



วารสารแก่นเกษตร  
THAIJO

Content List Available at [ThaiJO](https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj)

## Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj>



### การพัฒนาต้นแบบเครื่องตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรีย อูปรณัจฉริยะเพื่อตรวจการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย vibrio ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

### Development of a bacterial growth tracker (BGT), a smart device to detect growth of *Vibrio* in shrimp farm

บรรพต แซ่ไคว้<sup>1</sup>, สุกัญญา จิตรชนะ<sup>2</sup>, วัชรภรณ์ ช่างเก็บ<sup>2</sup>, ศุภนิช พรธีระภัทร<sup>1</sup>,  
กัลยาณ ศรีธัญญลักษณ์<sup>2</sup> และ รุ่งกานต์ สืบสิงห์<sup>2\*</sup>

Bunpot Saekow<sup>1</sup>, Sukanya Jitchana<sup>2</sup>, Watcharaporn Changkeb<sup>2</sup>,  
Supanit Porntheeraphat<sup>1</sup>, Kallaya Sritunyalucksana<sup>2</sup> and Rungkarn Suebsing<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> ทีมวิจัยเทคโนโลยีเกษตรดิจิทัล, ด้านวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีระบบและเครือข่ายอัจฉริยะ, ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

<sup>1</sup> Digital Agriculture Technology Research Team, Deputy Executive Director Research and Development Intelligent Systems and Networks, National Electronics and Computer Technology Center, National Science and Technology Development Agency

<sup>2</sup> ทีมวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ, กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีสุขภาพสัตว์น้ำแบบบูรณาการ, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

<sup>2</sup> Aquatic Animal Health Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency

**บทคัดย่อ:** เชื้อแบคทีเรียมีความสำคัญในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีทั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาต้นแบบเครื่องตรวจหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง ที่สามารถตรวจได้โดยเกษตรกร สามารถรู้ผลการตรวจได้อย่างรวดเร็ว เพื่อนำผลการตรวจที่ได้ไปใช้ในการบริหารจัดการบ่อเลี้ยงได้อย่างทันท่วงที การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาต้นแบบการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง ต้นแบบดังกล่าวเกิดจากการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวสำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เรียกว่า modified TCBS (MTCBS) โดยทำการทดสอบความจำเพาะของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ต่อเชื้อ *Vibrio* พบว่ามีเพียงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* เท่านั้นที่เจริญเติบโตในอาหาร MTCBS ที่พัฒนาขึ้นได้ ร่วมกับการพัฒนาเครื่องตรวจติดตามวัดเชื้อแบคทีเรียอัตโนมัติ bacterial growth tracker (BGT) ซึ่งเป็นระบบอัจฉริยะในการอ่านผลการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคโนโลยีแสง และบันทึกข้อมูลการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอัตโนมัติ ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วนคือ (1) ส่วนที่เป็น incubator shaker ที่มีช่องสำหรับใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 30 องศาเซลเซียส และ (2) ส่วนอ่านผลที่เป็นเซ็นเซอร์วัดค่าการส่องผ่านของแสงเพื่อวัดความขุ่นของอาหารเหลว MTCBS ที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ส่งไปแสดงที่หน้าจอโดยแปลงผลความขุ่นที่ได้เป็นความเข้มข้นของเชื้อที่มีอยู่ สามารถอ่านผลแบบ real time ได้ การศึกษานี้ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาต้นแบบเครื่อง BGT ในระดับห้องปฏิบัติการ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MTCBS ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในตัวอย่างน้ำ เปรียบเทียบระหว่างเครื่อง BGT กับการอ่านผลด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) โดยการศึกษาต่อไปจะนำต้นแบบเครื่อง BGT ไปทดลองใช้ในงานภาคสนาม

**คำสำคัญ:** เครื่องวัดเชื้อแบคทีเรียอัตโนมัติ; เชื้อ vibrio; modified TCBS; bacterial growth tracker (BGT); บ่อเลี้ยงกุ้ง

**ABSTRACT:** Bacteria is major microorganism in the shrimp pond, which can be both beneficial and pathogenic bacteria. The smart device called “bacterial growth tracker (BGT)” to detect growth of bacteria in shrimp farm that can be performed by farmers, resulting to apply the pond management in a timely manner has been developed.

\*

Corresponding author: [rungkarn.sue@biotec.or.th](mailto:rungkarn.sue@biotec.or.th)

Received: date; September 10, 2021 Accepted: date; February 28, 2022 Published: date; June 30, 2022

The objective of this study was to develop a detection method of *Vibrio* species in shrimp ponds. The modified liquid medium for *Vibrio* (MTCBS) has been developed and tested to be able to grow only *Vibrio* species tested. The selective MTCBS medium was then combined with BGT to detect growth of *Vibrio* spp. BGT is composed of two major parts: (1) the incubator shaker with a compartment for a medium tube and with a temperature control set at 30°C (2) the light transmittance sensor to measure turbidity of medium culture caused by bacterial growth and record the light transmittance in real time at every five minutes of interval. The selective MTCBS medium for *Vibrio* has been used in BGT device to determine *Vibrio* counts in the shrimp culture water. The *Vibrio* bacterial growth test was compared between the BGT and the spectrophotometer in laboratory. This study has successfully developed a prototype BGT that can be further used in the farm.

**Keywords:** smart bacterial detection device; vibrio species; modified TCBS; bacterial growth tracker (BGT); shrimp pond

