

ชื่อวิทยานิพนธ์	แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ( <i>Penaeus monodon</i> )
ชื่อผู้เขียน	นางสาวมณฑกานต์ ทองสม
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2546

### บทคัดย่อ

ทำการศึกษาแบคทีเรียแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติ 20 ตัวและกุ้งเป็นโรค 5 ตัว พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่พบในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติอยู่ระหว่าง  $<20 - 1.2 \times 10^5$  CFU/g และปริมาณของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่พบในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นโรคอยู่ระหว่าง  $1.4 \times 10^2 - 1.5 \times 10^5$  CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่พบในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งกุลาดำเป็นโรคพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยพบว่าในกุ้งทั้งสองกลุ่มมีแบคทีเรียแลกติกมากที่สุดในส่วนของลำไส้ตอนต้น  $1.3 \times 10^4$  CFU/g และ  $3.7 \times 10^4$  CFU/g ตามลำดับ และต่ำสุดในส่วนของตับ  $5.2 \times 10^2$  CFU/g และ  $6.3 \times 10^2$  CFU/g ตามลำดับ ได้สุ่มคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 140 สายพันธุ์ จากกุ้งกุลาดำปกติและ 10 สายพันธุ์จากกุ้งกุลาดำเป็นโรคผลการเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกจากกุ้งกุลาดำปกติพบว่าประกอบด้วย *Lactobacillus salivarius* 18 สายพันธุ์, *Lactobacillus farciminis* 3 สายพันธุ์, *Enterococcus faecalis* 66 สายพันธุ์, *Enterococcus faecium* 38 สายพันธุ์, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 สายพันธุ์, *Leuconostoc mesenteroid* 1 สายพันธุ์, *Leuconostoc lactis* 3 สายพันธุ์, *Leuconostoc dextranicum* 2 สายพันธุ์, *Pediococcus halophilus* 4 สายพันธุ์, *Pediococcus pentosaceus* 2 สายพันธุ์ และ *Streptococcus duran* 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำเป็นโรคจะพบแต่ *E. faecium* 10 สายพันธุ์ ซึ่ง *E. faecium* สามารถพบได้ทั้งในกุ้งปกติและกุ้งเป็นโรค โดยจะพบ *E. faecium* 10 สายพันธุ์ จากกุ้งเป็นโรค 3 ตัว 38 สายพันธุ์ จากกุ้งปกติ 9

ตัว อย่างไรก็ตามจะพบ *E. faecalis* ได้สูง 66 สายพันธุ์ในกุ้งกุลาดำปกติ 11 ตัว นอกจากนี้พบ *L. salivarius* 18 สายพันธุ์ จากกุ้งปกติ 5 ตัว ทำการทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ต่อกุ้งกุลาดำได้แก่ การทนต่อกรดที่ระดับ pH 1-5 การย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง การเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จำนวน 21 สายพันธุ์ ซึ่งรวมทั้ง *Vibrio harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งกุลาดำสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกได้ 9 สายพันธุ์ คือ *L. dextranicum* AM20, *E. faecalis* AM35, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *L. salivarius* AM101, *E. faecalis* AM107, *L. salivarius* AM111, *L. farciminis* AM115 และ *E. faecium* AM119 จากการศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 9 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 35°C และให้ผลการยับยั้งสูงสุดใน ชั่วโมงที่ 36 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 9 สายพันธุ์ ยังคงสามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้แม้เลี้ยงในสภาวะที่จำกัดปริมาณน้ำตาลและอากาศเพียงอย่างเดียวหรือทั้งสองอย่างเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 9 สายพันธุ์มาผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการเจริญและมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรียแลคติกแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จากการตรวจนับปริมาณของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มพบว่าปริมาณของแบคทีเรียแลคติกในกุ้งที่ได้รับแบคทีเรียแลคติกมากกว่ากลุ่มควบคุมแต่อย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ขณะที่พบ *Vibrio* sp. ในปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) เมื่อนำกุ้งกุลาดำที่รอดตายมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* บันทึกผล 7 วัน หลังจากติดเชื้อพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ทั้งนี้กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35, *E. faecium* AM107, *L. salivarius* AM111 และ

