http://journal.rmutp.ac.th/

การคัดเลือกแบคทีเรียจากลำไส้กุ้งกุลาดำเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]* วุฒิศักดิ์ ศักดิ์สิทธิ์[1] และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

[2] ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

[1, 2] 169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

รับบทความ 12 มีนาคม 2564 แก้ไขบทความ 13 กรกฎาคม 2564 ตอบรับบทความ 16 สิงหาคม 2564

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการประเมินคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 14 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ S1, S3, S6, S7, T4 และ T5 สามารถย่อยสารอาหารได้ทั้ง 3 ชนิด คือ โปรตีน แป้งและไขมันได้ โดยสายพันธุ์ที่ย่อยสารอาหารทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด คือ S3, S7, และ S2 ตามลำดับ แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดแดงได้ ได้แก่ S2, S3, T0, T1, T2 และ T3 และ S2 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง คือ *Vibrio harveyi* ได้ดีที่สุดจากการทดสอบด้วยเทคนิค Agar overlay เมื่อศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมพบว่าสายพันธุ์ S2 และ T0 เจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมกว้าง คือ สภาวะที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-8% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-10 และอุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส ดังนั้นแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมากที่สุด คือ สายพันธุ์ S2 เนื่องจากไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ยังยั้งการเจริญของ *V. harveyi* สามารถย่อยโปรตีนและไขมันและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งทะเลได้ดี โดยสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียชนิดนี้ได้เป็น *Micrococcus* sp. สายพันธุ์ S2 แต่ควรมีการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การย่อยสารอาหารและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในกุ้งทะเลต่อไป

คำสำคัญ : โพรไบโอติก; กุ้งกุลาดำ; เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ; สารอาหาร; ความยั่งยืน

** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +66 3874 5900 ต่อ 3120, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: subunti@buu.ac.th*

http://journal.rmutp.ac.th/

Screening of Bacteria Isolated from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Intestine Using as Probiotics in Aquaculture

Subuntith Nimrat[1]* Wuttisak Saksit[1] and Verapong Vuthiphandchai[2]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri

[2] Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri

[1, 2] 169 Long Had Bangsaen Road, Saensuk Subdistrict, Mueang District, Chon Buri 20131

Received 12 March 2021; Revised 13 July 2021; Accepted 16 August 2021

Abstract

In this study, 14 bacterial strains isolated from gastrointestinal tract of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) was investigated for their probiotic potential. The results showed that 6 strains, namely S1, S3, S6, S7, T4 and T5 were able to degrade 3 nutrient substances including protein, starch, and lipid among which S3, S7, and S2 were the best tested nutrient-degrading bacteria, respectively. Six bacterial strains were unable to lyse red blood cells including S2, S3, T0, T1, T2 and T3. S2 strain showed the strongest antibacterial activity against shrimp pathogenic *Vibrio harveyi* following an agar overlay technique. Based on environmental tolerance tests, S2 and T0 strains grew well under wide ranges of environmental conditions, e.g. sodium chloride concentration (0-8%), pH (6-10), and temperature (25-37°C). As a consequence, S2 strain had the most probiotic potential for shrimp culture owing to no hemolysis of red blood cells, inhibition of *V. harveyi* growth, protein and lipid degrading ability, and high environmental tolerance for shrimp cultivation. The strain was identified as *Micrococcus* sp. S2. However, additional study focused on immune response, nutrient digestibility and growth promotion of the strain should be further performed in marine shrimp.

