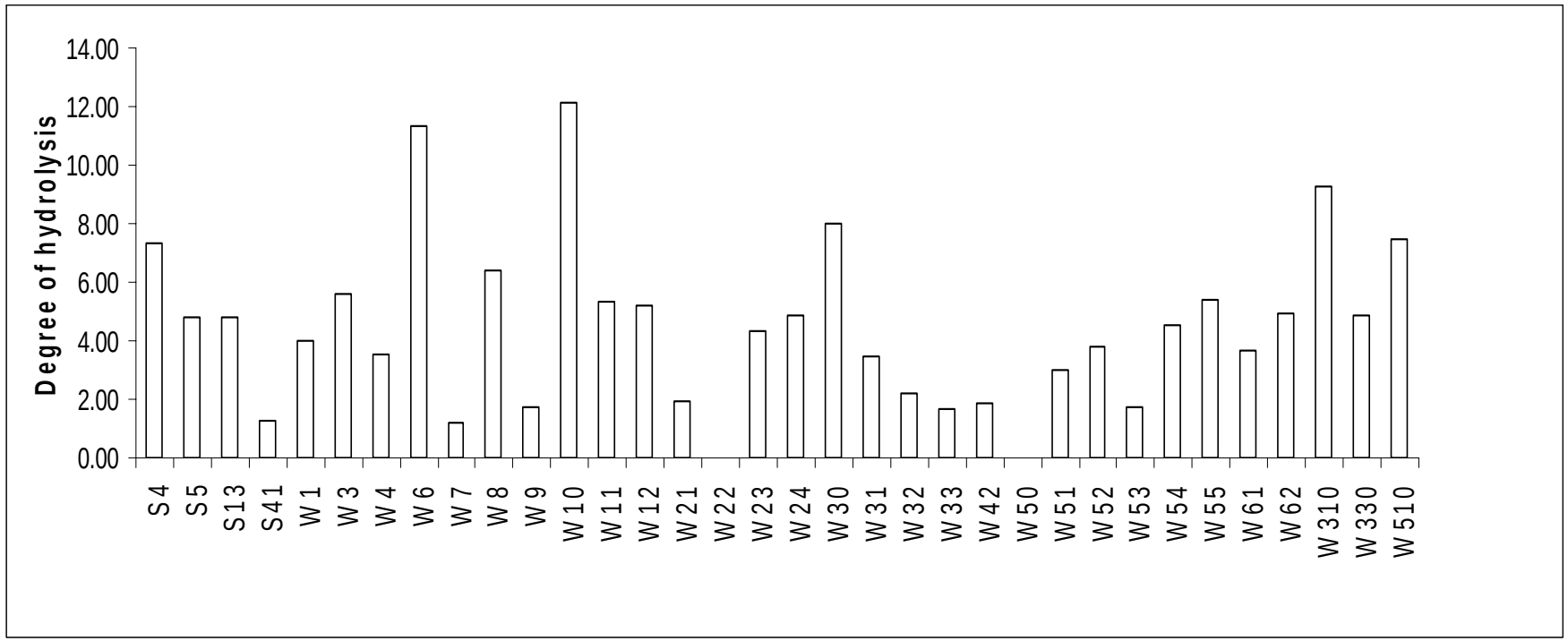
3. ผลการทดลอง

1. ผลการคัดเลือกเบื้องต้นสำหรับแบคทีเรียย่อยโปรตีน

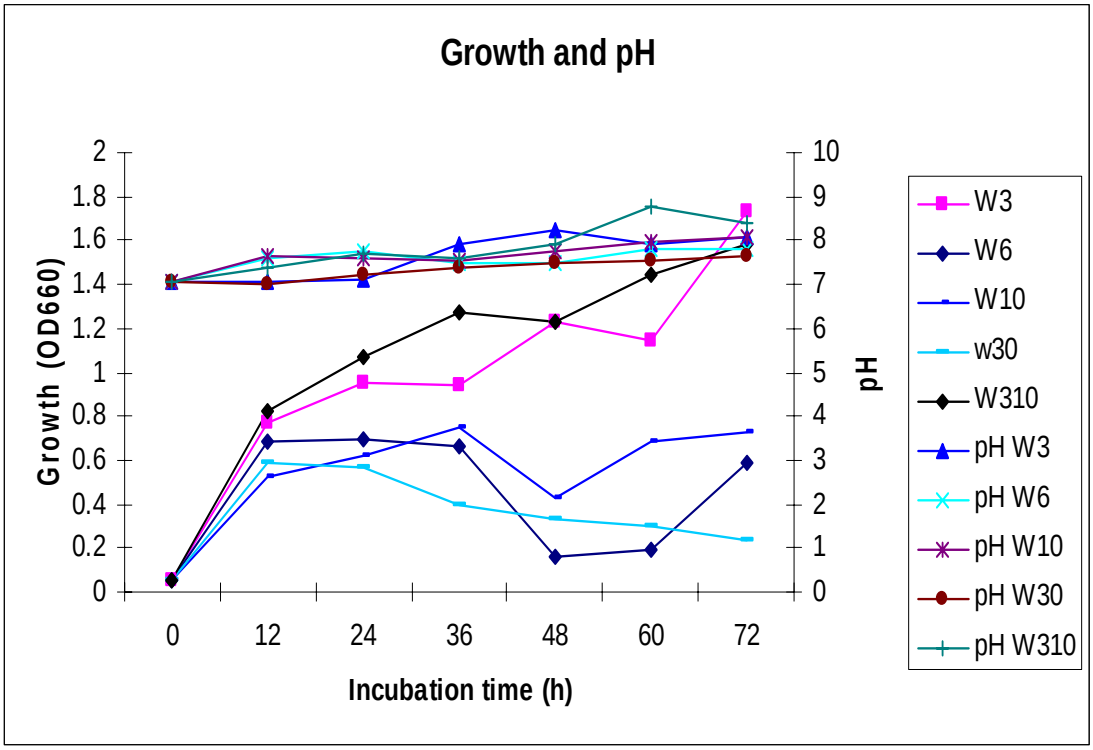
การทดสอบหาค่า degree of hydrolysis ในอาหาร Frazier gelatin medium (FGM) เพื่อเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นถึงความสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 ซึ่งจากรูปที่ 4 ได้คัดเลือกเชื้อมา 5 ไอโซเลท ซึ่งมีค่า degree of hydrolysis เรียงจากมากไปน้อยได้แก่ W10 (12.70) W6 (11.36) W310 (9.25) W30 (8.00) และ W3 (5.63) ขณะที่เชื้อ W510 (7.49) S4 (7.30) และ W8 (6.39) มีค่า degree of hydrolysis สูงกว่าไอโซเลท W3 แต่ไม่ได้คัดเลือกมาศึกษาต่อเพราะขนาดของโคโลนีเล็กมากแสดงถึงการเจริญเติบโตช้า ซึ่งจะเห็นว่าในส่วนของเชื้อ W3 นั้นค่า degree of hydrolysis ต่ำกว่าเชื้ออื่นๆที่กล่าวมา เนื่องจาก W3 มีการเจริญได้ดีสังเกตจากลักษณะโคโลนีที่โตสุด จึงมีส่วนทำให้ค่า degree of hydrolysis มีค่าต่ำสุดในกรณีของเชื้อที่เลือกมาเพื่อศึกษาต่อ



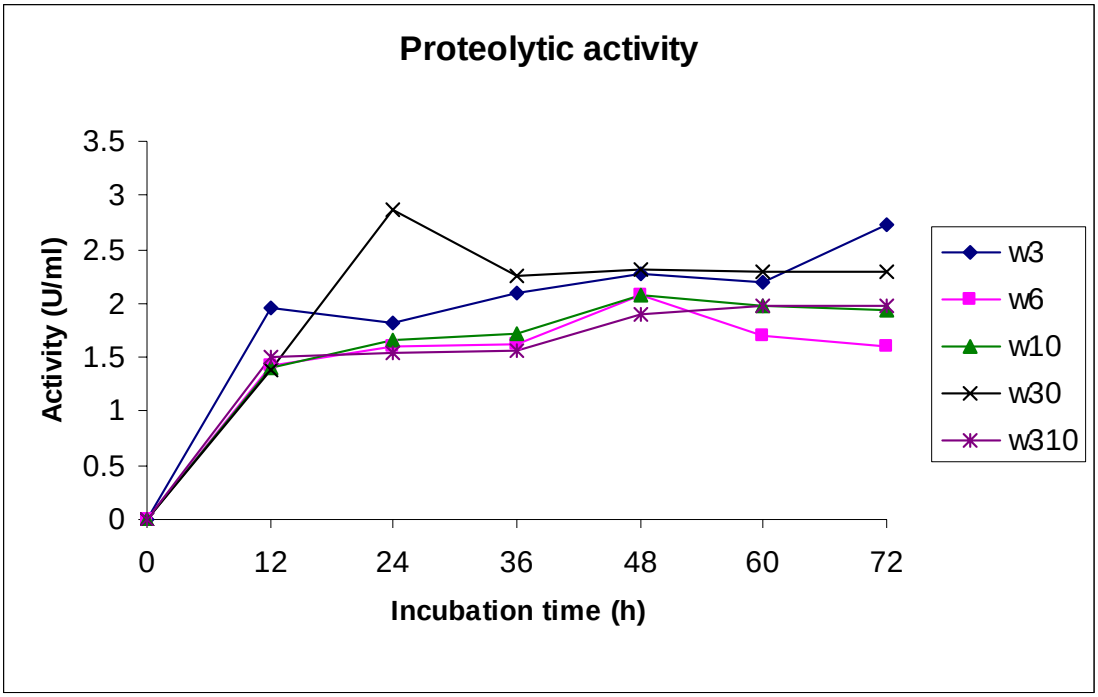
รูปที่ 4 ค่า Degree of hydrolysis ของแบคทีเรียย่อยโปรตีนทั้ง 34 ไอโซเลท ที่แยกได้จากนากุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น
โดย S = เชื้อที่แยกได้จากดินเลน และ W = เชื้อที่แยกได้จากน้ำ

2. ผลการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนได้ดี

จากการคัดเลือกเบื้องต้นพบว่า แบคทีเรียย่อยโปรตีนที่ผ่านการคัดเลือกมี 5 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท W3 W6 W10 W30 และ W310 ซึ่งทั้งหมดแยกได้จากส่วนที่เป็นน้ำของบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นเมื่อวัดการเจริญ pH และทำการวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่า ไอโซเลท W310 และ ไอโซเลท W3 มีการเจริญที่สูงกว่าไอโซเลท W6 W10 และ W30 เมื่อวัด pH พบว่า ค่า pH ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยง ไอโซเลท W310 มีค่า pH ที่สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ (8.76) ดังรูปที่ 5 และเมื่อทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่า ไอโซเลท W30 เมื่อเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนมากที่สุดคือ 2.88 ยูนิคต่อมิลลิลิตร แต่ไอโซเลท W3 ที่ 12 และ 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ สูงกว่าไอโซเลท W6 W10 และ W310 และมีค่ามากกว่าไอโซเลท W30 เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 การเจริญและค่า pH ของแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น



รูปที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น

3. การทดสอบการยับยั้ง *Vibrio harveyi*

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* โดยใช้วิธี Agar diffusion ผลการทดลองพบว่าเชื้อ W3 (70 µl) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* ได้ ซึ่งให้ค่า inhibition zone ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 21.61 ± 0.40 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 7 ส่วนเชื้อไอโซเลท อื่นๆ ได้แก่ W6 W10 W30 และ W310 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ จึงเลือกไอโซเลท W3 ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ดีและยับยั้ง *V. harveyi* อีกด้วย

ผลการทดสอบกับยาและยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดได้แก่ tetracycline (30 µg) norfloxacin (10 µg) oxolinic acid (2 µg) และ sulphamethoxazole trimethoprin (25 µg) พบว่ายาทั้ง 4 ชนิดให้ inhibition zone เท่ากับ 26.15 ± 0.80 25.55 ± 0.21 21.67 ± 1.30 มิลลิเมตร และ 21.04 ± 0.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 โดยที่ tetracycline (30 µg) และ norfloxacin (10 µg) ให้ผลการยับยั้งดีกว่าเชื้อไอโซเลท W3 ซึ่งให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 21.16 ± 0.40 มิลลิเมตร

รูปที่ 7 การยับยั้ง *Vibrio harveyi* โดยวิธี Agar diffusion ของแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 บนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 การยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* โดยไอโซเลท W3 และยาปฏิชีวนะ

เชื้อ/ยาปฏิชีวนะ	Inhibition zone (mm)
W3 (70 µl)	21.62 ± 0.40
Sulphamethoxazole trimethoprin (25 µg)	20.02 ± 0.03
Tetracycline (30 µg)	26.05 ± 0.80
Norfloxacin (10 µg)	24.97 ± 0.21
Oxolinic acid (2 µg)	21.98 ± 1.30

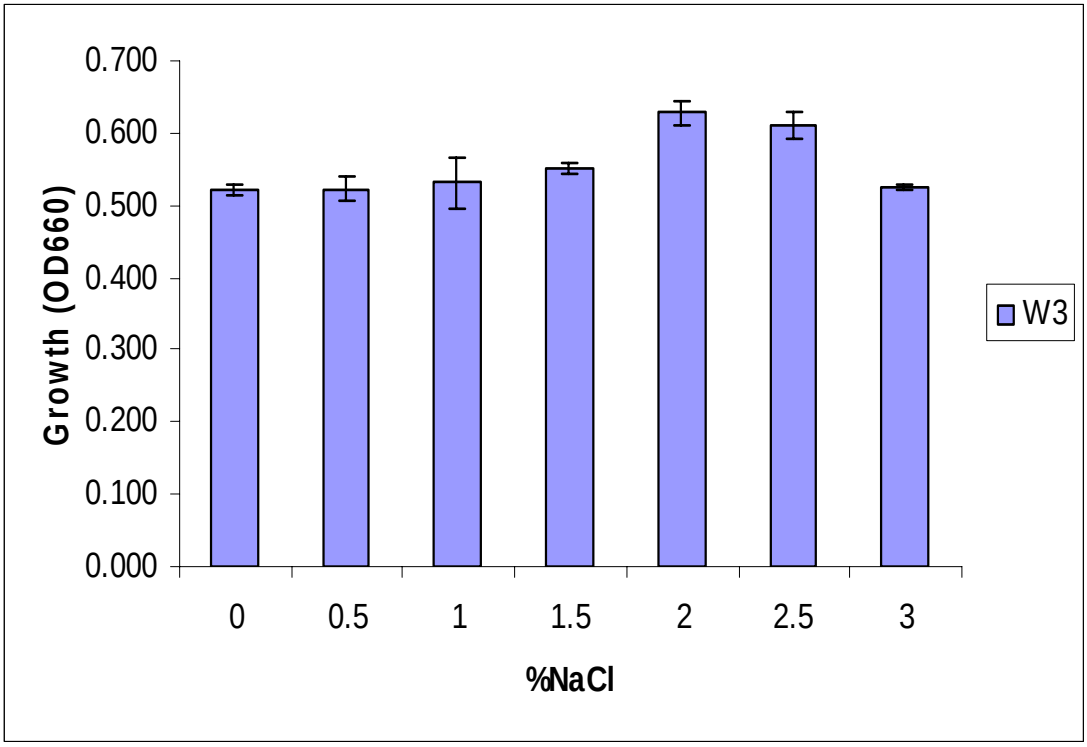
4. ผลของสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้

จากผลการทดลองการย่อยสลายโปรตีนโดยการหาค่า degrees of hydrolysis และการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ได้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือก 1 ไอโซเลท คือ W3 เนื่องจาก

เชื้อไอโซเลท W3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้และย่อยโปรตีนได้ดี จึงได้นำเชื้อไอโซเลทดังกล่าวนี้มาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

4.1 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3

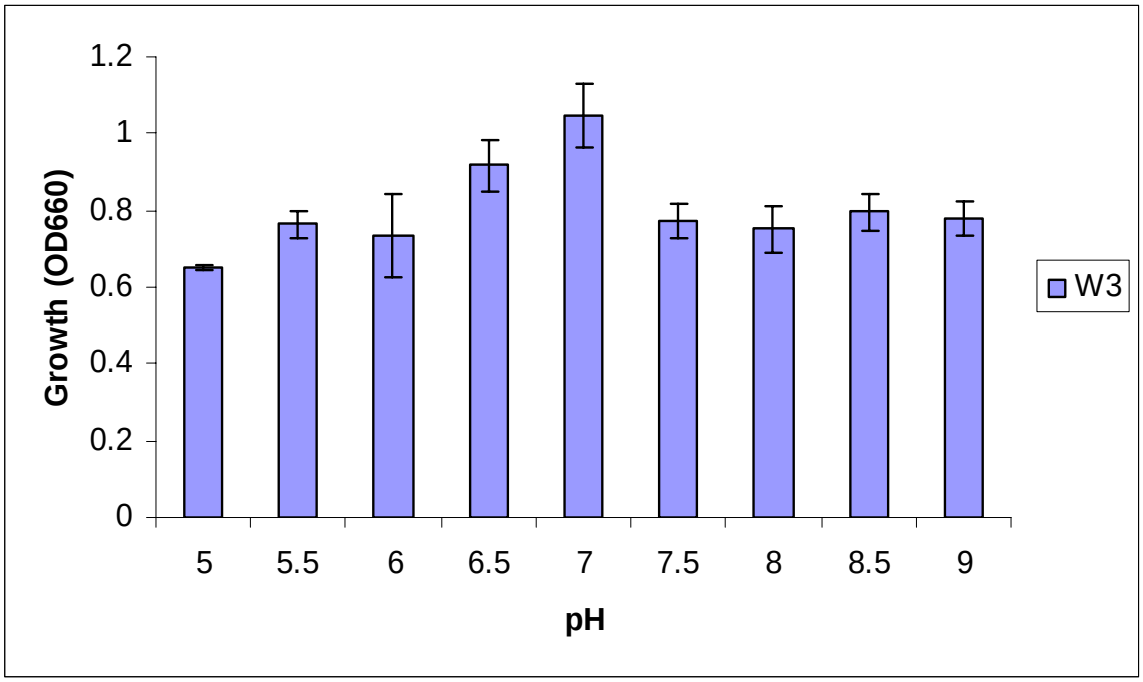
จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของ 2% NaCl (OD_{660} เท่ากับ 0.63) การเจริญของเชื้อสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง ได้แก่ 0% 0.5% 1.0% 1.5% 2.5% และ 3% ดังแสดงในรูปที่ 8 แต่พบว่าที่ความเข้มข้นของ 2.5% NaCl (OD_{660} เท่ากับ 0.61) การเจริญของเชื้อใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้นของ 2% NaCl โดยที่อาหารไม่เติม NaCl มีการเจริญโดยวัดค่า OD_{660} ได้ 0.52 ดังนั้นจึงเลือกเติม 2% NaCl สำหรับการศึกษาต่อ



รูปที่ 8 ความเข้มข้นของ NaCl ในอาหาร NB ต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 36 ชั่วโมง

4.2 pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

จากการทดลองพบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง เชื้อไอโซเลท W3 มีการเจริญได้สูงที่ pH 7 (OD_{660} เท่ากับ 1.05) และรองลงมาที่ pH 6.5 (OD_{660} เท่ากับ 0.92) การเจริญที่ pH 6.5 และ 7 มีความแตกต่างกันน้อยมาก และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ก็พบว่าเชื้อไอโซเลท W3 สามารถเจริญได้ดีที่ pH 7.5 (OD_{660} เท่ากับ 0.86) และ pH ที่ทำการทดลองได้แก่ pH 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 และ 9 โดยพบว่าสภาวะเป็นกรดอ่อน (pH 5-6) และด่างอ่อน (pH 8-9) เชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกันโดยมีค่า OD_{660} อยู่ในช่วง 0.65-0.73 และ 0.75-0.79 ตามลำดับ ดังรูปที่ 9 สำหรับการศึกษาครั้งต่อไปเลือกใช้ pH เริ่มต้นของอาหารให้เป็น 7

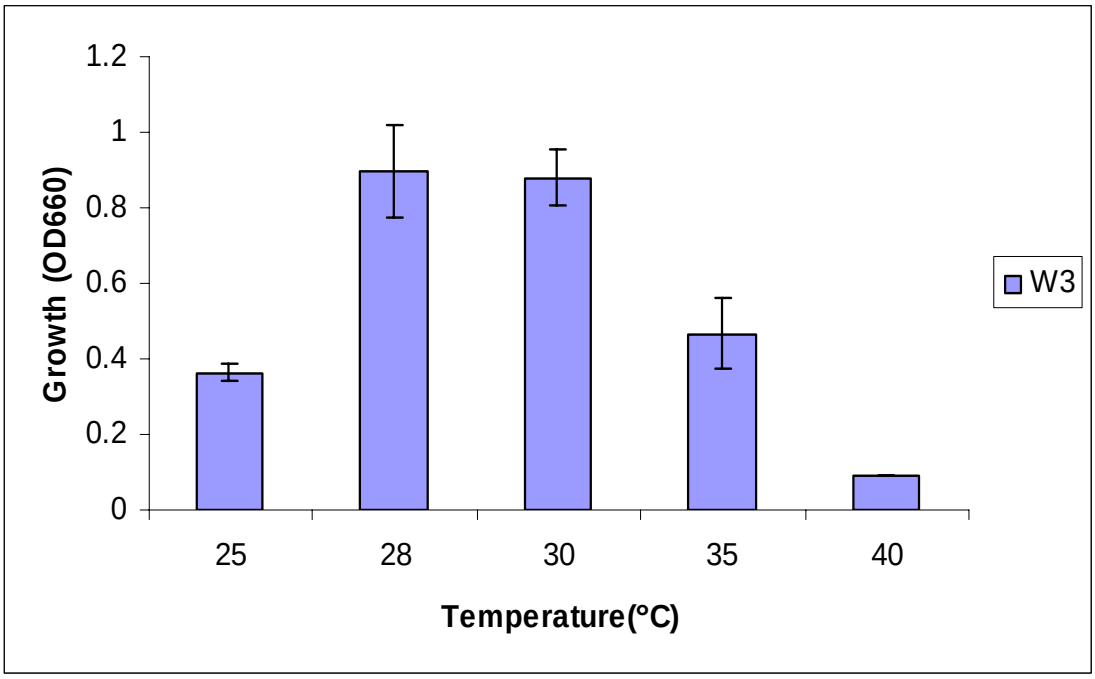


รูปที่ 9 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3 ที่ย่อยโปรตีนเมื่อเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติม 2% NaCl เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

จากรูปที่ 10 พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลท W3 มีการเจริญเติบโตสูงสุด (OD_{660} เท่ากับ 0.90) แต่ใกล้เคียงมากกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

