1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงกุ้งมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วพิจารณาจากจำนวนฟาร์มและโรงเพาะฟักลูกกุ้งที่เพิ่มขึ้น จำนวนผลผลิตกุ้งที่ได้จากฟาร์มเหล่านี้ คิดเป็นร้อยละ 30 ของกุ้งทั้งหมดที่ถูกส่งเข้าสู่ตลาดโลก โดยมีประเทศผู้ผลิตอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ โดยมีผลผลิตรวมประมาณ 71,200 เมตริกตัน (Rosenberry, 1996) ในจำนวนนี้ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่มีความก้าวหน้ามาเป็นลำดับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 เป็นต้นมา ปัจจุบันกุ้งกุลาดำยังคงเป็นสินค้าติดอันดับหนึ่งในสิบของสินค้าส่งออกของไทยโดยมีมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพานิชย์, 2539) ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 – 2538 แต่ในปี พ.ศ. 2539 จนถึงปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งมีปัญหาต่างๆ ตามมามากมาย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในระดับอนุบาลลูกกุ้งและในฟาร์มเพาะเลี้ยงเป็นไปแบบระบบหนาแน่น เพื่อให้คุ้มทุนต่อการผลิตและการลงทุน จำเป็นต้องใช้อาหารจำนวนมากเพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตสูง ซึ่งส่งผลให้มีปัญหาน้ำเสียเกิดขึ้นและ มีปัญหาการระบาดของโรค เช่น โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงดวงขาว โรคเรืองแสง และโรคอื่นๆ ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดตายต่ำตามมา ในการแก้ไขปัญหามีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะจำนวนมากในการควบคุมโรคทั้งในบ่ออนุบาลลูกกุ้งและฟาร์มเพาะเลี้ยง ซึ่งสารเคมีและยาปฏิชีวนะที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำและสิ่งแวดล้อมนอกจากมีผลทำให้เกิดการสะสมในตัวกุ้งที่นำไปบริโภคแล้ว ยังมีผลที่ช่วยเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคดื้อยาและเกิดการต้านทานขึ้นได้ จึงทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคในความเข้มข้นที่สูงยิ่งขึ้นส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างที่พบในปัจจุบัน

แนวโน้มในอนาคตของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเพื่อให้เป็นอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่ยั่งยืน และมีผลผลิตดีเช่นเดิม จำเป็นต้องมีการจัดการในด้านการลดการใช้ยาและสารเคมีที่เป็นอันตรายและให้ความรู้ที่ถูกต้องในการใช้ยาและสารเคมีแก่เกษตรกรมาก

ขึ้น การใช้สารกลุ่มโปรไบโอติก (Probiotics) เพื่อทดแทนการใช้ยาและสารเคมี และการจัดการเพื่อรักษาสภาพแวดล้อมโดยเน้นระบบสมดุลธรรมชาติในการเลี้ยงกุ้ง

Vibrio harveyi เป็นแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสงในกุ้งที่มีความสำคัญต่ออัตรารอดของลูกกุ้งและกุ้งที่โตเต็มวัย เมื่อมีการติดเชื้อแล้วมีอัตรารอดตายได้ไม่เกิน 26 เปอร์เซนต์ และกุ้งจะมีอาการผิดปกติบริเวณตับ ตับอ่อนและลำไส้ของกุ้ง (Phianphak *et al.*,1997) มีผู้นำวิธีการทางชีวภาพมาควบคุมโรค เช่น การใช้แบคทีเรียบางชนิดใส่ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง หรืออาหารกุ้งพบว่าทำให้อัตราการรอดตายสูงขึ้นและลดปริมาณแบคทีเรียที่ก่อโรคลงได้โดยเฉพาะ *Vibrio* spp. (Maeda and Liao, 1992) นอกจากนี้ได้มีผู้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยการผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งเพื่อเป็นโปรไบโอติคแก่ลูกกุ้งกุลาดำ พบว่ามีประสิทธิภาพเสริมให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดีและมีอัตรารอดตายสูงขึ้น (Shivappa and Chanratchakool, 1997)

ปัจจุบันมีผู้นิยมนำจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียและมีขายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาด แต่ไม่มีการยืนยันข้อมูลในด้านกลไกการออกฤทธิ์ จึงได้มีคณะวิจัยร่วมงานกันเพื่อศึกษาในด้านการนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการที่สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) พ.ศ. 2541 มาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสีย โดยมุ่งเน้นการลดระดับสารอินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรทและไนไตรท์ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของกุ้งในบ่อเลี้ยง และข้อมูลเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการพบว่า *B. subtilis* บางสายพันธุ์ยังมีศักยภาพในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้ (วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ และสมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ, 2541) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาเบื้องต้นในด้านการควบคุมหรือยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง โดยค้นหาแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพื่อใช้ประโยชน์ควบคู่กับการรักษาคุณภาพของน้ำ และทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นการลดอันตรายและการเสี่ยงต่อการบริโภคสารเหล่านี้ หากการศึกษานี้สามารถได้ข้อมูลพื้นฐานในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง ก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคในกุ้งในระดับอนุบาลหรือบ่อพัก หรือในระยะเวลาที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงในบ่อเลี้ยงทั่วไปเพื่อแก้ไขความเสียหายจึงทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายและสิ้นเปลืองเวลาเป็นอันมากเกษตรกรชาว

นากุ้งก็สามารถนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงนี้มาใช้ควบคุมการเกิดโรคแบบชีววิธีสำหรับการเพาะเลี้ยงทำให้ช่วยลดปัญหาทั้งมลพิษของสิ่งแวดล้อมและช่วยทำให้การดูแลจัดการน้ำได้ง่ายและสะดวกขึ้นและขณะเดียวกันก็สามารถควบคุมโรคพร้อมกันไปด้วย รวมทั้งมีผลดีต่อการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของผลผลิตกุ้งที่ส่งออกไปขายยังต่างประเทศ โดยขจัดปัญหาการจำกัดและควบคุมปริมาณสารเคมีและยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในกุ้ง

การตรวจเอกสาร

1.1 ปัญหาของการเพาะเลี้ยงกุ้ง

การเลี้ยงกุ้งของไทยในปัจจุบันประสบกับปัญหาหลายประการ จำนวนกุ้งที่เพาะเลี้ยงเริ่มตายมากขึ้น ส่งผลกระทบต่อผลผลิตกุ้งเป็นอย่างมาก ทำให้มีการวิจัยถึงสาเหตุการตายของกุ้ง พบว่า มีผลมาจากโรคติดเชื้อที่เกิดจาก แบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต การตายของกุ้งพบทุกช่วงอายุ ตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดโตใกล้จับ การระบาดของโรคกุ้งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงดวงขาว โรคเรืองแสง และโรคอื่นๆ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย ได้แก่ การกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ ความหายนะทางธรรมชาติ มลพิษอุตสาหกรรม และของเสียที่เกิดจากมนุษย์

ตารางที่ 1 โรคติดเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในกุ้งกุลาดำ

จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ	โรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากจุลินทรีย์
แบคทีเรีย	
Vibrio harveyi	โรคเรืองแสง
Vibrio vulnificus	โรคเสี้ยนดำ
Vibrio sp.	โรคเหงือกกร่อน
Vibrio sp.	โรคตายเดือน
ไวรัส	
Monodon Baculovirus (MBV)	โรคโมโนดอน แบคคิวโลไวรัส
Hepatopancreatic Parvo-like virus (HPV)	โรคเฮบพาโตแพนคริเอติกพาโว-ไลค์ไวรัส
V – shaped virus (VV)	โรควิเชพ
Yellow – head virus	โรคหัวเหลือง
Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV)	โรคตัวแดงดวงขาว

