การใช้แบคทีเรีย *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

นางสาวขนิษฐา แสงงาม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0269-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

USE OF BACTERIA *Alteromonas* sp. S9730 IN CONTROLLING PATHOGENIC *Vibrio harveyi* IN LARVAE OF TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius

Miss. Khanittha Sang-ngam

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0269-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้แบคทีเรีย *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน
โดย	นางสาวขนิษฐา แสงงาม
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศุภิชัย ตั้งใจตรง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนิษฐา แสงงาม: การใช้แบคทีเรีย *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. (USE OF BACTERIA *Alteromonas* sp. S9730 IN CONTROLLING PATHOGENIC *Vibrio harveyi* IN LARVAE OF TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, 71 หน้า. ISBN 974-03-0269-6.

Alteromonas sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* 1526 ได้ และเซลล์สดของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ยังสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเลได้ เมื่อศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Double-Layer Method พบว่า *Alteromonas* sp. S9730 สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในสกุล *Vibrio* ได้หลายชนิด ได้แก่ *V. harveyi* 6 สายพันธุ์, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* อย่างละ 1 สายพันธุ์ เมื่อนำเซลล์สดของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แช่ลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย ไมซิส และโพสลาวี่ พบว่า อัตรารอดของลูกกุ้งทั้งสามระยะไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แต่เมื่อนำลูกกุ้งทั้งสามระยะที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ไปเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 พบว่า ลูกกุ้งระยะไมซิสมีอัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนระยะซูเอียและโพสลาวี่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต ขนิษฐา แสงงาม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4172234623 MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: *Alteromonas* sp. S9730/*Vibrio harveyi*/SHRIMP LARVAE/PROBIOTICS/BIOCONTROL

KHANITTHA SANG-NGAM: USE OF BACTERIA *Alteromonas* sp. S9730 IN CONTROLLING PATHOGENIC *Vibrio harveyi* IN LARVAE OF TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., 71 pp. ISBN 974-03-0269-6.

Alteromonas sp. S9730 cultured in 20% dilution of marine broth can produce antibacterial substance againts pathogenic *V. harveyi* 1526. Their fresh cells can also inhibit virulent *V. harveyi* 1526 in seawater. *Alteromonas* sp. S9730 showed antibacterial activity against shrimp pathogenic bacterias: *V. harveyi* 6 strains, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and non-pathogenic *V. alginolyticus* by using a double layer method. Adding *Alteromonas* sp. S9730 at 10^7 CFU/ml in the culture water did not increase survival of *Penaeus monodon* in the 3 different stages studied: zoea, mysis, and postlarvae. However, after challenging by immersion with *V. harveyi* 1526, shrimp larvae in mysis stage showed significantly higher survival rate than those of the control group ($p<0.05$) but no different survival rates among the treatment and the control groups in zoeal and postlarval stages were found.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Marine Science Student's signature

Field of Study Marine Science Advisor's signature

Academic year 2001 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ซึ่งให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยให้ความกรุณาในการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการเขียนวิทยานิพนธ์และดูแลข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา ขอบพระคุณอาจารย์ ดร.พิกุล จิรวาณิชไพศาล อาจารย์ที่ทำหน้าที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือสนับสนุนด้านทุนวิจัยและแนะแนวทางในการทำการทดลองจนทำให้งานวิจัยของข้าพเจ้าเป็นไปตามจุดประสงค์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศุภิชัย ตั้งใจตรง, ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นกับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และ รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

นอกจากบุคคลเหล่านี้แล้ว ข้าพเจ้าต้องขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และคณาจารย์ในภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลอีกหลายท่านที่ห่วงใยสอบถามถึงความก้าวหน้าของวิทยานิพนธ์อยู่เสมอ รวมไปถึงอาจารย์ และพี่ ๆ นักวิจัยของหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือทุกครั้งที่ข้าพเจ้ามีบัญหา ที่ขาดเสียมิได้คงเป็นพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทั้งที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลและหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่คอยให้ความช่วยเหลือในยามที่เกิดปัญหาและขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่เอื้ออำนวยพื้นที่ในการทำการทดลอง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าอยากกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นทุกสิ่งทุกอย่างในชีวิตของข้าพเจ้าและเป็นกำลังใจที่ดีให้ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....ฎ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
3. วิธีการทดลอง.....27
4. ผลการทดลอง.....36
5. อภิปรายผลการทดลอง.....50
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....57
รายการอ้างอิง.....59
ภาคผนวก.....67
ภาคผนวก ก.....68
ภาคผนวก ข.....69
ภาคผนวก ค.....70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....71

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ.....11
2. แบคทีเรียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....17-20
3. ลักษณะทางชีวเคมีของ *Alteromonas* sp. S9730.....26
4. การยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* spp. โดย *Alteromonas* sp. S9730 โดยวิธี Double-Layer Method.....40
5. ค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* 1526 ที่ทำให้กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 2 ตายที่เวลาต่าง ๆ.....41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ.....5
2. องค์ประกอบการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำและบทบาทของแบคทีเรียในธรรมชาติ.....8
3. ประโยชน์และหน้าที่ของแบคทีเรียที่พบในระบบการเพาะเลี้ยง.....10
4. ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติก.....15
5. การเจริญของ *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนความเข้มข้น 100, 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์.....37
6. ความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* 1526 ในอาหารเหลวความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Disc Diffusion Method.....38
7. ความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* 1526 โดย *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน.....39
8. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5–15 ที่แช่ด้วยเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ.....41
9. ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15.....42
10. ปริมาณ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15.....43
11. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย 1–3 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร.....44
12. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย 1-3.....44
13. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1–3 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น $4x10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร.....45
14. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1–3 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร.....46
15. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1-3.....46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

16. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 1–4 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น 8 x 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร.....47

17. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 3-15 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร.....48

18. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาสี่ 3-15.....48

19. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 16-20 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น 4.125x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร.....49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยโดยทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ให้ผลผลิตต่อไร่สูง และเนื้อมีรสอร่อย ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมบริโภคโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นและอเมริการวมไปถึงหลายประเทศในแถบยุโรป ดังนั้นในประเทศไทยจึงมีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำกันอย่างแพร่หลายทั้งในระดับบ่อดินและโรงเพาะฟักลูกกุ้งวัยอ่อน

ปัญหาที่พบในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งในระบบบ่อดินและโรงเพาะฟักลูกกุ้งวัยอ่อนคือปัญหาโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Vibrio harveyi* หรือที่รู้จักกันในชื่อโรคเรืองแสงหรือโรคเพชรพลอย เป็นต้น เมื่อกุ้งติดเชื้อชนิดนี้จะมีอัตราการตาย 90-100 เปอร์เซ็นต์ และสร้างความเสียหายให้กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างมาก การแพร่ระบาดพบได้ทั้งในประเทศไทยและหลายประเทศในแถบเอเชีย (Lavilla-Pitogo, 1995)

ในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ผู้ประกอบการมักใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีซึ่งมีจำหน่ายอย่างแพร่หลาย การใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีด้วยความรู้เท่าไม่ถึงการณ์ ไม่มีความรู้เกี่ยวกับตัวยาและการออกฤทธิ์ตลอดจนการใช้ยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (Karunasagar และคณะ, 1994) รวมทั้งมีการสะสมของยาในผลิตภัณฑ์กุ้ง ส่งผลต่อการส่งออกกุ้งกุลาดำสู่ตลาดโลกซึ่งมีมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท ปัจจุบันจึงเริ่มให้ความสนใจการใช้จุลชีพจากธรรมชาติเป็นโพรไบโอติก (Probiotics) และ/หรือการควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) ในการป้องกันและควบคุมการปริมาณเชื้อก่อโรคเพื่อลดการตายของกุ้งหรือรักษาสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (Gatesoupe, 1999)

โพรไบโอติก (Probiotics) คือ จุลินทรีย์ที่เสริมในอาหารสัตว์แล้วมีผลให้เกิดสมดุลย์ในระบบทางเดินอาหาร (intestinal balance) ของสัตว์ชนิดนั้น (Fuller, 1989) กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารเสริมชีวนะ เช่น *Bacillus* sp. (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539), *Bifidobacterium* sp., *Clostridium butyricum*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp.,

Streptococcus sp., ยีสต์และจุลินทรีย์ผสม เป็นต้น การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเริ่มเมื่อประมาณ 50 ปีที่ผ่านมา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของโรค (Giffith, 1995) ทั้งนี้เริ่มมีการใช้โพรไบโอติกครั้งแรกในปลา โดยมีการผสมแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* AH2 ในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา rainbow trout ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และพบการตายสะสมของปลา rainbow trout เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. anguillarum* ลดลง (Gram และคณะ 1999)

แบคทีเรีย *Bacillus* S11 ซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำจากธรรมชาติเป็นโพรไบโอติกชนิดแรกที่นำมาใช้ในกุ้งกุลาดำ โดยนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกใน 3 รูปแบบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งให้อัตรารอดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหลังจากทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* D331 โดยกุ้งในกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม มีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตรารอด 26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียมาใช้สร้างภูมิคุ้มกันโรค และเพิ่มอัตรารอดให้กับกุ้งกุลาดำ (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์, 2539)

นอกจาก *Bacillus* spp. แล้ว Thongton (1998) พบว่า แบคทีเรียน้ำเค็ม *Alteromonas* sp. S9730 ที่แยกได้จาก hydroid ชนิดหนึ่งก็มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากสาร Isatin ที่สกัดโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่จากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ค่า Minimum Inhibiting Concentration (MIC) เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้าน *Vibrio* sp. ที่ค่า MIC เท่ากับ 31.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาของ Thongton (1998) ทำให้เห็นว่า *Alteromonas* sp. S9730 สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ *Alteromonas* sp. S9730 ในการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนเพื่อลดความเสียหายจากแบคทีเรียก่อโรคอันจะนำไปสู่อัตรารอดของลูกกุ้งที่สูงขึ้นในที่สุด

วัตถุประสงค์ที่สำคัญของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเจริญของ *Alteromonas* sp. S9730 และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมารีนเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Alteromonas* sp. S9730

2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *Alteromonas* sp. S9730

3. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

4. เพื่อศึกษาอัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่อนุบาลด้วย *Alteromonas* sp. S9730 และเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

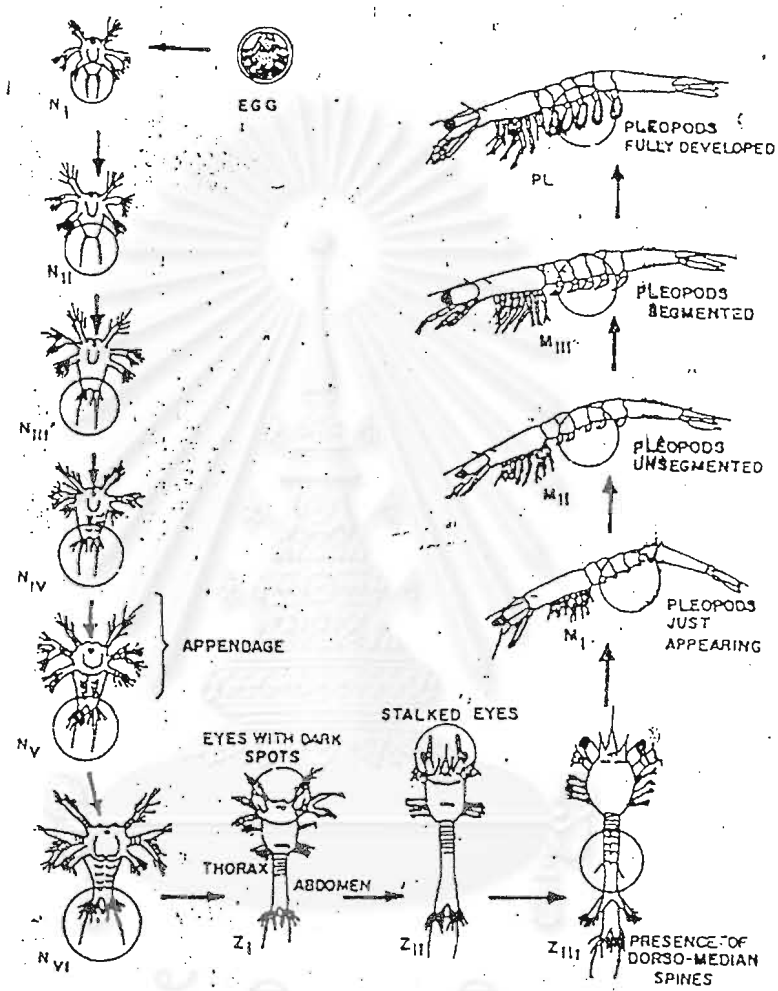
กุ้งกุลาดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon* Fabricius หรือชื่อสามัญว่า grass shrimp หรือ giant tiger prawn เป็นกุ้งที่อยู่ในครอบครัว Penaeidae จัดเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เมื่อโตเต็มที่จะมีความยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 250 กรัม กุ้งกุลาดำเพศเมียที่ได้รับการผสมแล้วจะวางไข่ในเวลากลางคืน ปริมาณไข่ที่ได้ประมาณ 248,000-811,000 ฟอง ขึ้นอยู่กับขนาดแม่พันธุ์กุ้ง ไข่ที่ได้รับการผสมเริ่มมีการพัฒนาหลังจากการปฏิสนธิครึ่งชั่วโมง โดยมีการแบ่งเซลล์ 11-12 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ระยะนอเพลียส (nauplius) 1 และใช้เวลาอีก 36 ชั่วโมง เพื่อเข้าสู่ระยะนอเพลียส 6 กุ้งในระยะนี้ยังไม่กินอาหาร หลังจากนั้นกุ้งจะเข้าสู่ระยะซูเอีย (zoea) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระยะ แต่ละระยะใช้เวลาประมาณ 36 ชั่วโมง ในระยะนี้กุ้งจะกินสาหร่ายขนาดเล็ก (*Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp.) เป็นอาหาร หลังจากนั้นกุ้งจะพัฒนาสู่ระยะไมซิส (mysis) ระยะ 1-3 กุ้งระยะนี้จะมีการลอยตัวในลักษณะนอนหงายท้องขึ้นสู่ผิวน้ำตลอดเวลา มีการเคลื่อนที่ไปทางหางได้รวดเร็วด้วยการดีดตัว มีการพัฒนาระยางค์ส่วนหัวทำให้สามารถจับเหยื่อขนาดใหญ่จำพวกแพลงก์ตอนสัตว์กินเป็นอาหารได้ และมีการพัฒนาระยางค์ส่วนท้องเพื่อช่วยในการว่ายน้ำด้วย กุ้งระยะไมซิส 1 จะใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน เพื่อพัฒนาไปสู่ระยะโพสลาวี่ (postlarvae) ซึ่งจะว่ายน้ำในลักษณะคว่ำตัวลงแต่ยังคงว่ายอยู่ในมวลน้ำตลอดเวลาจนกุ้งมีการลอกคราบ 4-5 ครั้ง เป็นกุ้งระยะโพสลาวี่ 5 แล้วจึงเริ่มลงเกาะกับพื้นดินและหากินบนพื้นเหมือนพ่อแม่ (ภาพที่ 1)

อาการเจ็บป่วยที่พบในกุ้งกุลาดำ

อาการเจ็บป่วยเกิดจากสาเหตุดังนี้

1. อาการเจ็บป่วยที่เกิดจากปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ทั้งในด้านคุณภาพน้ำและดินหรือคุณภาพอาหารทั้งที่ปัจจัยเหล่านี้ไม่ใช่สาเหตุหลักที่ทำให้กุ้งตายแต่มักจะทำให้กุ้งอ่อนแอและติดโรคได้ง่ายกว่ากุ้งที่อยู่ในภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

2. อาการเจ็บป่วยที่เกิดจากโรคและสิ่งมีชีวิต ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และพยาธิซึ่งสามารถพบได้ในกุ้งกุลาดำทุกระยะ (Flegel et al., 1992) สาเหตุนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากกุ้งที่ติดโรคมักอ่อนแอและตายหรือบางชนิดอาจทำให้ตายอย่างเฉียบพลัน



ภาพที่ 1. วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

โรคที่พบในกุ้งกุลาดำซึ่งมีสาเหตุมาจากไวรัสมีความรุนแรงมากที่สุดเพราะนอกจากทำให้กุ้งตายอย่างฉับพลันแล้วยังไม่มียารักษาอาการที่เกิดขึ้นได้ ไวรัสที่ก่อโรคในประเทศไทย ได้แก่ *Penaeus monodon* baculovirus (MBV), Lympoid organ virus, Infectious Hematopoietic and Hypodermal Necrosis virus (IHHNV), Hepatopencreatic Parvo-like virus, Yellow head virus (YHV) และ Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculiovirus (SEMBV) (Flegel et al., 1992) สำหรับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย

แกรมลบ ความรุนแรงที่พบขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย เช่น โรค Vibriosis ที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล Vibrio ได้แก่ *V. harveyi* (โรคเรืองแสง), *V. parahaemolyticus, V. vulnificus* (โรคเสี้ยนดำ), *V. splendidus* นอกจากนี้แบคทีเรีย *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ยังเป็นสาเหตุของโรคในกุ้งได้ (Flegel et al., 1992)

สำหรับสาเหตุอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดการตายของสัตว์น้ำ เช่น เชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง ตั้งแต่กุ้งเล็กไปจนถึงกุ้งโตเต็มวัย การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ขยายพันธุ์ของเชื้อรา โรคติดเชื้อรามักก่อความเสียหายเมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะอ่อนแอ เชื้อราที่พบว่าก่อโรคในกุ้งได้แก่ *Leginidium* sp. และ *Fusarium* sp. (Flegel et al., 1992) ส่วนปรสิตพวกพยาธิจะเกาะติดอยู่กับกุ้งที่บริเวณผิว เหงือก และระยางค์ ซึ่งถ้าพบในปริมาณน้อยมักจะไม่ทำให้เกิดโรคแต่ถ้ามีปริมาณมากพบว่าจะไปรบกวนการหายใจ การเคลื่อนไหว การกินอาหาร และการลอกคราบของกุ้ง อาการเหล่านี้พบได้ในภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำหรือดินก้นบ่อเสีย คุณสมบัติบางประการของน้ำเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วหรือขาดธาตุอาหารที่จำเป็น โปรโตซัวที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp. *Vorticella* sp. และ *Acineta* sp. ซึ่งพบภายนอกผิวหรือเหงือก ส่วน *Agmasoms penbaei* (mocrosporidium) เป็นพยาธิที่พบได้ในลำตัวกุ้ง (Flegel et al., 1992)

แบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi*

V. harveyi เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มีความรุนแรงมากโดยเฉพาะในกุ้งวัยอ่อน เนื่องจากกุ้งระยะนี้ยังไม่มีระบบภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์ โดยพบการแพร่ระบาดของ *V. harveyi* ในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย (Sunryanto and Mariam, 1986) ไทย (Tansutapanit and Ruangpan, 1987; Lightner, 1988) ฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo et al., 1990 ; Batcados et al., 1991) และอินเดีย (Karunasagar et al., 1994) เป็นต้น ในขณะที่เกิดโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักลูกกุ้งวัยอ่อนจะสังเกตพบการเรืองแสงในเวลากลางคืนของกุ้งที่ติดเชื้อและกุ้งที่ตายแล้ว และพบ *V. harveyi* ในปริมาณสูง กุ้งที่ติดเชื้อชนิดนี้จะไม่กินอาหาร ว่ายน้ำแบบไร้ทิศทาง ลำตัวขุ่นขาวและตายในที่สุด (Sae-qui et al., 1989) กุ้งในระยะซูเอียมีความไวต่อการติดโรคมากที่สุด ส่วนกุ้งในระยะไมซิสและโพสลาวี่ (1-2) สามารถติดโรคนี้ได้เช่นเดียวกัน ส่วนกุ้งระยะโพสลาวี่ 3-4 มีความทนต่อการติดโรคได้ดีกว่าระยะอื่น ๆ (Limsuwan, 1989) เมื่อนำลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอียและโพสลาวี่ไปแช่

เชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า มีอัตราการรอดเท่ากับ 25 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Prayino and Latchford, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าการก่อโรคของ *V. harveyi* มีความจำเพาะต่อสัตว์น้ำบางชนิดเท่านั้น เนื่องจากสามารถก่อโรคในกุ้ง *P. monodon, P. indicus* และอาร์ทีเมียแต่ไม่ก่อโรคในเพรียงและกุ้งก้ามกราม (*Macrobranchium* spp.)

ปัจจัยของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

การเกิดโรคในกุ้งกุลาดำขึ้นกับปัจจัย 3 ประการดังนี้

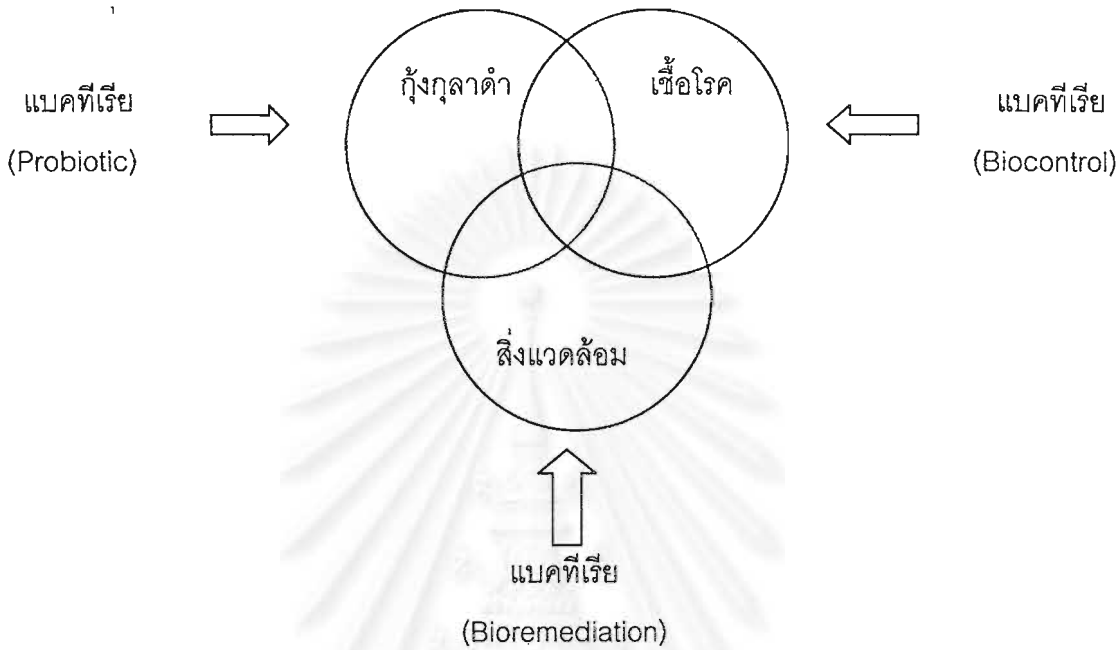
1. **กุ้งกุลาดำ** (Host) พ่อแม่พันธุ์ที่มีสุขภาพดีเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญของระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่วนใหญ่นิยมใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้จับได้จากธรรมชาติซึ่งถือได้ว่าเป็นกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงและให้ไข่ปริมาณสูง ในปัจจุบันได้มีผู้ประกอบการพยายามหันมาใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้เองในระบบการเพาะเลี้ยงทั่วไปเพื่อลดต้นทุนและสามารถควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมและโรคได้

2. **เชื้อโรค** (Pathogen) เรามักพบสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีบทบาทสำคัญในระบบการเพาะเลี้ยงอาศัยอยู่ร่วมกันในสภาพที่สมดุลย์ บางชนิดอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหรือบางชนิดอาจเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์กับกุ้ง สาเหตุการเพิ่มจำนวนของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มักขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

3. **สิ่งแวดล้อม** (Enviroment) สัตว์น้ำเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำย่อมมีผลต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำ เช่น ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ไนเตรต ไนไตรท์ แอมโมเนีย มีผลกระทบโดยตรงต่อการปรับตัวและดำรงชีพของสัตว์น้ำ

ดังนั้น ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำจึงเป็นองค์ประกอบร่วมของปัจจัยทั้ง 3 (ภาพที่ 2) คือ กุ้งอยู่ในสภาวะที่อ่อนแอ คุณภาพน้ำในบ่อไม่เหมาะสม และมีเชื้อก่อโรคอยู่ในปริมาณที่เป็นอันตราย การป้องกันแก้ไขจึงควรเริ่มจากการดูแลปัจจัยทั้งหมดนี้ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม เช่น การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่แข็งแรง มีความต้านทานโรคและลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อ การจัดการคุณภาพ

น้ำให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรคในน้ำให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายกับกุ้ง



ภาพที่ 2. องค์ประกอบการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำและบทบาทของแบคทีเรียในธรรมชาติ (ดัดแปลงจาก ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539; Gatesoupe, 1999)

บทบาทของแบคทีเรียในการควบคุมปัจจัยการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

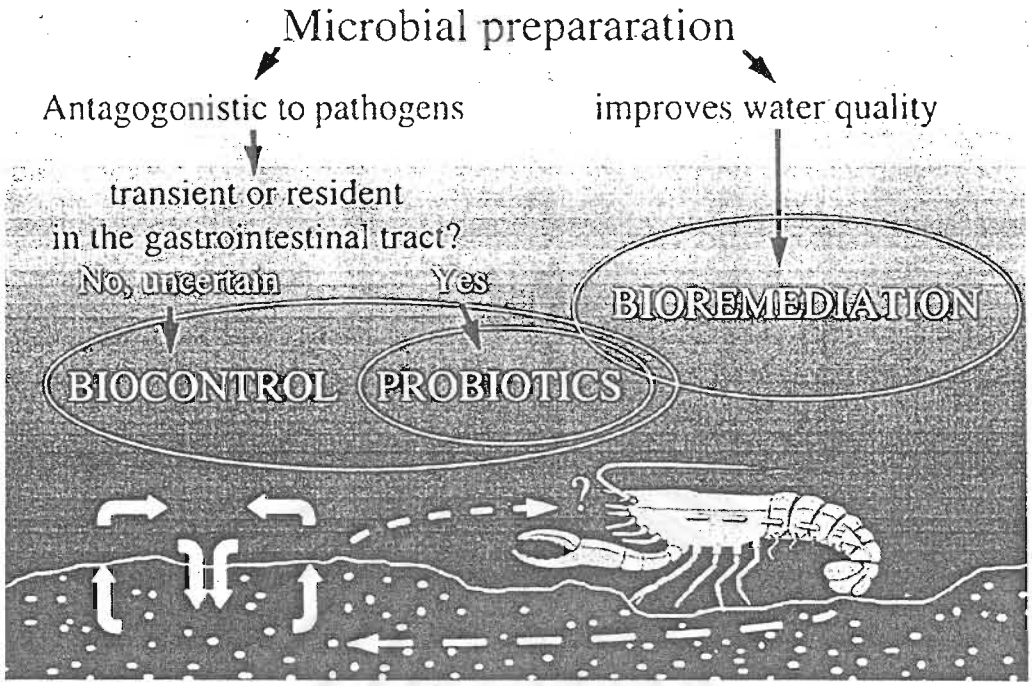
ในปัจจุบันเกษตรกรมักใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการควบคุมและรักษาโรคกุ้งซึ่งยาแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไป เกษตรกรจำเป็นต้องทราบถึงสาเหตุของโรค ขนาด และวิธีการใช้ยาอย่างละเอียด แต่ในความเป็นจริงเกษตรกรไม่มีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับยาที่ใช้และมักใช้ยาตามคำบอกเล่า ดังนั้นปัญหาการใช้ยาผิดประเภทและเกินขนาดจึงส่งผลให้เกิดภาวะดื้อยาของจุลชีพและการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ส่งออกนอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังทำลายสมดุลย์ของจุลชีพที่มีประโยชน์ในน้ำอีกด้วย ดังนั้น การเปลี่ยนแนวทางการควบคุมโรคกุ้งจึงควรเปลี่ยนไปใช้แบคทีเรียที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งมาใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อเพิ่มอัตรารอด เสริมสร้างให้กุ้งมีสุขภาพที่แข็งแรงและควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคให้อยู่ในปริมาณที่ไม่เป็นอันตราย

แบคทีเรียที่พบในระบบการเพาะเลี้ยงทั่วไปประกอบไปด้วยกลุ่มที่มีประโยชน์และให้โทษ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้อยู่ร่วมกันในภาวะที่สมดุลย์ (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539) แบคทีเรียที่มีประโยชน์มีหน้าที่สำคัญต่อระบบเพาะเลี้ยงโดยทำหน้าที่ย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิต อาหารที่เหลือและของเสียจากการขับถ่าย ควบคุมคุณภาพน้ำและดิน (โดยทำหน้าที่เป็น Bioremediation) ตลอดจนควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่ให้โทษก่อโรคในกุ้ง (Biocontrol) นอกจากนี้แบคทีเรียบางกลุ่มยังมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการเจริญเติบโต และกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคให้กับสัตว์น้ำอีกด้วย(Probiotics) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การเติมแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในระบบการเพาะเลี้ยงได้ (Gatesoupe, 1999)

การควบคุมทางชีวภาพ (Biological control)

Biological control (หรือ biocontrol) คือ การควบคุมจำนวนสิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม โดยใช้สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถแก่งแย่งหรือควบคุมการเพิ่มจำนวน โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นต้องไม่ก่อโรคหรือความเสียหายให้กับสัตว์และแหล่งน้ำ (Meada et al., 1997) จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่า probiotics เป็นส่วนย่อยของ biocontrol ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้มีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกัน คือ สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคได้ แต่แบคทีเรียที่เป็น probiotics ต้องสามารถดำรงชีพอยู่ในลำไส้ของสัตว์น้ำที่เลี้ยงได้ (Gatesoupe, 1999)

แบคทีเรียสายพันธุ์ SK-05 มีคุณสมบัติเจริญได้ดีในบริเวณที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำถูกนำมาใช้ในการควบคุมปริมาณ *V. alginolyticus* ในบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Skeletonome costatum* โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของ *V. alginolyticus* ได้ แต่จากการศึกษาในระดับ in vitro พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. alginolyticus* ที่พบได้ (Rico-Mora et al., 1998) นอกจากแบคทีเรียแล้ว สิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ก็สามารถนำมาใช้เป็น biocontrol ในการควบคุมปริมาณ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในกุ้งได้ เช่น แพลงก์ตอนพืช *Tetraselmis suecica* (Austin and Day, 1990) และ *Skeletonema costatum* (Kitto and Regunathan, 1997)



ภาพที่ 3. ประโยชน์และหน้าที่ของแบคทีเรียที่พบในระบบการเพาะเลี้ยง (Gatesoupe, 1999)

โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก (Probiotics) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกซึ่งมีความหมายว่า "เพื่อชีวิต" (for life; Fuller, 1992) Lilly and Stillwell (1965) ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่าคือ สารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและมีผลกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ส่วน Parker (1974) เป็นบุคคลแรกที่ใช้คำว่าโพรไบโอติกเพื่ออธิบายถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ป้อนสัตว์ โดยให้คำจำกัดความว่า "จุลินทรีย์หรือสสารซึ่งเป็นตัวทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุลย์" Fuller (1989) ให้คำจำกัดความของคำว่าโพรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตเป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์โดยปรับปรุงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสัตว์ให้สมดุลย์ ส่วน Stark and Wilkinson (1989) ให้คำจำกัดความว่า "เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถให้สัตว์กินเพื่อปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและทำให้สุขภาพดี" ส่วน Havenaar and Huis in't Veld (1992) ให้ความหมายว่า "จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือแบบผสม นำไปเสริมให้กับสัตว์และคนแล้วมีผลประโยชน์ต่อสัตว์และคนนั้น ๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น" จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่พบทั่วไป เช่น

Bacillus sp. (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539), *Bifidobacterium* sp., *Clostridium butyricum*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., ยีสต์และจุลินทรีย์ผสม เป็นต้น ความแตกต่างของโพรไบโอติกและยาปฏิชีวนะสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ

โพรไบโอติก	ยาปฏิชีวนะ
<u>คุณสมบัติ</u>	<u>คุณสมบัติ</u>
1. เป็นสิ่งมีชีวิต	1. เป็นสารเคมีบริสุทธิ์
2. ไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร	2. ดูดซึมในทางเดินอาหาร
3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพในการใช้อาหาร	3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพในการใช้อาหาร
4. ไม่ตกค้างในเนื้อเยื่อ	4. หลงเหลือในเนื้อเยื่อ
5. ไม่เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา	5. อาจทำให้เชื้ออื่นเกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา
<u>กลไกการออกฤทธิ์</u>	<u>กลไกการออกฤทธิ์</u>
1. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฉพาะที่	1. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ทั่วร่างกายและออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด
2.เจริญได้ในทางเดินอาหารและแข่งการเจริญกับเชื้อก่อโรคได้	2. ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์, DNA, RNA และโปรตีนของแบคทีเรีย

ที่มา : ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ (2539)

หลักการทำงานของโพรไบโอติกเป็นดังนี้ (Fuller, 1989)

1. ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดย
   - 1.1 สร้างสารต่อต้านจุลชีพ
   - 1.2 แย่งอาหารกับจุลินทรีย์อื่น
   - 1.3 แย่งพื้นที่ในผนังทางเดินอาหาร

2. เปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร

2.1 เพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น β-galactosidase ที่ช่วยบรรเทาภาวะที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในระบบทางเดินอาหารได้

2.2 ลดประสิทธิภาพของเอนไซม์บางชนิด เช่น β-glucuronidase, nitroreductase และ azooreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดมะเร็ง โดยปล่อยสารก่อมะเร็งในทางเดินอาหาร

3. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

3.1 เพิ่มระดับแอนติ้บอดี (antibody)

3.2 เพิ่มประสิทธิภาพของแมคโครฟาจ (macrophage)

คุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดีต่อสัตว์น้ำ (Fuller, 1989; Havenenaar, และ Huis in't Veld, 1992) ควรเป็นมีดังนี้

1. ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำที่เลี้ยง
2. สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้
3. มีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในลำไส้และสร้างตัวเองให้โดดเด่นเพื่อยึดผนังลำไส้เป็นการป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค
4. ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น สภาพกรดและปริมาณสารอาหารน้อยหรือมีความทนทานต่อสารพิษ
5. มีความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วงกว้าง 20-60 องศาเซลเซียส
6. มีความสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งได้พอสมควร
7. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้
8. มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตและสร้างความต้านทานโรคให้กับสัตว์น้ำได้
9. สามารถทนต่อสภาพการเก็บรักษาก่อนมีการใช้งานและมีจำนวนเซลล์ที่ออกฤทธิ์คงที่ เช่น ทนต่อสภาพแห้งแล้งในรูปผง

ขั้นตอนในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Verschuere et al., 2000)

หลักการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำสามารถทำได้ตามภาพที่ 4 ดังนี้

1. การศึกษาเอกสาร ศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่สนใจ โดยสำรวจจากเอกสารงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ และต้องทราบถึงแหล่งที่พบของแบคทีเรียชนิดนั้นด้วย เนื่องจากการนำแบคทีเรียจากแหล่งที่เพาะเลี้ยงหรือจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกับการนำไปใช้จะให้ประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียที่นำมาจากต่างถิ่น เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการปรับตัวให้ต่อสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว

2. การทดลองเพื่อคัดเลือกเบื้องต้น โดยทำการศึกษา

2.1 in vitro antagonism test เป็นการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหรือการผลิตสารบางชนิดเพื่อการยับยั้งโดยทำการทดสอบได้ทั้งในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวและแบบแข็ง เช่น Sugita et al. (1996) ทำการศึกษาโดยวิธี Double-Layer Method พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้โดยทำการแยกจากปลา ปูทรายและน้ำทะเล แบคทีเรียที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยนำอาหารเลี้ยงที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NM14 มากรองแล้วนำไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pasteurella piscicida* K-111 และ *V. vulnificus* ได้ดี แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้นอกจากมีความสามารถผลิตสารต้านจุลชีพบางชนิดได้แล้วยังอาจเกิดจากความสามารถสูงกว่าในการแย่งสารอาหารกับแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้อาจเกิดจากสาร Primary metabolite หรือการเปลี่ยนแปลง pH ก็ได้

2.2 การยึดเกาะผนังลำไส้ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะผนังลำไส้หรือสามารถแย่งพื้นที่ส่วนใหญ่ในลำไส้หรือยึดเกาะพื้นที่ผิวของเจ้าบ้านจากแบคทีเรียก่อโรคได้จะมีคุณสมบัติที่ดีอีกประการของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก

3. ศึกษาความเป็นพิษกับสัตว์น้ำ ก่อนการนำแบคทีเรียที่สนใจไปใช้กับสัตว์น้ำต้องทำการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าแบคทีเรียที่นำมาใช้ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้สัตว์น้ำตายทั้งในภาวะปกติและภาวะเครียด ทำได้โดยการฉีดหรือแช่หรือเติมแบคทีเรียที่สนใจลงไปในระบบการเพาะเลี้ยง เช่น Riquelme et al. (2001) ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ Inhibitor-producing bacteria (IPB) มาใช้ในการเพาะเลี้ยงลูกหอย *Argopecten purpuratus* ในแบบอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่ง IPB ที่ใช้ประกอบด้วย *Vibrio* sp. C33, *Pseudomonas* sp. 11 และ *Bacillus* sp. (strain B2) ผลการศึกษาพบว่าการใช้ IPB และกลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะให้ผลไม่แตกต่างกันทั้งในด้านอัตรารอดและการเติบโตของลูกหอย โดยตลอดการทดลองลูกหอยแต่ละกลุ่มมีอัตรารอดรวมเท่ากับ 51,492,000 และ 42,264,000 ตัว ตามลำดับ ดังนั้น การนำแบคทีเรียกลุ่มนี้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยง *A. purpuratus* ในเชิงพาณิชย์จึงมีความเป็นไปได้สูง