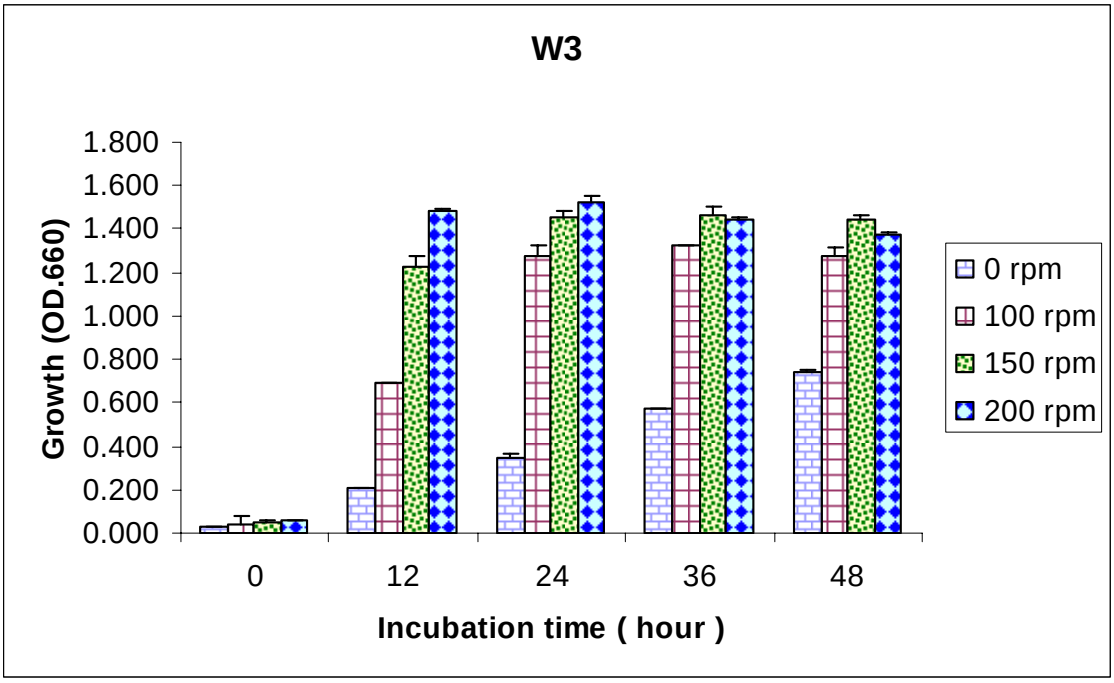
(OD_{660} เท่ากับ 0.88) ขณะที่อุณหภูมิอื่นที่ทำการทดลอง ซึ่งได้แก่ 25 และ 35 เชื้อมีการเจริญเติบโตปานกลาง (OD_{660} เท่ากับ 0.36 และ 0.47 ตามลำดับ) และต่ำสุดที่ 40 องศาเซลเซียส (OD_{660} เท่ากับ 0.09) จากผลการทดลองจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป (ตู้บ่มส่วนกลางตั้งอุณหภูมิไว้ 30 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB ที่มี 2% NaCl เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

4.4 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

จากการทดลองพบว่าเชื้อไอโซเลท W3 ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เชื้อมีการเจริญสูงกว่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่เวลา 12 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงไปจนกระทั่งถึง 36 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของเชื้อเท่ากับที่ความเร็วรอบ 150 rpm และเมื่อเวลา 48 ชั่วโมงการเจริญของเชื้อต่ำกว่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เล็กน้อยและกรณีที่ไม่มีการเขย่าเชื้อเจริญต่ำสุด (OD_{660} เท่ากับ 0.204) ดังแสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นจึงเลือกใช้การเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป

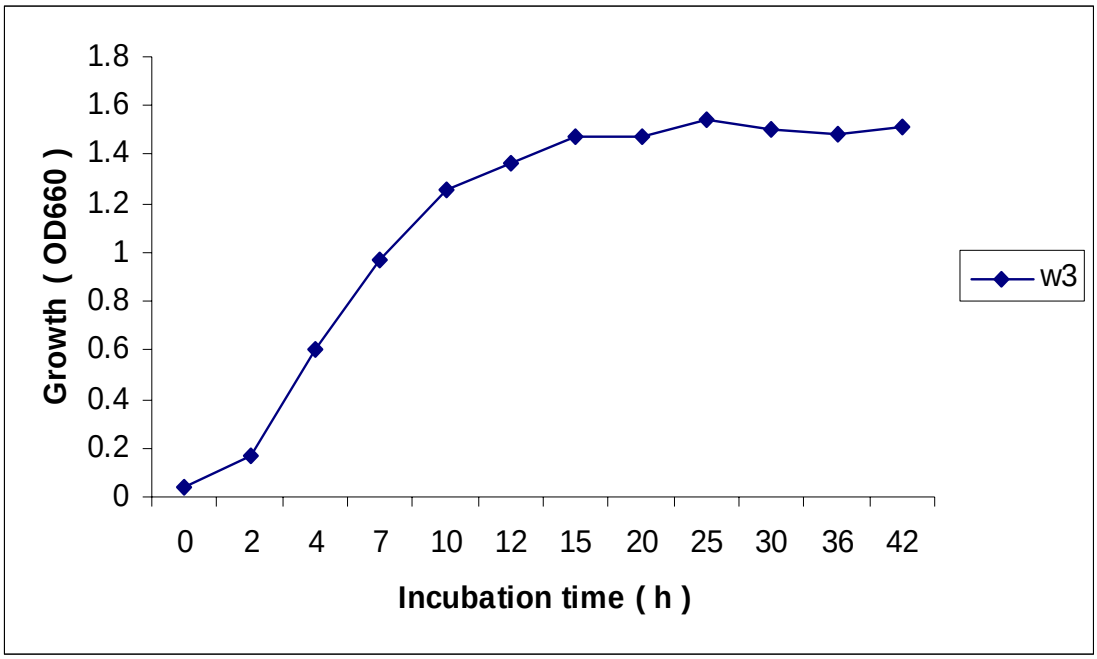


รูปที่ 11 ความเร็วรอบการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3 ในอาหาร NB ที่มี 2% NaCl ต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3

5. การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

5.1 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

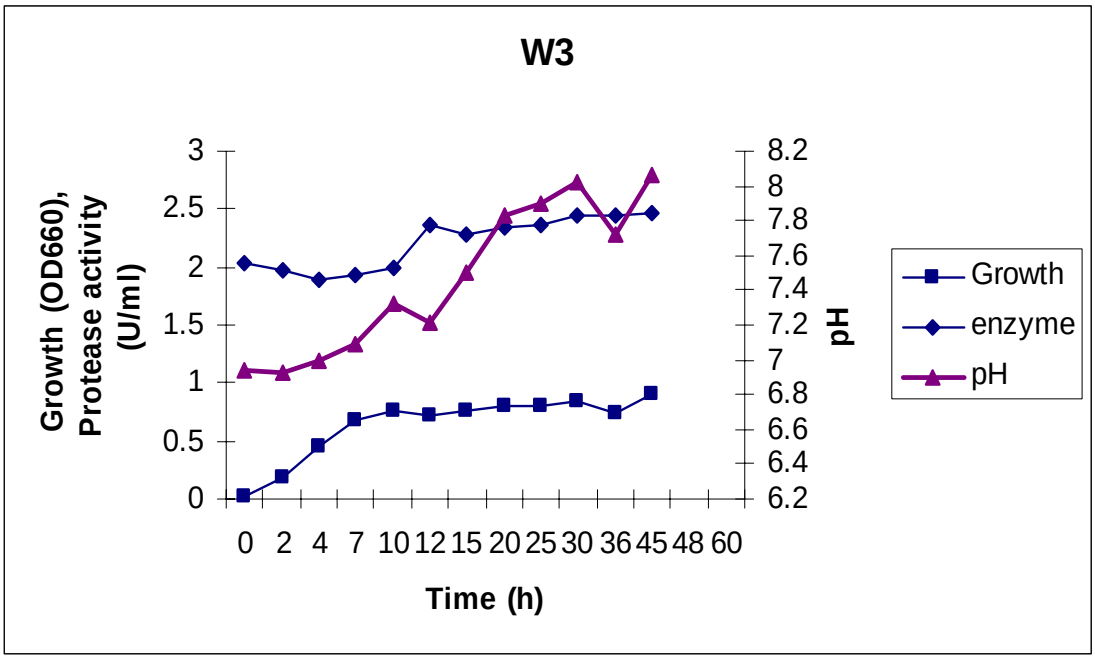
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ในอาหาร NB ที่มี 2% NaCl pH เริ่มต้น 7 บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) จากรูปที่ 12 พบว่าเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 2 ถึง 12 ของการเลี้ยง จากนั้นเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 15 ถึง 42 ของการเลี้ยง และเมื่อหาระยะเวลาที่เชื้อใช้เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (td: doubling time) มีค่าเท่ากับ 48 นาที เมื่อนำค่า td มาหาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ: specific growth rate) ซึ่งค่าที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.87 ต่อชั่วโมง (h^{-1}) หรือ 52.2 ต่อนาที



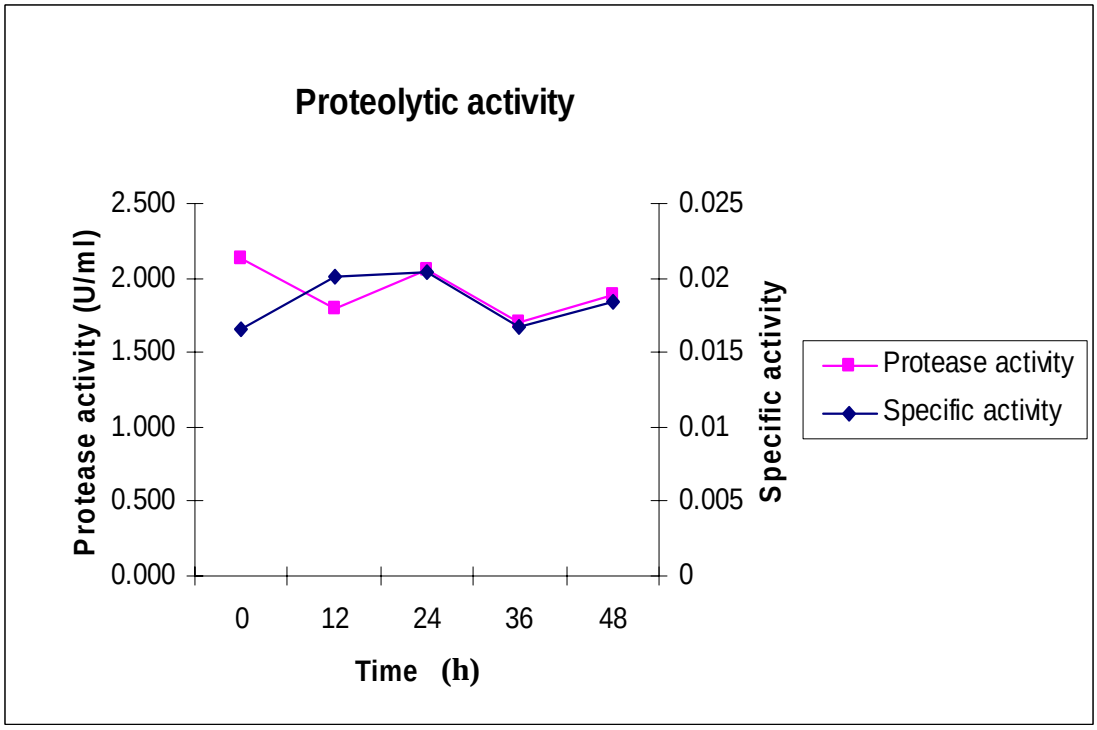
รูปที่ 12 การเจริญของเชื้อไอโซเลท W3 ในอาหาร NB ที่มี 2% NaCl ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

5.2 การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ในอาหาร FGM ที่มี 2% NaCl pH เริ่มต้น 7 บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) นำมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ระยะเวลาเดียวกับเวลาที่ทำการวัดการเจริญของเชื้อพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงโดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้เท่ากับ 2.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml) ดังรูปที่ 13 ขณะที่มี specific activity เท่ากับ 0.02 (รูปที่ 14) การย่อยโปรตีนส่งผลให้ pH ค่อยๆสูงขึ้นจากเริ่มต้นเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 7 เพิ่มเป็น 7.3 ที่ชั่วโมงที่ 10 แล้วลดลงที่ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นเพิ่มขึ้นและลดลงอีกครั้งที่ชั่วโมง 36 และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 48 มีค่า pH เป็น 8.1



