



สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
สวทศ

รายงานสืบเนื่อง
งานประชุมวิชาการระดับชาติ
ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
เครือข่ายสถาบันอุดมศึกษาภาคใต้ ครั้งที่ 7

วันที่ 10-11 มีนาคม พ.ศ. 2565
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและ กุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด

Isolation of Lactic Acid Bacteria and Luminous *Vibrio* Species from Shrimp Ponds and Shrimp Distributed in Market

อานิชะห์ ลาตะะ¹ และ สุธิมา ปรีเปรม^{1,2*}

¹ หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

² หลักสูตรจุลชีววิทยาทางการแพทย์และอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

* Corresponding author, E-mail: sutima.p@yru.ac.th

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคและช่วยส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ให้ดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และคัดแยก *Vibrio* spp. สายพันธุ์เรืองแสงที่เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในกุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งด้วย MRS agar ผสม Bromocresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม และรูปร่างท่อนจำนวน 4 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ นอกจากนี้แบคทีเรียทั้งหมดสามารถเจริญในเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0-10 การคัดแยก *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากตัวอย่างบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง 7 ตัวอย่างและกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด 1 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดแยก *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงได้ 1 ไอโซเลตจากตัวอย่างกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดแต่ไม่พบเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง โดย *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงที่คัดแยกได้มีลักษณะโคโลนีสีเขียวมเทาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และสามารถเรืองแสงได้ในที่มืด ดังนั้นงานวิจัยจึงชี้ให้เห็นว่าระบบทางเดินอาหารของกุ้งเป็นแหล่งของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคาดว่ามีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก นอกจากนี้ในตัวอย่างกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดยังมีการปนเปื้อนของ *Vibrio* spp. สายพันธุ์เรืองแสงที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในกุ้ง

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสง กุ้ง

Abstract

Lactic acid bacteria that are bacteria usually exhibited probiotic properties. Probiotic bacteria are microorganisms which can inhibit pathogenic bacteria and improves animal health. Therefore, this research was aimed to isolate lactic acid bacteria that feature as probiotic and to isolate luminous *Vibrio* species which one of the important causative agents in shrimp from shrimp ponds and shrimp distributed in market. The result of lactic acid bacteria isolation on MRS agar + 0.04% Bromocresol purple showed that 5 lactic acid bacteria were isolated from digestive tract of shrimp which 4 isolates and 1 isolate were gram-positive cocci bacteria and gram-positive bacilli bacteria, respectively. All of these bacteria were able to grow in media + 0-10% of bile salt. The isolation of luminous *Vibrio* spp. from 7 samples of shrimp pond and 1 sample of shrimp distributed in market showed that 1 isolate of luminous *Vibrio* sp. was detected in shrimp collected from market but this strain was not detected in shrimp ponds. Luminous *Vibrio* sp. presented grayish green colony on TCBS and could glow in the dark. Therefore, this study indicated that

the digestive tract of shrimp is source of lactic acid bacteria that may exhibited probiotic properties. In addition, shrimp distributed in market contains luminous *Vibrio* sp., a causative agent of vibriosis in shrimp.

