บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

จากตัวอย่างน้ำทะเลและตะกอนดิน 249 ตัวอย่าง แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ 7 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่ละสายพันธุ์มีรูปร่างของเซลล์และสีของโคโลนีแตกต่างกัน โดยจะมีทั้งโคโลนีแบบนูน (convex), แบน (slight) และแบบขรุขระ (crateriform) เป็นต้น ส่วนสีของโคโลนีนั้นเป็นสีแดง 4 สายพันธุ์คือ SR2a, SR16a, SR16b, SK99 สีน้ำตาล 2 สายพันธุ์คือ SR2b และ SR15a ส่วนสายพันธุ์ SR15b นั้นมีสีม่วงแดง (ตารางที่ 11) โดยสายพันธุ์ SR2a, SR2b, SR15a, SR15b SR16a และ SR16b เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ส่วนสายพันธุ์ SK99 แยกจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่จังหวัดสงขลา

แบคทีเรียสังเคราะห์ที่แยกได้ทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีและมีเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ จึงจัดเป็นแบคทีเรียชนิดทนเค็ม และไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีซัลไฟด์ ซึ่ง Noparatnaraporn และ Nagai (1986) รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์ที่แยกได้จากดินและน้ำบริเวณกรุงเทพมหานคร ที่ไม่เจริญในอาหารที่มีซัลไฟด์จะจัดอยู่ในวงศ์ *Rhodospirillaceae* เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม purple nonsulfur ส่วน Watanabe และ คณะ (1998) รายงานว่าเมื่อใช้อาหาร GM พีเอช 8.0 แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย พบว่าสายพันธุ์ PS88 เป็นแบคทีเรียชนิดทนเกลือ ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือแกงตั้งแต่ 0-6 เปอร์เซ็นต์ Vethanayagam (1991) แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากดินตะกอนบริเวณป่าชายเลน และในทะเลสาบ (Shoreit *et al.*, 1989) จากรายงานการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถพบได้ทั่วไปสอดคล้องกับรายงานของ Pfennig (1967) ซึ่งกล่าวว่าพบแบคทีเรียนี้ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม หรือในดิน

2. การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ เจริญได้ดีในอาหาร GM ที่มีเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4) โดยสายพันธุ์ SR2a, SR2b, SR15a, SR15b, SR16a, SR16b และ SK99 มีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) เท่ากับ 0.22, 0.12, 0.14, 0.15, 0.21, 0.22 และ 0.15 ต่อชั่วโมง ตามลำดับและมีค่าปริมาณมวลเซลล์สูงสุด (maximum cell mass) เท่ากับ 1.30, 1.25, 0.87, 1.11, 1.34, 1.33 และ 0.90 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงนาน 60, 72, 78, 54, 72, 72 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 11 รูปร่างโคโลนี สี รูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม และสมบัติบางประการของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

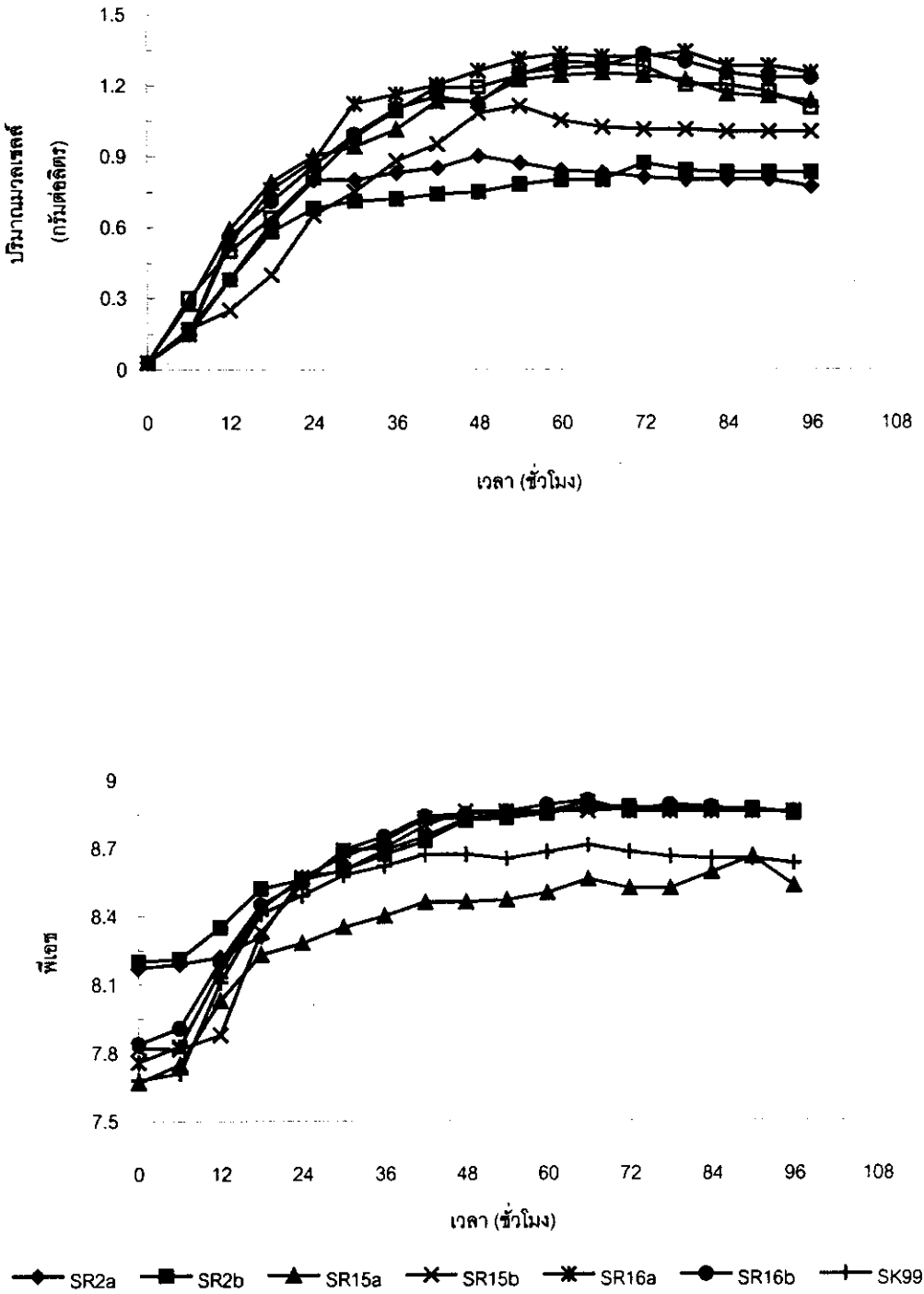
รหัสเชื้อ	รูปร่างโคโลนี	สีโคโลนี	รูปร่างเซลล์	ติดสีแกรม	การเจริญในอาหาร GM ที่มีและไม่มีเกลือแกง	การเจริญในอาหารซัลไฟด์
SR2a	โคโลนีแบน ขอบเรียบ	สีแดง	กลม	-	+	-
SR2b	โคโลนีขรุขระ ขอบเรียบ	สีน้ำตาล	กลม	-	+	-
SR15a	โคโลนีแบน ขอบเรียบ	สีน้ำตาล	กลม	-	+	-
SR15b	โคโลนีนูน ขอบเรียบ	สีม่วง-แดง	กลม	-	+	-
SR16a	โคโลนีนูน ขอบเรียบ	สีแดง	กลม	-	+	-
SR16b	โคโลนีแบน ขอบหยัก	สีแดง	กลม	-	+	-
SR99	โคโลนีแบน ขอบเรียบ	สีแดง	กลม	-	+	-

จากการทดลองพบว่าแต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญในอาหาร GM ได้ไม่เท่ากัน โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณมวลเซลล์ที่ได้จากการเจริญของเชื้อที่เวลาต่างๆกันจะเห็นว่าสายพันธุ์ SR16a มีค่าปริมาณมวลเซลล์มากที่สุด SR2a และ SR16b มีอัตราการเจริญจำเพาะดีที่สุด ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหาร GM ในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ เปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้นในช่วง 7.60-8.17 เป็น 8.71-8.90 หลังเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง

3. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

3.1 การศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ การรักษาอาการติดเชื้อเรืองแสงจาก *V. harveyi* นั้นจะนิยมใช้ยาปฏิชีวนะที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไปในท้องตลาด ได้แก่ ออกซีเตตร้าซัยคลิน นอร์ฟล็อกซาซิน คลอแรมฟินิคอล และ กรดออกโซลินิก จึงทดลองนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้ทุกสายพันธุ์มาศึกษาการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทุกสายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ซึ่งอาจเป็นไปได้