รูปที่ 13 การเจริญ pH และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อไอโซเลท W3 ในอาหาร FGM ที่มี 2% NaCl ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ



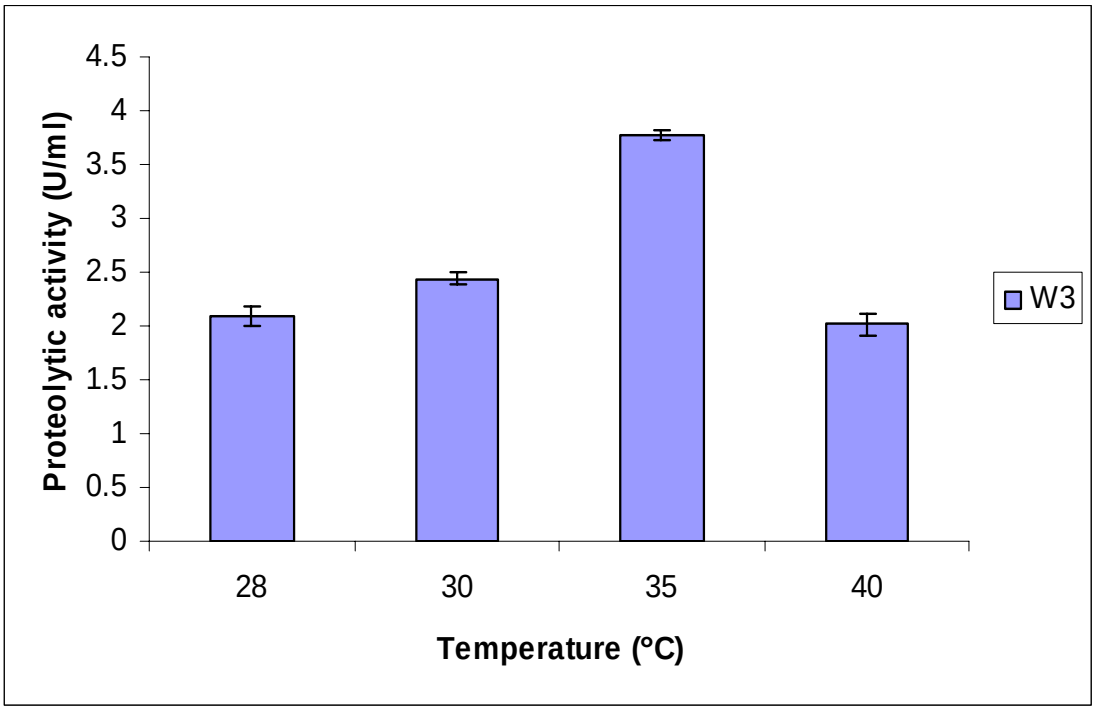
รูปที่ 14 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในอาหาร FGM ที่มี 2% NaCl ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

6. ลักษณะของเอนไซม์จากเชื้อที่คัดเลือกได้

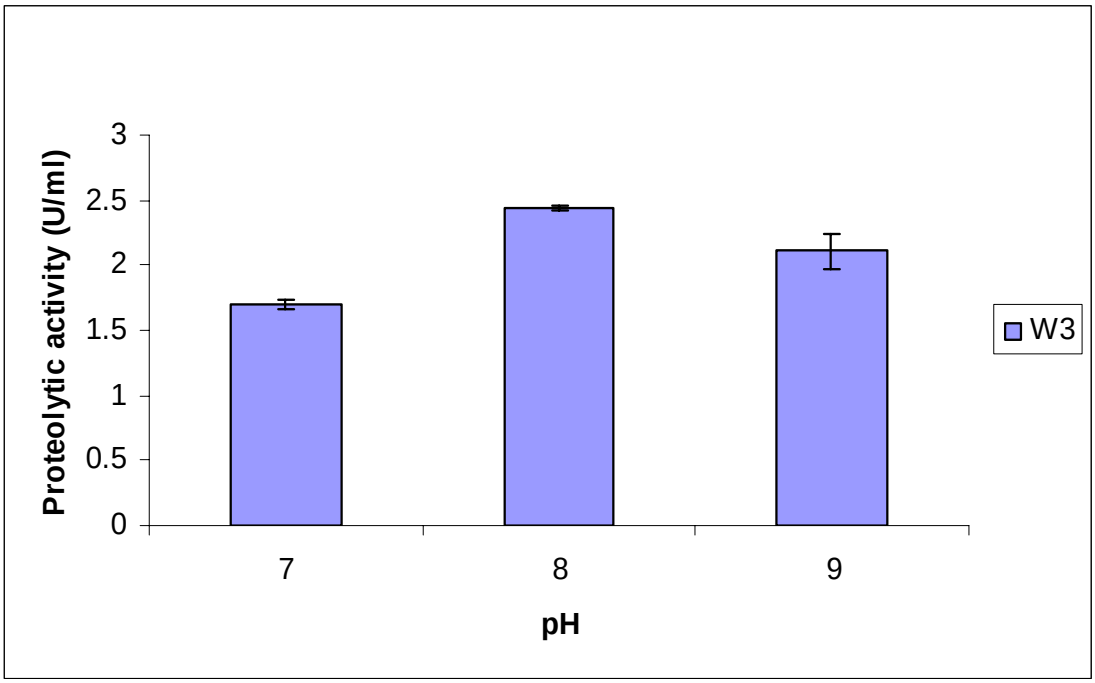
6.1 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีค่าสูงสุด (3.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส (2.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่อุณหภูมิ 28 และ 40 องศาเซลเซียสก็ไม่แตกต่างกัน คือมีค่าประมาณ 2.09 และ 2.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 15 แต่อุณหภูมิของน้ำที่วัดได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งอยู่ระหว่าง 28–30 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการทดลองหาสภาวะของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เพื่อประยุกต์ใช้ให้เหมาะในการเลี้ยงกุ้งในอนาคต

จากการทดลองพบว่าที่ pH 8 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อไอโซเลท W3 มีค่าสูงที่สุด (2.44 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับ pH 7 (1.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และ pH 9 (2.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ดังรูปที่ 16 จากผลแสดงว่าเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นเป็น alkaline protease (pH ที่เหมาะสม 6.7-9) (ปราณี,2543)



รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนของไอโซเลท W3

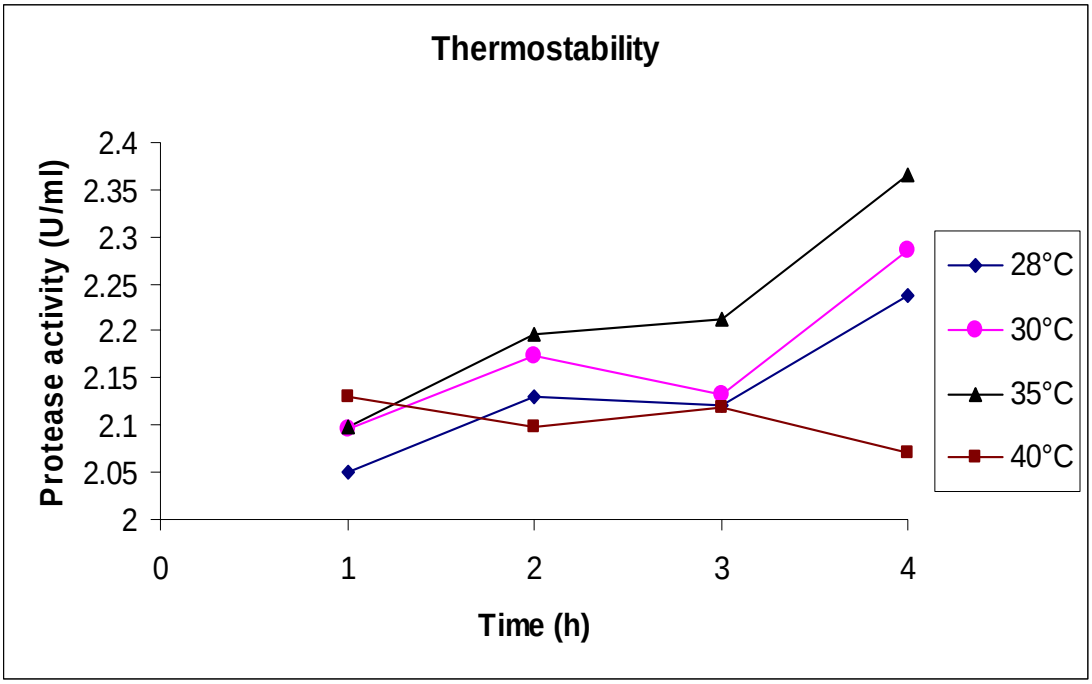


รูปที่ 16 ผลของ pH ต่อกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

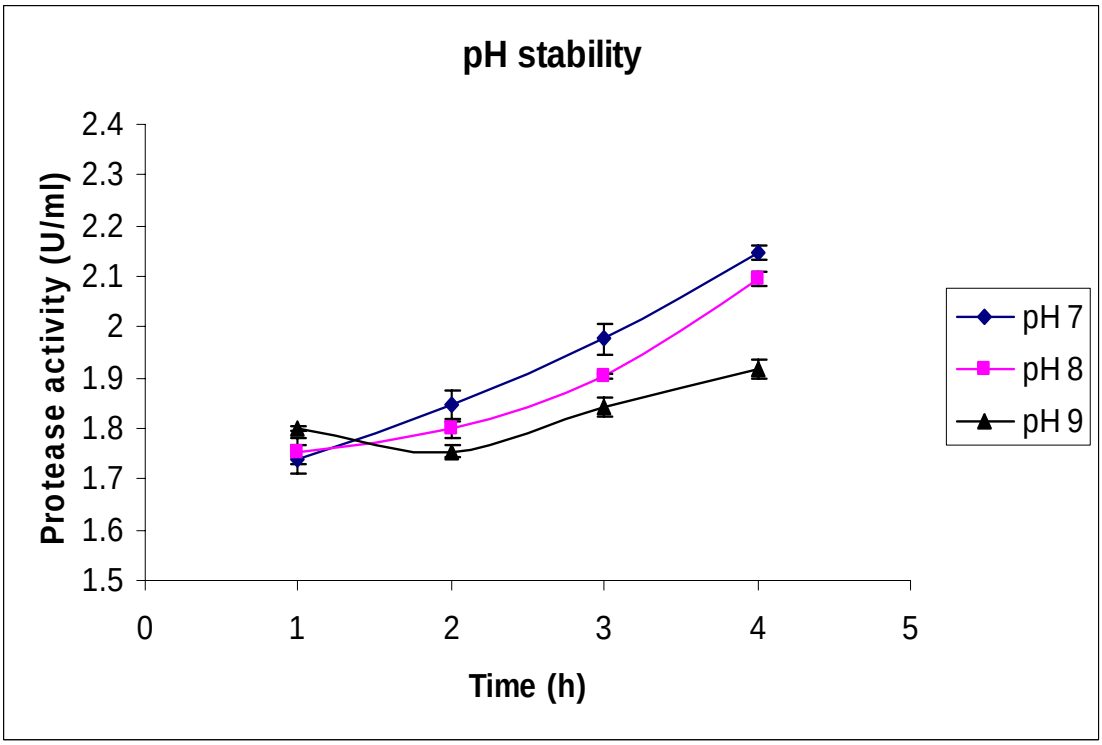
6.2 ผลของอุณหภูมิและ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์

จากรูปที่ 17 พบว่าค่าความคงตัวของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 28 30 และ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ยังคงมีอยู่และค่ากิจกรรมไม่ลดลงมีแต่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม แต่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มมีค่าลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากไอโซเลท W3 สามารถคงตัวที่อุณหภูมิ 28 30 และ 35 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ใช้ศึกษาพิจารณาจากผลซึ่งอาจมีความคงตัวนานกว่านี้ก็เป็นได้

