การคัดแยกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในจังหวัดกาฬสินธุ์

Screening of Protease Producing Probiotic Bacteria of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) on Pond Culture in Kalasin Province

กีรวิชญ์ เพชรจุล[1*] อนุพงษ์ ทานกระโทก[1] และปุณิกา ฉายเสมแสง[2]

Petjul, K.[1*], Tankrathok, A.[1] & Chaisemsaeng, P.[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) ในจังหวัดกาฬสินธุ์ พบแบคทีเรียโปรไบโอติก จำนวน 6 ไอโซเลต มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก และจากการจัดจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ทั้งหมด ได้แก่ *Bacillus marisflavi* (KS1), *B. aryabhattai* (KS2), *B. pseudomycoides* (KS3), *B. safensis* (KS4), *B. infantis* (KS5) และ *B. cereus* (KS6) และเมื่อนำทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า *B. pseudomycoides* (KS3) ผลิตโปรติเอสได้มากที่สุด 1.203^{e}±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *B. cereus* (KS6) 1.145^{d}±0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *B. aryabhattai* (KS2) 0.986^{c}±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *B. safensis* (KS4) 0.034^{b}±0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, *B. marisflavi* (KS1) 0.020^{b}±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *B. infantis* (KS5) 0.008^{a}±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

คำสำคัญ: แบคทีเรีย โปรไบโอติก กุ้งก้ามกราม เอนไซม์โปรติเอส ยีน 16S rDNA

[1]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ตำบลกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000
Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Mueang District, Kalasin Province.

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุขภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ตำบลกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000
Faculty of Science and Health Technology, Kalasin University, Mueang District, Kalasin Province.

[*]Corresponding author: pkeravit@yahoo.com

Abstract

A study of screening protease producing probiotic bacteria of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) on pond culture in kalasin province were found 6 isolates that all it is rod shaped and gram positive. The nucleotide analysis by 16S rDNA gene sequences identified that all bacterial isolates are genus *bacillus* such as *Bacillus marisflavi* (KS1), *B. aryabhattai* (KS2), *B. pseudomycoides* (KS3), *B. safensis* (KS4), *B. infantis* (KS5) and *B. cereus* KS6. Protease enzyme production of *B. pseudomycoides* (KS3) were highest 1.203^{e}±0.60 unit/ml, *B. cereus* (KS6) 1.145^{d}±0.50 unit/ml, *B. aryabhattai* (KS2) 0.986^{c}±0.60 unit/ml, *B. safensis* (KS4) 0.034^{b}±0.03 unit/ml, *B. marisflavi* (KS1) 0.020^{b}±0.01 unit/ml and *B. infantis* (KS5) 0.008^{a}±0.002 unit/ml, respectively with significant difference 0.05.

Keywords *:* bacterial, probiotic, giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, protease enzyme, 16S rDNA gene

บทนำ

กุ้งก้ามกราม มีชื่อสามัญว่า Giant freshwater prawn มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* de Man จัดเป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำจืด จังหวัดกาฬสินธุ์มีพื้นที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามกันมากบริเวณรอบ ๆ เขื่อนลำปาว ส่วนใหญ่สายพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์จะมีลักษณะเป็นกุ้งก้ามกรามก้ามทองและกุ้งก้ามกรามก้ามฟ้า (กีรวิชญ์ และมณีรัตน์, 2559) ในอดีตที่ผ่านมาความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีปริมาณมากและจะมีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น ปัญหาภาวะมลพิษทางน้ำ การขยายตัวของประชากร กำลังการผลิตมีไม่เพียงพอ ปริมาณการจับมากเกินไป การทำประมงผิดวิธี การเกิดโรคระบาด ปัจจุบันจึงได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพิ่มมากขึ้นขึ้นเพื่อทดแทนปริมาณกุ้งก้ามกรามจากธรรมชาติที่ลดน้อยลง จนกลายเป็นอาชีพหนึ่งที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างมากมาย

ปัจจุบันการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีความสำคัญมากขึ้น โดยจะมีประโยชน์ในการปรับปรุงระบบย่อยอาหารในทางเดินอาหารเป็นผลทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้นหรือการอยู่รอดของสัตว์น้ำที่เลี้ยงในฟาร์มเพิ่มมากขึ้น และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายทำให้ช่วยป้องกันการเกิด

โรคระบาดในสัตว์น้ำได้ (Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil et al., 2000) ช่วงระยะเวลาที่ผ่านมาเกษตรกรได้หันมาทดลองเลี้ยงกุ้งในระบบชีวภาพ โดยได้มีการศึกษาและทดลองนำแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ควบคุมและป้องกันแบบชีววิธีในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกบางชนิดที่เป็นประโยชน์สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (สนธิ และลิลา, 2541) และได้มีงานวิจัยซึ่งได้ทำการทดลองนำจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ผสมกับอาหารกุ้งเพื่อทำเป็นโปรไบโอติกให้ลูกกุ้งกุลาดำกินในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าลูกกุ้งกุลาดำที่ได้รับโปรไบโอติกจะมีอัตราการรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยเชื้อ *Vibrio harveyi* สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งกุลาดำทดลองมีสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตรารอดเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ และมีอาการผิดปกติในตับ ตับอ่อนและลำไส้ (Phianphak et al., 1997; สนธิ และลิลา 2541, และ Rengpipat et al., 1998) โดยในกระบวนการย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของกุ้งจะมีผลทำให้เกิดการย่อยสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะส่งผลต่อการย่อยสารอาหารและนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ในร่างกายของสัตว์น้ำ เอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในกระบวนการย่อยอาหารในสัตว์น้ำ ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอสซึ่งอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์โปรตีน ทำให้เกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะมีผลต่อการย่อยสารอาหารและการนำสารอาหารที่ย่อยได้ไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ และเป็นสารตั้งต้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน เกิดเป็นสารใหม่ในร่างกายต้องการสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

เอนไซม์โปรติเอส (Proteases enzyme) สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เป็นอย่างดี และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถนำเอาไปใช้ประโยชน์ในเชิงธุรกิจเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ดี Snealth et al. (1986) ได้มีรายงานการนำเชื้อ *B. subtilis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สามารถพบได้โดยทั่วไป มีความสามารถในการสร้างสปอร์และมีความทนทานเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญสามารถปลดปล่อยเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนได้ดี

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจทำการคัดแยกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตโปรติเอสเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำแบคทีเรียโปรไบโอติกไปใช้ผสมอาหารในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อเร่งการย่อยโปรตีน ลดระยะเวลาในการย่อย เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และสามารถนำแบคทีเรียโปร

ไบโอติกที่คัดแยกได้ไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์

2. เพื่อศึกษาปริมาณการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่คัดแยกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและการเตรียมเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก

เก็บตัวอย่างดินโคลนจากบ่อกุ้งเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติก โดยจากการสำรวจพื้นที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามในจังหวัดกาฬสินธุ์จำนวน 3 อำเภอ ได้แก่ 1. อำเภอยางตลาด 2. อำเภอเมืองกาฬสินธุ์ และ 3. อำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์ (กีรวิชญ์ และคณะ, 2561) ทำการเก็บตัวอย่างดินโคลนจากบ่อกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างดินโคลนจากพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรกรในพื้นที่ 3 อำเภอของจังหวัดกาฬสินธุ์ โดยตัวอย่างดิน 1 บ่อจะทำการเก็บ 4 จุด (ความลึกจากระดับน้ำถึงผิวดินโคลน ประมาณ 60-120 เซนติเมตร) เก็บตัวอย่างดินอำเภอละ 4-5 บ่อ แล้วนำตัวอย่างดินโคลนที่เก็บได้ทั้งหมดมาผสมรวมกัน (กีรวิชญ์ และคณะ, 2561) จากนั้นนำตัวอย่างดินโคลนที่ผสมเรียบร้อยแล้วมาชั่งจำนวน 10 กรัม ผสมในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ 25-30 ครั้ง เจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} ดูดสารละลายดินโคลน 10^{-4} ถึง 10^{-6} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ทำการ Spread plate จนทั่วจานอาหาร (ทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่า ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในแต่ละกลุ่มไปเลี้ยงต่อ โดยกำหนดให้ไอโซเลตแบคทีเรียโปรไบโอติกที่พบด้วยรหัสต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรียโปรไบโอติกไอโซเลตที่ 1 กำหนดด้วยรหัส KS1 และแบคทีเรียโปรไบโอติกไอโซเลตที่ 2 กำหนดด้วยรหัส KS2 ตามลำดับ จากนั้นเขี่ยเอาโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เจริญดีมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (อรวรรณ์ และคณะ, 2556b)

2. ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของแบคทีเรียโปรไบโอติก

ทำการ Streak plate เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกให้บริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้ออีกครั้งโดยเทคนิค Cross streak plate เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มากขึ้น นำไปเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มากขึ้นซึ่งสามารถเห็นโคโลนีที่ชัดเจนมากขึ้น สังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของโคโลนี

แบคทีเรียโปรไบโอติกที่พบด้วยตาเปล่า สังเกตขนาด ลักษณะสี และลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เจริญในอาหาร

3. การเตรียมสไลด์และวิธีการย้อมแกรมเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติก ประยุกต์จากวิธีการของพิมพร (2558)

นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปแตะหยดน้ำแล้วนำมาแตะวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นนำห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกตัวอย่างมาผสมกันในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ทำการเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่อยู่ในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ให้กระจายออกบาง ๆ ปล่อยสไลด์ทิ้งให้แห้งไว้ในอากาศ จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกติดแน่นบนแผ่นสไลด์โดยวิธีใช้ความร้อน (Heat fixed) โดยนำแผ่นสไลด์ที่มีเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกมาผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ประมาณ 5-6 ครั้ง จากนั้นปล่อยให้แผ่นสไลด์เย็นลงในอากาศแล้วนำแผ่นสไลด์ที่เตรียมได้ไปทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียโดยการนำแผ่นสไลด์มาหยดสี Crystal violet]' บนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นหยด Gram iodine ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด และทำการล้างสีส่วนเกินออกโดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นหยดสี Safranin ให้ท่วมแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 15-30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ปล่อยแผ่นสไลด์ทิ้งให้แห้งในอากาศ ทำการตรวจลักษณะของเซลล์และแกรมแบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่เป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet และเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่เป็นแกรมลบจะติดสีแดงหรือชมพูของสี Safranin

4. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกด้วยวิธี 16S rDNA

ตรวจสอบและจำแนกชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular biology) ซึ่งในงานวิจัยใช้หลักการของ 16S rDNA universal primer โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ DNA ที่เคยมีรายงานไว้ คือ Forward primer (5'AGAGTTTGATCCTGG CTCAG3') และ Reverse primer (5'ACGG CTACCTTGTTACGACTT3') (Weisburg et al., 1991) จากนั้นนำชิ้นส่วน PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น นำส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequence analysis ที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว./TISSTR; ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

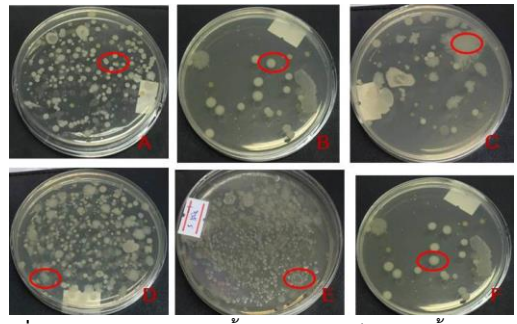
5. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่แยกได้ (อำพรรณ, 2558)

นำแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่มีค่า OD_{600} = 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการเก็บส่วนใส 75 ไมโครลิตร มาเติม TrisHCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 9 ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร และเติม Azocasein ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-Tyrosine (ความเข้มข้น 0-360 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาความเข้มข้นของ Tyrosine ในตัวอย่าง (ในการวัดค่าจะทำซ้ำ 3 ครั้ง) คำนวณหาค่ากิจกรรมของโปรติเอส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนและให้กรดอะมิโนในรูปของ Tyrosine 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่กำหนด

ผลการศึกษา

สัณฐานวิทยาภายนอกของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกจากดินโคลนบ่อกุ้งก้ามกรามในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ที่เจริญบนอาหาร พบว่าเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เจริญพบได้ 6 ไอโซเลต ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกพบว่าลักษณะของเชื้อจะมีลักษณะของโคโลนีและสีที่แตกกันออกไป โดยจะมีลักษณะโคโลนีกลม มีสีเหลืองใส ขอบเรียบ (รูปที่ 1 A=KS1) ลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ (รูปที่ 1 B=KS2) ลักษณะโคโลนีคล้ายเส้นใย สีขาวขุ่น (รูปที่ 1 C=KS3) ลักษณะโคโลนีขอบหยัก สีขาวใส (รูปที่ 1 D=KS4) ลักษณะโคโลนีกลม สีชมพูใส ขอบเรียบ (รูปที่ 1 E=KS5) และลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่นเยิ้มๆ ขอบเรียบ (รูปที่ 1 F=KS6)



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ไอโซเลต: A=KS1, B=KS2, C=KS3, D=KS4, E=KS5, และ F=KS6

การตรวจสอบลักษณะของเซลล์และการย้อมแกรมแบคทีเรีย

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ไอโซเลต ที่เจริญในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยไอโซเลตแบคทีเรีย KS1 จะมีลักษณะโคโลนีกลม มีสีเหลืองใส ขอบเรียบ KS2 มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ KS3 มีลักษณะโคโลนีคล้ายเส้นใย สีขาวขุ่น KS4 มีลักษณะโคโลนีขอบหยัก สีขาวใส KS5 มีลักษณะโคโลนี กลม สีชมพูใส ขอบเรียบ และ KS6 มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่นเยิ้มๆ ขอบเรียบ ลักษณะเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งหมดทุกไอโซเลตมีลักษณะเป็นท่อนและเซลล์ทุกๆ ไอโซเลตย้อมติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet จัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1

ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์	แกรมแบคทีเรีย
KS1	กลม สีเหลืองใส ขอบเรียบ	ท่อน	+
KS2	กลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	ท่อน	+
KS3	คล้ายเส้นใย สีขาวขุ่น	ท่อน	+
KS4	ขอบหยัก สีขาวใส	ท่อน	+
KS5	กลม สีชมพูใส ขอบเรียบ	ท่อน	+
KS6	กลม สีขาวขุ่นเยิ้มๆ ขอบเรียบ	ท่อน	+

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกคัดเลือกด้วยวิธี 16S rDNA

ผลจากการส่งวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก ผลจากการวิเคราะห์พบว่า เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 กลุ่ม ซึ่งได้ระบุชนิดได้ ดังนี้ ไอโซเลต KS1 มีค่าความเหมือน *B. marisflavi* 99.52 เปอร์เซ็นต์ ขนาดดีเอ็นเอ 1243 bp ไอโซเลต KS2 มีค่าความเหมือน *B. aryabhattai* 99.92 เปอร์เซ็นต์ ขนาดดีเอ็นเอ 1314 bp ไอโซเลต KS3 มีค่าความเหมือน *B. pseudomycoides* 99.61 เปอร์เซ็นต์ ขนาดดีเอ็นเอ 1292 bp ไอโซเลต KS4 มีค่าความเหมือน *B. safensis* 99.84 เปอร์เซ็นต์ ขนาดดีเอ็นเอ 1278 bp ไอโซเลต KS5 มีค่าความเหมือน *B. infantis* 99.47 เปอร์เซ็นต์ ขนาดดีเอ็นเอ 1332 bp และไอโซเลต KS6 มีค่าความเหมือน *B. cereus* 99.85 เปอร์เซ็นต์ ขนาดดีเอ็นเอ 1339 bp (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์การวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA

ไอโซเลต	ความคล้ายคลึง	ความเหมือน (% similarity)	ขนาดดีเอ็นเอ (bp)
KS1	*Bacillus marisflavi*	99.52	1243
KS2	*Bacillus aryabhattai*	99.92	1314
KS3	*Bacillus pseudomycoides*	99.61	1292
KS4	*Bacillus safensis*	99.84	1278
KS5	*Bacillus infantis*	99.47	1332
KS6	*Bacillus cereus*	99.85	1339

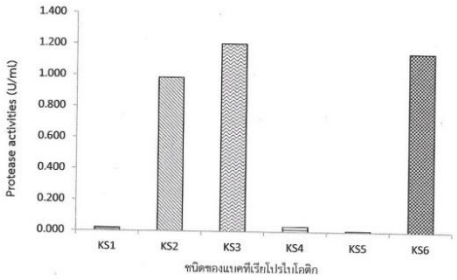
ผลการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้

จากการทดลองผลจากการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสในเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ชนิดที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด ได้แก่ *B. pseudomycoides* (KS3) มีค่าเท่ากับ 1.203^{e}±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา *B. cereus* (KS6) มีค่าเท่ากับ 1.145^{d}±0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. aryabhattai* (KS2) มีค่าเท่ากับ 0.986^{c}±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. safensis* (KS4) มีค่าเท่ากับ 0.034^{b}±0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. marisflavi* (KS1) มีค่าเท่ากับ 0.020^{b}±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *B. infantis* (KS5) มีค่าเท่ากับ 0.008^{a}±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 3

ผลการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ชนิดแบคทีเรีย	โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)
KS1	*Bacillus marisflavi*	0.020^{b}±0.01
KS2	*Bacillus aryabhattai*	0.986^{c}±0.60
KS3	*Bacillus pseudomycoides*	1.203^{e}±0.60
KS4	*Bacillus safensis*	0.034^{b}±0.03
KS5	*Bacillus infantis*	0.008^{a}±0.002
KS6	*Bacillus cereus*	1.145^{d}±0.50



รูปที่ 2 ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียโปรไบโอติก 6 ชนิดที่คัดแยกได้

อภิปรายผล

สัณฐานวิทยาภายนอกของแบคทีเรียโปรไบโอติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียโปรไบโอติก จากดินโคลนบ่อกุ้งก้ามกรามในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่า พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญพบได้ 6 ไอโซเลต ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกมีลักษณะของโคโลนีและสีที่แตกกันออกไปตามลักษณะชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยจะพบมีลักษณะโคโลนีกลม มีสีเหลืองใส ขอบเรียบ ลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ลักษณะโคโลนีคล้ายเส้นใย สีขาวขุ่น ลักษณะโคโลนีขอบหยัก สีขาวใส ลักษณะโคโลนีกลม สีชมพูใส ขอบเรียบ และลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่นเยิ้มๆ ขอบเรียบ สอดคล้องกับผลการทดลองของ อัจฉราพร และคณะ, 2555 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโปรไบโอติกพบว่ามีโคโลนีสีขาวขุ่น กลมนูน ขอบเรียบและมันวาว

การตรวจสอบลักษณะของเซลล์และการย้อมแกรมแบคทีเรียโปรไบโอติก

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ไอโซเลต ที่เจริญในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกมีลักษณะเซลล์ทั้งหมดเป็นท่อน และผลจากการย้อมแกรมของเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการวิจัย พบว่าเซลล์ย้อมติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่พบทั้งหมดจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งจะให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ อัจฉราพร และคณะ (2555) ทำการทดลองนำเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงได้ไปส่องดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งยาว และ Semanti et al. (2012) ได้ศึกษา *B. aryabhattai* พบอยู่ในรากของพืชน้ำชนิดหนึ่งที่เรียกว่า *Lammna* sp. จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำถึง 4 องศาเซลเซียส แต่จะไม่ทนในอุณหภูมิมากกว่า 37 องศาเซลเซียส