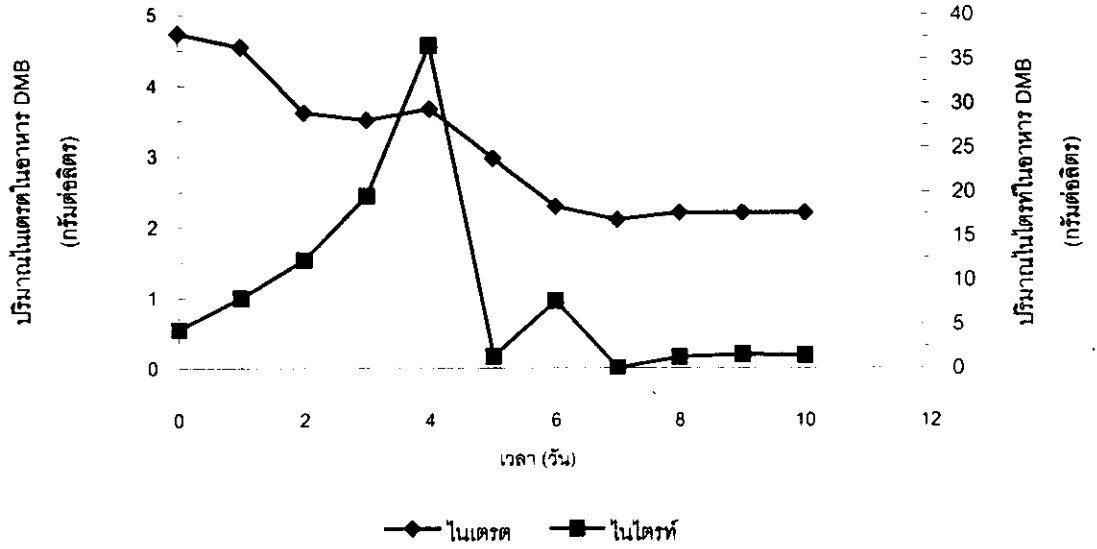


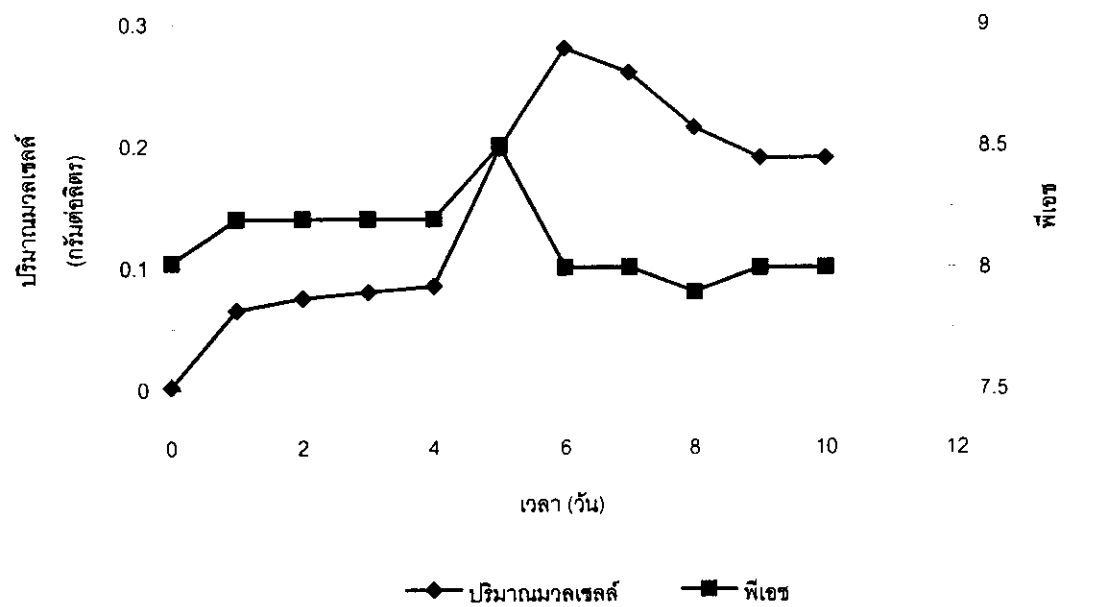
ภาพที่ 4 ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร GM +เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

ว่า *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาบางชนิดอยู่แล้ว หรืออาจเป็นไปได้ว่าสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสร้างขึ้นมีความเข้มข้นต่ำมากจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ Burgess และคณะ (1991) รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Chromatium purpurratum* NKPB 031704 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชนิด broad spectrum ที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ (*Saccharomyces cerevvisiae*) ได้ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้เช่น Gram และคณะ (1999) รายงานว่า *Pseudomonas fluorescences* AH2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio anguillarum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้

3.2 การลดไนเตรทและไนไตรท์

จากการทดลองคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 7 สายพันธุ์ ในอาหารแข็ง DMB ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง นาน 7 วัน พบว่ามีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ และนอกจากนี้พบว่า SR15b สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว DMB ทั้งในสภาวะไร้อากาศ มีแสง และมีอากาศ ไร้แสง เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหาร DMB ซึ่งมีโปแตสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งซัลเฟอร์ ดังนั้นการที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญในอาหาร DMB แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้โปแตสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ในภาพที่ 5 เป็นผลการศึกษาการเจริญของ SR15b การลดไนเตรทและการเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ในอาหารเหลว DMB ที่เวลาต่างๆกัน ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง พบว่าปริมาณของไนเตรทในอาหาร DMB ที่เวลาเริ่มต้นเท่ากับ 4.73 กรัมต่อลิตร และค่อยๆจะลดลงจนเหลือ 2.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลอง โดยสามารถลดไนเตรทได้ 42 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไนไตรท์นั้นที่เวลาเริ่มต้นวัดค่าได้ 4.34 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาในการเลี้ยงเชื้อครบ 4 วัน ปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้นเป็น 36.48 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณไนไตรท์ลดลงและในวันที่ 7 ของการทดลองไม่สามารถวัดปริมาณไนไตรท์ได้ จึงแสดงให้เห็นว่า SR15b สามารถลดไนไตรท์ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 8 ของการทดลองนั้นเข้าใจว่าไนเตรทที่ยังคงมีเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jianwei และ Hirayama (1991) พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม *Rb.sphaeroides* ที่แยกได้จากทะเลสาบ Nakaumi ในประเทศญี่ปุ่น สามารถเกิด denitrification ได้ โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้ไนเตรทหรือไนไตรท์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะไร้อากาศ จึงมีประโยชน์คือสามารถกำจัดไนเตรทจากน้ำเสียได้ (Barnes and Wilson, 1978) ดังนั้นจึงเกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนคือ ในบ่อ





ภาพที่ 5 การลดลงของไนเตรท การเพิ่มขึ้นของไนไตรท์ ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร DMB +เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

เลี้ยงกุ้งมีการสลายตัวของสารอินทรีย์ เช่นเศษอาหารกุ้งและสิ่งขับถ่ายจากกุ้ง เป็นแอมโมเนีย (Chin and Chen, 1987) และเมื่อเกิดกระบวนการ nitrification จุลินทรีย์บางชนิดก็จะเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และไนเตรท ซึ่งถ้ามีปริมาณมากก็จะเกิดอันตรายแก่สัตว์น้ำ จากนั้นแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปิกเช่นแบคทีเรียแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะเปลี่ยนไนไตรท์และไนเตรทเป็นแก๊สไนโตรเจนโดยอาศัยกระบวนการ denitrification การใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการกำจัดสารตกค้างจากการเลี้ยงสัตว์น้ำเช่น Takeno และคณะ (1999) ใช้ *Rhodobacter sphaeroides* เพื่อกำจัดฟอสฟอรัสที่ตกค้างในตะกอนดินจากการเลี้ยงหอยนางรม ได้ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และ *Chromatium* sp. ที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลในประเทศญี่ปุ่นก็กำจัดฟอสเฟตจากน้ำทิ้งจากบ้านเรือนได้ (Sudo *et al.*, 1997) ส่วน Yamada และคณะ (1997) รายงานว่า *Rhodobacter* sp. ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลแถบประเทศญี่ปุ่นและประเทศฟิลิปปินส์ มีความสามารถลดปริมาณสารซิลิไนท์ (selenite) ได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จากสมบัติที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถลดสารไนเตรทและไนไตรท์ได้ จึงนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวจากทั้งหมด 7 สายพันธุ์ มาศึกษาสมบัติด้านอื่นๆต่อไป

