การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

Selection of Purple Nonsulfur Bacteria with Ability to Produce Proteolytic Enzyme and Antivibrio Activity Against Shrimp Pathogenic *Vibrio* spp.

ณัชภัทร แสงธรรมหนอ

Natchapat Saengtumnor

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

Selection of Purple Nonsulfur Bacteria with Ability to Produce Proteolytic Enzyme and Antivibrio Activity Against Shrimp Pathogenic *Vibrio* spp.

ณัชภัทร แสงธรรมหนอ

Natchapat Saengtumnor

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

ผู้เขียน ว่าที่ร้อยตรี ณัชภัทร แสงธรรมหนอ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ

(ดร.ไสว บัวแก้ว)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(ว่าที่ร้อยตรี ณัชภัทร แสงธรรมหนอ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(ว่าที่ร้อยตรี ณัชภัทร แสงธรรมหนอ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

ผู้เขียน ว่าที่ร้อยตรี ณัชภัทร แสงธรรมหนอ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ ตลอดจนศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดเลือกได้ จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 22 ไอโซเลท เมื่อทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ด้วยเทคนิค Overlay diffusion method พบว่า มีแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 12 ไอโซเลท (54.55%) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ แต่มีเพียงไอโซเลท PS342b (4.55%) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบ (6 ไอโซเลท) ซึ่งเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ในบริเวณวงใสและขอบวงใสการยับยั้งไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เซลล์เกิดเป็นหลุม หรือรูรั่ว และพบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ส่วนใหญ่ (81.82%, 18 ไอโซเลท) สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ผลการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. กับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง 12 ไอโซเลท ทั้งในสภาวะที่มีแสง มีอากาศน้อย และมีอากาศ ไร้แสง พบว่าไม่สามารถยับยั้งหรือควบคุมปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ให้ลดลงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อีกทั้งน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ดังกล่าวก็ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ แต่การทำเข้มข้นน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 20 เท่า โดยวิธี Freeze-dry สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ในบางสายพันธุ์ จากการทดลองตามที่กล่าวมาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่

สะสมซัลเฟอร์ได้ 1 ไอโซเลท คือ PS342b ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ดี และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดี และเมื่อนำเชื้อมาบ่งชี้ชนิดด้วยเทคนิค 16s rRNA gene พบว่า ไอโซเลท PS342b เป็นเชื้อ *Rhodovulum sulfidophilum* ส่วนผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนในการคัดเลือกอาหารและความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในการเจริญ พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว Glutamate-Malate (GM medium) ที่เติม 1.5% NaCl โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะและเวลาที่ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า เท่ากับ 0.336 ชั่วโมง$^{-1}$และ 2.066 ชั่วโมง สำหรับความเร็วรอบในการเขย่าที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุด คือ 150 และ 200 รอบต่อนาที และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Rhodovulum sulfidophilum* PS342b เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร GM ที่เติม 1.5% NaCl โดยใช้ 1% เจลาติน แทน $(NH_4)_2HPO_4$ ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง ที่ความเร็วในการเขย่า 150 รอบต่อนาที ซึ่งศึกษาโดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองที่ออกแบบการทดลองเป็นแบบประสมกลาง ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ pH เท่ากับ 7.90 ความเข้มข้นของเกลือ NaCl เท่ากับ 1.30% และอุณหภูมิ เท่ากับ 29.50 องศาเซลเซียส โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ถึง 15.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และการทวนซ้ำยืนยันค่าที่ได้จากการทำนาย

Thesis Title Selection of purple nonsulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzyme and antivibrio activity against shrimp pathogenic *Vibrio* spp.

Author Acting Sub Lt. Natchapat Saengtumnor

Major Program Microbiology

Academic Year 2017

ABSTRACT

The aims of this study were to select purple nonsulfur bacteria (PNSB) with ability to produce proteolytic enzyme and antivibrio activity, including affecting factors on proteolytic enzyme production of the selected PNSB. Overlay diffusion method was used to test antivibrio activity against shrimp pathogenic *Vibrio* spp. by 22 PNSB isolates. It was found that 12 PNSB isolates (54.55%) were able to inhibit shrimp pathogenic *Vibrio* spp. However, there was only one PNSB strain (4.55%), PS342b, had ability to inhibit all vibrios tested (6 isolates). Observation of inhibited shrimp pathogenic *Vibrio* spp. cells collected from clear zone and around clear zone using a scanning electron microscope found altered cells with many holes. Almost PNSB tested (81.82%, 18 isolates) degraded gelatin. No inhibition of shrimp pathogenic vibrios was found for co-culture between vibrios and 12 PNSB strains under conditions of microaerobic light and aerobic dark when compared with controls. Moreover, culture supernatant of 12 PNSB isolates did not inhibit shrimp pathogenic *Vibrio* spp. However, concentrated culture supernatants at 20 times by freeze-dry method had ability to inhibit some isolates of shrimp pathogenic vibrios. There was only 1 isolate namely PS342b was selected according to its abilities to digest protein and inhibit shrimp pathogenic *Vibrio* spp.; and this strain was identified as *Rhodovulum sulfidophilum* using 16S rRNA.

Rhodovulum sulfidophilum PS342b was further studied optimal medium and conditions for proteolytic enzyme production. Glutamate-malate (GM medium) supplemented with 1.5% NaCl was the most suitable medium by giving specific growth rate and doubling time as 0.336 h^{-1} and 2.066 h.; while optimal shaking speeds were between 150 and 200 rpm. GM medium containing 1.5% NaCl with replacement of $(NH_4)_2HPO_4$ by 1% gelatin was used for proteolytic production under aerobic-dark conditions at 150 rpm. The use of response surface methodology with central composite design (CCD), optimum conditions for the production of proteolytic enzymes were pH 7.90, 1.30% NaCl and 29.50°C as the highest enzymatic activity up to 15.40 units per ml. The verification test confirmed the predicted values from the CCD.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน และจากหลายหน่วยงาน ข้าพเจ้าจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนแล้วเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ และ ดร.ไสว บัวแก้วที่ให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิยาลัย มหาวิยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนการศึกษาทุนผู้ช่วยวิจัยและ และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้สถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ อีกทั้งเจ้าหน้าที่ทุกๆ ท่านที่คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในด้านต่างๆ ตลอดมา

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทั้งภายในภาควิชาฯ และภายนอกทุกๆ ท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เสมอมา

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ พ่อแม่ ครอบครัว ตลอดจนญาติๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ ตลอดจนให้การสนับสนุนในการศึกษามาตลอดจนสำเร็จการศึกษา

ณัชภัทร แสงธรรมหนอ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(12)
รายการรูป	(14)
บทที่ 1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	25
ขอบเขตการวิจัย ความใหม่ที่เกิดขึ้นและประโยชน์ที่จะได้รับ	25
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ อุปกรณ์	26
วิธีการ	30
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	40
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	67
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	
ก	81

สารบัญ

	หน้า
ภาคผนวก (ต่อ)	
ข	87
ค	89
ประวัติผู้เขียน	97

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ปริมาณแอมโมเนียที่มีผลต่อคุณภาพน้ำ	6
1.2 ปริมาณไนเตรทที่มีผลต่อคุณภาพน้ำ	7
2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบ	28
2.2 สายพันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิด EMS	29
2.3 ตารางการทดสอบการออกแบบส่วนประสมกลาง	39
3.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง และการย่อย Gelatin ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์	43-44
3.2 จำนวนแบคทีเรียก่อโรคกุ้งที่เหลือรอดภายหลังการทดสอบเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์	50
3.3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง-ที่ไม่สะสมซัลเฟอร์โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นขึ้น 20 เท่า	51
3.4 อัตราการเจริญจำเพาะ และเวลาที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง-ที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่าในอาหารชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง มีอากาศน้อย	55
3.5 ค่าการดูดกลืนแสง (การเจริญ) และค่า pH แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่-ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b เพื่อทดสอบดูกิจกรรมเอนไซม์ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	59-60

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.6 ผลการทดสอบการออกแบบส่วนประสมกลาง 61

3.7 ค่าทางสถิติจาการทดสอบการออกแบบส่วนประสมกลาง 64

3.8 ตารางเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ 64

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กราฟิกพื้นที่ตอบสนอง	23
1.2	การออกแบบการทดลองแบบประสมกลางสำหรับ 3 ตัวแปร	24
3.1	ลักษณะวงใสการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. parahaemolyticus* SR1 ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b	41
3.2	เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.	42
3.3	ลักษณะหลุม หรือรูรั่ว ตลอดจนการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* PSU2015 ภายหลังการทดสอบกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท STW16-4	45
3.4	การย่อยสลายเยลาตินใน Gelatin medium โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์	46
3.5-3.6	ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นขึ้น 20 เท่า	52-53
3.7	การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ที่เจริญในอาหารชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง มีอากาศน้อย	55
3.8	ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ที่บ่มเลี้ยงที่ความเร็วรอบในการเขย่าที่แตกต่างกัน	56

รายการรูป

รูปที่ **หน้า**

3.9 แผนภาพต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์-แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b กับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ 57

3.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย 62

3.11 การตอบสนองที่พื้นผิวของค่ากิจกรรมเอนไซม์ทำได้โดยการสร้างแผนภาพสามมิติ (3D) และภาพคอนทัวร์ (contourfigure) 65

3.12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อค่า pH ความเข้มข้นของเกลือหรืออุณหภูมิ เพิ่มหรือลดลง กำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ 66

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้รับความนิยมสูงเนื่องจากที่ตั้งประเทศอยู่ในเขตร้อนชื้นจึงเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การเพาะเลี้ยงกุ้งของไทยจึงได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ประเทศไทยได้เป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งยาวนานกว่า 30 ปี จุดนี้แสดงให้เห็นได้ว่าอุตสาหกรรมกุ้งไทยประสบความสำเร็จในการปรับตัวเป็นอย่างดี โดยเฉพาะกุ้งทะเลจัดเป็นสินค้าที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยที่มีมูลค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ซึ่งสามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยปีละหลายแสนล้านบาท โดยได้มีการผลิตและขยายพื้นที่เพิ่มมากขึ้นในภาคใต้ของประเทศไทย (สมหญิง, 2553; สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งและคณะ, 2554; สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล และสำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, 2556; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของ กรมศุลกากร, 2559) แต่ในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา อุตสาหกรรมกุ้งไทยต้องเผชิญกับความท้าทายครั้งสำคัญที่กระทบผลผลิตและการค้า ทั้งจากโรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome; EMS) ปัญหาการค้ามนุษย์และการทำประมงผิดกฎหมายในอุตสาหกรรมประมงไทย รวมทั้งการถูกประเทศคู่ค้าสำคัญอย่างสหภาพยุโรปตัดสิทธิพิเศษทางภาษีศุลกากรเป็นการทั่วไป (Generalised System of Preferences; GSP) (ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2558)

นอกจากนี้ในการเลี้ยงกุ้งก็ประสบกับปัญหาการสูญเสียผลผลิตระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น คุณภาพอาหารโดยส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ตลอดจนปริมาณอาหารที่ให้มากหรือน้อยก็มีผลต่อของเสียตกค้างในบ่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอาหารจำพวกโปรตีนที่สัตว์น้ำมีความต้องการสูง 40-50% ของปริมาณสารอาหารทั้งหมดซึ่งอาจทำให้น้ำเน่าเสียและเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ก่อโรคกุ้งนอกจากนี้คุณภาพลูกกุ้งจัดว่าเป็นตัวแปรสำคัญของความสำเร็จในการเลี้ยงกุ้งอีกตัวแปรหนึ่ง เนื่องจากลูกกุ้งที่แข็งแรงสมบูรณ์มีอัตราการรอดตายสูง การจัดการพื้นที่บ่อก่อให้เกิดความสำเร็จหรือล้มเหลวได้ เพราะในบางพื้นที่ไม่อาจใช้เลี้ยงกุ้ง

ได้หรือต้องมีการปรับปรุงก่อน และการเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากคุณภาพน้ำที่ดีสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในกุ้ง ตลอดจนสภาวะเครียดของกุ้งได้ ถ้าไม่ได้เปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นเวลานาน หรือมีการให้อาหารเกินความต้องการของกุ้ง ทำให้เศษอาหารตกค้างจำนวนมากซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนอีกทั้งปริมาณอาหาร ของเสียหรือมูลที่กุ้งขับถ่ายออกมาหลังจากกุ้งนำโปรตีนไปสร้างเป็นเนื้อกุ้งหรือเพื่อการเจริญเติบโตเหล่านี้มีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ส่งผลให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง ตลอดจนเป็นสารอาหารให้แก่จุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง ก่อให้เกิดโรคในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบของการติดเชื้อ ได้แก่ โรคจากปรสิต โรคจากการติดเชื้อไวรัส และโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ *Vibrio* spp. และกลุ่มของ Filamentous bacteria (อนันต์, 2538; สุปราณี และคณะ, 2545; สิริ, 2547; อมรรัตน์ และคณะ, 2548; สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2549; ประสิทธิ์ และคณะ, 2554) ปัจจัยดังกล่าวได้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมกุ้งไทยตลอดทั้งห่วงโซ่การผลิต

ในปี 2550 สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง รายงานว่าโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ *Vibrio* spp. ได้แก่ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. aloginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida* โดยเฉพาะ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ทำให้เกิดความสูญเสียให้กับธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและที่เป็นปัญหาสำคัญมากในช่วงปี 2556 คือ โรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome; EMS) ที่ทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งประสบภาวะขาดทุนเพราะกุ้งที่เลี้ยงมีอัตราการรอดต่ำ ผลผลิตกุ้งลดลงมากทำให้โรงงานขาดแคลนกุ้งในการแปรรูป จำเป็นต้องหยุดกิจการชั่วคราวหรือถาวรจนเกิดเป็นปัญหาการเลิกจ้างแรงงานขณะเดียวกันผู้ส่งออกก็ไม่สามารถรับคำสั่งซื้อได้ดังเช่นภาวะปกติส่งผลทำให้รายได้จากการส่งออกกุ้งไทยลดลงอย่างมาก จนสูญเสียส่วนแบ่งตลาดโลกและความเป็นผู้นำในตลาดกุ้งโลกที่ไทยเคยอยู่ในอันดับที่ 1 มานานหลายทศวรรษ (สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล และสำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, 2556; ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2558)

นอกจากนี้ Cabello (2006); เพ็ญศรี และ อรอนงค์ (2551) กล่าวว่า การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้งเพื่อป้องกันโรคกุ้งส่งผลให้เกิดสารตกค้างในเนื้อกุ้ง ซึ่งตรวจพบตั้งแต่ พ.ศ. 2536 เป็นต้นมา ทั้งยังเป็นประเด็นสำคัญที่ถูกนำมาใช้เป็นข้ออ้างในการกีดกันทางการค้า แต่ก็มีการอนุญาตให้ใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดได้ อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง

หรือการใช้อย่างไม่ถูกวิธีก่อให้เกิดปัญหา คือ เชื้อเกิดการดื้อยา (Karunasagar *et al*., 1994; Abraham *et al*., 1997 อ้างโดย จิราพร, 2543) และเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงและลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะจึงหันมาให้ความสนใจวิธีการควบคุมทางชีวภาพ ด้วยการใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากการยับยั้ง/ฆ่าแบคทีเรียก่อโรคหรือสามารถบำบัดคุณภาพน้ำ รวมทั้งตะกอนของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อก่อโรคกุ้งได้ ด้วยเหตุนี้จึงสนใจศึกษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple nonsulfur bacteria) ซึ่งมักพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม อีกทั้งยังพบว่ามีการเจริญในบ่อกุ้ง โดยแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวสามารถนำมาใช้บำบัดน้ำเสียได้หลายประเภท (Kantachote *et al*., 2005) เช่น การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแปรรูปยางโดยสามารถลดค่า BOD และค่า COD ได้ถึง 90% (ดวงพร, 2545) ลดค่า COD สารโมเลกุลใหญ่ และสารโมเลกุลเล็ก (MW < 3000) ในการบำบัดน้ำเสียจากถั่วเหลืองได้ถึง 95.7%, 75.4% และ 79.8% ตามลำดับ ภายใน 72 ชั่วโมง (Lu *et al*., 2010) และพบว่า *Rhodovulum sulfidophilum* สามารถลดค่า COD ในน้ำเสียจากปลาซาร์ดีนได้ถึง 85% หลังการบำบัดน้ำเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Azad *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดโลหะหนักสำหรับ Pb, Cu, Cd, Zn และ Na ในบ่อกุ้งได้ถึง 39%, 20%, 7%, 5% และ 31% ตามลำดับ เมื่ออยู่ในสภาวะมีแสงมีอากาศน้อย (microaerobic-light) หรือ สภาวะมีอากาศ ไม่มีแสง (aerobic-dark) (Panwichian *et al*., 2010) อย่างไรก็ตามในการศึกษาการใช้กลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวในการควบคุมคุณภาพน้ำ ตะกอนของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งจากสารอาหารที่เหลือซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีน และความสามารถในยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง เช่น *Vibrio* spp. ยังมีน้อยมาก ดังนั้นจึงสนใจศึกษาหัวข้อนี้เพื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่อาจช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว และนำไปสู่การพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

บทตรวจเอกสาร

1. ลักษณะบ่อเลี้ยงกุ้งตลอดการเลี้ยง

การเลี้ยงกุ้งให้ประสบผลสำเร็จขึ้นอยู่ปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน เช่น ประสบการณ์ ความรู้ความสามารถ ความเอาใจใส่ การเรียนรู้ปรับเปลี่ยนของผู้เลี้ยง เพราะปัจจัยทุกอย่างเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาไปในทางที่ด้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังนั้นถ้าผู้เลี้ยงไม่ปรับเปลี่ยนพัฒนาก็คงไม่ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้ความสำเร็จในขั้นต้น คือ ลูกกุ้ง ซึ่งต้องจัดหาลูกกุ้งที่แข็งแรง สุขภาพดี ไม่ติดเชื้อโรค อีกประเด็นหนึ่งที่มีความสำคัญและไม่ควรมองข้าม คือ การเตรียมบ่อที่ดี การจัดการอาหาร การดูแลสุขภาพกุ้ง และการควบคุมคุณภาพน้ำที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งตลอดการเลี้ยง (สิริ, 2547) นอกจากนี้ในการเลี้ยงกุ้งนั้นผู้เลี้ยงเองก็ต้องมีจริยธรรมในการเลี้ยงกุ้ง มีกรอบปฏิบัติเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการเลี้ยงกุ้งโดยใช้หลักวิชาการที่ถูกต้อง มีการแก้ไขปัญหาในการเลี้ยงอย่างเป็นระบบเพื่อส่งผลดีต่อการเลี้ยงกุ้งและสิ่งแวดล้อม (สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล) ซึ่งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งนั้นมีดังนี้ (วัลลภ, 2532 อ้างโดย มณฑกานต์, 2547; สิริ, 2547; สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2549)

1. อุณหภูมิ (Temperature) กุ้งต้องการอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส โดยกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็นจึงไม่สามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ได้เหมือนสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตามธรรมชาติเพียงเล็กน้อยจึงไม่มีผลต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดมากเกินไปทำให้การกินอาหารและเจริญเติบโตของกุ้งลดลง

2. ความเค็มของน้ำ (Salinity) หมายถึงปริมาณของเกลือโดยเฉพาะโซเดียมคลอไรด์ที่ละลายในน้ำ ความเค็มที่กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตได้ดีอยู่ในช่วง 15-30 ppt กรณีที่น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งมีความเค็มสูงกว่าความเค็มของเลือดในตัวกุ้งน้ำภายในตัวกุ้งจะซึมออกจากตัวกุ้งตลอดเวลาทำให้กุ้งสูญเสียน้ำจนกุ้งตาย ส่วนในกรณีที่น้ำในบ่อกุ้งมีความเค็มต่ำกว่าความเค็มในเลือดกุ้ง น้ำภายนอกจะไหลเข้าตัวกุ้งทำให้เลือดในตัวกุ้งจางลงและตายในที่สุด ดังนั้นในการปรับความเค็มต้องปรับแบบค่อยเป็นค่อยไปและกุ้งจะโตช้าลงเมื่อความเค็มสูงกว่า 25 ppt และถ้าความเค็มเปลี่ยนแปลงแบบรวดเร็วทำให้กุ้งตายได้

3. ออกซิเจน (Oxygen) เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการเลี้ยงกุ้งเพราะกุ้งใช้ออกซิเจนเพื่อการหายใจและออกซิเจนยังช่วยในการย่อยสลายเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายต่างๆ ของกุ้งด้วย ปริมาณออกซิเจนในน้ำที่กุ้งต้องการต้องมีปริมาณออกซิเจนในน้ำไม่น้อยกว่า 3-5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกุ้งขนาดเล็กต้องการออกซิเจนมากกว่ากุ้งขนาดใหญ่ กุ้งที่มีขนาด 0.1-0.5 กรัม ใช้ออกซิเจนชั่วโมงละประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนกุ้งขนาด 10-20 กรัม ใช้ออกซิเจนประมาณ 0.3 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง และกุ้งจะใช้ออกซิเจนสูงในระยะที่ลอกคราบ (Boyd, 1989 อ้างโดยจันทร์จิรา, 2544) ถ้าในน้ำมีออกซิเจนน้อยกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะไม่กินอาหาร ลดการเคลื่อนไหวลง กล้ามเนื้อในส่วนหางของกุ้งจะเป็นสีขาวและอาจตายได้

4. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งมีค่าระหว่าง 7.5-8.5 ซึ่งเป็นระดับ pH ของน้ำทะเลทั่วไปและเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยปกติ pH จะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่ pH จะเปลี่ยนแปลงก็ต่อเมื่อเกิดการเน่าสลายของอาหารที่ตกค้าง หรือมีการเกิดของแพลงก์ตอนพืชมาก เพราะถ้ามีแพลงก์ตอนพืชมากจะทำให้ pH สูงตามไปด้วย ความเป็นกรด-ด่างจะมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงวันซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการลอกคราบของกุ้ง

5. ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เป็นก๊าซที่เกิดขึ้นในบ่อกุ้งจากการที่ซัลเฟตถูกดึงเอาออกซิเจนออกโดยแบคทีเรียที่ใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการหายใจ เช่น *Sulfolobus thermothrix, Clostridium nitrificans* หรือ *Bacillus megaterium* (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552) ซึ่งก๊าซนี้มีกลิ่นเหมือนไข่เน่า ถ้ามีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์มากเกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทำให้กุ้งเสียการทรงตัวและตายในที่สุด

6. แอมโมเนีย (NH_3) เกิดจากการขับถ่ายของเสียจากสัตว์และการเน่าสลายของเศษอาหารที่ตกค้างในบ่อ โดยแอมโมเนียในบ่อกุ้งอยู่ในรูปของก๊าซแอมโมเนียและในรูปของแอมโมเนียมไอออนมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ เมื่อ pH ของน้ำสูงแอมโมเนียจะเพิ่มขึ้น ทำให้ความเป็นพิษของแอมโมเนียสูงตามไปด้วย ปริมาณของแอมโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียในน้ำแสดงถึงความไม่สมดุลของแอมโมเนียในน้ำ และขาดระบบการกรองน้ำที่ดีหรือการให้อาหารแก่สัตว์น้ำมากเกินไป หรือการปล่อยสัตว์น้ำในอัตราที่หนาแน่นทำให้กระบวนการกำจัดแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทไม่ทันจึงเกิดการสะสมแอมโมเนีย

ทำให้เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ โดยปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียที่มีผลต่อคุณภาพน้ำแสดงดังตารางที่ 1.1