## บทนำ

เชื้อแบคทีเรียในกุ้งที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งและผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง คือ โรคไวรัสโรซิส (Vibriosis) ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. (Vandenbergh et al., 2003) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งโค้ง (curved rod shape) ใช้แฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 18 – 37 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม microflora สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้ง และจะกลายเป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาส เมื่อกุ้งอ่อนแอจากความเครียดและก่ออันตรายต่อกุ้งได้ (Ruangpan and Kitao, 1991; Otta et al., 1999) มีรายงานการตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีอัตราการตายสูง กุ้งกินอาหารน้อยลง ลอกคราบได้ช้าลง ตับและตับอ่อนผิดปกติ สีเนื้อจะขุ่น กุ้งเกาะขอบบ่อ ตัวกุ้งจะมีจุดและตะกอนเกาะตามผิวและเปลือก เมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อพบส่วนตับและตับอ่อนถูกทำลาย (Robert-Pillot et al., 2010) ในกรณีกุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* มีอาการลอยตามขอบบ่อ ไม่กินอาหารหรือกินอาหารได้น้อยลง สีลำตัวจะขุ่น เหงือกมีสีดำ ตับสีซีด พบอัตราการตายสูงในกุ้งระยะวัยอ่อนถึงวัยรุ่น และถ้าเกษตรกรพบกุ้งเกาะตามขอบบ่อ จะพบกุ้งเรืองแสงในเวลากลางคืน ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์ ลูซิเฟอเรส (Luciferase) (Baticados et al., 1990; Thaithongnum et al. 2006) ส่วน *V. vulnificus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดเสี้ยนดำในกุ้ง (black splint) จะมีการสะสมเม็ดสี (melanin) ที่บริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกของแต่ละปล้องหรือบริเวณใต้แพนหาง (Dalsgaard and Hoi, 1997)

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธีการ เช่น การทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio* คือ thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแข็ง (Baticados et al., 1990; Simidu et al., 1980) เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญจะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้น้ำตาล sucrose ของแต่ละสายพันธุ์ (Thompson et al., 2004) ใช้ระยะเวลาในการรอผลทดสอบนาน 24 ชั่วโมง ต่อมาได้มีการพัฒนาการใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย เช่น เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) วิธีการตรวจมีความไวและความจำเพาะสูง และใช้ระยะเวลาทดสอบน้อยลง (Wei et al., 2014) อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการดังกล่าว ต้องการบุคลากรที่มีประสบการณ์สูง และอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดราคาแพง เช่น เครื่อง thermal cycler จึงเป็นข้อจำกัดของวิธีการตรวจ ต้องส่งตัวอย่างตรวจในห้องปฏิบัติการทำให้ไม่สามารถใช้ในการเฝ้าระวังได้ทันเวลาที่ หรือไม่สามารถตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ตลอดเวลาเพื่อการเฝ้าระวังล่วงหน้า

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือพัฒนาต้นแบบเครื่องตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียอัตโนมัติ (bacterial growth tracker; BGT) เพื่อตรวจหาปริมาณของเชื้อ *Vibrio* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เครื่องต้นแบบ BGT นี้ เป็นการรวมการทำงานของเครื่องบ่มแบบเขย่า (shaking incubator) และระบบแสงที่ใช้ในการวัดค่าการส่องผ่านและค่าการดูดกลืนของแสงจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ไม่ต้องนำตัวอย่างออกมาวัดภายนอก ลดการปนเปื้อนเมื่อนำตัวอย่างออกมาวัด สามารถทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน เป็นเครื่องมือชนิดแรกที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียแบบ real-time ผู้ใช้งานหรือเกษตรกรสามารถทำการทดสอบได้ด้วยตนเอง และนำข้อมูลปริมาณเชื้อแบคทีเรียมาประกอบการตัดสินใจในการป้องกันหรือแก้ปัญหาในบ่อเลี้ยงกุ้งได้อย่างทันเวลาที่ โดยในการศึกษารุ่นนี้ ประกอบด้วย (1) การพัฒนาอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* เรียกว่า modified TCBS (MTCBS) และ (2) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเครื่องตรวจติดตามวัดเชื้อแบคทีเรียอัตโนมัติ

และวิธีการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า และติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

## วิธีการศึกษา

### 1. การพัฒนาเครื่องตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียอัตโนมัติ (bacterial growth tracker; BGT)

เครื่อง BGT จะถูกแบ่งส่วนการทำงานออกเป็นระบบควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ซึ่งประกอบไปด้วยตัวทำความร้อน (Heater) และพัดลมที่ใช้ในการกระจายความร้อนให้กับส่วนของตู้เลี้ยงเชื้อ ระบบการเขย่าแบบหมุน (Orbital shaker) ประกอบไปด้วยมอเตอร์ที่ใช้ในการออกแรงในการหมุนเขย่า เพื่อเปลี่ยนทิศทางในการเขย่า (Gear box) และกลไกเพลาลูกเบี้ยวที่ใช้ในการกำหนดระยะชัก (Stroke) ในการเขย่า เพื่อเขย่าภาดใส่หลอดทดลองในขณะทำการเลี้ยงเชื้อ โดยที่ภาดจะมีช่องใส่หลอดทดลองจำนวน 24 ช่อง และในแต่ละช่องจะมีเซ็นเซอร์วัดค่าการส่องผ่านของแสงจำนวน 24 ชุด มีแหล่งกำเนิดแสงแบบไดโอดเปล่งแสง (LED) 24 หลอดติดตั้งอยู่บนแผงวงจรแหล่งกำเนิดแสงทางด้านซ้ายของช่องใส่หลอดทดลอง และเซ็นเซอร์แสง 24 ตัว ติดตั้งอยู่บนแผงวงจรเซ็นเซอร์แสงทางด้านขวาของหลอดทดลอง วัดการส่องผ่านของแสงโดยเมื่อมีการเปิดแหล่งกำเนิดแสง แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะเคลื่อนที่เข้าไปในท่อนำแสง (Light guide) ทางด้านแหล่งกำเนิดแสง จากนั้นแสงจะเคลื่อนที่ผ่านหลอดทดลองผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง เข้าไปยังท่อนำแสงทางด้านเซ็นเซอร์แสงหลังจากนั้นสัญญาณที่ได้รับจะถูกส่งต่อไปยังชุดควบคุมทางอิเล็กทรอนิกส์ของเครื่องเพื่อที่จะนำค่าที่ได้ไปแสดงในส่วนของการแสดงผล

การวัดค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Vibrio* เมื่อแบคทีเรียเกิดการเจริญเติบโตจะเกิดการแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มจำนวน (Harry et al., 2006) ทำให้เกิดความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถทำการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยอาศัยค่าการส่องผ่านของแสง (Transmittance) เมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวมากแสงที่สามารถส่องผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้จะถูกลดทอนลงไปด้วย เนื่องจากกระเจิงของแสงและการดูดกลืนของแสงเมื่อเคลื่อนที่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเซลล์แบคทีเรีย โดยค่าการส่องผ่านจะสามารถคำนวณได้จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert law)