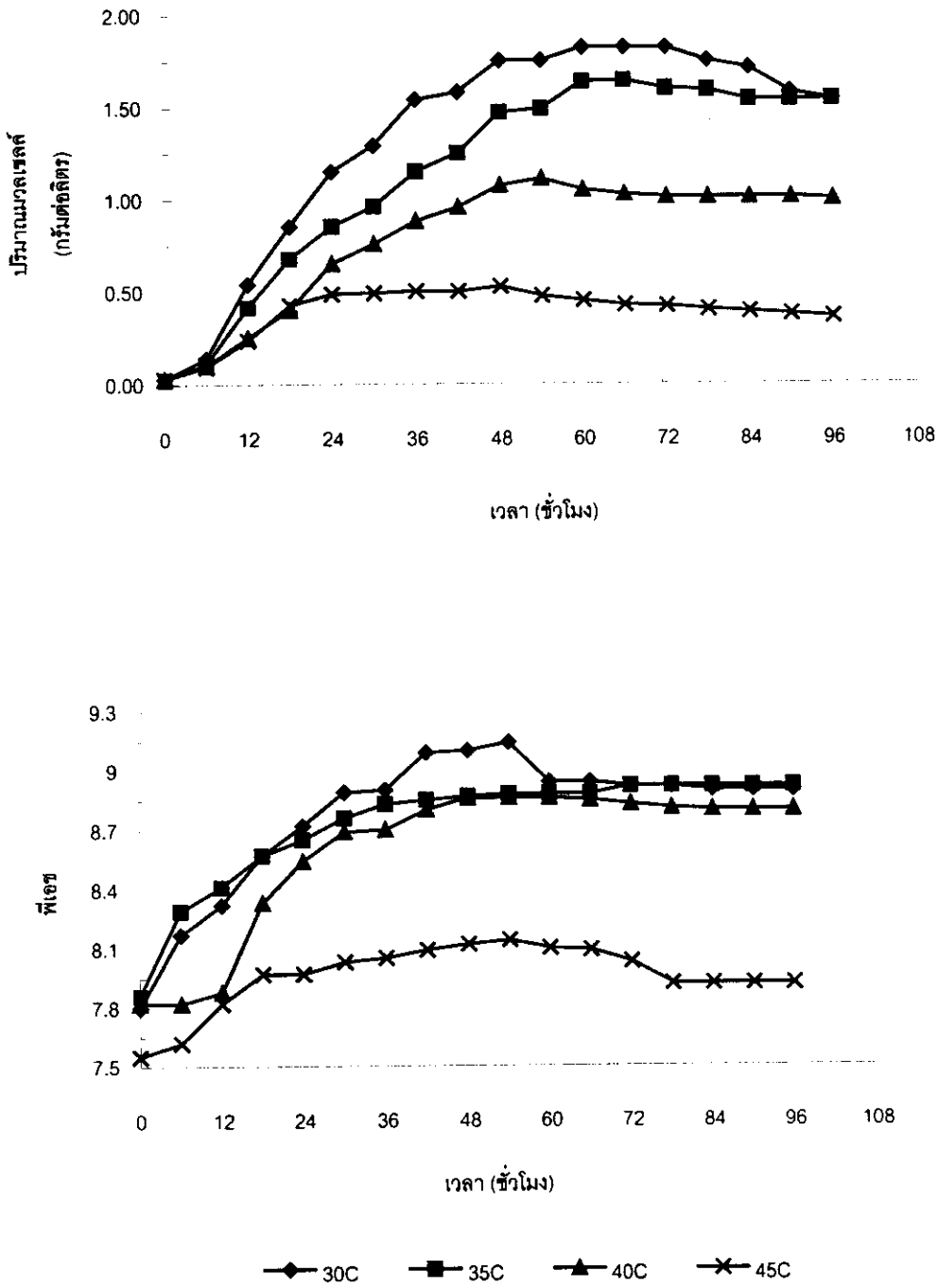
4. ชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์

ผลการทดลองพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR2a, SR2b, SR15a, SR15b, SR16a SR16b และ SK99 ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 60 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 801 และ 853 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวกที่ ง1-ง4) เป็นแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ชนิดชนิดเอ (Staley *et al.*, 1989)

5.ผลของสภาพแวดล้อมและอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

5.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกคือสายพันธุ์ SR15b สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6) แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 และ 55 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ เท่ากับ 0.15, 0.15, 0.15 และ 0.13 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงอุณหภูมิที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีค่าปริมาณมวลเซลล์สูงสุด เท่ากับ 1.82, 1.64, 1.11 และ

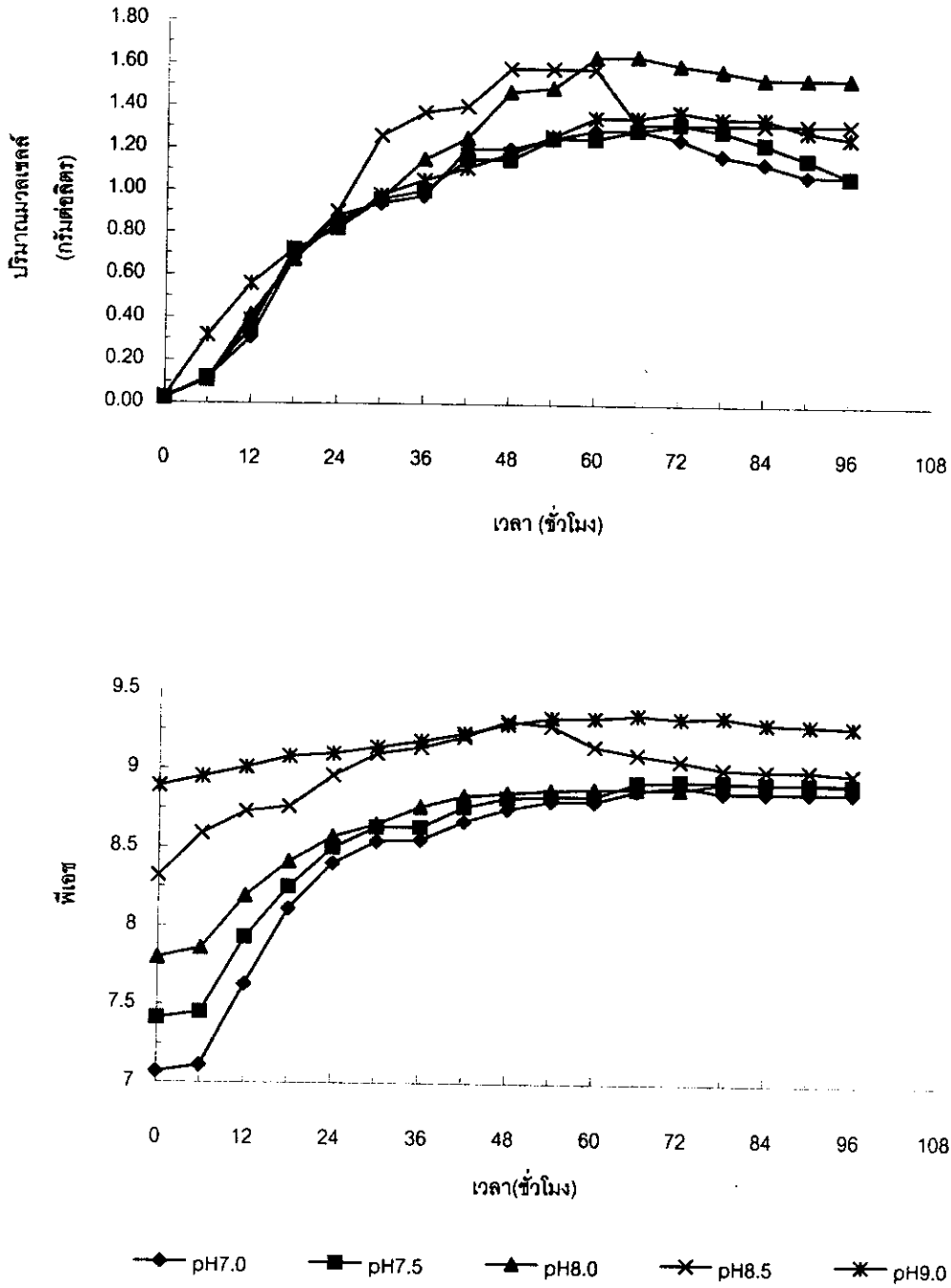


ภาพที่ 6 ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร GM + เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 30, 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