สำหรับค่า pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์ จากรูปที่ 18 พบว่า แม้เวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ pH 7 8 และ 9 ไม่ได้ลดลงมีแต่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่ pH 7 8 และ 9 ได้เป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง



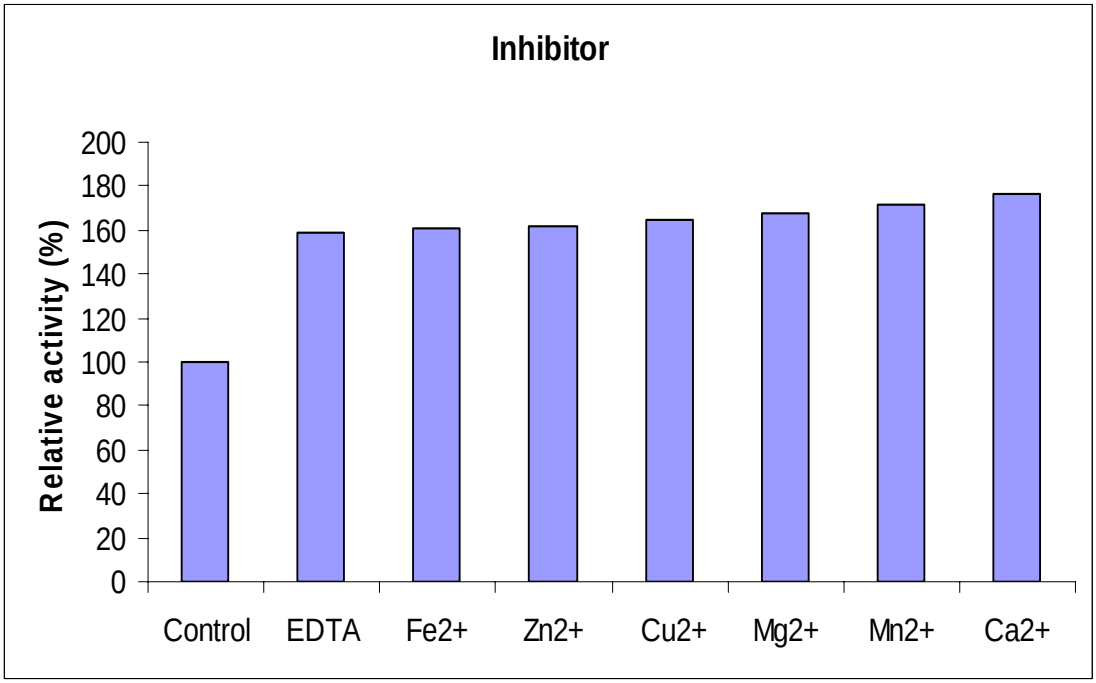
รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากไอโซเลท W3



รูปที่ 18 ผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์ ที่ 35 องศาเซลเซียส

6.3 ผลของตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ผลของตัวยับยั้งเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (100 %) พบว่า EDTA มีค่า relative activity น้อยที่สุดคือ 158.55% ตามด้วย Fe^{2+} (160.63 %) Zn^{2+} (162.23 %) Cu^{2+} (164.54 %) Mg^{2+} (167.37 %) Mn^{2+} (171.51%) และ Ca^{2+} (176.78 %) ตามลำดับ ดังรูปที่ 19 ดังนั้นโปรติเอสที่เชื้อ W3 ผลิตไม่จัดอยู่ในกลุ่มโปรติเอสโลหะ



รูปที่ 19 ผลของตัวยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนผลิตโดยไอโซเลท W3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 8

7. ลักษณะของเชื้อที่คัดเลือกได้

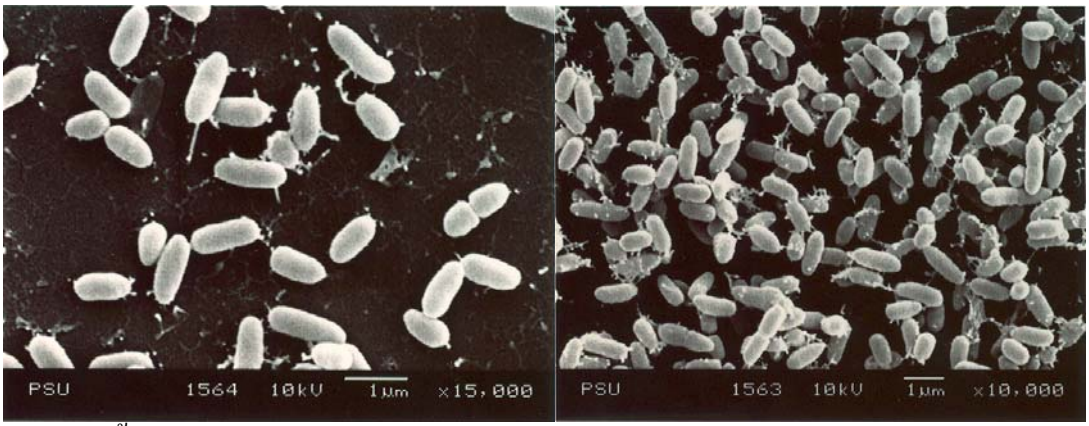
7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้

เมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไอโซเลท W3 มาทดสอบทางชีวเคมี ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม (conventional method) ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984) เพื่อเทียบเคียงในระดับจีนัส (genus) พบว่า ติดสี Gram ลบ มีรูปร่างแท่งสั้น เมื่อทดสอบ catalase oxidase และ cirate test ให้ผลบวก แต่ทดสอบ

indole และ MR-VP ให้ผลเป็นลบซึ่งลักษณะที่กล่าวมาจัดว่าเป็นเชื้อในสกุล *Pseudomonas* และยังทดสอบอื่นๆ อีกพบว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถย่อยเจลาตินได้ ออกซิไดซ์กลูโคสและฟรุกโตส และยังสามารถใช้ L-arginine ได้ สร้างรงควัตถุ (Pigment) สีเขียว ดังตารางที่ 2 และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร CM559 Pseudomonas Agar Base ซึ่งเป็นอาหารที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas* sp. ปรากฏว่าเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกสามารถเจริญได้และมีการสร้างรงควัตถุ (pigment) ที่มีสีเขียว ดังรูปที่ 20 และเมื่อทดสอบด้วย Test kits ชนิด API 20 E ได้ผลเช่นเดียวกับที่ทดสอบเองคือ การใช้ cirate ให้ผลบวก อีกทั้งเชื้อไอโซเลท W3 สามารถย่อยเจลาตินและ D-glucose และผลการทดสอบอื่นๆ ดังตารางที่ 2 และ รูปที่ 21 และผลการนำเชื้อดังกล่าวไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ได้ผลดังรูปที่ 22 และเทียบเคียงเชื้อในระดับสปีชี่ (species) โดยใช้คุณลักษณะตามที่กล่าวมาแต่ไม่สามารถจัดลงในสปีชี่ (species) ใดจึงได้ใช้วิธีการเรียงลำดับเบส (16S rDNA) พบว่าเชื้อไอโซเลท W3 มีลำดับเบสตรงกับ AF 125317 ซึ่งก็คือ *Pseudomonas* sp. pDL01 AF 125317 โดยมีค่า identity เป็น 100% (โดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค)

รูปที่ 20 เชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 ในอาหาร CM559 Pseudomonas Agar Base

รูปที่ 21 เชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 ในชุดทดสอบ API 20 E



รูปที่ 22 เชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้

Characteristic	Conventional Method	Test Kit (API 20 E)	Bergy's Manual (*Pseudomonas*)*
Short rod	0.44 x 1.00 µm	ND	Short Rod
Gram stain	-	ND	-
Motility	+	ND	+
Catalase test	+	ND	+
Oxidase test	+	ND	D
Cirate test (CIT)	+	+	D
Indole test (IND)	-	-	-
Methyl red test	-	ND	-
Voges-Proskauer test (VP)	-	-	-
H_2S production (H_2S)	K/K (-)	-	ND
Urease (URE)	-	-	ND
Gelatin (GEL)	+	+	D
Oxidation-fermentation glucose	+/-	ND	ND
Oxidation-fermentation fructose	+ / -	ND	ND
Oxidation-fermentation lactose	- / -	ND	ND
D-glucose (GLU)	ND	+	D
D-mannitol (MAN)	ND	-	D
L-arabinose (ARA)	ND	-	D
Amygdalin (AMY)	ND	-	ND
D-sucrose (SAC)	ND	-	D

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้ (ต่อ)

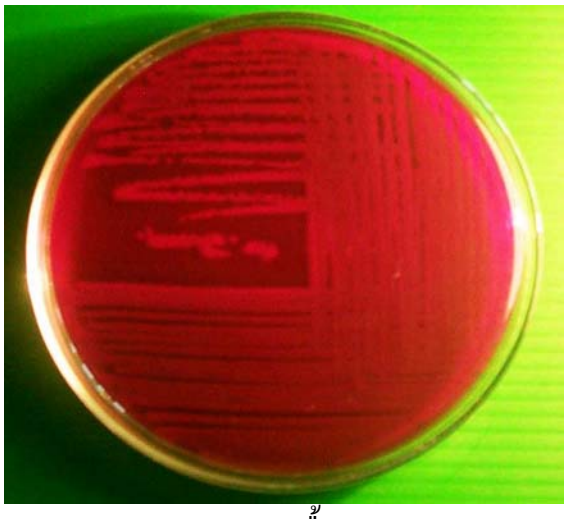
Characteristic	Conventional Method	Test Kit (API 20 E)	Bergy's Manual (*Pseudomonas*)*
L-rhamnose (RHA)	ND	-	D
D-sorbitol (SOR)	ND	-	D
Inositol (INO)	ND	-	ND
Litmus milk	peptonization	ND	ND
L-arginine (ADH)	+	+	D
Nitrate reduction test	-	ND	D
L-ornithine (ODC)	-	-	D
L-lysine (LDC)	-	-	D
L-trpytophane (TDA)	ND	-	D
Water-soluble fluorescence pigment formed	+	ND	D

หมายเหตุ
* = อ้างจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984)
(+) = สามารถใช้สารที่ทดสอบได้ หรือสร้างรงควัตถุ (pigment) ได้ หรือเคลื่อนที่ได้
(-) = ไม่สามารถใช้สารที่ทดสอบได้
D = Different reactions occur in different taxa (species of a genus or genera of a family)
ND = Not Determined
K = Alkaline
Peptonization = เชื้อแบคทีเรียสามารถสลายโปรตีนได้

7.2 ผลของยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ/*Pseudomonas* ต่อเชื้อไอโซเลท W3

จากการทดลองพบว่าเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบเกือบทุกชนิด ได้แก่ gentamicin (10 µg) amikacin (30 µg) tetracycline (30 µg) netilmicin (30 µg) ceftazidime (30 µg) และ norfloxacin (10 µg) ยกเว้น cephalothin (30 µg) ที่เชื้อมีความต้านทานยา และเชื้อมีความต้านทานยาปานกลางในกรณีของยา chloramphenicol (30 µg) และยา trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg) ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4

เมื่อทดสอบการ hemolytic เพื่อดูลักษณะการแตกของเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar พบว่า เชื้อไอโซเลท W3 ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงในอาหาร Blood agar แตกได้ ดังรูปที่ 23 แสดงว่าเชื้อ W3 ไม่น่าเป็นเชื้อก่อโรค



รูปที่ 23 การเจริญบนอาหาร Blood agar ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3

ตารางที่ 3 ผลของยาปฏิชีวนะที่ใช้ควบคุมเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบต่อ *Pseudomonas* sp. W3

Antibiotic	Disk Content	Resistant	Intermediate	Susceptible
Chloramphenicol	30 µg		/	
Gentamicin	10 µg			/
Amikacin	30 µg			/
Cephalothin	30 µg	/		
Tetracycline	30 µg			/
Netilmicin	30 µg			/
Ceftazidime	30 µg			/