ที่มา : ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ , 2539

1.2 โรคกุ้งที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย

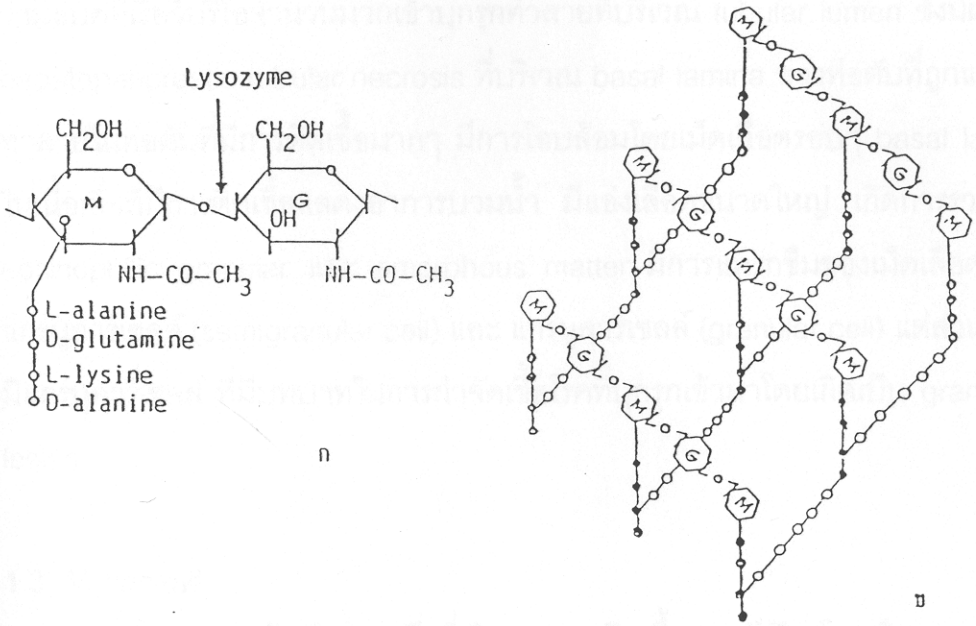
โรคกุ้งที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียมีเป็นจำนวนมาก และมักเป็นการติดเชื้อแบบระยะที่สอง (secondary infection) คือ ร่างกายกุ้งจะอ่อนแอจากสาเหตุอื่นๆ อยู่ก่อนแล้ว เช่น มีบาดแผล เกิดความเครียด เป็นต้น โรคแบคทีเรียมักพบมากในกุ้งวัยอ่อน (larvae) โพสท์ลาวา (postlarvae) และกุ้งวัยรุ่น (juvenile) ชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งส่วนใหญ่จะเป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนไหวได้ แบคทีเรียที่พบส่วนมากเป็นแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ซึ่งได้แก่ *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. splendidus,V. vulnificus, V. damsela* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo, 1995)

โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) พวกไกลเคน (Glycan) ซึ่งเป็นแกนหลักให้โปรตีนจับกันเป็นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ดังแสดงในรูปที่ 1

เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวกุ้งได้หลายทาง เช่น ทางปาก โดยการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปทางรอยแผล โดยเจาะเข้าไปในระยะฟักตัวหรือติดต่อจากแม่กุ้ง ซึ่งในกรณีนี้เกิดจากเลือดซึ่งเข้าไปหล่อเลี้ยงรังไข่ ทำให้ลูกกุ้งติดเชื้อมาตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อนเป็นต้น บริเวณสำคัญที่สุดซึ่งเป็นจุดอันตรายที่เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวกุ้งคือส่วนเหงือก

เหงือกของกุ้งประกอบไปด้วยก้านเหงือก (central axis), พุ่มเหงือก (primary gill) และฝอยเหงือก (first และ secondary gill filament) ที่ฝอยเหงือกจะถูกปกคลุมด้วยผิวบางๆ 3 ชั้น คือ ชั้นนอก (epicuticle) ชั้นกลาง (exocuticle) และชั้นใน (endocuticle) ที่ผิวชั้นในมีรูผ่านผิวชั้นในและชั้นนอก ใต้ผิวที่ปกคลุม 3 ชั้นนี้เป็นชั้นที่เซลล์เยื่อบุผิวเรียงตัวกันบางๆ เป็นชั้นเดียว แบคทีเรียสามารถเข้าสู่เหงือกทางรูเล็กๆ ดังกล่าว พอมาถึงชั้นในสุดเป็นเซลล์บางๆ ชั้นเดียวก็ใช้เอนไซม์ (enzyme) ย่อยเซลล์ดังกล่าวเพื่อเข้าไปในฝอยเหงือก จากนั้นจึงเข้าไปตามกระแสเลือดไปตามส่วนต่างๆหมุนเวียนไปทั่วร่างกายโดยการอาศัยน้ำเลือดที่มีโปรตีนสูงถึง 80-95 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหาร เมื่อไปถึงตับหรือตับอ่อนหรือแม้แต่ส่วนอื่นๆ ที่เป็นจุดอับและเป็นแหล่งที่ใช้อาหารได้บางส่วน แบคทีเรียก็เข้าไปอยู่ในอวัยวะส่วนนั้น แต่สภาพของอวัยวะดังกล่าวไม่เหมือนสภาพแวดล้อมเดิม แบคทีเรียสร้างแคปซูล (capsule) และเมื่อพักตัวอยู่ในระยะเวลาพอสมควรก็ออกมาจาก capsule แล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นก็มีการแพร่พันธุ์และขยายจำนวนออกไป เมื่อส่วนของเนื้อเยื่อถูกทำลายทำให้กุ้ง

ป่วยโดยเกิดอาการกินอาหารได้ลดลงซึมและเครียด เสียการทรงตัวเมื่อว่ายน้ำ และในที่สุดก็เกยฝั่งและตายภายใน 2-3 วัน หลังจากนั้นแบคทีเรียก็ออกมาอยู่ในน้ำเพื่อหา host ใหม่ต่อไป (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2541)



รูปที่ 1 โครงสร้างของ เปปติโดไกลแคน M = กรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิก

G = เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน

ก. หน่วยซ้ำ ๆ ของ กรดเอ็น-อะเซทิลมิวรามิก และเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน และเททระเปปไทด์

ข. การเชื่อมต่อทางขวางระหว่างเปปติโดไกลแคนสายที่อยู่ใกล้เคียงกัน

ที่มา : สุวณี สุภเวชย์, 2536

จากรายงานของ Jiravannichpaisal (1995) พบว่าลูกกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio* เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์ท่อตับและพบแบคทีเรียอยู่ในบริเวณท่อตับเกิด granulomatous ล้อมรอบบริเวณที่ตับที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ในกรณีที่การติดเชื้อไม่รุนแรงพบแบคทีเรียในปริมาณที่ไม่มากนัก และเกิดหนองขึ้นในบริเวณที่มีการตายของเซลล์ในท่อตับ นอกจากนี้ยังพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดที่บริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อตับ ส่วนในกรณีที่ติดเชื้อรุนแรง พบว่ามีแบคทีเรียวิบริโอจำนวนมากเข้าบุกรุกทำลายที่บริเวณ tubular lumen ซึ่งมีผลทำให้เกิด hepatopancreatic tubular necrosis ที่บริเวณ basal lamina ของท่อตับที่ถูกแบคทีเรียเข้าทำลายในท่อตับที่มีการติดเชื้อมากๆ มีการโอบล้อมโดยเม็ดเลือดรอบๆ basal lamina ภายในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแสดงอาการบวมน้ำ มีแอ่งเลือดขนาดใหญ่ เกิดการรวมตัวกันของ eosinophilic granular และ amorphous matter มีการแทรกซึมของเม็ดเลือดทั้งชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semigranular cell) และ แกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) แต่ส่วนใหญ่เป็นเซมิแกรนูลาร์เซลล์ ที่มีบทบาทในการกำจัดเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามาโดยเกิดเป็น granulomatous lesion

1.3 *V. harveyi*

โรคเรืองแสงในกุ้งเป็นโรคหนึ่งที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) ซึ่งมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน สำหรับชนิดที่ตรวจพบในประเทศไทย ได้แก่ *V. fischeri*, *V. cholerae*, Biotype albesis, *V. harveyi* และ *Photobactrium leiognathi* ซึ่งในจำนวนแบคทีเรียเรืองแสงดังกล่าวมานี้ *V. harveyi* เป็นชนิดที่พบในแหล่งน้ำเป็นปริมาณสูงกว่าชนิดอื่นและยังพบในกุ้งป่วยและกุ้งตายอยู่เสมอ (Raungpan *et al.*,1995b)

ความเสียหายจากปัญหาโรคทั้งหมดในขณะนี้โรคเรืองแสงจากเชื้อ *V. harveyi* รุนแรงที่สุด ไม่ต่ำกว่า 70% ของโรคทั้งหมดเกิดจากโรคนี้เพียงอย่างเดียว ในประเทศไทยโรคเรืองแสงรายงานครั้งแรกในปี 2530 จากโรงเพาะฟักลูกกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*) โดยพบแบคทีเรียเรืองแสงเจริญแพร่หลายมากในบ่อเพาะฟักในขณะที่เกิดการตายของลูกกุ้งระยะต่างๆ ถึง 70-100 % ถูกจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้อาหารทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* และเมื่อทดสอบการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) พบว่าเชื้อ