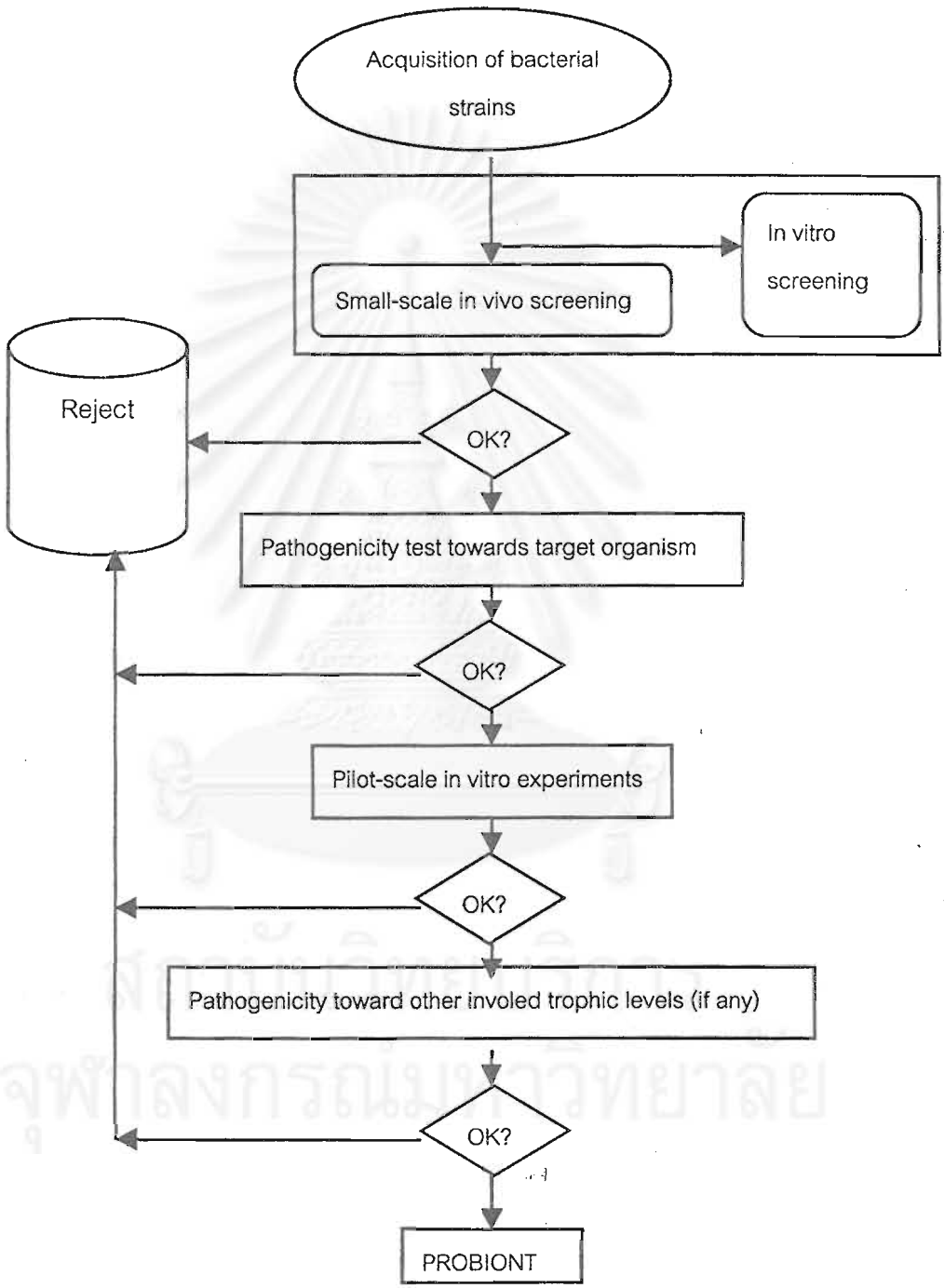
4. ศึกษารูปแบบการนำไปใช้และผลกระทบ ศึกษาโดยนำแบคทีเรียเป้าหมายไปใช้จริงกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระดับ in vivo และศึกษาผลต่อการเจริญและ/หรืออัตรารอดของสัตว์น้ำและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียก่อโรค

4.1 รูปแบบในการนำไปใช้ การนำแบคทีเรียไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมต้องศึกษารูปแบบของแบคทีเรียที่จะนำไปใช้ว่าควรให้กับสัตว์น้ำในรูปแบบใด เช่น การผสมในอาหาร เติมในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงหรือให้กับอาหารที่มีชีวิตพวกอาร์ทีเมีย โรติเฟอร์กินก่อนแล้วจึงนำไปให้กับสัตว์น้ำ .

4.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดโรค เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคของสัตว์น้ำที่รับแบคทีเรียที่สนใจแล้ว โดยนำสัตว์น้ำมาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งอาจเหนี่ยวนำด้วยวิธีการแช่ในเชื้อก่อโรคหรือโดยการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อหรือให้ทางอ้อมกับอาหารที่มีชีวิต

5. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตแบคทีเรียที่สนใจในเชิงอุตสาหกรรมทั้งในด้านเทคโนโลยีในการผลิต ต้นทุน และข้อกฎหมาย

6. การพัฒนาเครื่องมือในการตรวจวัดและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเมื่อมีการพัฒนาไปใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่การควบคุมคุณภาพสินค้าให้อยู่ในระดับมาตรฐานเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง



ภาพที่ 4. ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติก (Verschuere et al., 2000)

การใช้แบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำรวมทั้งการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างผิดวิธี และการใช้สารเคมีอย่างเกินความจำเป็น ทำให้แนวทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการควบคุมการเกิดโรคในสัตว์น้ำเปลี่ยนแปลงไป ด้วยความรู้พื้นฐานที่ว่าในระบบนิเวศตามธรรมชาติมีแบคทีเรียที่ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์และควบคุมสมดุลย์ของระบบสสารในน้ำและดินแต่ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ตายไปด้วย ดังนั้น เมื่อเกิดสภาวะเสียสมดุลย์ของสิ่งแวดล้อม เช่น การตกค้างของอาหารหรือซากสัตว์ที่ตายก็ทำให้เกิดการเน่าเสียของน้ำและดินได้ง่ายและส่งผลไปยังสัตว์ที่เลี้ยง

ในปัจจุบันการเติมแบคทีเรียเพื่อควบคุมแบคทีเรียและรักษาสมดุลย์ในธรรมชาติจึงเป็นแนวทางใหม่ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปลอดยาปฏิชีวนะและสารเคมี แบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบการเพาะเลี้ยงอาจประกอบด้วยแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิด (ตารางที่ 2) ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่จำหน่ายในท้องตลาดประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. และแบคทีเรีย Nitrifying ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยที่แบคทีเรีย Nitrifying ประกอบด้วยแบคทีเรีย Nitrozomonas และ Nitrobacter ซึ่งไม่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ บทบาทของแบคทีเรีย Nitrifying ที่สำคัญ คือ เปลี่ยนแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำให้เป็นไนเตรตซึ่งไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่จะถูกใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ แบคทีเรีย *Bacillus* S11 ซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่จับได้จากธรรมชาติถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกใน 3 รูปแบบ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมหลังจากทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* D331 ให้อัตรารอดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ พบว่า กุ้งในกลุ่มทดลองทั้ง 3 รูปแบบและกลุ่มควบคุมมีอัตรารอด 100 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Rengpipat et al., 1998) นอกจากนี้ยังพบว่า *Bacillus* S11 มีความสามารถในการเพิ่มหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งให้ต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* ได้ด้วย (Rengpipat et al., 2000) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียมาใช้สร้างภูมิคุ้มกันโรคและเพิ่มอัตรารอดให้กับกุ้งกุลาดำ

ตารางที่ 2. แบคทีเรียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

แบคทีเรียโพรไบโอติก	แหล่งที่พบ	สัตว์ที่นำไปใช้	วิธีการใช้	แบคทีเรียที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค	กลไกในการออกฤทธิ์	รายการอ้างอิง
ไม่ได้จำแนก	ไข่จากปลาคอดและปลา halibut	ไข่ของปลาคอด	แช่ในสารละลายเชื้อ		antagonism	Hansen and Olafsen,1989
V. salmonicida และ *L. plantarum*	ปลา	ปลาฮาลิบัทวัยอ่อน	เติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง		กระตุ้นภูมิคุ้มกัน	Olafsen,1998
Bacillus สายพันธุ์ IP5832		ปลาเทอบอดวัยอ่อน	ให้โรติเฟอร์ผ่านอาหารมีชีวิต	Vibrionaceae	antagonism และ/หรือเพิ่มคุณค่าทางอาหารของโรติเฟอร์	Gatesoup, 1991
Streptococcus lactis และ *L. bulgaricus*		ปลาเทอบอดวัยอ่อน	เพิ่มให้โรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย			Garcia de la Banda et al., 1992
Lactobacillus หรือ *Carnobacterium*	โรติเฟอร์ (*Brachionus plicatilis*)	ปลาเทอบอด	เพิ่มให้โรติเฟอร์	*Vibrio* sp.		Gatesoup, 1994
Vibrio pelagius	โคพีพอด	ปลาเทอบอดวัยอ่อน	เติมในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง	*A. caviae*		Ringo and Vadstein, 1998
*V. alginolyticus*สายพันธุ์ E	ปลาเทอบอดวัยอ่อน	ปลาเทอบอดวัยอ่อน	เพิ่มให้โรติเฟอร์	*Vibrio* สายพันธุ์ P	แย่งเหล็กที่ละลายอยู่ในน้ำ	Gatesoup, 1997

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. (ต่อ)

แบคทีเรียโพรไบโอติก	แหล่งที่พบ	สัตว์ที่นำไปใช้	วิธีการใช้	แบคทีเรียที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค	กลไกในการออกฤทธิ์	รายการอ้างอิง
Carnobacterium divergens	ลำไส้ของปลาแซลมอน	ปลาแซลมอน	เติมในอาหาร	*A. salmonicida*		Gilberg et al., 1995
Carnobacterium divergens	ลำไส้ของปลาแซลมอน	ปลาคอด	เติมในอาหาร	*V. anguillarum*		Gilberg et al., 1997
Carnobacterium divergens	ลำไส้ของปลาแซลมอน		เติมในอาหาร		antagonism	Gilberg and Mikkelsen, 1998
Carnobacterium สายพันธุ์ K1	ลำไส้ของปลาแซลมอน				antagonism	Joborn et al.,1997
Carnobacterium	ลำไส้ของปลาแซลมอน				antagonism	Olsson et al., 1998
Fluorescent pseudomonad F19/3	เมือกของปลา	ปลาแซลมอน	แช่ในสารละลายเชื้อ	*A. salmonicida*	แย่งเหล็กในน้ำ	Smith and Davey, 1993
Pseudomonas fluorescens AH2		rainbow trout	เติมในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงและ/หรือแช่ในสารละลายเชื้อ	V. anguillarum		Gram et al., 1999
V. alginolyticus	โรงเพาะฟักกุ้งวัยอ่อน	ปลาแซลมอน		*A. salmonicida*, *V. anguillarum*		Austin et al., 1995

ตารางที่ 2. (ต่อ)

แบคทีเรียโพรไบโอติก	แหล่งที่พบ	สัตว์ที่นำไปใช้	วิธีการใช้	แบคทีเรียที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค	กลไกในการออกฤทธิ์	รายการอ้างอิง
Bacillus megaterium, B. polymyxa, B.		cat fish	เติมในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง			Queiroz and Boyd, 1998
Tetraselmis suecica		ปลาแซลมอน	เติมในอาหาร		antagonism	Austin et al., 1992
Bacillus สายพันธุ์S11	กุ้งกุลาดำ	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	*V. harveyi* D331	antagonism	Rengpipat et al., 1998
V. alginolyticus	น้ำทะเล	*L. vannamei*	เติมในน้ำที่ใช้เลี้ยง		antagonism	Garriques and Arevalo, 1995
Bacillus		กุ้งสกุล Penied	เติมในน้ำที่ใช้เลี้ยง		antagonism	Moriarty, 1998; Moriarty and Budy, 1995
แบคทีเรียสายพันธุ์ PM4 และ/หรือ NS-110	ดิน	กุ้งกุลาดำและปู P. trituberculatus	เติมในน้ำที่ใช้เลี้ยง		antagonism หรือแหล่งอาหารให้กับตัวอ่อน	Meada, 1994; Meada and Liao, 1994; Nogami and Maeda, 1992
แบคทีเรียสายพันธุ์ BY-9	น้ำทะเลชายฝั่ง	กุ้งกุลาดำ	เติมในน้ำที่ใช้เลี้ยง			บทคัดย่อของ Sugama and Tsumaru

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. (ต่อ)

แบคทีเรียโพรไบโอติก	แหล่งที่พบ	สัตว์ที่นำไปใช้	วิธีการใช้	แบคทีเรียที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค	กลไกในการออกฤทธิ์	รายการอ้างอิง
Alteromonas sp.	กุ้ง *Palaemon macrodactylus*	กุ้ง *Palaemon macrodactylus*		*Leenidium callinestes*		Gil-Turnes et al., 1989
Alteromonas-like	โรงเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ			*Vibrio* spp.		Tanasomwang et al., 1998
Vibrio สายพันธุ์ 11	สาหร่ายขนาดเล็ก	หอยเซลล์วัยอ่อน	แช่ในสารละลายแบคทีเรีย	V. anguillarum	antagonism	Riquelme et al., 1997
Aeromonas media สายพันธุ์ A199		หอยนางรม	เติมในน้ำที่ใช้เลี้ยง	*V. tubiashii*	antagonism	Gibson et al., 1998

ที่มา: Verschuere et al. (2000)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์น้ำวัยอ่อนและแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยง

สัตว์น้ำตัวอ่อนจะถูกปล่อยออกสู่แหล่งน้ำที่อยู่อาศัยตั้งแต่ระยะไข่แล้วจึงพัฒนาสู่ระยะตัวเต็มวัย ดังนั้น การดำรงชีพของตัวอ่อนของสัตว์น้ำจึงขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมของแหล่งน้ำที่อยู่อาศัย เนื่องด้วยพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนบางชนิดที่เป็นแบบกรองกินซึ่งบางชนิดไม่สามารถเลือกอาหารที่จะเข้ามาได้ ดังนั้น แบคทีเรียที่พบในลำไส้ของสัตว์น้ำวัยอ่อนจึงเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกับที่พบในแหล่งน้ำซึ่งบางชนิดเป็นสาเหตุของการเกิดโรค นอกจากนี้สัตว์น้ำวัยอ่อนมีระบบภูมิคุ้มกันที่ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้น การป้องกันตัวเองจากแบคทีเรียก่อโรคจึงเป็นไปได้ยากขึ้น การใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์หรือโพรไบโอติกในสัตว์น้ำวัยอ่อนย่อมมีความจำเป็นสูงเพราะนอกจากจะไปควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคแล้วบางชนิดยังสามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สัตว์น้ำมีความต้านทานต่อโรคได้

Vibrio spp. และ *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในสัตว์น้ำกลุ่ม Crustacean (Moriarty, 1990) ปลาทะเล (Sakata, 1990) และหอยสองฝา (Prieur et al., 1990) ส่วน *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp. และ *Enterobacteriaceae* พบได้ทั่วไปในปลาน้ำจืด (Sakata, 1990) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่ผ่านมาชั่วคราวซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่พบในน้ำ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม แบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำนอกจากได้รับจากสิ่งแวดล้อมแล้ว สัตว์น้ำบางชนิดยังได้รับจากอาหารและดินตะกอนบริเวณนั้นด้วย เช่น พวกที่เป็นพวกกรองกิน (หอยสองฝา ตัวอ่อนกุ้งและอาหารที่มีชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน Artemia) การใช้แบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพบแพร่หลายทั้งในปลา ปู หอยสองฝาและกุ้ง ดังนี้

ปลา (fish)

ในระบบทางเดินอาหารของปลามีจุลินทรีย์อยู่ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณแบคทีเรียที่พบในน้ำที่ปลาอยู่อาศัย (Ringo et al., 1995) เมื่อปลาฟักออกจากไข่จะถูกแบคทีเรีย (*Pseudomonas, Cytophage* และ *Flexibacter*) ที่พบได้จากบริเวณผิวนอกของเปลือกไข่เข้าไปยึดพื้นที่ในลำไส้ของลูกปลาวัยอ่อน (Hansen and Olafsen, 1989; 1999) แบคทีเรียเหล่านี้จะยึดครองพื้นที่จนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ดังนั้น การเติมโพรไบโอติกตั้งแต่ระยะที่

ปลายังอยู่ในไข่จะช่วยลดการติดเชื้อเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ยังทำให้โพรไบโอติกสามารถเข้ายึดครองพื้นที่ได้ก่อนด้วย

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้โพรไบโอติกโดยพัฒนาจากการศึกษาในหลอดทดลองจนนำไปสู่การนำไปใช้จริงกับสัตว์น้ำ พบว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ AH2 มีคุณสมบัติสามารถยังยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *V. anguillarum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในปลา rainbow trout (*Oncorynchus mykiss* Walbaum) โดยใส่เชื้อในความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำไปเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. anguillarum* ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^4-10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยในขณะที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคนั้นจะให้ *P. fluorescens* สายพันธุ์ AH2 ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านไป 7 วัน กลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมมีอัตรารอดเท่ากับ 75 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Gram et al., 1999)

แบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในปลา *Carnobacterium* sp. ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของปลาแซลมอน ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกกับปลาแซลมอน (*Salmo salar* L.) และปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) โดยผสมในอาหาร พบว่า เมื่อปลาได้รับแบคทีเรียดังกล่าวแล้ว สามารถลดการเกิดโรคจากแบคทีเรีย *A. salmonicida, V. ordalii,* และ *Yersinia ruckeri* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคจาก *V. anguillarum* (Robertson et al., 2000) ส่วนแบคทีเรีย *C. divergens* ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของปลาคอด (*Gadus morhua*) เมื่อนำมาใช้กับปลาคอด พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเพิ่มระดับความต้านทานโรคต่อเชื้อ *V. anguillarum* ได้ (Gildberg et al., 1997)

หอยสองฝา (bivalve mollusks)

การศึกษาแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงหอยส่วนใหญ่มักมุ่งเน้นคุณภาพของสารอาหารที่ได้รับจากแบคทีเรีย มากกว่าการควบคุมการเกิดโรค (Douillet and Langdon, 1993 และ Douillet and Langdon, 1994) แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการก่อโรคในหอยนางรม (Elston et al., 1981) และหอยเชลล์อีก 2 ชนิด คือ *Pecten maximas* (Nicolas et al., 1996) และ *A. purpuratus* (Riquelme et al., 1996, 1997)

แบคทีเรีย *Aeromonas media* สายพันธุ์ A199 มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *V. tubiashii* ในหอย *Crassostrea gigas* ได้ พบว่า A199 สามารถควบคุมการติดเชื้อก่อโรคในบ่อเพาะเลี้ยงหอยได้ (Gibson et al., 1998) ส่วนแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงลูกหอยนางรมวัยอ่อน (*C. gigas*) โดยให้ในปริมาณความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร พร้อมกับสาหร่ายขนาดเล็ก พบว่า อัตรารอดและการเจริญเติบโตของลูกหอยเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งให้สาหร่ายเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ *A. haloplankis* ซึ่งแยกได้จากรังไข่ของหอย Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดจาก *V. ordalii, V. parahaemolyticus, V. anguillarum, V. alginolyticus* และ *Aeromonas hydropilla* (Riquelme et al., 1996, 1997)

ปู (crab)

Nagomi and Meada (1992) ได้ทำการแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ PM-4 จากน้ำทะเลซึ่งทราบภายหลังว่าเป็น *Thalassobacter utilis* และเติมแบคทีเรียชนิดนี้ลงในถังที่ใช้เลี้ยงปู *Portunus trituberculatus* ในความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า ในถังที่มีการเติมแบคทีเรียและถังควบคุมให้อัตรารอดของลูกปูเท่ากับ 27.2 และ 6.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า PM-4 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *V. anguillarum Vibrio* sp. ชนิดต่าง ๆ และแบคทีเรียที่สร้างรงควัตถุที่พบในบ่อเลี้ยงรวมทั้งรา *Haliphthoros* sp. ด้วย

กุ้ง (shrimp)

แม้ว่าจะมีการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำมีการใช้อย่างแพร่หลายแต่เริ่มมีการใช้ในกุ้งเมื่อไม่นานมานี้ โดยในระยะแรกเป็นการทำเพื่อเพิ่มผลผลิตของกุ้งโดยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* กลุ่มที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ โดยเติมน้ำตาลลงไปในระบบการเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นการเจริญของ *Vibrio* กลุ่มดังกล่าว (Garriques and Wyban, 1993) ซึ่งต่อมาก็ได้มีการนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กและเติมลงในระบบการเพาะเลี้ยง (Daniels, 1993) ซึ่งการใช้โพรไบโอติกในประเทศ Equador ได้ผลดีและช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะได้ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (Giffith, 1995)

แบคทีเรียในสกุล Vibrio ส่วนใหญ่มักเป็นตัวก่อโรค Vibriosis แต่สำหรับ *V. alginolyticus* ส่วนใหญ่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำ *V. alginolyticus* ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลมาใช้ในการเลี้ยงลูกกุ้ง *Litopenaeus vannamei* ระยะโพสลาวี่ พบว่า ลูกกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตรารอดและน้ำหนักเปียกสูงกว่ากลุ่มควบคุมและบ่อที่ใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytetracyclin ในการควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยในบ่อที่ใช้แบคทีเรียไม่พบ *V. parahaemolyticus* แต่กลับพบแบคทีเรียชนิดนี้ในบ่อควบคุมและบ่อที่ใช้ยา (Garriques and Arevalo, 1995) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่า *V. alginolyticus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ เช่น พบ *V. alginolyticus* ในโรติเฟอร์ที่มีสุขภาพดีและมีความสำคัญต่ออัตรารอดของลูกปลาวัยอ่อนด้วย (Austin et al., 1995; Gatesoupe, 1990)

นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ก็ยังสามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งได้ เมื่อใช้แบคทีเรียผสมระหว่าง *Lactobacillus* และแบคทีเรียสายพันธุ์ L-P ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของไก่โดยนำไปผสมอาหารกุ้งให้เป็นเวลา 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียดังกล่าวมีการเจริญและอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมและเมื่อนำเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* D331 เป็นเวลา 10 วัน พบว่า กุ้งในกลุ่มควบคุมตาย 74 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบการตายของกุ้งในกลุ่มทดลอง (Phianphak et al., 1999) นอกจากนี้ แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นอีกชนิดที่ได้รับความสนใจ เช่น การเลี้ยงกุ้งที่ประเทศอินโดนีเซีย พบว่า กุ้งในบ่อที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp ในปริมาณ 10^4 -10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถเลี้ยงกุ้งจนครบ 160 วัน โดยไม่พบปัญหาการติดโรค Vibriosis ส่วนบ่อที่ไม่ได้รับแบคทีเรียเลี้ยงกุ้งได้เพียง 80 วัน เท่านั้น (Moriarty, 1998)

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Alteromonas* sp.