Keywords: lactic acid bacteria, luminous *Vibrio*, shrimp

1. บทนำ

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งประมาณร้อยละ 40 ซึ่งอยู่ทั้งในส่วนภาคใต้ฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน (กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561) ทั้งนี้กุ้งจัดเป็นสินค้าที่สร้างรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ (ณัชภัทร แสงธรรมหนอ, 2560) ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตซึ่งเกิดจากการจัดการระหว่างการเพาะเลี้ยงในหลายปัจจัยเช่น การจัดการบ่อกุ้งที่ไม่ดี การปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง คุณภาพของอาหาร การให้อาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนสูงจึงทำให้เกิดของเสียสะสมในบ่อเพาะเลี้ยงและส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำแ่ล่ง ซึ่งนำไปสู่การอ่อนแอและการป่วยของลูกกุ้งจึงทำให้ได้ผลผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งซึ่งมักเกิดการติดเชื้อในกุ้งระยะวัยอ่อน (larvae) ระยะโพสท์ลาวา (postlarvae) และระยะวัยรุ่น (juvenile) รวมถึงกุ้งที่อ่อนแอจากสาเหตุอื่น (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; กุสุมาวดี ฐานเจริญ, 2560) แบคทีเรียก่อโรคในกุ้งที่สำคัญคือแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยโรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้แก่ โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* และโรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (Luminescent disease) ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *V. harveyi* และ *V. campbellii* (สุบัณฑิต นิมรัตน์ และคณะ, 2560) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงซึ่งเป็นโรคที่ทำให้กุ้งมีอาการอ่อนแอ ไม่มีแรง ตับและตับอ่อนถูกทำลาย ลำไส้มีเซลล์ตายและเกิดการอักเสบซึ่งจะนำไปสู่การตายของกุ้งในที่สุด นอกจากนี้กุ้งที่ติดเชื้อมักขึ้นมาเกาะตามขอบบ่อหรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำจึงทำให้มองเห็นการเรืองแสงในเวลากลางคืนได้อย่างชัดเจน (กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561) สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้งจะมีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นหลักทั้งนี้เมื่อกุ้งได้รับสารปฏิชีวนะเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดสารตกค้างในเนื้อกุ้งและอาจเกิดอันตรายต่อผู้บริโภค (Timboontum, 2001) ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ทางเลือกอื่น ๆ ในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำ เช่น การใช้พืชสมุนไพรในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ การใช้กรดไขมันต่อการเจริญเติบโตของกุ้งและยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง และการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการรักษาโรคติดเชื้อในกุ้ง เป็นต้น ก่อนหน้านี้มีการรายงานถึงการโปรไบโอติกเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่าง ๆ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มักมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์สามารถช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและทำให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารของสัตว์จึงส่งผลในการช่วยให้สัตว์มีสุขภาพที่ดีขึ้น (Ahmed *et al.*, 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากตัวอย่างบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด และศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกในการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาแนวทางการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ก่อโรคเรืองแสงในกุ้งและเป็นประโยชน์ในการต่อยอดเพื่อพัฒนาวิธีทางเลือกที่จะช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

เก็บตัวอย่างกุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยนำส่วนระบบทางเดินอาหารของกุ้งมาบดแล้วผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นคัดแยกเชื้อโดยวิธี Cross streak ลงบนอาหาร de-man Rogosa and Sharpe (MRS) agar ผสม

Bromocresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร MRS agar ผสม Bromocresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 และทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak บนอาหาร MRS agar ผสม Bromocresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 จากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561)

2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเจริญในอาหารที่มีเกลือน้ำดี (อรรวรรณ บุตรดี และคณะ, 2556)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงปรับปริมาณเชื้อให้มีค่าเท่ากับ McFarland No. 0.5 นำเชื้อแต่ละไอโซเลตที่ปรับความเข้มข้นของเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่มีส่วนผสมของเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบแต่ละชุดซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อโดยการตรวจสอบความขุ่น และยืนยันการเจริญของเชื้อด้วยวิธีการ Drop plate บนอาหาร MRS agar ผสม Bromocresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงสังเกตการเจริญและบันทึกผลการทดลอง (อรรวรรณ บุตรดี และคณะ, 2556; มารุตพงศ์ ปัญญา และคณะ, 2557)

2.3 การคัดแยกเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากกุ้ง

ทำการคัดแยกเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคเรืองแสงโดยนำตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ กุ้ง น้ำ และตะกอนดิน และกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด มาบดและผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Spread plate ลงบนอาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้น จึงคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเรืองแสงได้ในที่มืด และนำโคโลนีที่เรืองแสงได้นี้มาคัดแยกให้บริสุทธิ์ โดยการ Cross streak ลงบนอาหาร TCBS จากนั้นตรวจสอบและบันทึกลักษณะของโคโลนี (ดัดแปลงจากกุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561)

3. ผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงและกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด โดยแยกบนอาหาร MRS agar ที่เติม Bromocresol purple ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้จำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เติม Bromocresol purple เป็นสีเหลืองเข้ม สีเหลืองอ่อน และสีเหลืองอมครีม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อที่แยกได้สามารถผลิตกรดแลคติก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งหมดไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์ออกซิเดส และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมจำนวน 4 ไอโซเลต และรูปร่างท่อนจำนวน 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