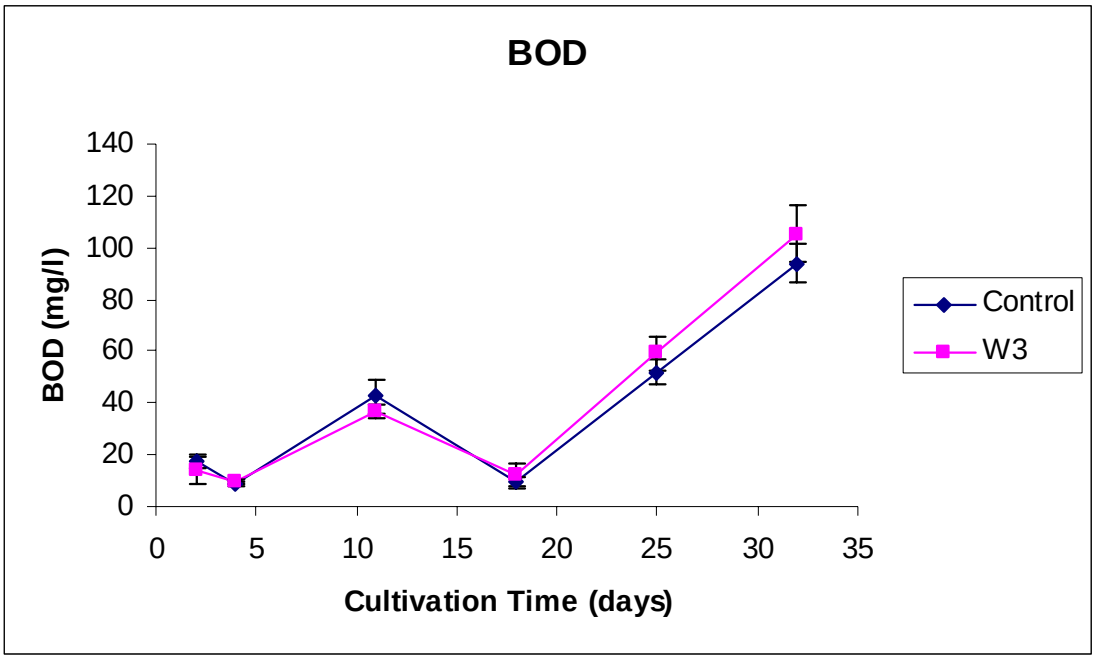
ตารางที่ 4 ผลของยาปฏิชีวนะที่ใช้ควบคุมกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ต่อเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3

Antibiotic	Disk Content	Resistant	Intermediate	Susceptible
Chloramphenicol	30 µg		/	
Norfloxacin	10 µg			/
Trimethoprim-sulfamethoxazole	25 µg		/	
Cephalothin	30 µg	/		
Tetracycline	30 µg			/
Netilmicin	30 µg			/
Amikacin	30 µg			/
Gentamicin	10 µg			/

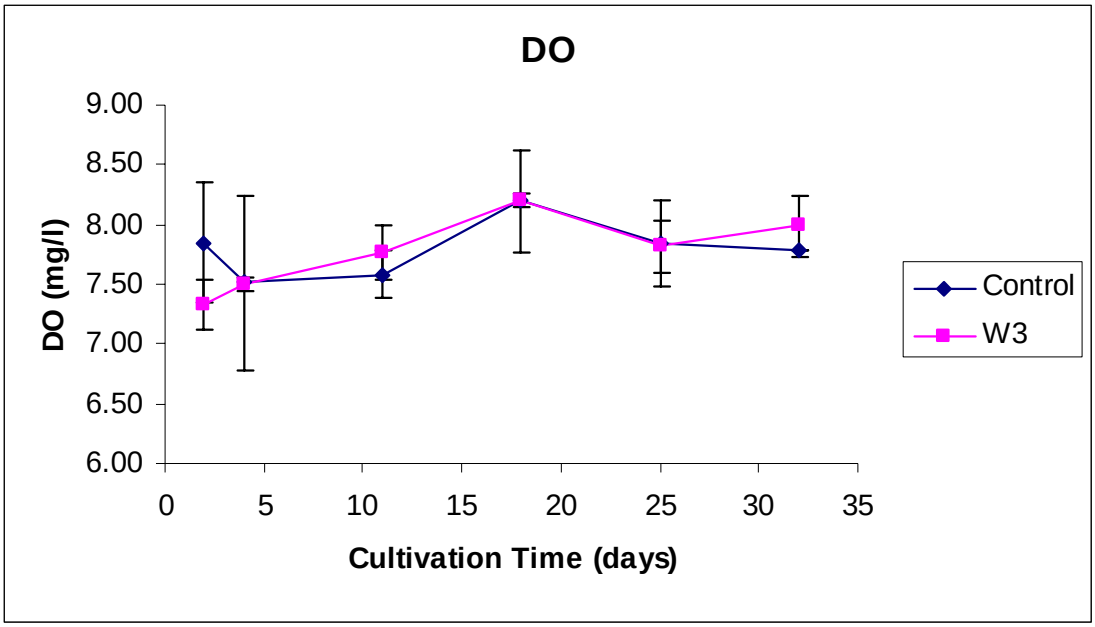
8. การประยุกต์ใช้ไอโซเลท W3 ในการเลี้ยงกุ้งในสภาวะจำลอง

8.1 ค่า BOD และ DO ในสภาวะจำลอง

จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่า BOD มีลักษณะการขึ้นลงเหมือนกันทั้งในชุดที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 และชุดควบคุมโดยวันที่ 4 ของการทดลองค่า BOD ลดลงเมื่อเทียบกับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง จากนั้นมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงวันที่ 10 หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงมีค่าเท่ากับ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงไปได้ 18 วันและเพิ่มขึ้นอีกจนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 105.33 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 32 วัน สำหรับชุดที่เติมเชื้อ ขณะที่ชุดควบคุมมีค่า 94 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 24 เมื่อทำการวัดค่า DO ภายในตู้เลี้ยงกุ้งจำลองพบว่า ค่า DO ภายในชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 มีค่าอยู่ในช่วง 7.33-8.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 25 และจากรูปที่ 25 พบว่าค่า DO ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าที่ใกล้เคียงกันตลอดการเลี้ยงกุ้ง



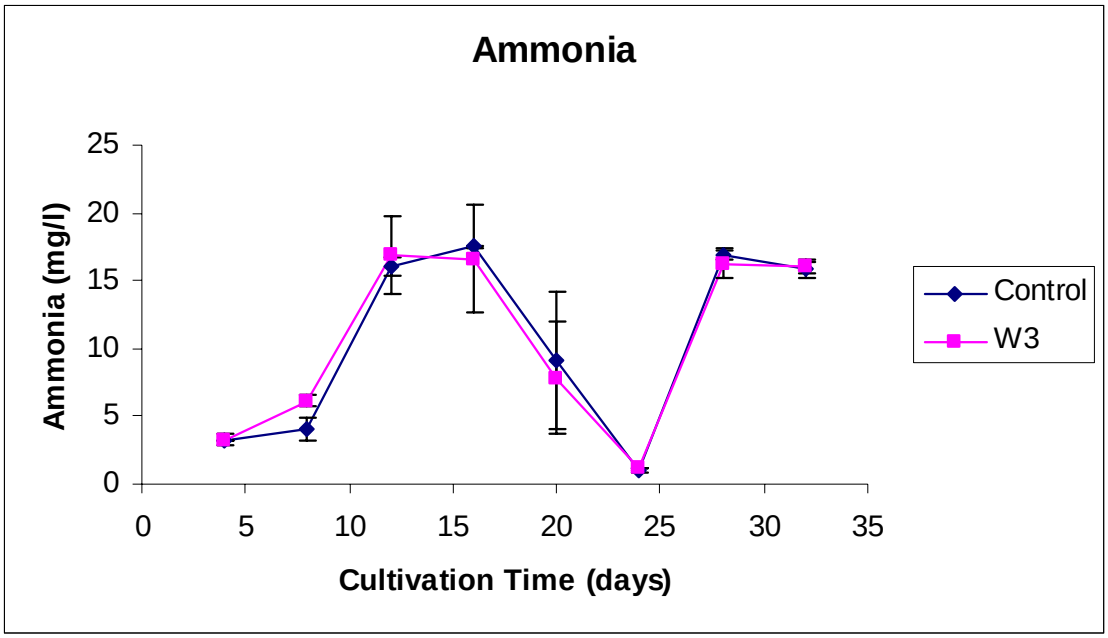
รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของค่า BOD ในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้งขาว เมื่อมีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3



รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของค่า DO ในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้งขาว เมื่อมีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3

8.2 ปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

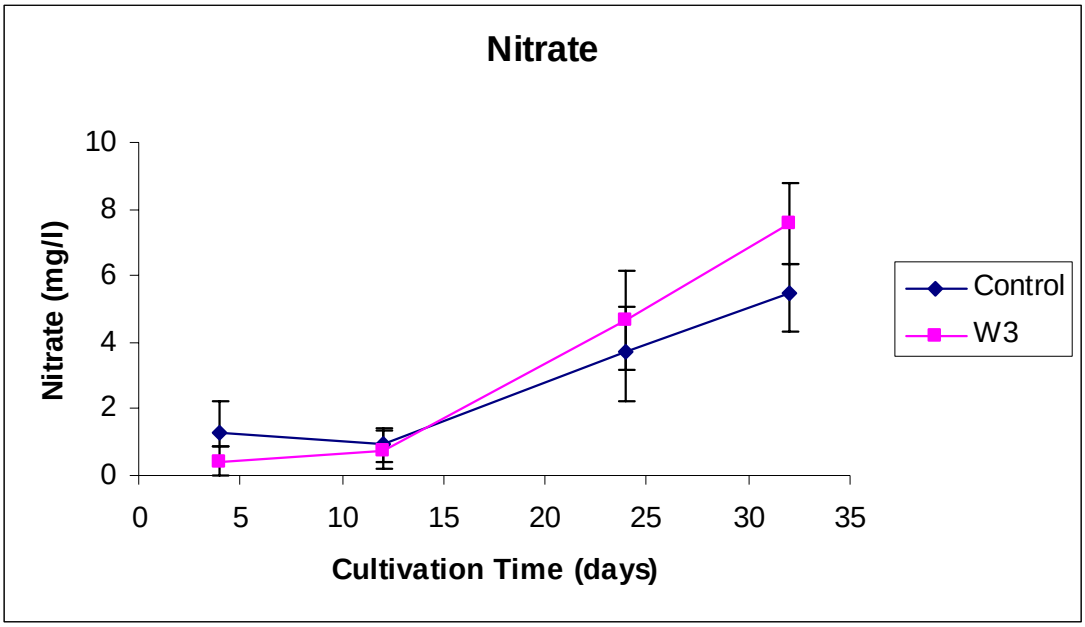
เช่นเดียวกับค่า BOD ที่การเปลี่ยนแปลงของค่าแอมโมเนียในชุดควบคุมและชุดที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงแบบเดียวกัน และแทบไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากการทดลองพบว่า ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นมากเมื่อวันที่ 12 ของการทดลอง (16.82 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากนั้นปริมาณแอมโมเนียลดลงจนต่ำสุดที่วันที่ 24 ของการทดลอง (1.19 มิลลิกรัมต่อลิตร) และจากนั้นเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วงวันที่ 28 ของการเลี้ยง (16.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณแอมโมเนียของทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน และมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 ปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงกุ้งในสภาวะจำลองบ่อ เมื่อมีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3

8.3 ปริมาณ NO_3^- ที่เกิดขึ้นในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