Alteromonas sp. เป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกับ *Alcaligenas, Flavobacterium, Halomonas, Marinobacter, Marinomonas, Pseudomonas* และ *Vibrio* พบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ทั้งในดิน น้ำทะเล สัตว์ พืช และมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าบางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างสารประกอบ bioactive ได้ด้วย

Alteromonas sp. เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobic bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งขนาดประมาณ 0.7-1.5 ไมครอน สามารถเคลื่อนที่ได้ มี flagella ที่บริเวณขั้วเซลล์ พบได้ทั้งบริเวณชายฝั่งและทะเลเปิด อาศัยร่วมกับสิ่งมี

ชีวิตในทะเลทั่วไป (symbiosis) พบทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ *A. aurantia*, *A. citrea*, *A. colwelliana*, *A. denitrificans*, *A. espejiana*, *A. haloplanktis*, *A. hanedai*, *A. luteovolacea*, *A. macleodii*, *A. nigrifaciens*, *A. rubra* และ *A. undina* เกือบทุกชนิดมีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลชีพชนิดอื่น ๆ ได้ (Holt et al., 1994)

ลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. S9730

Alteromonas sp. S9730 แยกได้จาก hydriod ชนิดหนึ่งบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบ cylindrical rod ขนาด 0.5-0.8 x 1.8-2.5 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้มีแฟลกเจลลา 1 เส้น โคโลนีมีลักษณะกลมเรียบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมารีน ให้รงควัตถุสีส้มอมเหลือง ลักษณะทางชีวเคมีของ *Alteromonas* sp. S9730 แสดงในตารางที่ 3 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมีของ*Alteromonas* sp. S9730 และสกัดขั้นไดคลอโรมีเทนจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เมื่อนำสิ่งสกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีทำให้แยกสาร isatin ได้ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีค่า Minimum Inhibiting Concentration (MIC) เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและมีฤทธิ์ต้าน *Vibrio* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งมีค่า MIC เท่ากับ 31.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Thongton, 1998)

Gil-Turnes et al. (1989) แยก *Alteromonas* sp. จากบริเวณผิว embryo ของกุ้ง *Palaemon macrodactylus* พบว่าแบคทีเรียนี้สามารถผลิตสาร 2,3-indoline dione (isatin) ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยยับยั้งการติดเชื้อรา Legenidium callinectes ซึ่งพบได้ทั่วไปในพวก crustacean ทำการศึกษาโดยใช้ Penicillin ฆ่าเชื้อบริเวณผิว embryo หลังจากนั้นแบ่ง embryo ที่ได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกไม่ใส่สารใด ๆ กลุ่มที่ 2 ใส่สาร isatin ที่สกัดได้ กลุ่มที่ 3 ใส่แบคทีเรีย *Alteromonas* sp. กลับไปเหมือนเดิม การทดลองนี้มีกลุ่มควบคุมเป็น embryo ที่ได้ตามปกติ จากผลการทดลองพบว่า embryo ในกลุ่มที่ 1 มีอัตรารอดต่ำที่สุดโดยชุดการทดลองอื่น ๆ และชุดควบคุมให้ผลไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 3. ลักษณะทางชีวเคมีของ *Alteromonas* sp. S9730

ลักษณะ	S9730	ลักษณะ	S9730
รูปร่างของเซลล์	แท่งตรง	การสร้างกรดจาก : D-glucose	-
ขนาดเซลล์ (ไมครอน)	0.5-08X1.8-2.5	D-mannose	W
flagella	+	D-galactose	-
ย้อมแกรม	-	D-fructose	-
รงควัตถุ	+	Sucrose	+
Aerobiosis	+	Maltose	W
การเจริญที่ : 4 องศาเซลเซียส	-	Cellobiose	W
35 องศาเซลเซียส	+	Melibiose	+
40 องศาเซลเซียส	-	Lactose	-
การเจริญที่ : 0.1%NaCl	+	Salicin	+
0.2%NaCl	+	D-manitol	W
0.5%NaCl	+	L-arginine	-
1.0%NaCl	+	Glycerol	+
2.0%NaCl	+	การใช้น้ำตาล : D-glucose	+
5.0%NaCl	+	D-mannose	W
10.0%NaCl	-	D-galactose	-
การเจริญที่ pH : 6	+	D-fructose	W
7	+	Sucrose	-
8	+	Maltose	+
9	+	Cellobiose	-
reduction of nitrate	-	Melibiose	-
Hydrolysis of arginine	+	Lactose	-
Catalase	+	Salicin	-
Production of : amylase	+	Sorbitol	-
chitinase	-	D-manitol	-
gelatinase	+	L-arginine	W
		Glycerol	-

+, positive reaction; W, weak reaction; -, negative reaction (Thongton, 1998)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ *in vitro* experiment และ *in vivo* experiment ดังนี้

in vitro experiment ประกอบด้วยการทดลองดังนี้

1. ศึกษาการเจริญของ *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเหลวมารีน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ อาหารเหลวมารีนความเข้มข้นปกติ อาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันก็ศึกษาช่วงเวลาที่ *Alteromonas* sp. S9730 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Disc diffusion method

2. ศึกษาความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมปริมาณ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเล

3. ศึกษาความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในสกุล *Vibrio* สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ *V. harveyi* 1526, *V. harveyi* (สงขลา), *V. harveyi* 046 (ตรัง), *V. harveyi* (MBRU), *V. harveyi* (WN3), *V. harveyi* (CU/KU), *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* 94/4 และ *V. parahaemolyticus* (string) โดยวิธี Double-Layer Method

in vivo experiment ประกอบด้วยการทดลองดังนี้

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของ *V. harveyi* 1526 ที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 2-6 มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในลูกกุ้งกุลาดำ

2. ศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนเพื่อเพิ่มอัตรารอดโดยกำหนดความเข้มข้นเท่ากับ 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3. ศึกษาอัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่อนุบาลด้วย *Alteromonas* sp. S9730 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 โดยแบ่งระยะของลูกกุ้งที่ใช้ในการทดลองเป็น 3 ระยะคือ ซูเอีย ไมซิส และโพสลาวี่

สถานที่ทำการทดลอง

หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมเชื้อสำหรับ *in vitro* experiment ทำโดยเลี้ยง *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้นที่ต้องการตามระยะเวลาที่ได้จากกราฟการเจริญ ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ละลายในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวกที่ 1 เพื่อคำนวณหาปริมาณเชื้อ ส่วน *V. harveyi* 1526 เลี้ยงในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้นปกติเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นแยกเซลล์และหาปริมาณเชื้อเช่นเดียวกันแต่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

สัตว์ทดลอง

นำลูกกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* วัยอ่อนระยะ nauplius 5-6, zoea 3 และ post larvae I จากฟาร์มเอกชนใน จ. ฉะเชิงเทรา นำมาปรับสภาพให้เข้ากับการทดลองในน้ำความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ให้อากาศตลอดเวลา

การดูแลและให้อาหาร

ลูกกุ้งกุลาดำแต่ละระยะจะมีการพัฒนาระยางค์แตกต่างกันไป ดังนั้นพฤติกรรมในการกินอาหารของลูกกุ้งจึงเปลี่ยนแปลงไปตามอายุด้วย โดยลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอียจะกินแพลงก์ตอนพืชซึ่งชนิดที่เลือกใช้ในการทดลองนี้คือ *Chaetoceros* sp. ซึ่งเป็นไดอะตอมที่เกษตรกรทั่วไปนิยมใช้และผสมอาร์ทีเมียที่ทำให้ตายด้วยน้ำอุ่นร่วมกับไดอะตอมในระยะหลังได้ ส่วนลูกกุ้งระยะไมซิสและโพสลาวี่นั้นจะมีการพัฒนาของระยางค์ต่าง ๆ ให้สามารถจับแพลงก์ตอนสัตว์ซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นมากินได้ ดังนั้นอาหารที่ให้จึงเป็นอาร์ทีเมียที่เพาะใหม่ทุกวัน การให้อาหารลูกกุ้งในแต่ละระยะต้องใช้การสังเกตจากพฤติกรรมการกินอาหาร ดูจากสีของน้ำ ปริมาณมูล และปริมาณอาหารที่

เหลือ โดยต้องให้อาหารตลอดเวลา ถ้าลูกกุ้งขาดอาหารลูกกุ้งจะหยุดพฤติกรรมการกินอาหารและตายในที่สุด เนื่องจากการทดลองในลูกกุ้งระยะโพสลาวี่จะใช้เวลานาน จึงต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาคุณภาพน้ำให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

อาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดลองครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

1. อาหารเหลวมารีน (Marine broth) มีส่วนประกอบดังนี้

เปปโทน (Peptone) (OXOID)	5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) (MERCK)	1	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรต (Ferric citrate)	0.1	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน	1	ลิตร

ชั่งและตวงส่วนประกอบทั้งหมดใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ตามปริมาตรที่ต้องการ ปิดด้วยจุกสำลีและแผ่นอะลูมิเนียมนำไปฆ่าเชื้อในหม้ออบฆ่าเชื้อไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้ ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ นั้นให้นำอาหารเหลวสูตรนี้เจือจางด้วยน้ำทะเลความเค็มเดิมในอัตราส่วน 1:1 และ 1:4 ตามลำดับ ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ สำหรับอาหารแข็งมารีนก็เตรียมด้วยวิธีเดียวกันแต่เพิ่มวุ้นผง (Pronadisa) ในปริมาณ 18 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว รอให้อาหารแข็งตัวและหน้าวุ้นแห้งพอสมควรจึงนำไปใช้ได้

2. อาหารเหลวทริปโตนซอย (Tryptone soya broth) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากบริษัท OXOID ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Pancreatic digest of casein	17	กรัม
Papaic digest of soybean meal	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Di-basic Potassium phosphate	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

ชั่งอาหารผง 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 15 กรัม และวุ้นผง 8 กรัม ผสมให้เข้ากัน ค่าความเป็นกรดด่างที่ได้เท่ากับ 7.3±0.2 ทำให้วุ้นผงละลายในไมโครเวฟ หลังจากนั้นนำมาแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้ออบฆ่าเชื้อไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ้าตั้งทิ้งไว้จนแข็ง ก่อนนำไปใช้ให้นำไปหลอมวุ้นให้ละลายในไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เกือบเย็นจึงผสมเชื้อที่ต้องการทดสอบ ไม่ควรให้อุณหภูมิสูงมากเพราะอาจทำให้เชื้อที่ผสมตายได้

3. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS Agar)) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS จากบริษัท Pronadisa มีส่วนประกอบดังนี้

Yeast exteact	5	กรัม
Casein peptone	5	กรัม
Meat peptone	5	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulphate	10	กรัม
Dissect bovin bile	5	กรัม
Sodium cholate	3	กรัม
Sacarose	20	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Iron citrate	1	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Bromothymol blue	0.04	กรัม
Agar	14	กรัม

ชั่งอาหารผง 86 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.6±0.2 หลังจากนั้นนำไปหลอมให้วุ้นละลายในไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว รอให้อาหารแข็งตัวและหน้าวุ้นแห้งพอสมควรจึงนำไปใช้ได้

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ใช้แบคทีเรียดังนี้

Alteromonas sp. S9730 แบคทีเรียน้ำเค็มที่แยกจาก hydroid ชนิดหนึ่ง โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

V. harveyi 1526 เป็นแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำที่มีความรุนแรงสูง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้งเครือเจริญโภคภัณฑ์ ใช้ทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคตลอดการทดลองนี้

V. harveyi (สงขลา) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. กิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หัวหน้าศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

V. harveyi 046 (ตรัง) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อิสริยา ทองงาม สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จ. ตรัง

V. harveyi (MBRU) แยกได้จากกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์ที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงในโรงเพาะเลี้ยง หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

V. harveyi (WN3), *V. harveyi* (CU/KU), *V. alginolyticus*, *V. vulnificus 94/4*, *V. parahaemolyticus* (string) แบคทีเรียเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พิกุล จิรวาณิชไพศาล หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล

แบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองจะเลี้ยงไว้ใน Marine agar slant ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะนำมาทดลองเพื่อใช้เป็นตัวเริ่มต้น (starter) จะเลี้ยง *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเหลวมารีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าให้อากาศตลอดเวลา ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. นั้นจะ

เลี้ยงในอาหารเหลวมารีนเช่นเดียวกันแต่ใช้เวลาเพียง 12 ชั่วโมง โดยจะบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การทดลองส่วนที่ 1 *in vitro* experiment

1. **การเจริญของ** *Alteromonas* sp. S9730 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีน** (Marine Broth) **ความเข้มข้นต่าง ๆ และการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค**

ศึกษาการเจริญของ *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเหลวมารีน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ อาหารเหลวมารีนความเข้มข้นปกติ อาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันก็ศึกษาช่วงเวลาที่ *Alteromonas* sp. S9730 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Disc Diffusion Method

ทำการทดลองโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนตามความเข้มข้นที่ต้องการ หลังจากนั้นเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้แล้วนำไปเขย่าให้อากาศตลอดเวลาที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง นับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Plate Count Technique (drop plate) บนอาหารแข็งมารีนตามช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ข้อมูลที่ได้นำไปสร้างกราฟการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนการหาสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อทำโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเจริญนำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใส 50 ไมโครลิตร หยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำ paper disc ที่ได้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมารีนที่เกลี่ยไว้ด้วย *V. harveyi* 1526 (OD=1) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อชลอการเจริญของ *V. harveyi* 1526 และให้สารใน paper disc แพร่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องอีกประมาณ 6-12 ชั่วโมง วัดขนาด clear zone ที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. **ศึกษาความสามารถของ** *Alteromonas* sp. S9730 **ในการควบคุมปริมาณ** *V. harveyi* 1526 **ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน**

นำ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการศึกษาโดยแบ่งเป็น 7 ชุดการทดลอง ได้แก่

1. ชุดควบคุม *V. harveyi* 1526.

2. ชุดควบคุม *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นปกติ

3. ชุดควบคุม *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

4. ชุดควบคุม *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

5. ชุดที่ผสมระหว่าง *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นปกติและ *V. harveyi* 1526 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 และ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6. ชุดที่ผสมระหว่าง *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ *V. harveyi* 1526 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 และ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7. ชุดที่ผสมระหว่าง *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และ *V. harveyi* 1526 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 และ 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เลี้ยง *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้นต่าง ๆ และ *V. harveyi* 1526 ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้นปกติ หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ละลายในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณเชื้อกับกราฟมาตราฐาน (ภาคผนวก ก) นำเซลล์ที่ได้ใส่ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ซึ่งปลอดเชื้อโดยให้มีปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 และ *V. harveyi* 1526 ตามความเข้มข้นที่ต้องการ สุ่มนับปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 บนอาหารแข็งมารีนและ *V. harveyi* 1526 บนอาหารแข็ง TCBS ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง

3. ศึกษาความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* sp. โดยวิธี Double-Layer Method

ดำเนินการการทดสอบด้วยแบคทีเรีย 9 ชนิด ได้แก่ *V. harveyi* 1526, *V. harveyi* (สงขลา), *V. harveyi* 046 (ตรัง), *V. harveyi* (MBRU), *V. harveyi* (WN3), *V. harveyi* (CU/KU),

V. alginolyticus, *V. vulnificus* 94/4, และ *V. parahaemolyticus* (string) เริ่มเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยเลี้ยง *Alteromonas* sp. S9730 และแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้นปกติ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 9 ชนิด โดยนำเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็งมารีน ขนาดของหยดน้ำที่ได้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร ทิ้งให้หยดน้ำแห้งสนิทจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

นำจานเพาะเชื้อที่ได้มาฆ่าเชื้อเพื่อหยุดการเจริญด้วยคลอโรฟอร์ม โดยคว่ำจานเพาะเชื้อใส่คลอโรฟอร์มไว้ในฝาจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จึงนำฝาจานเพาะเชื้อใหม่ที่ปลอดเชื้อมาเปลี่ยน นำจานเพาะเชื้อที่ได้เทราดทับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปโตนซอย (เติมโซเดียมครอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมีวุ้นผงอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งผสมแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. แต่ละชนิด (OD=0.1) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดลองส่วนที่ 2 *in vivo* experiment

นำผลการทดลองที่ได้จาก *in vivo* experiment เลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมมาเลี้ยง *Alteromonas* sp. S9730 เพื่อนำไปแช่กุ้ง

1. ระดับความเข้มข้นของ *V. harveyi* 1526 ที่ทำให้กุ้งมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})

การทดลองนี้ต้องการหาความเข้มข้นของเชื้อ *V. harveyi* 1526 ที่เหมาะสมซึ่งมีความรุนแรงไม่มากหรือน้อยเกินไป เพื่อนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในขั้นตอนสุดท้ายของการทดลอง โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ *V. harveyi* 1526 ชุดทดลองความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการนับแบ่งลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 2 จำนวน 100 ตัว ใส่ขวดทดลองขนาด 700 มิลลิลิตร ที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน อยู่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่เชื้อ *V. harveyi* 1526 ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ (เพียงครั้งเดียวเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) ทำการนับจำนวนกุ้งที่มีชีวิตทุกวันจนครบ 4 วัน นำข้อมูลที่ได้เข้าโปรแกรม Probit Analysis เพื่อหาค่า LC_{50}

2. **ศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสลาวี่ 5-15**

การทดลองแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดที่ใส่เชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ โดยในชุดการทดลองที่ใส่เชื้อนั้นจะใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

นับลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5 จำนวน 100 ตัว ใส่ขวดทดลองขนาด 700 มิลลิลิตร ที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่เชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ตามความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ โดยทำการเติมเชื้อใหม่ทุกวันเพื่อคงปริมาณเชื้อให้คงที่ตลอดการทดลอง ทำการนับกุ้งที่มีชีวิตทุก 3 วัน จนลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวี่ 15 และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกวัน

3. **อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย ไมซิสและโพสลาวี่เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526**