Keywords : Probiotic; Black Tiger Shrimp; Aquaculture; Nutrient; Sustainability

** Corresponding Author. Tel.: +66 3874 5900 ต่อ 3120, E-mail Address: subunti@buu.ac.th*

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศชั้นนำของโลกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลและส่งออกผลิตภัณฑ์จากกุ้งทะเล โดยปริมาณผลผลิตกุ้งทะเลจากการเพาะเลี้ยงในปี พ.ศ. 2560 สูงถึงเกือบ 4 แสนตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 67,000 ล้านบาท [1] แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงกุ้งในเชิงอุตสาหกรรมแบบหนาแน่นทำให้เกษตรกรประสบปัญหาต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นโรคระบาดจากแบคทีเรีย เช่น โรคเรืองแสงจาก *Vibrio harveyi* โรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome) หรือเรียกว่ากลุ่มอาการตับและตับอ่อนตายเฉียบพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome) ที่เกิดจาก *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์ และโรคที่เกิดจากไวรัส ได้แก่ โรคกล้ามเนื้อตายจาก Infectious Myonecrosis Virus โรคตัวพิการจาก Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus และโรคที่เกิดจาก Hepatopancreatic Parvovirus เป็นต้น จึงทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเพื่อลดการระบาดของโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง แต่การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างอิสระ ไร้ขอบเขตและขาดการควบคุมก่อให้เกิดผลเสียหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นการอุบัติและการแพร่กระจายของแบคทีเรียดื้อยาในสัตว์ มนุษย์และสิ่งแวดล้อม การตกค้างและสะสมของยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ เมื่อมนุษย์บริโภคเข้าไปอาจมีผลโดยตรงต่อสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยตามปกติในลำไส้ของมนุษย์หรือจุลินทรีย์ที่ดื้อยาอาจเพิ่มจำนวนขึ้นภายในลำไส้ จนกระทั่งไปรบกวนการทำงานหรือการป้องกันการติดเชื้อของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ รวมทั้งทำให้เกิดการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ เป็นต้น [2]

นอกเหนือจากความกังวลด้านสุขภาพที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะและแบคทีเรียดื้อยา ปัจจุบันผู้บริโภคมีความใส่ใจในอาหารเพื่อสุขภาพ ปราศจากสารอันตรายเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความสนใจในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น โดยหนึ่งในวิธีการที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน คือ การใช้โพรไบโอติกหรือสารเสริมชีวนะ F.J. Gatesoupe [3] ได้ให้คำนิยามของโพรไบโอติกว่า เซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดวิธีหนึ่งแล้วสามารถอาศัยและมีชีวิตอยู่ได้ภายในลำไส้เจ้าบ้านเพื่อพร้อมปรับปรุงสุขภาพเจ้าบ้านให้ดีขึ้น โพรไบโอติกที่ดีจะทำให้จุลินทรีย์ภายในลำไส้สมดุล ลดปัญหาการติดเชื้อภายในทางเดินอาหาร ช่วยให้การดูดซึมสารอาหารดีขึ้นและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้ จุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ ได้แก่ แบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus*, *Bacillus* และ *Enterococcus* และยีสต์ เช่น *Saccharomyces* หรือเชื้อผสม เป็นต้น [4]-[7] การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลช่วยเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการเจริญเติบโต ปรับปรุงคุณภาพน้ำ รักษาความสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้ง และป้องกันโรคจากแบคทีเรียก่อโรค [4]-[8] ประเทศไทยได้มีการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างแพร่หลายมามากกว่า 10 ปี จากข้อมูลการสำรวจการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง 60 แห่ง ในจังหวัดระยองระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2549 ถึงมกราคม พ.ศ. 2550 พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกว่าร้อยละ 60 โดยเกษตรกรนำโพรไบโอติกมาผสมกับอาหารและนำโพรไบโอติกผสมน้ำสาดรอบบ่อเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้ง [9] โพรไบโอติกหลายชนิดที่คัดแยกได้ในประเทศไทยได้รับการพิสูจน์และยอมรับถึงประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ยกตัวอย่างเช่น *Bacillus* S11 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มจำนวนและลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ รวมทั้งเพิ่มการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* [10] นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วย *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. thuringiensis* ในการ

เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าแบคทีเรียผสมดังกล่าวสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต การรอดชีวิตและมีบทบาทในการปรับปรุงจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ [4] แบคทีเรียผสมกลุ่มเดียวกันนี้ยังถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต การรอดชีวิต ปรับปรุงคุณภาพน้ำ ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และเพิ่มความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* [8]

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้งและทดแทนการใช้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาสูงและอาจจะไม่เหมาะกับสภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติย่อยสลายโปรตีน แป้งและไขมัน