ภาพเปรียบเทียบการลดทอนของแสงที่ส่องผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเกิดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

$$T = I_T/I_0$$

$$\%T = 100(I_T/I_0)$$

โดยที่ T คือค่าการส่องผ่านของแสง,  $I_T$  คือค่าความเข้มแสงที่ผ่านสารละลาย และ  $I_0$  คือค่าความเข้มแสงก่อนผ่านสารละลาย และค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่สามารถคำนวณได้จากค่า Transmittance ดังต่อไปนี้

$$A = \log_{10} (1/T)$$

$$\text{หรือ } A = \log_{10} (I_0/I_T)$$

เครื่อง BGT มีการควบคุมอุณหภูมิและความเร็วรอบให้คงที่ การอ่านค่าความขุ่นในแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างจากสมการสอบเทียบ (calibration equation) ด้วยสารละลาย McFarland และสอบเทียบค่าความขุ่นจากการตรวจวัดของเครื่อง BGT ในทุกตำแหน่งของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในเครื่องทั้ง 24 หลอด กับเครื่อง spectrophotometer นำค่าความขุ่นที่วัดได้จากเครื่อง BGT มา

หาความสัมพันธ์กับค่าที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer ได้สมการโพลีโนเมียล ( $AX^2+BX+C$ ) ที่จำเพาะของแต่ละหลอด ทั้ง 24 หลอดภายในเครื่อง ด้วยวิธีการนี้ ทำให้เครื่อง BGT มีความถูกต้องเที่ยงตรง และแม่นยำในการอ่านค่าความขุ่นที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียจากทุกหลอด ตามการทดสอบที่ได้ทำการออกแบบไว้ (Ratkowsky, 1982; Duetza and Witholta, 2001)

## 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ที่จำเพาะสำหรับเชื้อกลุ่ม *Vibrio* เท่านั้น โดยเลียนแบบส่วนประกอบที่สำคัญมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบบวุ้นแข็ง TCBS โดยเอา pH indicator (bromothymol blue และ thymol blue) และ agar ออกในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย sucrose 20 กรัม, sodium chloride 10 กรัม, sodium thiosulfate 10 กรัม, sodium citrate 10 กรัม, meat peptone 5 กรัม, casein peptone 5 กรัม, yeast extract 5 กรัม, ox bile 5 กรัม, ferric ammonium citrate 1 กรัม นำส่วนประกอบอาหารเหลวผสมน้ำปริมาตร 1 ลิตร มาต้ม และให้เดือดนาน 1 นาที รอให้อาหารเหลวเย็นลง และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 3. การทดสอบความจำเพาะของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS

การทดสอบความจำเพาะของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ด้วยเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Shewanella khirikhana* นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) เติม 1.5% NaCl ในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (Rattanama et al., 2009; Sritunyalucksana et al., 2005; Prachumwat et al., 2020) จากนั้นปรับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) เท่ากับ 0.05 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS และอาหารเหลว TSB เติม 1.5% NaCl มีปริมาตรรวม 15 มิลลิลิตร นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มาเลี้ยงในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบ 3 ซ้ำ ในแต่ละเชื้อที่นำมาทดสอบ และนำมาวัดความขุ่น (OD600) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทุกชั่วโมง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

## 4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเครื่อง bacterial growth tracker (BGT) และวิธีการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เติม 1.5% NaCl ในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางแบบเป็นระดับ 10 เท่า (10-fold dilution) เพื่อนับปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี plate count และนำ 0.5 มิลลิลิตรของเชื้อปริมาณ  $10^2$ ,  $10^3$  และ  $10^4$  CFU/ml เติมลงไปในอาหารเหลว MTCBS ที่มีปริมาตรรวม 15 มิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในแต่ละปริมาณของเชื้อที่ทดสอบ แบ่งชุดการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 นำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที และวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD600) ทำการวัดความขุ่นทุกชั่วโมง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และชุดที่ 2 นำไปเลี้ยงในเครื่อง BGT อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วระดับ 2 (120 รอบ/นาที) ทำการเปรียบเทียบผลความขุ่นการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่นำมาเลี้ยงในเครื่องบ่มแบบเขย่าและเครื่อง BGT

## 5. การศึกษาผลของความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งต่อการตรวจวัดเชื้อ *Vibrio*

นำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มาเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว TSB เติม 1.5% NaCl ในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางแบบเป็นระดับ 10 เท่า (10-fold dilution) เพื่อนับปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี plate count นำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ปริมาณ  $10^2$ ,  $10^3$  และ  $10^4$  CFU/ml มาผสมกับน้ำเค็มปลอดเชื้อที่ 10 ppt เป็นตัวแทนตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มต่ำ และ 30 ppt เป็นตัวแทนตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มสูง และนำน้ำเค็มที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย ของแต่ละปริมาณของเชื้อ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว MTCBS ที่มีปริมาตรรวม 15 มิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง BGT ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วระดับ 2 (120 รอบ/นาที) เปรียบเทียบผลความขุ่นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียระหว่างหลอดอาหารที่มีปริมาณเชื้อเพียงอย่างเดียวและหลอดอาหารที่มีตัวอย่างน้ำเค็มผสมกับเชื้อ *V. parahaemolyticus*

## 6. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio* ในตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ด้วยเครื่อง bacterial growth tracker (BGT) และวิธีการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง จำนวน 5 ตัวอย่าง มานับปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี plate count และแบ่งปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MTCBS ที่มีปริมาตรรวม 15 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง BGT ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วระดับ 2 (120 รอบ/นาที) และด้วยวิธีการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ คือ นำมาเลี้ยงในเครื่องบ่มแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบ/นาที ร่วมกับวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD600) ทำการวัดความขุ่นทุกชั่วโมง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

