0	780.88	0.69	72
290	NNAYLQ	6	0	721.769	2.03	72
291	TMNKDT	6	0	708.787	3.95	72
292	QYALCQ	6	0	724.837	0.53	72
293	ELHMLT	6	-0.75	742.896	0.3	72
294	YFVDEF	6	-2	818.883	0.94	72
295	SLTVSP	6	0	602.686	0.06	71
296	KSSGPK	6	+2	602.68	2.82	71
297	TTGHAH	6	+0.5	622.638	1.95	71
298	FHPGAP	6	+0.25	624.698	-0.17	71
299	KGKVPV	6	+2	626.79	0.34	71
300	CLCVGF	6	0	640.827	-2.57	71
301	EVTLVV	6	-1	658.795	-1.27	71
302	ATYCLT	6	0	670.785	-0.45	71
303	KCKLEV	6	+1	718.909	1.27	71
304	TYLFLP	6	0	752.91	-1.68	71
305	FFVDLF	6	-1	786.928	-1.53	71
306	QYKFPQ	6	+1	809.917	2.29	71
307	FYPYEP	6	-1	814.894	0.68	71
308	FGAPAF	6	0	608.696	-1.75	70

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
309	PPMPLP	6	0	650.842	-1.21	70
310	QLNSCL	6	0	676.793	0.74	70
311	KRMPVP	6	+2	726.939	2.34	70
312	HDNDMT	6	-1.75	731.742	4.82	70
313	QMPFPQ	6	0	746.887	0.95	70
314	THHFLP	6	+0.5	750.856	0.66	70
315	LTTLSL	6	0	630.74	-0.21	87
316	ELHSTM	6	-0.75	742.896	0.3	70
317	PKRLP	5	+2	609.767	3.11	96
318	QPSMM	5	0	592.739	0.84	87
319	HLPKL	5	+1.25	606.763	0.07	85
320	KEDDT	5	-2	606.584	6.47	84
321	SRYSP	5	+1	608.652	4.37	81
322	DVMMM	5	-1	593.768	-0.81	81
323	PYPQR	5	+1	659.744	4.12	80
324	KSLHH	5	+1.5	620.705	2.67	80
325	EDKEY	5	-2	682.682	5.6	80
326	ENSEF	5	-2	624.606	4.13	79
327	AAYTW	5	0	610.667	-0.64	78
328	QWPPT	5	0	627.698	1.15	78
329	PKPER	5	+2	643.784	3.49	78
330	DPPYQ	5	-1	618.645	2.88	77
331	KFGKW	5	+2	664.797	0.97	77
332	KYLVL	5	+1	634.814	-1.63	75
333	MMSKP	5	+1	592.778	0.85	74
334	TGFTW	5	0	610.667	-0.22	74
335	WMNTT	5	0	651.741	1.42	73
336	RQPPQ	5	+1	624.699	5.2	72
337	SPYPR	5	+1	618.691	3.69	94
338	MPFPK	5	+1	618.795	0.04	93
339	HLPHL	5	+0.5	615.734	-0.1	92

ลำดับ ที่	ลำดับกรดอะมิโน	ความยาว อะมิโน	Net charge	Molecular weight	Protein binding potential (kcal/mol)	ค่า <i>De novo</i> Score
340	KQAFQ	5	+1	620.703	2.36	90
341	YPMPK	5	+1	634.794	0.66	90
342	WFLTT	5	0	666.775	-1.01	90
343	EYQTT	5	-1	640.648	3.52	89
344	EYKTT	5	0	640.687	3.52	89
345	KLHPL	5	+1.25	606.763	0.07	88
346	HPLKH	5	+1.5	630.744	1.98	88
347	LLFLV	5	0	603.805	-4.35	71
348	PMPHF	5	+0.25	627.766	-0.13	70
349	EAAAP	5	-1	457.485	0.27	70



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางแพรทิพย์ คล้ายเจริญสุข
วัน เดือน ปี เกิด	14 สิงหาคม 2531
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี ประกาศนียบัตรบัณฑิต วิชาชีพครู สาขาการศึกษาองค์รวม สถาบันอาศรมศิลป์
ที่อยู่ปัจจุบัน	310/20 หมู่บ้านดุสิตาทิพย์ ซอยประชาอุทิศ 76 ถนนประชาอุทิศ ตำบล บ้านคลองสวน อำเภอพระสมุทรเจดีย์ สมุทรปราการ 10290
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลชนะเลิศ การนำเสนอผลงาน การประชุมวิชาการระดับชาติ ราชมงคล สุรินทร์ ครั้งที่ 12 ประจำปี 2564 ในหัวข้อ “วิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนา เศรษฐกิจวิถีใหม่”