

บทความวิจัย (Research Article)

การจำแนกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์จากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง
Identification of Extracellular Enzyme-Producing Bacteria from
Shrimp Pond Sediments

เอกศิษฐ์ สุพรรณโรจน์¹, รัชณี มิ่งมา^{1*}

¹ สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Aekasit Suphannarot¹, Ratchanee Mingma^{1*}

¹ Division of Microbiology, Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

* Corresponding author

E-mail address: faasnm@ku.ac.th

Received: 08/03/2025; Revised: 15/07/2025; Accepted: 30/07/2025

คำสำคัญ

เอนไซม์
แบคทีเรีย
ตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง

บทคัดย่อ

การทำฟาร์มเลี้ยงกุ้งเป็นหนึ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่แพร่หลายในหลายจังหวัดของประเทศไทย การสะสมของอินทรีย์วัตถุ รวมถึงอาหารที่เหลือจากการกิน ขี้กุ้ง และซากสัตว์ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งและทำให้เกิดปัญหาน้ำเสีย แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ ซึ่งช่วยแก้ปัญหาน้ำเน่าเสียได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและระบุชนิดแบคทีเรียที่แยกจากดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งในการผลิตเอนไซม์จากเอนไซม์ จำนวน 5 ชนิด แยกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลต นำมาระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ใน 5 สกุล 10 ชนิดที่แตกต่างกัน จัดอยู่ในสกุล *Arthrobacter* จำนวน 6 ไอโซเลต สกุล *Pseudarthrobacter* จำนวน 1 ไอโซเลต สกุล *Bacillus* จำนวน 6 ไอโซเลต สกุล *Sinomonas* จำนวน 5 ไอโซเลต และสกุล *Methylobacterium* จำนวน 2 ไอโซเลต แบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลตมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้น้อย 1 ชนิด โดยมีจำนวน 18 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 12 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์ไลเปส จำนวน 10 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์เจลาติเนส จำนวน 6 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์เคซีเนส และจำนวน 6 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และมีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* คือ KUSK64-04, KUSK64-10 และ KUSK64-15 ผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 5 ชนิด เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีศักยภาพในการนำมาศึกษาต่อเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ในอนาคต

KEYWORDS

Extracellular enzyme
Bacteria
Shrimp pond sediment

ABSTRACT

Shrimp farming is a prevalent form of aquaculture in many provinces of Thailand. The accumulation of organic matter, including leftover feed, shrimp feces, and decaying organisms can result in shrimp diseases and water pollution. Some bacteria produce enzymes that degrade organic matter, helping to alleviate pollution. This study aims to investigate and identify bacteria isolated from shrimp pond sediments that are capable of producing five extracellular enzymes. A total of 20 bacterial isolates were obtained and identified using 16S rRNA sequence analysis. The results classified them into five genera and 10 different species. Among the isolates, six were identified as *Arthrobacter*, one as *Pseudarthrobacter*, six as *Bacillus*, five as *Sinomonas* and two as *Methylobacterium*. All twenty isolates demonstrated the ability to produce at least one type of enzyme. Specifically, 18 produced amylase, 12 produced lipase, 10 produced gelatinase, 6 produced caseinase, and 6 produced cellulase. Notably, three isolates—*Bacillus* sp. KUSK64-04, KUSK64-10, and KUSK64-15—exhibited all five enzymatic activities. These isolates hold potential for further investigation into their application in wastewater treatment for shrimp ponds.

1. บทนำ

กุ้งจัดเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นสินค้าส่งออกอันดับหนึ่งของภาคการประมงในประเทศไทย อีกทั้งยังมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ฐิตินา, 2567) ทั้งนี้ การเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณสูงจำเป็นต้องใช้อาหารในปริมาณมากเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของกุ้ง เพื่อให้คุ้มต่อการผลิตและการลงทุน แต่การให้อาหารที่มากเกินไปซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์และเหลือจากการกินของกุ้ง รวมถึงของเสียต่าง ๆ ที่กุ้งปล่อยออกมา ทำให้เกิดการสะสมที่ก้นบ่อและก่อให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง และทำให้เกิดการระบาดของโรคในกุ้งตามมา เช่น โรคหัวเหลือง โรคหัวแดงตัวขาว โรคเรืองแสง และโรคอื่น ๆ (นิติ และคณะ, 2551) ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ การแก้ไขปัญหาโดยใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนและการตกค้างของยาในน้ำและสิ่งแวดล้อม และมีการสะสมของยาในตัวกุ้งที่จะนำไปบริโภค อีกทั้งยังเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเกิดการดื้อยาและต้านทานต่อยามากขึ้น (Albuquerque Costa et al., 2015) การควบคุมปริมาณสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งรวมถึงตะกอนเลนที่ก้นบ่อจึงมีความสำคัญต่อการจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งอย่างมีประสิทธิภาพ

