

การศึกษาจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) ในจังหวัดกาฬสินธุ์

A study of probiotic microorganisms from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) pond in Kalasin province

กีรวิชัย เพชรจุล^{1*}, กาญจนา กุลวิฑิต², อนุพงษ์ ทานกระโทก¹ และ พนิดา สืบชมภู¹
Keeravit Petjul^{1*}, Kanjana Kulvitit², Anupong Tankrathok¹
and Panida Suebchompoo¹

บทคัดย่อ: การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต สามารถแยกได้จากดินบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) ในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ได้แก่ ตำบลเขาพระนอน ตำบลนาเชือก ตำบลบัวบาน อำเภอยางตลาด, ตำบลลำคลอง อำเภอเมืองกาฬสินธุ์ และตำบลหัวหิน อำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์ พบจุลินทรีย์ จำนวน 7 กลุ่ม ได้แก่ KS1, KS2, KS3, KS4, KS5, KS6 และ KS7 มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง เป็นแกรมบวก 6 ชนิด (KS1, KS2, KS3, KS4, KS5 และ KS6) และแกรมลบ 1 ชนิด (KS7) และจากการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อในกลุ่ม Bacillus จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus marisflavi* KS1, *B. aryabhattai* KS2, *B. pseudomycoides* KS3, *B. safensis* KS4, *B. infantis* KS5 และ *B. cereus* KS6 และเชื้อในกลุ่ม Chromobacterium จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Chromobacterium violaceum* KS7 ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. marisflavi* KS1, *B. aryabhattai* KS2 และ *B. cereus* KS6 ดังนั้นเชื้อเหล่านี้จึงมีคุณสมบัติเลือกใช้เป็นโปรไบโอติกในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบอินทรีย์ต่อไปได้

คำสำคัญ : โปรไบโอติก, จุลินทรีย์, กุ้งก้ามกราม, จังหวัดกาฬสินธุ์

ABSTRACT: Probiotic microorganisms have been more preferable for the growth in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) cultivation. This study attempted isolate probiotic microorganisms from soil of giant freshwater prawn pond in Kalasin province, tambol Khaopranon, Nachueak, Buaban, Yatalad district, tambol Lamkloung, Mueang Kalasin district and tambol Huahin, Huaimek district in Kalasin province. The purified microorganisms were found 7 isolates, such as KS1, KS2, KS3, KS4, KS5, KS6 and KS7. The morphological characteristics revealed that all its is rod shaped, 6 isolates of gram positive (KS1, KS2, KS3, KS4, KS5 and

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ถนนเกษตรสมบูรณ์ ตำบลกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-industrial Technology, Kalasin University, Kasetsomboon Road, Kalasin District, Kalasin Province, 46000

² สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ถนนเกษตรสมบูรณ์ ตำบลกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

Department of Plant Technology, Faculty of Agro-industrial Technology, Kalasin University, Kasetsomboon Road, Kalasin District, Kalasin Province, 46000

* Corresponding author: pkeravit@yahoo.com

KS6) and 1 isolate of gram negative (KS7). The genetic analysis by 16S rDNA gene sequences identified that all microorganisms isolates are genus bacillus such as *Bacillus marisflavi* KS1, *B. aryabhatai* KS2, *B. pseudomyoides* KS3, *B. safensis* KS4, *B. infantis* KS5 and *B. cereus* KS6 and genus *Chromobacterium* such as *Chromobacterium violaceum* KS7. Probiotic microorganisms of aquaculture are 3 species, *B. marisflavi* KS1, *B. aryabhatai* KS2 and *B. cereus* KS6. Therefore, these microorganisms property can be selected as the probiotic agents for a development of technique an organic giant fresh water prawn cultured.