7. ไนไตรท์ (NO^-_2) เป็นสารกึ่งกลางที่เกิดจากการเปลี่ยนแอมโมเนียที่เป็นพิษไปเป็นไนเตรทที่ไม่เป็นพิษ ถ้าปริมาณไนไตรท์ในน้ำมากเกินไปอาจทำอันตรายต่อสัตว์น้ำทั้งทางตรงและทางอ้อม คือ ทำให้สัตว์น้ำมีสีซีดลงและติดเชื้อได้ง่าย ปริมาณไนไตรท์ในบ่อกุ้งไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าอยู่ในระดับ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าการกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำไม่เร็วพอ คือ เกิดจากการเลี้ยงที่หนาแน่นการให้อาหารมากเกินไป หรือมีระบบการกรองน้ำไม่ดีทำให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำได้

ตารางที่ 1.1 ปริมาณแอมโมเนียที่มีผลต่อคุณภาพน้ำ

ระดับแอมโมเนีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	คุณภาพน้ำ
0	ดีมาก
0.25	อาจเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำได้
1.5	เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ
3.0	ทำให้สัตว์น้ำบางชนิดตายทันที
5.0	ทำให้สัตว์น้ำตายทันที

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก มณฑกานต์, 2547

8. ไนเตรท (NO^-_3) เกิดจากการที่ไนไตรท์ถูกออกซิไดซ์โดยใช้ออกซิเจน ซึ่งในสภาพปกติปริมาณของแอมโมเนียและไนไตรท์จะมีปริมาณน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะมีปริมาณไนเตรทสะสมอยู่ กระบวนการที่ทำให้ไนเตรทเพิ่มขึ้น คือ มีการสลายตัวของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์เพิ่มขึ้น มีการให้อาหารมากเกินไปมีการใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนไนเตรทไม่เกิดอันตรายกับสัตว์น้ำมากเมื่อเทียบกับแอมโมเนียและไนไตรท์แต่ไนเตรททำให้คุณภาพน้ำไม่ดี ปริมาณไนเตรทที่มีผลต่อคุณภาพน้ำ (ตารางที่ 1.2)

9. ธาตุอาหารในน้ำ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และพวกซิลิกา ธาตุอาหารเหล่านี้จะเป็นตัวเร่งให้แพลงก์ตอนต่างๆ ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและช่วยปรับสภาพน้ำให้มีคุณภาพดี

10. ความขุ่นใสของน้ำ ในบ่อเลี้ยงไม่ควรมีความขุ่นเกิน 25 หน่วย เพราะถ้ามีความขุ่นมากทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง

ตารางที่ 1.2 ปริมาณไนเตรทที่มีผลต่อคุณภาพน้ำ

ระดับไนเตรท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	คุณภาพน้ำ
0.0-12.5	ดีมาก
12.5-25.0	ปานกลาง ควรเปลี่ยนน้ำบ้าง
25.0-50.0	ไม่ดี เริ่มมีมลภาวะต้องเปลี่ยนน้ำ
มากกว่า 50	จำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำ

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก มณฑกานต์, 2547

แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งไประยะหนึ่งก็พบว่าสภาพพื้นบ่อมีเศษอาหารที่เหลือและสิ่งปฏิกูลต่างๆ หมักหมมตามพื้นบ่อ ถ้าทิ้งไว้อาจเกิดกลิ่นเหม็นและเป็นพิษต่อกุ้ง ซึ่งการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (ในการเลี้ยงแบบระบบเปิด) สามารถเจือจางและนำของเสียออกไปจากบ่อเลี้ยง แต่ในปัจจุบันใช้การเปลี่ยนถ่ายน้ำจากคลองส่งน้ำทะเลโดยตรง ไม่ได้พักเก็บน้ำ ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงและการเลี้ยงแบบระบบปิด ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ อินทรียวัตถุ (อาหารและสิ่งขับถ่ายจากกุ้ง) ที่ใส่เข้าไปเท่าไรก็อยู่ในบ่อทั้งหมดตลอดการเลี้ยง นอกจากนี้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งก็มีผลต่อการเกิดโรคกุ้งเช่นกัน โดยสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นตัวช่วยให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีและส่งผลให้เกิดการติดเชื้อขึ้นในกุ้ง ดังนั้นควรแก้ไขโดยการดูแลควบคุมการให้อาหารโดยไม่ให้ในปริมาณที่มากเกินไปเพื่อให้อยู่ในระดับที่ธรรมชาติบำบัดภายในได้ หรือบริหารจัดการช่วยให้ระบบธรรมชาติบำบัดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น แบคทีเรียกินสิ่งเน่าเปื่อยและแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์กินแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรีย และกุ้งกินแพลงก์ตอนสัตว์ ซึ่งกุ้งสามารถนำมาเป็นอาหารมนุษย์ได้ โดยถือหลักให้ห่วงโซ่อาหารเกิดความสมดุลในบ่อเลี้ยงกุ้งหรือเก็บเกี่ยวมาใช้ประโยชน์ให้มากที่สุด โดยทั้งนี้แหล่งที่มาของสารอินทรีย์นั้นมีที่มาได้จาก

1. อาหารที่ให้กับกุ้ง จากการศึกษาพบว่า มีเพียง 30% ของโปรตีนหรือไนโตรเจนในอาหารที่ถูกนำไปสร้างเป็นเนื้อกุ้งหรือเพื่อการเจริญเติบโต ส่วนที่เหลือถูกขับออกมาเป็นมูล ซึ่งสิ่งขับถ่ายจากสิ่งมีชีวิตในบ่อกุ้ง ไม่ว่าจะเป็นขี้กุ้ง ขี้ปลา หรือขี้หอย ล้วนเป็นสารอินทรีย์ที่สะสมในบ่อกุ้งทั้งสิ้น

2. สารอินทรีย์จากการตายของแพลงค์ตอนพืชและแพลงค์ตอนสัตว์ หากในน้ำมีธาตุอาหารสมบูรณ์ แพลงค์ตอนจะเจริญได้ดี หรือที่เรียกว่าแพลงค์ตอนบลูม เมื่อธาตุอาหารมีไม่พอ หรือถ้าไม่มีสัตว์น้ำที่กินแพลงก์ตอน แพลงก์ตอนดังกล่าวก็จะแก่และตายกลายเป็นของเสีย (สารอินทรีย์) สะสมที่พื้นก้นบ่อโดยตรง เมื่อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในบ่อหรือใส่ลงไปใหม่ย่อยสลายสารอินทรีย์หรือเศษอาหารเหลือให้เป็นธาตุอาหาร เช่น N, NO^{-}_{3}, C, P และ S หากพื้นบ่อและน้ำมีออกซิเจน แต่หากพื้นบ่อและน้ำขาดออกซิเจนสารอินทรีย์จะถูกย่อยสลายไปเป็นก๊าซมีพิษ เช่น NH_3, H_2S, และ CH_4 เป็นต้น ซึ่งจุดนี้เป็นผลเสียต่อการเลี้ยงกุ้ง

3. ตะกอนหรือเลนพื้นบ่อในการเลี้ยงครั้งแรก โดยบ่อที่ขุดใหม่ตะกอนเลนยังมีอยู่น้อย แต่เมื่อผ่านการเลี้ยงไปหนึ่งรุ่นจะมีเลนที่พื้นบ่อเป็นจำนวนมาก

4. อินทรีย์สารที่มากับน้ำ เช่น ตะกอนดิน ซากสิ่งมีชีวิตต่างๆที่ติดมากับน้ำก่อนนำมาใช้ ถ้าหากดึงน้ำมาใช้โดยตรงจากแหล่งน้ำธรรมชาติย่อมมีตะกอนหลุดลอดเข้ามาในบ่อกุ้งอย่างแน่นอน โดยปริมาณมาก หรือน้อยขึ้นกับที่ตั้งฟาร์มและฤดูกาล (สืบค้นจาก: http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=17 เมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2554; สิริ, 2547)

2.ลักษณะอาหารกุ้ง

ในปัจจุบันการผลิตอาหารสัตว์น้ำมีมาตรการต่างๆ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และความยั่งยืนของสิ่งแวดล้อมที่ดี โดยมีระบบการผลิตที่ดี คือ ระบบมาตรฐาน GMP (Good Manufacture Practice) หลักการคือ อาหารต้องทำจากวัตถุดิบคุณภาพดี มีสารอาหารครบถ้วนเพียงพอเหมาะสมกับชนิดของสัตว์น้ำ มีกระบวนการผลิตที่ดี มีการเก็บรักษาที่ถูกต้องเหมาะสม อาหารควรมีสารเหนียวหรือสารยึดติด และการผลิตที่เฉพาะหรือเหมาะสม ที่ช่วยให้มีความคงทนในน้ำได้ดี มีประสิทธิภาพเหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสัตว์น้ำสูง เพื่อให้อาหารเกิดประโยชน์สูงสุดและสัตว์น้ำได้รับอาหารมากเพียงพอ ซึ่งช่วยให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตดี ลดค่าใช้จ่าย ไม่เกิดอาหารเหลือมากที่อาจทำให้เกิดอาหารเน่าเสียจนส่งผลต่อคุณภาพน้ำ รวมทั้งลดปริมาณของเสียได้ โดยสัตว์น้ำต้องการโภชนาหรือสารอาหารจากวัตถุดิบหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วย

- โปรตีนและกรดอะมิโน (กรดอะมิโนที่จำเป็นมีประมาณ 10 ชนิด)
- ไขมันและสารจำเป็นที่มาจากไขมัน (กรดไขมันที่จำเป็น ฟอสโฟลิปิด และคลอเลสเตอรอล)
- พลังงาน (โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต)
- วิตามิน (ละลายน้ำ 11 ชนิด ละลายไขมัน 4 ชนิด)
- แร่ธาตุ (10 ชนิด)

ซึ่งประเภทของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถแยกชนิดอาหารสัตว์น้ำทั้งกลุ่มปลา/กุ้งทะเล โดยแยกตามชนิดการกินอาหารของสัตว์น้ำได้ 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. อาหารสำหรับสัตว์น้ำกลุ่มที่กินพืช (hervivorous)

- กลุ่มปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาจีน ลิ่นฮื้อ แรด
- ปลาน้ำกร่อย/ทะเล ได้แก่ ปลานวลจันทร์ ปลากระบอก

2. อาหารสำหรับสัตว์น้ำกลุ่มที่กินทั้งพืช-สัตว์ (omnivorous)

- กลุ่มกินพืชค่อนไปทางกินเนื้อ ได้แก่ ปลานิล ตะเพียน

- กลุ่มกินเนื้อมากกว่ากินพืช ได้แก่ ปลาดุก กุ้งก้ามกราม

ดังนั้น อาหารสำหรับกลุ่มปลาที่กินพืชจะมีส่วนผสมที่เป็นแป้งหรือวัตถุดิบพวกพืชมากกว่ากลุ่มที่กินเนื้อ เนื่องจากมีเอนไซม์ (enzyme) หรือน้ำย่อยที่จะย่อยแป้งได้มากกว่า และลักษณะของระบบทางเดินอาหารหรือระบบย่อยอาหารต่างกัน เป็นต้น

3. อาหารสำหรับสัตว์น้ำกลุ่มที่กินเนื้อ (carnivorous) ได้แก่ ปลาช่อน ปลาบู่ ปลากราย ปลาหมอไทย กุ้ง โดยสัตว์น้ำกลุ่มนี้มีความต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูง อาหารที่ใช้เลี้ยงจึงเน้นเป็นเนื้อในปริมาณสูง และใช้แป้งในปริมาณน้อย เพราะน้ำย่อยของสัตว์น้ำกลุ่มนี้สามารถย่อยเนื้อสัตว์ได้ดี ย่อยแป้ง-พืชได้น้อย ถ้าใส่แป้งมากเกินไปจะทำให้สัตว์ย่อยได้ไม่ดีท้องอาจอืดหรือตายได้

ส่วนปลาสวยงามก็จัดกลุ่มตามชนิดของปลากลุ่มกินพืชและกินเนื้อแต่มีการใส่วัตถุดิบอาหารมากชนิดและมีการเติมสารสีธรรมชาติ เพื่อให้ปลามีสีสวยหรือเข้มขึ้นนั้นหมายถึงโปรตีนจัดเป็นโภชนาที่สัตว์น้ำต้องการมากประมาณ 30-50% โดยเฉพาะในกลุ่มสัตว์น้ำที่กินเนื้อ (กุ้ง) เพื่อใช้เป็นสารอาหารสำหรับร่างกายในการสร้าง เนื้อ หนัง อวัยวะต่างๆ เอนไซม์ ฮอร์โมน ภูมิคุ้มกัน และสารพันธุกรรม โดยโปรตีนประกอบด้วยส่วนย่อยของโปรตีนที่เรียกว่ากรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งมี 2 กลุ่มคือ กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) มี 10 ชนิดที่ร่างกายสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ หรือสร้างเองได้ และกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น 10 ชนิดที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นเองได้จึงไม่จำเป็นต้องมีในอาหาร สัตว์น้ำต้องได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกตัวในปริมาณที่พอเหมาะ จึงทำให้ร่างกายสร้างโปรตีนได้ โปรตีนคุณภาพดีที่ทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีควรมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 10 ชนิดในปริมาณที่สมดุล ซึ่งสัตว์น้ำแต่ละชนิดต้องการกรดอะมิโนจำเป็น 10 ชนิดนี้ในปริมาณที่แตกต่างกันไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สัตว์น้ำวัยอ่อนทุกชนิดต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูง เมื่อโตขึ้นความต้องการโปรตีนจึงลดลง (อมรรัตน์ และคณะ, 2548)

3.แบคทีเรียในทะเลและแหล่งการเลี้ยงกุ้ง

ในธรรมชาติตามชายฝั่งทะเลสามารถพบแบคทีเรียทั้งในน้ำและดินตะกอนซึ่งจากรายงานของ พัฒนาและคณะ (2547) พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่ม Coliforms, Fecal coliform, *Vibrio* spp. และ Enterococci ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณหน้าศาลากลางจังหวัดชลบุรี ห้วยกะปิ อ่างศิลา แหลมแท่น ศรีราชา หาดจอมทอง บริเวณปากแม่น้ำ บางปะกง ประแสร์ พังราด จันทบุรี เวพุ และตราด โดยพบ *Vibrio* spp. สูงสุดที่ตรวจพบคือ $2.12x10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่แหลมแท่นในเดือนสิงหาคม และยังพบแบคทีเรียประจำถิ่น (bacterial flora) ได้ทั่วไปทั้งในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง และในตัวกุ้งเอง จากรายงานการศึกษาของ Ruangpan และ Tabkaew (1994); Oxley และคณะ (2002) พบว่า แบคทีเรีย *Aeromonas, Plesiomonas, Photobacterium, Pseudoalteromonas, Pseudomonas* และ *Vibrio* เป็นชนิดหลักในตับอ่อน ลำไส้ และ haemolymph ของการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น ซึ่งอุษณีย์ และสิริ (2543) รายงานว่า จากการเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขนาด 3,220 ตารางเซนติเมตร ความหนาแน่นของกุ้ง 100,000 ตัว/ไร่ พบปริมาณ *Vibrio* spp. เฉลี่ยอยู่ระหว่าง $6.0x10\text{-}5.3\text{-}10^2$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Ruangpan และคณะ (1995) อ้างโดย พรพิมล (2545) รายงานว่าแบคทีเรียประจำถิ่นของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ความหนาแน่นแตกต่างกันที่ระดับ 30 ตัว/ตารางเมตร และ 45 ตัว/ตารางเมตร พบแบคทีเรียรวม และ *Vibrio* ประมาณ $10^3\text{-}10^4$ และ $10^2\text{-}10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในบ่อที่มีความหนาแน่นต่ำ และ $10^4\text{-}10^5$ และ $10^3\text{-}10^4$เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในบ่อที่มีความหนาแน่นสูง และพบ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นตลอดช่วงการเลี้ยง และยังพบแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. damsela*, *V. alginolyticus*,*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae* (non-01) และ *Vibrio* spp. ส่วนแบคทีเรียอื่นๆ ที่พบได้แก่ *Aeromonas*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Plesiomonas* และ *Acinetobacter*

นอกจากนี้ Johnson (1983) รายงานการพบแบคทีเรียบางชนิดบนผิวลำตัวในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำเป็นจำนวนมาก แต่แบคทีเรียเหล่านี้ก็ไม่สามารถทำ อันตรายต่อสัตว์น้ำได้ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม และสัตว์น้ำไม่เกิดอาการเครียด แม้ว่าแบคทีเรียสามารถเข้าสู่ตัวสัตว์ได้ตามบริเวณบาดแผลถ้าหากมีปริมาณไม่มาก สัตว์น้ำสามารถใช้ระบบป้องกันตัวภายในร่างกาย (defense mechanism) กำจัดเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นได้การติดเชื้อแบคทีเรียในระบบเลือด และของเหลวภายในร่างกาย (body fluid) เกิดขึ้นหลังจากสัตว์มีความอ่อนแอ

เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในสัตว์เปลือกแข็ง (crustacean) มักเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ทั้งหมด ยกเว้น *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งมังกร (lobster)

4.โรคกุ้งที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย

โรคกุ้งที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียพบว่าเป็นการติดเชื้อแบบระยะที่สอง (secondary infection) คือ ร่างกายกุ้งอ่อนแอจากสาเหตุอื่นๆ อยู่ก่อนแล้ว เช่น คุณภาพน้ำไม่ดี หรือเกิดความเครียดหรือมีบาดแผล เป็นต้น โรคแบคทีเรียมักเกิดกับกุ้งวัยอ่อน (larvae) โพสท์ลาวา (postlarvae) และกุ้งวัยรุ่น (juvenile) แบคทีเรียก่อโรคในกุ้งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนไหวได้ ส่วนมากเป็นแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ซึ่งได้แก่ *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. splendidus, V. vulnificus, V. damsela* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo, 1990) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวกุ้งได้หลายทาง เช่น ทางปาก โดยการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ทางรอยแผล หรือติดต่อจากแม่กุ้งในกรณีนี้เกิดจากเลือดซึ่งเข้าไปหล่อเลี้ยงรังไข่ทำให้ลูกกุ้งติดเชื้อตั้งแต่ยังอ่อน เป็นต้น บริเวณสำคัญที่สุดซึ่งเป็นจุดอันตรายที่เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวกุ้ง คือ เหงือก จากนั้นจึงเข้าไปตามกระแสเลือดไปตามส่วนต่างๆ หมุนเวียนไปทั่วร่างกายโดยการอาศัยน้ำเลือดที่มีโปรตีนสูงถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหาร เมื่อไปถึงตับหรือตับอ่อนหรือแม้แต่ส่วนอื่นๆ ที่เป็นจุดอับและเป็นแหล่งที่ใช้เป็นอาหารได้บางส่วน แบคทีเรียก็เข้าไปอยู่ในอวัยวะส่วนนั้นแล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นก็มีการแพร่พันธุ์และขยายจำนวนออกไป เมื่อส่วนของเนื้อเยื่อถูกทำลายทำให้กุ้งป่วยโดยเกิดอาการกินอาหารได้ลดลง ซึมและเครียด เสียการทรงตัวเมื่อว่ายน้ำ และในที่สุดก็เกยฝั่งและตายภายใน 2-3 วัน หลังจากนั้นแบคทีเรียก็ออกมาอยู่ในน้ำเพื่อหากุ้งตัวใหม่ (host) เพื่ออาศัยต่อไป

โรคเรืองแสงในกุ้งเป็นโรคหนึ่งที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด สำหรับชนิดที่ตรวจพบในประเทศไทย ได้แก่ *V. fischeri, V. cholerae, V. harveyi* และ *Photobactrium leiognathi* ซึ่งในจำนวนแบคทีเรียเรืองแสงดังกล่าวมานี้ *V. harveyi* เป็นชนิดที่พบในแหล่งน้ำเป็นปริมาณสูงกว่าชนิดอื่นและยังพบในกุ้งป่วยและกุ้งตายอยู่เสมอ (Ruangpan *et al.*, 1995) รายงานวิจัยของ

Ruangpan และคณะ (1995) พบว่า ในบ่อเลี้ยงที่มีการเลี้ยงกุ้งหนาแน่นสูงพบแบคทีเรีย *Vibrio* และแบคทีเรียเรืองแสงในปริมาณสูงกว่าบ่อที่มีความหนาแน่นต่ำและพบว่า หากปล่อยให้ปริมาณแบคทีเรียรวมในบ่ออยู่ในระดับสูง 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 วัน ขึ้นไปกุ้งในบ่อจะเกิดปัญหาด้านสุขภาพ นอกจากนี้เมื่อแยกเชื้อสกุล *Vibrio* จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคจากการเลี้ยงในหลายพื้นที่ของประเทศไทยพบว่ามี *V. harveyi* ในตัวกุ้งด้วย

ความเสียหายจากปัญหาโรคกุ้งทั้งหมดในขณะนี้พบว่าโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* รุนแรงที่สุด ไม่ต่ำกว่า 70% ของโรคทั้งหมดเกิดจากเชื้อโรคนี้เพียงอย่างเดียว ในประเทศไทยโรคเรืองแสงรายงานครั้งแรกในปี 2530 จากโรงเพาะฟักจากกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiemsis*) โดยพบแบคทีเรียเรืองแสงเจริญแพร่หลายมากในบ่อฟักในขณะที่เกิดการตายของลูกกุ้งระยะต่างๆ ถึง 70–100% เมื่อทดสอบการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) พบว่า *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดโรคกับลูกกุ้งแชบ๊วยระยะนอเพลียส (nauplius) มากที่สุด ขณะที่ลูกกุ้งในระยะไมซิส (mysis) และโพสท์ลาวา (postlarva) จะเกิดโรคน้อยลงตามลำดับ และซูเอี้ย (zoea) มากที่สุด ขณะที่เกิดโรคกับกุ้งระยะไมซิสและโพสท์ลาวาได้น้อยลงตามลำดับจนกระทั้งในปี 2556 พบว่า มีการระบาดของโรคตายด่วนในกุ้งทำให้การส่งออกกุ้งของประเทศไทยลดลง จนสูญเสียอันดับที่ 1 ในการเป็นผู้นำการส่งออกกุ้งตลอดจนเกิดปัญหาต่างๆ แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556; ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2558)

5.แบคทีเรียสกุล *Vibrio*

เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งเป็นสาเหตุการตายของกุ้งและปลาจำนวนมาก ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-nagative) รูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curve rod) หรือตรงขนาด 0.5-0.8x1.4-2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้าง endospore หรือ microcyst เมื่ออยู่ในอาหารเหลว (liquid media) มีการเคลื่อนที่โดยใช้ monotrichous หรือ multitrichous flagella เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) สร้าง lateral flagella จำนวนมาก ทุกสายพันธุ์เป็น chemoorganotroph ต้องการ sodium ion เป็นตัวกระตุ้น สำหรับการเจริญโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 5-700 mM ส่วนใหญ่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย D-glucose และ NH_4Cl หมัก

น้ำตาล glucose ได้กรด และส่วนใหญ่ไม่สร้างก๊าซ ทุกชนิดสามารถใช้ D–glucose, D–fructose, maltose และ glycerol ส่วนใหญ่ให้ปฏิกิริยา Oxidase เป็นบวก ทุกชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบได้ในช่วงความเค็มค่อนข้างกว้าง พบได้ทั่วไปในทะเล และบริเวณชายฝั่ง รวมทั้งผิวลำตัว และในลำไส้ของสัตว์ทะเล บางชนิดพบในแหล่งน้ำจืดและเป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล mol% G+C ของ DNA เท่ากับ 38-51 หลายๆ สายพันธุ์ของ *Vibrio* สามารถ swarm ได้บนอาหารแข็ง การ swarm เกิดจากความยาวของเซลล์ และมี lateral flagella เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นผลจากสภาพทางกายภาพ เคมี รวมทั้งความเข้มข้นของอาหาร องค์ประกอบของอาหาร และอุณหภูมิ แบคทีเรียสกุลนี้สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดและสามารถเจริญได้ดีใน differential medium คือ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar) เจริญได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 9 และก่อให้เกิดโรคแบบ secondary infection คือ เมื่อร่างกายของสัตว์น้ำเกิดอาการเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้กุ้งอ่อนแอ ทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายได้จึงเรียกว่าเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) (Prosser *et al*., 1996)