ไอโซเลต	ลักษณะการเจริญบนอาหาร	ลักษณะภายใต้กล้อง
11	โคโลนีสีเหลือง/ขุ่น/ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่
12	โคโลนีสีเหลือง/ขอบเรียบ/นูน	แกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่
13	โคโลนีสีเหลือง/ขุ่น/ขอบขรุขระ	แกรมบวก รูปร่างท่อน เรียงตัวเป็นสาย
14	โคโลนีสีเหลืองครีม/ไม่ขุ่น/ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม
15	โคโลนีสีเหลือง/ขุ่น/ด้านบนขรุขระ/ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นสาย

จากการทดสอบการเจริญในอาหารที่มีเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 5 ไอโซเลต โดยทดสอบที่ความเข้มข้นของเกลือแร่ร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10 และตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยการสังเกตความขุ่นและป็นย่น การเจริญของเชื้อด้วยวิธีการ Drop plate พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือแร่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10 (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีความสามารถในการทนต่อเกลือแร่ได้ในทุกความเข้มข้นของเกลือแร่ที่ทดสอบ

ตารางที่ 2 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือแร่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10

ไอโซเลต	ร้อยละความเข้มข้นของเกลือแร่																	
	0	2	4	6	8	10												
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

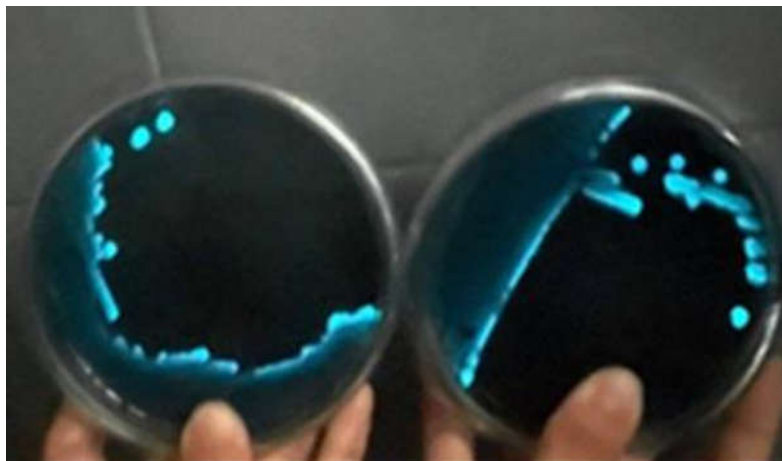
หมายเหตุ + หมายถึง มีเชื้อเจริญ
- หมายถึง ไม่มีเชื้อเจริญ

จากการคัดแยกเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคเรืองแสงจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ กุ้ง น้ำ ตะกอนดิน และกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดจำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อ *Vibrio* sp. ที่เรืองแสงได้จำนวน 1 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างกุ้ง ที่วางจำหน่ายในตลาด (ตารางที่ 3) และเมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาคัดแยกให้บริสุทธิ์โดยการ Cross streak บนอาหาร TCBS พบว่า เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีสีเขียวอมเทา ขอบเรียบ เมื่อนำมาตรวจสอบการเรืองแสงในที่มืด พบว่าเชื้อดังกล่าวมีการเรืองแสงเป็นสีฟ้าเข้ม (ภาพที่ 1) ส่วนตัวอย่างที่เก็บจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถพบเชื้อบนอาหาร TCBS ซึ่งมีโคโลนีเป็นลักษณะสีเขียวทึบ ขอบเรียบ และสีเหลือง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการเรืองแสงของเชื้อดังกล่าว จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ตัวอย่างกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดมีการปนเปื้อนของเชื้อเรืองแสงซึ่งเป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคติดเชื้อของกุ้งที่สำคัญ

ตารางที่ 3 ตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ กุ้ง น้ำ ตะกอนดิน และกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดนำมาคัดแยกเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากกุ้ง