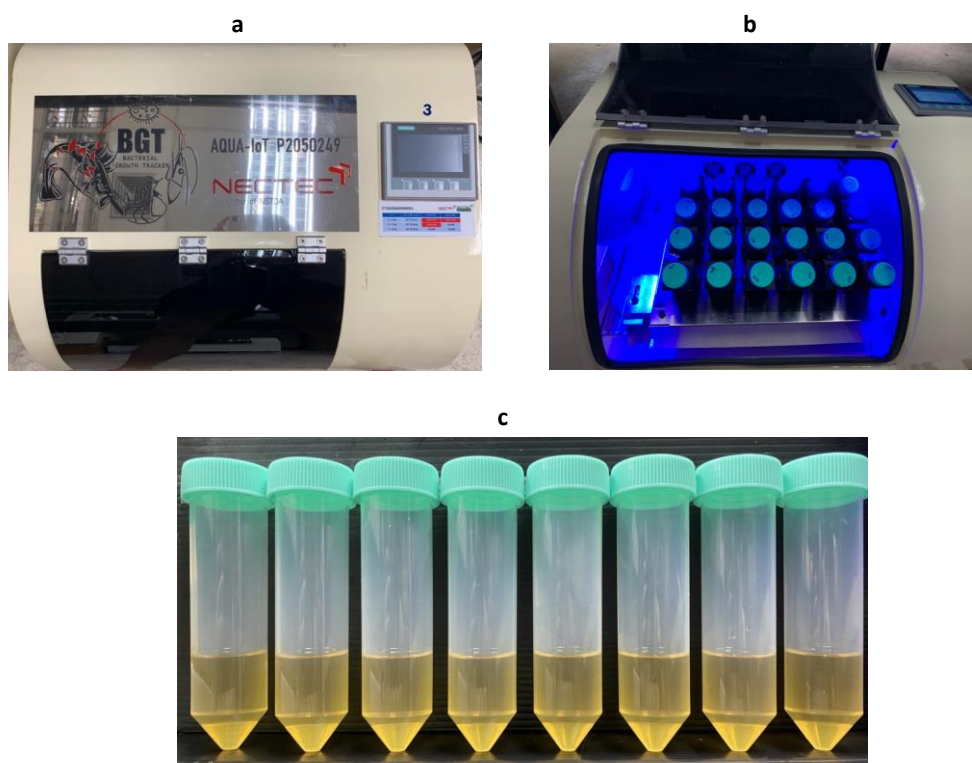
## 7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้น ของแต่ละชั่วโมง มาตรวจสอบการกระจายตัวของข้อมูล หากมีการกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติ (Normal distribution) จะนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มด้วย One-way ANOVA และ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หากข้อมูลไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติจะใช้วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Kruskal-Wallis test และนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่าง ที่วัดด้วยเครื่อง BGT และด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ (เครื่องบ่มแบบเขย่า + spectrophotometer; OD600) มาวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient; r) โดยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS (Neter et al., 1996)

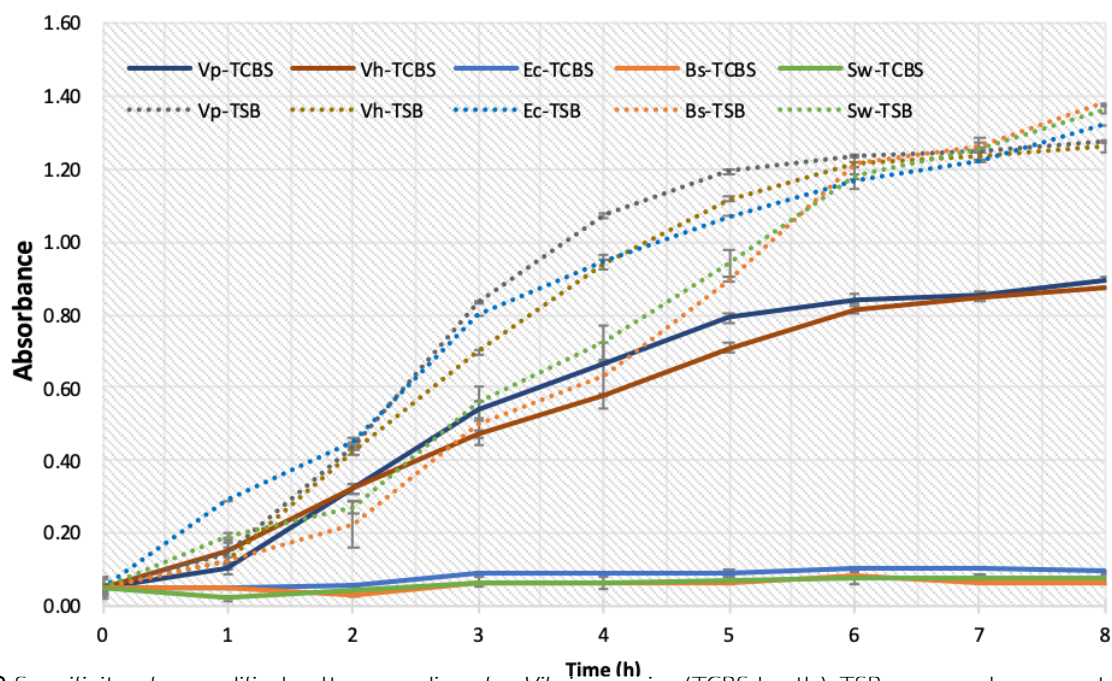
## ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

### 1. การทดสอบความจำเพาะของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS

วิธีการที่ใช้ในการตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BGT (Figure 1) ใช้หลักการในการวัดความขุ่น เมื่อเชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นมากขึ้น ค่าที่วัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเครื่อง BGT จึงต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสม ในการศึกษาได้พัฒนาอาหารเลี้ยงแบบเหลวสำหรับเชื้อกลุ่ม *Vibrio* เรียกว่า modified TCBS (MTCBS) โดยเลียนแบบส่วนประกอบที่สำคัญมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นแบบวุ้นแข็ง โดยเอา pH indicator คือ bromothymol blue และ thymol blue และวุ้นแข็งออก เนื่องจากการรบกวนการวัดของเซ็นเซอร์แสง (LED) ที่ติดตั้งในช่องใส่หลอดตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะกับเชื้อกลุ่ม *Vibrio* เท่านั้น นำมาทดสอบความจำเพาะด้วยเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ที่พบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้ง คือ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. khirikhana* พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบ มีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว TSB ได้ดี ในขณะที่มีเพียงเชื้อกลุ่ม *Vibrio* เท่านั้น ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MTCBS ที่พัฒนาขึ้นได้ คือ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* (Figure 2) โดยที่เชื้อ *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. khirikhana* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ที่พัฒนาขึ้น สามารถวัดความขุ่นที่ OD600 อยู่ระหว่าง 0.05 – 0.105 (Figure 2) และไม่พบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี plate count แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS มีความจำเพาะสำหรับการตรวจวัดเชื้อกลุ่ม *Vibrio* เท่านั้น