สุ่มจับกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชนในอำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา แล้วขนส่งมายังบ่ออนุบาลในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำกุ้งกุลาดำ 20 ตัว มาแช่ในสารละลายฟอร์มาลิน (0.05 กรัมต่อลิตร) นาน 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียภายนอก นำลำไส้กุ้งกุลาดำเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.85% Normal Saline Solution แล้วดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์และขีดเป็นจุดบนอาหาร Skim Milk Agar, Starch Agar และ Tributyrin Agar เมื่อบ่มจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ครบ 2-3 วัน วัดวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Skim Milk Agar และ Tributyrin Agar เพื่อประเมินความสามารถย่อยโปรตีนและไขมัน ตามลำดับ และราดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร Starch Agar และวัดวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียเพื่อประเมินความสามารถย่อยแป้ง จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยคำนวณจากขนาดวงใสหารด้วยขนาดโคโลนี [11]

2.2 การยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ดำเนินการทดสอบด้วย 2 เทคนิค ได้แก่ Agar Well Diffusion และ Agar Overlay โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar Well Diffusion [11] เริ่มจากนำแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บส่วนใสด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหาร Nutrient Agar ที่เติม 3% NaCl และป้ายด้วยแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง คือ *Vibrio harveyi* ความเข้มข้น 0.01 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่วัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง คำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสลบด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม

การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar overlay [12] นำแบคทีเรียที่แยกได้มาปรับความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFU/mL จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร Nutrient Agar ที่เติม 3% NaCl บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเททับผิวหน้าอาหารด้วย Nutrient Soft Agar (0.7% agar) ที่มี *V. harveyi* ความเข้มข้น 0.01 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง คำนวณ

ความกว้างของบริเวณยับยั้งจากเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสลบด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

2.3 ความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้ง

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำขีดลงบนอาหาร Blood Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตการณ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรีย เพื่อนำสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไปศึกษาต่อไป

2.4 คุณสมบัติการทนต่อสภาพแวดล้อม

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วปรับความเข้มข้นให้เป็น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดูด Cell Suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Nutrient Broth ที่เติม 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% NaCl และ Nutrient Broth ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 4, 6, 7, 8 และ 10 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือและค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ นอกจากนี้ดูด Cell Suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Nutrient Broth บ่มที่อุณหภูมิ 10, 25, 37 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ หลังจากบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อประเมินการเจริญของเซลล์ โดยสภาวะที่แบคทีเรียทดสอบมีค่าการดูดกลืนแสงสูงจะบ่งชี้ว่าสภาวะนั้นแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีกว่าสภาวะที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ ซึ่งในช่วงเริ่มต้นการทดลองแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีค่าการดูดกลืนแสงที่สภาวะต่างๆ อยู่ในช่วง 0.01-0.0.2

2.5 จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี [13] และ API Test Kits (BioMerieux, Marcy I' Etoile, France)

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

แบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำในครั้งนี้มีทั้งหมด 14 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกได้ผลการทดลองดังนี้

3.1 คุณสมบัติการย่อยสลายโปรตีน แป้งและไขมัน

แบคทีเรีย 6 ไอโซเลท สามารถย่อยสารอาหารทั้ง 3 ชนิดได้ ได้แก่ S1, S3, S6, S7, T4 และ T5 โดยสายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีน แป้งและไขมันได้ดีที่สุด คือ S3 (3.81), S7 (2.0) และ S2 (3.30) ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำในการย่อยโปรตีน แป้งและไขมัน

Isolate ID	Protein	Starch	Lipid
S1	3.05	1.0	1.85
S2	3.70	-	3.30
S3	3.81	1.0	2.06
S4	1.61	-	-
S5	1.5	-	-
S6	1.79	1.0	1.81
S7	2.96	2.0	2.18
S8	1.59	-	-
T0	-	-	1.19
T1	-	-	2.04
T2	2.33	-	2.16
T3	-	1.4	1.33
T4	1.67	1.4	1.27
T5	1.97	1.3	1.37