V. harveyi ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ทำให้เกิดโรคกับลูกกุ้งแชบ๊วยระยะนอเพลียส (nauplii) มากที่สุด ขณะที่ระยะไมซิส (mysis)และโพสท์ลาวาน้อยลงตามลำดับ (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) มณเฑียร ส่งเสริม (2533) รายงานว่า *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำระยะนอเพลียส และซูเอี้ย (zoea) มากที่สุด ขณะที่เกิดโรคกับกุ้งระยะไมซิสและโพสท์ลาวาได้น้อยลงตามลำดับ

รายงานวิจัยของ Raungpan *et al.* (1995a) พบว่าในบ่อเลี้ยงที่มีการเลี้ยงกุ้งหนาแน่นสูงพบแบคทีเรียวิบิโอและแบคทีเรียเรืองแสงในปริมาณสูงกว่าบ่อที่มีความหนาแน่นต่ำ และพบว่าหากปล่อยให้ปริมาณแบคทีเรียรวมในบ่ออยู่ในระดับสูง 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 วันขึ้นไปกุ้งในบ่อเกิดปัญหาด้านสุขภาพ และนอกจากนี้ Raungpan *et al.* (1995b) ได้ทำการทดลองแยกชนิดเชื้อสกุล *Vibio* จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคซึ่งเก็บได้จากการเลี้ยงในหลายพื้นที่ของประเทศไทยพบว่า มีเชื้อ *V. harveyi* ในตัวกุ้งด้วย

ปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น แต่เกิดขึ้นกับประเทศอื่นๆ ทั่วโลก ในเอเชียพบว่าเชื้อนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งในโรงเพาะฟักในประเทศฟิลิปปินส์ โดยพบอยู่ในแอ่งเลือดของลูกกุ้งประมาณ 8.6×10^4 CFU/ml (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) และ Lavilla-Pitogo *et al.* (1998a) รายงานว่า กุ้งกุลาดำในระยะ postlarvae ในบ่อเลี้ยงแสดงการตายอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับเชื้อ *V. harveyi* 10^2 CFU/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในประเทศอินโดนิเซีย *V. harveyi* ที่ 1×10^3 CFU/ml ทำให้เกิดการตายของกุ้งกุลาดำในระยะต่าง ๆ (Prayito *et al.*,1995) ประเทศอินเดีย พบว่า *V. harveyi* ที่ 1×10^5- 1×10^6 CFU/ml ทำให้เกิดการตายของกุ้ง 100 % (Karunasagar *et al.*, 1994) ประเทศไต้หวัน พบว่า *V. harveyi* ที่ 10^6 CFU/ml ทำให้เกิดความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายของกุ้งกุลาดำระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม (Chen *et al.*, 1992) และในประเทศนิวคาลีโดเนีย Goarant *et al.* (1999) ตรวจพบว่า *V. harveyi* เป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง (*P. stylirostris*) นอกจากนี้ประเทศเอควาดอร์และเม็กซิโก ซึ่งเป็นประเทศแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ที่มีการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) มีการตรวจพบเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งที่เป็นโรคด้วยเช่นกัน โดยในเอควาดอร์พบเชื้อนี้ในลูกกุ้งระยะโพสต์ลาวา ส่วนเม็กซิโกพบเชื้อในกุ้งวัยรุ่น (Vandemberghe *et al.*,1999)

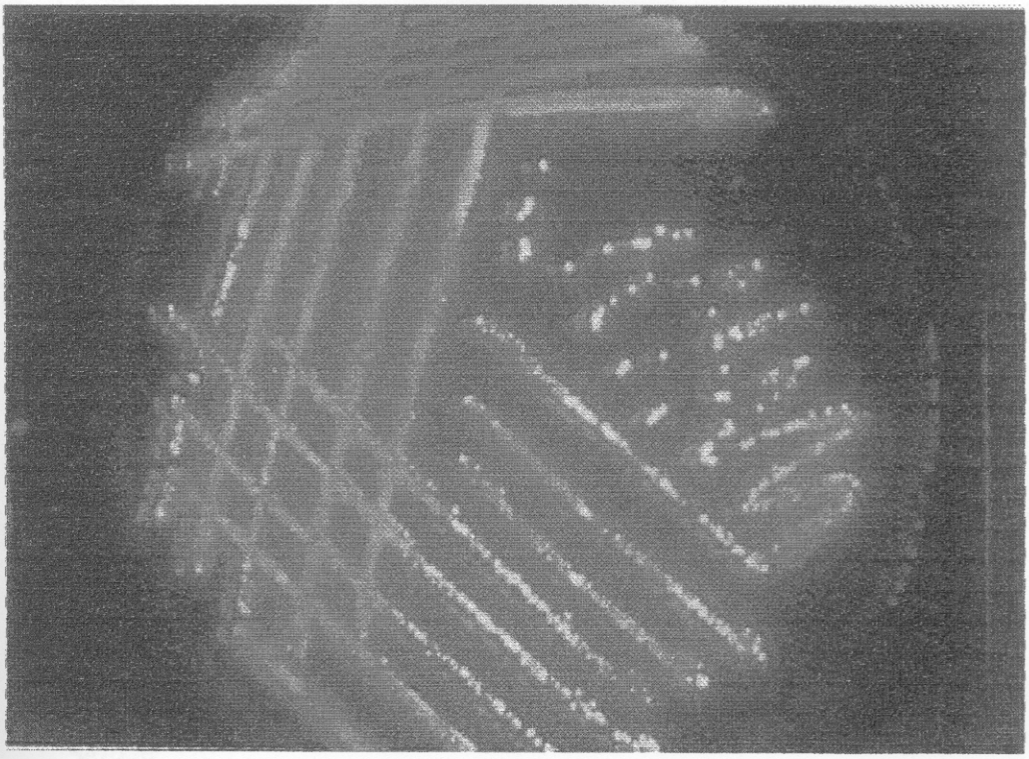
1.3.1 **ลักษณะของเชื้อ** *V. harveyi*

เชื้อ *V. harveyi* เดิมมีชื่อสกุลเป็น *Lucibacterium* ซึ่งมีอยู่เพียงชนิดเดียว คือ *harveyi* ต่อมาจึงได้เปลี่ยนไปเป็นสกุล Beneckea เพราะมีลักษณะแฟลกเจลลาที่เปลี่ยนแปลงไปมาได้ แต่ในที่สุดก็เปลี่ยนมาอยู่ในสกุล *Vibrio* เชื้อ *V . harveyi* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีการดำรงชีวิตทั้งแบบต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobic gram-negative rods) เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา เรืองแสงสีน้ำเงิน-เขียว (bioluminescence) ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นโดยอาศัยออกซิเจน โดยมีเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ (Prosser *et al.*, 1996)

$$FMNH_2 + RCHO + O_2 \xrightarrow{\text{bacteria luciferase}} FMN + RCOOH + H_2O + \text{light (590 nm)}$$

ลักษณะโคโลนีของ *V. harveyi* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะเรียบ โคโลนีกลม นูน มีสีขาวนวลมันวาว เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2-3 มิลลิเมตร โคโลนีมีการเรืองแสงถ้าอยู่ในที่มืด (Lavilla-Pitogo,1990) การเรืองแสงสีเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SWC agar ลักษณะโคโลนีกลมปืนมันเยิ้ม บนอาหาร TCBS agar เป็นแบคทีเรียเรืองแสง มีโคโลนีสีเขียว (Baticados *et al.*, 1991) สร้างเอนไซม์คะตาเลส ออกซิเดส อะไมเลส ไลเปส และเจลลาติเนส สร้างกรดจากการหมักกลูโคส มอลโตส และฟรุคโตส แต่ไม่สร้างกรดจากการหมักอราบิโนส และดูลซิโทล ไม่สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโต เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีในน้ำที่มีความเค็ม 30-60 ppt

การทดสอบความไวต่อยาพบว่า *V. harveyi* มีความไวต่อยาคลอแรมฟินิคอล กานามัยซิน เจนต้ามัยซิน อะมิกาซิน ซัลฟาฟูลาโซล และไตรเมทโธพริม-ซัลฟาเมธอกซาโซล ดื้อต่อแอมพิซิลิน เตตราไซคลีน สเตรปโตมัยซินและโพลีมัยซิน บี (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) Baumann *et.al.* (1984) พบว่า *V. harveyi* อยู่ในสกุล *Vibrio* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน การจำแนกและเทียบเคียงอาศัยลักษณะและการทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 2 แสดงรูปการเรืองแสงในที่มืดของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (luminescent bacteria) ที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Chanratchakool *et al.*, (1993)

ตารางที่ 2 ลักษณะและสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้จำแนกแบคทีเรีย *V. harveyi*