0.52 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงนาน 60, 60, 54 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในการทดลองครั้งนี้ SR15b เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Omerod *et al.*, 1961; Pfennig, 1969) จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์สายพันธุ์ SR15b สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส คือที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงจัดเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์สามารถเจริญได้ที่อุณห-ภูมิสูง เช่น Sasaki และ Nagai (1979) รายงานว่า *Rhodopseudomonas gelatinosa* เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส ส่วน Watanabe และคณะ (1981) รายงานว่า *R. gelatinosa* และ *Rhodopseudomonas sphaeroides* ที่แยกจากดินในประเทศญี่ปุ่น เจริญได้ดีทั้งที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส Eckersley และ Dow (1980) รายงานว่า *Rhodopseudomonas blastica* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ส่วน *Rhodopseudomonas capsulata* เจริญได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส เจริญได้น้อยที่ 40 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ในการทดลองขั้นต่อไปหลังจากนี้จะใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลองเนื่องจากว่าเป็นอุณหภูมิที่เท่ากับอุณหภูมิห้องปกติ ทำให้ไม่สิ้นเปลืองพลังงานในการควบคุมอุณหภูมิ และปริมาณมวลเซลล์ที่ได้จากอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ก็ไม่แตกต่างจากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มากนัก

5.2 พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกคือสายพันธุ์ SR15b สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14, 0.15, 0.15, 0.15 และ 0.07 ต่อชั่วโมง และมีปริมาณมวลเซลล์สูงสุด เท่ากับ 1.27, 1.32, 1.64, 1.58 และ 1.38 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 60, 72, 60, 66 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 7) ดังนั้นพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส คือ พีเอช 8.0 เมื่อพิจารณาแหล่งที่อยู่เดิมของ SR15b ซึ่งแยกมาจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีพีเอชประมาณ 8.0 ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชต่างๆกัน จึงสามารถเจริญในอาหารที่มีพีเอช 8.0 ได้ดีที่สุดเพราะมีสภาวะที่คล้ายกับแหล่งที่อยู่เดิม ซึ่ง Watanabe และคณะ (1998) รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodovulum* sp. ที่แยกได้จากน้ำทะเลเจริญได้ดีที่พีเอช 8.0 ซึ่งจะแตกต่างจากแบคทีเรีย



ภาพที่ 7 ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอชในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร GM+เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

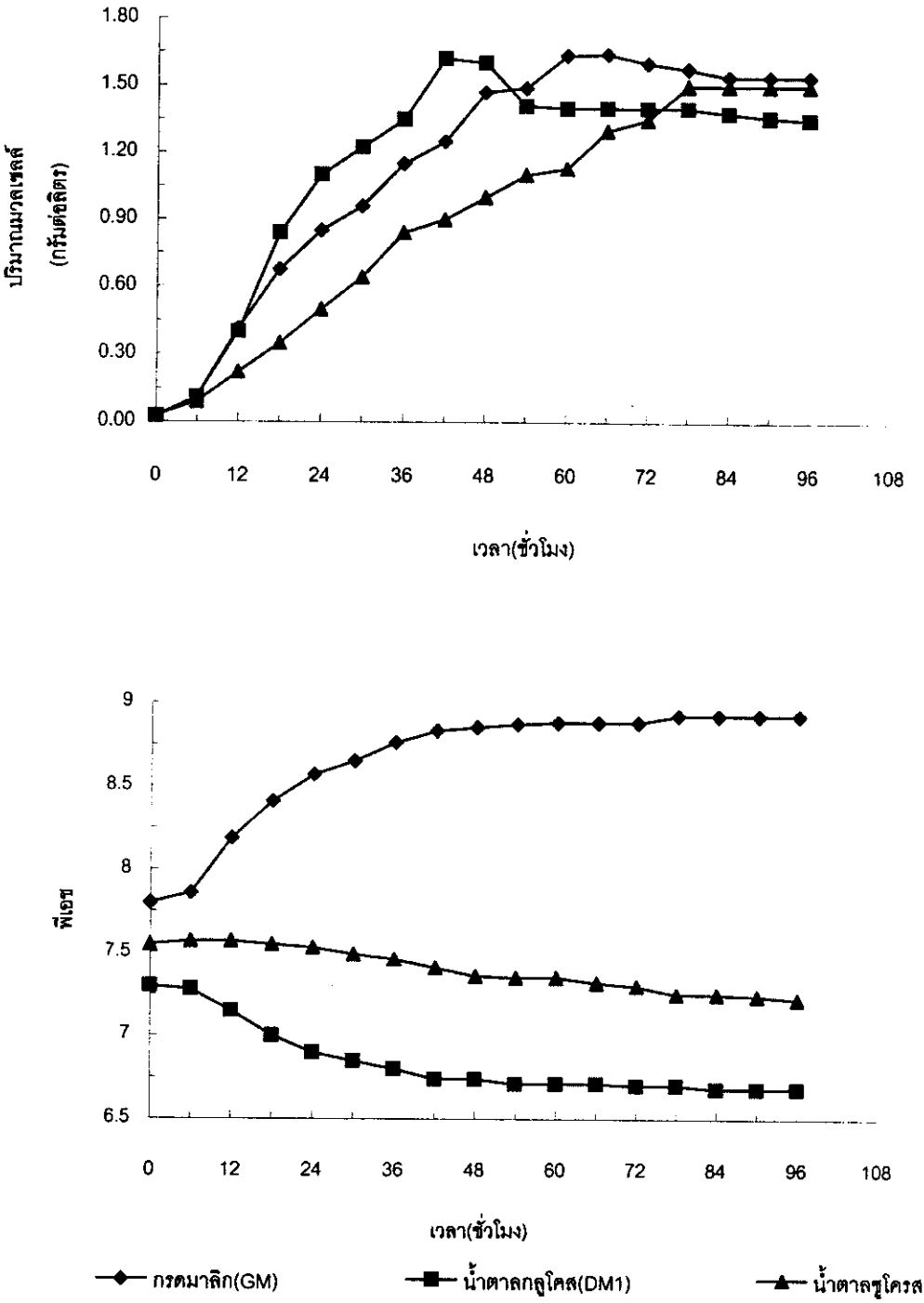
สังเคราะห์แสงที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ เช่น Kim และคณะ (1999) แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้จากระบบบำบัดน้ำเสียมีพีเอชที่เหมาะในการเจริญเท่ากับ 5.5 ส่วน Prasertsan และคณะ (1993a) แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (*Rhodocyclus gelatinosus*) ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอาหารทะเล มีพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเท่ากับ 7.0 จะเห็นว่าแหล่งที่เชื้ออาศัยอยู่เดิม จะมีผลต่อพีเอชที่เชื้อจะเจริญได้ดี โดยส่วนใหญ่แล้วพีเอชที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเจริญได้ดีอยู่ในช่วง 5.5-8.5 (Pfennig and Trüper, 1989) แต่จากการทดลองครั้งนี้ SR15b สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชค่อนข้างสูงคือตั้งแต่ 7.0-9.0 โดยที่พีเอช 8.0, 8.5 และ 9.0 จะให้ปริมาณมวลเซลล์สูงกว่าที่ พีเอช 7.0 และ 7.5

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเจริญของ SR15b ในอาหาร GM ที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างกัน จะเปลี่ยนแปลงจาก 7.11-8.89 เป็น 8.86-9.28 หลังเลี้ยงเชื้อนาน 96 ชั่วโมง จะเห็นว่าที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหลังจากมีการเติมเชื้อเริ่มต้นเช่น ที่พีเอชของอาหาร 7.0 แต่เมื่อเติมกล้าเชื้อลงไปจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.11 เป็นเพราะว่ากล้าเชื้อที่ใช้มีอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีพีเอชขณะนั้นเท่ากับ 8.40 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.0 จึงมีผลให้ที่เวลา 0 ชั่วโมง มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 นั้นจะเห็นว่าพีเอชที่เวลา 0 ชั่วโมง จะลดลงเล็กน้อย น่าจะมีสาเหตุมาจากกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อซึ่งใช้วิธีการ autoclave อาจจะมีผลให้พีเอชของอาหารลดลง

5.3 การทดสอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

5.3.1 แหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกคือสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร GM พีเอช 8.0 ที่มีเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ กรดมาลิก, น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลซูโครส (สูตรอาหาร GM, DM1, DM2) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.15, 0.17 และ 0.11 ต่อชั่วโมง (ภาพที่ 8) จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ SR15b เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.63 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 42 ชั่วโมง ส่วนการเจริญในอาหารที่มีกรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.64 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66 ชั่วโมง จะเห็นว่าถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะช่วยลดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อลงได้ เหมาะสำหรับนำมาผลิตเซลล์ ที่สำคัญน้ำตาลกลูโคสมีราคาถูกกว่ากรดมาลิก ส่วนเมื่อเลี้ยงโดยใช้น้ำตาลซูโครส