**Figure 1** a. A smart device called “bacterial growth tracker (BGT)”, b. interior design of BGT is composed of tube rack (24 x 50 ml), heater, shaker and LED sensors, c. a modified liquid medium for *Vibrio* species (MTCBS broth)



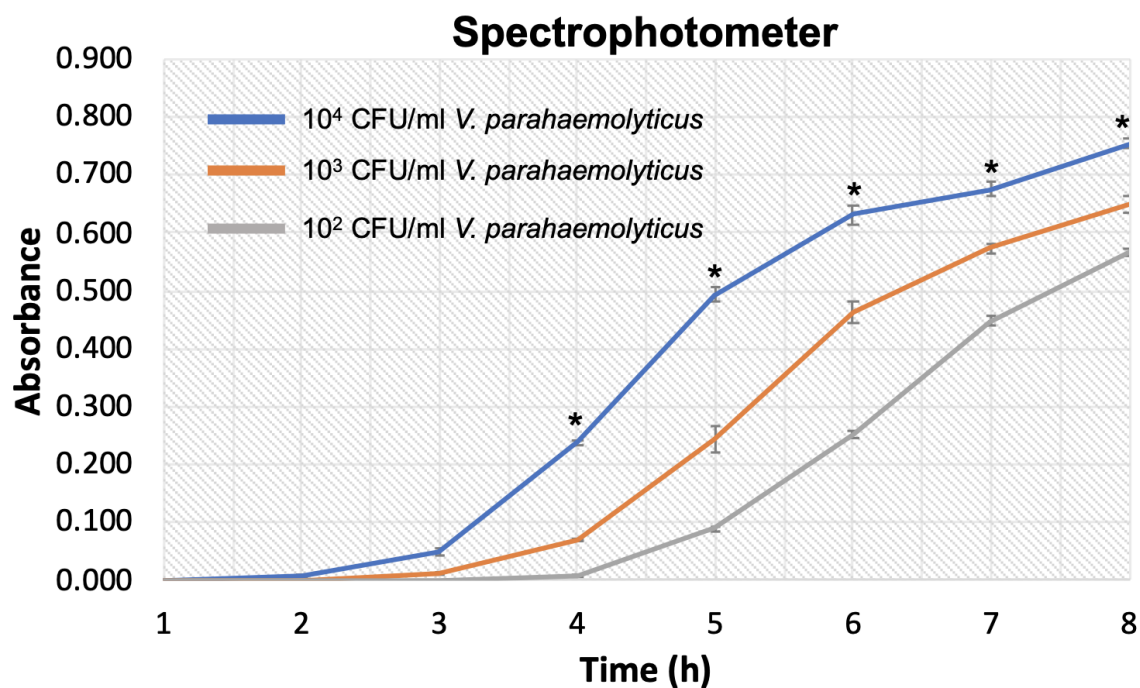
**Figure 2** Specificity of a modified culture medium for *Vibrio* species (TCBS broth). TSB was used as a control for all tested bacteria, and the optical density was measured every hour at 600 nm by spectrophotometer. *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), *Escherichia coli* (Ec), *Bacillus subtilis* (Bs) and *Shewanella khirikhana* (Sw)

## 2. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเครื่อง Bacterial growth tracker (BGT) และวิธีการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ

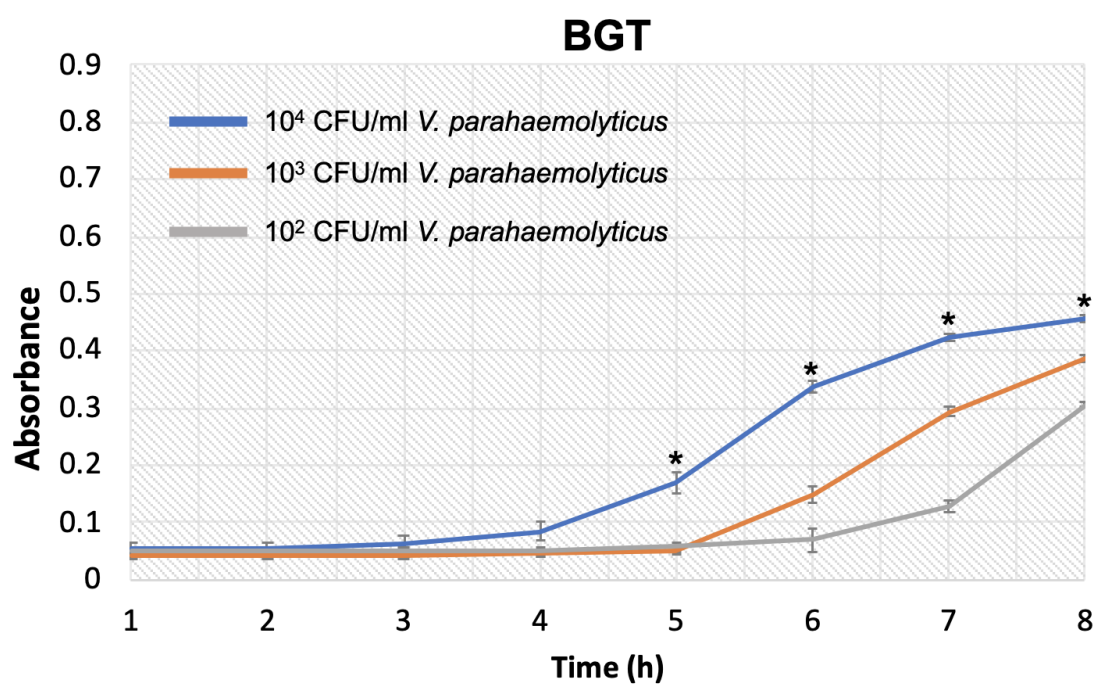
จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ที่ปริมาณ  $10^4$  CFU/ml ในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง มีผลต่อการตายของกุ้งในบ่อเลี้ยง (Sung et al., 2001) และหากปล่อยให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในบ่ออยู่ในระดับสูง  $10^4$  CFU/ml เป็นเวลา 10 วันขึ้นไป กุ้งในบ่อเกิดปัญหาด้านสุขภาพ (Raungpan et al. 1995) นอกจากนี้ผลจากการทดลองวิธีการติดเชื้อด้วยการแช่ (immersion challenge) ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis disease; AHPND) ที่  $10^3$  CFU/ml สามารถทำให้กุ้งตาย 100% ภายในเวลา 4 วัน (Joshi et al., 2014) ดังนั้นการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อย และรวดเร็ว เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อนำมาประกอบการตัดสินใจ แก้ปัญหาในบ่อเลี้ยงกุ้งได้อย่างทันท่วงที ในการศึกษาครั้งนี้ นำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ปริมาณ  $10^2$  ถึง  $10^4$  CFU/ml มาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS เปรียบเทียบการตรวจวัดด้วยเครื่อง BGT และ วิธีการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ (เครื่องบ่มแบบเขย่า + spectrophotometer OD600) ดังแสดงใน **Figure 3** การตรวจวัดด้วยเครื่อง BGT สามารถแยกความแตกต่างของปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ  $10^2$  ถึง  $10^4$  CFU/ml ( $p < 0.05$ ) ได้เช่นเดียวกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ ถึงแม้ว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง BGT เริ่มตรวจวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย  $10^4$  CFU/ml ที่ได้ 4 ชั่วโมง ซ้ำกว่าในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเท่ากันเมื่อนำมาตรวจวัดด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ (3 ชั่วโมง) เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า การวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง BGT มีความสัมพันธ์ทางบวกเช่นเดียวกับการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.925 มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BGT สามารถนำไปใช้งานได้ใกล้เคียงกับวิธีทางห้องปฏิบัติการ