6.แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anoxygenic phototrophic purple bacteria) จัดเป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถที่โดดเด่น คือ ความสามารถในสังเคราะห์แสงโดยใช้รงควัตถุ (pigment) คือ แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ หรือ บี (Bacteriochlorophyll a or b) และคาโรทินอยด์ (Carotenoid) ชนิดต่างๆ เช่น spirilloxanthin, rhodopinal, spheroidene หรือ okenone series (Schmidt,1978) เพื่อสร้างพลังงาน โดยเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีหรือขาดออกซิเจน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ไม่ใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ใช้ซัลไฟด์และสารประกอบของซัลเฟอร์ตลอดจนสารอินทรีย์โมเลกุลเล็กเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Widdel *et al*, 1993; Ehrenreich *et al*., 1994) ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งแบบ photoautotrophically และ/หรือ photoheterotrophically รวมทั้งแบบ heterotrophy ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและเมื่อจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่ใช้ออกซิเจน สามารถแบ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสม

ซัลเฟอร์เป็น 2 กลุ่ม คือ Alphaproteobacteria และ Betaproteobacteria และกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่สะสมซัลเฟอร์ 1 กลุ่ม คือ Gammaproteobacteriaซึ่งอาศัยข้อมูลทางด้านโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจัดกลุ่ม (Imhoff *et al*., 2005)

1. Phototrophic Alphaproteobacteria

แบคทีเรียในกลุ่ม Alphaproteobacteria เป็นกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถสังเคราะห์แสงโดยการใช้แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ หรือ บี (ซึ่งถูก esterified ด้วย phytol หรือ geranylgeraniol) และอีกหลายๆ ประเภทของคาโรทินอยด์สามารถพบได้หลายสี เช่น สีน้ำตาล สีน้ำตาลแดงสีแดงหรือสีชมพู ซึ่งเป็นผลมาจากรงควัตถุ ส่วนใหญ่สามารถเจริญแบบ chemotrophic ในที่มืดได้ด้วย บางชนิดของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความไวต่อออกซิเจนสูง ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มนี้ แต่ก็สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในในน้ำจืด และทะเล ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่มีการสัมผัสกับแสง แบคทีเรียในกลุ่ม Alphaproteobacteria เช่น *Rhodospirillum*, *Phaeospirillum*, *Roseospira*, *Rhodocista*, *Rhodovibrio*, *Rhodothalassium* และ *Rhodospira* เป็นต้น

2. Phototrophic Betaproteobacteria

Betaproteobacteria เป็นกลุ่มของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถสังเคราะห์แสงได้โดยการใช้แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์และคาโรทินอยด์ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งตรง (straight) แท่งโค้ง (curved rods) หรือกลม (sphere) สามารถเคลื่อนที่โดยการใช้ polar flagella สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ มีแสงและมีความแตกต่างจากแบคทีเรียในกลุ่ม Alphaproteobacteria ที่แบคทีเรียกลุ่ม Betaproteobacteria มี ubiquinone และ menaquinone (หรือ rhodoquinone) ที่ตำแหน่ง 8 isoprenoid ของ sidechain (Q-8, RQ-8 และ MK-8) อีกทั้ง “small type” cytochrome C551 ที่พบในกลุ่มของ *Chromatiaceae* และ *Ectothiorhodospiraceae* แต่ไม่พบในกลุ่มของ Alphaproteobacteria (Ambler *et al*., 1979; Dickerson, 1980) แบคทีเรียในกลุ่ม Betaproteobacteria เช่น *Rhodocyclus, Rhodoferax* และ *Rubrivivax*เป็นต้น

3. Phototrophic Gammaproteobacteria

Gammaproteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะแสงสีม่วงที่สะสมซัลเฟอร์ ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ใช้ซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เป็นการเจริญแบบ photolithoautotrophically โดยการใช้แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ หรือ บี และคาโรทินอยด์ชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียในกลุ่ม Gammaproteobacteria เช่น *Ectothiorhodospira, Thiorhodospira, Halorhodospira, Arhodomonas* และ *Alkalispirillum* เป็นต้น

6.1 ประโยชน์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (purple nonsulfur bacteria: PNSB) เป็นแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีพได้หลายสภาวะทั้งในสภาวะที่มีแสง-ไม่มีออกซิเจน (microaerobic-light) และไร้แสง-มีออกซิเจน (aerobic-dark) ซึ่งลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ มีความสามารถในการเจริญได้ทั้งในแบบ photo- และ chemoautotrophy, heterotrophy และ fermentation (Sasikala and Ramana, 1995; Wexler and Startari, 1998) ซึ่งใช้สารอินทรีย์ในการสร้างพลังงาน และมวลเซลล์ ดังนั้นจึงมีการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้ให้เกิดใช้ประโยชน์อย่างมากมาย

1. การบำบัดน้ำเสีย

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนโดยเฉพาะแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์เป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำไม่ว่าทางด้านการเกษตร ปศุสัตว์ หรืออื่นๆ (Wexler and Startari, 1998) ซึ่งตัวอย่างการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียเช่น

Kim และคณะ (2004) ได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ เช่น *Rhodopseudomonas palustris* มาใช้บำบัดน้ำเสียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสุกร โดยคุณลักษณะของน้ำเสียในที่นี้ มีค่า COD สูงมากกว่า 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรและมี

ธาตุอาหารประเภทฟอสเฟตในปริมาณสูง ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดยูโทรฟิเคชั่น (Eutrophication) นอกจากนี้ยังมีสารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds; VOC) ก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ และเมื่อนำแบคทีเรีย *R. palustris* มาใช้ในการบำบัดน้ำเสียภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการลดค่า COD ลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์และลดธาตุอาหารฟอสเฟตได้ 58 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งมีผลช่วยกำจัดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ให้ลดลง

Lu และคณะ (2011) พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ เช่น *Rhodobacter sphaeroides* มีความสามารถในการลดปริมาณ Total nitrogen (TN) ในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลือง ได้ 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการลดค่า COD (Chemical oxygen demand) ได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลในการบำบัดน้ำเสียให้มีคุณลักษณะที่ดีขึ้น

2. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จันทร์จิรา (2544) กล่าวว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากน้ำและดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งสามารถเจริญได้ดีและมีชีวิตได้นานกว่า *V. harveyi* และเมื่อนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปริมาณ 1% พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันและสีของกุ้งกุลาดำได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับเชื้อดังกล่าว นอกจากนี้ Chandrasekaran และคณะ (2011) ยังกล่าวอีกว่า สารสกัดจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่แยกได้จากสิ่งปฏิกูลในบ่อกุ้งมีกิจกรรมในการต้าน *V. harveyi* และ *V. fischerii* โดยวิธี disc diffusion method โดย *R. sphaeroides* ให้กิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุด

3. การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

Sasikala และ Ramana (1995; 1998); Wexler และ Startari (1998) กล่าวว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ไม่ใช้ออกซิเจนมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสารอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันได้ ขณะที่ Oda และคณะ (2004) พบว่า *Rubrivivax gelatinosus* KDDS1 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Proteinase โดยนำมาตรวจหาด้วยอาหาร GM+1% casein plate ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerobic condition) และมีแสง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ มีขนาดโมเลกุล

ประมาณ 32.5 kDa และเมื่อทำการระบุชนิดของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงนี้เป็นเอนไซม์ประเภท serine-type proteinase และสามารถทำงานได้ดีในค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์นี้ คือ 45 องศาเซลเซียส

7. เมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย

กระบวนการเมตาบอลลิซึมเป็นปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ประกอบด้วย catabolism เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่เพื่อให้พลังงานและสาร ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ต่อไป ส่วน anabolism เป็นการนำเอาพลังงานและสารโมเลกุลที่เป็นโครงสร้างพื้นฐานที่ได้จากกระบวนการ catabolism มาสร้างเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยเอนไซม์ ซึ่งสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ โดยแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน คือจุลินทรีย์ซึ่งมีทั้งเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์เรียกว่า endoenzyme และเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาทำงานภายนอกเซลล์เรียกว่า exoenzyme ซึ่งมีข้อดีอีกหลายประการดังนี้ (ดวงพร, 2545; สมใจ, 2547; ดุษณี, 2555)

1. จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมากๆ ได้ในระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและมีขนาดเล็ก จึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก และผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ ทำได้โดยวิธีการง่ายๆ และใช้เวลาไม่มากนัก

3. จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันได้ แต่มีสมบัติบางอย่างต่างกัน จึงสามารถเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่แตกต่างกันได้ตามต้องการ

4. การเพิ่มผลผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยการปรับปรุงพันธุกรรม หรือโดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น

7.1 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนชนิดก้อนกลม (globular protein) มีการขดตัวหรือโครงรูป (conformation) ที่จำเพาะซึ่งถูกกำหนดโดยลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โครงรูปของเอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงได้เช่นเดียวกับโปรตีนทั่วไป และขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย pH และอุณหภูมิ เอนไซม์จำนวนมากเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) ซึ่งจับตัวกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในทางชีวภาพ (Biological catalyst) ที่มีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาอื่นๆ คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหรือสารที่เข้าทำปฏิกิริยาชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เป็นผลให้ร่างกายสามารถควบคุมปฏิกิริยาต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม (คงพัฒน์, 2536; พัชรา, 2541; รัชดาภรณ์, 2556)

7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ส่วนหนึ่งของความสามารถในผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนให้มีปริมาณมากที่สุดของจุลินทรีย์เกิดจากความต้องการในปัจจัยต่างๆ ในสร้างเอนไซม์ซึ่งมีความแตกต่างกัน (ศรีสุดา, 2545)

1. แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากคาร์โบไฮเดรต (ผ่องผกาและวิวิทย์, 2539) ในงานวิจัยของนักวิจัยกล่าวว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือโปรติเอส คือ น้ำตาล กลูโคส และซูโครส ตลอดจนสารประกอบอินทรีย์ เช่น กลูตาเมต และ whey (ศรีสุดา, 2545) โดย Hébert และคณะ (1997) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย casein, yeast extract และกลูโคสสามารถใช้ในการเลี้ยง *Lactobacillus helveticus* CRL581 ในถังหมักเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเนสได้ นอกจากนี้ Geethanjiali และ Subash (2011) พบว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สามารถให้ผลผลิตเอนไซม์สูงที่สุด และจากงานวิจัยของ Jenssen และคณะ (1994) ที่กล่าวว่าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Thermus* sp. RT41A ให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสและกลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นและได้ผลผลิตต่ำเมื่อมีอะซีเตท

2. แหล่งไนโตรเจนโดยทั่วไปจุลินทรีย์ใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อนำไปสร้างกรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ โปรตีนและองค์ประกอบของผนังเซลล์ แต่แหล่งไนโตรเจนเช่น กรดอะมิโนและแอมโมเนียมไอออนที่เข้มข้นในอาหารมีความสามารถในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Frankena *et al.*, 1986; Giesecke *et al.*, 1991) และจากงานวิจัยของ Yamamoto และคณะ (1993) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี skim milk เป็นส่วนประกอบ สามารถนำมาเลี้ยง *L. helveticus* CP790 ให้ผลิตโปรติเอสได้มากกว่าอาหารที่มีส่วนประกอบของเปปไทด์หรือกรดอะมิโน เช่น Briggs Liver Broth และ MRS (de Man Rogose Sharpe) Broth อีกทั้ง Geethanjiali และ Subash (2011) พบว่า ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* ให้ได้ผลผลิตเอนไซม์สูงที่สุด แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ต้องเป็น peptone ในขณะที่ *Prevotella ruminicolo* 23 ใช้ casein และ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วให้ผลผลิตเอนไซม์มากที่สุด (Wang and Hsu, 2005)

3. อุณหภูมิสำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสมีความแตกต่างขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจแตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (ผ่องผกาและวิวิทย์, 2539) ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส *Aspergillus oryzae* ให้การผลิตเอนไซม์ลดลง (Patil *et al*., 2012) ในขณะที่ Akhtar และคณะ (2013) พบว่า *Streptomyces albolongus* และ *S. aburaviensis* ให้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *B. Subtilis* ให้ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Geethanjiali and Subash, 2011) และ *B. cereus* CA15 ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส (Uyar *et al*., 2011)

4. ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ โดยส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นั้นอาจแตกต่างกันเช่นเดียวกับอุณหภูมิ เช่น ในการเลี้ยง *A. oryzae* แบบ Solid substrate fermentation (SSF) เพื่อผลิตเอนไซม์ milk-clotting พบว่าที่ pH 7.5 ให้ผลผลิตมากที่สุด (Patil *et al*., 2012) ส่วน *S. albolongus* และ *S. aburaviensis* ให้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่ pH 8 (Akhtar *et al.*, 2013) ในขณะที่ *B. subtilis* ให้ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 9 (Geethanjiali and Subash, 2011) นอกจากนี้ Uyar และคณะ (2011) พบว่า *B. cereus* CA15 ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 8

5. สารเหนี่ยวนำ ผ่องผกา และวิวิทย์ (2539) กล่าวว่า ในการผลิตเอนไซม์บางชนิดต้องมีสารเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต ซึ่งในบางกรณีสารเหนี่ยวนำอาจมีอยู่ตามธรรมชาติ อีกทั้งสารประกอบบางชนิดมีลักษณะคล้ายสารเหนี่ยวนำธรรมชาติ ซึ่งสามารถเร่งการผลิตเอนไซม์นั้นได้เช่นกัน โดย Hellio และคณะ (1993) กล่าวว่า ในการศึกษาเชื้อ psychrotrophic strain *Pseudomonas fluorescens* MFO ได้มีการใช้ amino acid และ small peptides เป็นสารเหนี่ยวนำ อีกทั้ง Cheng และ Yim (2007) พบว่า ในอาหาร modified (skim milk 3.4% + soybean meal 0.6% + glucose 0.5% + NaCl 1% +$K_2HPO_4$0.5% + $MgSO_4$0.5%, pH 7.3) สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซน์โปรติเอสใน *B. subtilis* BCRC14716 ได้สูงกว่าอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) นอกจากนี้ Jirawatthanapong และคณะ (2543) กล่าวว่า peptone และ yeast extract สามารถเหนี่ยวนำให้ *A. oryzae* U1521 ผลิต alkaline protease หลังจากที่เชื้อเจริญได้ดีแล้ว

8. พื้นที่ผิวตอบสนอง

ปัจจุบันได้มีการเอาวิธีการทางสถิติเข้ามาประยุกต์ใช้ทั้งในงานวิจัยและในทางอุตสาหกรรม โดยในทางอุตสาหกรรมจะมีการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลและตีความหมายเพื่อบ่งบอกถึงระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ส่วนในงานวิจัยสามารถนำสถิติมาใช้ได้ทั้งในการวางแผนการทดลอง (Experimental design) และการวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับในงานวิจัยที่ต้องการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาเงื่อนไขของปัจจัยต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตนั้นจะต้องใช้วิธีการทางสถิติชั้นสูงคือการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology)

Response surface methodology (RSM) คือ การวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการทางสถิติที่อาศัยข้อมูลทางด้านปริมาณ (quantitative data) ที่ได้มาจากการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมเพื่อสร้าง regression analysis ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและค่าตอบสนองในรูปของสมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งอาจเป็นสมการกำลังหนึ่ง (first order model) หรือสมการกำลังสอง (second order model) แต่เนื่องจากในทางปฏิบัติมักจะไม่ทราบรูปแบบความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างตัวแปรผลตอบสนองและตัวแปรอิสระ ดังนั้นจึงต้องมีการประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ดังกล่าวและพบว่า นิยมใช้ตัวแปรแบบกำลังสอง (Second ordermodel) เพราะมีความยุ่งยากและซับซ้อนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัว

แปรแบบอื่นๆ สามารถแสดงตัวแบบกำลังสองได้ (วาศินี และคณะ, 2558) ดังสมการที่ 1 และจากสมการที่สร้างขึ้นนี้ สามารถนำมาสร้างภาพกราฟสามมิติที่เรียกว่า response surface plot (รูปที่ 1.1) ซึ่งแสดงระดับของตัวแปรในแนวระนาบและแสดงค่าตอบสนองในแนวแกนตั้ง หรือสร้างกราฟสองมิติที่เรียกว่า contour plot ซึ่งแสดงค่าตอบสนองในแนวรูปเส้นกราฟหลายเส้น กราฟทั้งสองประเภทนี้มีประโยชน์ในการอธิบายผลของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษา รวมถึงผลร่วมของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง และพร้อมกันนั้นจะสามารถแก้ปัญหาสมการชนิดหลายตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันของตัวแปรผลตอบสนอง (dependent variable) กับคุณลักษณะทางด้านปริมาณของผลิตภัณฑ์ กระบวนการและ/หรือพารามิเตอร์ที่ออกแบบ (Olkku *et al*., 1983 อ้างโดย สุรชัย และประพันธ์, 2557; พรรณทิพย์ และราตรี, 2558)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i-1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

สมการที่ 1.1

เมื่อ y คือ ตัวแปรผลตอบสนอง

x_i คือปัจจัยที่ i;i = 1, 2,..., k

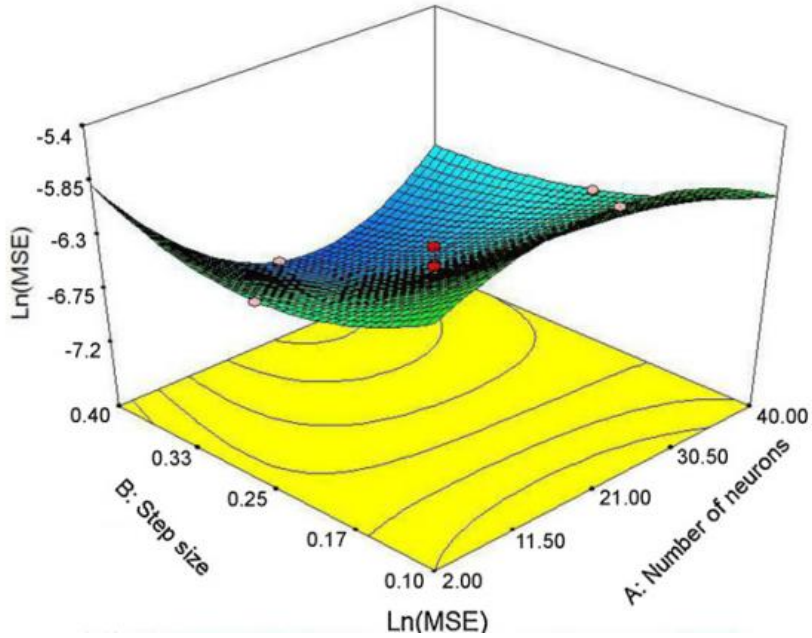
K คือจำนวนปัจจัยทั้งหมด

β_0 คือ จุดตัดแกน y (y intercept)

$\sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i$ คือ เทอมของอิทธิพลเชิงเส้น (Linear Effect)

$\sum_{i-1}^{k} \beta_{ii} x_i^2$ คือ เทอมของอิทธิพลกำลังสอง (Quadratic effect)

และ $\sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} \beta_{ij} x_i x_j$ คือ เทอมของอิทธิพลร่วม (Crossproducteffect)



รูปที่ 1.1 กราฟิกพื้นที่ผิวตอบสนอง

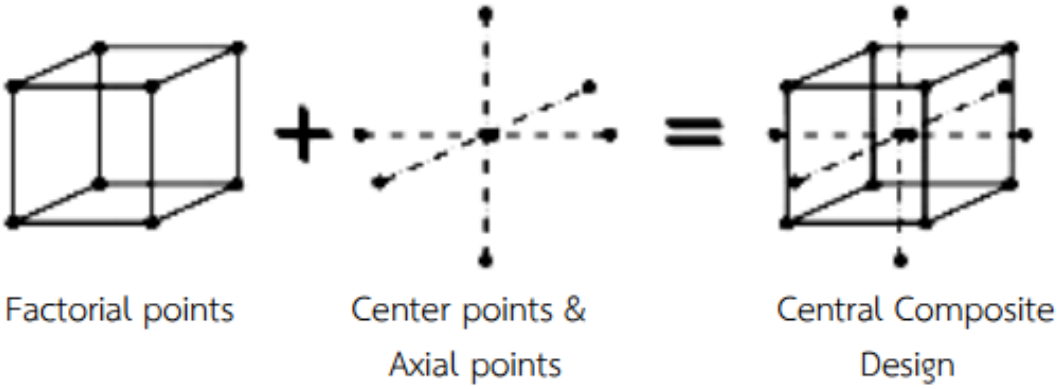
ที่มา : Nazghelichiและคณะ, 2011

การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง

การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design; CCD) เป็นการออกแบบการทดลองโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ที่เมื่อตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งเพิ่มหรือลดค่า ตัวแปรอื่นอาจเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรงทำให้ต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) การกำหนดสภาวะการทดลองที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปร ว่าควรมีจำนวนการทดลองกี่การทดลองจึงเหมาะสม และครอบคลุม เช่น ถ้าต้องการศึกษาตัวแปร 3 ตัว จำนวนการทดลองคือ 3^3 = 27 การทดลอง หากต้องการศึกษาตัวแปร 4 ตัว จำนวนการทดลองคือ 3^4 = 81 การทดลอง หรือ ต้องมีการศึกษาตัวแปร 5 ตัวแปร จำนวนการทดลองคือ 3^5 = 234 การทดลอง ซึ่งไม่เหมาะสมกับสถานการณ์ปัจจุบันที่มีทรัพยากรจำกัด ทางออกของการแก้ปัญหาคือ การใช้การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง ซึ่งเป็นการออกแบบแผนการทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรเชิงเส้นโค้ง แต่ใช้จำนวนการทดลองไม่มาก เช่น

กรณี 3 ตัวแปรจะใช้เพียง 16 แผนการทดลองเป็นต้น (จรัล, 2552; พรรณทิพย์ และ ราตรี, 2558)

การออกแบบการทดลองแบบประสมกลางเป็นการทดลองที่ 3 ระดับ นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ 1, 0, +1 คือจะมีการปรับตัวแปรที่ศึกษาตัวแปรละ 3 ค่า โดยทำการเลือกสภาวะการทดลองบางการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ รูปแบบที่ได้จะยังคงมีผลของตัวแปรหลัก (main effect) ความสัมพันธ์ของตัวแปร (interaction) และสมการกำลังสอง (quadratic terms) โดยใช้ทรัพยากรไม่มาก ตัวอย่างของการออกแบบการทดลองแบบประสมกลางสำหรับ 3 ตัวแปรประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 1. Factorial points เป็นการนำ 2 level full factorial มาเป็นส่วนหนึ่งในการทดลอง 2. Axial points เป็นการปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งโดยให้ตัวแปรอื่นอยู่ที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) และ 3. Center points เป็นการปรับค่าตัวแปรทุกตัวแปรเป็นค่ากลาง (หรือค่า 0) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 (จรัล, 2552; พรรณทิพย์ และราตรี, 2558)



รูปที่ 1.2 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลางสำหรับ 3 ตัวแปร

ที่มา : จรัล, 2552

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้

2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. จากนั้นศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษา/แก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

ความใหม่ที่จะเกิดขึ้นและประโยชน์ที่จะได้รับ

เพื่อเป็นข้อมูลที่นำไปสู่แนวทางในการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถเจริญได้ดีในบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถนำมาใช้บำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ อีกทั้งมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. มาช่วยแก้ไขปัญหาในการเลี้ยงกุ้งโดยไม่เป็นอันตรายต่อตัวกุ้ง ผู้บริโภค ตลอดจนสิ่งแวดล้อม ในการเลี้ยงกุ้งเป็นการเพาะเลี้ยงที่ยั่งยืน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์และแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง Vibrios