นำค่าความเข้มข้นของเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เหมาะสมมาใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 (จากค่า LC_{50}) โดยการทดลองนี้แบ่งลูกกุ้งกุลาดำเป็น 3 ระยะ คือ ซูเอีย ไมซิสและโพสลาวี่ ในแต่ละชุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ โดยในระยะซูเอีย 1 จะแช่เชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 จนลูกกุ้งเข้าสู่ระยะไมซิส 1 แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ส่วนในลูกกุ้งระยะไมซิส 1 จะแช่เชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 จนลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวี่ 1 จึงเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ส่วนในลูกกุ้งระยะโพสลาวี่ 1 จะแช่เชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 จนลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาวี่ 15 หลังจากนั้นจึงทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 โดยนับอัตรารอดตลอดการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

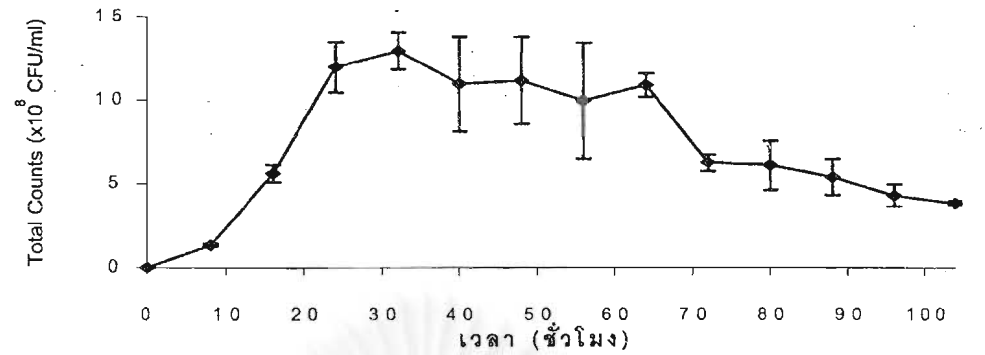
การทดลองส่วนที่ 1 *in vitro* Experiment

1. **การเจริญของ** *Alteromonas* sp. S9730 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีน** (Marine Broth) **ความเข้มข้นต่าง ๆ และการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค**

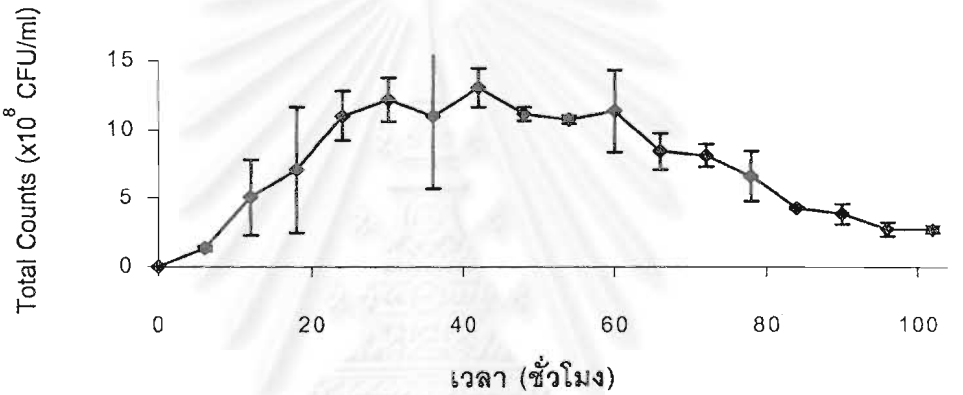
Alteromonas sp. S9730 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวมารีนทั้ง 3 ความเข้มข้น โดย *Alteromonas* sp. S9730 เจริญอย่างช้า ๆ ในช่วงแรก (lag phase) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 0-8 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) จนเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24-25 จึงเข้าสู่ระยะ stationary phase ทั้งนี้ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5ก และ 5ข) จะใช้เวลาอยู่ในช่วงนี้จนถึงชั่วโมงที่ 60-65 จึงลดจำนวนลง (death phase) แต่ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 30 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 5ค)

2. **การสร้างสารยับยั้ง** *V. harveyi* 1526 **โดย** *Alteromonas* sp. S9730 **ในอาหารเหลวมารีนโดยวิธี** Disc Diffusion Method

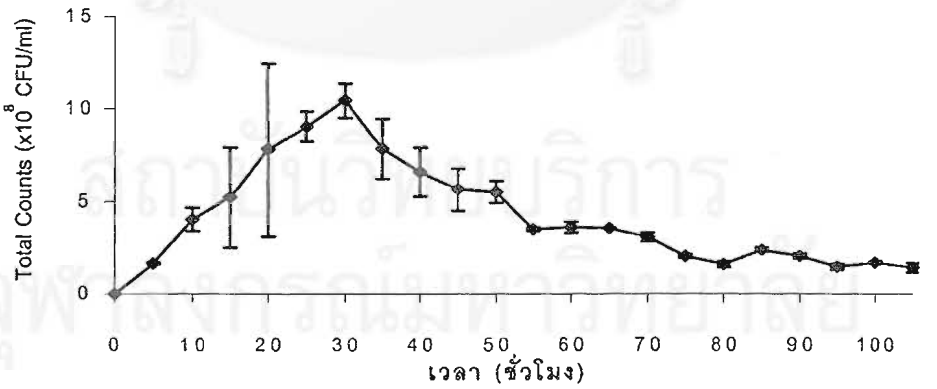
อาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่ให้ผลการยับยั้ง *V. harveyi* 1526 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion Method แต่ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* 1526 ได้ โดยเริ่มให้ผลการยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5-55 ของการทดลองโดยให้การยับยั้งสูงสุดที่เวลา 15 ชั่วโมง ก่อนที่จะค่อย ๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 65 (ภาพที่ 6)



ก

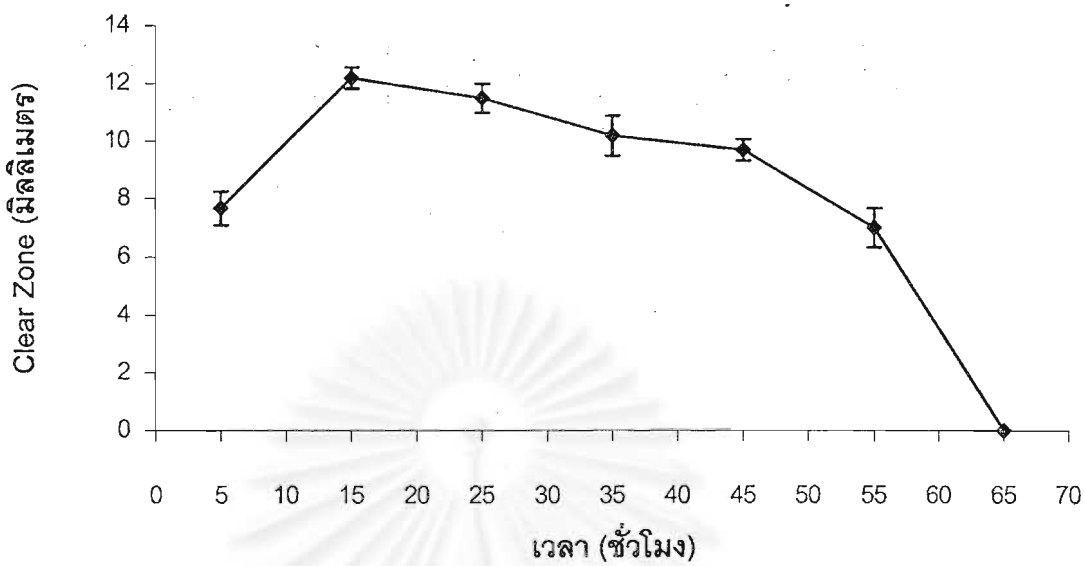


ข



ค

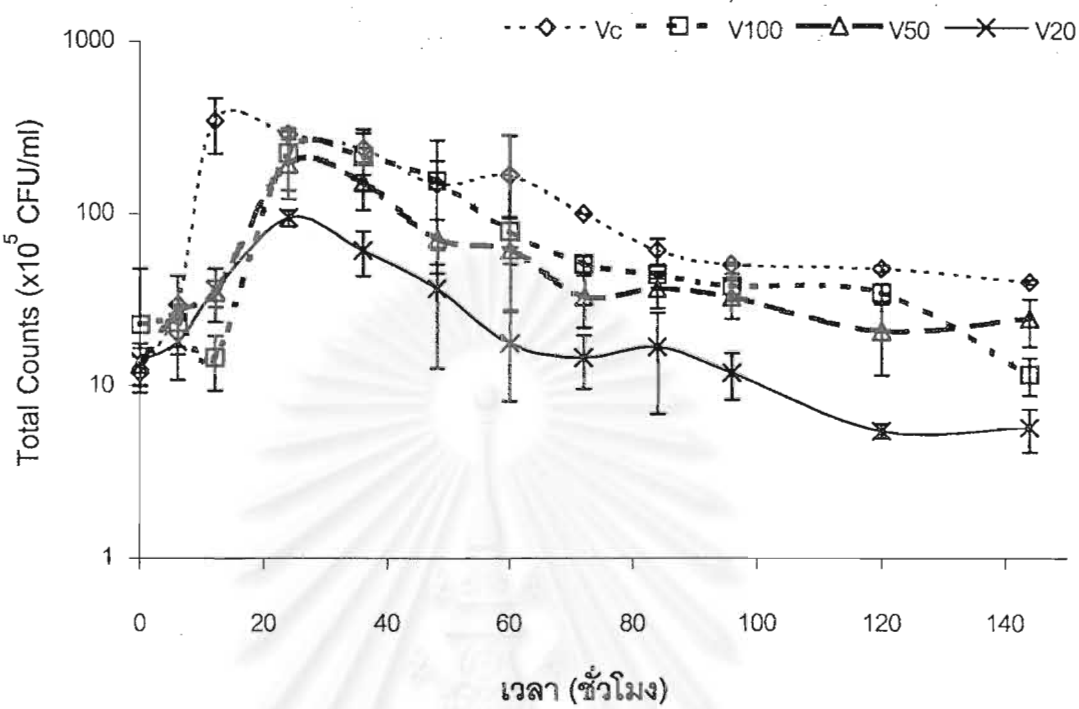
ภาพที่ 5. การเจริญของ *Alteromonas* sp. S9730 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (ก) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ข) และความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ค) แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 6. ความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* 1526 ในอาหารเหลวความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี Disc Diffusion Method แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 9 ซ้ำ±SD

3. **ความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมปริมาณ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน**

Alteromonas sp. S9730 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปริมาณของ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเลได้ประมาณ 10 เท่า ตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมง และต่ำกว่าการทดลองชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7. ความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* 1526 โดย *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

4. **ความสามารถของ** *Alteromonas* **sp. S9730 ในการยับยั้งแบคทีเรีย** *Vibrio spp.* **โดยวิธี** Double Layer Method

Alteromonas sp. S9730 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกชนิดที่ทดสอบ (ตารางที่ 4) โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* (CU/KU) ได้มากที่สุด (clear zone เท่ากับ 46±2.65 มิลลิเมตร) และยับยั้ง *V. alginolyticus* ได้น้อยที่สุด (clear zone เท่ากับ 29±1 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 4. การยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* spp. โดย *Alteromonas* sp. S9730 โดยวิธี Doubl-Layer Method

Vibrio spp.	ขนาด clear zone (มิลลิเมตร)*
V. harveyi 1526	37.00 ± 1.73 [c]
V. harveyi 046 (ตรัง)	40.67 ± 0.58 [b]
V. harveyi (สงขลา)	40.00 ± 0.00 [b]
V. harveyi (MBRU)	40.67 ± 0.58 [b]
V. harveyi (WN3)	41.33 ± 1.53 [b]
V. harveyi (CU/KU)	46.00 ± 2.65 [a]
V. vulnificus	34.00 ± 1.00 [d]
V. parahaemolyticus	33.67 ± 3.21 [d]
V. alginolyticus (โคโลนีสีเหลือง)	29.00 ± 1.00 [e]

*ค่าเฉลี่ย±SD (n = 3)

ตัวอักษรยกที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดลองส่วนที่ 2 *in vivo* experiment

จากผลการทดลองระดับ *in vivo* experiment จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 24-30 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ตลอดการทดลองที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

1. **ระดับความเข้มข้นของ *V. harveyi* 1526 ที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})**

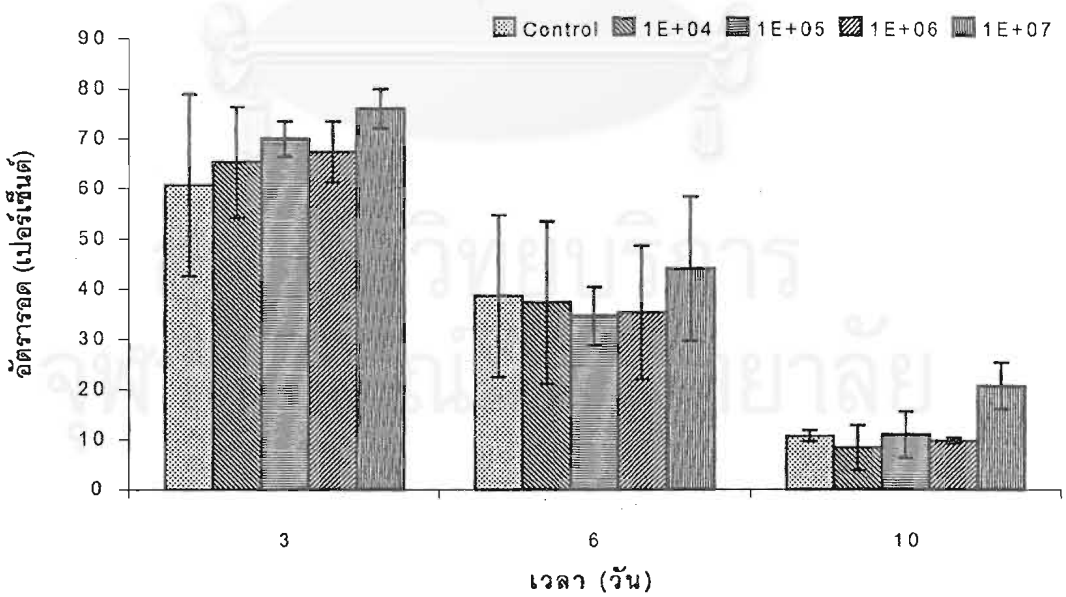
ค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* 1526 เท่ากับ $1.53x10^5$, $2.14x10^4$, $3.67x10^3$ และ $3.04x10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5. ค่า LC_{50} ของ-*V. harveyi* 1526 ที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 2 ตายที่เวลาต่าง ๆ แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่า LC_{50} (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
24	$1.53x10^5$
48	$2.14x10^4$
72	$3.67x10^3$
96	$3.04x10^3$

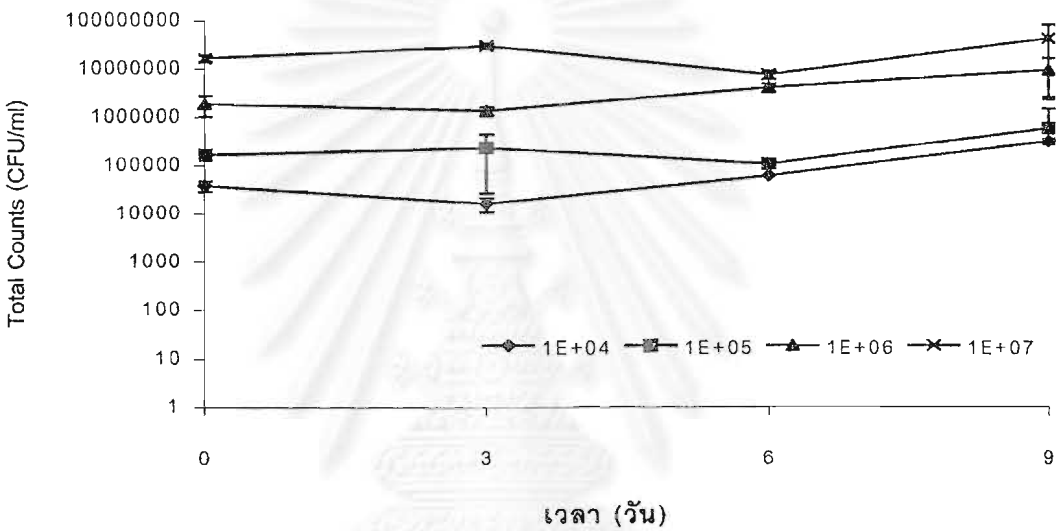
2. **ศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสลาวี่ 5-15**

ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ระดับความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร มีอัตรารอดสูงสุดตลอดระยะเวลาการทดลอง 10 วัน โดยอัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำที่แช่ด้วยเชื้อความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ให้อัตรารอดสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกชุดการทดลองในวันที่ 10 (ภาพที่ 8)



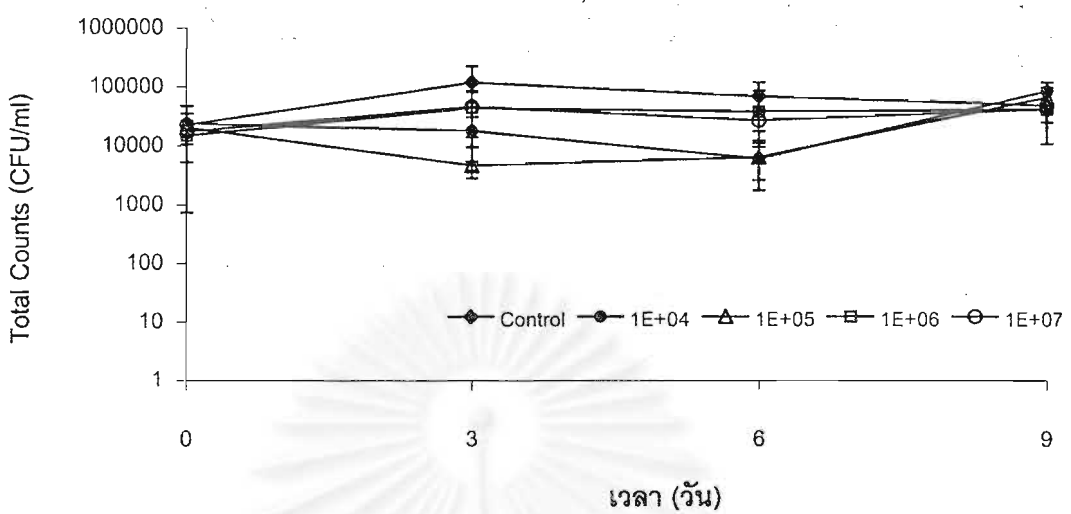
ภาพที่ 8. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5–15 ที่แช่ด้วยเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

เมื่อนับแบคทีเรียในน้ำที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15 ในวันที่ 0 3 6 และ 9 ของการทดลอง พบว่า ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 คงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นที่กำหนดไว้ตลอดการทดลองและไม่พบในชุดควบคุม (ภาพที่ 9) ส่วนปริมาณ *Vibrio* spp. ในวันเริ่มต้นและวันที่ 9 ของการทดลองที่พบในทุกการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนวันที่ 3 และ 6 ของการทดลอง ปริมาณ *Vibrio* spp. แปรผันอยู่ในช่วง $6x10^3$-$1x10^5$ และ $1x10^4$-$8x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9. ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15 แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