ภาพที่ 8 ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร GM, DM1 และ DM 2 + เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหาร GM ในระหว่างการเจริญจะเปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้นในช่วง 7.14-7.80 เป็น 7.57-8.92 หลังเลี้ยงเชื้อนาน 96 ชั่วโมง และจากภาพที่ 8 จะเห็นว่าในสูตรอาหารที่ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง แต่สูตรอาหารที่ใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าพีเอชมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ ทำให้ปริมาณมวลเซลล์ที่ได้จากอาหาร DM1 มีปริมาณน้อย ซึ่ง Noparatnaraporn และ Nagai (1986) รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ P_{47} สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.156 และ 0.016 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการแช่แข็งแห้ง มาวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ (ตารางที่ 12) พบว่าเซลล์ที่ใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีคุณทางโภชนาการสูงสุดคือ โปรตีน,น้ำตาลทั้งหมด, ไขมัน เท่ากับ 54.14, 35 และ 8.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีคาโรทินอยด์ และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เท่ากับ 42.16 และ 34.6 (OD_{480nm}ต่อปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม)

5.3.2 แหล่งไนโตรเจน

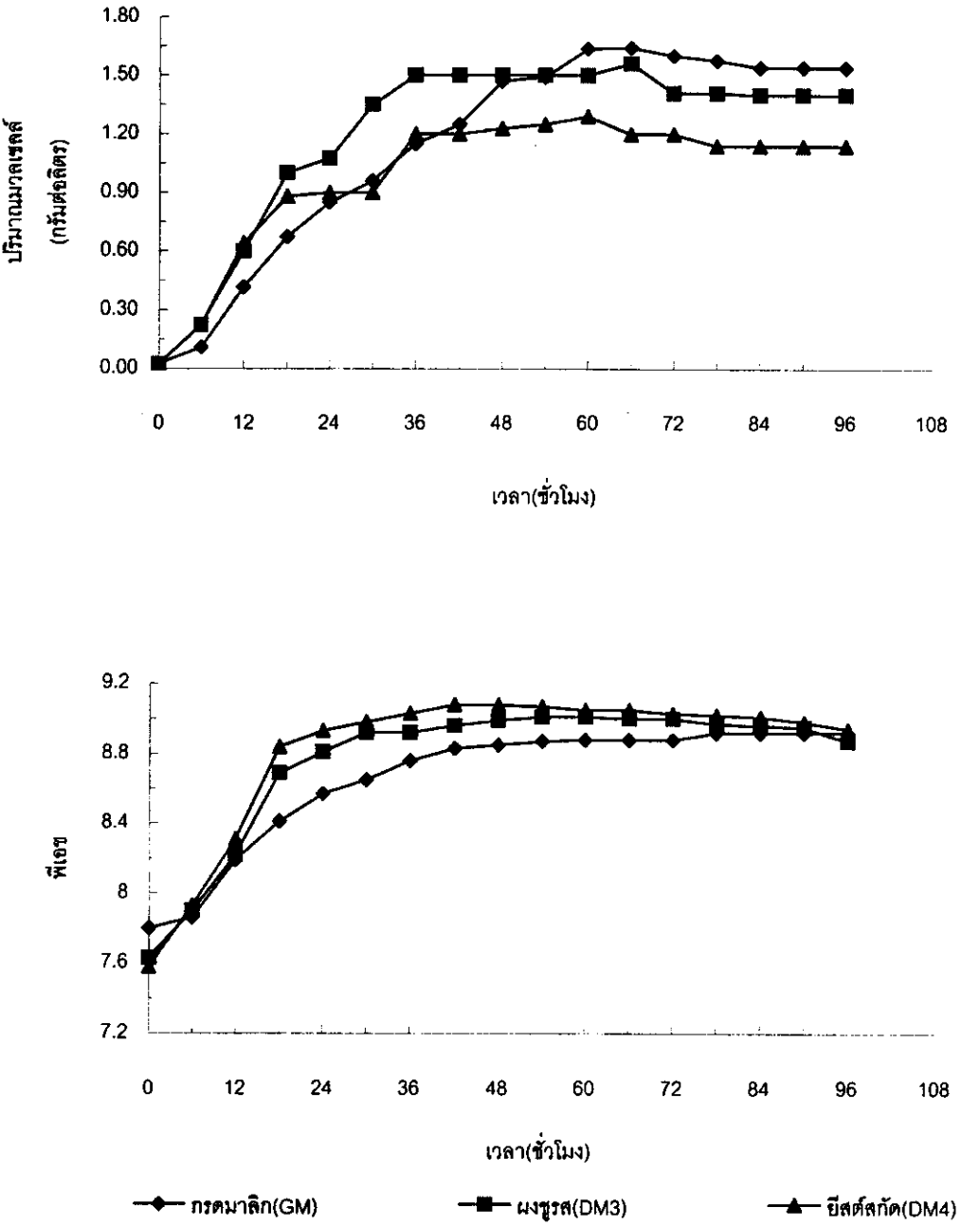
แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกคือสายพันธุ์ SR15b เจริญได้ดีในที่มี กรด กลูตามิกบริสุทธิ์, ผงชูรส และยีสต์สกัด (อาหารสูตร GM, DM3 และ DM4) เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.15, 0.12 และ 0.11 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ อาหารที่มีกรดกลูตามิกบริสุทธิ์จะให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุดคือเท่ากับ 1.64 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66 ชั่วโมงและเมื่อใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุด 1.56 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 66 ชั่วโมง เช่นกัน แต่จะเห็นว่าที่ 36 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเซลล์สูงถึง 1.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อเจริญได้เร็วและให้ค่าปริมาณมวลเซลล์ใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหารที่ใช้กรดกลูตามิก บริสุทธิ์ แต่ใช้เวลาน้อยกว่าถึง 30 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกันในด้านต้นทุนการผลิตต่อราคาแล้วพบว่า อาหารสูตร DM3 จะได้เซลล์แห้ง 0.43 กรัม ต่อ 1 กรัมของกรดกลูตามิกบริสุทธิ์ (ต้นทุน 3.5 บาท) ส่วนอาหารสูตร DM4 จะให้เซลล์แห้ง 0.41 กรัม ต่อ 1 กรัม ผงชูรส (ต้นทุน 0.2 บาท) ดังนั้นการใช้อาหารสูตร DM3 จะสามารถลดต้นทุนได้มากกว่าเพราะราคาถูกกว่า ส่วนเมื่อเลี้ยงโดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตร 60 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ซึ่งอาหารสูตร DM4 นี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการเลี้ยง SR15b เพราะให้ปริมาณมวลเซลล์น้อยที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าในอาหารสูตร DM4 มี

ตารางที่ 12 คุณภาพของเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธ์ SR15bเมื่อเลี้ยงในอาหารต่างๆกัน พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

สูตรอาหาร	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	ปริมาณเซลล์สูงสุด (กรัม/ลิตร)	โปรตีนทั้งหมด	น้ำตาลทั้งหมด	ไขมัน	คาร์โรทินอยด์	แบคเทอริโรคลอโรฟิลล์
			(เปอร์เซ็นต์)			(OD*ต่อปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม)	
GM	0.15	1.64	54.14	35.00	8.96	42.16	34.60
DM1	0.17	1.56	46.20	43.20	3.83	36.90	19.60
DM2	0.11	1.50	42.62	44.00	6.77	61.20	44.70
DM3	0.12	1.56	52.00	40.55	3.62	27.00	22.35
DM4	0.11	1.29	50.00	42.30	3.07	38.06	29.93
DM5	0.14	2.56	50.00	42.70	3.46	37.66	26.60