Keywords: probiotic, microorganisms, giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, Kalasin province

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) เป็นกุ้งน้ำจืดที่สามารถได้พบทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำจืด จังหวัดกาฬสินธุ์เป็นอีกจังหวัดหนึ่งที่มีพื้นที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามกันมากบริเวณรอบ ๆ เขื่อนลำปาว ส่วนใหญ่กุ้งที่เลี้ยงจะเป็นกุ้งก้ามกรามก้ามทองและกุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (กีรวิชัย และ มณีรัตน์, 2559) ในอดีตที่ผ่านมาความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติมีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การทำประมงผิดวิธี การเกิดโรคระบาด ตลอดจนเกิดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมทางน้ำ ปัจจุบันจึงได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามขึ้นเพื่อชดเชยปริมาณกุ้งก้ามกรามจากธรรมชาติ จนกลายเป็นอาชีพหนึ่งที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างมากมาย

กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและมีราคาแพง ในปี พ.ศ. 2560 ประมาณการผลิตกุ้งก้ามกรามจากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณ 16,693 ตัน มีมูลค่า 5,133 ล้านบาท เมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมาปีมีปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.8 และ 9.6 ตามลำดับ เนื้อที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามทั้งประเทศมีประมาณ 78,632 ไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 2.5 ได้ผลผลิตเฉลี่ย 212 กิโลกรัม/ไร่ โดยในช่วง 9 เดือนแรกของปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกรามไปตลาดต่างประเทศ ปริมาณ 1,499.90 ตัน มูลค่า 398.20 ล้านบาท (จันทิมา, 2560) สามารถส่งเป็นสินค้าออกและทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างดี จึงทำให้มีการเพิ่มปริมาณการผลิตมากขึ้น วิธีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมนำมา

ใช้คือมีการลงทุนน้อย แต่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบหนาแน่น ซึ่งทำให้มีปัญหาและอุปสรรคตามมา เช่น ลูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำ กุ้งเจริญเติบโตช้า แคร่กระถิ่นเกิดโรคระบาดจากเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ทำให้ผลผลิตไม่ได้ตามต้องการ เกษตรกรจึงต้องพึ่งพาสารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นหลัก ทำให้มีต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ผลกระทบอีกอย่างหนึ่งก็คือเกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะและสารเคมีในตัวกุ้งที่จำหน่าย ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคตามมา (วิศณุ, 2541)

การนำโปรไบโอติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีความสำคัญมากขึ้น ในการปรับปรุงการเจริญเติบโตหรือการอยู่รอดของสัตว์น้ำที่เลี้ยงในฟาร์มและช่วยป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำได้ (Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil et al., 2000) ช่วงระยะที่ผ่านมาเกษตรกรหันมาทดลองเลี้ยงกุ้งแบบชีวภาพ และได้มีการทดลองนำแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ควบคุมและป้องกันแบบชีววิธีในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยนำเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (สนธิ และ ลีลา, 2541) จุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมีหลายชนิด มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา สายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ แบคทีเรียส่วนมากเป็นแบคทีเรียแลคติก เช่น *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* ปัจจุบันแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม *Enterococci* เช่น *Enterococcus faecium* M74 และ SF68 กลุ่ม *Lactococci* เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* และกลุ่ม *Streptococci* เช่น *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles*,

กลุ่ม *Bifidobacterium* เช่น *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium thermophilum*, กลุ่ม *Propionibacterium* ได้แก่ *Propionibacterium freudenreichii*, และกลุ่ม *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ยีสต์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pintolopesii* และราที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Aspergillus nige* และ *Aspergillus oryzae* (วิเชียร, 2541)

Li et al. (2012) ได้ทำการศึกษากการเตรียมจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากพื้นบ่อเลี้ยงปลาเฉา (*Ctenopharyngodon idellus*) นำไปเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ลงในน้ำ 10^8 CFU/m² และ *Bacillus subtilis* ผสมในอาหาร 0.5 เปอร์เซ็นต์ (10^8 CFU/kg diet) พบว่าสามารถเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันและเพิ่มแอนติออกซิเดชันในปลาเฉาทดลองได้ และ Lavanya and Dayakar (2017) ได้ศึกษากการแยกเชื้อและคุณลักษณะของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากตัวอย่างดินใกล้บริเวณชายฝั่งทะเลเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ทำการศึกษแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* จากตัวอย่างดิน โดยศึกษาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่จะนำมาเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตกับระยะเวลา ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจนและกรดน้ำดี และศึกษาคุณลักษณะทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จะมีขนาดดีเอ็นเอ 200 bp และจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อ และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในสัตว์ได้