–: no bacterial growth on the medium

โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ สัตว์บกและสัตว์น้ำ รวมถึงกุ้งในการส่งเสริมการเจริญเติบโต การทำงานและองค์ประกอบของโครงสร้างร่างกาย ตามปกติแล้วอาหารกุ้งทางการค้ามักประกอบด้วยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักตั้งแต่ 28-57% ของน้ำหนักอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของกุ้ง [14] นอกจากนี้ยังประกอบด้วยไขมันตั้งแต่ 6-10% [15] ดังนั้นหากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสารอาหารเหล่านี้ได้ดีก็น่าจะทำให้ระบบทางเดินอาหารของกุ้งย่อย ดูดซึมและใช้สารอาหารได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง [3], [7]

3.2 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi*

ฤทธิ์การยับยั้ง *V. harveyi* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion ของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำพบในบางสายพันธุ์เท่านั้น ได้แก่ S2, S3 และ T2 โดยมีประสิทธิภาพเท่ากับ + ในขณะที่แบคทีเรียเหล่านี้มีฤทธิ์การยับยั้ง *V. harveyi* สูงขึ้นเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Agar Overlay โดย S3 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (+++) รองลงมาคือ S2 และ T2 (++) ดังตารางที่ 2 จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียพบว่า S3 จัดจำแนกได้เป็น *Bacillus pasteurii* และ S2 และ T2 จัดจำแนกได้เป็น *Micrococcus* sp. ตามปกติแล้วแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลากหลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ (Polymyxin, Bacitracin และ Gramicidin) แบคเทอริโอซิน ซิเดอร์โรฟอร์ ไลโซไซม์และกรดอินทรีย์ต่างๆ [3] ส่วนแบคทีเรียสกุล *Micrococcus* นั้นก็มีรายงานความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกัน ได้แก่ *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Aeromonas hydrophila* [16], [17] การศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยเทคนิค Agar Overlay มีค่าสูงกว่าการทดสอบด้วยเทคนิค Agar Well Diffusion ทั้งนี้อาจเกิดจากการผลิตสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียในขณะทดสอบ การระเหยของสารออกฤทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในขณะทดสอบด้วย Agar well diffusion และสารออกฤทธิ์เป็นสารที่ยึดเกาะกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Membrane-bound Agents) [18] ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค Agar Overlay เป็นเทคนิคที่ดีในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *V. harveyi* ของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Agar well diffusion และ Agar overlay methods

Isolate ID	Agar well	Agar overlay
S1	-	-
S2	+	++
S3	+	+++
S4	-	+
S5	-	-
S6	-	+
S7	-	+
S8	-	-
T0	-	-
T1	-	-
T2	+	++
T3	-	+
T4	-	-
T5	-	+

- = no inhibition zone, + = 1-2 mm, ++ = 3-5 mm, +++ =6-8 mm

3.3 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

จากแบคทีเรียทั้ง 14 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ได้แก่ S2, S3, T0, T1, T2 และ T3 (ตารางที่ 3) การที่เชื้อใดสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อาจเป็นการบ่งชี้เบื้องต้นว่าเชื้อนั้นมี

ความสามารถในการก่อโรค เนื่องจากผลิตสาร Hemolysin ที่มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง และมักมีผลต่อกลไกการทำลายเชื้อของเม็ดเลือดขาวในระหว่างการติดเชื้อ [19] แต่อย่างไรก็ตามการแตกของเม็ดเลือดแดงอาจเกิดจากสาเหตุอื่นได้เช่นกัน เช่น สารลดแรงตึงผิวที่แบคทีเรียผลิตขึ้น เป็นต้น [20] ดังนั้นหากแบคทีเรียใดมีความสามารถก่อโรคจะไม่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเป็นอันขาด ถึงแม้ว่าแบคทีเรียนั้นจะมีคุณสมบัติอื่นที่ดี เนื่องจากหากหลุดไปในสิ่งแวดล้อมก็จะก่อให้เกิดการแพร่ระบาดโรคไปสู่มนุษย์หรือสัตว์ต่างๆ ทำให้สัตว์หรือมนุษย์ป่วยและล้มตายได้ และอาจทำให้เกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจในทางอ้อมอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงนำแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมาทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำบนอาหาร Blood Agar