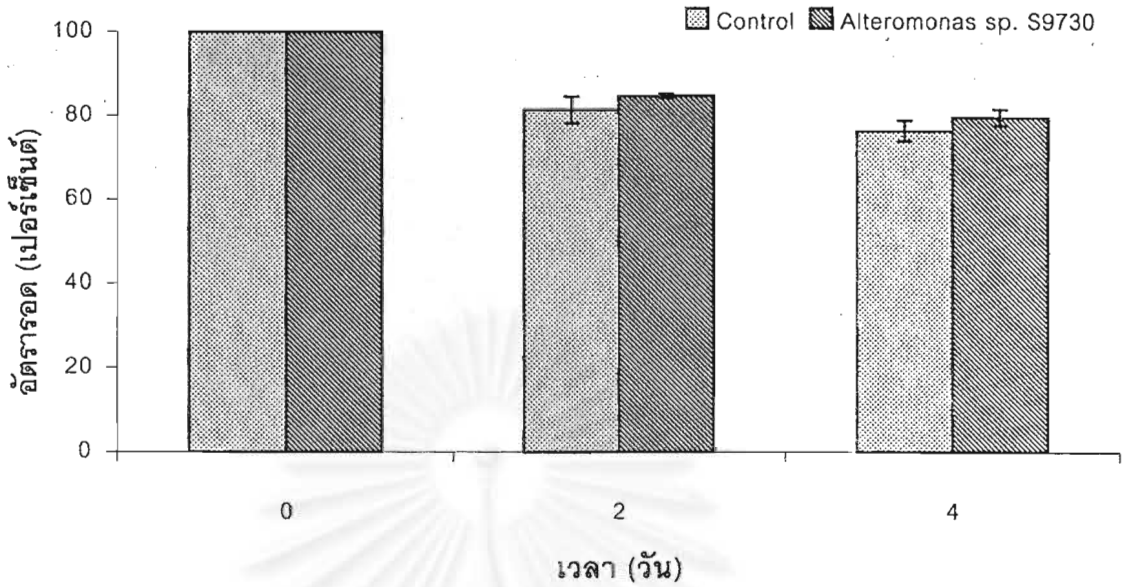


ภาพที่ 10. ปริมาณ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15 แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

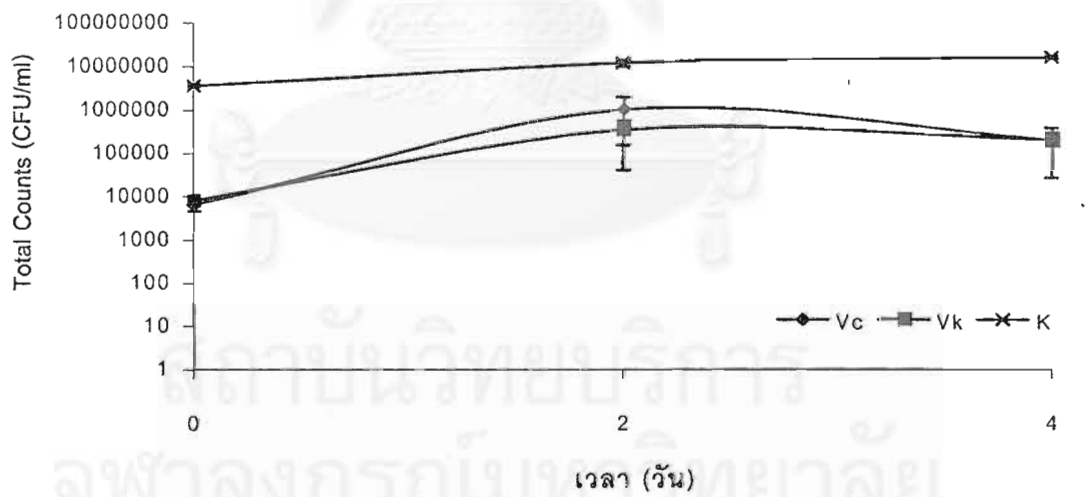
3. **อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย 1-3 เมื่อแช่ด้วย** *Alteromonas* sp. S9730 **แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย** *V. harveyi* 1526

กุ้งกุลาดำระยะซูเอีย 1-3 ที่แช่ใน *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร มีอัตรารอดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง (ภาพที่ 11) ปริมาณแบคทีเรียในน้ำของทั้งสองชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันโดยปริมาณ *Altromonas* sp. S9730 คงที่ตลอดการทดลองและไม่พบในชุดควบคุม ส่วนปริมาณ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง 10^4-10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 12) หลังจากนั้นนำลูกกุ้งไปทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้นเท่ากับ $4x10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ก็ไม่พบความแตกต่างของอัตรารอด (ภาพที่ 13)

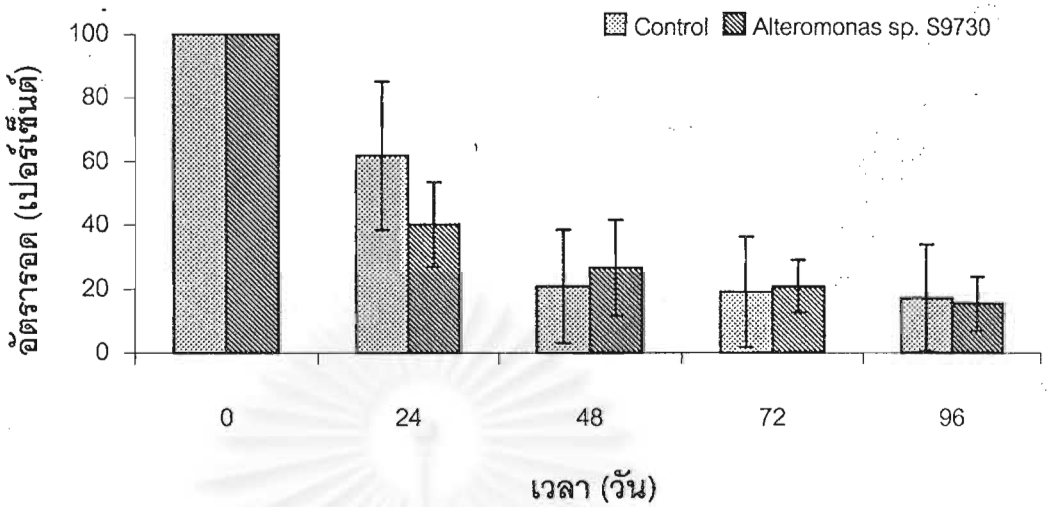
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 11. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย 1–3 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



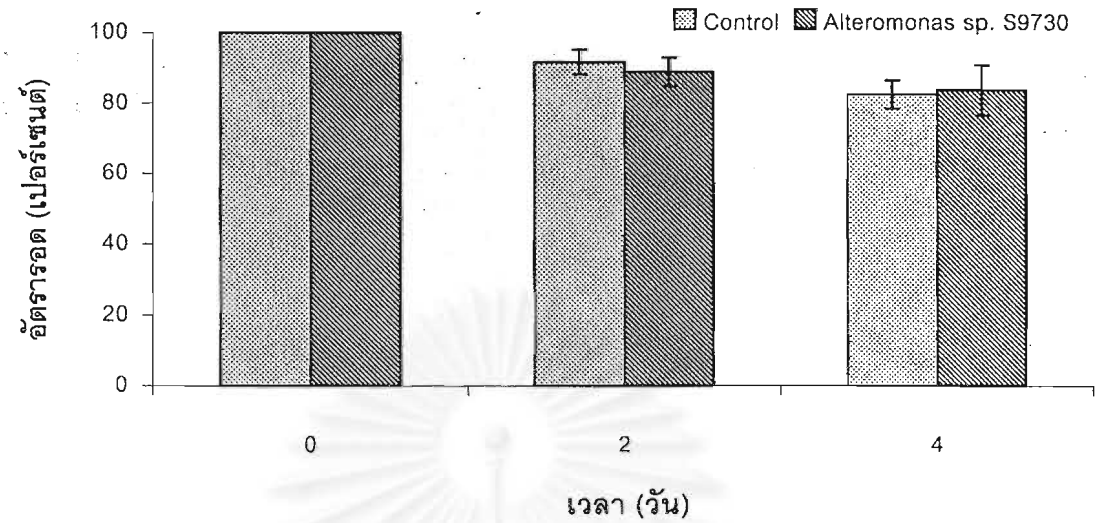
ภาพที่ 12. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย 1-3 (Vc คือ ปริมาณ *Vibrio* spp. ในกลุ่มควบคุม, Vk คือ ปริมาณ *Vibrio* spp. ในชุดการทดลองและ K คือ ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในชุดการทดลอง) แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



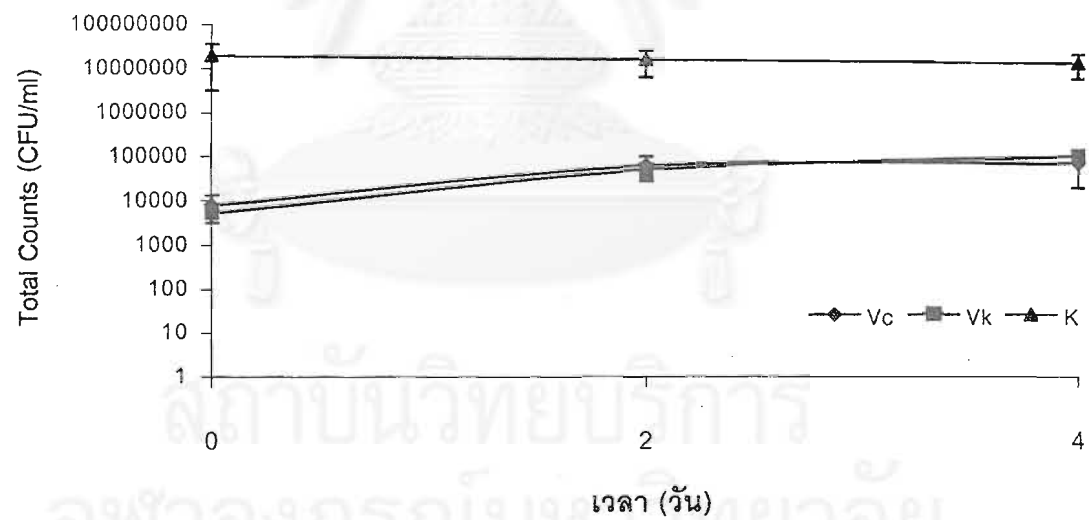
ภาพที่ 13. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1–3 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น $4x10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 6 ซ้ำ)

4. **อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะไมซิส 1-3 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526**

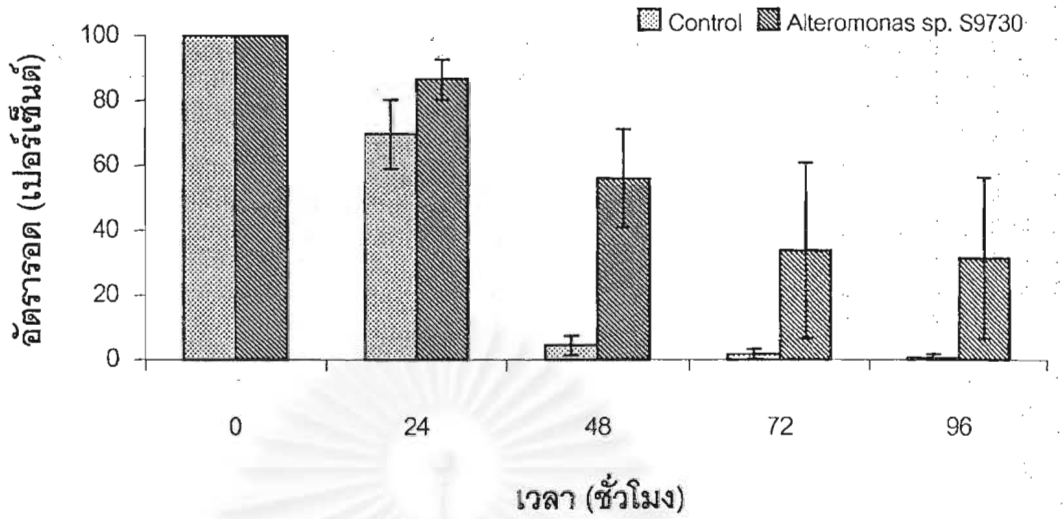
กุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1-3 ในกลุ่มควบคุมและที่แช่ใน *Alteromonas* sp. S9730 ให้อัตรารอดใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง (ภาพที่ 14) ปริมาณแบคทีเรียในน้ำของทั้งสองชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันโดยปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 คงที่ตลอดการทดลองและไม่พบในชุดควบคุม ส่วนปริมาณ *Vibrio* spp. เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 10^4 และคงที่ ที่ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 15) หลังจากนั้นนำกุ้งที่ได้ไปเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น $8x10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า กุ้งที่แช่ *Alteromonas* sp. S9730 ให้อัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมและแตกต่างกันทางสถิติตลอดระยะเวลา 4 วัน ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 14. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1–3 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



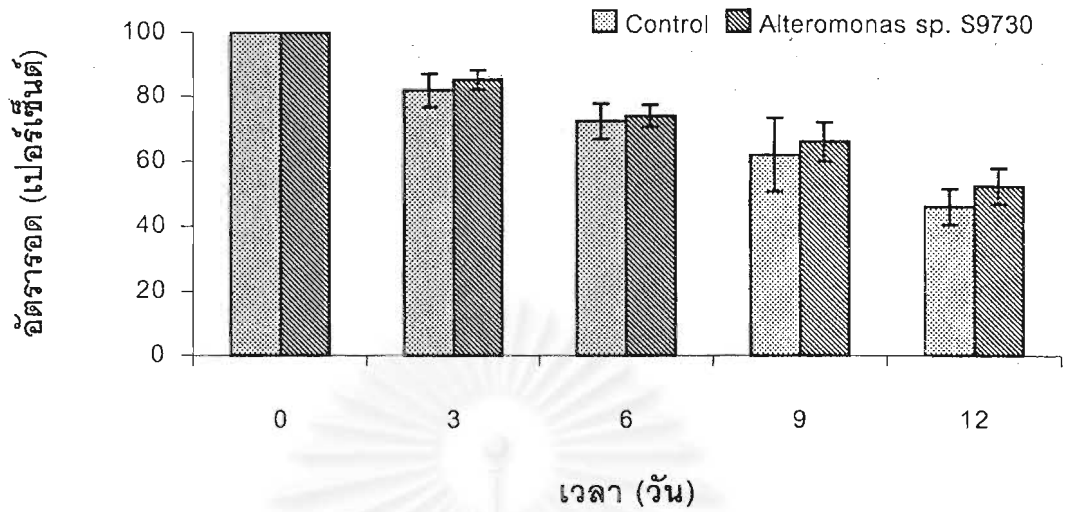
ภาพที่ 15. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิส 1-3 (Vc คือ ปริมาณ *Vibrio spp.* ในกลุ่มควบคุม, Vk คือ ปริมาณ *Vibrio* spp. ในชุดการทดลอง และ K คือ ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในชุดการทดลอง) แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



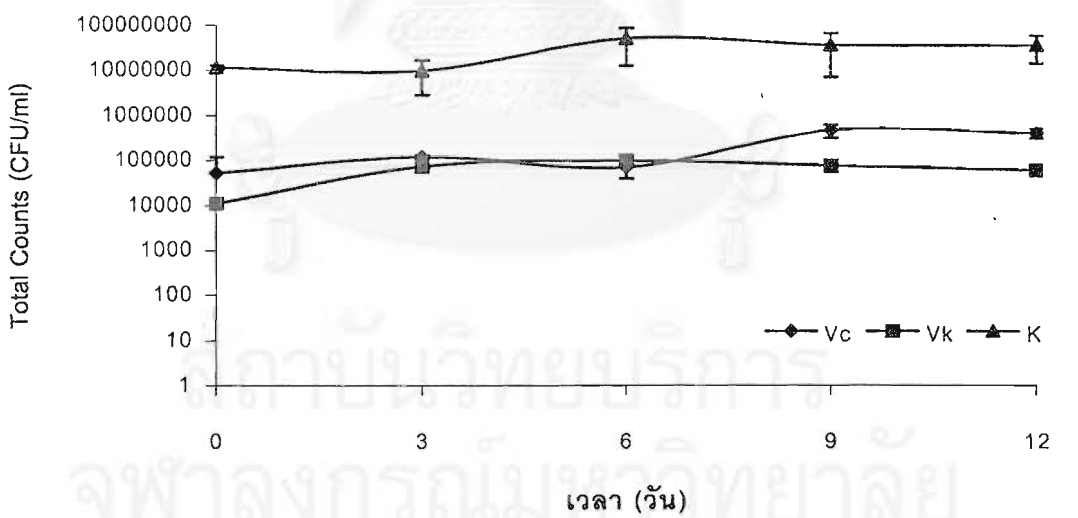
ภาพที่ 16. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 1–4 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น 8 x 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 6 ซ้ำ

5. **อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสลาวี่ 3-15 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526**

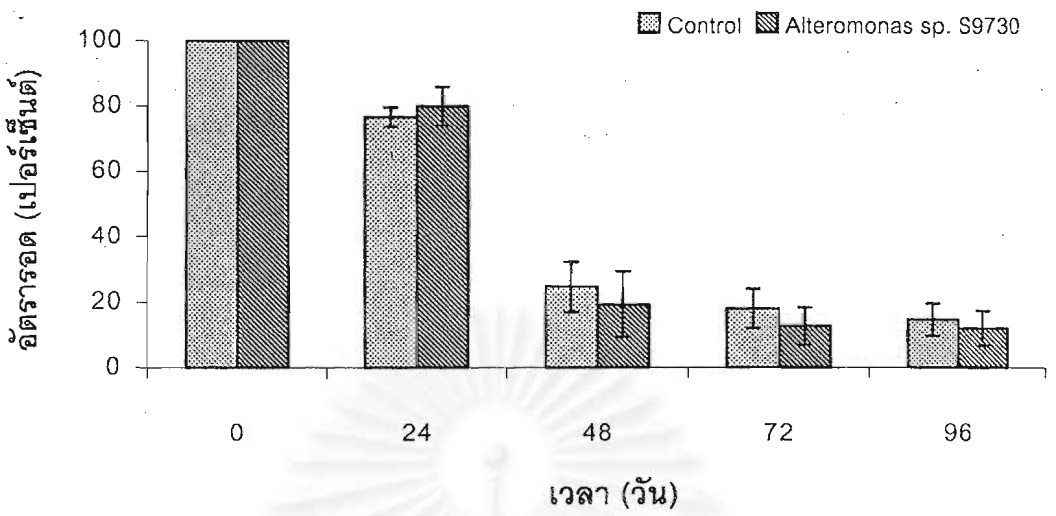
กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 3-15 ที่แช่ด้วยเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ให้อัตรารอดของลูกกุ้งไม่แตต่างจากชุดควบคุมตลอดการทดลอง 12 วัน (ภาพที่ 17) ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำเลี้ยงในชุดการทดลองอยู่ในช่วง $1x10^7$-$5x10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และไม่พบในชุดควบคุม ส่วนปริมาณ *Vibrio* spp. ของทั้งสองชุดการทดลองใกล้เคียงกันในช่วงแรกและเริ่มแตกต่างกันในวันที่ 9 โดยในชุดควบคุมมีปริมาณ *Vibrio* spp. สูงกว่าชุดการทดลอง (ภาพที่ 18) เมื่อลูกกุ้งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้นเชื้อ $5x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 มีอัตรารอดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 17. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 3-15 เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 18. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 3-15 (Vc คือ ปริมาณ *Vibrio spp.* ในกลุ่มควบคุม, Vk คือ ปริมาณ *Vibrio* spp. ในชุดการทดลองและ K คือ ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในชุดการทดลอง) แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 19. อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 16-20 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น 4.125×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองส่วนที่ 1 *in vitro* experiment

1. **การเจริญของ** *Alteromonas* sp. S9730 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีน** (Marine Broth) **ความเข้มข้นต่าง ๆ และการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค**

