ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากนากุ้ง

ผู้เขียน นางสาวปฐมารัตน์ รัตนช่วย

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้จำนวน 34 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีเพียงไอโซเลท W3 ที่มีความสามารถย่อยโปรตีนได้ดี และยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งก่อโรคในกุ้ง ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท W3 (70 µl) ด้วยวิธี agar well diffusion ได้ inhibition zone เท่ากับ 21.61 มิลลิเมตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับยา oxolinic acid (2 µg) และ sulphamethoxazole trimethoprin (25 µg) ไอโซเลท W3 เจริญเติบโตได้ดีในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่มีเกลือ NaCl 2% pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 และเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.87 ต่อชั่วโมง และเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อเลี้ยงในอาหาร Frazier gelatin medium (FGM) ที่มี 2% NaCl มีค่าเท่ากับ 2.40 U/ml เอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งผลิตโดยเชื้อไอโซเลท W3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่ pH ระหว่าง 7 ถึง 9 โดย pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน คือ pH 8 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 28°C ถึง 40°C ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 35°C เอนไซม์โปรติเอสมีความคงตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 28-35°C และ pH ในช่วง 7-9 โดยสามารถคงตัวได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง และพบว่าค่า relative activity มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Ca^{2+} Fe^{2+} Mg^{2+} Cu^{2+} Zn^{2+} และ EDTA ที่ความเข้มข้นละ 0.01 M จากผลการทดลองแสดงว่าเป็น alkaline protease (serine protease) จากการเทียบเคียงเชื้อไอโซเลท

W3 พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบยกเว้น cephalothin (30μg) และไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก สำหรับการทดลองใช้แบคทีเรียไอโซเลท W3 ในการเลี้ยงกุ้งในตู้แก้วเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ พบว่าค่า BOD แอมโมเนีย และไนเตรทในตู้ทดลองมีค่าที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงทั้งในชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเชื้อ) และชุดเติมเชื้อไอโซเลท W3 โดยเป็นไปในทิศทางเดียวกัน อัตราการเจริญของกุ้งที่ 30 วันของการเลี้ยงมีค่าต่ำ 9.44% และ 9.41% ตามลำดับ เนื่องจากค่าดังกล่าวสูงกว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้ง ขณะที่อุณหภูมิและ pH มีค่าที่ต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้ง ส่วนในตู้เลี้ยงกุ้งที่เติมทั้งไอโซเลท W3 กับ *Vibrio harveyi* ไม่พบการเรืองแสงของกุ้ง และมีปริมาณ *Vibrio harveyi* โดยเฉลี่ยตลอดการเลี้ยงกุ้งต่ำกว่าในชุดควบคุม (เติมเฉพาะเชื้อ *Vibrio harveyi*) ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการเจริญที่ 30 วันเท่ากับ 10.17% ดีกว่าชุดควบคุมที่มีอัตราการเจริญเท่ากับ 9.28%

Thesis Title	Effects of Environmental Factors on Growth and Proteolytic Activity of the Selected Bacterial Strain from Shrimp Farm
Author	Miss Pattamarat Rattanachuay
Major Program	Microbiology
Academic Year	2005

ABSTRACT

A total of 34 isolates of proteolytic bacteria isolated from various intensive shrimp ponds in southern Thailand were isolated. The isolate W3 was selected due to production high protease and antivibrio activity. The inhibitory effect of the culture broth W3 against *Vibrio harveyi* was investigated using the agar well diffusion. The inhibition zone was 21.61 mm and its inhibitory effect against *V. harveyi* was similar to the antibiotics used (2 μg oxolinic acid and 25 μg sulphamethoxazole trimethoprin). The isolate W3 grew well in nutrient broth (NB) plus 2% NaCl with initial pH 7 under incubation of 28-30°C and shaked at 150 rpm. A specific growth rate of the isolate W3 in the NB under the optimal condition was 0.87 h^{-1}. The protease activity of the bacterium W3 was 2.40 u/ml under the optimal growth condition in FGM plus 2% NaCl. Protease produced by the isolate W3 had a good activity in a range of pH 7-9 with an optimum of pH 8 and temperature in a range of 28-40°C with an optimum of 35°C. Effects of temperature and pH on protease stability were investigated for 4 h incubation; the thermostability was between 28-35ºC and pH stability was in a range of 7-9. The relative activity was increased when added 0.01 M of following inhibitors as in order of Ca^{2+}> Mg^{2+} > Cu^{2+}> Zn^{2+}> Fe^{2+} > EDTA. Thus, protease produced by the isolate W3 was thought to be alkaline protease (serine protease). The isolate W3 was identified and belonged to *Pseudomonas* sp. The isolate W3 was sensitive to most of

antibiotics used for controlling Gram negative bacteria except cephalothin (30μg) and no hemolytic was found by the bacterium. The applications of the isolate W3 for improving water quality and controlling *Vibrio harveyi* in shrimp cultivation in aquariums were conducted. Values of BOD, ammonia and nitrate during cultivation in a treatment of the isolate W3 were as high as those in a control set. Therefore, shrimp growth rates in the treatment of the isolate W3 (9.41%) and the control (9.44%) was similar. Shrimp growth rate was low due to unsuitable condition for shrimp growth as high levels of BOD, ammonia and nitrate, but low levels of pH and temperature. In order to control *V. harveyi* in shrimp cultivation, a treatment of inoculations of the isolate W3 and *V. harveyi* was compared with a control set (only inoculation of *V. harveyi*). Average numbers of *V. harveyi* throughout shrimp cultivation in a treatment of both organisms were lower than those in the control set and no fluorescent shrimp was found. Hence, shrimp growth rate at day 30 of cultivation in the treatment of both organisms was higher (10.17%) than the control set (9.28%).