Isolate ID	Hemolysis pattern	Isolate ID	Hemolysis pattern
S1	β-hemolysis	S8	β-hemolysis
S2	γ-hemolysis	T0	γ-hemolysis
S3	γ-hemolysis	T1	γ-hemolysis
S4	α-hemolysis	T2	γ-hemolysis
S5	α-hemolysis	T3	γ-hemolysis
S6	β-hemolysis	T4	β-hemolysis
S7	β-hemolysis	T5	β-hemolysis

β-hemolysis = complete hemolysis of red blood cells, α-hemolysis = partial hemolysis of red blood cells, γ-hemolysis = no hemolysis of red blood cells

3.4 การจัดจำแนกแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมาจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ

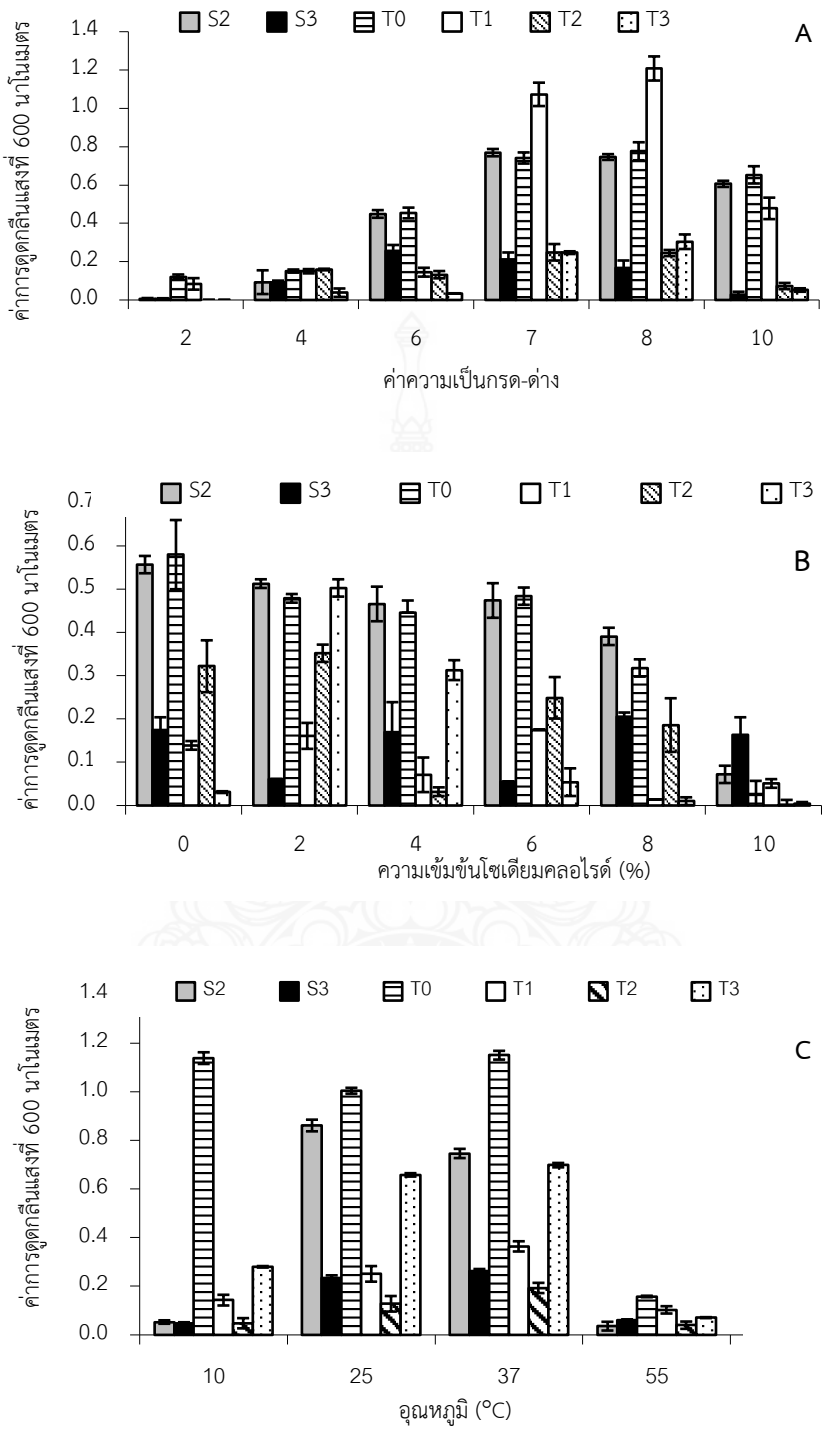
Isolate ID	Bacterial species
S2	*Micrococcus* sp.
S3	*Bacillus pasteurii*
T0	*Methylococcus* sp.
T1	*Pantoea* sp.
T2	*Micrococcus* sp.
T3	*Listeria denitrificans*