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มโปรคาริโอตที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ เนื้อเยื่อพืช รวมถึงในตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง แบคทีเรียกลุ่มหลักที่มีรายงานว่าพบในบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ แบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria, Bacteroidetes และ Firmicutes (Gawas et al., 2019) โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Algoriphagus*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Exiguobacterium* และ *Halobacillus* (Ali et al., 2022) แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์และหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งเรียกว่าเอนไซม์นอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส (Zhang et al., 2021) เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรต แป้ง โปรตีน และไขมันให้มีขนาดเล็กลง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวจะถูกปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม ช่วยให้คุณภาพน้ำดีขึ้น และส่งผลให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหารในระบบนิเวศ ทั้งยังสามารถเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สิ่งมีชีวิต

ขนาดเล็กในน้ำ และเป็นอาหารธรรมชาติสำหรับกุ้งได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังช่วยลดการสะสมของสารอินทรีย์วัตถุในบ่อเลี้ยงกุ้ง ตลอดจนลดการปลดปล่อยแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเป็นสารที่ส่งผลกระทบในทางลบต่อสุขภาพของกุ้งและเป็นสาเหตุให้น้ำเน่าเสีย นอกจากนี้มีรายงานว่าแบคทีเรียจากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งสามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่ช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ (Ali et al., 2022) งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและระบุแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไทรโอไลต์จากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง ข้อมูลที่ได้เป็นแนวทางการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน และเสริมสร้างกลยุทธ์การจัดการสิ่งแวดล้อมในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างดินนาุ้ง และแยกแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณข้างบ่อเลี้ยงกุ้ง (ภาพที่ 1) ในพื้นที่ตำบลห้วยม่วง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (14°08'11.1"N 100°00'31.4"E) ทำการเก็บตัวอย่างดินลึกไม่เกิน 10 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกสะอาด นำดินมาผึ่งให้แห้งในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาแยกแบคทีเรียโดยวิธีเจือจางลำดับส่วน (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ความเจือจาง 10^{-3} - 10^{-6} คัดสารแขวนลอยดินแต่ละความเจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวน้ำจานอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันนำมาทำให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในสารละลาย 20% (w/v) กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 °C ตรวจสอบลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม (Gram's staining) และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า



ภาพที่ 1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง ตำบลห้วยม่วง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2.2 การระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient Broth บ่มแบบเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป i-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit (iNtRON technology, Korea) และวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop DeNovix DS-11, USA) ให้มีความเข้มข้นมากกว่า 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) และ 1525R (GGYTACCTTGTTACGACTT) ตามวิธีที่อธิบายโดย รัชนี และคณะ (2566) ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) บริษัท Bionix ประเทศเกาหลีใต้ วิธี BTSeq™ (Barcode-Tagged Sequencing) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EzbioCloud (<http://ezbiocloud.net>) (Yoon et al., 2017) เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียในระดับสกุล และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA11 (Tamura et al., 2021) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) และกำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985)

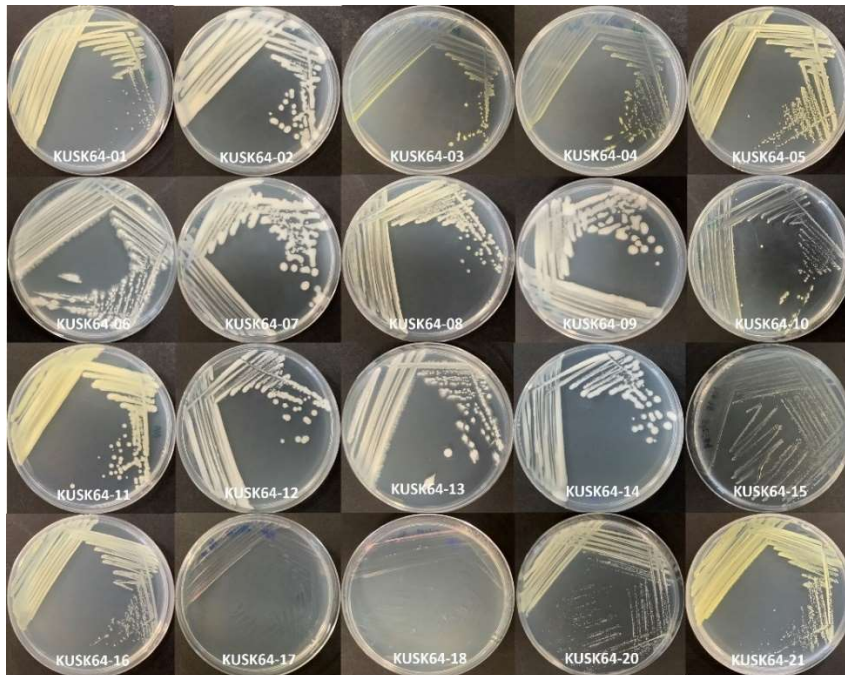
2.3 การทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มอุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียลงบนอาหารทดสอบแต่ละชนิด ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์หลังบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนี้ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) บนอาหาร NA ที่เติม 2% starch (w/v) ตรวจสอบโดยการหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วผิวหน้าอาหาร สังเกตบริเวณสีรอบโคโลนี ทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยไขมัน (lipolytic enzyme) บนอาหาร Tween80 agar ที่มี 1% Tween 80 (v/v) ตรวจสอบโดยสังเกตการเกิดตะกอนขุ่นรอบโคโลนี ทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) บนอาหาร skim milk agar (1% skim milk, w/v) เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์เคซีนเนส (caseinase) และอาหาร gelatin agar (beef extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม, gelatin 5 กรัม, วุ้น 18 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร) เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase) ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เคซีนเนสโดยสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี และตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เจลาติเนสโดยหยดสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ (HgCl_2) ท่วมผิวหน้าอาหาร สังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนี ทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) บนอาหาร carboxy methyl cellulose (CMC) agar (Carboxymethyl cellulose 5 กรัม, Yeast Extract 1 กรัม, K_2HPO_4 0.7 กรัม, KH_2PO_4 0.3 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัม, ZnSO_4 0.001 กรัม, วุ้น 18 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร) ตรวจสอบโดยการหยดสารละลายคองโกเรด 0.1 % (w/v) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 1 M NaCl สังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี (Ariffin et al., 2006)

3. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

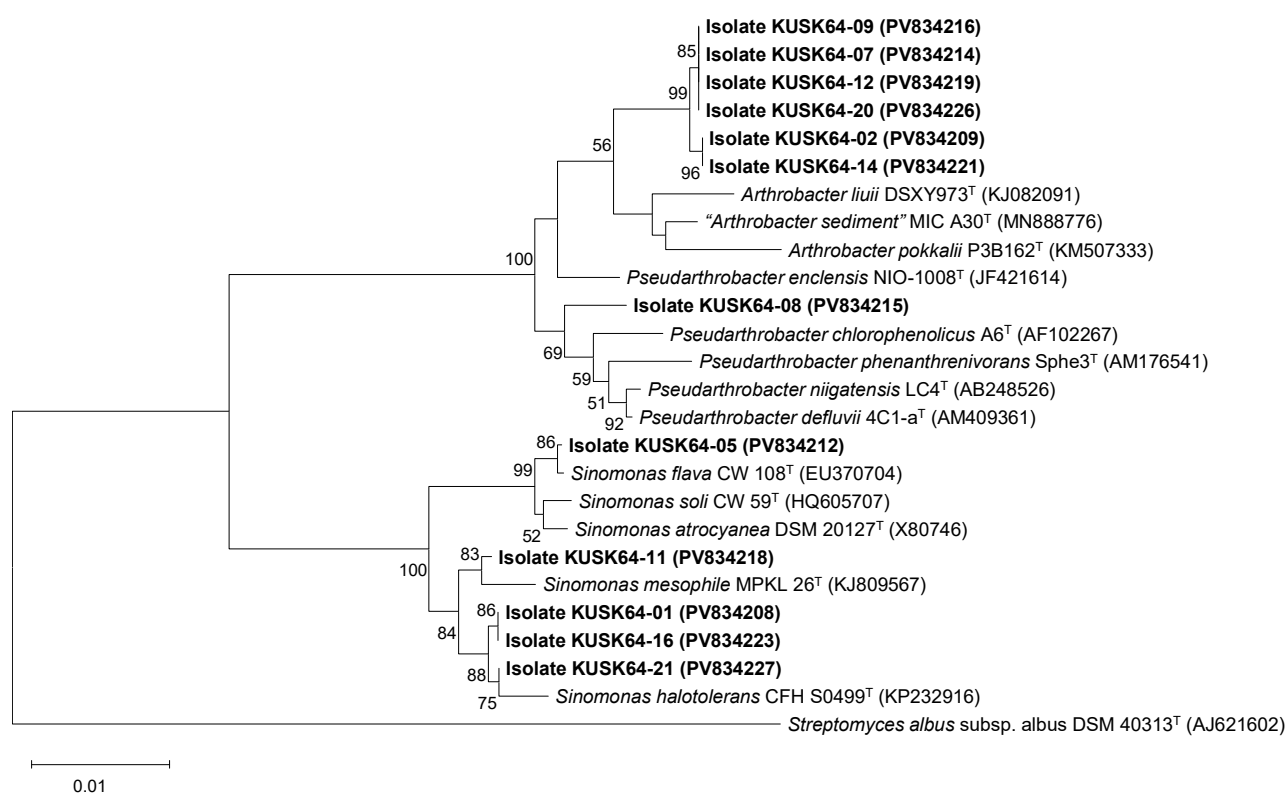
3.1 การแยกแบคทีเรียและการระบุชนิด

แยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต กำหนดรหัสชื่อเป็น KUSK64-01 ถึง KUSK64-18, KUSK64-20 และ KUSK64-21 แบคทีเรียที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีมีมehl และสีของโคโลนีหลากหลาย ได้แก่ สีเหลือง สีครีม สีขาว และสีชมพู (ภาพที่ 2) เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA และเปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิง (type strain) ที่อยู่ในฐานข้อมูล Ezbiocloud พบว่าทั้ง 20 ไอโซเลต จัดอยู่ใน 5 สกุลที่แตกต่างกัน คือ *Sinomonas*, *Arthrobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Bacillus* และ *Methylobacterium*

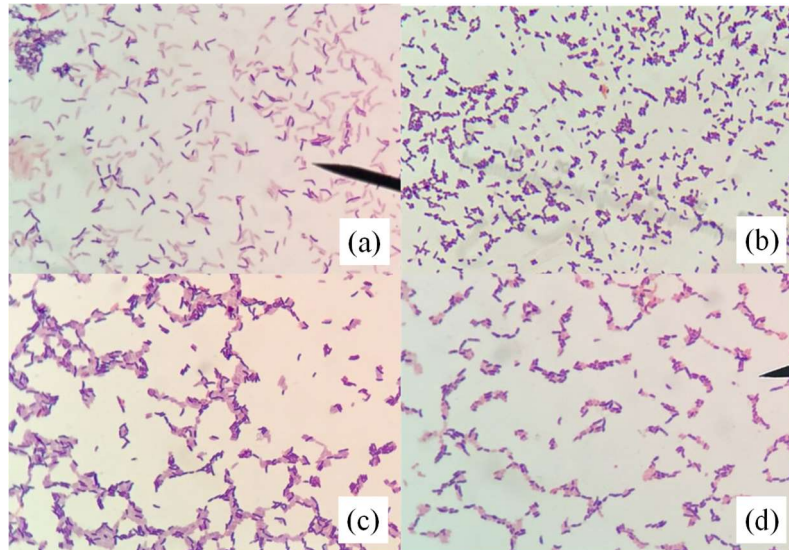


ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 20 ไอโซเลตที่แยกจากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง บนจานอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ไอโซเลต KUSK64-01, KUSK64-05, KUSK64-11, KUSK64-16 และ KUSK64-21 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล *Sinomonas* จำนวน 3 ชนิด คือ *S. halotolerans*, *S. flava* และ *S. mesophila* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity) อยู่ที่ 