- หลอดฝาเกลียวขนาด 150 x 20 มิลลิลิตร
- จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- หลอดไฟทังสเตน 100 วัตต์
- Anaerobic jar, gas pack และ indicator
- ขวดซีรั่ม ขนาด 120 มิลลิลิตร
- อุปกรณ์ทางจุลชีววิทยาอื่นๆ เช่น ห่วงเขี่ยเชื้อ ขวดเลี้ยงเชื้อ ปิเปตขนาดต่างๆ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานทางจุลชีววิทยา และการวิเคราะห์ทางเคมี

- เครื่อง Autoclave ของบริษัท TOMY
- เครื่องHot air oven ของบริษัท Venticell
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น SP-300 ของบริษัท OPTIMA
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ของบริษัท METTLERTOLEDO
- เครื่องหมุนเหวี่ยง Sorvall Rc 5C

- เครื่องวัดความเข้มแสงหน่วยเป็นลักซ์ รุ่นที่ใช้ DK-211

- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ของบริษัท Olympus

3. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 16 ไอโซเลท จากโครงงานทางจุลชีววิทยา (326-491) ตามหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา ปีการศึกษา 2555 ของนายสิริศักดิ์เสียงใหญ่ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 6 ไอโซเลท ที่ได้รับจากงานวิจัยของ ศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ และน.ส. สุภาพร ชุมพล ที่แยกมาจากตัวอย่างดินและน้ำเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 2.1)

4. แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

ใช้แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ จำนวน 3 ไอโซเลท จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 1 ไอโซเลท และจากงานวิจัยของ ศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ และ น.ส. สุภาพร ชุมพลจำนวน 2 ไอโซเลท ดังตารางที่ 2.2

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)

5.1 อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ คือ อาหารสูตร Basic isolation medium (BIM), Glutamate-acetate medium (GA), Glutamate-malate medium (GM) และ G5 medium

5.2 อาหารที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายโปรตีน คือ อาหารสูตร Gelatin medium

5.3 อาหารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. คือ Triptic soy agar (TSA) และ Triptic soy broth (TSB) ที่เติม 1% NaCl

5.4 อาหารที่ใช้ในการนับแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. คือ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar เนื่องจาก TCBS agar จัดเป็นอาหารที่ใช้ในการคัดแยกและบอกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่ม *Vivrionaceae* จากความสามารถการใช้น้ำตาลซูโครส และไม่ใช้น้ำตาลซูโครสออกจากกันได้โดยดูจากสีของโคโลนี เช่น *V. parahaemolyticus* ที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ เมื่อเจริญบนอาหารนี้จะให้โคโลนีสีเขียว ในขณะที่ *V. harveyi* สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ จึงให้โคโลนีสีเหลืองเมื่อเจริญบนอาหารนี้ เป็นต้น (ศุภยางค์, 2547)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ไอโซเลท	แหล่งที่มา	ได้รับมาจาก
PS121, PS132, PS133b, PS133d, PS141, PS142, PS243, PS342, PS342b, PS342d	อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	โครงงานทางจุลชีววิทยา (326-491)
STW1-6, STW16-1, STW16-4, STW18-1, STW4-3	อ.เทพา จ.สงขลา	โครงงานทางจุลชีววิทยา (326-491)
PTS20-1	อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	โครงงานทางจุลชีววิทยา (326-491)
S3W11	อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี	ศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ และ น.ส.สุภาพร ชุมพล
TKW1, TKW17, TKW31, TKW32, TPW55	อ.กันตัง จ.ตรัง	ศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ และ น.ส.สุภาพร ชุมพล

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคตายด่วนในกุ้ง (Early Mortality Syndrome; EMS)

เชื้อ	ไอโซเลท	ได้รับจาก
V. harveyi	PSU 2015	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
V. harveyi	KSAAHRC 32	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
V. parahaemolyticus	KSAAHRC 46	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ
V. parahaemolyticus (EMS)	SR1	ศ.ดร.ดวงพร คันธโชติและน.ส.สุภาพร ชุมพล
V. parahaemolyticus (EMS)	SR2	ศ.ดร.ดวงพร คันธโชติและน.ส.สุภาพร ชุมพล
V. vulnificus	KSAAHRC3	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ

วิธีการทดลอง

1. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยใช้เทคนิค Overlay diffusion method

1.1 การเตรียมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์จำนวน 22 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมีแสง (3,000ลักซ์) มีอากาศน้อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เชื้อเจริญดีจากนั้นปรับปริมาณเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 (10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร แล้วใช้เชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาหยด (drop plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มี 1.5% NaCl จำนวน 3 หยด (1 หยดต่อ 1 ตำแหน่ง) บ่มไว้ในกล่องมืด ในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

นำแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSB ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 ขั้นตอนการทดสอบ

นำแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. มาปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland ($1.5x10^8$เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.ที่ปรับความขุ่นแล้วใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSB ที่มี 0.7% Agar technique และ 1.5% NaCl ปริมาตร 7 มิลลิลิตร (มีเซลล์แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ประมาณ $2.1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เขย่าให้เชื้อผสมกับอาหารนำไปเททับลงบนแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่เตรียมไว้ (ข้อ 1.1) บ่มเพาะเชื้อต่อในสภาวะเดิม ดูผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. จากวงใสการยับยั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.4 การตรวจสอบความผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ที่ถูกยับยั้ง

ในการนำเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ไปตรวจสอบความผิดปกติของเซลล์ ทำได้โดยการตัดวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มี 1.5% NaClบริเวณวงใส และขอบวงใสการยับยั้งเป็นแผ่นขนาด 1x1เซ็นติเมตร มาดึงน้ำออก (dehydrate) แล้วตรึงตัวอย่างก่อนนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งว่าเกิดจากสารต้านแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์หรือไม่

2. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

2.1 การเตรียมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl ในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร แล้วปรับปริมาณเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 (10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

2.2 ขั้นตอนการทดสอบ

ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 มาหยดลงในหลอดอาหารสูตร Gelatin medium และแทงซ้ำด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ เพื่อดูการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน บ่มสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ดูผลโดยดูการเหลวของอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

3. การหาสภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์และการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยการเลี้ยงร่วมกัน

3.1การเตรียมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมีแสง (3,000 ลักซ์) มีอากาศน้อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 (10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลวสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ทำไอโซเลทละ 6 หลอด (ทำ 3 ซ้ำ) แยกเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง มีอากาศน้อยและมีอากาศ ไร้แสง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.2

3.3 ขั้นตอนการทดสอบ

ปรับความขุ่นแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ทุกไอโซเลท (6 ไอโซเลท) ให้เท่ากับ 0.5 McFarland ($1.5x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ใช้ปริมาตรไอโซเลทละ 100 ไมโครลิตร ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSB ที่มี 1.5% NaCl แยกบ่มตามสภาวะเดิมที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในข้อ 3.1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ด้วยการนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSB ที่มี 1.5% NaCl ด้วยเทคนิค pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TCBS เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

เมื่อทราบไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดีในแต่ละสภาวะ (มีแสง มีอากาศน้อย และมีอากาศ ไร้แสง) ถัดไปเป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ที่เชื้อปล่อยออกมาควบคุมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

4. ความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยใช้เทคนิค Agar well diffusion

4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกการหาสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 มาเลี้ยงในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 (10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วเลี้ยงต่อในสภาวะที่เหมาะสม (ดูจากการทดลองที่ผ่านมา) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl โดยใช้เชื้อปริมาตร 10% ของอาหาร ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยใช้เทคนิค Agar well diffusion

4.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.2

4.3 ขั้นตอนการทดสอบ

นำแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลท มาปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland ($1.5x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TSA ที่มี 1.5% NaCl เจาะหลุมหยดน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลการเกิดวงใสการยับยั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

5. ความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ในการยับยั้งการเจริญเของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้น

5.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ตามการเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการทดลองที่ 4 จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์แบ่งเป็น 2 ส่วน คือส่วนหนึ่งนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยเครื่อง

Rotary evaporator และอีกส่วนนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี Freeze-dry แล้วปรับความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเซลล์ให้เข้มข้นขึ้นเป็น 5, 10 และ 20 เท่า เพื่อไว้ใช้ในการทดสอบ

5.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และการทดสอบ

ขั้นตอนการเตรียมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และวิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเหมือนกับการทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar well diffusion เพียงแต่เปลี่ยนมาใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นในแต่ละความเข้มข้นแทน

6. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

6.1 การเตรียมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนได้ดีหรือมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดี หรือย่อยโปรตีนได้และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl ในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ1 (10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

6.2 ขั้นตอนการทดสอบ

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (10% ของอาหาร) ถ่ายลงอาหารเหลวสูตร GA, GM, G5 และ BIM ที่เติม 1.5% NaCl บ่มในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย เมื่อครบ 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พร้อมทั้งหาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) และเวลาที่แบคทีเรียใช้เพิ่มเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time, hour) ในอาหารแต่ละชนิดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density; OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตรทุก 6 ชั่วโมง จนถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 12 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมงแล้วนำมาคำนวณหาค่าดังกล่าว

7. การหาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

7.1 การเตรียมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 6.1

7.2 ขั้นตอนการทดสอบ

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือก (10% ของอาหาร) ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GM ที่เติม 1.5% NaCl (จากผลการทดลองที่ 6) โดยปรับความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที บ่มในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง เมื่อครบ 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสม โดยทุกๆ การทดสอบที่ผ่านมา (ข้อ 1-7) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

8. การเทียบเคียงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์โดยใช้เทคนิค 16s rRNA gene

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GM ที่มี 1.5% NaCl ในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อยให้เข้าสู่ระยะ log phase จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกมาเพื่อสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ 16s rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Ivanovskii *et al*., 2013) แล้วทำบริสุทธิ์ PCR products ด้วย Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นส่ง PCR products ไปวิเคราะห์ลำดับ DNA sequence ที่ Wardmedic ประเทศมาเลเซีย เมื่อได้ข้อมูล นำข้อมูลมา blast ในเว็บไซต์ของ NCBI-BLAST เพื่อเปรียบเทียบ DNA sequences กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

$$\text{Specific growth rate, } \mu = \frac{ln(X2) - ln(X1)}{(t2 - t1)}$$

โดยที่ X_2 = ค่า OD_{660} (nm.) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

X_1 = ค่า OD_{660} (nm.) เริ่มต้น

t_2 = เวลาเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

t_1 = เวลาเริ่มต้นการทดสอบ

ln = ลอการิธึมฐานธรรมชาติ (natural logarithm)

หรือ คำนวณได้จาก

$$\text{Specific growth rate, } \mu = \frac{ln2}{td}$$

โดยที่ $ln2$ = 0.693

td = เวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์เป็น 2 เท่า

เวลาที่แบคทีเรียใช้เพิ่มเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time or doubling time, *td*)

$$\text{Generation time, } td = t_2 - t_1$$

โดยที่ t_2 = เวลาเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

t_1 = เวลาเริ่มต้นการทดสอบ

หรือ คำนวณได้จาก

$$\text{Generation time, } td = \frac{0.693}{\mu}$$

โดยที่ μ = อัตราการเจริญจำเพาะ

9. การศึกษาปัจจัยร่วมอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเกลือที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

9.1 การเตรียมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่ย่อยโปรตีนได้ดีและมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ด้วย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแล้ว (เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากที่ใช้มาเป็น 1% gelatin) ในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร แล้วปรับให้มีค่าเท่ากับ 1 (10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ใช้เป็นกล้าเชื้อ

9.2 ขั้นตอนการทดสอบ

เพื่อศึกษาผลร่วมของ pH ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยศึกษาปัจจัยละ 5 ระดับตามการออกแบบการทดลองของหลักการพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface design: RSM) ที่กำหนดจุดทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design: CCD) ดังตารางที่ 2.3 โดยใช้กล้าเชื้อ 5% เลี้ยงในอาหาร GM ที่เติม 1.5% NaCl ในปริมาตร 50 มิลลิลิตรเลี้ยงในสภาวะไร้แสง มีอากาศ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (จากผลการทดลองที่ 7) เก็บตัวอย่างในแต่ละการทดสอบครั้งละ 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร วัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมา 1 มิลลิลลิตร เติม 1 มิลลิลลิตรของ 1% สารละลายเจลาตินที่มี 2% NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl pH 8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 5% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 มิลลิลลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เพื่อหากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (ดัดแปลงมาจาก Norberg and Hofsen, 1969 อ้างโดยปฐมา รัตน์, 2549) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

ทำกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำนวณกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Unit/ml)

$$\text{Unit/ml} = \frac{\text{tyrosine } (\mu g/ml) \times \text{dilution}}{\text{sample volume } (ml) \times \text{incubation time } (min)}$$

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน คือ กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนอิสระไทโรซีนปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(http://www.degp.go.th/data_env/south/animals/water/kunkuladoum.html., 08/07/2005 อ้างโดย ปฐมารัตน์, 2549)

หลังจากนั้นทำการทดสอบ เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการออกแบบการทดลอง (Verification test) ตามหลักการพื้นที่ผิวผลตอบสนองในการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยทดสอบในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย และไร้แสง มีอากาศ

ตารางที่ 2.3 ตารางการทดสอบการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design: CCD)

ชุดการทดสอบ	ค่าที่ได้จากโปรแกรม RSM			ค่าที่ใช้จริงในการทดลอง		
	pH	NaCl (%)	อุณหภูมิ (ºc)	pH	NaCl (%)	อุณหภูมิ (ºc)
1	7.5	0.5	27	7.5	0.5	27
2	8.5	0.5	27	8.5	0.5	27
3	7.5	2.5	27	7.5	2.5	27
4	8.5	2.5	27	8.5	2.5	27
5	7.5	0.5	33	7.5	0.5	33
6	8.5	0.5	33	8.5	0.5	33
7	7.5	2.5	33	7.5	2.5	33
8	8.5	2.5	33	8.5	2.5	33
9	7.16	1.5	30	7.0	1.5	30
10	8.84	1.5	30	9.0	1.5	30
11	8.0	-0.18	30	8.0	0.0	30
12	8.0	3.18	30	8.0	3.0	30
13	8.0	1.5	24.95	8.0	1.5	25
14	8.0	1.5	35.05	8.0	1.5	35
15*	8.0	1.5	30	8.0	1.5	30
16*	8.0	1.5	30	8.0	1.5	30
17*	8.0	1.5	30	8.0	1.5	30
18*	8.0	1.5	30	8.0	1.5	30
19*	8.0	1.5	30	8.0	1.5	30
20*	8.0	1.5	30	8.0	1.5	30

* :ชุด center point มีจำนวน 6 ซ้ำ

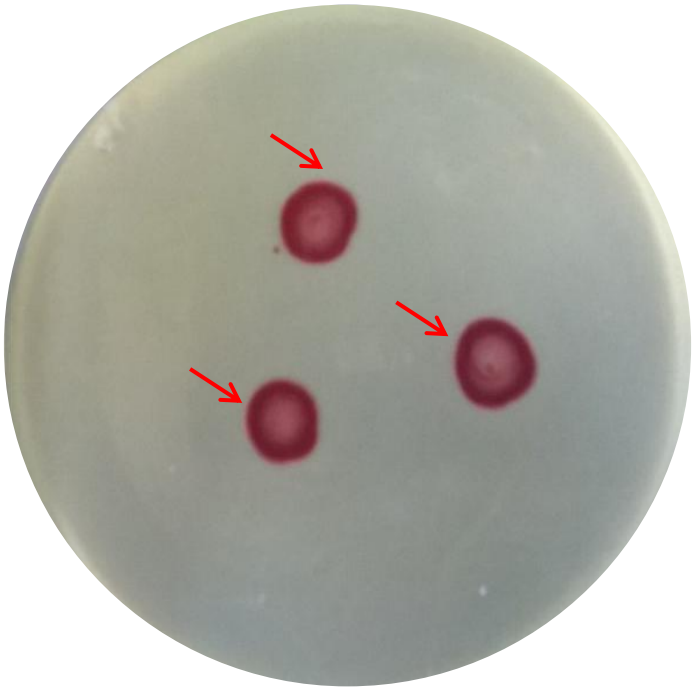
บทที่ 3

ผลการทดลอง และการวิจารณ์ผลการทดลอง

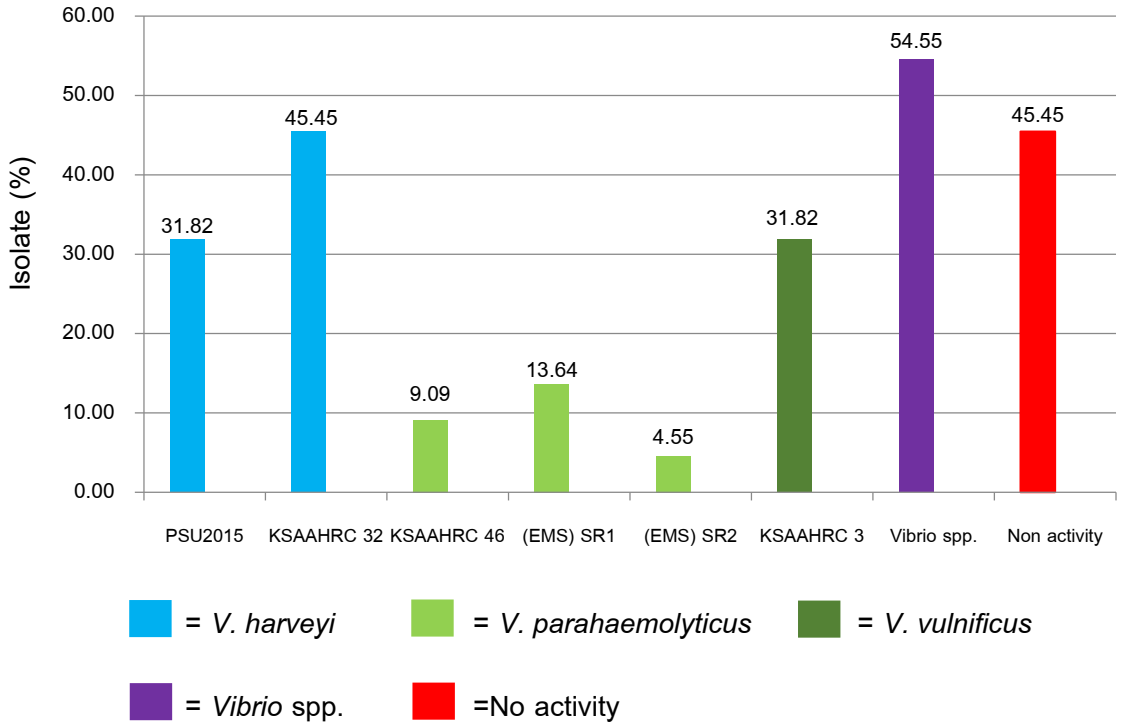
1. ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

เบื้องต้นใช้เทคนิค Overlay diffusion method ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 22 ไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. จำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลท (4.55%) คือ PS342b ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ทุกไอโซเลท ในขณะที่ 11 ไอโซเลท (50.00%) คือ PTS20-1, STW1-6, STW4-3, STW16-1, STW16-4, STW18-1, TKW1, TKW17, TKW31, TKW32 และ TKW55 มีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้บางไอโซเลทเท่านั้น โดยเกิดเป็นวงใสรอบๆ โคโลนี (รูปที่ 3.1) เป็นลักษณะการยับยั้งบางส่วน (partial inhibition) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. คิดเป็น 54.55% (12 ไอโซเลท) จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ทั้งหมดที่นำมาคัดเลือก ในขณะที่ 45.45% (10 ไอโซเลท), 31.82% (7 ไอโซเลท), 31.82% (7 ไอโซเลท), 13.64% (3 ไอโซเลท), 9.09% (2 ไอโซเลท) และ 4.55% (1 ไอโซเลท) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harvey* KSAAHRC 32, *V. harvey* PSU2015, *V. vulnificus* KSAAHRC 3, *V. parahaemolyticus* (EMS) SR1, *V. parahaemolyticus* KSAAHRC 46 และ *V. parahaemolyticus* (EMS) SR2 ตามลำดับ (รูปที่ 3.2) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถผลิตสารออกมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ หรืออาจเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ใช้สารอาหารส่วนใหญ่ที่อยู่ในบริเวณรอบๆ โคโลนี ทำให้แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. เจริญได้ไม่ดี โดยดูได้จากการที่แบคทีเรียก่อโรค

กุ้ง *Vibrio* spp. สามารถเจริญได้ในบริเวณวงใสการยับยั้งและเมื่อนำแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ที่อยู่ในบริเวณวงใส และขอบวงใสการยับยั้งไปดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) พบว่า แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. มีลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติ หรือเกิดหลุมบนตัวเซลล์ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถผลิตสารบางชนิดออกมา ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. เกิดเป็นหลุม หรือรูรั่ว ตลอดจนการเจริญที่ผิดปกติไปของเซลล์ (รูปที่ 3.3) ทำให้เกิดเป็นวงใสการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. จากนั้นนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง 12 ไอโซเลท (40.90%) ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. นำไปเก็บรักษาไว้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



รูปที่ 3.1 ลักษณะวงใสการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. parahaemolyticus* SR1 สาเหตุของโรคตายด่วนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

2.การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ทั้ง 22 ไอโซเลท มาคัดเลือกความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ โดยดูจากการย่อยสลายเจลาตินใน Gelatin medium (รูปที่ 3.4) พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ส่วนใหญ่ (81.82%) สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ในขณะที่บางไอโซเลท (18.18%) ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ดังที่แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง และการย่อย Gelatin ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

ไอโซเลท	การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.						การย่อย Gelatin[1]
	V. harveyi[2]		*V. parahaemolyticus*[2]			*V. vulnificus*[3]	
	PSU2015	KSAAHRC 32	KSAAHRC 46	(EMS)SR1	(EMS)SR2	KSAAHRC3	
PTS20-1	++	-	-	-	-	-	+
PS121	-	-	-	-	-	-	-
PS132	-	-	-	-	-	-	-
PS133b	-	-	-	-	-	-	+
PS133d	-	-	-	-	-	-	-
PS141	-	-	-	-	-	-	+
PS142	-	-	-	-	-	-	+
PS243	-	-	-	-	-	-	+
PS342	-	-	-	-	-	-	++
PS342b	++	+	++	+	++	+	+
PS342d	-	-	-	-	-	-	+

[1] - = ไม่พบการย่อย Gelatin เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน; +, ++ และ +++ = พบการย่อย Gelatin ที่เวลา 4, 3 และ 2 วันตามลำดับ

[2] - = ไม่พบวงใส ; + = วงใส <1 มม. ; ++ = วงใส อยู่ในช่วงระหว่าง 1-5 มม. ; +++ = วงใส > 5 มม.

[3] - = ไม่พบวงใส ; + = วงใส <5 มม. ; ++ = วงใส อยู่ในช่วงระหว่าง 5-10 มม. ; +++ = วงใส > 10 มม.