3.5 การทนต่อสภาพแวดล้อมของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้ง 6 สายพันธุ์ มาศึกษาการทนต่อความเป็นกรด-ด่าง พบว่า *Micrococcus* sp. S2 และ *Methylococcus* sp. T0 เจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 6-10 ส่วน *Pantoea* sp. T1 เจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 7-10 (รูปที่ 1A) การทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ พบว่า *Micrococcus* sp. S2 และ *Methylococcus* sp. T0 เจริญที่ดีที่สุดและกว้างที่สุดคือ เจริญได้ดีในโซเดียมคลอไรด์ 0-8 % โดย *Micrococcus* sp. S2 เจริญได้ดีที่สุดในช่วงความเค็มเกลือดังกล่าว (รูปที่ 1B) สำหรับการทนต่ออุณหภูมิต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ *Methylococcus* sp. T0 โดยเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-37 องศาเซลเซียส ส่วน *Micrococcus* sp. S2 และ *L. denitrificans* T3 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1C)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีข้อดีต่างกัน โดย *Micrococcus* sp. S2 สามารถย่อยโปรตีนและไขมันได้ดี ทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและความเข้มข้นเกลือกว้าง ส่วน *B. pasteurii* S3 สามารถย่อยได้ทั้งโปรตีน ไขมันและแป้ง แต่ทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ไม่ดีนัก และ *Methylococcus* sp. T0 สามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ แต่ย่อยสลายได้เพียงไขมันเท่านั้น เป็นต้น เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของการเป็น

โพรไบโอติกพบว่า *Micrococcus* sp. S2 มีความเหมาะสมในการใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งมากที่สุด เนื่องจากไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง มีความสามารถในการย่อยโปรตีนและไขมัน ยับยั้ง *V. harveyi* ได้ในระดับหนึ่ง เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่างกว้างและอุณหภูมิกว้าง คือ 0-8%, 6-10 และ 25-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทำให้น่าจะรอดชีวิตได้ดีในสภาวะการเลี้ยงกุ้งในน้ำทะเลที่มีความเป็นด่างและความเค็มประมาณ 1-3% โดย M. Thongsom and L. Chanudom [21] ได้คัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกั้งตั๊กแตน พบว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวน 7 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 3-6 สามารถย่อยแป้ง โปรตีนและไขมัน และยับยั้ง *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ได้ การศึกษาก่อนหน้านี้ยังได้ยืนยันความสำเร็จของการใช้แบคทีเรียสกุล *Micrococcus* นั่นคือ *M. luteus* เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยพบว่า *M. luteus* สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต การนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต การรอดชีวิตและความสามารถในการต้านทานต่อโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ได้อย่างชัดเจน [16] รวมทั้ง *Micrococcus* sp. บางสายพันธุ์ยังถูกนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้าสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่จำหน่ายในประเทศไทย ผสมกับแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดอื่น เช่น *Bacillus* และ *Staphylococcus* เป็นต้น [11] เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีบทบาทในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านจุลชีพกลุ่ม Antimicrobial Peptides ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งกุลาดำที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก White Spot Virus [22] ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ก็ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเช่นเดียวกัน ได้แก่ *Bacillus* [4]-[6], [8] การศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของเชื้อเดี่ยวซึ่งอาจให้ผลไม่ดีนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค แบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำในครั้งนี้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [16, 17, 21] แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางสายพันธุ์ คือ *Micrococcus* sp. S2 เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนและไขมันได้สูง ซึ่งสารอาหารทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารกุ้งทะเล และแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมกว้าง ทำให้มีความเหมาะสมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในสภาวะแวดล้อมของเมืองไทย แต่อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและครอบคลุมคุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงควรมีการศึกษาการใช้เชื้อผสมร่วมกับแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป ซึ่งอาจจะให้ผลการทดลองที่แตกต่างออกไป การใช้โพรไบโอติกแบบเชื้อผสมได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกุ้งทะเล [4, 5, 6, 8] รวมทั้งผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้าหลายชนิดมักประกอบด้วยจุลินทรีย์ผสม [11] เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถที่แตกต่างกัน การใช้จุลินทรีย์ผสมจึงช่วยส่งเสริมบทบาทหน้าที่ของโพรไบโอติกที่แตกต่างกันออกไป ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยระบบการย่อยอาหารและดูดซึมสารอาหาร การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการยับยั้งเชื้อก่อโรค เป็นต้น โดย *Micrococcus* sp. S2 อาจนำไปเป็นเชื้อผสมร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีคุณสมบัติที่ดีที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค ดังรายงานของ S. Nimrat et al. [8] ที่พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเจริญร่วมกัน (Co-culture) ของแบคทีเรียผสม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. thuringiensis* ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *V. harveyi*