99.38 – 99.86% (ภาพที่ 3) ลักษณะโคโลนีสีเหลือง รูปร่างกลม โค้งนูนเล็กน้อย (convex) เซลล์มีรูปร่างท่อน (ภาพที่ 4(a) และ 4(b)) ไอโซเลต KUSK64-02, KUSK64-07, KUSK64-09, KUSK64-12, KUSK64-14 และ KUSK64-20 มีความใกล้เคียงกับ *Arthrobacter sediminis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 98.70 – 99.17% ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม โค้งนูนเล็กน้อย สีขาว-ครีม ทึบแสง เซลล์มีรูปร่างท่อน (ภาพที่ 4(c)) และไอโซเลต KUSK08 มีความใกล้เคียงกับ *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99.71% ลักษณะโคโลนีเป็นรูปร่างกลม สีเหลืองอ่อน เซลล์รูปร่างท่อน (ภาพที่ 4(d)) แบคทีเรียทั้ง 3 สกุล *Sinomonas*, *Arthrobacter* และ *Pseudarthrobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่จัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) Actinomycetota ชั้น (Class) Actinomycetia อันดับ (Order) Micrococcales วงศ์ (Family) Micrococcaceae เป็นจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนแบคทีเรีย เซลล์รูปร่างกลมถึงท่อน ไม่เคลื่อนที่ พบได้ทั่วไปในดิน มีรายงานว่าสกุล *Arthrobacter* และ *Pseudarthrobacter* ย่อยสลายประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินได้ (Seo et al., 2006)