ลักษณะ	*V. harveyi*
Gram stain	Gram negative
Rods shape	+
Motility	+
Flagella	Polar (1) peritrichous
Swarming	-
Gas from D-glucose	-
Nitrate reduction	+
Oxidase	+
Catalase	+
Luminescence	+
Enzyme production	
- amylase	+
-chitinase	+
-gelatinase	+
-lipase	+
Arginine dihydrolase	-
Decarboxylase	
- ornithine decarboxylase	+
- lysine decarboxylase	+
Ferment to Acid	
-glucose	+
-maltose	+
-mannitol	+
-sucrose	+/-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลักษณะ	*V. harveyi*
-lactose	-
- arabinose	+
-galactose	+/-
-mannose	+
-salicin	+/-
-D-xylose	-
- fructose	+
Growth at 4 $^{\circ}$ C	-
Growth at 35 $^{\circ}$ C	+
Production of acetone and/or diacetyl	-

ที่มา : Baumann *et al.*, 1984

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ

1.3.2 **กลไกการก่อโรคของ** *V. harveyi*

V. harveyi สามารถเจาะพุ่มเหงือกของกุ้งเข้าไปอยู่ภายในเหงือก และในน้ำเลือดได้ เมื่ออยู่ในเหงือกทำให้เกิดโรค "โรคเหงือกสีชา" โดยพบว่า มีสีชาในตอนกลางวันและมีสีส้มในตอนกลางคืน จากการที่แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเรืองแสงได้ ความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* ถูกเสริมโดยไวรัส (bacteriophage) ซึ่งทำให้ host เซลล์คือ *V. harveyi* แตกและแพร่กระจายมากขึ้นทำให้กุ้งตายเนื่องจาก endotoxin ที่สร้างจากไซโตพลาสซึมของเซลล์ *V. harveyi* ถูกปล่อยออกมาผสมกับน้ำเลือด ยังมีข้อสังเกตอีกว่าแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดโรคเรืองแสงคล้ายเพชรเมื่อเกาะ (adhere) ติดอยู่ทั่วบริเวณเปลือกที่หุ้มลำตัว (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2541)

จากรายงานของ Jiravannichpaisal (1994) พบว่า *V. harveyi* เข้าทำลายโดยการบุกรุกและเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณในบริเวณท่อตับ และเซลล์ด้านในของท่อตับ ทำให้เกิดบาดแผลขนาดกว้าง เกิดการซ้อนกันของชั้นบาง ๆ ของเนื้อเยื่อเป็นชั้นหนาขึ้นเป็นการป้องกันการแพร่ของแบคทีเรียในเบื้องต้น เพราะแบคทีเรียถูกจำกัดอยู่ในท่อตับเนื่องจากมี collagenous fibers ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ และมีเซลล์ที่ภายในมีนิวเคลียสเป็นรูปเกลียวและถูกตรึงอยู่ใน collagenous fibers ท่อตับที่มีการติดเชื้อจะถูกเซลล์เม็ดเลือดโอบล้อมรอบ ๆ basal lamina ที่มีลักษณะหนา เนื้อเยื่อที่อยู่ในบริเวณท่อตับที่มีการติดเชื้อมีลักษณะบวมแอ่งเลือดขยายขนาดใหญ่ขึ้น หลังจากเซลล์เม็ดเลือดโอบล้อมท่อตับ ทำให้ท่อตับที่ติดเชื้อกลายเป็น granulomatous capsule นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียจำนวนมากที่บริเวณหัวใจและ spongy connective issue, haemal sinus และ sinus ของกระเพาะอาหาร ทางเดินอาหาร บริเวณที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์และบริเวณกล้ามเนื้อ โดยพบเซลล์เม็ดเลือดทำหน้าที่ในการจับกินแบคทีเรียเหล่านี้บริเวณอวัยวะที่มีการติดเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเคลื่อนย้ายไปบริเวณช่องเหงือกและเพิ่มจำนวนมากขึ้นที่บริเวณเปลือกชั้นนอกและบริเวณ spongy connective tissue ปลายหางก็พบการติดเชื้อนี้โดยพบการตายของเนื้อเยื่อเซลล์บุผิวที่บริเวณนี้ด้วย

Karumasagar *et al.* (1996) รายงานว่าเชื้อ *V. harveyi* สามารถสร้างแผ่นฟิลม์บางๆ ขึ้นคลุมตัวได้ เรียกทั่วๆ ไปว่า "Biofilm" ซึ่งสามารถป้องกันเชื้อนี้จากยาปฏิชีวนะ เช่น ออกซิเดตราซัยคลินหรือคลแรมฟีนิคอลถึง 50 ppm นอกจากนี้พบว่าเชื้อปกติที่ไม่มี Biofilm

จะถูกทำลายด้วยคลอรีนเข้มข้น 20 ppm ภายใน 5 นาที Biofilm ที่สร้างขึ้นในถังสแตนเลสถูกทำลายได้ด้วยคลอรีน 100 ppm แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ใน Biofilm ที่เกิดตามซีเมนต์หรือพื้นผิวพลาสติกได้ Gu *et al.* (1998) พบว่า แบคทีเรียที่สามารถสร้าง Biofilm เป็นเกราะป้องกันตัว ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Ochrobactrum anthropi*, *Alcaligens denitrificans*, *Xanthomonas maltophila* และ *V. harveyi*

Bassler *et al.* (1997) พบว่าสารที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์รวมถึงแบคทีเรียก่อโรค *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีผลเหนี่ยวนำโดยอัตโนมัติในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนเรืองแสงใน *V. harveyi*

Montero *et al.* (1999) ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารที่ *V. harveyi* ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellar product, ECPs) ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้ง *P. vannamei* ในระยะโพสต์ลาวา พบว่าสารชนิดนี้เป็น exotoxin ที่ทนความร้อนสูงและมีผลต่อการตายของกุ้งเมื่อกุ้งได้รับการติดเชื้อภายในกล้ามเนื้อ โดยมี Lethal dose 50% (LD_{50}) ของสารสกัดหยาบ ECPs อยู่ที่ 44 µg protein $prawn^{-1}$ ตรวจพบว่า ECPs มีแอคติวิตี้ของ Proteolytic, Haemolytic และ Cytotoxic เมื่อนำ ECPs ไปผ่านความร้อน 100°C นาน 10 นาที หรือย่อยด้วย Proteinase K ไม่สามารถทำให้สารสูญเสียสภาพธรรมชาติ และจากการทำ Westem blotting พบว่า ECPs เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ 70, 47, 34 และ 23 กิโลดาลตัน (kDa) ประเภทไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ทำให้ *V. harveyi* มีความรุนแรงก่อโรคทำให้กุ้งตายได้

Manefiel *et al.* (2000) ศึกษาการแสดงออกของการเรืองแสงในแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ พบว่ายีนนี้ถูกควบคุมโดย quorum sensing ภายในเซลล์ร่วมกับโมเลกุลส่งสัญญาณที่สำคัญ 2 ส่วน ในการสังเคราะห์และตรวจจับ โดยพบว่าตัวแรก คือ *N* - hydroxybutanoyl - L - homoserine lactone และอีกตัวยังไม่สามารถจำแนกได้ ความรุนแรงของเชื้อนี้เกิดจากการควบคุมร่วมกันของโปรตีนที่เป็นพิษที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์กับการเรืองแสงของ *V. harveyi* และได้มีการวิเคราะห์ผลของ acylated homoserine lactone ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยสาหร่ายทะเล (*Delisea pulchra*) พบว่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในระดับที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ สามารถยับยั้งการผลิตสารที่จะทำให้เกิดการ

เรืองแสง และสารพิษทั้งสองตัวนี้ได้ เมื่อนำสารที่ได้ไปทดลองกับหนูและกุ้ง ผลปรากฏว่าสารปฏิปักษ์มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* ที่ก่อโรคในกุ้งได้

1.4 การควบคุมโรคที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* spp.