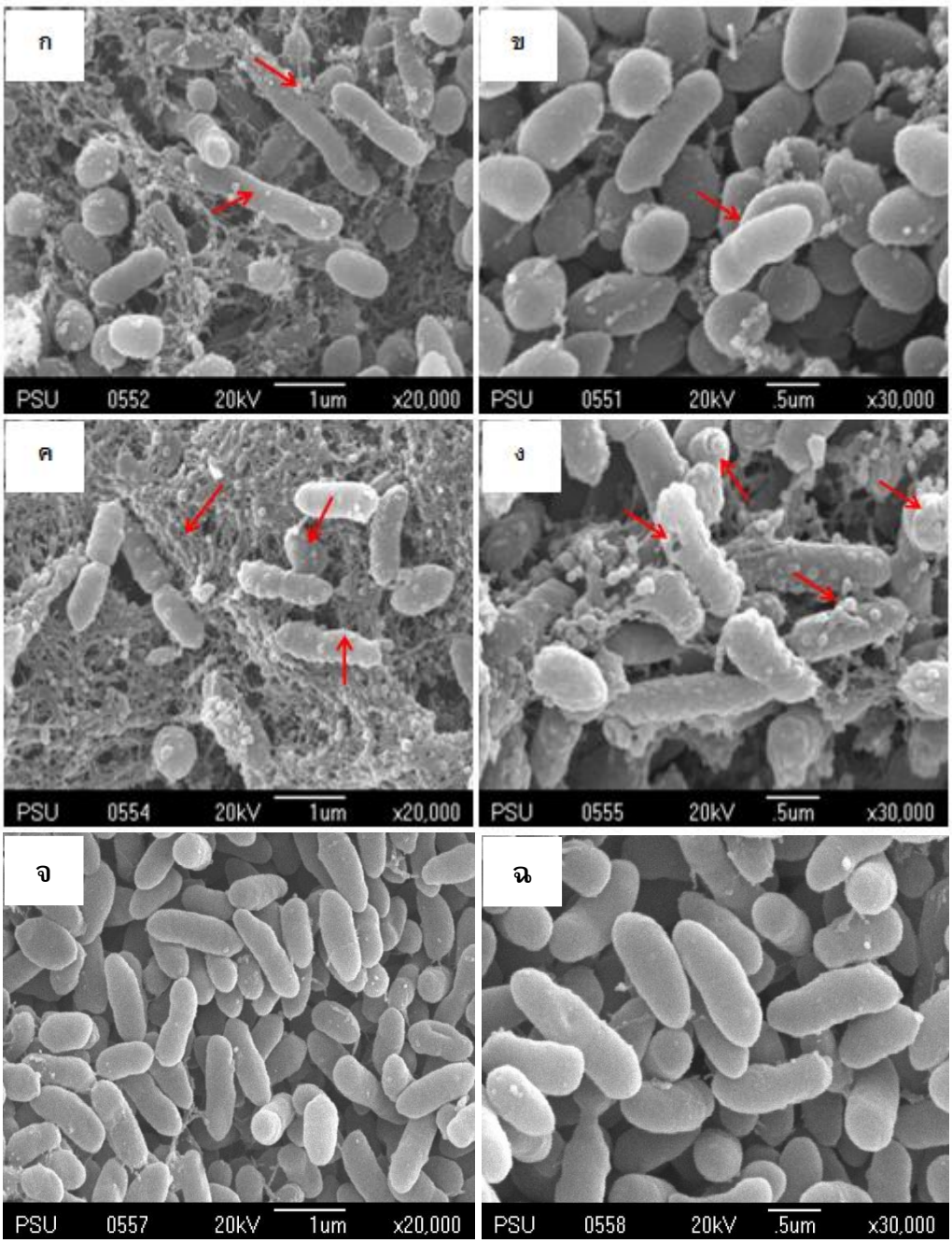
ตารางที่ 3.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง และการย่อย Gelatin ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (ต่อ)

ไอโซเลท	การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.						การย่อย Gelatin[1]
	V. harveyi[2]		*V. parahaemolyticus*[2]			*V. vulnificus*[3]	
	PSU2015	KSAAHRC 32	KSAAHRC 46	(EMS) SR1	(EMS) SR2	KSAAHRC3	
S3W11	-	-	-	-	-	-	+
STW1-6	+	-	-	-	-	-	+
STW4-3	+	+	-	-	-	-	-
STW16-1	+	+	-	-	-	-	+
STW16-4	++	++	-	-	-	-	++
STW18-1	+	++	+	-	-	++	++
TKW1	-	+	-	-	-	+	+
TKW17	-	+	-	-	-	+	+
TKW31	-	+	-	-	-	+	+
TKW32	-	+++	-	+	-	+++	+++
TKW55	-	+++	-	+	-	+++	+++

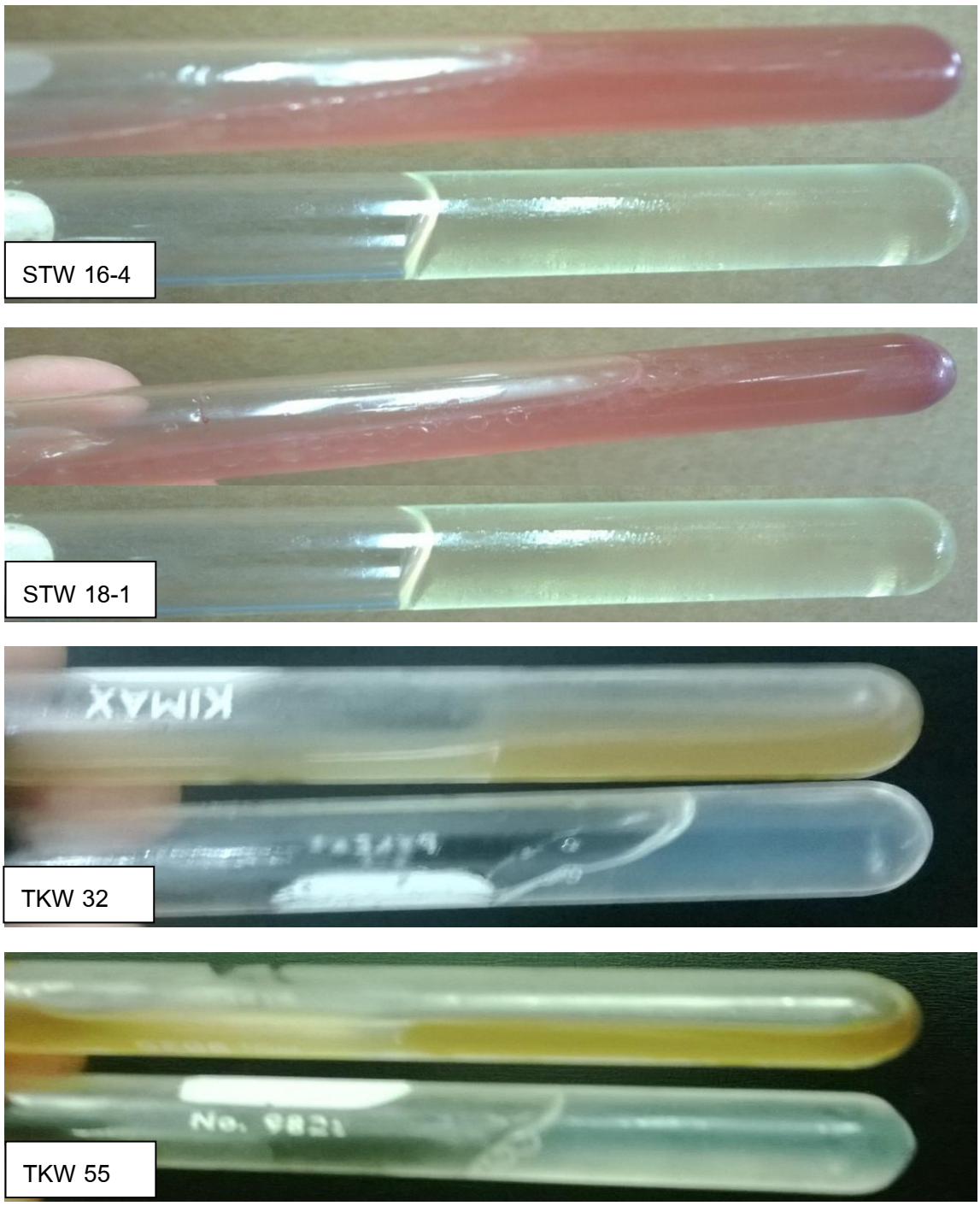
[1] - = ไม่พบการย่อย Gelatin เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน; +, ++ และ +++ = พบการย่อย Gelatin ที่เวลา 4, 3 และ 2 วันตามลำดับ

[2] - = ไม่พบวงใส ; + = วงใส <1 มม. ; ++ = วงใส อยู่ในช่วงระหว่าง 1-5 มม. ; +++ = วงใส > 5 มม.

[3] - = ไม่พบวงใส ; + = วงใส <5 มม. ; ++ = วงใส อยู่ในช่วงระหว่าง 5-10 มม. ; +++ = วงใส > 10 มม.



รูปที่ 3.3 ลูกศรชี้ลักษณะหลุม หรือรูรั่ว ตลอดจนการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* PSU2015 บริเวณขอบวงใสการยับยั้ง (ก และ ข) และภายในวงใสการยับยั้ง (ค และ ง) ภายหลังการทดสอบกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไอโซเลท STW16-4 เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* PSU2015 (จ และ ฉ)



รูปที่ 3.4 การย่อยสลายเจลาตินใน Gelatin medium ให้เหลวโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์เมื่อบ่มในที่มีแสง มีอากาศน้อย ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (หลอดบน) เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (หลอดล่าง)

3. การหาสภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์และการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยการเลี้ยงร่วมกัน

จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยการเลี้ยงร่วมกัน พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง 12 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ดูได้จากปริมาณแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ที่เหลืออยู่ภายหลังการเลี้ยงร่วมกันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ลงไป ทั้งใน 2 สภาวะ คือ เลี้ยงในสภาวะที่มีแสง มีอากาศน้อยและมีอากาศ ไร้แสง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่เชื้อทั้งสองชนิดมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแข่งขันในการเจริญ ตลอดจนการปรับตัวในการเจริญในอาหารที่ใช้ในการทดสอบ (TSA + 1.5% NaCl) ได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. นั้นมีอัตราการเจริญ (ประมาณ 0.219 ชั่วโมง$^{-1}$) (Ma F. *et al*., 2016) ซึ่งอาจสูงกว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ ส่งผลให้การแข่งขันในการเจริญในการใช้อาหาร หรือการผลิตสารยับยั้งเกิดขึ้นได้น้อย ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ลดลงได้น้อยโดยมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุมดังตารางที่ 3.2 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงหาอาหารที่เหมาะสมและค่าการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

4. ความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

เพื่อพิสูจน์ความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. (ผลการทดสอบจากเทคนิค Overlay diffusion method) แล้วปล่อยสารดังกล่าวออกมาในอาหารเหลว หรือน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยง ดังนั้นน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่เลี้ยงในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย จึงได้นำมาใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ด้วยเทคนิค Agar well diffusion จากการทดลอบพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง 12 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง

12 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และปล่อยสารดังกล่าวออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่ถูกปล่อยออกมานั้นมีน้อย ส่งผลให้ไม่เกิดฤทธิ์การยับยั้งโดยมีความแตกต่างจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยใช้เทคนิค Overlay diffusion method ที่ให้ผลการยับยั้งที่สามารถตรวจสอบได้ชัดเจนกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ผลิตและปล่อยสารยับยั้งออกมาในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์โดยใช้เทคนิค Agar well diffusion ความเข้มข้นของสารมีน้อย เนื่องจากเป็นการใช้น้ำเลี้ยงเซลล์จึงไม่มีการเพิ่มปริมาณสารในระหว่างการทดสอบ หรืออีกกรณีอาจเป็นได้ว่าสารที่ปล่อยออกมาละลายได้น้อยในน้ำส่งผลให้ไม่มีการยับยั้งและเพื่อตอบสมมุติฐานดังกล่าว จึงได้นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. ความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้น

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์มาทำให้เข้มข้น โดยเลี้ยงและเตรียมน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ตามการทดลองที่ 4 จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยเครื่อง Rotary evaporator และอีกส่วนนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี Freeze-dry แล้วปรับความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเซลล์ให้เข้มข้นขึ้นเป็น 5, 10 และ 20 เท่า นำมาใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยเครื่อง Rotary evaporator นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความร้อนและเวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวอย่างแห้งที่ร้อนและนาน จึงส่งผลให้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ถูกทำลายหรือเสื่อมคุณสมบัติไป ในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี Freeze-dry พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็น 20 เท่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ดังที่แสดงในตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.5 และ 3.6 จากผลการทดลองนี้สามารถใช้ในการยืนยันได้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ได้ แต่

มีปริมาณน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถใช้น้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ (ไม่ได้ทำให้เข้มข้น) ในการยับยั้งหรือควบคุมแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ และยังสามารถอธิบายได้ว่าในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยการเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์และแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. นั้น นอกจากอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อทั้ง 2 ที่อาจมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนแล้ว สารยับยั้งที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์มีปริมาณน้อยส่งผลให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไม่สามารถยับยั้ง หรือควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ให้มีจำนวนน้อยกว่าชุดควบคุมได้ จึงเป็นผลให้ชุดควบคุมและชุดทดสอบในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. โดยการเลี้ยงร่วมกันมีปริมาณแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. เหลือในปริมาณใกล้เคียงกันภายหลังการทดสอบแต่อย่างไรก็ตาม ในสภาพความเป็นจริงของการเลี้ยงกุ้ง ปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. นั้นมีปริมาณที่ต่ำกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าในการทดสอบ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ย่อมมีปริมาณสูงกว่าแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. มากจากการใช้เป็นกล้าเชื้อในการเลี้ยงกุ้งซึ่งอาจควบคุมปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้

ตารางที่ 3.2 จำนวนแบคทีเรียก่อโรคกุ้งที่เหลือรอดภายหลังการทดสอบเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในสภาวะที่มีแสง มีอากาศน้อย และมีอากาศ ไร้แสงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลท	จำนวนของ *Vibrio* spp. ภายหลังการทดสอบ (10^6cfu/ml)					
	V. harveyi		*V. parahaemolyticus*			*V. vulnificus*
	PSU2015	KSAAHRC 32	KSAAHRC 46	(EMS) SR1	(EMS) SR2	KSAAHRC3
PTS20-1	>300	-	-	-	-	-
PS342b	>300	>300	>300	>300	>300	>300
STW1-6	>300	-	-	-	-	-
STW4-3	>300	>300	-	-	-	-
STW16-1	>300	>300	-	-	-	-
STW16-4	>300	>300	-	-	-	-
STW18-1	>300	>300	>300	-	-	>300
TKW1	-	>300	-	-	-	>300
TKW17	-	>300	-	-	-	>300
TKW31	-	>300	-	-	-	>300
TKW32	-	>300	-	>300	-	>300
TKW55	-	>300	-	>300	-	>300
ชุดความคุม	>300	>300	>300	>300	>300	>300

- = ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากในการทดสอบก่อนหน้า (การทดลองที่ 1) ไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้งดังกล่าว

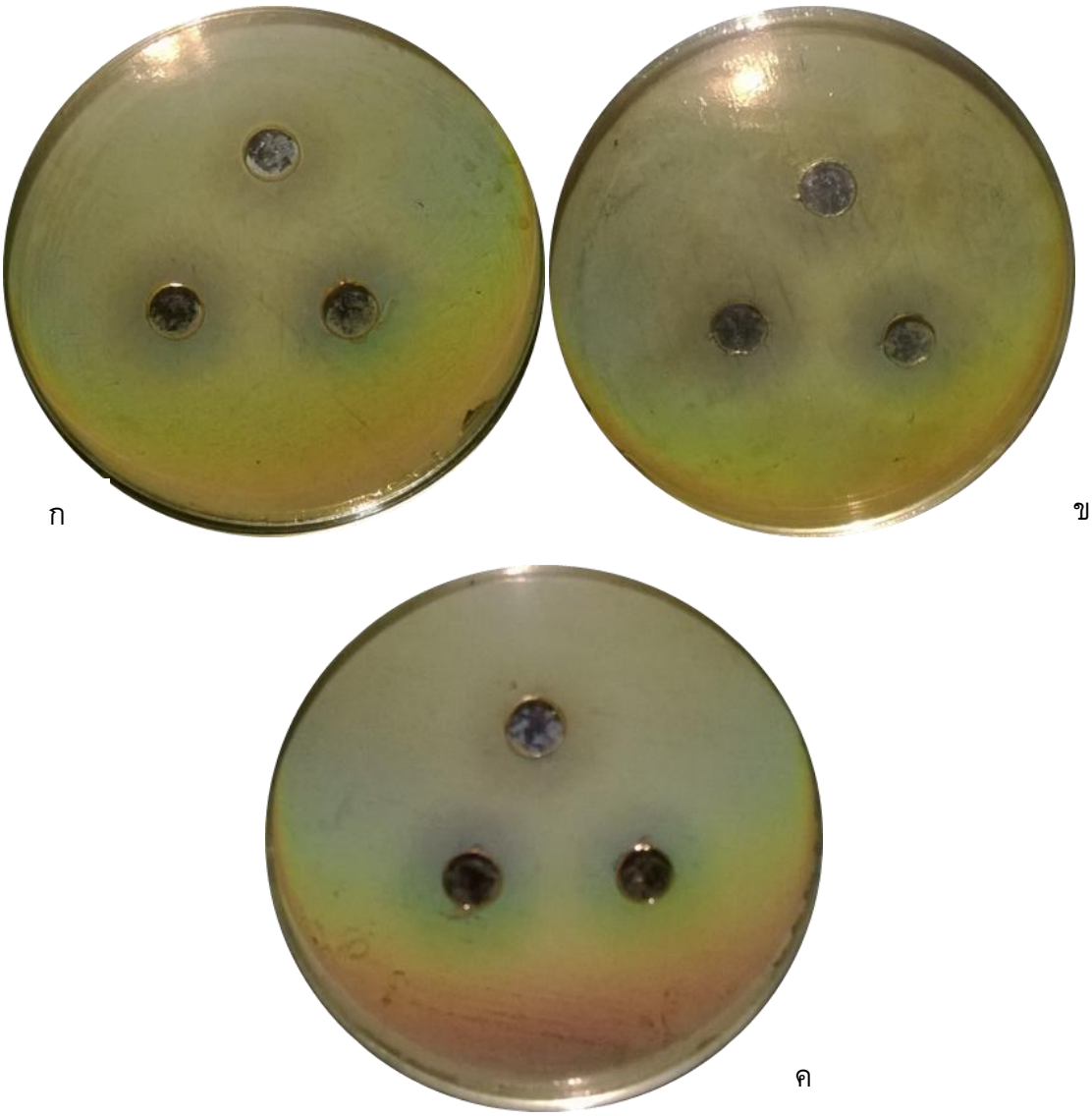
ตารางที่ 3.3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์เมื่อเลี้ยงในสภาวะมีแสง-มีอากาศน้อย โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นขึ้น 20 เท่า

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้ง (มม.)					
	V. harveyi		*V. parahaemolyticus*			*V. vulnificus*
	PSU2015	KSAAHRC 32	KSAAHRC 46	(EMS) SR1	(EMS) SR2	KSAAHRC3
PTS20-1	0	-	-	-	-	-
PS342b	15.8	12.6[d]	0.52	0.42	0.38	13.4[c]
STW1-6	0	-	-	-	-	-
STW4-3	0	0	-	-	-	-
STW16-1	0	0	-	-	-	-
STW16-4	0	0	-	-	-	-
STW18-1	0	18.2[a]	0	-	-	22.8[b]
TKW1	-	11.9[e]	-	-	-	15.4[c]
TKW17	-	12.7[d]	-	-	-	21.7[b]
TKW31	-	12.1[e]	-	-	-	19.6[b]
TKW32	-	15.3[b]	-	0	-	20.2[b]
TKW55	-	14.1[c]	-	0	-	24.4[a]

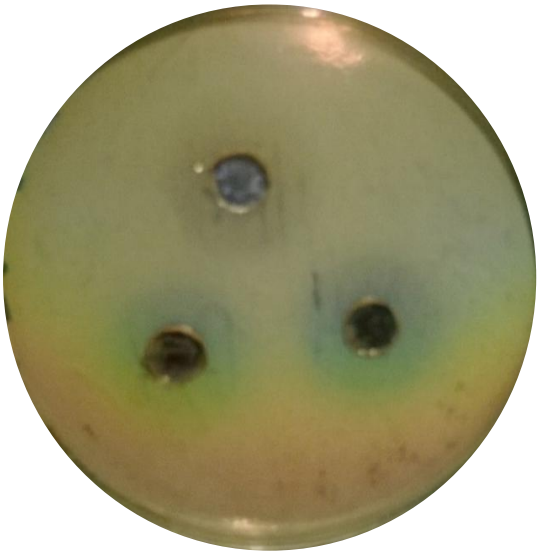
- = ไม่ได้ทดสอบเนื่องในการทดสอบก่อนหน้า (การทดลองที่ 1) ไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้งดังกล่าว

0 = ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้งดังกล่าว

ตัวอักษรที่ต่างกันบนตัวเลขแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละคอลัมน์อยู่ที่ $p<0.05$

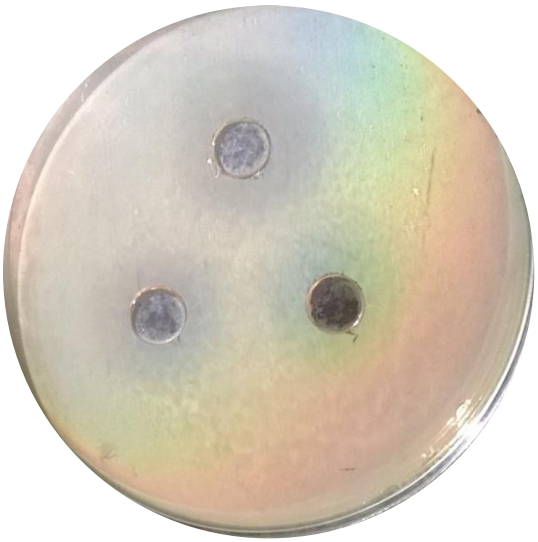


รูปที่ 3.5 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *V. harveyi* PSU2015 (ก), *V. harveyi* KSAAHRC 32 (ข) และ *V. vulnificus* KSAAHRC3 (ค) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไอโซเลท PS342b ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นขึ้น 20 เท่า

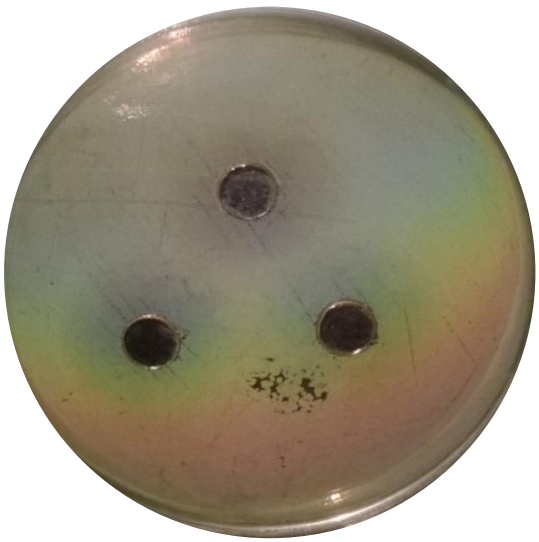


ก

ข



ค

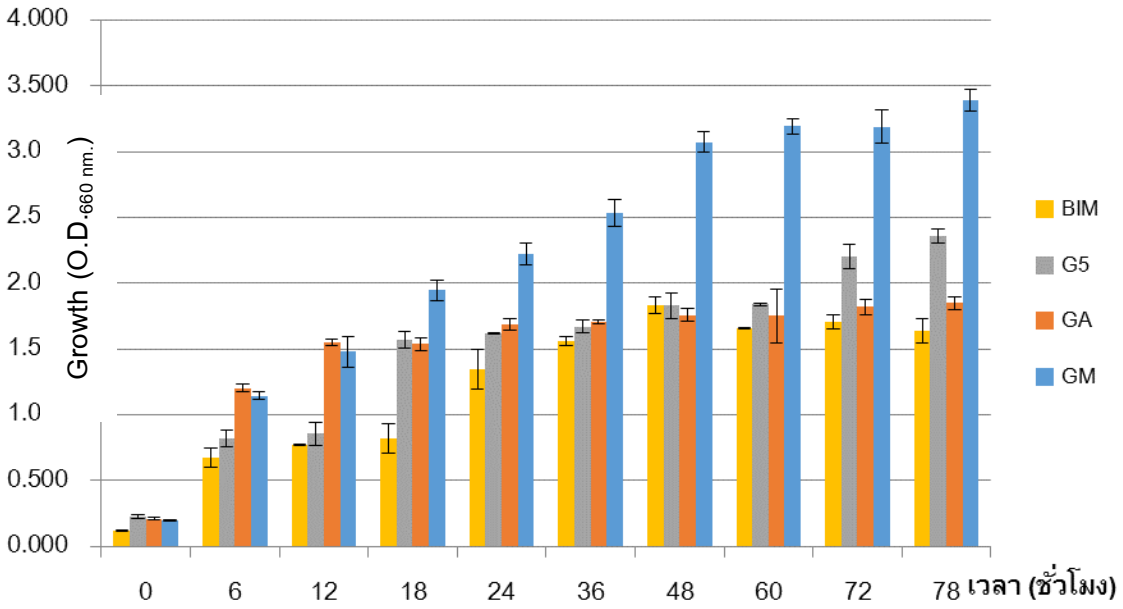


ง

รูปที่ 3.6 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง*V. harveyi* KSAAHRC 32 (ก, ข) และ *V. vulnificus* KSAAHRC3 (ค, ง) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไอโซเลท STW 18-1, TKW32, TPW55 และ TKW17 ตามลำดับที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้นขึ้น 20 เท่า

6. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

หลังจากการคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ดี หรือมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดี หรือย่อยโปรตีน (เจลาติน) และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดีแล้ว พบว่า ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกมีเพียงไอโซเลทเดียว คือ PS342b เนื่องจากให้การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้หลายไอโซเลทที่สุด อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GA, GM, G5 และ BIM ที่เติม 1.5% NaCl บ่มในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย เมื่อครบ 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ตลอดจนหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของเชื้อในอาหารแต่ละชนิดพบว่า ไอโซเลท PS342b สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว GM ที่เติม 1.5% NaCl โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะและเวลาที่แบคทีเรียใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า เท่ากับ 0.336 และ 2.066 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 3.7) และตารางที่ 3.4



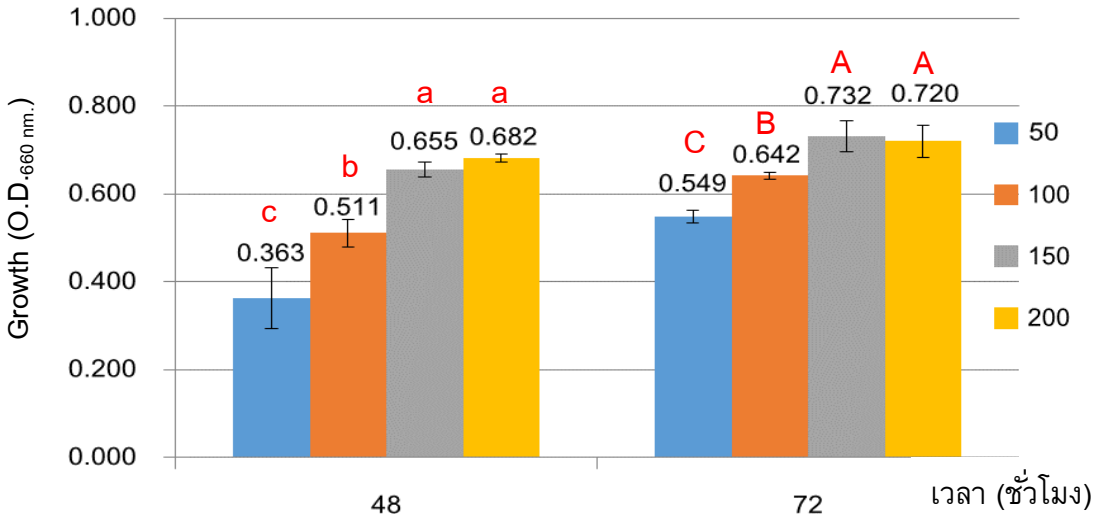
รูปที่ 3.7 การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ที่เจริญในอาหารชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง มีอากาศน้อย

ตารางที่ 3.4 อัตราการเจริญจำเพาะ และเวลาที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า ในอาหารชนิดต่างๆ ภายใต้สภาวะมีแสง มีอากาศน้อย

อาหารทดสอบ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชม$^{-1}$)	เวลาที่ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (ชม.)
BIM	0.173	4.001
G5	0.210	3.298
GA	0.126	5.513
GM	0.335	2.066

7. การหาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

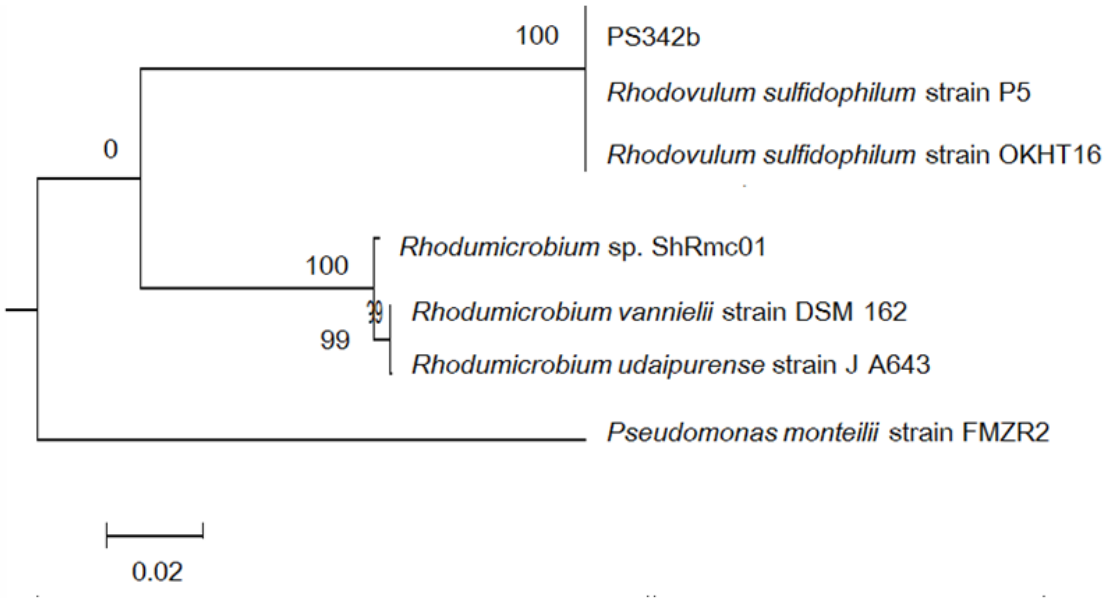
เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GM ที่เติม 1.5% NaCl แยกบ่มในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง โดยปรับความเร็วรอบในการเขย่าเชื้อเป็น 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที บ่มเลี้ยงเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการเจริญของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer เช่นเดียวกับการทดสอบการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการคัดเลือกความเร็วรอบที่ควรใช้ในการเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อมีค่าสูงที่ความเร็วในการเขย่าที่ 150 และ 200 รอบต่อนาที และมีค่าใกล้เคียงกันทั้งที่เวลา 48 และที่ 72 ชั่วโมงภายหลังการบ่มเลี้ยงดังที่แสดงในรูปที่ 3.8 ดังนั้น ในการทดสอบต่อไปจึงเลือกใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานที่ใช้ในการทดสอบ และในการนำไปใช้



รูปที่ 3.8 การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ที่เลี้ยงในอาหารสูตร GM ที่เติม 1.5% NaCl บ่มเลี้ยงที่ความเร็วรอบในการเขย่าที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง

8. การเทียบเคียงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์โดยใช้เทคนิค 16s rRNA gene

จากการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b มาบ่งชี้ชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค 16s rRNA gene พบว่า เมื่อนำข้อมูลมา blast ในเว็บไซต์ของ NCBI-BLASTเปรียบเทียบ sequences ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้วพบว่า มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ *Rhodovulum sulfidophilum* strain P5 และ *Rhodovulum sulfidophilum* strain OKHT16 ถึง 100% ดังที่แสดงในรูปที่ 3.9 จากผลแสดงว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b เป็นเชื้อ *Rhodovulum sulfidophilum*



รูปที่ 3.9 แผนภาพต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b กับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ

9. ผลของปัจจัยร่วมอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเกลือที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ภายหลังการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ที่เจริญในอาหารสูตร GM ที่เติม 1.5% NaCl และเปลี่ยนแหล่งไนโตเจน จาก $(NH_4)_2HPO$ มาเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของเจลาติน ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสงที่ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างมาวัดการเจริญของเชื้อ ค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป และหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ดังที่แสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6 จากการทดสอบพบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.5) โดยเป็นช่วงเวลาที่เชื้อเจริญ ($O.D._{660}$= 0.906±0.044) เข้าสู่ระยะ stationary phase (รูปที่ 3.7) และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่มีค่าสูงที่สุด ก็พบว่า ค่าดังกล่าวมีค่าสูงที่สุดที่เวลา 48 ชั่วโมง จึงกล่าวได้ว่า ในช่วงที่เชื้อเจริญเต็มที (เข้าสู่ระยะ stationary phase) สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงกว่าช่วงการเจริญก่อนหน้า ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ระหว่าง 11.02-14.71 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.6) และเมื่อนำผลที่ได้จากการทดลองมาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเพื่อนำไปสร้างสมการทำนายค่าการตอบสนอง โดยสมการที่ 3.1 ซึ่งเป็นรูปแบบสมการกำลังสองที่สามารถนำมาหาพื้นที่การตอบสนอง ณ จุดใดๆ ในแต่ละช่วงของปัจจัยที่กำหนดไว้ได้ และเมื่อแทนค่าปัจจัยต่างๆ ในสมการดังกล่าวจะได้ค่าที่เรียกว่า ค่าจากการทำนาย ดังที่แสดงในตารางที่ 3.6 ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 11.20-14.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

$$Y = -137.889+34.639A-5.590B+1.320C-2.743A^2 - 1.251B^2-0.058C^2+0.858AB+0.256AC+0.072BC \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

โดยที่ A คือ ค่า pH

B คือ %NaCl

C คือ อุณหภูมิ

Y คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ตารางที่ 3.5 ค่าการดูดกลืนแสง (การเจริญ) และค่า pH ที่เปลี่ยนแปลง ภายหลังการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไอโซเลท PS342b เพื่อทดสอบดูกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง

ลำดับ	ค่าที่กำหนด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{660}$ nm.)			pH		
	pH	NaCl (%)	Temp. (°c)	0	24	48	0	24	48
1	7.5	0.5	27	0.172±0.010	0.782±0.085	0.790±0.049	7.220±0.056	7.157±0.090	6.957±0.025
2	8.5	0.5	27	0.168±0.027	0.725±0.050	0.850±0.028	7.843±0.032	7.230±0.044	7.170±0.026
3	7.5	2.5	27	0.232±0.126	0.744±0.016	0.869±0.020	7.153±0.015	6.983±0.208	7.073±0.012
4	8.5	2.5	27	0.149±0.022	0.580±0.044	0.896±0.016	7.780±0.243	8.133±1.517	7.073±0.012
5	7.5	0.5	33	0.150±0.025	0.822±0.083	0.891±0.074	7.190±0.010	7.027±0.100	6.827±0.012
6	8.5	0.5	33	0.121±0.034	0.742±0.082	0.762±0.035	7.910±0.022	7.347±0.090	7.157±0.015
7	7.5	2.5	33	0.116±0.043	0.802±0.004	0.742±0.010	7.167±0.046	7.197±0.021	6.900±0.010
8	8.5	2.5	33	0.163±0.013	0.760±0.013	0.901±0.066	7.927±0.021	7.423±0.068	7.047±0.025
9	7	1.5	30	0.139±0.024	0.778±0.009	0.883±0.037	6.913±0.015	6.667±0.159	6.743±0.021
10	9	1.5	30	0.107±0.003	0.392±0.018	0.577±0.084	8.650±0.026	7.647±0.145	7.453±0.038

ตารางที่ 3.5 ค่าการดูดกลืนแสง (การเจริญ) และค่า pH ที่เปลี่ยนแปลง ภายหลังการบ่มเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b เพื่อทดสอบดูกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง (ต่อ)

ลำดับ	ค่าที่กำหนด			ค่าการดูดกลืนแสง ($O.D._{660\ nm.}$)			pH		
	pH	NaCl (%)	Temp. (°c)	0	24	48	0	24	48
11	8	0	30	0.131±0.034	0.578±0.133	0.718±0.052	7.503±0.060	7.233±0.360	7.057±0.006
12	8	3	30	0.152±0.021	0.752±0.063	0.883±0.017	7.363±0.059	6.947±0.067	6.910±0.010
13	8	1.5	25	0.116±0.011	0.610±0.072	0.792±0.071	7.420±0.070	7.353±0.050	6.960±0.036
14	8	1.5	35	0.118±0.015	0.821±0.017	0.850±0.071	7.433±0.045	7.200±0.312	6.943±0.012
15*	8	1.5	30	0.179±0.007	0.683±0.033	0.923±0.064	7.453±0.035	7.200±0.132	6.983±0.021
16*	8	1.5	30	0.183±0.041	0.725±0.086	0.923±0.064	7.557±0.276	7.350±0.178	6.983±0.021
17*	8	1.5	30	0.146±0.015	0.655±0.025	0.858±0.033	7.537±0.060	7.440±0.072	6.973±0.015
18*	8	1.5	30	0.139±0.019	0.670±0.018	0.941±0.004	7.472±0.057	7.387±0.035	6.897±0.080
19*	8	1.5	30	0.143±0.041	0.637±0.004	0.880±0.048	7.519±0.039	7.573±0.038	6.977±0.006
20*	8	1.5	30	0.146±0.024	0.670±0.004	0.912±0.053	7.521±0.028	7.400±0.085	6.967±0.025

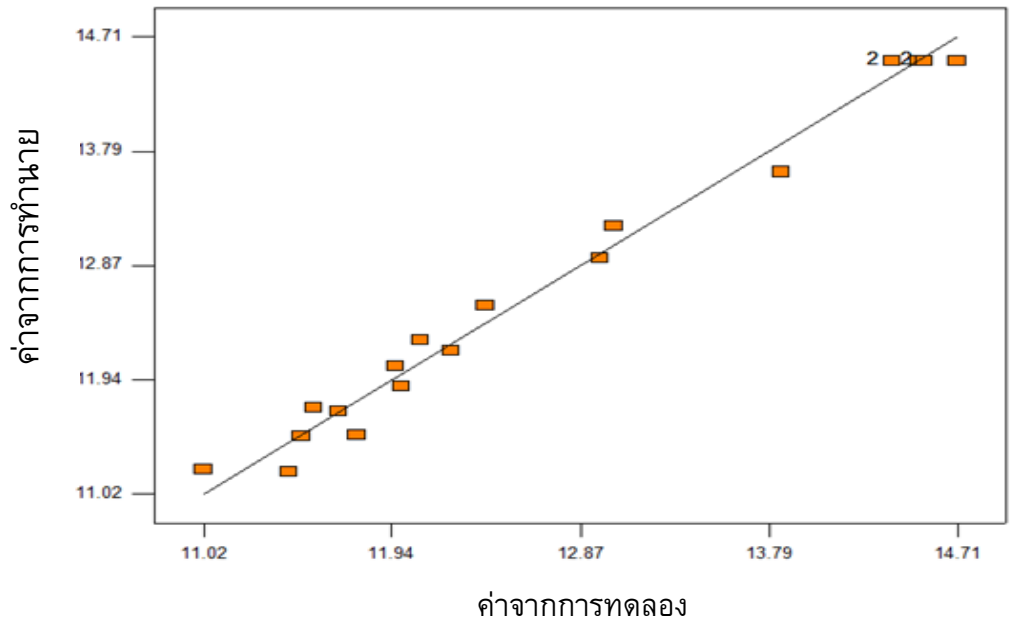
*:ชุด center point มีจำนวน 6 ซ้ำ

ตารางที่ 3.6 ผลการทดสอบการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite desingn: CCD) ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ในสภาวะมีอากาศ ไร้แสง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชุดทดสอบ	ค่าที่ใช้จริงในการทดลอง			ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	pH	NaCl (%)	อุณหภูมิ (ºc)	การทำนาย	การทดลอง	ส่วนต่าง
1	7.5	0.5	27	13.62	13.85	-0.23
2	8.5	0.5	27	11.72	11.56	0.16
3	7.5	2.5	27	11.69	11.68	0.02
4	8.5	2.5	27	11.50	11.77	-0.27
5	7.5	0.5	33	12.26	12.08	0.18
6	8.5	0.5	33	11.89	11.99	-0.10
7	7.5	2.5	33	11.20	11.44	-0.24
8	8.5	2.5	33	12.54	12.40	0.14
9	7.0	1.5	30	12.05	11.96	0.09
10	9.0	1.5	30	11.49	11.50	-0.01
11	8.0	0.0	30	12.18	12.23	-0.05
12	8.0	3.0	30	11.22	11.02	0.20
13	8.0	1.5	25	13.19	13.03	0.16
14	8.0	1.5	35	12.93	12.96	-0.03
15*	8.0	1.5	30	14.52	14.55	-0.03
16*	8.0	1.5	30	14.52	14.55	-0.03
17*	8.0	1.5	30	14.52	14.39	0.13
18*	8.0	1.5	30	14.52	14.52	0
19*	8.0	1.5	30	14.52	14.39	0.13
20*	8.0	1.5	30	14.52	14.71	-0.29

*:ชุด center point มีจำนวน 6 ซ้ำ

นำค่าที่ได้จากการทดลองและการทำนายมาสร้างกราฟเส้นตรงดังรูปที่ 3.10 พบว่า ค่า R-Squared เท่ากับ 0.99 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงค่าที่ยอมรับได้ระหว่างค่าจากการทดลองจริงกับค่าการทำนาย (พรรณทิพย์, 2558) นอกจากนี้ Model และ Lack of fit ต่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ตามลำดับ ดังที่แสดงร่วมกับค่าทางสถิติอื่นๆ ในตารางที่ 3.7 สำหรับการตอบสนองที่พื้นผิวของค่ากิจกรรมเอนไซม์ทำได้โดยการสร้างแผนภาพสามมิติ (3D) และภาพคอนทัวร์ (contourfigure) จากสมการที่หาได้โดยใช้โปรแกรม DX6 แล้วแสดงผลออกมาในผลของปัจจัย 2 ตัวแปรคือ ค่า pH กับความเข้มข้นของเกลือ (ดังรูปที่ 3.11 ก และ ง) ค่า pH กับอุณหภูมิ (ดังรูปที่ 3.11 ข และ จ) และความเข้มข้นของเกลือกับอุณหภูมิ (ดังรูปที่ 3.11 ค และ ฉ) โดยพบว่า ค่า pH ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดอยู่ในช่วง 7.75-8, 1-1.5% และ 28.5-30 องศาเซลเซียส ตามลำดับและเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อกำหนดให้ค่าปัจจัยอื่น 2 ตัวแปรเป็นค่าคงที่ ดังที่แสดงในรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองและการทำนาย

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมแล้ว พบว่า ค่า pHความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิ ที่ควรใช้ คือ 7.89, 1.32% และ 29.43 องศาเซลเซียส และคาดว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าประมาณ 14.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบทวนซ้ำ (Verification test) โดยกำหนดค่าใหม่ให้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากโปรแกรม ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการปรับค่าต่างๆ ได้อย่างลงตัว (ตารางที่ 3.8) ภายหลังการทดสอบพบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการทดสอบใหม่ให้ค่าสูงกว่าการทดสอบก่อนหน้าและค่าที่ได้จากการทำนาย ดังที่แสดงในตารางที่ 3.8 ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียง 0.81 (5.55%) และ 0.83 (5.70%) ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่า 10% เป็นค่าที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3.7 ค่าทางสถิติจากการทดสอบการออกแบบส่วนประสมกลาง

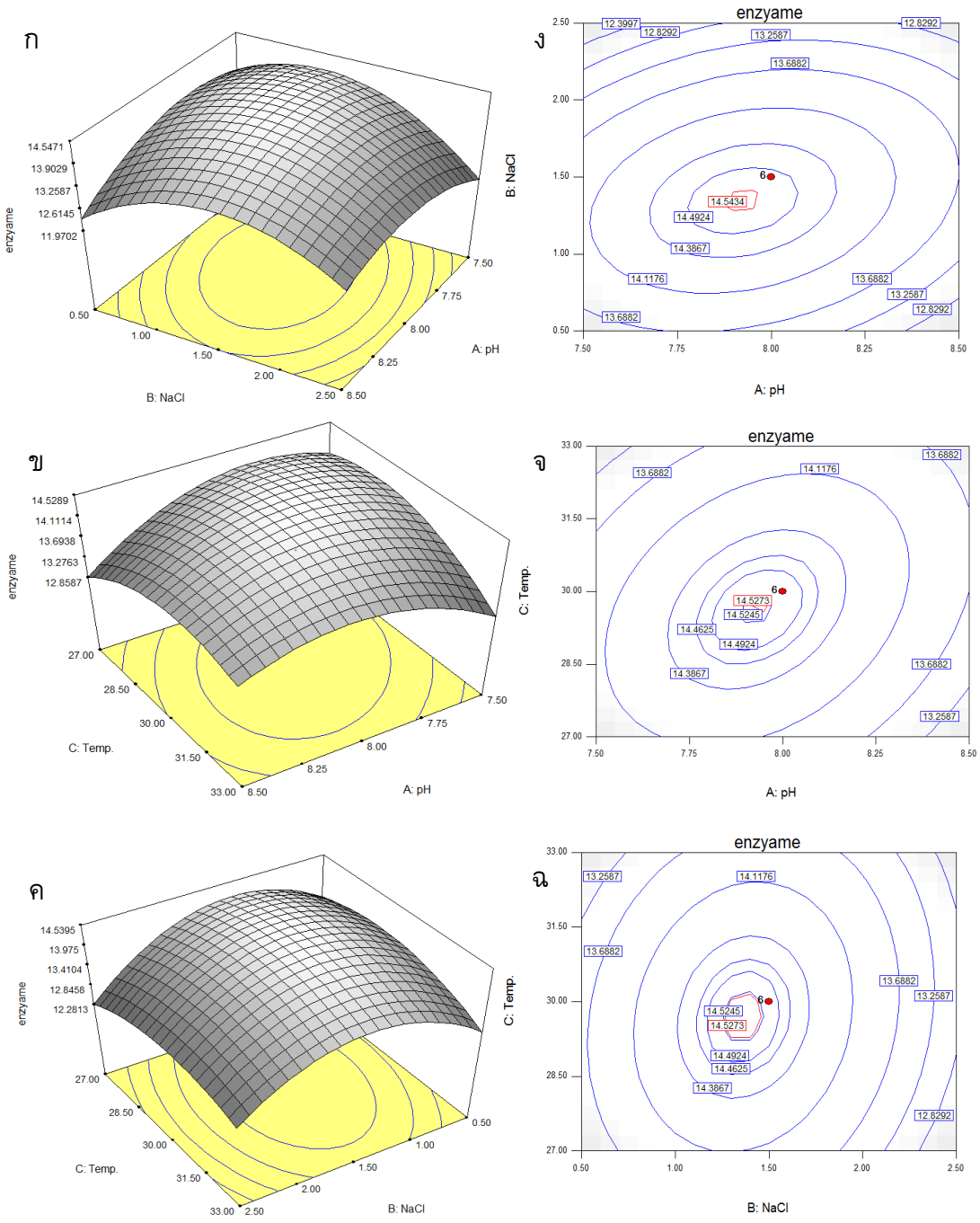
ค่าที่นำมาพิจารณา	ค่าที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ	
	Model	Lack of fit
Sum of squares	31.46	0.35
Mean of squares	3.50	0.07
F value	83.16	4.86
Prob > F	<0.0001	0.0537
	significant	*not significant*
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	0.21	
ค่ากลาง (Mean)	12.83	
R-Squared	0.99	
Adj R-Squared	0.97	
Pred R-Squared	0.91	