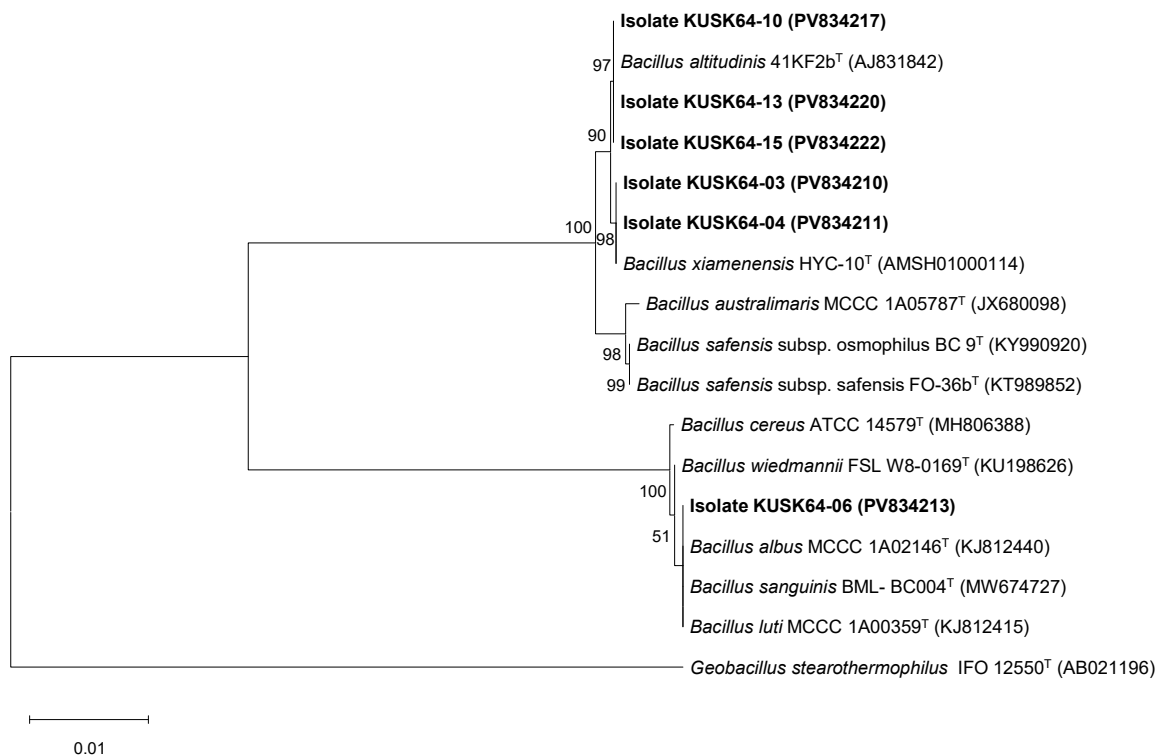


ภาพที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rDNA ของแอคติโนแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต สกุล *Sinomonas*, *Arthrobacter* และ *Pseudarthrobacter* ที่แยกจากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง

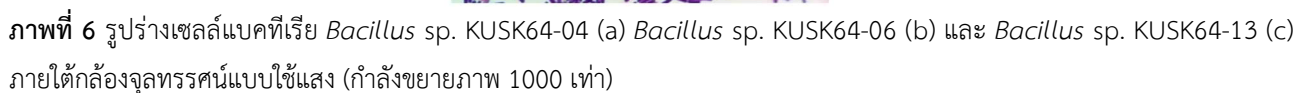


ภาพที่ 4 รูปร่างเซลล์แบคทีเรีย *Sinomonas* sp. KUSK64-11 (a) *Sinomonas* sp. KUSK64-16 (b) *Arthrobacter* sp. KUSK64-14 (c) และ *Pseudarthrobacter* sp. KUSK64-08 (d) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

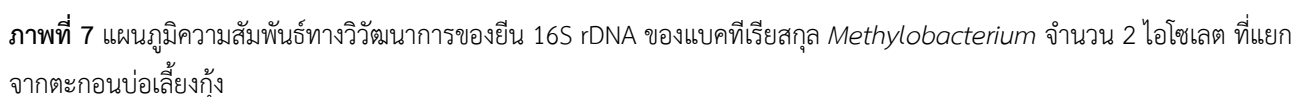
ไอโซเลต KUSK64-03, KUSK64-04, KUSK64-06, KUSK64-10, KUSK64-13 และ KUSK64-15 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จำนวน 3 ชนิด คือ *B. xiamenensis*, *B. albus* และ *B. altitudinis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100% (ภาพที่ 5) ลักษณะโคโลนีมีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ โคโลนีสีขาว ขอบไม่เรียบ (irregular) ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นสายไม่สม่ำเสมอ (filamentous) โคโลนีแบนราบติดกับอาหาร (flat) และโคโลนีขนาดเล็ก สีเหลือง ขอบเรียบ เซลล์รูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ค่อนข้างปลายเซลล์ (subterminal) (ภาพที่ 6) สกุล *Bacillus* จัดอยู่ในชั้น (Class) Bacilli อันดับ (Order) Bacillales วงศ์ (Family) Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่จัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา พบเป็นจำนวนมากในดิน และพบกระจายทั่วไปทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม รวมถึงในเนื้อเยื่อพืชและในสัตว์ บางชนิดก่อให้เกิดโรค (Earl et al., 2008)