งานวิจัยอื่นๆ ที่ได้ทำการทดลองนำจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ผสมกับอาหารกุ้งเพื่อทำเป็นโปรไบโอติกให้ลูกกุ้งกุลาดำกินในอัตราส่วนต่างๆ กัน พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดตายจากการเนื้อมวนทำให้เกิดโรคโดย *Vibrio harveyi* สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งทดลองมีสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ และมีอาการผิดปกติในตับอ่อนและลำไส้ (Phianphak et al., 1997; สนิธิ และ

ลีลา, 2541; Rengpipat et al., 1998) พื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนมากของไทย ผ่านการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารเคมีมาเป็นระยะเวลานาน ทำให้อาจมีปุ๋ยเคมี สารเคมีและสิ่งต้องห้ามต่าง ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนบ่ออย่างน้อย 1 รอบการผลิตซึ่งหมายถึงช่วงระยะเวลาตั้งแต่การเตรียมบ่อ

อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ เป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อส่งจำหน่ายในตลาดทั่วภาคอีสานและตลาดภาคกลาง เนื่องจากมีทำเลที่เหมาะสม แหล่งน้ำอุดมสมบูรณ์เนื่องจากอยู่ใกล้กับเขื่อนลำปาว และมีระบบชลประทานที่ดี แต่ปัจจุบันได้พบปัญหามากมายเกี่ยวกับการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เช่น พบสารเคมีตกค้างและเกิดโรคกุ้ง จึงต้องมีการรักษา ซึ่งรักษาด้วยสารเคมีและยาปฏิชีวนะมีราคาแพงและมีผลตกค้างในตัวกุ้งและน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จำเป็นต้องมีการแก้ไขปัญหาสภาวะมลพิษทางน้ำจากเขื่อนลำปาว ที่มีต้นเหตุมาจากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (กีรวิชัย, 2560)

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาแนวทางพัฒนาระบบการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพให้กับกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม โดยทำการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากพื้นก้นบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรกร โดยเป็นการศึกษาจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติซึ่งอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่อยู่ในพื้นที่เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรเอง เพื่อการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในแบบอินทรีย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างดินและการเตรียมเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินโคลนจากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกเก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยจากการสำรวจพื้นที่ที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามภายในจังหวัดกาฬสินธุ์ ได้แก่ 1. ตำบลเขาพระนอน 2. ตำบลนาเชือก 3. ตำบลบัวบาน อำเภอยางตลาด 4. ตำบลลำคลอง

อำเภอเมืองกาฬสินธุ์ และ 5. ตำบลหัวหิน อำเภอห้วยเม็ก ในการเก็บตัวอย่างดินโคลนจากบ่อกึ่งก้ามกราม จะสุ่มเก็บตัวอย่างดินโคลนจากพื้นที่ 5 ตำบล 3 อำเภอที่มีการเลี้ยงกึ่งก้ามกราม โดยตัวอย่างดินใน 1 บ่อจะเก็บตัวอย่างดิน 4 จุด (ความลึกจากระดับน้ำถึงผิวดินโคลน ประมาณ 30-90 เซนติเมตร) โดยเก็บตำบลละ 4-5 บ่อ แล้วนำดินโคลนที่เก็บได้ทั้งหมดมาผสมรวมกัน จากนั้นนำมาชั่ง 10 กรัม ผสมในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ 25-30 ครั้ง เจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} ดูนํ้าละลายดิน 10^{-4} ถึง 10^{-6} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (NA) 0.5 มิลลิลิตร ทำการ Spread plate จนทั่วอาหารหรือจนอาหารแห้ง (ทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่า แล้วทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในแต่ละกลุ่มไปเลี้ยงต่อ โดยจะกำหนดจุลินทรีย์ที่พบด้วยรหัสต่าง ๆ ได้แก่ เช่น เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 กำหนดด้วยรหัส KS1 เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 กำหนดด้วยรหัส KS2 ตามลำดับ จากนั้นเขียนเอาโคโลนีที่เจริญดี มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (NA) (ดัดแปลงจาก อรรถวรรณ์ และคณะ, 2556b)

ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์

ทำการ streak plate เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แยกเชื้ออีกครั้ง โดยการ cross streak plate เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มากขึ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งจะเห็นโคโลนีที่ชัดเจน สังเกตลักษณะของสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ที่พบด้วยตาเปล่าได้ สังเกตและบันทึกขนาด ลักษณะสีและลักษณะของโคโลนีที่เจริญในอาหาร