1.4.1 การใช้จุลินทรีย์บำบัดน้ำ

คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งระบบปิด หรือระบบที่มีการถ่ายน้ำน้อยเป็นส่วนใหญ่มีการสะสมของอินทรียสารจำนวนมากในบ่อเลี้ยงซึ่งเกิดจากอาหารกุ้งที่เหลือ ซากแพลงค์ตอนที่ตายทับถมกัน และยังมีของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากตัวกุ้งเอง ทำให้เกิดพิษจากแอมโมเนียและไนไตรท์ ซึ่งสามารถทำให้ลูกกุ้งตายได้ จากการศึกษาของ Chin และ Chen (1987) รายงานว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะ postlarva ตาย 50% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 5.71 mg NH_3/ l และตาย 50% ที่ 96 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้น 1.26 mg NH_3/ l ส่วนความเข้มข้นไนไตรท์ ที่ทำให้ลูกกุ้งตาย 50% ในเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 204 mg/ l และตาย 50% ที่ 96 ชั่วโมงด้วยความเข้มข้น 45 mg/ml

โดยปกติในธรรมชาติก็มีจุลชีพต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ แต่ในสภาพบ่อเลี้ยงจริงนั้น อินทรียสารที่มีอยู่นับว่าสูงกว่าในธรรมชาติมาก ทำให้มีปัญหาตามมา เช่น เชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะสกุล *Vibrio* spp. เพิ่มจำนวนขึ้น ค่าแอมโมเนียและค่าไนไตรท์สูงขึ้น กุ้งอ่อนแอและเครียดจากสภาพน้ำทำให้มีโอกาสติดเชื้อ*Vibrio* spp. มากยิ่งขึ้นไปด้วย ดังนั้น นอกจากการบำบัดโดยการเอาของเสียออกจากบ่อโดยตรง เช่น การดูดเลน ถ่ายน้ำ การทำชีวบำบัดโดยการใช้แบคทีเรียก็ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมกับระบบการเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน โดยใช้จุลินทรีย์เข้ามาช่วยในการย่อยสลายที่สมบูรณ์ขึ้น และใช้ไนตริฟรายอิ้งแบคทีเรีย (nitriflying bacteria) ในการลดแอมโมเนีย เนื่องจาก แอมโมเนีย ไนไตร์ และไนเตรท มีความสัมพันธ์กันมาก โดยกระบวนการ Nitrification จุลินทรีย์จะเปลี่ยนรูปแอมโมเนียไปเป็น ไนไตร์ท และ ไนเตรตในที่สุด Purubcan (1991a) ได้รายงานถึง การใช้แบคทีเรียเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ และเพิ่มผลผลิตของกุ้งกุลาดำ โดยการเติมแบคทีเรียกลุ่มไนติฟรายอิ้ง ลงในน้ำเลี้ยงเพื่อลดปริมาณแอมโมเนีย และไนไตรท์ ผลปรากฏว่าการทดลองนี้เพิ่มจำนวนอัตรารอดของกุ้งและการนำ *Bacillus* spp. ใส่ลงในบ่อเพาะเลี้ยง ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้เครื่องอัดอากาศ โดย *Bacillus* spp ลดความต้องการใช้ออกซิเจนและเพิ่มผลผลิตกุ้ง

(Porubcan, 1991b) Moriarty (1998) กล่าวว่าอัตราการรอดของกุ้งเพิ่มขึ้นในบ่อเลี้ยงที่มีการใส่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งการบำบัดน้ำด้วยวิธีนี้ทำให้สัดส่วนของแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสง (luminous *Vibrio* spp.) ในตะกอนดินลดลงเป็นผลให้แบคทีเรียก่อโรคแพร่กระจายในน้ำน้อยลงด้วย อัตราการรอดของกุ้งที่เพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีผลต่อสุขภาพกุ้งโดยตรง และนอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุซึ่งเป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำอีกด้วย

วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ และคณะ (2541) ได้ศึกษา *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการบำบัดน้ำ โดยใช้สารประกอบไนโตรเจนที่เป็นของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย ที่ทำการทดลองในบ่อซิเมนต์ พบว่า แอมโมเนียรวมในบ่อที่ใส่ *B. subtilis* ลงไปในน้ำมีปริมาณน้อยกว่าอีกสองบ่อที่ไม่ใส่ *B. subtilis* อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณไนไตรท์และไนเตรต จะมีระดับต่ำสุดในบ่อที่ใส่ *B. subtilis*

1.4.2 **การเพิ่มความต้านทานในตัวกุ้งโดยใช้โปรไบโอติก** (Probiotic)

โปรไบโอติกเป็นการควบคุมโรคแบบชีววิธี ซึ่งมีความหมาย ดังนี้

Parker (1974) เป็นผู้เสนอในตอนแรกเริ่มว่าโปรไบโอติค คือ สิ่งมีชีวิตหรือสารเคมีที่ช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้

Fuller (1989) ให้คำจำกัดความโปรไบโอติคว่าเป็นอาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ (host) โดยการปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร

Tannok (1997) กล่าวว่า โปรไบโอติคคือ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่จัดการใส่เพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อจุดประสงค์ในการปรับปรุงสุขภาพให้ดีขึ้น

Gatesoupe (1999) โปรไบโอติคคือ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เพิ่มเข้าไปในอาหารแล้วทำให้สุขภาพของมนุษย์ทำให้สุขภาพของมนุษย์และสัตว์บนโลกดีขึ้น

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการใช้สารกลุ่มโปรไบโอติกเพื่อทดแทนการใช้ยาและสารเคมี ทำให้บริษัทเอกชนหลายบริษัทมีการส่งเสริมให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในเชิงการค้าหลายชนิด (Gatesoupe, 1999) (ตารางที่ 3) ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเหล่านี้ส่วนใหญ่มีส่วนผสมของ nitriflying bacteria และ *Bacillus* spp. ในประเทศไทยพบว่ามีงานวิจัยเกี่ยวกับ

ประสิทธิภาพของโปรไบโอติคที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งผลการวิจัยได้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จาก *Bacillus* ในแง่เป็นโปรไบโอติค (สนธิ แดงสกุล และลิลา เรืองแป้น, 2541) และมีการทดลองควบคุมและป้องกันโรคเรืองแสงจากเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธีชีวบำบัด จากการใช้ *Bacillus* S11 เป็นโปรไบโอติคผสมอาหารให้กุ้งกิน ผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดตายสูงถึง74 %ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กิน *Bacillus* S11 ตายหมด (Rengpipat *et al.*,1998) และการทดสอบการเพิ่มระบบภูมิต้านทานโรคเรืองแสงจากเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้ *Bacillus* S11 เป็นโปรไบโอติก โดยวัดค่า %phagocytosis และ phagocytic index (PI) ในเลือดกุ้ง และศึกษาความว่องไวของ Phenoloxidase และ antibacterial ผลการทดลองพบว่า ค่าเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้งได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติค และพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดตาย 54.3 %ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กิน *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดตาย 35.5 % (Rengpipat *et al.*, 2000)

1.4.3 การใช้วัคซีนเพื่อให้เป็นภูมิคุ้มกันโรค

Itami *et al.* (1989) ได้ทำการทดลองและวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันการเกิดโรค Vibriosis ในกุ้ง Kuruma (*P. japonicus*) ของญี่ปุ่น โดยใช้วัคซีนที่ทำจาก *Vibrio* sp. NU-1 วัคซีนที่ได้นำไปทดลองทั้งฉีด ทั้งกิน และแช่ ผลที่ได้พบว่า กุ้งที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีด หรือกินเข้าไปมีอัตราการรอดตายสูงกว่าพวกที่แช่วัคซีน หรือพวกที่ไม่ได้รับวัคซีน และจากรายงานของ Teunissen *et al.* (1998) ที่ศึกษาถึงการใช้วัคซีนซึ่งเป็น polyvalence vaccine prototype เพื่อกระตุ้นให้กุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาวามีความทนต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* พบว่าสามารถเพิ่มความต้านทานของกุ้งต่อเชื้อ *Vibrio* และแปรตรงตามอายุของกุ้ง ในประเทศไทย กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุญยรัตผลิน (2538) ได้ทำการทดลองใช้วัคซีนเชื้อ *Vibrio* sp. แก่กุ้งกุลาดำโดยวิธีแช่ พบว่าหลังจากแช่วัคซีนเป็นเวลา 10 วัน ค่าความว่องไวของเม็ดเลือดกุ้งในการจับกินสิ่งแปลกปลอมมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และกุ้งทดลองที่ใช้วัคซีนแบบแช่ไม่มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง นอกจากนี้ สาวิตรี ศิลาเกษ (2541) ได้ทำการทดลองวิจัยเกี่ยวกับการผลิตวัคซีนจากเชื้อ *V. harveyi* โดยนำวัคซีนที่ผลิตได้มาให้แก่กุ้งกุลาดำ 3 วิธี คือ กิน แช่ และฉีด พบว่าการให้วัคซีนด้วยวิธีการให้

ฉีดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ดีที่สุด ส่วนวิธีการให้กินและวิธีการแช่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3 ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติคที่มีจำหน่ายโดยบริษัทเอกชน