## 3. การศึกษาผลของความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งต่อการตรวจวัดเชื้อ *Vibrio*

ความเค็มเป็นหนึ่งในปัจจัยจากบ่อเลี้ยง มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* (Prayitno and Latchford, 1995) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของความเค็มในน้ำเลี้ยงกุ้งต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ที่พัฒนาขึ้น โดยเลือกตัวอย่างน้ำเค็มที่ระดับต่ำ (10 ppt) เป็นตัวแทนบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตพื้นที่ภาคกลาง และที่ความเค็มระดับสูง (30 ppt) เป็นตัวแทนบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตพื้นที่ริมชายฝั่งทะเล นำมาผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ทราบปริมาณแน่นอน ( $10^2$  ถึง  $10^4$  CFU/ml) นำไปเลี้ยงในเครื่อง BGT ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างน้ำ ทั้งตัวอย่างน้ำที่ความเค็มระดับ 10 ppt และ 30 ppt ผสมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในแต่ละความเข้มข้น ใช้ระยะเวลาในการเจริญไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ให้ผลเช่นเดียวกับหลอดทดลองที่มีเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว (**Figure 4**) เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า การวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่างน้ำที่ความเค็มระดับ 10 ppt และ 30 ppt ที่ผสมเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีความสัมพันธ์ทางบวกเช่นเดียวกับหลอดทดลองที่มีเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.998 และ 0.997 ตามลำดับ มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 แสดงให้เห็นว่าความเค็มในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มต่ำและสูงไม่มีผลกระทบในการวัดปริมาณเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MTCBS ที่พัฒนาขึ้นและตรวจวัดด้วยเครื่อง BGT