การเตรียมสไลด์จุลินทรีย์ ประยุกต์จากวิธีการของ พิมพร (2558)

นำห่วงถ่ายเชื้อ (loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปแตะหยดน้ำ แล้วนำมาแตะวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นนำห่วงถ่ายเชื้อ (loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปแตะเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่าง มาผสมกันในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ที่เตรียม

ไว้ smear เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในหยดน้ำให้กระจายออกบาง ๆ ปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศให้แห้ง จากนั้นทำให้เซลล์จุลินทรีย์ติดแน่นบนแผ่นสไลด์ โดยใช้ความร้อน (heat fixed) โดยการนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ประมาณ 5-6 ครั้ง หลังจากนั้นปล่อยให้สไลด์เย็นลง แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปทำการย้อมสีแกรมแบบที่เรียกต่อไป

วิธีการย้อมแกรมเซลล์จุลินทรีย์ ประยุกต์จากวิธีการของ พิมพร (2558)

นำแผ่นสไลด์ที่ได้จากข้อ 3 มาหยดสี Crystal violet บนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยด Gram iodine ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ล้างสีด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% อีกครั้ง ทิ้งไว้ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดสี Safranin ให้ท่วมสไลด์ เป็นเวลา 15-30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ปล่อยให้สไลด์แห้ง ทำการตรวจดูเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Oil immersion lens แล้วทำการตรวจลักษณะของเซลล์และแกรมแบบที่เรียกโดยดูด้วย Oil immersion lens ของกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า โดยเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวก จะติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet และเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นแกรมลบ จะติดสีแดงหรือชมพูของสี Safranin

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยวิธี 16S rDNA

ตรวจสอบและจำแนกชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular biology) โดยใช้หลักการของ 16S rDNA universal primer ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ DNA ที่เคยมีรายงานไว้ คือ Forward primer (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') และ Reverse primer (5'ACGGCTACCTTGTACGACTT3') (Weisburg et al., 1991) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธีการทำ DNA sequence analysis ที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การวิเคราะห์รูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7.0.26)

เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยการนำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 5 เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี MEGA dendrogram ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7.0.26)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

สัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินโคลนบ่อกุ้งก้ามกรามที่เจริญบนอาหารพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญ 7 กลุ่ม ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบทั้ง 7 กลุ่ม มีลักษณะโคโลนีและลักษณะของสีที่ต่างกันอย่างออกไป โดยโคโลนีที่พบมีลักษณะกลม ลักษณะเป็นเส้นใย ลักษณะเป็นดอกๆ ขอบหยัก พบมีสีเหลือง สีขาวขุ่น สีชมพู สีขาวขุ่นเข้ม (Figure 1)

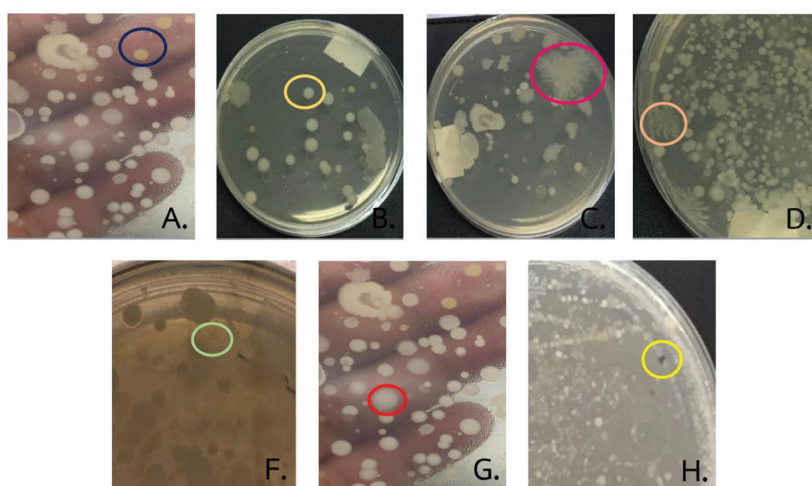


Figure 1 Characterization of microorganisms 7 strains: A=KS1; round, pale yellow, smooth edge, B=KS2; round, cloudy white, smooth edge, C=KS3; spread, cloudy white, fiber mold, D=KS4; spread pale white, wavy edge, E=KS5; round, pale pink, smooth edge, F=KS6; round, cloudy white, smooth edge และ G=KS7; round, cloudy violet, wavy edge

การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของแบคทีเรียทั้ง 7 กลุ่ม ที่เจริญในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยเซลล์จุลินทรีย์แต่ละ

กลุ่มมีลักษณะของโคโลนี ลักษณะเซลล์และแกรมเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Morphology of colony, cell and gram staining of microorganisms 7 isolates

No.	Isolate No.	Morphology of colony	Morphology of cell	Gram staining
1	KS1	round, pale yellow, smooth edge	rod shaped	+
2	KS2	round, cloudy white, smooth edge	rod shaped	+
3	KS3	spread, cloudy white, fiber mold	rod shaped	+
4	KS4	spread pale white, wavy edge	rod shaped	+
5	KS5	round, pale pink, smooth edge	rod shaped	+
6	KS6	round, cloudy white, smooth edge	rod shaped	+
7	KS7	round, cloudy violet, wavy edge	rod shaped	-

การตรวจสอบลักษณะของเซลล์และการย้อมแกรมจุลินทรีย์

ผลจากการย้อมแกรมของเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จากการวิจัย พบว่าเซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมติดสีม่วงหรือ

น้ำเงินของสี crystal violet พบมีจำนวน 6 กลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ KS1, KS2, KS3, KS4, KS5, และ KS6 และเซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมติดสีแดงของสี safranin พบมีจำนวน 1 กลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ KS7 (Figure 2)

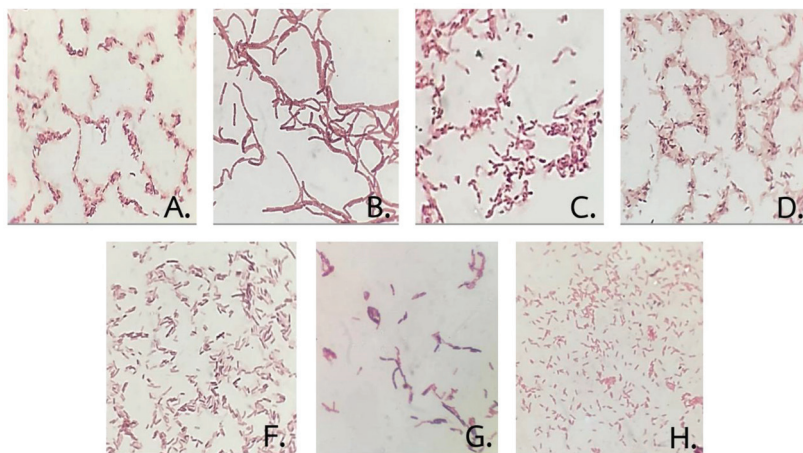


Figure 2 Gram staining of microorganisms 7 strains : A=KS1, B=KS2, C=KS3, D=KS4, E=KS5, F=KS6 และ G= KS7

การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือkdด้วยวิธี 16S rDNA

ผลจากการวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยศูนย์วิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้ระบุชนิดของแบคทีเรีย โดยแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือกลุ่ม *Bacillus* spp. และ *Chromobacterium* sp. มีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ KS1 มีความเหมือน 99.52 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus marisflavi* ที่ลำดับเบสขนาด 1243 bp เชื้อ KS2 มีความเหมือน 99.92 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus*

aryabhattai ที่ลำดับเบสขนาด 1314 bp เชื้อ KS3 มีความเหมือน 99.61 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus pseudomycooides* ที่ลำดับเบสขนาด 1292 bp เชื้อ KS4 มีความเหมือน 99.84 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus safensis* ที่ลำดับเบสขนาด 1278 bp เชื้อ KS5 มีความเหมือน 99.47 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus infantis* ที่ลำดับเบสขนาด 1332 bp เชื้อ KS6 มีความเหมือน 99.85 เปอร์เซ็นต์กับ *Bacillus cereus* ที่ลำดับเบสขนาด 1339 bp และเชื้อ KS7 มีความเหมือน 99.92 เปอร์เซ็นต์กับ *Chromobacterium violaceum* ที่ลำดับเบสขนาด 1315 bp ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Identification of the microorganisms 7 Isolates, based on 16S rDNA gene sequences