ชื่อผลิตภัณฑ์	**บริษัทที่ผลิต/ประเทศ**
Bacteria	Aquatic Warehouse, San Diago, CA
Biostar	Advanced Microbial System, Shakopee, MN
BRF-1A, BRF-13A, PB-32, PBL-44	Enviro-Reps International, Camarillo, CA
Liqualife	Cargill, Animal Nutrition Division
Microbial and emzyme Product	Alliance Bioremediation and Composting, Emcinitas,CA
PondPro-VC	Biomanagement Systems,Wellington Point, Australia
Probiotics	Contessa, ZB Industries, San Pedro, CA

ที่มา : Gatesoupe, 1999

1.5 แบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งและการใช้แบคทีเรียโดยเกษตรกร

ศุภชัย ประพัสศร (2538) ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในเขตจังหวัดจันทบุรี โดยเก็บตัวอย่างดินในช่วงก่อนปล่อยกุ้ง และหลังปล่อยกุ้ง 1, 2, 3 และ 4 เดือน จนถึงระยะหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต ปรากฏว่าแบคทีเรียรวมที่ตรวจพบในตัวอย่างดินมีปริมาณ $8.2x10^7$, $1.3 x10^8$, $2.3x10^8$, $1.6x10^9$, $1.2x10^9$ และ $2.7x10^7$ CFU/g ตามลำดับ ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp.ในตัวอย่างดินในช่วงก่อนปล่อยกุ้ง และหลังปล่อยกุ้ง 1, 2, 3 และ 4 เดือนจนถึงระยะหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตมีปริมาณ $3.3x10^2$, $4.1x10^3$, $2.9x10^4$,$3.6x10^4$, $6x10^4$ และ $2.3x10^5$ CFU/g ตามลำดับ *Vibrio* spp. ทั้งหมด 135 สายพันธุ์ถูกจำแนกออกได้ 8 ชนิด ได้แก่ *V. harveyi* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvalis* type I, *V. anguillarum*, และ *V. cholerae* ตามลำดับ แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ที่ตรวจพบในดิน ได้แก่ *Bacilllus* spp., *Escherichaia coli, Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp.

Sung *et al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการระบาดของโรคกุ้งกับ ชนิดของ *Vibio* spp. ในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะตัวอ่อนที่มีอายุ 1 เดือนในบ่อเดียวกัน และเมื่อได้กุ้งระยะโพสท์ลาวาที่ 43 วัน จึงแยกเลี้ยงเป็น 3 บ่อหลังจากเลี้ยงไป 73 และ 89 วัน พบว่ามี *V. Cholerae*, *V. furnissii* และ *Aeromonas spp.* เป็นจำนวนมากตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงไป 95 วัน มีเชื้อหลักเป็น *Aeromonas spp.* และ *V. furnissii* ต่อมานำเชื้อทั้งสองชนิดมา 38 สายพันธุ์ มาทำการจำแนกใหม่ด้วยวิธี Biolog GN พบว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* และ *V. carchariae*

Tendencia *et al.* (2001) ทำการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่เคยใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อนกับบ่อเดิมที่เคยใช้ยาปฏิชีวนะมาแล้ว และบ่อที่กำลังเลี้ยงโดยมีการใช้ยาปฏิชีวนะ oxolinic acid โดยแยกแบคทีเรียมาจากน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้ง ตะกอนดิน และน้ำกับตะกอนดินจากน้ำทิ้ง พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็น *Vibrio* spp.ซึ่ง *V. harveyi* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ผลที่ได้เกี่ยวกับการดื้อยาปฏิชีวนะพบว่าแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายชนิด(Multiple antibiotic resistance,MAR) พบมากที่สุดในบ่อที่กำลังเลี้ยงโดยมีการใช้ยาปฏิชีวนะ oxolinic acid (24%ของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อนี้)

Central Library
Prince of Songkla University

ตามมาด้วยบ่อที่เคยใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อน (19%) และ พบน้อยที่สุดในบ่อที่ไม่เคยใช้ยาปฏิชีวนะมาก่อน (17%)

ในประเทศไทยปัจจุบันมีสินค้าจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียมากมายในท้องตลาด รูปแบบการใช้งานก็มีหลากหลาย มีทั้งใช้บำบัดน้ำ บำบัดก้นบ่อ และผสมให้กุ้งกิน ตัวสินค้าอาจเป็นแบบผง แบบเม็ด แบบที่ต้องนำไปหมักก่อน หรือชนิดที่สามารถนำไปใช้สาดได้ทันที เป็นต้น ในส่วนราคาสินค้าก็แตกต่างกันออกไป ราคาในท้องตลาดเริ่มตั้งแต่ไม่กี่ร้อยบาท จนถึงหลายพันบาทต่อกิโลกรัม โดยเกษตรกรไม่สามารถทำการตรวจสอบคุณภาพสินค้าได้ด้วยตนเองเนื่องจากไม่มีความรู้ทางหลักวิชาการ จึงจำเป็นต้องอาศัยห้องปฏิบัติการและทีมวิชาการเกษตร เพื่อความรวดเร็วเกษตรกรส่วนใหญ่จึงมักอาศัยฉลากจากผู้ผลิต คำแนะนำจากร้านค้า ราคาและประสบการณ์เป็นตัวกำหนดเพื่อเลือกซื้อสินค้า และจากการทดลองของฝ่ายวิชาการเครือเจริญโภคภัณฑ์ พบว่าจุลินทรีย์ที่มีขายในท้องตลาด มีทั้งที่ใช้ได้ผล และไม่มีประโยชน์กับเกษตรกรใดๆ ทั้งสิ้น โดยส่วนใหญ่มักสร้างความสับสน และอ้างสรรพคุณเกินความเป็นจริง (นิรนาม, 2543)

1.6 *Bacillus subtilis*

1.6.1 **บทบาทของ *B. subtilis* ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง**

B. subtilis เป็นแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนรูปแอมโมเนียทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงในระดับที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำได้ ดังนั้นปัจจุบันมีผู้นิยมนำ *B. subtilis* มาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยของ วิจิตรา จุติดำรงพันธ์ และคณะ (2541) พบว่า *B. subtilis* บางสายพันธุ์มีศักยภาพในด้านการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง (*V. harveyi*) ได้ โดยเป้าหมายที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* เช่น สารปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* ผลิตออกมา กลไกการยับยั้งของ *B. subtilis* ที่มีต่อ *V. harveyi*, เอนไซม์ที่ *B. subtilis* ผลิตปล่อยออกมา และ การแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย

1.6.2 **ลักษณะโดยทั่วไปของ *B. subtilis***

เดิมชื่อ *Vibiro subtilis* ต่อมาในปี 1972 Ferdinand Cohn ได้เปลี่ยนชื่อจีนัสนี้เป็น *B. subtilis* (Harwood,1989) โดยมีลักษณะดังนี้ คือเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา เจริญได้ดีทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถสร้างแคปซูลได้ ทำให้สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เจริญได้ในอาหารหลายชนิด แม้แต่ในอาหารที่มีสารอาหารเพียงเล็กน้อย (Baron, 1990) เจริญได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสม

และพีเอชเป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด รวมทั้งจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแก่คนและสัตว์ (Bore and Diderichson,1991) โคโลนีมีรูปร่างกลม หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวด้านหน้าทึบแสง บางครั้งมีรอยย่น มีสีครีมจนถึงสีน้ำตาล เจริญได้อย่างรวดเร็วเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีความชื้นสูง ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวมีสีคล้ำขึ้น มีฝ้าที่มีลักษณะย่นติดต่อกัน (Buchanan *et al.*,1974) การจัดหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ของ *B. subtilis* ใน Bergey ' s manual of systematic bacteriology โดย Staley และคณะ (Staley *et al.*,1989) มีดังนี้

Kingdom	Procaryote
Division	the Bacteria
Order	Cytophagaceae
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*

การจำแนกและบ่งชี้อาศัยลักษณะและการทดสอบทางชีวเคมี ตามตารางที่ 4

1.6.3 สารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่ผลิตจาก *B. subtilis*

แบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี ได้แก่แบคทีเรียใน Family Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteraceae, Vibriobacteraceae, Streptococcaceae และ Myxococcaceae เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด สารปฏิชีวนะประมาณครึ่งหนึ่งที่ผลิตโดยแบคทีเรียได้มาจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* (Berdy,1974) นอกจากนี้ Katz และ Demain (1977) รายงานว่า *Bacillus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งหมด 167 ชนิด และเป็นสารปฏิชีวนะเปปไทด์ (peptide) ที่ผลิตจาก *B. subtilis* 66 ชนิด (ตารางที่ 5) เช่น Mycobacillin, Subtilin, Bacilycin, Bacillomycin, Fungistatin, Bacillin, Subsporin, Bacillocin, Mycosubtilin, Fungocin, Iturin, Neocidin และ Eumycin เป็นต้น โดยส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *B. subtilis* มักถูกสร้างในระยะ statinary phase (Nakano *et al.*,1988) เพราะเป็นช่วงที่เซลล์ของ *B. subtilis* เริ่มเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์และเซลล์อยู่ในสภาวะที่เริ่มขาดแคลนอาหารที่ใช้ในการดำรงชีวิต แต่ก็มีสารปฏิชีวนะบางชนิดที่เริ่มสร้างในระยะ exponential phase เป็นต้นไป เช่น Surfactin (Cooper *et al.*, 1981)