จากผลการทดลอง พบว่า *Alteromonas* sp. S9730 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ 100 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญในช่วง log phase (8-30 ชั่วโมง) และปริมาณเซลล์ ($10.5x10^8$-$13x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ไม่มีความแตกต่างกัน *Alteromonas* sp. S9730 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนความเข้มข้น 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยใช้เวลาอีกประมาณ 30-35 ชั่วโมง จึงลดจำนวนลงในระยะ dead phase ส่วน *Alteromonas* sp. S9730 ที่เจริญในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญสูงสุดที่เวลาประมาณ 30 ชั่วโมง เท่ากับ $10.5x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะ dead phase การลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วนี้อาจเกิดได้จากปริมาณสารอาหารที่ลดลง เนื่องจากแบคทีเรียใช้สารอาหารที่มีอยู่จำกัดจนหมดหรือเกิดจากการแตกตัวของเซลล์แบคทีเรียเพราะความเป็นพิษจากของเสียที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญ นอกจากนี้การลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วของอาจเกิดได้จากสารที่ *Alteromonas* sp. S9730 ผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญดังผลการทดลองในภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่ามีเพียง *Alteromonas* sp. S9730 ที่เจริญในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* 1526 ได้ Thongton (1998) ทำการศึกษาพบว่าสาร antibacterial agent ที่ *Alteromonas* sp. S9730 ผลิตออกมามีชื่อว่า isatin จากการศึกษาแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันแต่คนละชนิด คือ *Alteromonas rubra*, *A. luteoviolacea*, *A. citrea* และ *A. aurutia* พบว่า สามารถผลิต antibacterial substance ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และยังเป็นพิษกับตัวเอง (autotoxic) ได้อีกด้วย (Ballester et al., 1977)

จากการทดลองทำให้ทราบว่า *Alteromonas* sp. S9730 สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีปริมาณสารอาหารต่ำ จากองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีส่วนประกอบหลักเป็นไนโตรเจน (จากเปปโทน) และวิตามิน (จาก yeast extract) (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) จะเห็นได้ว่ามีแหล่งของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่เพียงเล็กน้อยจากองค์ประกอบทั้งสอง ดังนั้น *Alteromonas* sp. S9730 จึงจัดอยู่ในกลุ่ม Oligotrophic bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในบริเวณที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ (1-15 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อลิตร) และพบได้ทั่วไปในทะเลเนื่องจากต้องการ Na^+ (จากน้ำทะเล) มาใช้ในขบวนการเมตาบอลิซึม Maeda et al. (2000) ศึกษาการเจริญของ *Alteromonas* sp. สายพันธุ์ KE10 ซึ่งเป็น Heterotrophic marine bacteria ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำและสูง (0.2 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เพื่อศึกษาผลของปริมาณสารอินทรีย์ต่อการปรับตัวของเซลล์ในการผลิตโปรตีน พบว่า *Alteromonas* sp. สายพันธุ์ KE10 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำและให้ปริมาณเซลล์สูงสุด $2x10^6$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และคงปริมาณเซลล์อยู่ในช่วง Stationary phase ได้นานก่อนที่จะลดจำนวนลง นอกจากนี้ *Alteromonas* sp. สายพันธุ์ KE10 ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ในสารละลายน้ำเกลือ (salt solution) จาก $2x10^7$ ถึง $1x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเวลา 2 วัน ก่อนลดจำนวนลงในภายหลัง เมื่อศึกษาระดับโปรตีนในเซลล์พบว่า ระดับโปรตีน OlgA, -B และ -C ในเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีสารอินทรีย์ต่ำมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่ได้จากอาหารที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงหรือไม่มีสารอินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปรับตัวให้สามารถดำรงชีพอยู่ได้ในสภาวะที่มีสารอาหารอยู่อย่างจำกัด

2. ความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมปริมาณ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน

สำหรับการทดลอง Antagonism assay ระหว่าง *Alteromonas* sp. S9730 และ V. harveyi 1526 ในน้ำทะเล พบว่า เซลล์ของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมปริมาณ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเลได้ดีที่สุด โดยลดปริมาณ *V. harveyi* 1526 ได้ประมาณ 10 เท่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง ส่วนเซลล์ที่ได้จากอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ลดปริมาณ *V. harveyi* 1526 ได้เล็กน้อยและลดได้เพียงช่วงแรกของการทดลองเท่านั้น จากการทดลองเบื้องต้น (ไม่ได้แสดงผล) พบว่า *Alteromanas* sp. S9730 สามารถควบคุมปริมาณ *V. harveyi* 1526 ได้เมื่อ *Alteromanas* sp. S9730 มีปริมาณเซลล์สูงกว่า *V. harveyi* 1526 1000 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ

Gram et al. (1999) ที่ทดสอบความสามารถของ *Pseudomonas fluorescens* AH2 ความเข้มข้น 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้ง *V. anguillarum* 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อและพบว่าการยับยั้งจะเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดแตกต่างกันประมาณ 100-1000 เท่า การยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากหลายกลไก เช่น แบคทีเรียมีการผลิตสารออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น การหลั่งเอนไซม์เพื่อย่อยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหรือความสามารถในการเจริญในบริเวณที่มีสารอาหารจำกัด

3. **ความสามารถของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. โดยวิธี Double-Layer Method**

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongton (1998) ซึ่งใช้สารสกัด isatin ที่ได้มาจาก *Alteromonas* sp. S9730 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีค่า Minimum Inhibiting Concentration (MIC) เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้าน *Vibrio* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งมีค่า MIC เท่ากับ 31.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงแต่การศึกษาครั้งนี้ทดสอบโดยใช้เซลล์ของ *Alteromonas* sp. S9730 ซึ่งความเข้มข้นของสารที่แบคทีเรียหลั่งออกมามีความเข้มข้นต่ำกว่าสารสกัดบริสุทธิ์ซึ่งผลการทดสอบกับเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ ให้ผลการยับยั้ง ส่วนแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำและบางชนิดเป็นโพรไบโอติกที่ดีต่อสัตว์น้ำถูกยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Alteormonas* sp. S9730 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในแหล่งน้ำได้น้อย นอกจากจะพบแบคทีเรียกลุ่ม *Alteromanas* sp. ในธรรมชาติแล้วยังพบแบคทีเรียนี้จากระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วไปด้วย โดย Tanasomwang et al. (1998) แยก *Alteromanas* sp. จากลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน อาร์ทีเมีย และน้ำทะเลซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในแหล่งเดียวกัน ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* และ *Vibrio* spp. ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลา

การทดลองส่วนที่ 2 *in vivo* experiment

1. **ระดับความเข้มข้นของ** *V. harveyi* 1526 **ที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 2-6 มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์** (LC_{50})

ค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* 1526 ของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 2-6 ในเวลาที่ 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $1.53x10^5$, $2.14x10^4$, $3.67x10^3$ และ $3.04x10^3$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ข้อมูลเหล่านี้เป็นค่าพื้นฐานในการนำไปใช้ เนื่องจากระยะที่ใช้ในการทดลองเป็นลูกกุ้งระยะโพสลาวี่ 2-6 แต่การนำไปใช้จะรวมไปถึงลูกกุ้งระยะไมซิส ซูเอีย และโพสลาวี่ 15 ด้วย ดังนั้น ระดับความเข้มข้นของ *V. harveyi* 1526 ที่นำไปใช้จึงควรเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสม จากการทดลองพบว่า ความรุนแรงของ *V. harveyi* 1526 มีค่าไม่คงที่ ดังนั้น ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองจึงต้องประมาณค่าที่ได้นี้ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* 1526 ที่ได้จากการทดลองนี้เป็นค่าที่ใช้ได้กับลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อน แต่จากการศึกษาของ สมบัติ รักประทานพร (2542) ซึ่งหาค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* 1526 เช่นเดียวกันแต่ศึกษาในกุ้งกุลาดำวัยรุ่นน้ำหนักประมาณ 0.77 กรัม พบว่า มีค่า LC_{50} ของ *V. harveyi* 1526 เท่ากับ $7.65x10^5$ $1.30x10^5$ $3.44x10^4$ และ $1.77x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ค่าที่ได้สูงกว่าในการทดลองซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของอายุของกุ้งต่อความสามารถในการทนต่อการติดเชื้อก่อโรค การศึกษาของ Limsuwan (1989) ก็พบว่า กุ้งในระยะซูเอียมีความไวต่อการติดโรคมากที่สุด แม้ว่ากุ้งในระยะไมซิสและโพสลาวี่ (1-2) สามารถติดโรคนี้ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้กุ้งระยะโพสลาวี่ 3-4 มีความทนต่อการติดโรคได้ดีกว่าระยะอื่น ๆ และเมื่อนำลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอียและโพสลาวี่ไปแช่เชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า มีอัตราการรอดเท่ากับ 25 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Prayino and Latchford, 1995)

2. **ระดับความเข้มข้นของ** *Alteromonas* sp. S9730 **ที่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสลาวี่ 5-15**

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาหาระดับของความเข้มข้นของ *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งเพื่อให้มีอัตรารอดที่สูง โดยเติมแบคทีเรียที่เลี้ยงใหม่ทุกวันเพื่อให้ปริมาณแบคทีเรียคงที่ตลอดการทดลอง เนื่องจาก *Alteromonas* sp. S9730 ลดปริมาณลงวันละ 10 เท่า (ภาคผนวก ข) โดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมเชื้อให้ได้

ปริมาณที่ต้องการ ผลของการศึกษาพบว่า ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15 ที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ระดับความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร มีอัตรารอดสูงสุดตลอดระยะเวลาการทดลอง 10 วัน ซึ่งค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียนี้เป็นค่าที่สูงเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ใช้ในสัตว์อื่น ๆ เช่น ในหอย *Argopecten purpuratus* และ ปู *Portunus trituberculatus* วัยอ่อน ซึ่งแช่ด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วนการศึกษาของ Gram et al. (1999) ในปลา rainbow trout จะแช่ปลาด้วย *Pseudomonas fluorescens* AH2 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อนำปลาเหล่านี้ไปเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. anguillarum* ก็ต้องเพิ่มระดับความเข้มข้นของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* AH2 เป็น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เนื่องจากการควบคุมปริมาณ *V. anguillarum* ให้มีประสิทธิภาพต้องมีปริมาณ *Pseudomonas fluorescens* AH2 สูงกว่า *V. anguillarum* 100-1000 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Antagonosm assay ครั้งนี้ในน้ำทะเล ซึ่งพบว่า *Alteromonas* sp. S9730 สามารถควบคุมปริมาณ *V. harveyi* 1526 ได้เมื่อมีปริมาณเซลล์แตกต่างกัน 1000 เท่า (จากการทดลองเบื้องต้น) ดังนั้นการให้เชื้อในระดับที่สูงจึงเป็นการควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคมากกว่าการแก้ไขเมื่อลูกกุ้งติดโรคแล้ว

จากการสังเกตขณะทำการทดลอง พบว่า โดยทั่วไปในน้ำที่เลี้ยงลูกกุ้งถ้ามีปริมาณแบคทีเรียสูงถึง 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร น้ำจะมีสีขาวขุ่นซึ่งอาจทำให้กุ้งเกิดความเครียด นอกจากนี้อาจเกิดปัญหาคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพ เนื่องจากแบคทีเรียขับของเสียออกมาจากเซลล์และมีการตายของแบคทีเรีย แต่ *Alteromonas* sp. S9730 ในระดับความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จะทำให้น้ำเป็นสีชาอ่อน เนื่องจากเซลล์สดของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จะมีสีส้มมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นอื่น จากผลการนับปริมาณแบคทีเรียในน้ำที่เลี้ยงตลอดการทดลอง พบว่า ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 อยู่ในระดับที่ต้องการ ส่วน *Vibrio* spp. ซึ่งมีโคโลนีสีเหลืองเป็นส่วนใหญ่มีค่าในช่วง $6x10^3$-$1x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ภัทราพร ยุธาชิต และคณะ (2533) ที่พบปริมาณ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งอยู่ในช่วง 10^4-10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3. **อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย ไมซิส และโพสลาวี่ เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526**

กุ้งกุลาดำวัยอ่อนมีการพัฒนาเป็น 3 ระยะ คือ ซูเอีย ไมซิส และโพสลาวี่ ความแตกต่างของลูกกุ้งแต่ละระยะสังเกตจากการพัฒนาของระยางค์ทั้งในส่วนหัวและท้อง อีกทั้งสามารถสังเกตได้จากพฤติกรรมการกินอาหารซึ่งแตกต่างกัน เมื่อกุ้งมีการลอกคราบเพื่อเปลี่ยนระยะจะมีอัตราตายสูงและการเลี้ยงต่อเนื่องจากระยะซูเอียจนถึงโพสลาวี่ไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงแบ่งทำการศึกษาตามระยะการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง จากผลการทดลองนำเซลล์แบคทีเรียระดับความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มาอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะซูเอีย 1-3 เป็นเวลา 4 วัน ไมซิส 1-3 เป็นเวลา 4 วัน และโพสลาวี่ 3-15 เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ลูกกุ้งในชุดการทดลองให้อัตรารอดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่เมื่อนำลูกกุ้งที่ได้ไปเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 ที่ความเข้มข้น $4x10^3$ $8x10^3$ และ $4.12x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า มีเพียงลูกกุ้งกุลาดำระยะไมซิสที่แช่เชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 ให้อัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า เมื่อแช่กุ้งขนาด 0.77 กรัม ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงแยกกุ้งไปใส่ในน้ำที่ปลอดเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730 แล้วนำนับปริมาณเชื้อในลำไส้พบว่า *Alteromonas* sp. S9730 ที่ผ่านเข้าไปในระบบทางเดินอาหารสามารถดำรงชีพในลำไส้ของกุ้งได้ โดยมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ $8x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากหยุดให้เชื้อเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง (ภาคผนวก ค) แบคทีเรียที่ตรวจพบเหล่านี้อาจเป็น *Alteromonas* sp. S9730 ที่ใส่เข้าไปหรืออาจเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในโรงเพาะเลี้ยงกุ้งวัยอ่อน (Tanasomwang et al., 1998) และที่มีอยู่ตามธรรมชาติซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกับ *Alteromonas* sp. S9730 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง

เมื่อนำลูกกุ้งในแต่ละระยะมาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 พบว่า ลูกกุ้งในระยะซูเอีย และโพสลาวี่ที่แช่เชื้อมีอัตรารอดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนลูกกุ้งระยะไมซิสในชุดทดลองให้อัตรารอดที่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองที่แตกต่างกันใน 3 ระยะ นี้อาจเนื่องมาจากแหล่งของกุ้งเพราะในการศึกษาครั้งนี้นำลูกกุ้งมาจากโรงเพาะเลี้ยงเอกชนในจังหวัดฉะเชิงเทรา การทดลองแต่ละครั้งจะนำลูกกุ้งมาจากโรงเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน พ่อแม่พันธุ์ของลูกกุ้งแต่ละครั้งจึงแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้น กุ้งที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งจึงมีความแข็งแรงและ

ทนต่อโรคแตกต่างกัน สำหรับอัตรารอดที่ต่ำของลูกกุ้งระยะซูเอียที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคอาจเนื่องมาจากลูกกุ้งในระยะซูเอียที่ใช้ในการทดลองจะนำมาเลี้ยงตั้งแต่ระยะนอเพลียส 5 ซึ่งลูกกุ้งระยะนี้ยังไม่มีการเปิดปากเพื่อกินอาหาร ดังนั้น จึงยังไม่ได้รับแบคทีเรียที่มีอยู่ทั่วไปในน้ำซึ่งบางชนิดอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งวัยอ่อน เช่น *Vibrio* spp. (Moriarty, 1990) เมื่อกุ้งเริ่มกินอาหารโดยการกรองกินสาหร่ายในน้ำที่เลี้ยง *Alteromonas* sp. S9730 จึงสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของลูกกุ้งแต่ไม่สามารถช่วยเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันให้กุ้งสามารถทนต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* 1526 ที่นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคได้ในทันที

ส่วนในกุ้งระยะโพสลาวี่ซึ่งทำการแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 นานถึง 12 วัน ในปริมาณเชื้อที่สูงถึง 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร อาจทำให้กุ้งเกิดความเครียด เนื่องมาจากตลอดการทดลองต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำและคงปริมาณเชื้อให้เท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตลอดการทดลองหรือเกิดจากปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในลำไส้ที่สูงเกินไป เนื่องจากระยะเวลาในการแช่ที่นานส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นที่มีประโยชน์กับกุ้งตายหรือไม่สามารถยึดพื้นที่ในลำไส้ได้ ดังนั้น จึงทำให้กุ้งในระยะนี้มีการตายที่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลอง

สำหรับลูกกุ้งในระยะไมซิสที่แช่เชื้อแล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 แล้วมีอัตรารอดสูงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอาจ เนื่องจากกุ้งที่นำมาเลี้ยงนี้เติบโตในระยะแรกจากระยะนอเพลียสถึงไมซิสในระบบโรงเพาะเลี้ยงเอกชนซึ่งจากการสอบถาม พบว่า ในระยะแรกของการเลี้ยงนี้เกษตรกรไม่ได้ใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรค แต่ให้สารจำพวกวิตามินและอาหารเสริม แสดงให้เห็นว่าลูกกุ้งที่ได้น่าจะมีสุขภาพที่แข็งแรง นอกจากนี้กุ้งอาจจะได้รับแบคทีเรียบางชนิดที่มีประโยชน์เข้าไป เช่น *V. alginolyticus* ที่พบได้ทั่วไปในโรงเพาะเลี้ยงกุ้งวัยอ่อนและมีรายงานว่าส่วนใหญ่พบว่าเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Austin et al., 1995; Garriques and Arevalo, 1995) ทำให้กุ้งมีความแข็งแรงและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เริ่มทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการนำ *Alteromonas* sp. S9730 มาใช้ในการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนเพื่อใช้เป็น Biocontrol (หรือ Probiotics) แต่ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้ *Alteromonas* sp. S9730 ในสภาพความเป็นจริงที่ใกล้เคียงกับการนำไปใช้ในระบบการเพาะเลี้ยง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. นอกจากอาหารเหลวมารีน 100 เปอร์เซ็นต์ *Alteromonas* sp. S9730 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์

2. *Alteromonas* sp. S9730 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* 1526 และเซลล์สดจากอาหารเลี้ยงเชื้อนี้สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของ *V. harveyi* 1526 ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน

3. *Alteromonas* sp. S9730 สามารถยังยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ได้ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *V. harveyi* 5 สายพันธุ์, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

4. เซลล์สดของ *Alteromonas* sp. S9730 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมารีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ให้อัตรารอดของลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวี่ 5-15 สูงที่สุดแต่เมื่อนำไปแช่ลูกกุ้งกุลาดำระยะซูเอีย ไมซิส และโพสลาวี่ให้อัตรารอดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

5. ลูกกุ้งระยะไมซิสที่แช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 มีอัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมแตกต่างกันทางสถิติ หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดลองเพื่อศึกษาการเป็น Biocontrol ของ *Alteromonas* sp. S9730 ในการควบคุมปริมาณ *V. harveyi* ในระบบการเพาะเลี้ยงและการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อการเกิดโรคของลูกกุ้ง โดยเติมแบคทีเรียทั้งสองลงในระบบการเพาะเลี้ยงในปริมาณที่แตกต่างกัน

2. นำ *Alteromonas* sp. S9730 ไปทดลองในระบบการเพาะเลี้ยงที่ใกล้เคียงการนำไปใช้จริง เนื่องจากระบบที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นการทดลองในภาชนะขนาดเล็กซึ่งแตกต่างจากระบบการเพาะเลี้ยงทั่วไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ พิมพ์ครั้งที่ 3. 507 หน้า.

ภัทราพร ยุธาชิต, ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และ ประเสริฐ สันตินาเลิศ. 2533. การศึกษาแบคทีเรียที่ประจำอยู่ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์**. 12: 151-157.

วรรนิภา เพี้ยนพักตร์. 2539. **การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2539. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. **วารสารวาริชศาสตร์**. 3: 42-51.