a

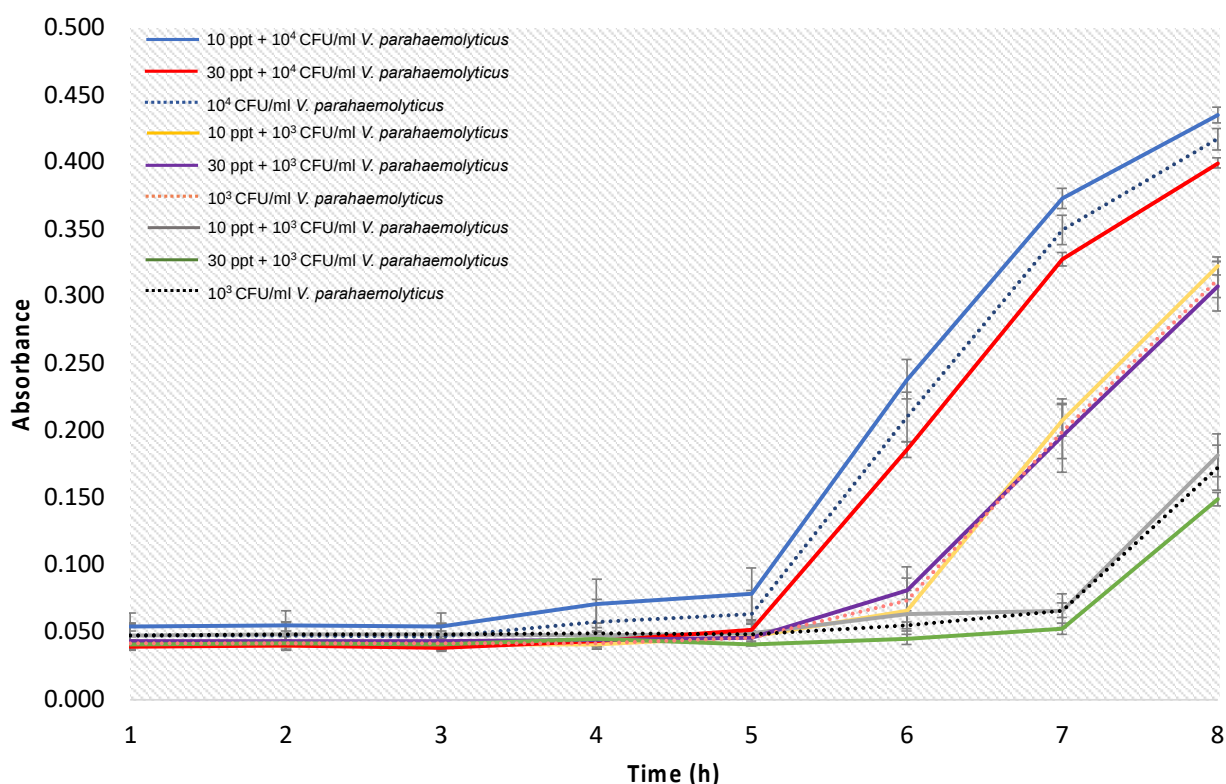


b

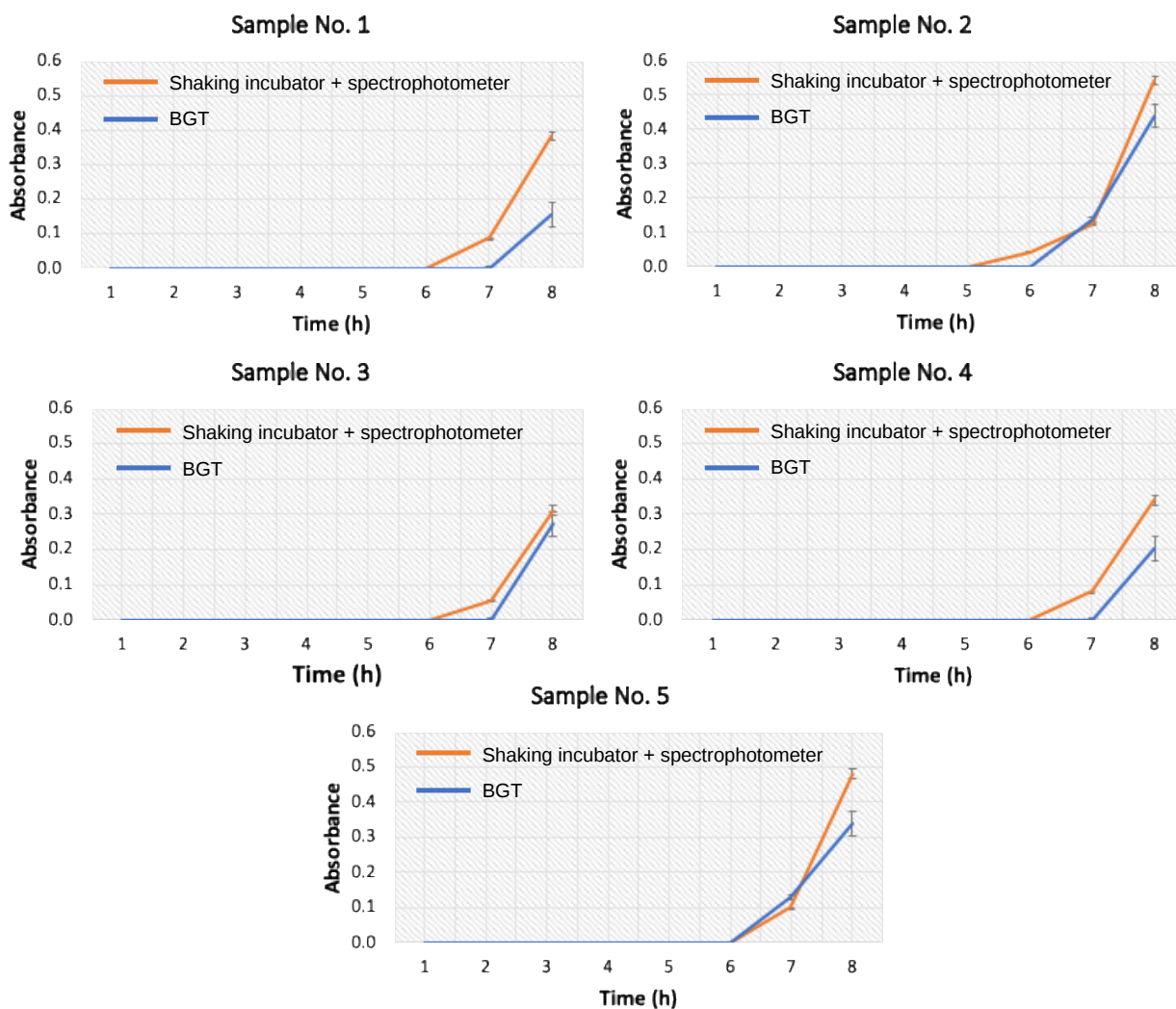
**Figure 3** Comparison of *V. parahaemolyticus* (10<sup>4</sup> to 10<sup>2</sup> CFU/ml) growth in MTCBS broth were measured turbidity every hour **a)** by spectrophotometer and **b)** by BGT (1.00E+04: *V. parahaemolyticus* 10<sup>4</sup> CFU/ml, 1.00E+03: *V. parahaemolyticus* 10<sup>3</sup> CFU/ml and 1.00E+02: *V. parahaemolyticus* 10<sup>2</sup> CFU/ml)

#### 4. เปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้ง ในระดับห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ทั้งหมดจำนวน 5 อย่าง นำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* รวม ด้วยวิธี plate count พบ ปริมาณเชื้อตั้งแต่  $2.2 \pm 0.5 \times 10^2$  ถึง  $4.8 \pm 0.5 \times 10^3$  CFU/ml (Table 1) ซึ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในปริมาณที่ไม่ ก่อให้เกิดปัญหาภายในบ่อเลี้ยง (Raungpan et al., 1995; Sung et al., 1999, 2001) เมื่อนำมาเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเชื้อ แบคทีเรีย *Vibrio* ในตัวอย่างน้ำ 5 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง BGT และการตรวจวัดวิธีทางห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการ เจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง และทั้งสองวิธีพบหลอดอาหารเริ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ดังแสดงใน Figure 5 เมื่อนำค่า ความขุ่นของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์ทางบวก ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.913 – 0.988 มี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (Table 2) แสดงให้เห็นว่าเครื่อง BGT มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในตัวอย่างภาคสนาม