ตารางที่ 4 ลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย *B. subtilis*

คุณสมบัติที่ทดสอบ	สายพันธุ์ *B. subtilis*			
	NB22	UB24	YB8	SB4
Gram stain	+	+	+	+
Spore	+	+	+	+
Spore shape	Elliptical or cylindrical			
Spore position	central	central	central	central
Maximum growth temperature (C)	50	50	55	55
Sporangium distended distinctly	–	–	–	–
Catalase และ Oxidase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	–	–	–	–
Anaerobic growth on glucose agar	+	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+
Acid from				
D-glucose, L-arabinose	+	+	+	+
D-xylose, D-mannitol	+	+	+	+
D-fructose, inositol	+	+	+	+
Casein และ Gelatin decomposition	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
NO_3^- to $NO_2^=$	+	+	+	+
Utilization of Citrate	+	+	+	+
pH in VP broth	8	7.7	6.3	7.7

ที่มา : Phae, 1990

ตารางที่ 5 สารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *B. subtilis*

Name	Producer	General properties					Remark
		G^+	G^-	MY	AF	AT	
AL-Antibiotic	*B. subtilis*	+			+		
Alboleutin	*B. subtilis* AF8				+		
Bacillomycins	*B. subtilis*				+		
Bacillocin	*B. subtilis*				+		
Bacilysin	*B. subtilis*	+					
Bacitracin	*B. subtilis*	+					Tropical antibiotic
	B. licheniformis						feed additive, chemical regent target ; metal-ion binding, proteinase – inhibitor, cell wall - formation
Botrycidin	*B. subtilis* RRLB 12231				+		
Botryticidin	*B. subtilis* AS 1361				+		
Fluvomycin	*B. subtilis*	+	+		+		
Fungistatin	*B. subtilis*			+	+		
Fumgocin	*B. subtilis*				+		
Iturins	*B. subtilis ituriensiens*	+	+		+		Dermatomycese Treatment
Mccobacilin	*B. subtilis* V3				+		
Mycosubtilin	*B. subtilis*				+		
	B. subtilis niger						

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Name	Producer	General properties					Remark
		G^+	G^-	MY	AF	AT	
Pocilin	*B. subtilis*				+		
Subsporin	*B. subtilis*				+		
Subtilin	*B. subtilis* ATCC 6633	+					feed preservative
Surfactin	*B. subtilis* ATCC 21332			+			cAMP diesterase – inhibitor, clotting – inhibitor in the thronbin-fibrinogen reaction

ที่มา : Katz และ Demain (1977) ; Shoji (1978) ; Kleinkauf และ Dohren (1985, 1986)

หมายเหตุ G^+ = anti-gram positive. G^- = anti-gram negative

MY = antimycobacterial AF = antifungal, AT = antitumor

1.6.4 คุณสมบัติของสารปฏิชีวนะเปปไทด์

จากการศึกษาของ Katz และ Demaim (1977) ได้รวบรวมคุณสมบัติของสารปฏิชีวะเปปไทด์ ไว้ดังนี้

1. สารปฏิชีวนะเปปไทด์โดยทั่วไปมักมีขนาดเล็กกว่าโปรตีน และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 270-4500 ดาลตัน

2. สารปฏิชีวนะเปปไทด์โดยทั่วไปที่ผลิตจากจุลินทรีย์ประกอบด้วยสารที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันมากกว่าเป็นสารเดี่ยว โดยที่โครงสร้างของสารปฏิชีวนะอาจมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1, 2, 3 ตัวหรือทั้งหมด เช่น Linear gramicidins (A, B และ C) และ Cyclic tyrocidines (A, B และ C) จาก *B. brevis* ในขณะเดียวกัน Linear gramicidims (pentadecapeptides) และ Tyrocidines (decapeptides) มีส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดภายในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันตรงหมู่ที่มาแทนที่ aromatic amino acid ของแต่ละโมเลกุล

3. สารปฏิชีวนะเปปไทด์ส่วนใหญ่ที่ผลิตจาก *Bacillus* ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมดแต่บางชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโนร่วมกับส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น Edeine A ประกอบด้วย spermidine เป็นหลักร่วมกับกรดอะมิโนอีก 5 ตัว ส่วน Polymyxin ประกอบด้วย 6-methylactanoic acid หรือ methylheptanoic acid ซึ่งเป็นสารพวกกรดไขมัน (fatty acid) ร่วมกับกรดอะมิโน

4. กรดอะมิโนที่ประกอบเป็นสารปฏิชีวนะเปปไทด์บางชนิด เป็นกรดอะมิโนที่ไม่เคยปรากฏเป็นโครงสร้างของโปรตีน ได้แก่ กรดอะมิโนที่เป็น D-amino acid หรือ basic amino acid เช่น ornithine diaminobutyric β-amino acid dehydroamino acid และ sulfur-contianing amino acid ซึ่งแตกต่างจากสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อรา และ *Actinimycetes* เนื่องจากสารปฏิชีวนะเปปไทด์จาก *Bacillus* ไม่มี N-methylamino acid

5. สารปฏิชีวนะเปปไทด์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวง (cyclic) แต่ก็มีบ้างที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง เช่น Edinine, Linear gramicidines นอกจากนี้พบว่าลักษณะโครงสร้างเป็นวงมีทั้งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และอาจเกิดจากการจัดเรียงตัวกันใหม่ของกรดอะมิโน เช่น Bacitracin จะมี thiazoline ring ที่เกิดจากการรวมตัวของ cysteine และ

isoleucine โดย thaizoline ring นี้เป็น cyclic hexapeptide ที่มีพันธะระหว่าง β-carbonyl group ของ aspartic acid กับ δ-amino group ของ lycine

6. สารปฏิชีวนะเปปไทด์โดยทั่วไปทนต่อปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์เปปติเดส (peptidase) และ โปรติเอส (protease) จากพืชและสัตว์ แต่ก็มีบางชนิดง่ายต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์อื่น เช่น Polymyxin B ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ ficin และ papain ส่วน Edeine A และ B ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ carboxypeptidase นอกจากนี้ Bacilysin ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ subtilopeptidase A

1.6.5 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะเปปไทด์

Shoji (1978) แบ่งลักษณะของสารปฏิชีวนะเปปไทด์ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. พวกที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นเส้น (linear peptide) ได้แก่ Bacilysin, Linear gramicidins, Edeines, Cererins (A, B, C และ D) และสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tridecaptin เช่น Tridecaptin A

2. พวกที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวง (cyclic peptide) ได้แก่ Gramicidin S, Tyrocidins, Bacitracin, Mycosubtilin, Bacillmycin L, Polymyxins เช่น Polymyxins S1, Polymysin F, Colistin และ Cerculin และกลุ่ม Octapeptin เช่น EM-49, Bu-1880, TM-473, Y-8495 และ AB-1

3. พวก peptide lactone ได้แก่ Esperin, Surfactin, Brevistin, TL-119

โดยในรูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของสารปฏิชีวนะเปปไทด์บางตัวอย่าง

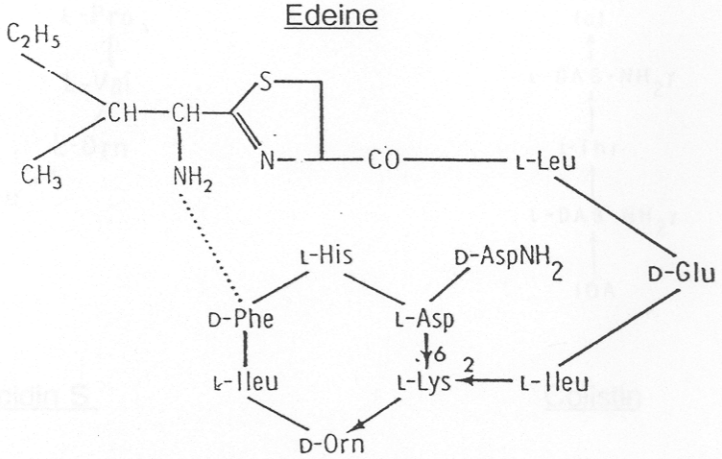
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.(Katz and Demain., 1977)

