T159674

ศิริเพ็ญ สังข์ชัย : โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio harveyi* (PROBIOTIC *Bacillus subtilis* BP11 FOR SUPPLEMENTATION IN BLACK TIGER SHRIMP FEED FOR PREVENTION FROM *Vibrio harveyi*)

อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ หน้า. 131 ISBN 974-17-5160-5

การแจงนับแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบปริมาณแบคทีเรียรวม $8.5x10^3$ - $5.9x10^7$CFU/กรัมลำไส้ เมื่อใช้อาหารจำเพาะตรวจพบ *Vibrio* sp. 3x10 - $1.31x10^2$CFU/กรัมลำไส้ และ *Bacillus* sp. $8.5x10^3$CFU/กรัมลำไส้ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลตที่แยกได้กล่าวคือ *Bacillus* P1, *Bacillus* P2 และ *Bacillus* P11 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* 639 และ *Escherichia coli* เมื่อนำแต่ละไอโซเลตมาผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วน 2.0 % (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 ในตู้กระจกขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโตและต้านทานโรคได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มอื่นๆ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* P11 ด้วยวิธีทางชีวเคมีและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จัดเป็น *Bacillus subtilis* โดยมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus subtilis* ที่มีรายงานไว้ใน GenBank 99 เปอร์เซ็นต์ การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 ด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 100 วัน (2 ครั้ง) พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสามารถพบเซลล์แบคทีเรียรูปแท่งคล้าย Bacillus ที่บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เมื่อนำกุ้งที่เลี้ยงครบ 100 วันมาชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม กล่าวคือ กุ้งในกลุ่มควบคุมมีการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หลังจากชักนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 4 และ 5 วันของการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร *Bacillus* P11 มีการตายสะสมเพียง 28 เปอร์เซ็นต์และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถตรวจพบ *V. harveyi* 639 ในตับกุ้งที่ตายด้วยวิธี Immunohistochemistry ตรวจไม่พบสารปฏิชีวนะในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 ด้วยวิธี Disk assay และ ชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้าง CM-Test และไม่พบสารปฏิชีวนะตกคางในเนื้อกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ด้วยชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในอาหาร CM-Test การตรวจหาปริมาณ *Bacillus* P11 ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบ *Bacillus* P11 ~10^9 CFU/กรัม หลังจากเก็บอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสม *Bacillus* P11 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 5 เดือน และพบ ~ 10^8CFU/กรัม ในเดือนที่ 6

4472425423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY **TE159674**

KEY WORDS: BACILLUS/PROBIOTICS/BLACK TIGER SHRIMP/FEED SUPPLEMENT / *Vibrio harveyi* 639

SIRIPEN SANGCHAI : PROBIOTIC *Bacillus subtilis* BP11 FOR SUPPLEMENTATION IN BLACK TIGER SHRIMP FEED FOR PREVENTION FROM *Vibrio harveyi*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D.,pp. 131 ISBN 974-17-5160-5

Total bacterial counts of Black tiger shrimp broodstocks's gastrointestinal tracts between $8.5X10^3$ – $5.9X10^7$ CFU/g were enumerated. Based on their growth on the selective media *Vibrio* spp. ($3X10$-$1.31X10^2$ CFU/g) and *Bacillus* spp. ($8.5X10^3$ CFU/g) were identified. *Bacillus* spp., designated as *Bacillus* P1 (BP1), *Bacillus* P2 (BP2) and *Bacillus* P11 (BP11) inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Vibrio harveyi in vitro* were selected for shrimp culture tests. Each strain of the Bacillus was mixed into shrimp diet (2.0%w/w) and feeding shrimp three times a day in 20 litres aquarium. Starting from PL-25 for 2 months better growth of shrimps were detected in BP11 group with high survival of BP11 shrimp after being challenged with *V. harveyi* 1526 (10^7CFU/ml) by immersion technique. Larger scale of shrimp culture with BP11 were twice performed in 400 litres cement tanks for 100 days. It was found that growth and survival of shrimp fed with BP11 were higher than those of the control groups significantly at $p<0.05$. After 100 day all shrimp were challenged with 10^7CFU/ml of *V. harveyi* 639 by immersion technique, fifty percent of shrimp mortality was detected in the control groups in 4 and 5 days from first trial and second trial, respectively. Whereas 28% and 20% of moribund BP11-shrimp were found in first and second trial, consecutively. Confirmation of *V. harveyi* 639 infection on shrimp was performed by microbiological examination and immunohistochemical technique. Under scanning electron microscopic examination BP11 showed the adhesion on gastrointestinal tract's surface of BP11 shrimp. BP11 was identified as *Bacillus subtilis* by biochemical tests and 16S rDNA sequencing (99% homology with 16S rDNA of *B. subtilis*, Gen Bank). No detection of antibiotic in supernatant of BP11 36 h -culture by Disk assay and CM-test. No antibiotic residue in BP11 shrimp by CM-test were assayed. BP11 viability in shrimp diet remained at ~10^9CFU/g for 5 months after storage at 4°C and room temperature and decreased to ~10^8CFU/g after 6 months.