รูปที่ 1 ความสามารถในการเจริญในสภาพแวดล้อม ได้แก่ A) ค่าความเป็นกรด-ด่าง, B) ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ และ C) อุณหภูมิ แตกต่างกัน หลังการบ่มนาน 24 ชั่วโมง; S2 = *Micrococcus* sp., S3 = *B. pasteurii,* T0 = *Methylococcus* sp., T1 = *Pantoea* sp., T2 = *Micrococcus* sp. และ T3 = *L. denitrificans*

เชื้อผสมร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีคุณสมบัติที่ดีที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค ดังรายงานของ S. Nimrat et al. [8] ที่พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเจริญร่วมกัน (Co-culture) ของแบคทีเรียผสม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. thuringiensis* มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *V. harveyi* ในขณะที่ส่วนใสที่ได้จากเชื้อเดี่ยวไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค รวมทั้งอาจนำ *Micrococcus* sp. S2 มาผสมร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติยับยั้ง *V. harveyi* เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* F6 และ *Enterococcus* S2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย โดยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่สามารถผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยสารอาหารและดูดซึมสารอาหาร รวมทั้งยังสามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้ในหลอดทดลองและเพิ่มความต้านทานต่อโรคเรืองแสงที่เกิดจาก *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ [23] นอกจากนี้ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การป้องกันโรค การย่อยสารอาหาร การดูดซึมสารอาหาร การส่งเสริมการเจริญเติบโตและการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียชนิดนี้ที่ใช้แบบเชื้อผสมในกุ้งทะเลต่อไป

4. สรุป

Micrococcus sp. S2 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมากที่สุด เนื่องจากไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง มีความสามารถในการย่อยโปรตีนและไขมัน ยับยั้ง *V. harveyi* ได้ในระดับหนึ่ง เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่างกว้างและอุณหภูมิกว้าง คือ 0-8%, 6-10 และ 25-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทำให้น่าจะมีชีวิตรอดได้ดีในสภาวะการเลี้ยงกุ้งในน้ำทะเลที่มีความเป็นด่างและความเค็มประมาณ 1-3% และน่าจะส่งเสริมการย่อยสารอาหารทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดี โดยอาจจะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกแบบเชื้อผสมกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้หรือสายพันธุ์อื่นที่มีความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* แต่การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาในระดับหลอดทดลอง ดังนั้นจึงควรศึกษาศักยภาพการเป็นโพรไบโอติกของสายพันธุ์นี้ในกุ้งทะเลต่อไป เช่น การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การป้องกันโรค การย่อยสารอาหาร การส่งเสริมการดูดซึมสารอาหาร การส่งเสริมการเจริญเติบโตและการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Fisheries Statistics of Thailand, *Statistics of Marine Shrimp Culture 2017*. Fisheries Statistics Analysis and Research Group, Fisheries Development Policy and Strategy Division, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, No. 9/2019, 2019.