**Figure 4** Effect of salinity at 10 and 30 ppt in water spiked with *V. parahaemolyticus* at  $10^2$  to  $10^4$  CFU/ml were grown in MTCBS broth by using BGT. (10 ppt+ $10^4$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*: salinity at 10 ppt spiked with  $10^4$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*, 10 ppt+ $10^3$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*: salinity at 10 ppt spiked with  $10^3$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*, 10 ppt+ $10^2$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*: salinity at 10 ppt spiked with  $10^2$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*, 30 ppt+ $10^4$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*: salinity at 30 ppt spiked with  $10^4$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*, 30 ppt+ $10^3$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*: salinity at 30 ppt spiked with  $10^3$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*, 30 ppt+ $10^2$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*: salinity at 30 ppt spiked with  $10^2$  CFU/ml *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*  $10^4$  CFU/ml, 1V. *parahaemolyticus*  $10^3$  CFU/ml and *V. parahaemolyticus*  $10^2$  CFU/ml)



**Figure 5** Correlation coefficient analysis of *Vibrio* growth of absorbance measured by spectrophotometer versus absorbance values by BGT. The X axis represents absorbance measured by BGT and Y axis represents absorbance measure by spectrophotometer. R means correlation coefficient index

**Table 1** Total *Vibrio* count (CFU/ml) in water samples

| Sample No. | Total <i>Vibrio</i> count (CFU/ml) |
|------------|------------------------------------|
| 1          | $3.8 \pm 1.3 \times 10^2$          |
| 2          | $4.8 \pm 0.5 \times 10^3$          |
| 3          | $6.3 \pm 0.9 \times 10^2$          |
| 4          | $4.2 \pm 1.1 \times 10^2$          |
| 5          | $2.2 \pm 0.5 \times 10^2$          |

**Table 2** Pearson correlation coefficient (r) of *Vibrio* growth in water samples and absorbance measured by spectrophotometer versus absorbance values by BGT

| Sample No. | r      |
|------------|--------|
| 1          | 0.9713 |
| 2          | 0.9878 |
| 3          | 0.9134 |
| 4          | 0.9591 |
| 5          | 0.9820 |

## สรุป

การตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ด้วยอาหารเลี้ยงแบบเหลว MTCBS ร่วมกับเครื่อง BGT มีผลทดสอบใกล้เคียงกับวิธีการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวัดด้วยเครื่อง BGT อย่างง่ายที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปการประยุกต์ใช้ตรวจติดตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยนำข้อมูลปริมาณเชื้อที่ได้ไปบริหารจัดการบ่อเลี้ยงหรือโรงเพาะฟักได้อย่างทันทั่วทั้งที่ และเกษตรกรสามารถตรวจได้ตนเอง

## คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ รหัสโครงการ P19-51879 และ P20-50249 และสถานที่ในการทำวิจัยภาคสนาม คือ โครงการสาธิตมันเกษตร “สองน้ำ” มูลนิธิชัยพัฒนา ต.ท่าไข่ อ.เมือง จ. ฉะเชิงเทรา

## เอกสารอ้างอิง

- Baticados, M.C.L., C.R Lavilla-Pitogo, E.R., Cruz-Lacierda, L.D. de la Pena, and N.A. Sunaz. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Diseases of Aquatic Organisms. 9: 133-139.
- Dalsgaard, A., and L. Hoi. 1997. Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. Journal of Food Protection. 60: 1132-1135.
- Duetza, W.A., and B. Witholta. 2001. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deep well microtiter plates. Biochemical Engineering Journal. 7: 113–115.
- Harry, E., L. Monahan, and L. Thompson. 2006. Bacterial cell division: the mechanism and its precision. International Review of Cytology. 253: 27-94.
- Joshi, J., J. Srisala, V.H. Truong, I.T. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C.F. Lo, T.W. Flegel, K. Sritunyalucksana, and S. Thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture. 428-429: 297–302.
- Neter, J., M.H. Kutner, C.J. Nachtsheim, and W. Wasserman. 1996. Applied Linear Statistical Models. 4th Edition. McGraw-Hill, Chicago, IL.
- Otta, S.K., I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. Journal of Aquaculture in Tropics. 14: 309–318.

- Prachumwat, A., P. Wechprasit, J. Srisala, R. Kriangsaksri, T.W. Flegel, S. Thitamadee, and K. Sritunyalucksana. 2020. *Shewanella khirikhana* sp. Nov. – a shrimp pathogen isolated from a cultivation pond exhibiting early mortality syndrome. *Microbial Biotechnology*. 13: 781–795.
- Prayitno, S.B., and J. W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustacean with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio* effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*. 132: 105–112.
- Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, and A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*. 149(1): 1-5.
- Rattanama, P., K. Srinitiwarawong, J.R. Thompson, R. Pomwised, K. Supamattaya, and V. Vuddhakul. Shrimp pathogenicity, hemolysis, and the presence of hemolysis and TTSS genes in *Vibrio harveyi* isolated from Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*. 86: 113–122.
- Raungpan, L., R. Tabkaew, and K., Sangrungruang. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. p. 141–149. In: M. Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe. *Diseases in Asian Aquaculture II Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila.
- Robert-Pillot, A., S. Copin, M. Gay, P. Malle, and M.L. Quilici. 2010. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 143: 190-197.
- Ruangpan, L., and T. Kitao. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus. *Journal of Fish Diseases*. 14: 383–388.
- Simidu, U., and K. Tsukamoto. 1980. A method of the selective isolation and enumeration of marine *Vibrionaceae*. *Microbial Ecology*. 6: 181-184.
- Sritunyalucksana, K., W. Gangnonngiw, S. Archakunakorn, D. Fegan, and T.W. Flegel. 2005. Bacterial clearance rate and new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 89–94.
- Sung, H.H., H.L. Ching, M. Tsai, Y.Y. Ting, and W.L. Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 236: 261–271.
- Sung, H.H., S.F. Hsu, C.K. Chen, Y.Y. Ting, and W.L. Chao. 2001. Relationship between disease outbreak in culture shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreases during cultivation. *Aquaculture*. 192L: 101–110.
- Thaithongnum, S., P. Ratanama, K. Weeradechapol, A. Sukhoom, and V. Vuddhakul. 2006. Detection of *V. harveyi* shrimp postlarvae and hatchery tank water by the most probable number technique with PCR. *Aquaculture*. 261: 1–9.
- Vandenbergh, I., F.L. Thompson, B. Gomez-Gill, and J. Swings. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*. 219: 9-20.