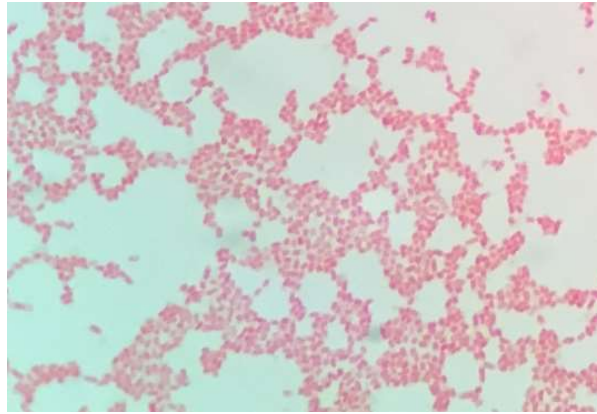


ภาพที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จำนวน 6 ไอโซเลต ที่แยกจากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง



ไอโซเลต KUSK64-17 และ KUSK64-18 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จำนวน 2 ชนิด คือ *M. gregans* และ *M. longum* ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 99.64 – 99.71% (ภาพที่ 7) ลักษณะโคโลนีสีชมพู กลมมน แบคทีเรียสกุล *Methylobacterium* จัดอยู่ในไฟลัม Proteobacteria ชั้น Alphaproteobacteria อันดับ Rhizobiales วงศ์ *Methylobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ เซลล์มีรูปร่างท่อน (ภาพที่ 8) พบกระจายทั่วไป ในธรรมชาติ เช่น ดิน อากาศ น้ำจืด ตะกอน รวมถึงในเนื้อเยื่อพืช (Bijlani et al., 2021) สามารถผลิตรงควัตถุสีชมพู (pink-pigmented facultative methylotrophs; PPFMs) เป็นแบคทีเรียกลุ่มเฉพาะที่สามารถใช้มีเทนหรือเมทานอลเป็นแหล่ง คาร์บอนและแหล่งพลังงาน (Patt et al., 1976) มีการเจริญค่อนข้างช้า บางสายพันธุ์ถูกนำไปใช้กระตุ้นการงอกของเมล็ดและ การเจริญเติบโตของพืชได้ เนื่องจากสามารถผลิตฮอร์โมนพืช (phytohormones) (Mondal et al., 2023)





ภาพที่ 8 รูปร่างเซลล์แบคทีเรีย *Methylobacterium* sp. KUSK64-17 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

จากแบคทีเรีย 5 สกุล ที่พบในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali et al. (2022) ศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยใช้เทคโนโลยีเอ็นจีเอสหรือ Next generation sequencing technology ในการระบุชนิด พบแบคทีเรียจำนวนมากกว่า 360 สกุล และจัดอยู่ในไฟลัมเดียวกันกับที่พบในงานวิจัยนี้คือไฟลัม Proteobacteria, Actinomycetota และ Firmicutes มากที่สุด 10 อันดับแรก และพบแบคทีเรียไฟลัม Bacteroidota, Planctomycetota, Cyanobacteria, Chloroflexi, Desulfobacterota, Patescibacteria และ Verrucomicrobiota บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและมีกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค *Vibrio* sp. นอกจากนี้งานวิจัยของ Gong et al. (2018) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งโดยอาศัยเทคนิคไพโรซีควนซิง (pyrosequencing) พบแบคทีเรียวงศ์ Alcaligenaceae ประกอบด้วยสกุล *Tissierell*, *Soehngenia* และ *Planomicrobium* เป็นจำนวนมากที่สุด

3.2 การทดสอบกิจกรรมการสร้างเอคตร้าเซลลูลาร์เอนไซม์

นำแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5 ชนิด คือ เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์เคซีเนส เอนไซม์เจลาติเนส และเอนไซม์ไลเปส พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างน้อย 1 ชนิด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่แยกจากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง

ไอโซเลต	การผลิตเอนไซม์				
	เซลลูเลส	อะไมเลส	เจลาติเนส	เคซีเนส	ไลเปส
KUSK64-01	-	+	-	-	-
KUSK64-02	-	+	-	-	-
KUSK64-03	+	+	++	+	-
KUSK64-04	+	+	++	+	++
KUSK64-05	-	+	-	-	-
KUSK64-06	+	+	+++	++	-
KUSK64-07	-	+	-	-	+
KUSK64-08	-	+	-	-	+
KUSK64-09	-	+	+	-	-
KUSK64-10	+	+	++	+	++
KUSK64-11	-	+	+	-	++
KUSK64-12	-	+	+	-	++
KUSK64-13	+	+	+++	++	-
KUSK64-14	-	+	+	-	-
KUSK64-15	+	+	++	+	++