[2] F.C. Cabello, H.P. Godfrey, A.H. Buschmann and H.J. Dölz, “Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance,” *Lancet*

Infectious Diseases, vol. 16, no. 7, pp. e127-e133, Jul. 2016.

[3] F.J. Gatesoupe, "The use of probiotics in aquaculture," *Aquaculture*, vol. 180, no. 1-2, pp. 147-165, Oct. 1999.

[4] T. Boonthai, V. Vuthiphandchai and S. Nimrat, "Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)," *Aquaculture Nutrition,* vol. 17, no. 6, pp. 634-644, Dec. 2011.

[5] S. Nimrat, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, "Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae," *Animal Feed Science and Technology*, vol. 169, no. 3-4, pp. 244-258, Nov. 2011.

[6] S. Nimrat, S. Suksawat, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, "Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)," *Veterinary Microbiology*, vol. 159, no. 3-4, pp. 443-450, Oct. 2012.

[7] N.V. Hai, "The use of probiotics in aquaculture: review," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 119, no. 4, pp. 917-935, Oct. 2015.

[8] S. Nimrat, W. Khaopong, J. Sangsong, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, "Improvement of growth performance, water quality and disease resistance against *Vibrio harveyi* of postlarval whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by administration of mixed microencapsulated *Bacillus* probiotics," *Aquaculture Nutrition*, vol. 26, no. 5, pp. 1407-1418, Oct. 2020.

[9] S. Nimrat, P. Kaewmanee, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, "Field survey on the use of probiotic in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture in Rayong province," *Burapha Science Journal*, vol. 14, no. 1, pp. 56-69, 2009.

[10] S. Rengpipat, W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta, "Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth," *Aquaculture*, vol. 167, no. 3-4, pp. 301-313, Sep. 1998.

[11] S. Nimrat and V. Vuthiphandchai, "In vitro evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 22, pp. 4643-4650, 2011.

[12] S.R. Spelhaug and S.K. Halander, "Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceous*," *Journal of Food Protection*, vol. 52, no. 12, pp. 856-862, Dec. 1989.

[13] J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.

[14] S.Y. Shiau, "Nutrient requirements of penaeid shrimps," *Aquaculture*, vol. 164, no. 1-4, pp. 77-93, May 1998.

[15] D.M. Akiyama, W.G. Dominy and A.L. Lawrence, "Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry," in *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*, American Soybean Association, Singapore, 1991, pp. 80-98.

[16] A.M. Abd El-Rhman, Y.A.E. Khattab and A.M.E. Shalaby, "*Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*," *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 27, no. 2, pp. 175-180, Aug. 2009.

[17] A. Akbar, U. Sitara, I. Ali, N. Muhammad and S.A. Khan, "Isolation and characterization of biotechnologically potent *Micrococcus luteus* strain from environment," *Pakistan Journal of Zoology*, vol. 46, no. 4, pp. 967-973, Aug. 2014.

[18] B.H. Çadirci and S. Çitak, "A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 4, no. 4, pp. 237-241, Apr. 2005.

[19] M. Zaky and W. Zina, *Pathogenic Hemolytic Bacteria.* Germany: LAP Lambert Academic Publishing, 2016.

[20] N. Butkhot, P. Soodsawaeng, T. Boonthai, V. Vuthiphandchai and S. Nimrat, "Properties and safety evaluation of *Bacillus velezensis* BUU004 as probiotic and biopreservative in seafood products," *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol. 51, no. 2, pp. 201-211, Jun. 2020.

[21] M. Thongsom and L. Chanudom, "Isolation of lactic acid bacteria from mantis shrimp (*Harpiosquilla raphidea*) intestine for probiotic development," *RMUTSV Research Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 232-244, 2019.

[22] S.P. Antony, I.S.B. Singh, R.M. Jose, P.R.A. Kumar and R. Philip, "Antimicrobial peptide gene expression in tiger shrimp, *Penaeus monodon* in response to gram-positive bacterial probionts and white spot virus challenge," *Aquaculture*, vol. 316, no. 1-4, pp. 6-12, Jun. 2011.

[23] S. Nimrat, P. Tanutpongpalin, K. Sritunyalucksana, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai, "Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics," *Aquaculture International*, vol. 21, no. 3, pp. 655-666, Oct. 2013.