ตัวอย่าง	เชื้อ <i>Vibrio</i> ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้ง	ลักษณะของเชื้อบนอาหาร TCBS
กุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยง 1	-	-
กุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยง 2	-	-
กุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยง 3	-	-
น้ำจากบ่อเพาะเลี้ยง 1	-	-
น้ำจากบ่อเพาะเลี้ยง 2	-	-
ตะกอนดินจากบ่อเพาะเลี้ยง 1	-	-
ตะกอนดินจากบ่อเพาะเลี้ยง 2	-	-
กุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด	+	โคโลนีสีเขียวอมเทา ขอบเรียบ และเรืองแสงได้ในที่มืด

หมายเหตุ + หมายถึง พบเชื้อเรืองแสง
- หมายถึง ไม่พบเชื้อเรืองแสง



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีเรืองแสงของเชื้อ *Vibrio* ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด

4. อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งและกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาด สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต โดยเชื้อเหล่านี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยแบคทีเรียรูปร่างกลม 4 ไอโซเลต และรูปร่างท่อน 1 ไอโซเลตซึ่งไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์ออกซิเตส นอกจากนี้จากการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลตที่คัดแยกสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ ปี พ.ศ. 2561 ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามและสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 327 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมมากกว่ารูปร่างท่อนเช่นเดียวกัน (กุสุมาวดี ฐานเจริญ และคณะ, 2561) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ ศิริรัตน์ สีหานาท และคณะ ปี พ.ศ. 2547 ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินซึ่งรายงานได้ว่า สามารถคัดแยก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่าง ๆ รวมถึงสภาวะที่มีเกลือ น้ำดีและมีการยืนยันว่า เชื้อดังกล่าว เป็นเชื้อ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* และ *Pediococcus* (ศิริรัตน์ สีหานาท และคณะ, 2547) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งช่วยในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและส่งเสริมการเจริญของกุ้ง เช่น งานวิจัยของ Balasingham และคณะ ปี ค.ศ. 2017 ซึ่งทำการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ซึ่งคุณสมบัติการทดสอบทางชีวเคมีตรงกับเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus plantarum* มีคุณสมบัติ ในการทนต่อกรด-ด่าง (pH 2-9) ทนต่อน้ำดี (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.3) และมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งชี้ให้เห็นถึง การมีคุณสมบัติของเชื้อโปรไบโอติกที่ดี และจากงานวิจัยของ อรวรรณ บุตรดี และคณะ ปี พ.ศ. 2556 ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรีย จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติ สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ได้จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อ ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในสภาวะของไซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-9 สภาวะ pH 5-9 สภาวะอุณหภูมิ ตั้งแต่ 20-42 องศาเซลเซียส และสภาวะเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-3 นอกจากนี้ *Bacillus* spp. นี้ยังสามารถยับยั้ง เชื้อก่อโรคได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *A. hydrophila*, *V. harveyi* และ *E. coli* ดังนั้นเชื้อดังกล่าวจึงเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติ ที่เหมาะสมในการเลือกใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้ (Balasingham *et al.*, 2017; อรวรรณ และ คณะ, 2556) จากรายงานวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อโปรไบโอติกเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนา เป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญของกุ้งและยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค และรวมถึงการลดการใช้ ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นจากผลการวิจัยครั้งนี้ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหาร ของกุ้ง ซึ่งเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติหนึ่งในการเป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยสามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือ น้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10 ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาจจะเป็นเชื้อโปรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อกุ้ง แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกยังจำเป็นต้องมีการศึกษาคูณสมบัติอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อเหล่านี้ มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโปรไบโอติก เช่น การศึกษาการเจริญในอาหารที่ pH ต่าง ๆ และการเจริญในอาหารที่มี ไซเดียมคลอไรด์ เป็นต้น

การคัดแยกเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคเรืองแสงโดยคัดแยกจากบ่อเพาะเลี้ยง ได้แก่ กุ้ง น้ำ ตะกอนดิน และกุ้งที่วาง จำหน่ายในตลาดจำนวนทั้งหมด 8 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อ *Vibrio* sp. ที่เรืองแสงได้จำนวน 1 ไอโซเลตจากตัวอย่าง กุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดแต่ไม่ตรวจพบเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในพื้นที่บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เก็บตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อเรืองแสงที่มักเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในกุ้ง ทั้งนี้อาจจะ เนื่องมาจากเกษตรกรมีการเตรียมบ่อ การจัดการอาหาร การดูแลสุขภาพกุ้ง และการควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ดี ทำให้ในพื้นที่บ่อสะอาดไม่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อก่อโรค และส่งผลให้ลูกกุ้งมีสุขภาพดี แข็งแรงและไม่ติดเชื้อ (กุสุมาวดี ฐานเจริญ, 2560) ส่วนในตัวอย่างกุ้งที่วางจำหน่ายในตลาดซึ่งมีการพบเชื้อเรืองแสงโดยเชื้อที่พบในตัวอย่างกุ้งอาจจะเป็น แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เช่น *V. harveyi* หรือ *V. campbellii* ที่สามารถทำให้เกิดโรคติดเชื้อเรืองแสงในกุ้ง และ เชื้อเหล่านี้ยังไม่มีรายงานการติดเชื้อในมนุษย์ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถถูกทำลาย ได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อน ดังนั้นการปรุงอาหารให้สุกจึงสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการติดเชื้อกลุ่มดังกล่าวได้ (Kumaret *et al.*, 2014) สำหรับการติดเชื้อก่อโรคในกุ้ง จากรายงานก่อนหน้านี้มีการรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคติดเชื้อ ในกุ้ง ได้แก่ ความหนาแน่นของกุ้ง การปล่อยกุ้งหนาแน่นเกินขนาดพื้นที่และการให้อาหารมากเกินไปจึงส่งผลต่อคุณภาพ ของสิ่งแวดล้อมในบ่อและนำไปสู่การติดเชื้อก่อโรคในกุ้งได้ (ณัชภัทร แสงธรรมพนอน, 2560) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับ การแยกเชื้อกลุ่ม *Vibrio* โดยจากงานวิจัยของ ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์ และคณะ ปี พ.ศ. 2558 ได้คัดแยกเชื้อ *Vibrio* spp. จากตัวอย่างกุ้ง ปลา และตัวอย่างสิ่งแวดล้อม โดยสามารถคัดแยกเชื้อ *Vibrio* ได้หลายสายพันธุ์และมีการพบ *V. harveyi* จำนวน 68 ไอโซเลตซึ่งคิดเป็นร้อยละ 32 จากเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดที่แยกได้ (ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์ และคณะ, 2558) และงานวิจัยของ Vandenbergh *et al.* และคณะ ปี ค.ศ. 2003 ได้ทำการศึกษาระบบการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp.

จากตัวอย่างหอยกึ่งเลี้ยง กึ่งทะเล ปลา อาหารสด สาหร่ายทะเล และผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำจากประเทศต่าง ๆ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในตัวอย่างซึ่งสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ *V. harveyi* ที่มาจากตัวอย่างกึ่ง (สุภณิตติ นิมรัตน์ และคณะ, 2548; Vandenberghe *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี่ที่มีการตรวจพบเชื้อ *Vibrio* sp. สายพันธุ์เรืองแสงที่อาจจะเป็นเชื้อ *V. harveyi* หรือ *V. campbellii* จากตัวอย่างอาหารทะเลที่วางจำหน่ายในตลาด จากผลการวิจัยนี้ที่แสดงให้เห็นว่า ในตัวอย่างบ่อเพาะเลี้ยงกึ่งที่นำมาศึกษานั้นไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงแต่ในตัวอย่างกึ่งที่วางจำหน่ายในตลาดมีการตรวจพบเชื้อดังกล่าวจำนวน 1 ไอโซเลตจึงแสดงให้เห็นถึงแหล่งที่มาของกึ่งดังกล่าวเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงอยู่ซึ่งอาจทำให้กึ่งมีการติดเชื้อเรืองแสงที่สามารถทำให้กึ่งมีอาการอ่อนแอ ไม่มีแรง ตับและตับอ่อนถูกทำลายและนำไปสู่การตายของกึ่งได้ โดยสรุปจากงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้จากระบบทางเดินอาหารของกึ่งจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมจำนวน 4 ไอโซเลต และรูปร่างท่อนจำนวน 1 ไอโซเลต และแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยสามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือแร่ได้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0-10 นอกจากนี้ในการคัดแยกเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากตัวอย่างบ่อเพาะเลี้ยงกึ่งและกึ่งที่วางจำหน่ายในตลาด สามารถแยกเชื้อเรืองแสงได้จากตัวอย่างกึ่งที่วางจำหน่ายในตลาดได้จำนวน 1 ไอโซเลต ซึ่งทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงที่แยกได้เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของโปรไบโอติกและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสงในกึ่งเพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงกึ่งด้วยการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกร่วมกับอาหารเลี้ยงกึ่งและทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นแนวทางสำคัญที่จะช่วยส่งเสริมให้กึ่งมีคุณภาพที่ดีขึ้นได้อย่างปลอดภัย รวมถึงช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและ *Vibrio* สายพันธุ์เรืองแสงจากบ่อเพาะเลี้ยงกึ่งและกึ่งที่วางจำหน่ายในตลาดได้ดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณพารมเพาะเลี้ยงกึ่ง มานพพาร์ม ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการคัดแยกเชื้อ และขอขอบคุณหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

- กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2560). การใช้ประโยชน์จากโปรไบโอติกแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในบ่อเลี้ยงกึ่งก้ามกรามจังหวัดกาฬสินธุ์. (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์): มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
- กุสุมาวดี ฐานเจริญ, จีรารัตน ธงหาญ, สุพิชญา อุปปุย, และวริดา พลาศรี. (2561). การคัดแยกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในกึ่งก้ามกราม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, 37(5), 659-665.
- ณัฏภัทร แสงธรรมหนอ. (2560). การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคงู *Vibrio* spp. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). หาดใหญ่: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ณัฐวรรณ เสริมวิทย์วงศ์, พิมลศรี มิตรภาพอาทร และจำเริญศรี อวารสุวรรณ. (2558). การหาเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในปลาเพาะเลี้ยง. (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์). หาดใหญ่: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- มารุตพงศ์ ปัญญา, วีระพงศ์ ลุฒิตานนท์, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, ฉันทนาการ ศรีวรรมาศ, ธาณิน ไชยวงศ์, และฐาปนีย์ ถิ่นบ้านใหม่. (2557). คุณสมบัติโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอุจจาระเด็กแรกเกิด. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 16(3), 35-42.
- ศิริรัตน์ สีหานาท, ลือชัย บุตคุป, สมคิด แซ่กกลาง และวิชัย สีสาวรรมาศ. (2547). การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกึ่งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กึ่งก้ามกราม. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1), 265-274.

- สุบัญญัติ นิมิตรตัน, แก้วการต์ ศักดิ์อ่อนชัชชาญ, นเรศ เชื้อสุวรรณ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2548). การแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัตว์ทะเลจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 10(1-2), 83-91
- สุบัญญัติ นิมิตรตัน, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, และปริญทร์ ชัยวิสุทธิธากร. (2560). การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกรูปแบบใหม่เพื่อการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม. (รายงานผลการวิจัย). ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อรวรรณ บุตรดี, พรพรรณ อยู่สุวรรณ, และกัญญา สอนสนิท. (2556). การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 2(1), 10-20.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q. and Imran, M. (2010). *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. *African Journal of Biotechnology*, 9(20), 2843-2850.
- Balasingham, K., C. Valli, L. Radhakrishnan, and D. Balasuramanyam. (2017). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from swine intestine. *Veterinary World*, 10, 825-829.
- Kumaret, B.K., Deekshit, V.K., Raj, J.R.M., Rai, P., Shivanagowda, B.M., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2014). Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquaculture*, 433, 247-251.
- Lavilla-Pitogo C. R., Baticados M. C. L., Lruz-Lalierda E. R. and De la Pena L. D. (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*. 91: 1-13.
- Timboontum, W. (2001). Screening of Microorganisms as Probiotic for feeding Giant Freshwater Prawn (*Microbranchium rosenbergii*). Master's thesis. Kasetsart University. (In Thai).
- Vandenbergh J., Thompson FL., Gomez-Gil B. and Swings J. (2002). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*, 219, 9-20.