ไอโซเลต	การผลิตเอนไซม์				
	เซลลูเลส	อะไมเลส	เจลาติเนส	เคซีนเนส	ไลเปส
KUSK64-16	-	++	-	-	++
KUSK64-17	-	-	-	-	+
KUSK64-18	-	-	-	-	++
KUSK64-20	-	+	-	-	++
KUSK64-21	-	+	-	-	+

หมายเหตุ - ไม่ผลิตเอนไซม์; + ผลิตเอนไซม์ในระดับดี; ++ ผลิตเอนไซม์ในระดับดีปานกลาง; +++ ผลิตเอนไซม์ในระดับดีมาก

เมื่อเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิด พบแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสเป็นจำนวนมากที่สุด คิดเป็น 90% ของไอโซเลตทั้งหมด (18 ไอโซเลต) สังเกตจากการเกิดวงใสของการย่อยสลายแป้งบนอาหาร starch agar ภายหลังการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาพที่ 8(a)) ยกเว้น 2 ไอโซเลต คือ *Methylobacterium* sp. KUSK64-17 และ *Methylobacterium* sp. KUSK64-18 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ รองลงมาแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส พบจำนวน 12 ไอโซเลต (60% ของไอโซเลตทั้งหมด) สังเกตจากการเกิดตะกอนขุ่นรอบโคโลนี (ภาพที่ 8(b)) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันที่ได้จากการย่อยไขมันทำปฏิกิริยากับ Ca^{2+} ในอาหาร มีแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต (50% ของไอโซเลตทั้งหมด) สามารถผลิตเอนไซม์เจลาติเนส สังเกตจากการเกิดวงใสของการย่อยโปรตีนบนอาหารเจลาติน ภายหลังทดสอบด้วย $HgCl_2$ (ภาพที่ 8(c)) มีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต (30% ของไอโซเลตทั้งหมด) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC สังเกตการเกิดวงใสหลังรดด้วยสารละลายคองโกเรด (ภาพที่ 8 (d)) สีคองโกเรดจะจับกับเซลลูโลส ยกเว้นบริเวณที่เซลลูโลสถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นล้างด้วย 0.1 M NaCl เพื่อชะสีส่วนเกินออก และมีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต (30% ของไอโซเลตทั้งหมด) ผลิตเอนไซม์เคซีนเนส สังเกตจากการเกิดวงใสของการย่อยโปรตีนบนอาหาร skim milk agar (ภาพที่ 8 (e)) นัศรญา และคณะ (2564) คัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชตระกูลถั่ว นำมาศึกษาคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยทุกไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์เซลลูเลสได้ ในขณะเดียวกันบางไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลสได้ ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียแต่ละชนิดผลิตเอนไซม์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความต้องการสารอาหาร การปรับตัวและการแก่งแย่งแข่งขันในบริเวณพื้นที่อาศัย ความหลากหลายของพันธุกรรมและกระบวนการชีวเคมีภายในเซลล์

จากการทดลองพบแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 5 ชนิด คือ KUSK64-04 มีความใกล้เคียงกับ *B. xiamenensis* HYC-10^T (AMSH01000114) 100% และไอโซเลต KUSK64-10 กับ KUSK64-15 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus altitudinis* 41KF2b^T (AJ831842) 100% งานวิจัยของ Artha et al. (2019) รายงานการค้นพบ *Bacillus* หลายชนิด ได้แก่ *B. thuringiensis*, *B. lentus* และ *B. sphaericus* จากดินตะกอนก้นบ่อบำบัดน้ำเสีย โดยพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น *B. cereus* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรติเอส ส่วน *B. licheniformis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรติเอส (Sonune and Garode, 2018) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ถูกนำมาใช้ร่วมกับกระบวนการบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนโลหะหนักและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Wróbel et al., 2023) เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นมลพิษและลดความเป็นพิษของโลหะหนัก อีกทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. ยังได้รับความสนใจนำมาใช้ประโยชน์ในหลากหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์ผงซักฟอก อุตสาหกรรมสิ่งทอ ผลิตภัณฑ์ยา และสารเคมีทางการเกษตร เป็นต้น (Akinsemolu et al., 2024; Danilova and Sharipova, 2020)



ภาพที่ 8 การตรวจผลการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (a) เอนไซม์ไลเปส (b) เอนไซม์เจลาติเนส (c) เอนไซม์เซลลูเลส (d) และเอนไซม์เคซีนเนส (e) บนจานอาหารทดสอบแต่ละชนิด

