ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพต่อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง (*Vibrio harveyi*)

ผู้เขียน นางสาวสุนิชา รัตนคช

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

Bacillus subtilis จำนวน 27 สายพันธุ์ ได้ถูกคัดเลือกเพื่อใช้สำหรับศึกษาศักยภาพด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสง (*V. harveyi* สายพันธุ์ 046) ซึ่งมีความรุนแรงของเชื้อต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยมีค่า LD_{50} เป็น 2.12×10^8 CFU/ml *B. subtilis* 5 สายพันธุ์ (ABS-D10, ABS-D18, ABS-D19, ABS-D24 และ ABS-D28) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* 046 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่เติม 1.5%NaCl ได้ดีที่สุด อัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดศึกษาโดยใช้สภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งในเรื่อง pH ความเค็ม และอุณหภูมิ *V. harveyi* 046 เจริญได้ดีที่ pH 7.0-8.0 อุณหภูมิ 30°C ขณะที่ *B. subtilis* ABS-D10 เจริญได้ดีที่ pH 7.0-8.0 ความเค็ม 5-50 ppt อุณหภูมิ 37°C การออกฤทธิ์ของ *B. subtilis* ต่อการเจริญของ *V. harveyi* นั้นศึกษาโดยทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ของ *B. subtilis* ที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง ใส่หลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติม 1.5%NaCl ที่เกลี่ยเชื้อ *V. harveyi* เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง น้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนี *V. harveyi* รอบๆ ขอบหลุมและเห็นได้ชัดเจนขึ้น เมื่อใช้สารออกฤทธิ์จาก *B. subtilis* ที่เข้มข้นขึ้น 10 เท่า *B. subtilis* ABS-D10 เป็นสายพันธุ์ที่แสดงการยับยั้งได้ดีที่สุด การศึกษาแหล่งของสารออกฤทธิ์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ABS-D10 เปรียบเทียบระหว่างที่ได้จากในเซลล์และนอกเซลล์ โดยกรองแยกตัวเซลล์ทิ้ง สารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* ได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นสารออกฤทธิ์ของ *B. subtilis* ABS-D10 มีการผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์สู่อาหารที่เพาะเลี้ยง ธรรมชาติ

และความเสถียรของสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ศึกษาได้จากการทนต่อความร้อนระดับอุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 5 นาที พบว่า สารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 เสียประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติม 1.5%NaCl เขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 3 วัน แล้วตกตะกอนด้วย HCl pH 2.0 และสกัดด้วย 80%แอทธานอล พบว่า มีค่า MIC อยู่ที่ค่าความเข้มข้น 0.25 mg/ml และค่า MBC อยู่ที่ค่าความเข้มข้น 0.5 mg/ml ซึ่งสามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้มากที่สุดที่ 1×10^4 CFU/ml ปฏิกิริยาการยับยั้งระหว่าง *B. subtilis* ABS-D10 กับ *V. harveyi* 046 ที่ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ABS-D10 ช่วง $1 \times 10^1 - 1 \times 10^5$ CFU/ml พบว่า *B. subtilis* ABS-D10 ปริมาณ 1×10^4CFU/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ที่ 1×10^3 CFU/ml ได้

Thesis Title	Effect of the Potential Strain of *Bacillus subtilis* on Shrimp Pathogenic Bacteria (*Vibrio harveyi*)
Author	Miss Sunicha Rattanakhot
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2002

Abstract

Twenty-seven strains of *Bacillus subtilis* (BS) were screened for their potential effects on a pathogenic luminous *Vibrio* (*V. harveyi*). The *V. harveyi* 046 strain was chosen in this study with regard to it's virulence to the black tiger prawns (*Penaeus monodon*) with LD_{50} $2.12x10^8$ CFU/ml. *B. subtilis* ABS-D10, D18, D19, D24 and D28 showed and inhibition on growth of *V. harveyi* (Vh) on tryptic soy broth supplemented with 1.5% NaCl plate. Growth conditions of both *V. harveyi* and *B. subtilis* were studied in term of pH, salinity and temperature corresponding to prawn farming condition. They grew successfully in the medium containing NaCl 5-50 ppt., pH 7.0-8.0 at 37°C. Bioactive substances secreted from BS had an inhibitory effect on the *Vibrio* growth. The inhibition zones were clearly when the 10X concentrated BS culture filtrate was applied. The BS-D10 was determined to be the most effective strain. To identify nature and stability of the products in term of antibiotic substances and/ or enzymes, the products were unstable when autoclaved at 121°C under pressure 15 lb/sq inches for 5 minutes. However, acid precipitate of culture filtrate from BS following with 80% ethanol extraction was active against Vh. Both MIC and MBC of the crude extract against Vh culture of 10^4 CFU/ml was 250 ppm and 500ppm, respectively. The amount of *Vibrio* number of 10^3 CFU/ml was inhibited by BS with 10^4-10^5 CFU/ml in the mixed cultures after 24 hour incubating.