การเปลี่ยนแปลงไนเตรทในชุดควบคุมและชุดทดสอบมีการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบเดียวกัน จากการทดลองพบว่า ปริมาณ NO_3^- ที่เกิดขึ้นในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และที่วันที่ 32 ของการทดลอง ปริมาณ NO_3^- ของชุดเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 มีค่า 7.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณ NO_3^- เท่ากับ 5.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าในวันที่ 24 และ 32 ของการเลี้ยง ปริมาณ NO_3^- ในชุดที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 มีค่ามากกว่าในชุดควบคุม ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 ปริมาณ NO_3^- ที่เกิดขึ้นในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้งเมื่อมีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3

8.4 อุณหภูมิ pH และความเค็มภายในสภาวะจำลอง

จากการวัดอุณหภูมิ และความเค็มภายในสภาวะจำลองการเลี้ยงกุ้ง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ดังกล่าวภายในสภาวะการเลี้ยงจำลอง มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างน้อย ในสภาวะจำลอง คือ อุณหภูมิภายในตู้ทดลองจะอยู่ระหว่าง 24.2-26 องศาเซลเซียส และความเค็มของน้ำในตู้ทดลองอยู่ระหว่าง 25-32.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเค็มของน้ำจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง ส่วน pH ของสภาวะจำลองลดลงในวันที่ 28 ของการเลี้ยงทั้ง 4 ชุดการทดลอง จาก pH ซึ่งอยู่ในระดับ pHเริ่มต้นเลี้ยง 7.60 ลดลงเป็นประมาณ pH ที่อยู่ในระดับเฉลี่ย 6.71 ของช่วงวันที่ 28-32 วันของการเลี้ยง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ pH และความเค็มภายในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

Time	Temperature (°C)				Salinity (ppt)				pH			
(day)	C	W3	V	W3+V	C	W3	V	W3+V	C	W3	V	W3+V
0	26	26	26	26	25	25	25	25	7.6	7.6	7.6	7.6
4	25.5	25.5	25.6	25.5	30	30	30	30	7.7	7.7	7.5	7.7
8	25	25	25	25	30	30	30	30	7.8	7.7	7.5	7.7
12	25	25	25	25	31	31	31	30.5	7.7	7.7	7.7	8.0
16	24.5	24.5	24.5	24.5	32	31.5	31	30.5	7.8	7.8	7.9	7.9
20	24	24	24.2	24.2	30.7	31.5	30.6	31	7.2	6.9	7.7	7.7
24	25	25	25	25	31.5	31.2	31.3	30.8	7.1	7.0	7.7	7.1
28	25	25	25	25	30.5	30.8	31	31.7	6.7	6.7	6.6	6.7
32	24.9	24.8	24.8	24.8	31.5	31.5	32.2	31.6	6.8	6.5	7.0	6.7

หมายเหตุ C = ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

W3 = เติมเชื้อย่อยโปรตีน *Pseudomonas* sp. W3

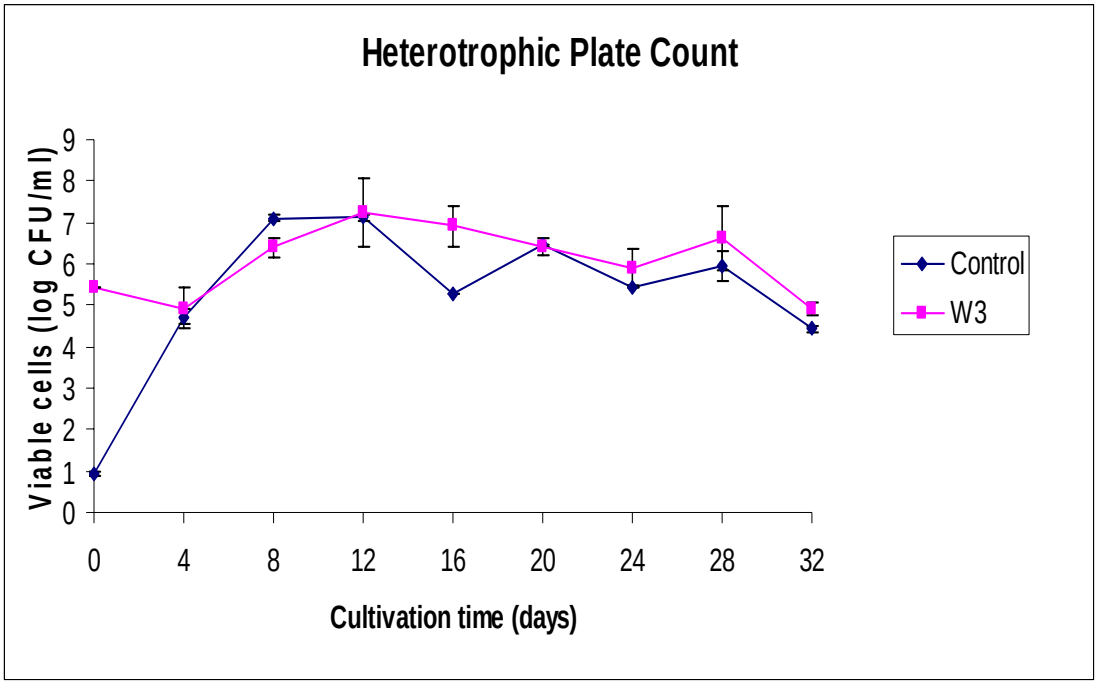
V = เติมเชื้อ *V. harveyi*

W3 + V = เติมเชื้อย่อยโปรตีน *Pseudomonas* sp.W3 และเชื้อ *V. harveyi*

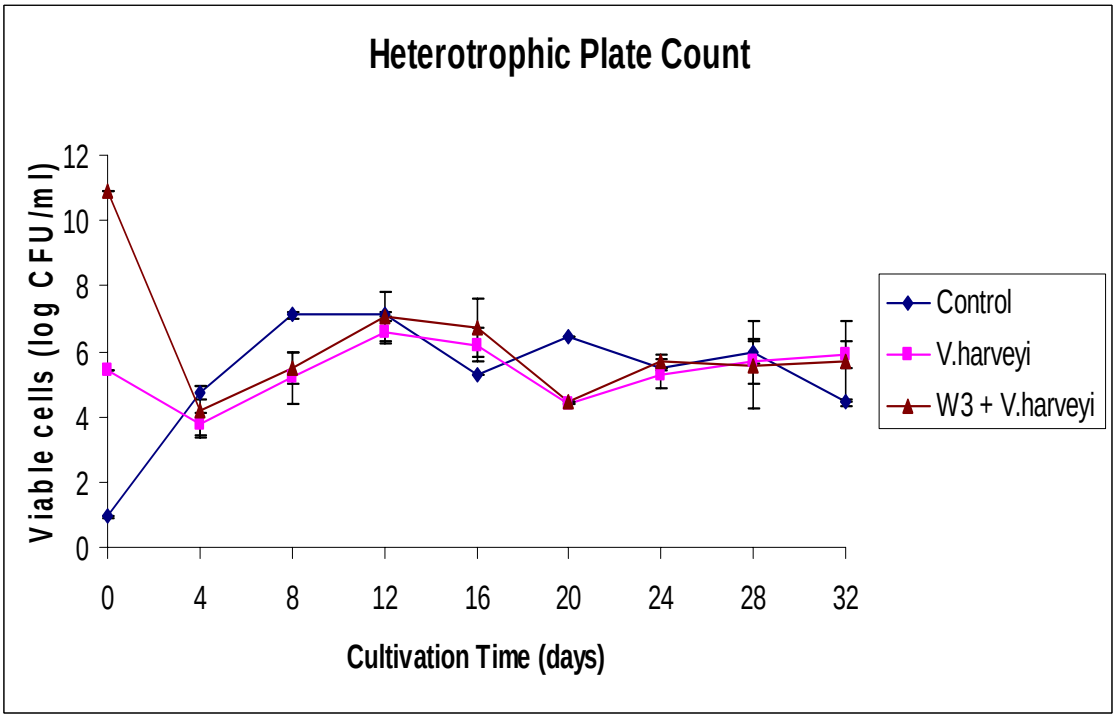
8.5 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในสภาวะจำลองการเลี้ยงกุ้ง

8.5.1 แบคทีเรียทั้งหมด

จากการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียในสภาวะจำลอง โดยทำการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Heterotrophic plate count: HPC) แบคทีเรียย่อยโปรตีน (Proteolytic bacteria: PTB) และจำนวนเชื้อ *V. harveyi* พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตู้ควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 และตู้ที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 พบความแตกต่างมากที่จุดเริ่มต้นของการเลี้ยง แต่หลังจากนั้นพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่วันที่ 4 ของการทดลองจนวันสุดท้ายของการทดลองของทั้ง 2 ตู้มีค่าที่ใกล้เคียงกัน คือ วันที่ 4 ปริมาณเชื้อ HPC ในตู้ที่เติมเชื้อเท่ากับ 4.91 log CFU/ml และในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 4.73 log CFU/ml ดังนั้นตู้ที่มีการเติมเชื้อลงไปมีปริมาณเชื้อ HPC มากกว่าเล็กน้อย ดังรูปที่ 28 และสำหรับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของตู้ที่มีการเติมเชื้อ *V. harveyi* และตู้ที่มีการเติมเชื้อ *V. harveyi* และเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 ก็พบว่า ปริมาณเชื้อ HPC ของทั้ง 2 ตู้แตกต่างกันมากที่จุกเริ่มต้นแต่ต่อมามีปริมาณของ HPC ในตู้ใกล้เคียงกันคือ ในวันที่ 4 และวันสิ้นสุดการเลี้ยง ภายในตู้ที่เติมเชื้อ 2 ชนิดมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 4.16 และ 5.69 log CFU/ml ส่วนตู้ที่เติมเฉพาะเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณ HPC เท่ากับ 3.78 และ 5.90 log CFU/ml ขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อมีค่า HPC ต่ำสุดเท่ากับ 0.93 และ 4.42 log CFU/ml ดังรูปที่ 29



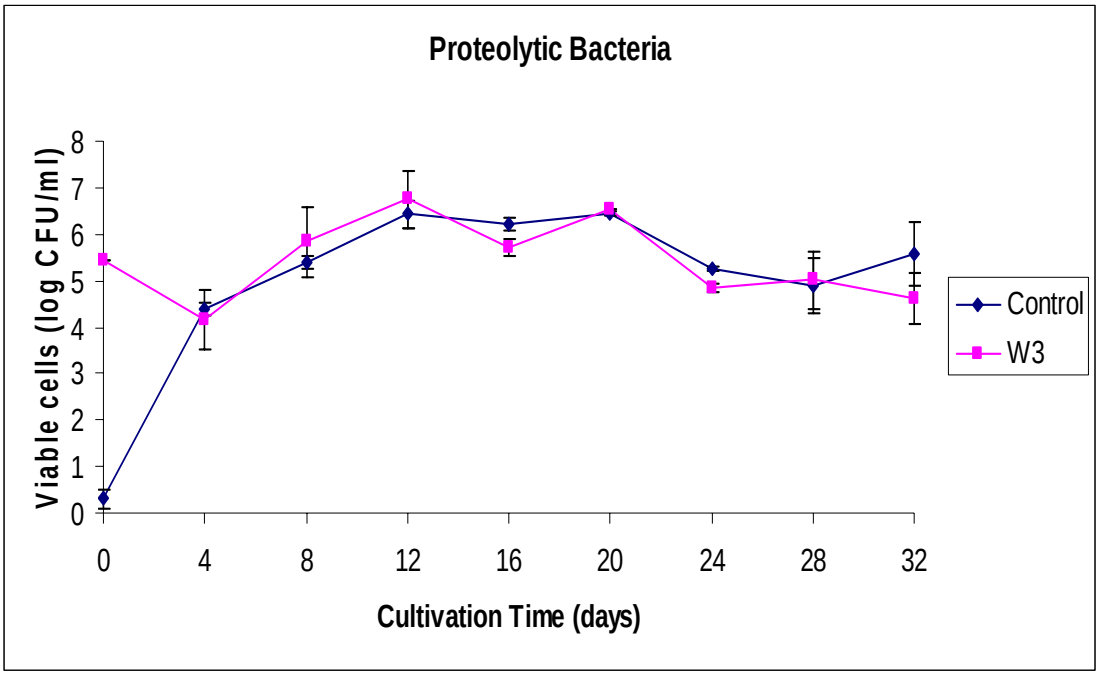
รูปที่ 28 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในสภาวะจำลองที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3