No.	Isolate No.	Species similarity	Similarity (%)	Size (bp)
1	KS1	<i>Bacillus marisflavi</i>	99.52	1243
2	KS2	<i>Bacillus aryabhattai</i>	99.92	1314
3	KS3	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	99.61	1292
4	KS4	<i>Bacillus safensis</i>	99.84	1278
5	KS5	<i>Bacillus infantis</i>	99.47	1332
6	KS6	<i>Bacillus cereus</i>	99.85	1339
7	KS7	<i>Chromobacterium violaceum</i>	99.92	1315

ผลการวิเคราะห์พหุชนิดโดยเอกลักษณ์ลำดับเบสวิธี 16S rDNA กลุ่ม *Bacillus* spp. ที่พบมีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus marisflavi* KS1, *Bacillus aryabhattai* KS2, *Bacillus pseudomycooides* KS3, *Bacillus safensis* KS4, *Bacillus infantis* KS5, *Bacillus cereus* KS6 และกลุ่ม *Chromobacterium* sp. พบเพียง 1 ชนิด ได้แก่ *Chromobacterium violaceum* KS7 โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์มีจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus marisflavi* KS1, (Beman et al., 1997; Ganguly and Mukhopadhyay, 2010; Austin and Austin, 2012) *Bacillus aryabhattai* KS2 (อรรวรรณ์ และคณะ, 2556b) และ *Bacillus cereus* KS6 (อรรวรรณ์ และคณะ, 2556a) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ อรรวรรณ์ และคณะ (2556a) ศึกษาที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม จำแนกเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนที่ยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อทั้งหมด เป็นเชื้อที่อยู่ในสกุลบาซิลลัส ได้แก่ *B. pumilus* TSN33, *B. pumilus* LLBM499, *B. subtilis* TSM33, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSN262, *B. aryabhattai* TSM362, *B. amyloliquefaciens* TSN63, *B. amyloliquefaciens* TSM499-4, *B. cereus* HMN142, *B. cereus* LLBM202, *B. thuringiensis* HMN151 และ *B. licheniformis* HMN152 เชื้อเหล่านี้ มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกรามต่อไปได้ และมีการศึกษาพบ *Bacillus marisflavi* ในลำไส้เล็กของปลาเทราท์สายรุ้ง ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Listorella anguillarum* (Beman et al., 1997; Ganguly and Mukhopadhyay, 2010; Austin and Austin, 2012) และศึกษาพบ *Bacillus aryabhattai* พบในรากของพืชชนิดหนึ่ง เรียกว่า *Lammna* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำถึง 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ทนในอุณหภูมิมากกว่า 37 องศาเซลเซียส (Semanti et al., 2012) และได้มีการศึกษาพบจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้งหมดที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามจากคลองธรรมชาติใน

จังหวัดนครปฐม เป็นโปรไบโอติกในกลุ่มบาซิลลัส ได้แก่ *B. subtilis* TSM33, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSN262, *B. aryabhattai* TSM362, *B. amyloliquefacian* TSN63, *B. amyloliquefacian* TSM499-4 และ *B. thuringiensis* HMN151 เชื้อเหล่านี้จึงมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกรามต่อไปได้ และยังสามารถเลี้ยงเชื้อแบบคหิเรียก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harviyi* และ *E. coli* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ (อรรวรรณ์ และคณะ, 2556b)

การจัดทำเดนโดรแกรม

แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ระหว่างจุลินทรีย์ทั้ง 7 ชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA 7 เลือกวิธีวิเคราะห์แบบ Kimura 2 - parameter model มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.1076 (10.76 เปอร์เซ็นต์) โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.0074 ระหว่าง *Bacillus marisflavi* KS1 กับ *Bacillus aryabhattai* KS2 ด้วยค่า Bootstrap 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.2123 ระหว่าง *Bacillus safensis* KS4 และ *Chromobacterium violaceum* KS7 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมีค่า Boot strap 85-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง ค่า Bootstrap 71-84 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับปานกลาง ค่า Boot strap 50-70 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ (ดวงกมล และคณะ, 2548) ในส่วนของผลการการวิเคราะห์เดนโดรแกรม แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ พบว่า จุลินทรีย์ที่ได้จากการวิจัยแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่ม *Bacillus* spp. (*Bacillus marisflavi* KS1, *Bacillus aryabhattai* KS2, *Bacillus pseudomycooides* KS3, *Bacillus safensis* KS4, *Bacillus infantis* KS5 และ *Bacillus cereus* KS6) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และกลุ่ม *Chromobacterium violaceum* (KS7) ถูกจัดแยกออกจากกลุ่ม *Bacillus* spp อย่างชัดเจน ดังแสดงใน Figure 3