ตารางที่ 3.8 ตารางเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ (Verification test)

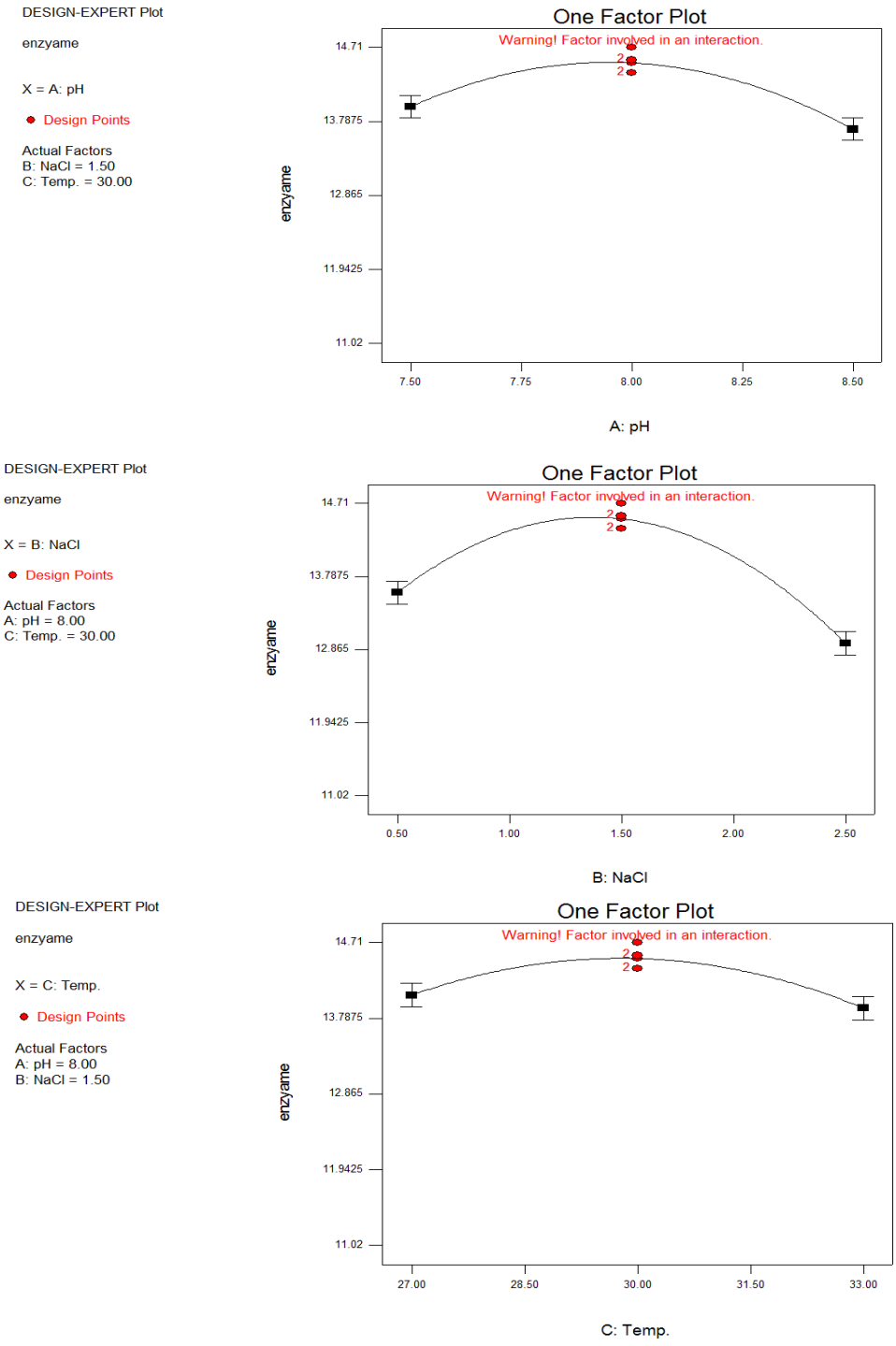
ค่าต่างๆ	pH	NaCl (%)	อุณหภูมิ (ºC)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ค่าที่ได้รับการแนะนำ*	7.89	1.32	29.43	14.57
ค่าจริงที่ใช้ในการทดสอบ	7.90	1.30	29.50	15.40
ค่าจากการทดสอบก่อนหน้า**	8.00	1.50	30.00	14.59

* ค่าที่ได้รับการแนะนำที่ระดับความพึงพอใจ เท่ากับ 0.961

** ค่าจากการทดสอบก่อนหน้า (ตารางที่ 3.6) ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด



รูปที่ 3.11 การตอบสนองที่พื้นผิวของค่ากิจกรรมเอนไซม์ทำได้โดยการสร้างแผนภาพสามมิติ (3D) (ซ้ายมือ) และภาพคอนทัวร์ (contourfigure) (ขวามือ)



รูปที่ 3.12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อค่าของ pH %NaCl หรืออุณหภูมิ เพิ่มหรือลดลง เมื่อกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่ศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ ตลอดจนศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ที่คัดเลือกได้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ หรือเป็นข้อมูลในการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถเจริญได้ดีในบ่อเลี้ยงกุ้ง มาใช้ในการรักษา/แก้ไขปัญหาคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.โดยไม่เป็นอันตรายต่อตัวกุ้ง ผู้บริโภค ตลอดจนสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งเป็นการเพาะเลี้ยงที่ยั่งยืน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงได้นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 22 ไอโซเลทมาทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

ในการทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ด้วยเทคนิค Overlay diffusion method พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลท (4.55%) คือ PS342d ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ทุกไอโซเลท ในขณะที่ 11 ไอโซเลท (50.00%) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้บางไอโซเลท จุดนี้แสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์อาจผลิตสารบางชนิดออกมา ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. เกิดเป็นหลุม หรือ รูรั่ว และเมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ทั้ง 22 ไอโซเลท มาคัดเลือกความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ พบว่า แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ส่วนใหญ่ (81.82%) สามารถย่อยสลายเจลาตินได้

เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง 12 ไอโซเลท ที่ผ่านการคัดเลือกสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. มาเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ในสภาวะที่มีแสง มีอากาศน้อยและมีอากาศ ไร้แสง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ลดลงได้น้อยโดยมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

ดังนั้นจึงได้นำเทคนิค Agar well diffusion มาใช้เพื่อพิสูจน์ความสามารถของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. แล้วสามารถปล่อยสารดังกล่าวออกมาอยู่ในอาหารเหลว หรือ น้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ใช้เลี้ยงได้ จากการทดสอบพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ทั้ง 12 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่ถูกปล่อยออกมานั้นอาจมีน้อย ส่งผลให้ไม่เกิดฤทธิ์การยับยั้ง ดังนั้นการทดสอบต่อมาคือการทำน้ำเลี้ยงเซลล์เข้มข้น

การทำน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ให้เข้มข้นทั้ง 12 ไอโซเลท ด้วยเครื่อง Rotary evaporator และวิธี Freeze-dry พบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทำให้เข้มข้นโดยเครื่อง Rotary evaporator นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความร้อนและเวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวอย่างแห้งที่ร้อนและนาน ในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Freeze-dry ที่ความเข้มข้น 20 เท่า ของน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ จำนวน 7 ไอโซเลท คือ PS342b, STW18-1, TKW1, TKW17, TKW31, TKW32 และ TKW55 สามารถให้การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.ได้ในบางสายพันธุ์ จากผลการทดลองนี้สามารถใช้ในการยืนยันได้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์สามารถผลิตสารยับยั้งแล้วปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

จากการทดลองทั้งหมดทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ออกมาได้เพียง 1 ไอโซเลท คือ PS342b โดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ดี และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ได้ดีมาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อไป โดยเริ่มจากการคัดเลือกอาหารและความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในการเจริญโดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร GA, GM, G5 และ BIM ที่เติม 1.5% NaCl บ่มในสภาวะมีแสง มีอากาศน้อย เมื่อครบ 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว GM ที่เติม 1.5% NaCl โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะและเวลาที่แบคทีเรียใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า เท่ากับ 0.336 ชั่วโมง$^{-1}$และ 2.066 ชั่วโมง ตามลำดับ และยังพบอีกว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 และ 200 รอบต่อนาที และมีค่าใกล้เคียงกันทั้งที่เวลา 48 และที่ 72 ชั่วโมง เมื่อนำเชื้อมาบ่งชี้ชนิดด้วย

เทคนิค 16s rRNA gene พบว่า ไอโซเลท PS342b มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ *Rhodovulum sulfidophilum* strain P5 และ *Rhodovulum sulfidophilum* strain OKHT16 ถึง 100%

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ที่เจริญในอาหารสูตร GM ที่เติม 1.5% NaCl และเปลี่ยนแหล่งไนโตเจน จาก $(NH_4)_2HPO_4$ มาเป็น 1% gelatin ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสงที่ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที ด้วยการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design; CCD) พบว่า ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง คือ ค่า pH ความเข้มข้นเกลือและอุณหภูมิ มีความสัมพันธ์เป็นแบบ ความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง Model ต่างมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ Lack of fit ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ อีกทั้งค่า R-Squared มีค่าใกล้เคียง 1 (R-Squared= 0.99) ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ และผลการทดสอบทวนซ้ำยังพบว่า ค่าที่แนะนำให้ผลไม่ต่างจากการทดลองจริง โดย pH (7.90) ความเข้มข้นเกลือ (1.30%) และอุณหภูมิ (29.50 องศาเซลเซียส) ที่ใช้สามารถส่งเสริมให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ ไอโซเลท PS342b ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกมาได้สูง ซึ่งดูได้จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ค่าสูงสุด15.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้งานที่ศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปสู่การปฏิบัติใช้ได้จริง สิ่งที่ควรศึกษาเพิ่มเติมมีดังนี้

1. จากผลการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไอโซเลท PS342b สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.ได้ทุกไอโซเลท (6 ไอโซเลท) ที่นำมาใช้ในการทดสอบ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติของสารดังกล่าวว่าเป็นสารชนิดใด ตลอดจนหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารดังกล่าว และรวมถึงความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อการเจริญของกุ้งหากนำไปใช้ต่อ

2. ศึกษาคุณสมบัติ และชนิดของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์ไอโซเลท PS342b ผลิตแล้วปล่อยออกมา ทั้งนี้เพื่อใช้ในการประเมินความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของโปรตีนที่พบได้ในอาหารเลี้ยงกุ้ง ตลอดจนชนิดของโปรตีนที่พบได้ในบ่อกุ้ง

3. ศึกษาลักษณะความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริงของไอโซเลท PS342b ภายในห้องทดลองก่อนการขยายผลสู่ภาคสนาม

4. ศึกษาการเลี้ยงร่วมกันในสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติโดยมีปริมาณแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. น้อยกว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์เพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง

เอกสารอ้างอิง

คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์. 2536. เอนไซม์และเซลล์ที่ถูกตรึง. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จรัล ทรัพย์เสรี. 2552. Central Composite Design. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤศจิกายน 2554 จาก http://www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/FQ145_p72-74.pdf

จันทร์จิรา จอมสวัสดิ์. 2544. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จิราพร เรืองศรี. 2543. การศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ.รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ดวงพร คันธโชติ. 2545. ศักยภาพของการใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการบำบัดน้ำทิ้งจากการแปรรูปน้ำยางพารา. ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ดุษณี ธระบริพัฒน์. 2555. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.วี.เจ.พริ้นติ้ง.กรุงเทพ

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฐมารัตน์ รัตนช่วย. 2549. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากนากุ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประสิทธิ์ ศรีนคร ขวัญตา ตันนิกำธน อรรถวิโรจน์ เขียวนาค จิระพล ศรีเสริฐผล และกนต์ธร ชำนิประศาสน์. 2554. การบำบัดตะกอนเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลโดยกระบวนการย่อยสลายแบบไร้ออกซิเจน. วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม ปีที่ 7 เล่มที่ 1 หน้า 10-21

ผ่องผกา เธียรมนตรี และวิวิทย์ ศมศานติ์. 2539. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจากน้ำทิ้ง. ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พรพิมลจุลพันธ์. 2545. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตสารปฏิชีวนะสกุล *Alteromonas* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio*. วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พรรณทิพย์ แสงสุขเอี่ยม และราตรี ซุ่ยหิรัญ. 2558. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสีย้อมจากกลีบดอกอัญชันโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 7

พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พัฒนา ภูเปี่ยม นัฐธิรา บุญรับ และสายสมร ศรีแก้ว. 2547. ดรรชนีทางแบคทีเรียของน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ปี 2547. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา

เพ็ญศรี บุญตามช่วย และอนงค์ คงทวี. รายงานประจำปี 2551. ประสิทธิภาพของสารสกัดใบฝรั่งขี้นก (*Psidium guajava* Linn.) ที่ได้จากการต้มต่อการควบคุมปริมาณเชื้อวิบริโอและการป้องกันโรควิบริโอซีสในกุ้งกุลาดำ.สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง. 100.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รัชดาภรณ์ศรีปรางค์โคบายาชิ ระวัฒน์แช่มปรีดา สุทิพาธนพงศ์พิพัฒน์ นิรันดร์รุ่งสว่าง ฮาจิเมะโคบายาชิและลิลี่เอื้อวิไลจิตร. 2556. เอนไซม์และการประยุกต์ใช้. ไทยเอฟเฟคสตูดิโอจำกัด

วาศินี ประดับศรีบุญอ้อม โฉมที และอำไพ ทองธีรภาพ. 2558. การศึกษาแผนแบบพื้นผิวตอบสนองขนาดเล็กสำหรับตัวแบบกำลังสองเต็มและตัวแบบลดรูปในขอบเขตทรงกลม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 23 ฉบับที่ 3

ศรีสุดา สมันใหม่. 2545. การศึกษาแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนอุณหภูมิสูงในประเทศไทยที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเนส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรัมบวกและลบ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. 2558. มองอุตสาหกรรมกุ้งไทย โดย ดร.ผณิศวร ชำนาญเวช นายกกิตติคุณ สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 กันยายน 2559 จาก http://fic.nfi.or.th/foodindustry_ceo_view.php?smid=366#

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง. 2549. คำแนะนำการปฏิบัติที่ดีสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แบบพัฒนา

สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล และสำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 2556. ยุทธศาสตร์กุ้งไทยฉบับที่ 3 ปี 2557-2559

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง. 2550. โรคและการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพ

สมหญิง เปี่ยมสมบูรณ์. 2553. ยุทธศาสตร์กุ้ง ฉบับที่ 2 กุ้งไทยพัฒนา นำพาเศรษฐกิจชาติ ผลิตได้มาตรฐานตลาด รักษ์ธรรมชาติยั่งยืน. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤศจิกายน 2554จาก http://www.farmrachan.com/hotnews/ยุทธศาสตร์กุ้ง-ฉบับที่-2-กุ้งไทยพัฒนา-นำพาเศรษฐกิจชาติ-ผลิตได้มาตรฐานตลาด-รักษ์ธรรมชาติยั่งยืน.html

สำนักงานวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง และกองประมงต่างประเทศของกรมประมง กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (พพ.) International Copper Association และองค์กรความร่วมมือระหว่างประเทศของเยอรมัน. 2554. คู่มือปฏิบัติที่ดีสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งไทย ในการจัดการระบบนิเวศและพลังงานเชิงเศรษฐกิจอย่างมีประสิทธิภาพ

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของ กรมศุลกากร. 2559. สถิติการส่งออก (Export) กุ้งขาว: ปริมาณและมูลค่าการส่งออก. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2560 จาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

สิริ ทุกข์วินาศ. 2547. การเตรียมบ่อกุ้งอย่างไร จึงเลี้ยงกุ้งทะเลได้ผล. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

สุปราณี ชินบุตร เต็มดวง สมศิริ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2545. ยาและสารเคมีเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

สุรชัย ใหญ่เย็น และประพันธ์ ปิ่นศิโรดม. 2557. สภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแมนแนนจากกากมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการแปรรูป. คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนันต์ ตันสุตะพานิช. 2538. เลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิดหรือระบบรีไซเคิ้ล. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล, พิสมัย สมสืบ, นุชนรี ทองศรี และสาวตรี วงศ์สุวรรณ. 2548. อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด

อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์ และสิริ ทุกข์วินาศ. 2543. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในบ่อกุ้งทะเลระบบปิดหมุนเวียน. รายงานประจำปี 2543 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Akhtar N., Mahmud ASM., Khan MS., Taznin T., Haque ME., Sultana S. and Sultana S. 2013. Effects of Cultural Conditions on the Production of Extracellular Protease by *Streptomyces albolongus* and *Streptomyces aburaviensis*.Enzyme Engineering. 2: 110

Ambler R.P., Daniel M., Hermoso J., Meyer T.E., Bartsch T.G. and Kamen M.D.1979. Cytochrome C2 sequence variation among the recognizedspecies of purple nonsulfur photosynthetic bacteria. Nature.278: 659-660.

Azad S.A., Vikineswary S., Chong V.C. and Ramachandran K.B. 2003. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. Letters in Applied Microbiology. 38: 13-18

Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology. 8: 1137–1144.

Chandrasekaran R. and Ashok Kumar G. V. 2011. Antagonistic activities of purple non-sulfur bacterial extracts against antibiotic resistant *Vibrio* sp. Malaysian Journal of Microbiology. 7(1): 54-56

Cheng H. H. and Yin L. J. 2007. Medium Effects on the Increase of Protease and Cellulase Activities of *Bacillus subtilis* BCRC14716. Journal of the Fisheries Society. 34(3): 291-298

Dickerson R.E. 1980. Evolution and gene transfer in purple photosyntheticbacteria. Nature. 283: 210–212.

Ehrenreich A. and Widdel F. 1994. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4517-4526.

Frankena J., Koningstein M. G., Van Verseveld H. W., and Stouthamer A. H. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 24: 106-112.

Geethanjiali S. andSubash A. 2011. Optimization of Protease Production by *Bacillus subtilis* Isolate from Mid Gud of Fresh Water Fish *Labeo rohita.* World Journal of Fish and Marine Sciences. 3(1): 88-95

Giesecke U. E., Gabriele Bierbaum G., Rudde H., Spohn U. and Wandrey C. 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology. 35: 720-724.

Hebert EM., Raya R. and De Giori G. S. 1997. Characterization of a Cell Membrane-Associated Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CRL581. Current Microbiology. 35: 161–164

Hellio F. C., Orange N. and Guespin-Michel J. F. 1993.Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by Pseudomonas fluorescens MFO, in the presence of various inducers. Research in Microbiology. 144(8): 617-625

Imhoff J. F., Hiraishi A. and Süling J. 2005. Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.5: 119-132

Jenssen P. H., Peek K. and MorganH. W. 1994. Effecet of cultuer conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. Applied Microbiology and Biotechnology. 41: 400-406

Jirawatthanapong S., IrawatthanapongY. and Tanticharoen M. 2543. The effect of inducer on alkaline protease production in *Aspergillus oryzae* U1521. King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Johnson P. T. 1983. Disease caused by viruses, riketsia, bacteria and fungi. The Biology of Crustacea. 6: 1-78

Kantachote D., Torpee S. and Umsakul K. 2005. The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. Electron. Journal ofBiotechnology. 8: 314-323.

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

Kim M. K., Choi K. M., Yin C. R., Lee K. Y., Im W. T., Lim J. H. and Lee S. T. 2004. Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. Biotechnology Letters. 26: 819-822

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.

Lu H., Zhang G., Dai X. and He C.2010. Photosynthetic bacteria treatment of synthetic soybean wastewater: Direct degradation of macromolecules.Bioresource Technology. 101: 7672-7674.

Lu H., Zhang G., Wan T. and Lu Y. 2011. Influences of light and oxygen conditions on photosynthetic bacteria macromolecule degradation : Different metabolic pathways. Bioresource Technology. 102: 9503-9508.

Moon S. H. and Parulekar J. S. 1990. A Parametric Study of Protease Production in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnology and Bioengineering. 32: 467-483

Nazghelichi T, Aghbashloa M and Kianmehr M. H. 2011. Optimization of an artificial neural network topology using coupled responsesurface methodology and genetic algorithm for fluidized bed drying. Computers and Electronics in Agriculture. 75: 84-91.

Oda K., Tanskul S., Oyama H. and Noparatnaraporn N. 2004. Purification and Characterization of Alkaline Serine Proteinase from Photosynthetic Bacterium, *Rubrivivax gelatinosus* KDDS1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(3): 650–655

Oxley A. P. A., Shipton W., Owens L. and McKay D. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguiensis*. Journal of Applied Microbiology. 93: 214-223

Panwichian S., Kantachote D., Wittayaweerasak B. and Mallavarapu M. 2010. Isolation of purple nonsulfur bacteria for the removal of heavy metals and sodium from contaminated shrimp ponds. Electronic Journal of Biotechnology.

Patil Pallavi M, Kulkarni Avanti A.and Kininge Pallavi T. 2012. Production of Milk Clotting Enzyme from *Aspergillus oryzae* under Solid-State Fermentation using Mixture of Wheat Bran and Rice Bran. International Journal of Scientific and Research Publications. 2: 2250-3153

Prosser, J. I., Killham K., Glove L. A. and Rattray E. A. S. 1996. Luminescence-base system for detection of bacteria in the environment. Critical Rev. Biotechnology. 16(2): 157-163

Ruangpan L. and Tabkaew R. 1994. Bacterial flora Intensive cultured black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Suisanzoshoku. 42(3): 485-489.

Ruangpan L., Tabkaew R. and Sangrungruang K. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *In* Fisheries Health Section Asian, Fisheries Soc. Manila, Philippins. 141-149.

Sasikala Ch.and Ramana Ch. V.1995. Biotechnological Potentials of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. I. Production of Single-Cell Protein, Vitamins, Ubiquinones, Hormones, and Enzymes and Use in Waste Treatment, Advances in Applied Microbiology. 41: 173-226

Sasikala Ch. and Ramana Ch. V.1998. Biodegradation and Metabolism of Unusual Carbon Compounds by Anoxygenic Phototrophic Bacteria, Advances in Microbial Physiology. 39: 339–377

Schmidt K. 1978. Biosynthesis of carotenoids. InClayton and Sistrom (Editors), The Photosynthetic Bacteria, Plenum Press, New York. 729-750.

Uyar F., Porsuk I., Kizil G. and Ince Y. E. 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. EurAsian Journal of BioSciences. 5: 1-9.

Wang H. T. and Hsu J. T. 2005. Optimal protease production condition for *Prevotella ruminicola* 23 and characterization of its extracellular crude protease. Ecology/environmental microbiology. 155–162.

Wexler M. H. and Startari F. J. 1998. Method for treating a waste stream using photosynthetic microorganisms

Widdel, F., S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assmus and B. Schink. 1993. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. Nature. 362: 834–836.