* หมายเหตุ คาร์โรทินอยด์ ใช้ค่า OD_{480nm}

แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ใช้ค่า OD_{770nm}

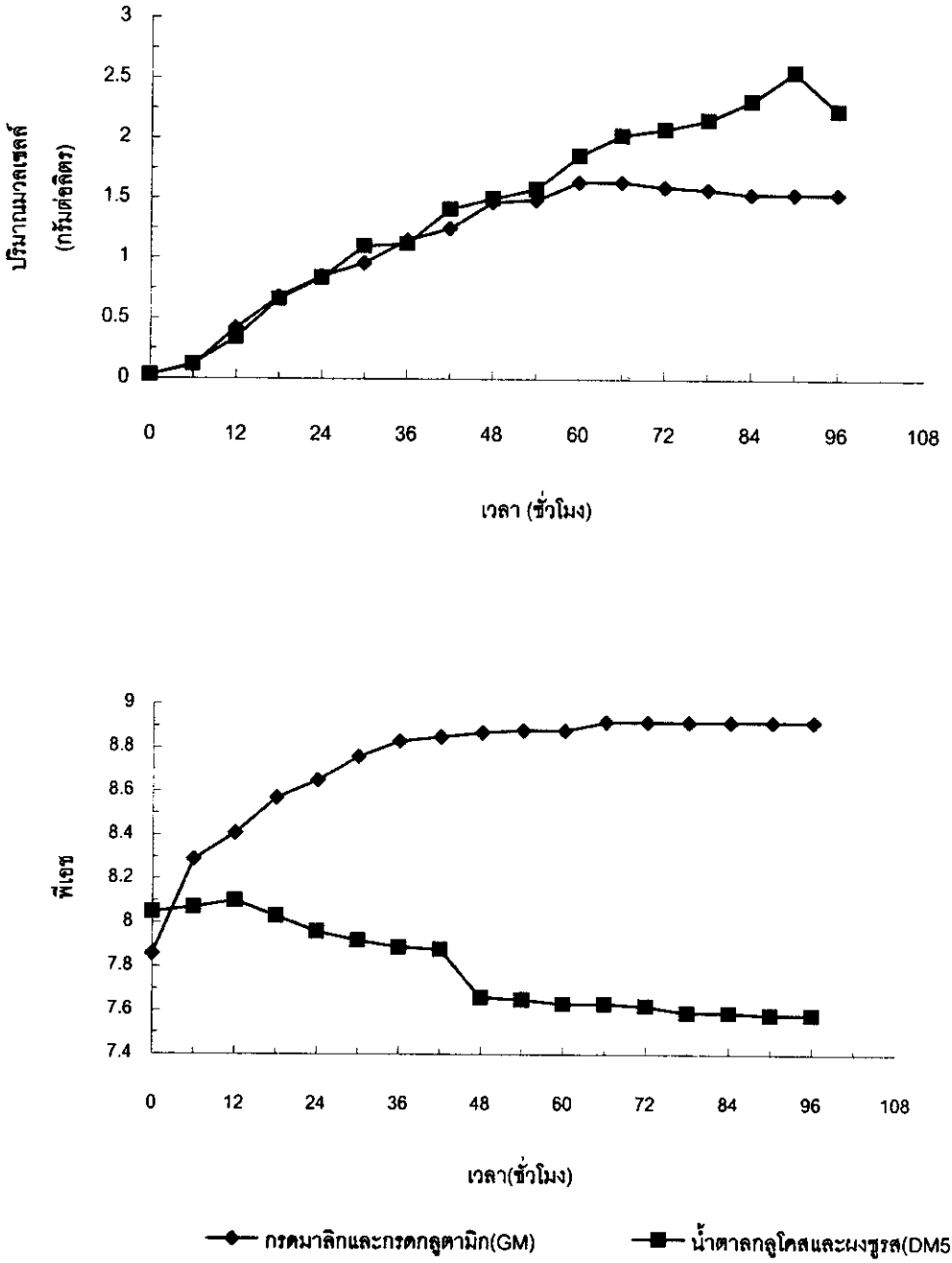


ภาพที่ 9 ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอชในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร GM, DM3 และ DM4 + เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

ยีสต์สกัดมากเกินไป เนื่องจากในอาหารสูตรเดิมคืออาหาร GM มียีสต์สกัดเป็นส่วนประกอบอยู่แล้วซึ่งน่าจะเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน แต่ในอาหารสูตร DM4 มีการเติมยีสต์สกัดแทนกรดแอลกลูตามิกในสัดส่วน 2.7 กรัมต่อลิตร เมื่อรวมกับยีสต์สกัดที่เป็นส่วนประ กอบที่มีอยู่เดิมก็จะรวมเป็น 4.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณที่มากเกินไปอาจจะยับยั้งการเจริญได้ และที่สำคัญยีสต์สกัดมีราคาสูงมากไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อการค้า เพราะจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลง พีเอชของอาหาร GM ในระหว่างการเจริญของ SR15b เปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้นในช่วง 7.57-7.80 เป็น 8.92-9.05 หลังเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง จากตารางที่ 12 จะเห็นว่ากรดกลูตามิกบริสุทธิ์จะให้เซลล์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด คือมีโปรตีน 54.14 , น้ำตาลทั้งหมด 35, ไขมัน 8.96 เปอร์เซ็นต์, คาร์โรทินอยด์ และ แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เท่ากับ 42.16 และ 34.6 (OD_{480nm}ต่อปริมาณมวลเซลล์ 1 กรัม)

5.3.3 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

จากผลการทดลองในข้อ 5.3.1 พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคส (DM1) เป็นแหล่งคาร์บอน และ ในข้อ 5.3.2 พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ใช้ผงซูรส (DM3) เป็นไนโตรเจน ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้เป็นการใช้อาหารสูตร DM5 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและผงซูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นการใช้สารประกอบที่มีราคาถูกมาแทนอาหารสูตร GM ที่มีราคาแพงกว่า พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง (ภาพที่ 10) ให้ค่าปริมาณมวลเซลล์เท่ากับ 2.56 กรัมต่อลิตร ส่วนในอาหาร GM มีอัตราการเจริญจำเพาะและปริมาณมวลเซลล์เท่ากับ 0.15 ต่อชั่วโมง และ 1.64 กรัมต่อลิตร แต่จะให้คาร์โรทินอยด์และแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าอาหารสูตร GM มีโปรตีน, น้ำตาลทั้งหมดและไขมันเท่ากับ 50, 42.70 และ 3.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ถ้าเปรียบเทียบในด้านราคาแล้ว อาหารสูตรนี้จะมีราคาต่ำสุด



ภาพที่ 10 ปริมาณมวลเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในอาหาร GM และ DM5 + เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

มีรายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งที่เป็นอาหารสังเคราะห์เช่น อาหาร GM (Takeno *et al.*, 1999) และ Omerod medium (Choorit *et al.*, 1993) หรือใช้วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตรซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ SR15b สามารถเจริญได้ เช่น อาจใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผงชูรส โรงงานน้ำตาล มีรายงานการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในวัสดุเศษเหลือโรงงาน เช่น Prasertsan และคณะ (1997) รายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถเจริญในน้ำนึ่งปลาทูน่าได้ โดยน้ำนึ่งปลาทูน่าจากโรงงานจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 6.5-7.5 มีค่า chemical oxygen demand (COD) เท่ากับ 74,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่คุณภาพของน้ำนึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดและฤดูกาลในการจับปลา ดังนั้นก่อนนำมาใช้ต้องเจือจางและปรับพีเอชให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อ ส่วน Nopratnaraporn และคณะ (1984) รายงานว่าน้ำทิ้งจากโรงงานสับปะรดมีน้ำตาลกลูโคส 0.7-0.8 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้เลี้ยง *R. sphearoides* P_{47} ได้ ส่วน Hassan และคณะ (1995) รายงานว่าน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม (POME) มีค่า biological oxygen demand (BOD) 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถนำมาเลี้ยง *Rhodobacter sphearoides* เพื่อให้ผลิตสารพอลิเมอร์ชนิดโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxy alkanoate, PHA) ได้

6. การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก (SR15b) และ *V. harveyi* ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b สามารถเจริญได้ดีในน้ำทะเลปลอดเชื้อ อยู่ได้นาน 15 วัน มีเพิ่มจำนวนจาก $2x10^6$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น $4.25x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 2 วัน หลังจากนั้นจะลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจนับจำนวนเชื้อได้ในวันที่ 16 ของการทดลอง ส่วน *V. harveyi* ก็สามารถเจริญได้ดีในน้ำทะเลปลอดเชื้อ โดยเพิ่มจำนวนจาก $2.33 x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น $4.76x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้นจะเริ่มลดจำนวนลง จนไม่สามารถตรวจนับจำนวนเชื้อได้ในวันที่ 9 ของการทดลอง (ตารางที่ 13) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าในน้ำทะเลมีแหล่งอาหารพอเพียงต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด แบคทีเรียสังเคราะห์แสง SR15b ทนอยู่ในน้ำทะเลนานกว่า *V. harveyi* ซึ่งสุภฎา และคณะ (2543) พบว่า *V. harveyi* เจริญได้ในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน โดยเพิ่มจำนวนจาก 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จึงจะลดจำนวนลง สามารถอยู่ในน้ำได้เพียง 6 วัน และเจริญได้ดีในอุณหภูมิช่วง 25-32 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 13 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b และ *V.harveyi* ทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในน้ำทะเลปลอดเชื้อ พีเอช 8.0 ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส นับจำนวนโดยใช้อาหาร GM และ TCBS