*L. farciminis* AM115 มีอัตราการรอดตาย 100% ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติก ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียง 50%

Thesis Title            Lactic Acid Bacteria in Digestive Tract of Black Tiger Prawn  
                                  (*Penaeus monodon*)  
Author                    Miss Montakarn Thongsom  
Major Program        Microbiology  
Academic Year        2003

### Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) isolated from digestive tracts of 20 healthy and 5 infected black tiger prawns were studied. The total counts of LAB were found in the range of  $<20 - 1.2 \times 10^5$  CFU/g and  $1.4 \times 10^2 - 1.5 \times 10^5$  CFU/g in healthy and infected prawns, respectively. These data were shown no significantly different when they were compared by two way ANOVA ( $P < 0.05$ ). However, There were also no significantly different when the total counts of LAB located in each part of digestive tracts were compared between both prawns ( $P < 0.05$ ), though in both prawns the highest number of LAB were found in midgut  $1.3 \times 10^4$  CFU/g and  $3.7 \times 10^4$  CFU/g in healthy and weak prawns respectively while the lowest number of LAB were found in hepatopancreas  $5.2 \times 10^2$  CFU/g and  $6.3 \times 10^2$  CFU/g. 140 isolates of LAB from healthy prawns and 10 isolates from weak prawns were randomly isolated and identified as *Lactobacillus salivarius* 18 strains, *Lactobacillus farciminis* 3 strains, *Enterococcus faecalis* 66 strains, *Enterococcus faecium* 38 strains, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 strain, *Leuconostoc mesenteroid* 1 strain, *Leuconostoc lactis* 3 strains, *Leuconostoc dextranicum* 2 strains, *Pediococcus halophilus* 4 strains, *Pediococcus pentosaceus* 2 strains and *Streptococcus duran* 2 strains. The results showed that *E. faecium* was the most frequently found in both prawns, 10 isolates from 3 infected prawns and 38 isolates from 9 healthy prawns. Whereas, *E. faecalis* was the highest number found in this study, were isolated from 11 healthy prawns. *L. salivarius* was also promising as 18 isolates

were found from 5 healthy prawns. While the rest of LABs were occasionally found in healthy prawns. All 150 isolates of LAB were subjects for prawn probiotic selective tests; acidity tolerance (pH 1-5), utilization of protein, fat and starch, growth under both aerobic and anaerobic condition, inhibition of 21 indicator strains of bacteria including *Vibrio harveyi* and *V. parahaemolyticus*, pathogenic bacteria of black tiger prawn. Nine isolates of LAB; *L. dextranicum* AM20, *E. faecalis* AM35, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *L. salivarius* AM101, *E. faecalis* AM107, *L. salivarius* AM111, *L. farciminis* AM115 and *E. faecium* AM119 were selected and they were subjects for further investigation in this studies. The maximum growth and inhibition activity against *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* of nine isolates were at pH 6.0 and 35°C, though the maximum inhibition activity was found when they were cultivated for 36 hours. Nine isolates still gave inhibition activity against *V. harveyi* even when they were grown under limited conditions of either sugar or air. More over, each of them was added to commercial feed for black tiger prawn rearing, after 30 days black tiger prawns were observed and weighed black tiger prawn that feed with LAB had higher growth and survival rate than control group which was not fed with LAB but with no significant differently ( $P<0.05$ ). Total counts of LAB found in digestive tract of black tiger prawns fed with LAB were not significantly higher than control group while the total counts of *Vibrio* sp. were significantly lower than those of control group ( $P<0.05$ ). Survived black tiger prawns These were fed with LAB and control group were challenged by *V. harveyi*, 7 days after infection the survival rate of black tiger prawns fed with LAB was significantly higher than control group ( $P<0.05$ ). Surprisingly, 100% survival rate of black tiger prawns was found in treatments that fed by four LAB isolates of *E. faecalis* (AM35), *E. faecium* (AM107), *L. salivarius* (AM111) and *L. farciminis* (AM115) while only 50% survival rate was found in the control group.