Yamamoto N., Akino A. and Takano T. 1993. Purification and Specificity of a Cell-Wall-Associated Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. The Journal of Biochemistry. 114: 740-745.

http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=1 7 สืบค้นเมื่อวันที่ 23 พฤศจิกายน 2554.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่สะสมซัลเฟอร์

อาหารสูตร Basic isolation medium (BIM)

1 $(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
2 K_2HPO_4	0.5	กรัม
3 $MgSO_4$	0.2	กรัม
4 $NaHCO_3$	5.0	กรัม
5 Yeast extract	1.5	กรัม
6 Glycerol	1.5	มิลลิลิตร
7 L-cystein	0.03	กรัม

นำสารตามสูตรอาหาร BIMมาละลายใน Distilled water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7±0.2 เติม Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอด์นต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารสูตร Glutamate-acetate medium (GA)

1 Sodium-L-glutamate	3.8	กรัม
2 Sodium-Acetate	5.44	กรัม
3 Yeast extract	2.0	กรัม
4 KH_2PO_4	0.5	กรัม
5 K_2HPO_4	0.5	กรัม
6 $(NH_4)_2HPO_4$	0.8	กรัม
7 $MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม

อาหารสูตร Glutamate-acetate medium (GA) (ต่อ)

8 $CaCO_2.2H_2O$	0.053	กรัม
9 Nicotinic acid	0.001	กรัม
10 Biotin	0.00001	กรัม
11 $MnSO_4.5H_2O$	0.0012	กรัม
12 Feric cirate	0.0025	กรัม
13 $CaCl_2.6H_2O$	0.0012	กรัม

นำสารตามสูตรอาหาร GA มาละลายใน Distilled water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7±0.2 เติม Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารสูตร Glutamate-malate medium (GM)

1 Sodium-L-glutamate	3.8	กรัม
2 DL-Malic acid	2.7	กรัม
3 Yeast extract	2.0	กรัม
4 KH_2PO_4	0.5	กรัม
5 K_2HPO_4	0.5	กรัม
6 $(NH_4)_2HPO_4$	0.8	กรัม
7 $MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
8 $CaCo_2.2H_2O$	0.053	กรัม
9 Nicotinic acid	0.001	กรัม
10 Biotin	0.00001	กรัม
11 $MnSO_4.5H_2O$	0.0012	กรัม
12 Feric cirate	0.0025	กรัม
13 $CaCl_2.6H_2O$	0.0012	กรัม

นำสารตามสูตรอาหาร GMมาละลายใน Distilled water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7±0.2 เติม Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร กรณีอาหารแข็งให้เติม Agar ปริมาตร 15 กรัม ลงไปก่อนนำไปทำให้ปราศจากเชื้อเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารสูตร G5 medium

1 Peptone	5	กรัม
2 Yeast extract	5	กรัม
3 L-glutamic acid	4	กรัม
4 DL-Malic acid	3.5	กรัม
5 KH_2PO_4	0.12	กรัม
6 K_2HPO_4	0.18	กรัม

นำสารตามสูตรอาหาร G5 มาละลายใน Distilled water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7±0.2 เติม Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารที่ใช้ในการทดสอบการย่อยสลายโปรตีน

อาหารสูตร Gelatin medium

1 Peptone	4	กรัม
2 Yeast extract	1	กรัม
3 Gelatin	15	กรัม
4 Agar	7.5	กรัม

นำสารตามสูตรอาหาร Gelatin medium มาละลายใน Distilled water ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7±0.2 เติม Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอด์นต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. อาหารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

อาหารสูตร Triptic soy agar (TSA) ที่เติม 1% NaCl

1 Peptone from casein	15.0	กรัม
2 Protons from oatmeal	5.0	กรัม
3 Sodium chloride	5.0	กรัม
4 Agar-agar	15.0	กรัม

ชั่งอาหาร TSA ปริมาณ 40 กรัม ละลายด้วย Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารสูตร Triptic soy broth (TSB) ที่เติม 1% NaCl

1 Protons from casein	17.0	กรัม
2 Protons from soymeal	3.0	กรัม
3 D(+)Glucose monohydrate	2.5	กรัม
4 Sodium chloride	5.0	กรัม
5 di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม

ชั่งอาหาร TSB ปริมาณ 30 กรัม ละลายด้วยDistilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.อาหารที่ใช้ในการนับแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp.

อาหารสูตร Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar

1 Protein from casein	5.0	กรัม
2 Protein from meat	5.0	กรัม
3 Yeast extract	5.0	กรัม
4 Sodium citrate	10.0	กรัม
5 Sodium thiosulfate	10.0	กรัม

อาหารสูตร Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar (ต่อ)

6 Ox bile, dried	5.0	กรัม
7 Sodium violate	3.0	กรัม
8 Sucrose	20.0	กรัม
9 Sodium chloride	10.0	กรัม
10 Iron,, (|||) citrate	1.0	กรัม
11 Thump blue	0.04	กรัม
12 Bromothymol blue	0.04	กรัม
13 Agar-agar	14.0	กรัม
14 Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร TCBS ปริมาณ 80 กรัม ละลายด้วย Distilled water ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม (Gram staining)

Crystal violet

เตรียมสารละลาย A โดยละลาย crystal violet 2.0 กรัม ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายสารละลาย B: ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

นำสารละลาย A และ B มาผสมเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violetstinning reagent 2.95% ethyl alcohol

Gram iodine (mordant)

บดไอโอดีน 1.0 กรัม และ potassium iodine 2.0 กรัม เข้าด้วยกัน แล้วค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปผสมจนกระทั่งไอโอดีนละลาย เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

Safranin (counterstain)

ละลาย safranin 2.5 กรัม ใน 95% ethylalcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6. น้ำยาสำหรับหยุดกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ละลาย TCA ปริมาตร 5 กรัม ใน Distilled water จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร

7. 1% gelatin solution สำหรับเป็นสับสเตรท

ชั่ง Gelatin 1 กรัม เติมเกลือ NaCl ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ จากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อค่า pH ที่ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ โดย pH 7 ใช้ phosphate buffer, pH 8 และ pH 9 ใช้ TRIS-HCl buffer

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่าง

1. การทำแห้งตัวอย่างก่อนส่ง CPD.

1 ตัดตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อในบริเวณที่วงใส และขอบวงใสการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง *Vibrio* spp. ขนาด 1x1 เซนติเมตร ใส่ในขวดน้ำยาทิ้งไว้ปริมาณ 2 ชั่วโมง

2 ล้างด้วย PBS. (ถ้าไม่มีใช้น้ำกลั่นแทนได้) ล้าง 2 ครั้ง

3 กำจัดน้ำออกด้วยการแช่ตัวอย่างนานครั้งละ 5 นาทีใน ethanol ที่มีความเข้มข้น 50%, 60%, 70%, 80% และ 90%ตามลำดับ ทำซ้ำ2 ครั้งในทุกๆ ความเข้มข้น แล้วนำมาแช่ใน absolute ethanol (100%) นาน 30 นาที 2 ครั้ง

4 นำตัวอย่างที่ได้ใส่ใน absolute ethanol ส่งศูนย์เครื่องมือ เพื่อส่งทำ CPD. ต่อไป

2.การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Norbert and Hidden, 1969 อ้างโดย ปฐมา รัตน์, 2549)

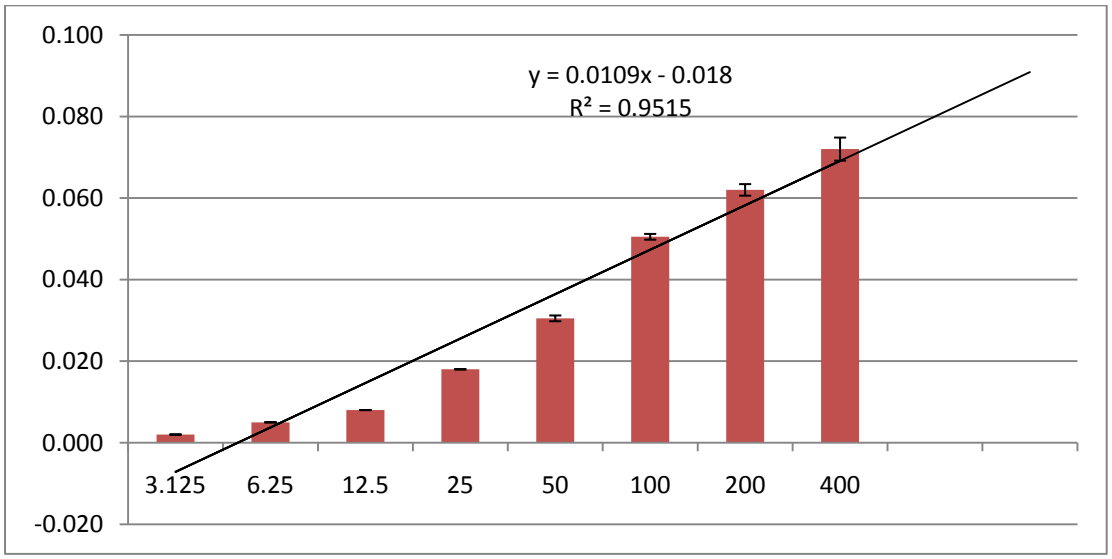
นำตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร ของ 1% gelatin solution ที่มี 2% NACl ใน 0.1 M This buffer pH 8 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 5% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง whatmam No. 1 นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ (blank) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของไทโรซีนโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มาเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

สำหรับชุดควบคุมนำตัวอย่างเอนไซม์มา 1 มิลลิลิตร เติม 5% TCA 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1% gelatin solution ที่มี 2% NaCl ใน 0.1 M This buffer pH 8 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีข้างต้น

3.การทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ดารณี, 2543อ้างโดย ปฐมารัตน์, 2549)

ชั่งไทโรซีน 0.01 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางสาร โดยทำ 2 fold dilution ทำ 5 ความเข้มข้น คือ 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนและค่าการดูดกลืนแสง

โดยกำหนดให้ 1 หน่อยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน คือ กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนอิสระปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อนาที



กราฟมาตรฐานไทโรซีน

ภาคผนวก ค

การเทียบเคียงโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name: PS342b

1440 by Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	EVALUE
JF794560.2	*Rhodovulum sulfidophilum* strain P5	1879	0.0
LC037397.1	*Rhodovulum sulfidophilum*strain OKHT16	1879	0.0

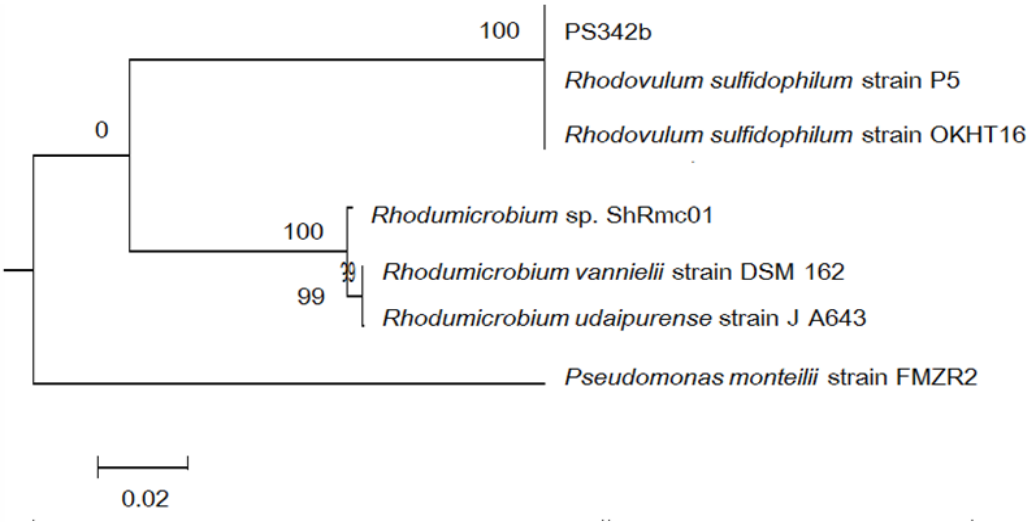
BLASTN 2.6.1 (Mar-10-2017)

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

RID: JBU9RMY9015

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (ULGMA)



Query= PS342b Length=1440

CGAGCGAACCCTTCGGGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCTCTGCGGAA
TAGGCTCGGGAAACTGGGTTTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGG
CCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCTACGATCTATAGCTGGTTTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTGG
ACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTT
CAGTCGTGAAGATAATGACGGTAGCGACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCAGG
GGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACT
GGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAAGCATGCTTGTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGATCGCGGTTACCCGAG
AGGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA
TGTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCAGGGGTGAAAT
CCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTC
CGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGAT
ACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAATGCCAGTCGTCGGCAAGCATGCTTGTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG

Rhodovulum sulfidophilum strain P5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length: 1446

Score = 1879 bits (1017), Expect = 0.0
Identities = 1017/1017 (100%), Gaps = 0/1017 (0%)
Strand = Plus/Plus

```
Query  1     CGAGCGAACCCTTCGGGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  65    CGAGCGAACCCTTCGGGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTC  124

Query  61    TCTGCGGAATAGGCTCGGGAAACTGGGTTTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGAT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  125   TCTGCGGAATAGGCTCGGGAAACTGGGTTTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGAT  184

Query  121   TTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  185   TTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA  244

Query  181   GCCTACGATCTATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  245   GCCTACGATCTATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  304

Query  241   CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  305   CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAG  364

Query  301   CCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  365   CCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAA  424

Query  361   TGACGGTAGCGACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  425   TGACGGTAGCGACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  484

Query  421   GGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  485   GGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTC  544

Query  481   AGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  545   AGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTC  604

Query  541   GAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACAC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  605   GAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACAC  664

Query  601   CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  665   CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  724

Query  661   AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  725   AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAA  784

Query  721   GCATGCTTGTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  785   GCATGCTTGTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  844

Query  781   AGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  845   AGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  904

Query  841   TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGATCGCGGTTACCCGAGAGG  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  905   TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGATCGCGGTTACCCGAGAGG  964

Query  901   GTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  965   GTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC  1024

Query  961   GTGAGATGTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCA  1017
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1025  GTGAGATGTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCA  1081
```

Rhodovulum sulfidophilum gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: OKHT16
Length: 1346

Score = 1879 bits (1017), Expect = 0.0
Identities = 1017/1017 (100%), Gaps = 0/1017 (0%)
Strand = Plus/Plus

```
Query  1     CGAGCGAACCCTTCGGGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTC  60
Sbjct  14    CGAGCGAACCCTTCGGGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTC  73

Query  61    TCTGCGGAATAGGCTCGGGAAACTGGGTTTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGAT  120
Sbjct  74    TCTGCGGAATAGGCTCGGGAAACTGGGTTTAATACCGCATACGCCCTTCGGGGGAAAGAT  133

Query  121   TTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA  180
Sbjct  134   TTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA  193

Query  181   GCCTACGATCTATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  240
Sbjct  194   GCCTACGATCTATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  253

Query  241   CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAG  300
Sbjct  254   CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATCTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAG  313

Query  301   CCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAA  360
Sbjct  314   CCATGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAA  373

Query  361   TGACGGTAGCGACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  420
Sbjct  374   TGACGGTAGCGACAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  433

Query  421   GGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTC  480
Sbjct  434   GGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTC  493

Query  481   AGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTC  540
Sbjct  494   AGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTAGAGTTC  553

Query  541   GAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACAC  600
Sbjct  554   GAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACAC  613

Query  601   CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  660
Sbjct  614   CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  673

Query  661   AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAA  720
Sbjct  674   AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAA  733

Query  721   GCATGCTTGTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  780
Sbjct  734   GCATGCTTGTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  793

Query  781   AGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  840
Sbjct  794   AGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  853

Query  841   TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGATCGCGGTTACCCGAGAGG  900
Sbjct  854   TCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGATCGCGGTTACCCGAGAGG  913

Query  901   GTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC  960
Sbjct  914   GTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC  973

Query  961   GTGAGATGTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCA  1017
Sbjct  974   GTGAGATGTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCA  1030
```

```
JF794560 Reports Rhodovulum sulfidophilum strain P5
LOCUS       JF794560                1446 bp    DNA     linear   BCT
07-DEC-2015
DEFINITION  Rhodovulum sulfidophilum strain P5 16S ribosomal RNA
gene, partial
sequence.
ACCESSION   JF794560
VERSION     JF794560.2
KEYWORDS    -
SOURCE      Rhodovulum sulfidophilum
ORGANISM  Rhodovulum sulfidophilum
            Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria;
Rhodobacterales;
            Rhodobacteraceae; Rhodovulum.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1446)
  AUTHORS   Cai,J. and Wang,G.
  TITLE     Hydrogen production by a marine photosynthetic bacterium,
            Rhodovulum sulfidophilum P5, isolated from a shrimp pond
  JOURNAL   Int J Hydrogen Energy 37 (20), 15070-15080 (2012)
REFERENCE   2  (bases 1 to 1446)
  AUTHORS   Cai,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (17-MAR-2011) Tianjin Key Laboratory of Marine
Resources
and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin
            University of Science and Technology, No. 29, 13th
Avenue, TEDA,
            Tianjin, Tianjin 300457, China
REFERENCE   3  (bases 1 to 1446)
  AUTHORS   Cai,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-DEC-2015) Tianjin Key Laboratory of Marine
Resources
and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin
            University of Science and Technology, No. 29, 13th
Avenue, TEDA,
            Tianjin, Tianjin 300457, China
  REMARK    Sequence update by database staff to remove vector
contamination
COMMENT     On Dec 7, 2015 this sequence version replaced
gi:333732879.
FEATURES             Location/Qualifiers
source          1..1446
                     /organism="Rhodovulum sulfidophilum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="P5"
                     /isolation_source="marine sludge"
                     /db_xref="taxon:35806"
                     /country="China"
                     /PCR_primers="fwd_name: 27f, fwd_seq:
agagtttgatcctggctcag, rev_name: 1492r, rev_seq:
gttaccttgttacgactt"

rRNA<1..>1446
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
    1 tccatgatta gagtttgatc ctggctcaga acgaacgctg gcggcaggcc
taacacatgc
```

```
   61 aagtcgagcg aacccttcgg ggttagcggc ggacgggtga gtaacgcgtg
ggaacgtgcc
  121 cttctctgcg gaataggctc gggaaactgg gtttaatacc gcatacgccc
ttcgggggaa
  181 agatttatcg gagaaggatc ggcccgcgtt agattaggta gttggtgggg
taatggccta
  241 ccaagcctac gatctatagc tggtttgaga ggatgatcag ccacactggg
actgagacac
  301 ggcccagact cctacgggag gcagcagtga ggaatcttgg acaatggggg
aaaccctgat
  361 ccagccatgc cgcgtgagcg atgaaggcct tagggttgta aagctctttc
agtcgtgaag
  421 ataatgacgg tagcgacaga agaagccccg gctaactccg tgccagcagc
cgcggtaata
  481 cggagggggc tagcgttgtt cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg
cggactatta
  541 agtcaggggt gaaatcccgg ggctcaaccc cggaactgcc tttgatactg
gtagtctaga
  601 gttcgagaga ggtgagtgga attccgagtg tagaggtgaa attcgtagat
attcggagga
  661 acaccagtgg cgaaggcggc tcactggctc gatactgacg ctgaggtgcg
aaagcgtggg
  721 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgaatg
ccagtcgtcg
  781 gcaagcatgc ttgtcggtga cacacctaac ggattaagca ttccgcctgg
ggagtacggc
  841 cgcaaggtta aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga
gcatgtggtt
  901 taattcgaag caacgcgcag aaccttacca acccttgaca tcctgatcgc
ggttacccga
  961 gagggtttcc ttcagttcgg ctggatcagt gacaggtgct gcatggctgt
cgtcagctcg
 1021 tgtcgtgaga tgttcggtta agtccggcaa cgagcgcaac ccacactctt
agttgccagc
 1081 attcagttgg gcactctagg agaactgccg atgataagtc ggaggaaggt
gtggatgacg
 1141 tcaagtcctc atggcccttа cgggttgggc tacacacgtg ctacaatggc
agtgacaatg
 1201 ggttaatccc caaaaactgt ctcagttcgg attgttctct gcaactcgag
agcatgaagt
 1261 cggaatcgct agtaatcgcg taacagcatg acgcggtgaa tacgttcccg
ggccttgtac
 1321 acaccgcccg tcacaccatg ggagttgggt ttacccgaag acggtgcgcc
aacccttacg
 1381 gggggcagct ggccacggta agctcagcga ctggggtgaa gtcgtaacaa
ggtaaccaat
 1441 catgga
```

```
LC037397ReportsRhodovulum sulfidophilum strain: OKHT16.
LOCUS       LC037397                1346 bp    DNA     linear   BCT
26-MAR-2015
DEFINITION  Rhodovulum  sulfidophilum  gene  for  16S  ribosomal  RNA,
partial
sequence, strain: OKHT16.
ACCESSION   LC037397
VERSION     LC037397.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Rhodovulum sulfidophilum
ORGANISM  Rhodovulum sulfidophilum
            Bacteria;      Proteobacteria;      Alphaproteobacteria;
Rhodobacterales;
            Rhodobacteraceae; Rhodovulum.
REFERENCE   1
  AUTHORS      Miyasaka,H.,  Yamauchi,N.,  Okuhata,H.,  Takanashi,K.,
Sasahira,T.,
            Maki,T.,  Okazaki,A.,  Sasaki,K.,  Hayashi,S.,  Yamamoto,S.
and
            Tanaka,S.

TITLE      Isolation of a purple non-sulfur photosynthetic bacterium
with
glycerol assimilation ability and its application for kurma shrimp
            (Marsupenaeus japonicus) aquaculture
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1346)
  AUTHORS   Miyasaka,H. and Tanaka,S.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL     Submitted  (24-MAR-2015)  Contact:Hitoshi  Miyasaka  Sojo
University,
            Department  of  Applied  Life  Science;  4-22-1  Ikeda,
Nishiku,
            Kumamoto, Kumamoto 860-0082, Japan Fax :81-963231331
FEATURES             Location/Qualifiers
source          1..1346
                     /organism="Rhodovulum sulfidophilum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="OKHT16"
                     /isolation_source="Seashore sediment"
                     /db_xref="taxon:35806"
                     /country="Japan"
                     /collection_date="2009-07-01"
                     /collected_by="Hiroshi Okuhata"
rRNA<1..>1346
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
    1   aacacatgca   agtcgagcga   acccttcggg   gttagcggcg   gacgggtgag
taacgcgtgg
61 gaacgtgccc ttctctgcgg aataggctcg ggaaactggg tttaataccg catacgccct
```

121 tcgggggaaa gatttatcgg agaaggatcg gcccgcgtta gattaggtag ttggtggggt
181 aatggcctac caagcctacg atctatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga
241 ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtgag gaatcttgga caatgggggа
301 aaccctgatc cagccatgcc gcgtgagcga tgaaggcctt agggttgtaa agctctttca
361 gtcgtgaaga taatgacggt agcgacagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc
421 gcggtaatac ggaggggggct agcgttgttc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgtaggc
481 ggactattaa gtcaggggtg aaatcccggg gctcaacccc ggaactgcct ttgatactgg
541 tagtctagag ttcgagagag gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata
601 ttcggaggaa caccagtggc gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgaggtgcga
661 aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc
721 cagtcgtcgg caagcatgct tgtcggtgac acacctaacg gattaagcat tccgcctggg
781 gagtacggcc gcaaggttaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag
841 catgtggttt aattcgaagc aacgcgcaga accttaccaa cccttgacat cctgatcgcg
901 gttacccgag agggtttcct tcagttcggc tggatcagtg acaggtgctg catggctgtc
961 gtcagctcgt gtcgtgagat gttcggttaa gtccggcaac gagcgcaacc cacactctta
1021 gttgccagca ttcagttggg cactctagga gaactgccga tgataagtcg gaggaaggtg
1081 tggatgacgt caagtcctca tggcccttac gggttgggct acacacgtgc tacaatggca

1141 gtgacaatgg gttaatcccc aaaaactgtc tcagttcgga ttgttctctg caactcgaga
1201 gcatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcgt aacagcatga cgcggtgaat acgttcccgg
1261 gccttgtaca caccgcccgt cacaccatgg gagttgggtt tacccgaaga cggtgcgcca
1321 acccttacgg ggggcagctg gccacg

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล ว่าที่ร้อยตรี ณัชภัทร แสงธรรมหนอ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220092

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษา

- ทุนอุดหนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย
- ทุนผู้ช่วยนักวิจัย (Research Assistantship) สัญญาทุนเลขที่ 1-2556-02-003

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Saengtumnor, N. Kantachote, D. 2015. Selection of purple non sulfur bacteria with ability to inhibit shrimp pathogenic *Vibrio* spp and control water quality in shrimp cultivation. Proceeding of Biotechnology Intenational Congress (BIC) 2015 Biotechnology for Healthy Society. September 9-10, 2015.

Saengtumnor, N. Kantachote, D., Sukhoom, A. Selection of purple non sulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzyme and antivibrio activity against shrimp pathogenic *Vibrio* spp. (Manuscript in preparation).