เวลา (วัน)	ปริมาณเชื้อ SR15b (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเชื้อ *V. harveyi* (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
0	$2x10^6$	$2.33 x10^5$
1	$3.17 x10^7$	$4.55 x10^5$
2	$4.25 x10^8$	$4.76 x10^5$
3	$1.36 x10^7$	$2.16 x10^2$
4	$1.09 x10^7$	$1.50 x10^2$
5	$1.04 x10^7$	96
6	$8.4 x10^6$	60
7	$6.4 x10^6$	20
8	$4.0 x10^6$	15
9	$2.5 x10^6$	0
10	$1.6 x10^6$	
11	$7.5 x10^5$	
12	$6.0 x10^4$	
13	$2.0 x10^4$	
14	$1.8 x10^3$	
15	$1.5 x10^3$	
16	0	

7. ความสามารถในการแข่งขันการเจริญในน้ำทะเลปลอดเชื้อ

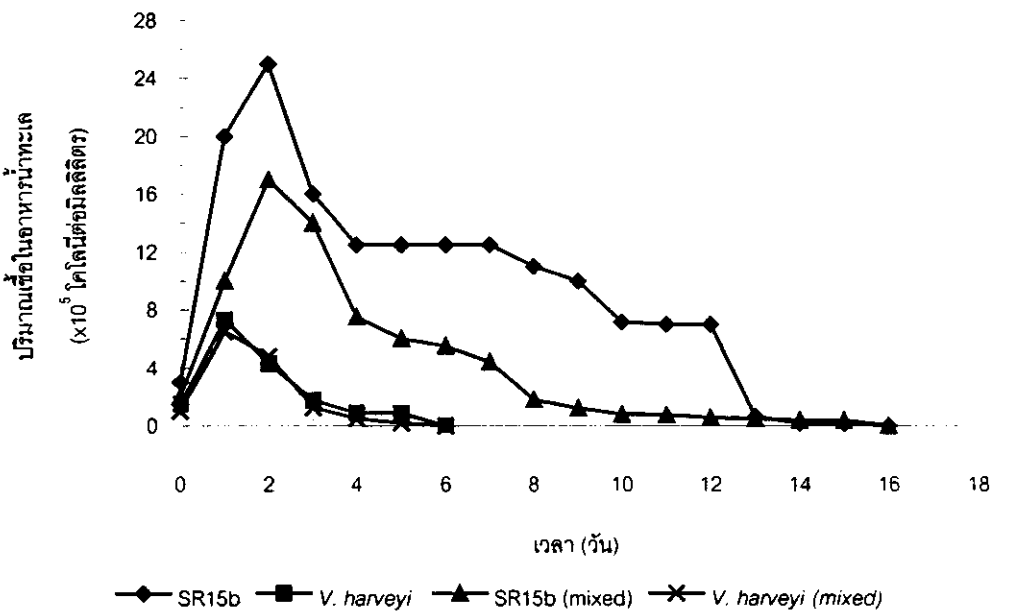
7.1 การเจริญแบบแข่งขันกันระหว่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก (SR15b) และ *V. harveyi* ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ

จากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในน้ำทะเลปลอดเชื้อ และมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากันคือ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า SR15b สามารถเจริญได้ดี และมีชีวิตในน้ำทะเลได้นานกว่า *V. harveyi* โดยในวันที่ 2 ของการทดลอง SR15b ในชุดควบคุมจะเพิ่มจำนวนขึ้นจาก 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 2.5×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วนในชุดทดลองที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนขึ้นน้อยกว่าคือเพิ่มเป็น 1.7×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วน *V. harveyi* นั้น ชุดควบคุมจะเพิ่มจำนวนจาก 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 7.3×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าสูงสุดจะใช้เวลาเพียง 1 วัน ส่วนชุดทดลองที่เลี้ยงร่วมกับ SR15b จะเพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าคือเพิ่มเป็น 6.5×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 11) การที่ในชุดทดลองมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อน้อยกว่าในชุดควบคุมเพราะมีการแข่งขันการเจริญ และแย่งสารอาหารที่มีอย่างจำกัดในอาหารน้ำทะเล

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ จะพบว่า SR15b สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำทะเลได้นานถึง 15 วัน ในขณะที่ *V. harveyi* สามารถอยู่ได้เพียง 5 วันเท่านั้น จะเห็นว่าในปริมาณเชื้อที่เท่ากัน คือ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นั้น SR15b สามารถเจริญได้เร็วและดีกว่า *V. harveyi* ซึ่งถ้าหากมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยการเติมเซลล์ที่มีชีวิตลงในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อหวังผลให้มีการแข่งขันกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและช่วยลดไนเตรทในบ่อเลี้ยง ควรเติมเชื้อ SR15b ในปริมาณมากและควรเติมทุกๆ 15 วันเพื่อให้มีการเจริญอย่างต่อเนื่องจะทำให้การเลี้ยงกุ้งได้ผลดี

8. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับกุ้งกุลาดำในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารที่ต่างกัน 4 สูตรคือ สูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุม สูตรที่ 2 สูตรที่ 3 และ สูตรที่ 4 เป็นอาหารที่ผสมเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในสัดส่วน 0.1, 1.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเลี้ยงกุ้งครบ 45 วัน นำมาวิเคราะห์ผลทางภูมิคุ้มกันดังนี้



ภาพที่ 11 การแข่งขันการเจริญระหว่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b และ *V. harveyi* ในอาหารน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : mixed คือ การเลี้ยงแบบแข่งขันการเจริญ

8.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม

ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งที่กินอาหารทั้ง 4 สูตรมีค่าแตกต่างกัน คือ ในสูตรที่ 4 จะให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุดคือ 8.04± 2.29 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 5.85 ±2.14 x 10^7, 7.31±1.77 x 10^7 และ 6.63±2.35 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 14) จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า กุ้งกินอาหารในสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดรวมจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนกุ้งในสูตร 2 และสูตรที่ 4 ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน ปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะมีสารที่สามารถกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเพิ่มมากขึ้นเช่น สารไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ (Soderhall and Hall, 1984), เปปติโดกลัยแคน (Itami *et al.*, 1993) และ กลูแคน (Johanson and Soderhall, 1985) เป็นต้น จากตารางที่ 14 จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดรวมในชุดที่ผสมเซลล์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยกว่าชุดที่ผสมเซลล์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ น่าจะเป็นเพราะว่าปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นเป็นคนละชนิดกัน เพราะเม็ดเลือดแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อสารกระตุ้นแตกต่างกันเช่น เม็ดเลือดชนิดอะแกรนูลาร์จะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการฟาโกซัยโตซิส, ส่วนชนิดลาร์จแกรนูลาร์จะตอบสนองโดยกระบวนการเอนแคปซูเลชันและการกระตุ้นระบบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Smith and Soderhall, 1983; Hose *et al.*, 1987) ดังนั้นจะต้องเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสว่าปริมาณเม็ดเลือดที่ต่างกันจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหมือนกันหรือแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมื่อให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดเช่นเบตา-กลูแคนในรูปของลามินาริน (laminarin) โดยวิธีการฉีดให้แก่กุ้งน้ำจืด (*Astacus astacus*) พบว่าที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้มีค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมลดลง (Smith and Soderhall (1983) ในทำนองเดียวกัน Persson และคณะ (1987) รายงานว่าเมื่อฉีดลามินาริน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้แก่กุ้งน้ำจืด (*Pacifastacus leniusculus*) ก็มีผลทำให้เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยลดลงเช่นกัน แต่จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นแสดงว่า ส่วนใหญ่จะเป็นเม็ดเลือดชนิดลาร์จแกรนูลาร์ ในการทดลองครั้งนี้ผสมเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้งเซลล์ (whole cell) ในอาหารกุ้ง ดังนั้นสารประกอบที่น่าจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็คือ เปปติโดกลัยแคน และสารไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้สารสีของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงก็อาจจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน

ตารางที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย, ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่กินอาหารที่ผสมเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ในระดับที่แตกต่างกันเป็นเวลา 45 วัน

พารามิเตอร์	สูตรอาหารที่ทดลอง			
	ปริมาณเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง			
	ชุดควบคุม	0.1 เปอร์เซ็นต์	1.0 เปอร์เซ็นต์	5.0 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย ($x10^7$เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	$5.85\pm2.14^{a*}$	$7.31\pm1.77^{b*}$	$6.63\pm2.35^{ab*}$	$8.04\pm2.29^{b*}$
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	$63.03\pm22.79^{a**}$	$70.86\pm19.36^{a**}$	$105.41\pm33.96^{b**}$	$88.72\pm21.71^{b**}$
อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)	-	-	-	-

*ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

**ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

- กุ้งทดลองไม่ตาย

8.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 14 จะเห็นว่ากุ้งที่กินอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 เป็นชุดที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำคือ เท่ากับ 63.03 ± 22.07 และ 70.86 ± 19.36 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในสูตรที่ 2 และสูตรที่ 4 เป็นชุดที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงคือ เท่ากับ 105.41 ± 33.96 และ 88.72 ± 21.71 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน จากตารางที่ 14 จะเห็นว่ากุ้งที่กินอาหารผสมเซลล์แห้ง 1.0 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงสุด จากผลการทดลองในข้อ 8.1 กุ้งที่ได้รับอาหารในสูตรนี้จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยน้อยกว่าสูตรที่ผสมเซลล์ 0.1 และ 5.0 เปิร์เซ็นต์ ซึ่ง Persson และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดจะลดลงเมื่อได้รับสารกระตุ้นจะเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการตอบสนองของระบบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นนั้น แสดงว่ามีเม็ด

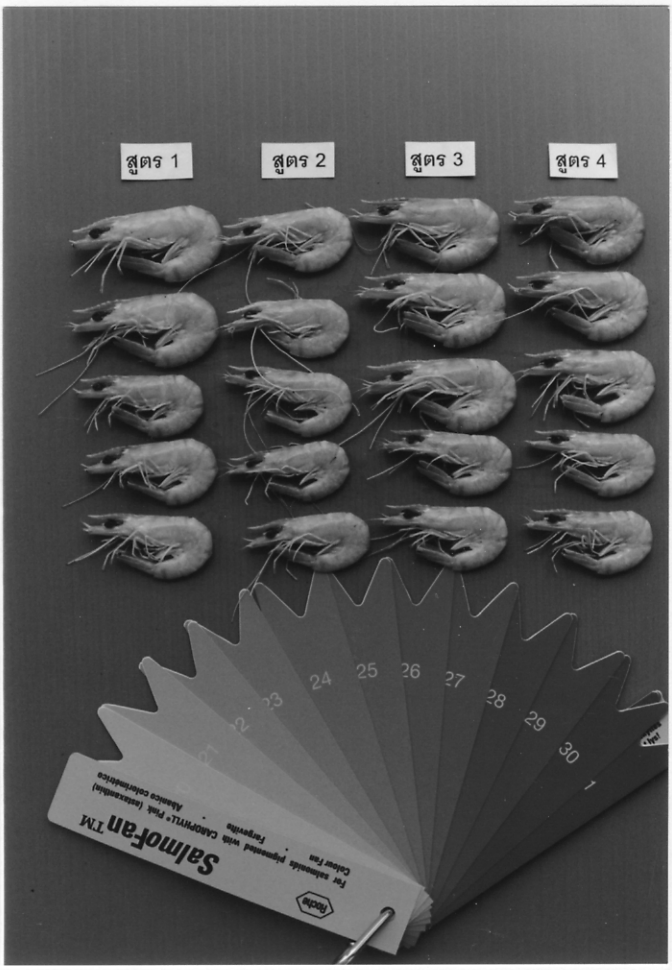
เลือดชนิดลาร์จ กรานูลาร์ อยู่ในปริมาณที่สูงกว่าเม็ดเลือดชนิดอื่นๆ เพราะในไซโตพลาสมิกกรานูลของเม็ดเลือดชนิดนี้ จะเป็นที่สะสมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Smith and Soderhall, 1991) การที่มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงแต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสต่ำนั้น น่าจะเป็นเพราะว่าปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่จะเป็นชนิดอะแกรนูลาร์ที่ไม่มีระบบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสอยู่ในเซลล์ แต่จะเกิดการตอบสนองแบบฟาโกซัยโตซิสแทน (Soderhall and Cerenius, 1992) และเห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในชุดที่ผสมเซลล์แห้ง 1.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นหากจะมีการนำไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งเพื่อการค้า สามารถใช้ปริมาณของเซลล์แห้งเพียง 1.0 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้เท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วยและนอกจากนี้ Lanz และคณะ (1993) กล่าวว่าปริมาณสารกระตุ้นที่มากเกินไปจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้

8.3 ความต้านทานเชื้อ *V. harveyi*

เมื่อฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.5×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แก่กุ้งกุลาดำ ปรากฏว่าไม่พบการตายของกุ้งในทุกชุดการทดลอง ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อมีความรุนแรงน้อยลงเนื่องจากมีการถ่ายเชื้อบ่อยครั้ง เพราะจรีพร เรืองศรี และ กิจการ ศุภมาตย์ (2544 ข้อมูลอยู่ระหว่างดำเนินพิมพ์) รายงานว่าเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์นี้มีค่า LD_{50} เท่ากับ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นมากกว่า แต่กุ้งไม่ตาย ทำให้เป็นไปได้ว่าเชื้อมีความรุนแรงลดลง

8.4 ผลของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b ต่อสีของกุ้งกุลาดำ

หลังจากให้กุ้งกินอาหารที่ผสมเซลล์แห้งในปริมาณต่างกันนาน 45 วัน จากนั้นนำมากุ้งมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีพบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมเซลล์แห้ง 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มของสีเพิ่มมากขึ้นกว่าชุดควบคุมและชุดที่ผสมเซลล์ 0.1 และ1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ค่าความเข้มของสีที่เพิ่มขึ้นนั้นเทียบกับแถบสีมาตรฐาน Salmo Fan ของบริษัท Roche โดยรายงานเป็นค่าตัวเลขตั้งแต่ 20-31 ตัวเลขที่เพิ่มขึ้นจะเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีความเข้มของสีเพิ่มขึ้นด้วย ในการทดลองครั้งนี้ค่าความเข้มของสีที่ได้คือ 21, 22, 22 และ 23 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) จะเห็นว่ากุ้งที่กินอาหารผสมเซลล์แห้งจะมีสีเข้มกว่ากุ้งในชุดควบคุมและที่ระดับความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีสีเข้มกว่าที่ 0.1 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ คาร์โรทินอยด์ที่พบในธรรมชาติมีหลายรูปแบบโดยชนิดที่พบใน



ภาพที่ 12 สีของกุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ SR15b นาน 45 วัน

หมายเหตุ : ถ่ายภาพหลังจากต้มกุ้งในน้ำเดือดนาน 5 นาที

แบคทีเรียสังเคราะห์ (*Rhodobacter capsulatus*) จะเป็นชนิดแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) และ เบตา-คาร์โรทีน (β-carotene) การที่สัตว์น้ำจะนำไปใช้ได้หรือไม่นั้นขึ้นลักษณะโครงสร้างของสารสีนั้น ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Chien และ Jeng (1992) พบว่าเมื่อให้กุ้งคุรุม่า (*P. japonicus*) กินอาหารผสมแอสตาแซนทีน 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 กรัม จะมีสีเข้มกว่าชุดที่ผสมแอสตาแซนทีน 100 มิลลิกรัม ส่วนมะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ (2543) พบว่ากุ้งที่กินอาหารผสมแอสตาแซนทีนจะมีสีแดงเข้มกว่ากุ้งที่กินอาหารปกติ No และ Storebakken (1992) รายงานว่าปลาเรนโบว์เทราต์ที่กินอาหารผสมแอสตาแซนทีนจะให้เนื้อปลาที่มีสีแดงกว่ากลุ่มที่กินแคนตาแซนทีน (canthaxanthine) เพราะปลาจะเปลี่ยนแอสตาแซนทีนเป็นวิตามินเอได้ง่ายกว่าแคนตาแซนทีน และนอกจากนี้แอสตาแซนทีนยังช่วยส่งเสริมให้ปลาเรนโบว์เทราต์มีระบบภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นด้วย (Thomson *et al.*, 1995) โดยคาร์โรทินอยด์จะไปกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์ได้ (Okimasu *et al.*, 1992) ในการทดลองครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารคาร์โรทินอยด์ที่อยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะมีส่วนช่วยให้กุ้งกุลาดำมีระบบภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นกว่าชุดควบคุมและมีผลทำให้กุ้งมีสีเข้มขึ้น เพราะจากการรายงานของ Pradal (1994) พบว่าเมื่อผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม *Rhodobacter capsulatus* ปริมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเพื่อเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์จะทำให้การเกิดสีและอัตราการเจริญดีกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติและอาหารที่ผสมคาร์โรทินอยด์สังเคราะห์ ในประเทศญี่ปุ่นสีของสัตว์น้ำจะเป็นบ่งชี้ถึงความมีคุณภาพและใช้กำหนดราคาของสัตว์น้ำนั้นๆ (Chien and Jeng,1992) ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้ที่จะนำสารคาร์โรทินอยด์ที่อยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำหรือสัตว์น้ำอื่นๆเพื่อการค้า รวมทั้งหาวิธีการผลิตให้ได้ในปริมาณมาก แต่ใช้การลงทุนน้อยที่สุด เพื่อให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความยั่งยืนต่อไป