สมบัติ รักประทานพร. 2542. **การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ** *Penaeus monodon* **ด้วย** *Bacillus* S11. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล. 2540. **ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ**. เอกสารประกอบการสอนวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อน. 23 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Austin, B., Baudet, E. and Stobie, M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. J. Fish. Diss. 15: 55-61.

Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A., Efendi, I. and Griffith, D. R. W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish. Dis. 18: 93-96.

Baticados, M. C. L., Lavilla-Pitogo, C. R., Cruz-Lacierda, E. R., de la Pena, L. D. and Sunaz, N. A. 1991. Studies on the chemical control of luminous bacteria *V. harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *P. monodon* larvae rearing water. Dis. Aquat. Org. 9: 133-139.

Daniels, H. V. 1993. Disease control in shrimp ponds and hatcheries in Ecuador. Associacao Brasileira de Aquicultura. IV simposio brasileiro sobre cultivo de camarao, 22-27 November, Brasil. pp. 175-184.

Douillet, P. and Langdon, C. J. 1993. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) larvae. Biol. Bull. 184: 36-51.

Douillet, P. and Langdon, C. J. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquculture. 119: 25-40.

Elston, R., Leibovitz, L., Relyea, D. and Zatila, J. 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and management features. Aquaculture. 24: 53-62.

Flegel, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantanachookhin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In Fulks, W. and Main, K.L. (eds.), Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, pp. 57-112. Hawaii : The Cceanic Institute.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In Fuller, R. (ed.), Probiotics the scientific basis, 1st ed, pp. 1-8. London: Chapman & Hall.

Garcia de la Banda, I., Chereguini, O. and Rasines, I. 1992. Influencia de la adicion de bactria lacticas en el cultivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 8: 247-254.

Garriques, D. and Arevalo, G. 1995. An evaluation of the production and yse of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C. L., Hopkins, J. S. (Eds.), Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculturre' 95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 53-59.

Garriques, D. and Wyban, J. 1993. Up to date advances on *Penaeus vannamei* maturation, nauplii and postlarvae production. Associacao Brasileira de

Aquicultura. IV simposio brasileiro sobre cultivo de camarao, 22-27 November, Brasil. pp. 217-235.

Gatesoupe, F.J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. Aquaculture. 89 : 139-148.

Gatesoupe, F.J. 1991. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., pp. 561-568. *In* S. Kaushik (ed.), Fish nutrition in practice. Proceedings of the 4th International symposium on fish nutrition and feeding. Institute National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* against pathogenic *Vibrio*. Aquat. Living. Resour. 7: 277-282.

Gatesoupe, F.J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Aquat. Living. Resour. 10: 239-246

Gatesoupe, F.J. 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180: 147-165.

Gibson, L. F., Woodworth, J. and George, A. M. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture. 169: 111-120.

Giffith, D.R.W. 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. (Eds.), Larvi' 95. European Aquaculture Society, Great, Special Publication No. 24, p 478.

Gildberg, A., Johansen, A. and Bogwald, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protien hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture. 138: 23-34.

Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringo, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia.** 352: 279-285.

Gil-Turnes, M. F., Hay, M. E. and Fenical, W. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. **Science.** 246: 116-118.

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielsen, T. F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (3): 969-973.

Hansen, G. H. and Olafsen, J. A. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1435-1446.

Hansen, G. H. and Olafsen, J. A. 1999. Bacteria interactions in early life stages of marine cold water fish. **Microb. Ecol.** 38: 1-26.

Havnaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: a general reviews. In Wood, B. J. W. (ed.), **The lactic acid bacteria in health & disease**, vol 1, pp. 151-170. London: Elsevier Applied Science.

Holt, J. G. (editor-in cief): 1994. **Burgey's manual of determinative bacteriology.** 9th ed. London: William & Wilkins.

Joborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L. and Kjelleberg, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. **J. Fish. Dis.** 20: 383-392.

Karunasagar, I., Pai, R. and Malathi, G.R. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture.** 128 (3-4): 203-209.

Kitto, M.R. and Regunathan, C. 1998. Skeletonema can kill luminosis in shrimp hatcheries. Fish Farm November/December. **Marine Resources Co. Ltd.** 37-38.

Lavilla-Pitogo, C.R. 1995. Bacterial diseases of penaeid shrimp: an asian view. In **Diseases in Asian Aquaculture II**. M. Shariff, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe (eds.), pp. 107-121. Fish Health, Asian Fisheries Society, Manila.

Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. and Leobert, D. de la Pena. 1990. Occurance of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture.** 91 (1-2): 1-13.

Lightner, D. V. 1988. Vibrio diseases of penaeid shrimp In C.J Sinderman and D. V. Lightner (Ed), **Disease diagnosis and control in North America Marine Aquaculture.** Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Vol 6 Elsevier, Amsterdam, 42-72.

Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.** 147: 744-748.

Limsuwan, C. 1989. Common diseases found in cultured shrimp, in Thailand. Asian **Shrimp news,** 1989 1: fourth quarter.

Maeda, M. 1994. Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. **Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.** 1: 71-74.

Maeda, M. and Liao, I. C. 1994. Microbial processes in aquaculture environment and their importance for increasing crustacean production. **Jpn. Int. Res. Cent. Agricult. Sci.** 28: 283-288.

Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., Hirayama, K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. **Hydrobiologia.** 358: 285-290.

Maeda, T., Yoshinaga, I., Shiba, T., Murakami, M., Wada, A. and Ishida, Y. 2000. Cloning and sequencing of the gene encoding an aldehyde dehydrogenase that is induced by growing *Alteromonas* sp. strain KE10 in a low concentration of organic nutreints. **Applied and Environmental Microbiology.** pp. 1883-1889.

Moriarty, D. J. W. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic anomals, particularlythe nutritional role of the gut flora. In: Lesel, R. (Ed.), **Microbiology in Poecilotherms.** Elsevier, Amsterdam, pp. 217-222.

Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture.** 164: 351-358.

Moriarty, D. J. W. and Body, A. G. C. 1995. Modifying microbial ecology in ponds: the key to sustainable aquaculture, pp. 1-10. *In* **Proceedings of Fish Asia'95 conference:** 2nd Asian Aquaculture and Fisheries Exhibition and Conference. RAI Exhibitions, Singapore.

Nagomi, K. and Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 49: 2373-2376.

Nicolas, J. L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. and Ansquer, D. 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximas* larval culture. **Dis. Aquqt. Org.** 27: 67-76.

Olafsen, J. A. 1998. Interactions between hosts and bacteria in aquaculture, pp. 127-145. *In* **Proceeding from the US-EC workshop on marine microorganisms:** Research issues for biotechnology. European commission, Brussels, Belgium.

Olsson, J. C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. and Conway, P. L. 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in Juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. **J. Fish. Dis.** 21: 1-9.

Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Anim. Nutr. Health.** 29: 4-8.

Phianphak, W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 24 (1): 41-56.

Prayitno, S. B. and Latchford, J. W. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture.** 132: 105-112.

Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J. L., Plusquellec, A., Vigneulle, M. 1990. Interaction between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.** 28: 277-352.

Queiroz, J. and Boyd, C. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. J. World Aquacult. Soc. 29: 67-73.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. 167: 301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture. 191: 271-288.

Rico-Mora, R., Voltolina, D. and Villaescusa-Celaya, J. 1998. Biological control of Vibrio alginolyticus in Skeletonema costatum (Bacillariophyceae) cultures. Aquacultural Engineering. 19: 1-6.

Ringo, E., Strom, E. and Tabachek, J. A. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquacult. Res. 26: 773-789.

Ringo, E. and Vadstein, O. 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. J. Appl. Microbiol. 84: 227-233.

Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. and Candia, M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1891). Aquaculture. 154: 17-26.

Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Ssatomi, M., Ishida, Y. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. J. Shellfish Res. 15: 369-374.

Riquelme, C. E., Jorquera, M. A., Rojas, A. I., Avendano, R. E. and Reyes, N. 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecyen purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). Aquaculture. 192: 111-119.

Robertson, P. A. W., Dowd, C. O., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture. 185: 235-243.

Sae-Qui, D., Tansutapanit, A. and Ruangpan, L. 1989. *Vibrio harveyi*, a causative agent of luminescent syndrome in white shrimp nauplii, *Penaeus merguiensis*. In: NACA/WP/89/87.

Sakata, T. 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish. In: Lesel, R. (Ed.), Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam, pp. 171-176.

Smith, P. and Davey, S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-indcible furuncrosis by a fluorescent pseudomonad. J. Fish. Dis. 16: 521-524.

Stark, B.A. and Wilkinson, J.M. (Eds.). 1989. Probiotics: Theory and application. Chalcombe Publications.

Sugita, H., Matsuo, N., Shibuya, K. and Deguchi, Y. 1996. Production of antibacterial substances by intestinal bacteria isolated from coastal crab and fish species. J. Mar. Biotechnol. 4: 220-223.

Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. Aquaculture. 145 (1-4): 195-203.

Sunaryanto, A. and Marian, A. 1986. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesia hatcheries. Bull. Brackishwater Aquacult. Dev. Cent. 8: 64-70.

Tanasomwang, V., Nakai, T., Nishimura, Y. and Muroga, K. 1998. Vibrio-inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. Fish Pathology. 33 (5): 459-466.

Tansutapanit, D.S.O.A. and Ruangpan, L. 1987. *Vibrio harveyi* a causative agent of mortality in white shrimp nauplii, *Penaeus merguiensis* In: Abstr. Tech. Pat. No 6/30, Third Natl. Seminar on marine science, NSRC, Bangkok, Thailand.

Thongton, C. 1998. Bioactive substances from a marine bacteria *Alteromonas* sp. S9730. Master's Thesis, Chulalongkorn University. 87 pp.

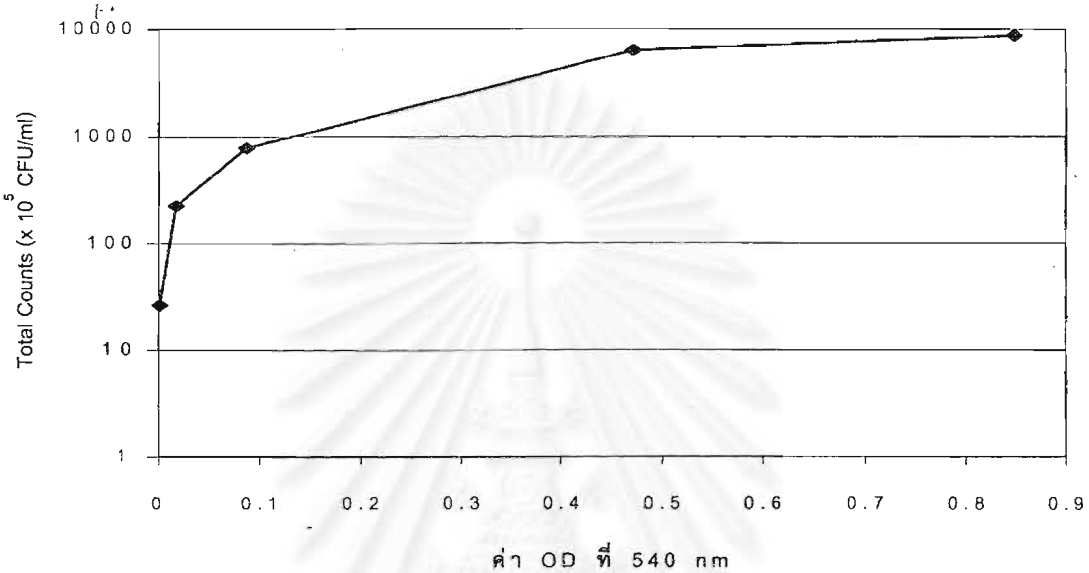
Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 655-671.

ภาคผนวก

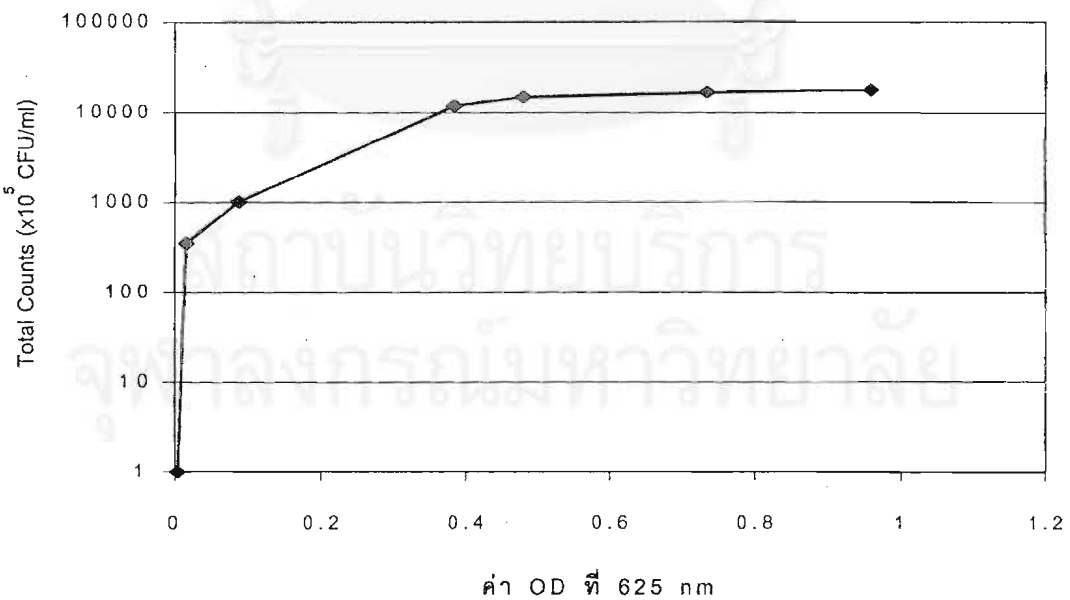
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณเชื้อ *Alteromonas* sp. S9730

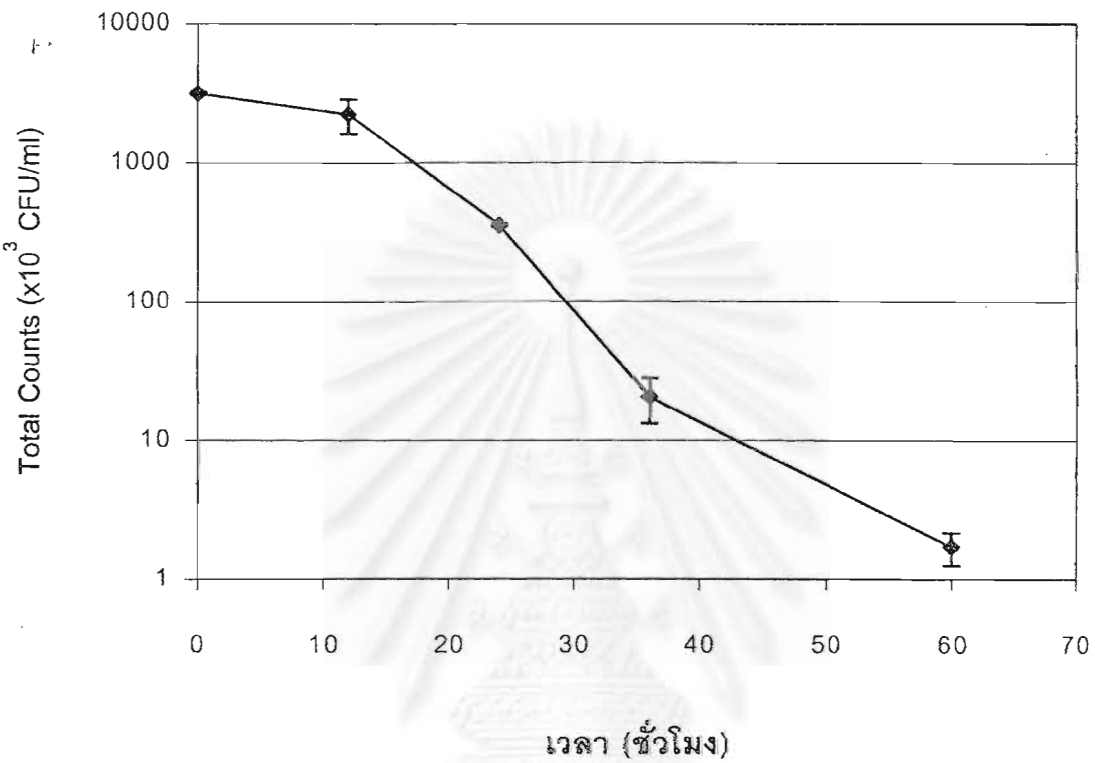


ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณเชื้อ *V. harveyi* 1526



ภาคผนวก ข

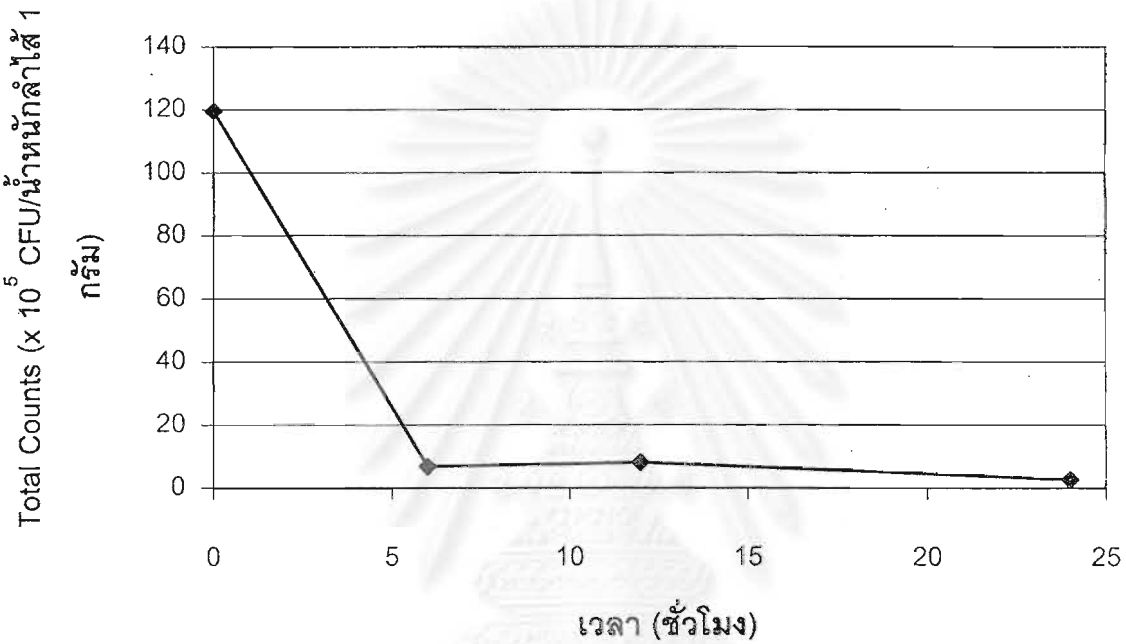
ปริมาณ *Alteromonas* sp. S9730 ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ปริมาณแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. S9730 ในลำไส้กุ้งกุลาดำขนาด 7.50±1.68 กรัม เมื่อแช่ด้วย *Alteromonas* sp. S9730 ความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml นาน 24 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวขนิษฐา แสงงาม เกิดเมื่อวันพุธที่ 22 ตุลาคม พ.ศ. 2518 ณ บ้านเลขที่ 53/1 ม.2 ต.โรงเข้ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร เข้ารับการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียน วัดปัจจันตาราม อ.เมืองฯ จ.สมุทรสาคร จากนั้นศึกษาต่อระดับมัธยมศึกษาต้นและปลายที่โรงเรียนศรัทธาสมุทร ต.ลาดใหญ่ อ.เมืองฯ จ.สมุทรสงคราม จบการศึกษาในปีการศึกษา 2536 และสอบเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีในโครงการ วพ. ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2537 เลือกศึกษาในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล สำเร็จการศึกษาและเข้ารับพระราชทานปริญญาบัตรในปีการศึกษา 2540 หลังจากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปี พ.ศ.2541

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย