



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Effect of Bacteria Isolated from Fish Culture Ponds on Inhibition of *Streptococcus agalactiae*, the Pathogenic Bacteria in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

นามผู้วิจัย นางสาวสุปราณี พึ่งแพง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กังสดาลย์ บุญปราบ, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุวิทย์ รัชกิจจานุกิจ, Dr. Scient)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงษ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคใน
ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Effect of Bacteria Isolated from Fish Culture Ponds on Inhibition of *Streptococcus*
agalactiae, the Pathogenic Bacteria in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

โดย

นางสาวสุปราณี พึ่งแพง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

สุปราณี พึ่งแพง 2550: ผลของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาต่อการยับยั้งเชื้อ
Streptococcus agalactiae ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปรินญาวิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประชานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์
ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D. 93 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในสถานีวิจัยประมง
กำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยทำ
การเก็บตัวอย่างจากน้ำจำนวน 6 ตัวอย่าง ถ้าใส่และเมื่อของปลานิลอย่างละ 2 ตัวอย่าง ได้เชื้อ
แบคทีเรียทั้งหมด 114 isolates และเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวไปทำการทดสอบความสามารถในการ
ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* โดยวิธี Cross streak technique พบว่ามีแบคทีเรียเพียง
4 isolates คือ isolate B-1, isolate B-2, isolate B-3 และ isolate B-4 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
ดังกล่าวได้และภายหลังจากการนำแบคทีเรียทั้ง 4 isolates ไปทดสอบทางชีวเคมี พบว่า isolates B-
1, B-2 และ B-4 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* และ isolate B-3 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B.*
subtilis และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย isolates B-1, B-3 และ B-4 ในการ
ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ด้วยวิธี Agar well diffusion technique พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B.*
licheniformis รหัส B-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สูงที่สุด นอกจากนี้
ได้ทำการประเมินหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแบคทีเรียชนิดนี้เจริญ
อยู่โดยวิธี SDS-PAGE ยังพบว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 4 kDa มีความสามารถในการ
ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจนและเมื่อนำแบคทีเรีย *B.*
licheniformis รหัส B-1 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ภายใต้อาณ
หึ่งทดลองโดยการแช่เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10^5 , 10^6 และ 10^7 cfu/มิลลิลิตร ร่วมกับ
เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/มิลลิลิตร นาน 14 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B.*
licheniformis รหัส B-1 ทั้ง 3 ความเข้มข้นสามารถลดอัตราการตายของปลานิลได้อย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีอัตราการตายสะสมที่ 14 วัน ของการทดลองเป็น
 15.33 ± 2.93 , 13.67 ± 2.62 , 8.33 ± 2.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ *B.*
licheniformis รหัส B-1 มีอัตราการตายสะสมสูงถึง 61.67 ± 2.58 เปอร์เซ็นต์

Supranee Pungpang 2007: Effect of Bacteria Isolated from Fish Culture Ponds on Inhibition of *Streptococcus agalactiae*, the Pathogenic Bacteria in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoome, Ph.D. 93 pages.

The efficiency of bacteria isolated from fish culture ponds in Kamphangsaeen Fisheries Research Station (Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Nakornprathom Province) on inhibition of pathogenic bacteria, *Streptococcus agalactiae* was investigated. Total of 114 isolates were collected from water (6 samples) and some components of fish bodies of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) such as intestine (2 samples) and mucus (2 samples). The preliminary screening test of these bacteria using the cross streak method was employed. The result revealed that there were only 4 isolates that showed high performance in inhibiting of *S. agalactiae*. These bacteria were named B-1, B-2, B-3 and B-4, and were consequently known as *Bacillus licheniformis* for isolates B-1, B-2 and B-4, while isolate B-3 was *B. subtilis*. However, in second screening using the well diffusion assay, the highest efficiency of inhibition was obviously observed in *B. licheniformis* B-1 bacteria. Using the SDS-PAGE assay, a protein fragment approximately 4 kDa extracted from culturing broth medium of *B. licheniformis* B-1 was identified to be able in controlling *S. agalactiae in vitro*. Additionally, the efficiency of *B. licheniformis* B-1 bacteria was also evaluated the ability of protection fingerling fishes (25 days old) from *S. agalactiae* in lab scale. Interestingly, application of 10^5 , 10^6 and 10^7 cfu/ml of *B. licheniformis* B-1 by long immersion could protect experimental fishes significantly different ($P < 0.05$) from control group when they were simultaneously exposed to 10^6 cfu/ml of *S. agalactiae* for 14 days by accumulated mortality of 15.33 ± 2.93 , 13.67 ± 2.62 , 8.33 ± 2.77 and 61.67 ± 2.58 % respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสุนา-ประเสริฐ-ประทีป พึ่งแพง คุณแม่ คุณพ่อและน้องชาย
ที่เป็นกำลังใจให้ ขอบพระคุณครูอาจารย์ที่มอบวิชาความรู้ให้ข้าพเจ้า ขอบพระคุณอาจารย์
ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำการทำ
วิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มงานทดลองจนถึงการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วย
ดีและสอนให้รู้จักการทำงานเขียน ความอดทน เพื่อจบไปเป็นนักวิจัยที่ผลิตผลงานที่มีคุณภาพเพื่อ
ประเทศชาติ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กังสดาลย์ บุญปราบ กรรมการ
ที่ปรึกษาวิชาเอก ที่คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริยัน ัญญกิจจานุกิจ
กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุภาพร กลิ่นคง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราห์
เทพาหุติ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ ดร. รัชนิ สงประยูร และสมาชิกห้องปฏิบัติ A 410 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชัย ไฉนสีต-
รัตน์ และสมาชิกห้องปฏิบัติ A 309 รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีชัยชน และสมาชิก
ห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำที่กรุณาให้ความช่วยเหลือพร้อมให้คำปรึกษาแนะนำใน
การทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ
คำปรึกษาชี้แนะในทุก ๆ เรื่อง ไม่ว่าจะเป็นพี่แก้ว พี่นัท พี่สุ พี่รัตน์ เตรต เป้ คุณพรต รวมถึงคนอื่น
ๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึงที่ช่วยทำให้วิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ ขอบพระคุณครอบครัวคุณมุกดา น้ำผึ้ง
ร้านครัวมุกดาหาร ครอบครัวหุตากร ที่ทำให้ข้าพเจ้ามีรายได้สำหรับการดำเนินชีวิต และการ
ทำงานวิจัย วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณ
ของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการ
บัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
กระทรวงศึกษาธิการ

สุปราณี พึ่งแพง

กันยายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	35
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ภาคผนวก	84
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนตัวอย่างและชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่าง	35
2	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	50
3	ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis โดยเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 cfu/มิลลิลิตร ในช่วงระยะเวลา 14 วัน	66
ตารางผนวกที่		
1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร กับปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	85
2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.	86
3	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ทดสอบความปลอดภัยของเชื้อ <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันภายใน 14 วัน	90
4	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ทดสอบความคุ้มโรคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันภายใน 7 วัน	91
5	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย <i>S. agalactiae</i> ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันภายใน 14 วัน	92

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. agalactiae</i> โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธี Cross streak techniques	40
2	ลักษณะการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion techniques	43
3	ลักษณะของเชื้อ <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง	44
4	ลักษณะของเชื้อ <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง เมื่อย้อมสีแบบ Gram's stain	45
5	ลักษณะของเชื้อ <i>B. subtilis</i> รหัส B-3 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง	46
6	ลักษณะของเชื้อ <i>B. subtilis</i> รหัส B-3 บนอาหาร Todd-Hewitt agar อายุ 24 ชั่วโมง เมื่อย้อมสีแบบ Gram's stain	47
7	ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของสารยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. agalactiae</i> จากเชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1	54
8	อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1	57
9	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายสะสมเฉลี่ยของปลานิลที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis ด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>S. agalactiae</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	60
10	อัตราการตายสะสมของปลานิลที่แช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย <i>B. licheniformis</i> รหัส B-1 หลังจากถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis โดยเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 cfu/ มิลลิลิตร	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 Standard curve ของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	85
2 Standard curve ของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.	86
3 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนกับน้ำหนักโมเลกุล	87