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกคัดเลือกด้วยวิธี 16S rDNA

ผลจากการส่งวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ 16S rDNA

ของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้ โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียโปรไบโอติก ทั้ง 6 ไอโซเลต ซึ่งได้ระบุชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ดังนี้ ไอโซเลต KS1 มีค่าความเหมือน *B. marisflavi* 99.52 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต KS2 มีค่าความเหมือน *B. aryabhattai* 99.92 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต KS3 มีค่าความเหมือน *B. pseudomycoides* 99.61 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต KS4 มีค่าความเหมือน *B. safensis* 99.84 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต KS5 มีค่าความเหมือน *B. infantis* 99.47 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต KS6 มีค่าความเหมือน *B. cereus* 99.85 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานวิจัยของอรวรรณ์ และคณะ (2556a) ศึกษาแบคทีเรียโปรไบโอติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม จำแนกเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งหมดอยู่ในสกุลบาซิลลัส 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 เชื้อเหล่านี้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้ และได้มีการศึกษาพบ *B. marisflavi* ในลำไส้เล็กของปลาเทราท์สายรุ้ง ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Listorella anguillarum* (Bernan et al., 1997; Ganguly and Mukhopadhayay, 2010; Austin and Austin, 2012) และได้มีการศึกษาพบแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งหมดที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐมเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกในกลุ่มบาซิลลัส 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 เชื้อเหล่านี้จึงมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้ และสามารถยั้งยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila, Vibrio harviyi* และ *Escherichia coli* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ (อรวรรณ์ และคณะ, 2556b) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการทดลองทั้งหมดจัดเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อพัฒนาใช้กับการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้

ผลการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีนและโพลีเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ ในปัจจุบันอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นิยมนำแบคทีเรียมาเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ เพราะแบคทีเรียสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและยังควบคุมการเจริญได้ง่ายและต้นทุนในการเลี้ยงต่ำ เอนไซม์ที่จำหน่ายในเชิงการค้าส่วนใหญ่ได้มาจากการผลิตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus* sp. (Rao *et al*., 1998) และจากงานวิจัยผลจากการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสในแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ชนิดที่คัดแยกได้ โดยพบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุดได้แก่ *B. pseudomycoides* (KS3) มีค่าเท่ากับ 1.203±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา *B. cereus* (KS6) มีค่าเท่ากับ 1.145±0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. aryabhattai* (KS2) มีค่าเท่ากับ 0.986±0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. safensis* (KS4) มีค่าเท่ากับ 0.034±0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. marisflavi* (KS1) มีค่าเท่ากับ 0.020±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ *B. infantis* (KS5) มีค่าเท่ากับ 0.008±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยนี้ *B. cereus* สามารถผลิตโปรติเอสได้มากกว่าการทดลองของ วัชรา (2545) พบว่า *B. cereus* และ *B. licheniformis* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 0.80 และ 29.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถเลือกชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้ผสมอาหารกุ้งก้ามกรามเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในระบบทางเดินอาหารของอาหารกุ้งก้ามกรามได้

สรุปผล

จากผลการวิจัยการคัดแยกแบคทีเรียโปรไบโอ-ติกในดินโคลนบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่ของจังหวัดกาฬสินธุ์ สามารถพบแบคทีเรียโปรไบโอติกกระจายอยู่ในพื้นที่เลี้ยงกุ้งทั้ง 3 อำเภอ ได้แก่ 1. อำเภอยางตลาด 2. อำเภอเมืองกาฬสินธุ์ และ 3. อำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์ จากการคัดแยกแบคทีเรีย โดยสังเกตสัณฐานวิทยาภายนอกของแบคทีเรียโปรไบโอติกมีลักษณะที่แตกต่างกันและย้อมแกรม สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต มีรูปร่างเป็นท่อนและเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด และจากผลการวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลำดับเบสวิธี 16S rDNA แบคทีเรียโปรไบโอติกจัดอยู่กลุ่ม *Bacillus* ทั้งหมด พบมีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. marisflavi* (KS1), *B. aryabhattai* (KS2), *B. pseudomycoides* (KS3), *B. safensis* (KS4), *B. infantis* (KS5) และ *B. cereus* (KS6) เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกเหล่านี้มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้ และจากการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสในเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 6 ชนิดที่คัดแยกได้ พบว่า เชื้อ

แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด ได้แก่ *B. pseudomycoides* (KS3) รองลงมา *B. cereus* (KS6), *B. aryabhattai* (KS2), *B. safensis* (KS4), *B. marisflavi* (KS1) และ *B. infantis* (KS5) ตามลำดับ ดังนั้นสามารถเลือกชนิดของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการทดลองไปพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอินทรีย์ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2560-2561 และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ได้พิจารณาให้ทุนวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ สถานที่ในการทำวิจัย เครื่องมือทำการวิจัยและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้านที่มีส่วนช่วยในงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กีรวิชญ์ เพชรจุล และมณีรัตน์ ศิริสวัสดิ์. (2559). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรจังหวัดกาฬสินธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 44*(2): 331-344.

กีรวิชญ์ เพชรจุล อนุพงษ์ ทานกระโทก กาญจนา กุลวิทิตและอรรคเดช อิ่มพัฒน์. (2561). *การคัดเลือกและการแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ๆ ระบบฟาร์มอินทรีย์ในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์.* รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์. 154 หน้า.

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ ชนิดา ชูพรม และอายูรีน มานะ. (2558). การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากปลาร้า. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม.10*(1): 1-8.

พิมพร ทองเมือง. (2558). *เอกสารประกอบการสอนรายวิชาความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับจุลชีววิทยาทางการแพทย์.* มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา. 13-14.

วัชรา นิคมขำ. (2545). *การศึกษาแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในน้ำปลา.* วิทยานิพนธ์ประกาศนียบัตรบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สนธิ แดงสกุล และลิลา เรืองแป้น. (2541). ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก Bacillus การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *วารสารการประมง. 51*(5): 446-456.

อรววรรณ์ บุตรดี พรพรรณ อู่สุวรรณ และกัญญา สอนสนิท. (2556a). การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่

แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม(*Macrobrachium rosenbergii* de Man). *วารสารวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น 41*(2) : 404-413.

อรววรรณ์ บุตรดี พรพรรณ อู่สุวรรณ และกัญญา สอนสนิท. (2556b). การคัดเลือกเชื้อบาซิลัสโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2*(1): 11-19.

อัจฉราพร เกิดกุล สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์ และเพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. (2555). *การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการผลิตแคปซูล.* ในการประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9 วันที่ 6-7 ธันวาคม 2555: 452-459.

Austin, B. & Austin, D., (2012). *Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish*, Springer, New York, 652 pp.

Bernan, V.S., Greenstein, M. & Maisese, W. M. (1997). Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advances in Applied Microbiology*, *43*, 57-90.

Ganguly, P.I. & Mukhopadhayay, K.S. (2010). Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and probiotics in aquaculture: A Review. *Bamidgeh*, *62* (3): 130-138.

Gatesoupe, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, *180*, 147–165.

Gomez-Gil, B., Roque, A. & Turnbull, J.F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms*. Aquaculture*, *191*, 259-270.

Phianphak, W., S. Piyatirativarakul, P. Menasveta, & S. Rengpipat.. (1997). *Use of probiotics in Penaeus monodon*. Abstract of poster session, 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 1997. Phuket, Thailand. p.18.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. *62*: 597–635.

Rengpipat S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul & 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. pp. 177-181.

Semanti, R., D., Rohini, B., Poilomi, C., Bodhisatwa & K M. Arup. (2012). From the space to earth: *Bacillus aryabhattai* found in the indian subcontinent. *Bioscience Discovery*, *3* (1): 138-145.

Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, & Holt JG. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams Wilkins Co., Baltimore, p. 1123.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier & D.J. Lane. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacterial.* 173(2): 697-703.