รูปที่ 29 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในสภาวะจำลองการเลี้ยงกุ้งที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 ผสมกับเชื้อ *V. harveyi* และเติมเชื้อ *V. harveyi* เท่านั้น

8.5.2 แบคทีเรียย่อยโปรตีน

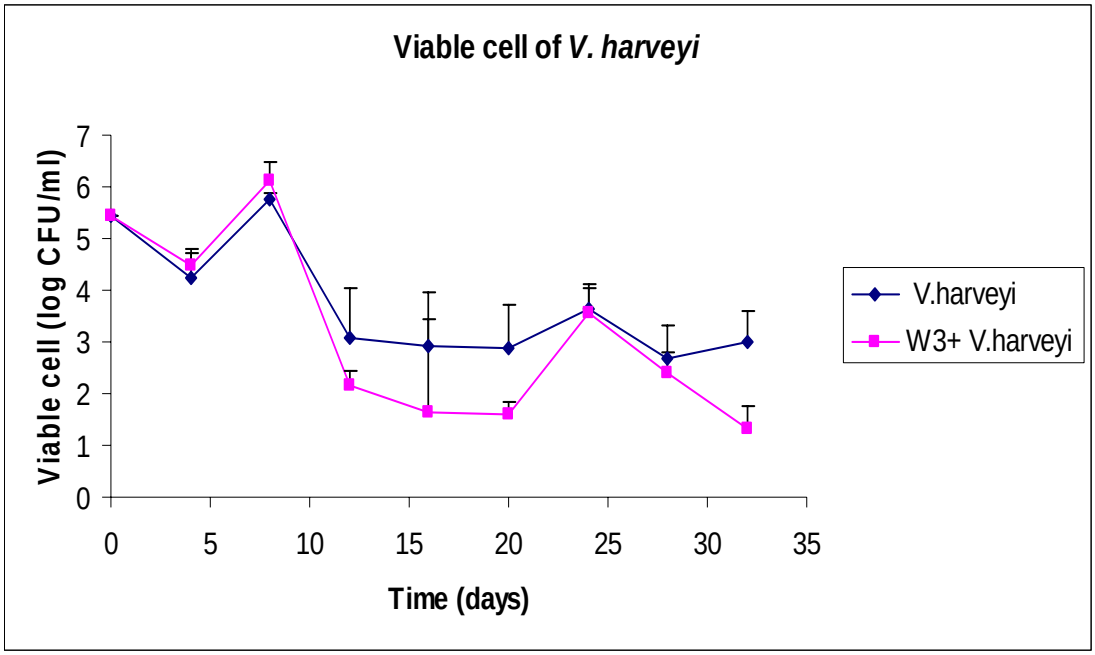
สำหรับการนับเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนในการทดลองชุดที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนเพียงอย่างเดียวพบว่าเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงมีค่า 5.44 log CFU/ml และวันที่ 4 ของการทดลองจำนวนเชื้อ PTB เท่ากับ 4.16 log CFU/ml และค่อยเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 8 (5.83 log CFU/ml) ของการทดลองจนกระทั่งวันที่ 24 ของการทดลองจำนวนของเชื้อ PTB ลดต่ำลงอีก (4.86 log CFU/ml) และเริ่มคงตัวจนกระทั่งช่วงสุดท้ายของการทดลอง (4.60 log CFU/ml) (วันที่ 32 ของการทดลอง) และสำหรับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไอโซเลท W3 ปริมาณ PTB ตลอดเวลาการเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกับชุดที่มีการเติมเชื้อ ดังรูปที่ 30 และสิ่งที่สังเกตได้จากการตรวจนับเชื้อ พบว่าชุดที่เติมเชื้อไอโซเลท W3 มีลักษณะสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร FGM เช่นเดียวกับสีของเชื้อไอโซเลท W3 คือมีสีน้ำตาลอ่อน ขณะที่ในชุดควบคุมมีลักษณะสีของโคโลนีสีขาวขุ่น แสดงว่าในตู้ที่เติมเชื้อส่วนใหญ่ของแบคทีเรียย่อยโปรตีนคือไอโซเลท W3 ที่เติมลงไป



รูปที่ 30 จำนวนเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนในสภาวะจำลองการเลี้ยงกุ้งที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีน W3

8.5.3 เชื้อ *V. harveyi*

ในส่วนของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* เมื่อทำการนับจำนวนเชื้อภายในตู้ที่มีการใช้เชื้อ 2 ชนิด คือ *Pseudomonas* sp. W3 และ *V. harveyi* เปรียบเทียบกับตู้ที่ใส่เฉพาะเชื้อ *V. harveyi* พบว่า จำนวนเชื้อที่มีอยู่ภายในตู้ทดลองที่มีการใส่เชื้อ 2 ชนิดมีจำนวนเชื้อ *V. harveyi* ภายในตู้ทดลองน้อยกว่าตู้ที่มีการเติมเชื้อ *V. harveyi* เพียงอย่างเดียวคือ ในวันที่ 12 16 20 และ 32 ของการเลี้ยง ตู้ซึ่งใส่เชื้อ 2 ชนิดมีปริมาณเชื้อ *V. harveyi* เท่ากับ 2.16 1.64 1.61 และ 1.33 log CFU/ml ในขณะที่ตู้ที่เติมเชื้อ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.10 2.98 2.89 และ 2.99 log CFU/ml ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 จำนวนเชื้อ *V. harveyi* ที่มีอยู่ภายในตู้ทดลองเลี้ยงกุ้งที่มีการเติมเชื้อ 2 ชนิด คือ *Pseudomonas* sp. W3 และ *V. harveyi* กับตู้ที่เติมเฉพาะเชื้อ *V. harveyi*

8.6 การเจริญเติบโตของกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะจำลอง

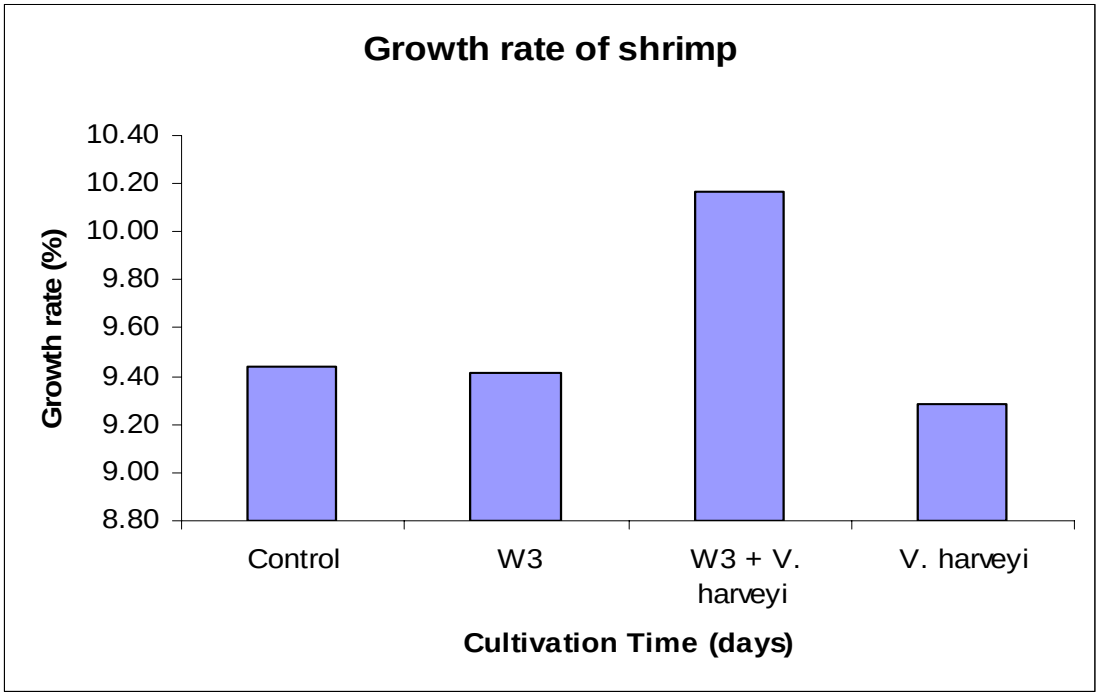
8.6.1 ผลการเติมเชื้อไอโซเลท W3 เพื่อรักษาคุณภาพน้ำ

จากการชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนทำการเลี้ยงในสภาวะจำลองในตู้ที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas sp.* W3 พบว่า น้ำหนักของกุ้งโดยเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 2.50 กรัม เมื่อทำการเลี้ยงได้ 30 วันได้นำกุ้งมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง พบว่า น้ำหนักของกุ้งเพิ่มเป็น 7.06 กรัม และเมื่อนำน้ำหนักกุ้งที่ได้มาหาอัตราการเจริญเติบโตต่อวันโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่า อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นในระยะการเลี้ยง 30 วัน มีค่าเท่ากับ 9.41% สำหรับในชุดที่ไม่เติมเชื้อน้ำหนักของกุ้งเฉลี่ยเท่ากับ 2.50 กรัมเช่นกัน เมื่อกุ้งอายุได้ 30 วันน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 7.08 กรัม ซึ่งเมื่อนำน้ำหนักกุ้งมาหาค่าอัตราการเจริญพบว่าในวันที่ 30 ของการเลี้ยงอัตราการเจริญเท่ากับ 9.44% ดังรูปที่ 32

8.6.2 ผลการเติมเชื้อไอโซเลท W3 เพื่อควบคุม *V. harveyi*

เมื่อทำการชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนทำการทดลองในตู้ที่เติมเชื้อ *Pseudomonas sp.* W3 ผสมกับการเติมเชื้อ *V. harveyi* พบว่า ในวันที่เริ่มต้นเลี้ยงกุ้งน้ำหนักของกุ้งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.35 กรัม เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 30 วัน พบว่าน้ำหนักของกุ้งมีค่าเท่ากับ 7.17 กรัม สำหรับชุดที่มีการเติมเชื้อ *V. harveyi* เพียงอย่างเดียว พบว่า น้ำหนักของกุ้งในวันที่เริ่มต้นเลี้ยงและวันที่ 30 ของการเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 2.55 กรัม และ 7.10 กรัม ตามลำดับ ซึ่งพบได้ว่ามีค่าน้อยกว่าชุดที่มีการเติมเชื้อทั้ง 2 ซึ่งเมื่อนำชุดที่มีการเติมเชื้อทั้ง 2 ชนิดมาหาอัตราการเจริญเติบโตต่อวันโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่า อัตราการเจริญเมื่อเลี้ยงไปได้ 30 วันเท่ากับ 10.17% ส่วนชุดที่เติม *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวพบว่า อัตราการเจริญที่ 30 วันของการเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 9.28% ดังรูปที่ 32

เมื่อสังเกตการณ์ตายของกุ้งในชุดทดลองพบว่า ในวันที่ 2 ของการทดลอง ชุดที่ใส่เฉพาะเชื้อ *V. harveyi* พบกุ้งตายเฉลี่ย 4 ตัว คิดเป็น 40% ในขณะที่ชุดที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 และ *V. harveyi* พบการตายของกุ้งในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ซึ่งกุ้งมีการตายเฉลี่ย 3.5 ตัว คิดเป็น 35%



รูปที่ 32 อัตราการเจริญของกุ้งขาวที่เลี้ยงภายใต้สภาวะจำลองเป็นเวลา 30 วัน