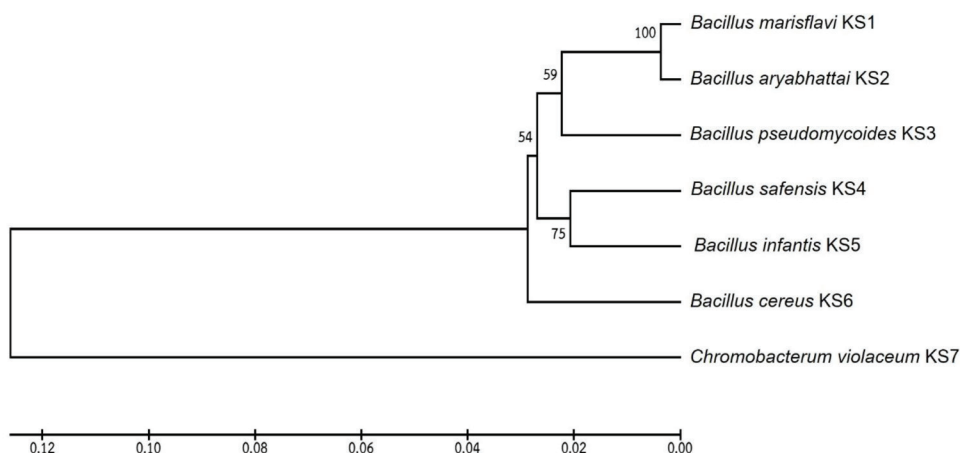


Figure 3 MEGA dendrogram of microorganisms 7 strains, based on 16S rDNA gene sequences

สรุป

ผลการวิจัยการคัดแยกจุลินทรีย์ในดินโคลนบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่ของจังหวัดกาฬสินธุ์สามารถพบจุลินทรีย์โปรไบโอติกกระจายอยู่ในพื้นที่เลี้ยงกุ้งทั้ง 5 ตำบล 3 อำเภอ ได้แก่ 1. ตำบลเขาพระนอน 2. ตำบลนาเชือก 3. ตำบลบัวบาน อำเภอยาง 4. ตำบลลำคลอง อำเภอมืองกาฬสินธุ์ และ 5. ตำบลหัวหิน อำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์ จากการวิจัยคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหาร NA โดยแยกได้จากการสังเกตสีฐานวิทยาภายนอกของเชื้อจุลินทรีย์มีลักษณะที่แตกต่างกันและย้อมแกรมจุลินทรีย์โดยพบกลุ่มจุลินทรีย์ สามารถคัดแยกได้ 7 ชนิด ได้แก่ กลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแกรมบวก 6 ชนิด และกลุ่ม *Chromobacterium violaceum* แกรมลบ 1 ชนิด และจากผลการวิเคราะห์ฟีโนไทป์โดยเอกลักษณ์ลำดับเบสวิธี 16S rDNA แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือกลุ่ม *Bacillus* spp. และ *Chromobacterium* sp. ซึ่งกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่พบมีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus marisflavi* KS1, *Bacillus aryabhattai* KS2, *Bacillus pseudomycoides* KS3, *Bacillus safensis* KS4, *Bacillus infantis* KS5, *Bacillus cereus* KS6 และ

Chromobacterium violaceum KS7 โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์มีจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus marisflavi* KS1, *Bacillus aryabhattai* KS2 และ *Bacillus cereus* KS6 ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามและยังมีความสมบัติที่ยังเชื่อแบคทีเรียก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* และ *E. coli* โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะรักษาโรคติดเชื้อเพื่อนำไปสู่การพัฒนาการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบอินทรีย์ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัยและอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ และศูนย์วิจัยความหลากหลายทางชีวภาพสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ช่วยวิเคราะห์ฟีโนไทป์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์