Compd.	Positions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
I	**Valine-gramicidin A:** HCO-L-Val-Gly- L -Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val- L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-$NHCH_2CH_2OH$
II	**Isoleucine-gramicidin A:** HCO-L-Ileu-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-$NHCH_2CH_2OH$
III	**Valine-gramicidin B:** HCO-L-Val-Gly- L-Ala- D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Phe-D-Leu- L -Trp- D-Leu-L-Trp-$NHCH_2CH_2OH$
IV	**Isoleucine-gramicidin B:** HCO-L-Ileu-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val- L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Phe-D-Leu-L -Trp- D-Leu-L-Trp-$NHCH_2CH_2OH$
V	**Valine-gramicidin C:** HCO-L-Val-Gly- L -Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Tyr-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-$NHCH_2CH_2OH$
VI	**Isoleucine-gramicidin C:** HCO-L-Ileu-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Tyr-D-Leu-L -Trp- D-Leu-L-Trp-$NHCH_2CH_2OH$

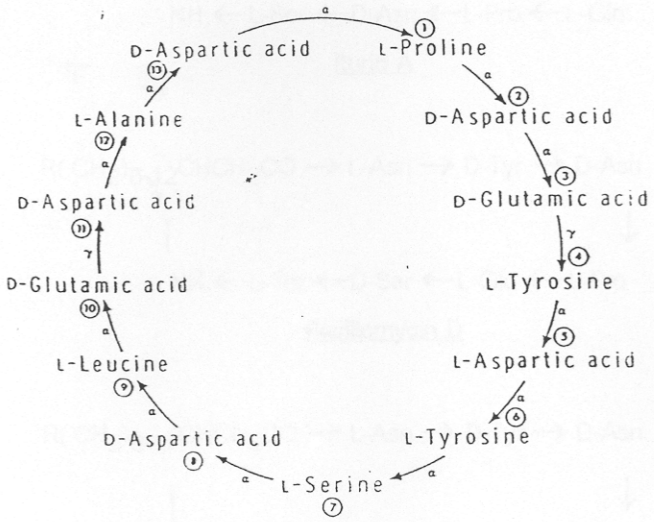
Gramicidins A, B and C

β-TYR—β-SER—DAPA—DAHAA—GLY—(GUANYL) SPERMIDINE

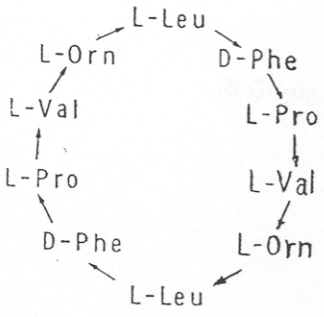
Edeine



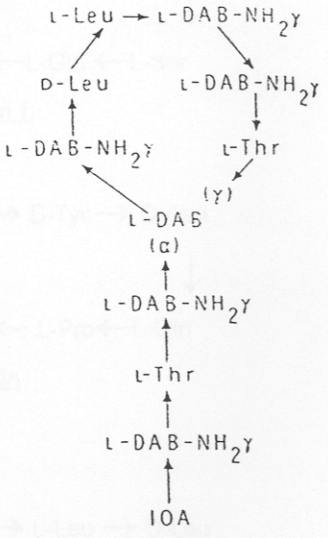
Bacitracin A



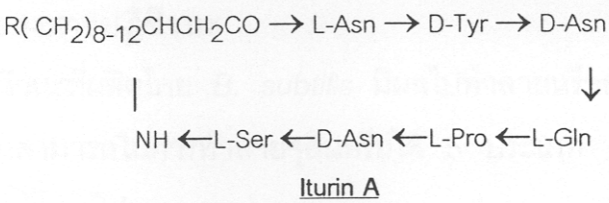
Mycobacillin



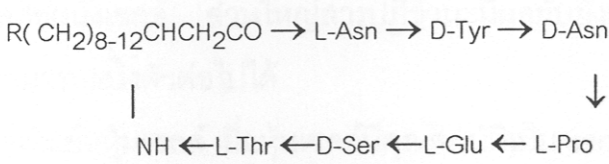
Gramicidin S



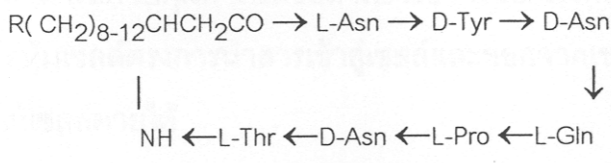
Colistin



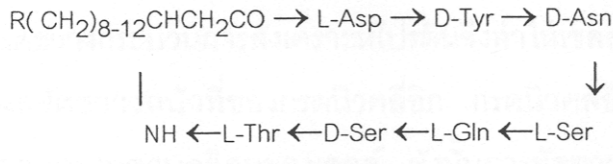
Iturin A



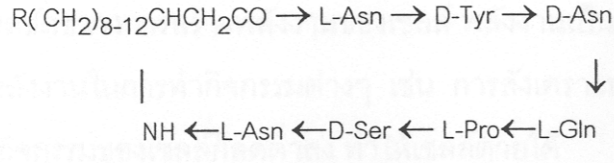
Bacillomycin D



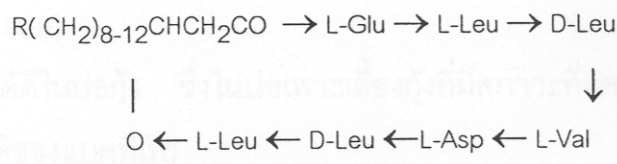
Bacillomycin F



Bacillomycin L



Mycosubtilin



Surfactin

1.6.6 **กลไกยับยั้งของสารปฏิชีวนะ**

สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *B. subtilis* มีผลไปทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ซึ่งแบ่งออกได้ตามความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้ 5 ประเภท (สมใจ เอี่ยมพรรัตน์, 2531)

1. มีผลต่อผนังเซลล์ ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้

2. มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็น semipermeable membrane โดยสารส่วนใหญ่เมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์แบบ active transport จำเป็นต้องใช้พลังงานและเยื่อหุ้มเซลล์สามารถควบคุมการปล่อยสารบางอย่างออกนอกเซลล์ด้วย สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเยื้อหุ้มเซลล์ตรงการนำสารเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ได้ผิดปกติ ซึ่งถ้าเป็นอย่างนี้นานก็ทำให้เซลล์ตายได้

3. มีผลขัดขวางกระบวนการสร้างโปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิตเป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับการซ่อมและการสร้างเสริมเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการเจริญ ดังนั้นการยับยั้งหรือขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจึงทำให้เซลล์ตายได้

4. มีผลขัดขวางหน้าที่ของกรดนิวคลีอิก กรดนิวคลีอิกเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิสมของเซลล์ ดังนั้นการขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลีอิกจึงทำให้เมแทโบลิซึมของเซลล์ผิดปกติไปด้วย

5. มีผลขัดขวางการสร้างพลังงานของเซลล์ พลังงานเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เพราะต้องใช้พลังงานในการทำกิจกรรมต่างๆ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน ถ้าการสร้างพลังงานถูกขัดขวางกิจกรรมของเซลล์ก็ลดต่ำลง ทำให้เซลล์ตายได้

1.7 **คุณสมบัติเบื้องต้นของ *B. subtilis* ที่นำมาพิจารณาเพื่อใช้กับการเพาะเลี้ยงกุ้ง** (Gatesoup., 1999)

1. ควรเจริญได้ดีในบ่อกุ้ง ซึ่งในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีสภาวะที่แตกต่างจากสภาวะการเจริญเติบโตโดยปกติของแบคทีเรีย

2. ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคในกุ้ง (friendly bacteria) และไม่อันตรายต่อสิ่งแวดล้อมทั้งแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ และ คน สัตว์ เป็นต้น

3. มีกิจกรรม (activity) สูง มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี และสามารถรักษาระบบบัฟเฟอร์ในน้ำได้ดี

4. เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคเรืองแสง (*V. harveyi*)

5. เพิ่มภูมิต้านทานต่อโรคให้กับกุ้ง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ดินในนาข้าวเก่า จังหวัดพัทลุง ของโครงการวิจัย "การพัฒนา Antagonist *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุมโรคข้าว." และ *B. subtilis* แยกจากดินของโครงการวิจัย "การขยายผลการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* สำหรับควบคุมโรคไม้ผล" ซึ่งสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย เพื่อให้ได้มาซึ่ง *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรค (*V. harveyi*) ในกุ้ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง (*V. harveyi*) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ
2. คัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*
3. สกัดสารออกฤทธิ์และทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อ *V. harveyi*
4. ตรวจหาความเข้มข้นสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*