เอกสารอ้างอิง

- กีรวิชัย เพชรจุล. 2560. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการหมู่บ้านแม่ข่ายวิทยาศาสตร์การเลี้ยง กุ้งก้ามกรามลำปาว. คลินิกเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ และกระทรวง วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- กีรวิชัย เพชรจุล และมณีนรัตน์ ศิริสวัสดิ์. 2559. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามใน บ่อเลี้ยงของเกษตรกรจังหวัดกาฬสินธุ์โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี-พีซีอาร์. วารสารวิทยาศาสตร์. 44: 331-344.
- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2553. พื้นที่ การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามและสถิติการส่งออก, แหล่งข้อมูล: <https://bit.ly/2yebxni> ค้นเมื่อ วันที่ 28 สิงหาคม 2560.
- จันทิมา เพียรผล. 2560. สถานการณ์กุ้งก้ามกราม 9 เดือนแรกปี 2560. กลุ่มเศรษฐกิจการประมง. กองนโยบายและยุทธศาสตร์การพัฒนากการ ประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์.
- ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงษ์หมาคำ และศทาฐนาม ดี. 2548. การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempfer* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สาย สัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางซีววิทยา ระดับโมเลกุล. วารสารวิจัย. 10: 5-12.
- พิมพ์พร ทองเมือง. 2558. เอกสารประกอบการสอน รายวิชาความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับจุลชีววิทยา ทางการแพทย์. มหาวิทยาลัยราชภัฏ สอนสุรินทร์.
- วัชรภรณ์ ไกรอำ. 2553. สถานการณ์กุ้งก้ามกราม ไตรมาส 1 ปี 2552, แหล่งข้อมูล: <https://bit.ly/2NH5wK>. ค้นเมื่อ วันที่ 28 สิงหาคม 2560.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. โปรไบโอติก: อาหาร สุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ ตอนที่ 1. วารสาร จาร์พา . 5: 50-53.
- วิศณุ บุญญาวิวัฒน์. 2541. โรคและความถดถอยทาง พันธุกรรมของกุ้งก้ามกราม. การอภิปรายทาง วิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2541. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.
- สนธิ แดงสกุล และลิลลา เรืองแป้น. 2541. ประสิทธิภาพ ของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* การเลี้ยง กุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง. 51: 446-456.
- อรวรรณ์ บุตรดี, พรพรรณ อุสุวรรณ์ และกัญญา สอน สนิท. 2556a. การคัดเลือกและการจำแนกชนิด แบคทีเรียที่แยกได้จาก ทางเดินอาหารของกุ้ง ก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). วารสารวิทยาศาสตร์. 41: 404-413.
- อรวรรณ์ บุตรดี, พรพรรณ อุสุวรรณ์ และกัญญา สอน สนิท. 2556b. การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสโปรไบโอ ติกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจาก คลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม. วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2: 11-19.
- Atlas. M. R. 1995. Microorganisms in our world. United State of America: Mosby-Year Book Inc.
- Austin, B., and D. Austin. 2012. Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish, Springer, New York. Bernan, V. S., M. Greenstein, and W. M. Maisese. 1997. Marine microorganisms as a source of new natural products. Adv. Appl. Microbiol. 43: 57-90.
- Ganguly, P. I., and K. S. Mukhopadhyay, 2010. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and probiotics in aquaculture: A Review. Bamidgeh. 62: 130-138.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180: 147-165.

- Gomez-Gil, B., A. Roque, and J. F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
- Lavanya, K., and Y. Dayakar. 2017. Isolation and characterization of probiotic bacteria from the soil samples of the coastal areas of (Gundur division, Nellore Dt.) for utilization in shrimp farming. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 5: 371-376.
- Li, K., X. Zhang, W. Song, B. Deng, Q. Liang, I. Fu, J. Zheng, Y. Wang, and D. Yu. 2012. Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol. Biochem.* 38: 1585-1592.
- Phianphak, W., S. Piyatirativarakul, P. Menasveta, and S. Rengpipat. 1997. Use of Probiotics in *Penaeus monodon*. Abstract of poster session, 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 1997. Phuket, Thailand.
- Rengpipat S, S. Rukpratanporn, S. Piyatirativarakul, and P. Menasveta. 1998. Probiotic in aquaculture: A case study of probiotic for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In Flegel TW(ed) *Advance in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Semanti, R., D. Rohini, B. Poilomi, C. Bodhisatwa, and K. M. Arup. 2012. From the space to earth: *Bacillus aryabhatai* found in the Indian subcontinent. *Biosci. Discov.* 3: 138-145.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.