4. บทสรุป

แบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลต แยกจากตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง จังหวัดนครปฐม เป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 7 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวก 13 ไอโซเลต โดยจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียและแอคติโนแบคทีเรียที่แตกต่างกัน 5 สกุล คือ *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Pseudarthrobacter* และ *Sinomonas* จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์พบว่าทุกไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยพบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเป็นจำนวนมากที่สุด 18 ไอโซเลต รองลงมาคือเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์เจลาติเนส จำนวน 12 และ 10 ไอโซเลต ตามลำดับ และมีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เคซีนเนส โดยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ KUSK64-04, KUSK64-10 และ KUSK64-15 ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 5 ชนิด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นแหล่งของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด ซึ่งสามารถนำมาศึกษาเพื่อใช้อย่างยั่งยืนและแก้ปัญหาหน้าผาเสียหายในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ด.ต.ไพศาล ดอนจันทร์ทอง เจ้าของบ่อเลี้ยงกุ้ง ตำบลห้วยม่วง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้อาหารและเก็บตัวอย่างตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนพัฒนานิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประจำปีการศึกษา 2564

เอกสารอ้างอิง

- ฐิติมา เอียดแก้ว. (2567). สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ปี 2567. <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%20report/Shrimp/กุ้งทะเล%20report/Shrimp/กุ้งทะเล%20ปี%202567%20-%20final.pdf>
- นัสรญา ภูนิง, ช่อทิพย์ ระเหม, และสายใจ วัฒนเสน. (2564, 26 มีนาคม). การผลิตเอนไซม์และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคฟิชของแอคติโนมัยซีดที่คัดแยกได้จากไรโซสเฟียร์ของพืชตระกูลถั่ว [เอกสารนำเสนอ]. การประชุมระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และนวัตกรรม ครั้งที่ 3 ประจำปี 2564 เรื่อง วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สร้างสรรค์นวัตกรรมเพื่อชุมชน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย, จังหวัดเลย, ประเทศไทย.
- นิติ ชูเชิด, สุธี วงศ์มณีประทีป, สาดิต ประเสริฐศรี, เกศินี หลายสุทธิสาร, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์, และทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล. (2551). การแพร่กระจายของโรคหัวเหลืองและโรคดวงขาวในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ: การศึกษาการเกิดโรคในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. ใน *การวิจัยเพื่อพัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งก้ามกรามอย่างยั่งยืน (ปีที่ 3): รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีที่ 3* (หน้า 321-377). สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- รัชนี มิ่งมา, อารีย์ อินทร์นวล, ทิพย์ดาพร เพ็งรุ่ง, ณฐมน บุญสัย, และกรรณิการ์ ดวงมัลย์. (2566). กิจกรรมการด้านจุลินทรีย์ของเอนโดไฟติกแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากรากพืชป่าชายเลน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 12(1), 28-40.
- Albuquerque Costa, R., Araújo, R. L., Souza, O. V., & Vieira, R. H. (2015). Antibiotic-resistant vibrios in farmed shrimp. *BioMed Research International*, 2015, 505914.

- Ali, S., Xie, J., Zada, S., Hu, Z., Zhang, Y., Cai, R., & Wang, H. (2022). Bacterial community structure and bacterial isolates having antimicrobial potential in shrimp pond aquaculture. *AMB Express*, 12(1), 82.
<https://doi.org/10.1186/s13568-022-01423-9>
- Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S., & Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*, 64(6), 2300614.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, 3(1), 47-53.
- Artha, O. A., Sudarno, Pramono, H., & Sari, L. A. (2019). Identification of extracellular enzyme-producing bacteria (proteolytic, cellulolytic, and amylolytic) in the sediment of extensive ponds in Tanggulangrejo, Gresik. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236(1), 012003.
- Bijlani, S., Singh, N. K., Eedara, V. V. R., Podile, A. R., Mason, C. E., Wang, C. C. C., & Venkateswaran, K. (2021). *Methylobacterium ajmalii* sp. nov., isolated from the international space station. *Frontiers in Microbiology*, 12, 639396.
- Danilova, I., & Sharipova, M. (2020). The practical potential of Bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1782.
- Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269–275.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Gawas, V., Shivaramu, M., Damare, S., Pujitha, D., Meena, R. & Shenoy, B. D. (2019). Diversity and extracellular enzyme activities of heterotrophic bacteria from sediments of the Central Indian Ocean Basin. *Scientific Reports*. 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45792-x>.
- Gong, B., Chen, S., Lan, W., Huang, Y., & Zhu, X. (2018). Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea of the Southern Coast of China. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(4), 1339-1346.
- Mondal, P., Ghosh, D., Seth, M., & Mukhopadhyay, S. (2023). Bioprospects of pink pigmented facultative methylotrophs (PPFMs). *Arab Gulf Journal of Scientific Research Database*, 2023.
<https://www.emerald.com/insight/1985-9899.htm>.
- Patt, T. E., Cole, G. C., & Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(2), 226-229.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Hu, Y., Lee, S.-E., & Li, Q. X. (2006). Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: Initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere*, 65(11), 2388-2394.

- Sonune, N., & Garode, A. (2018). Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 37-44.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Wróbel, M., Sliwakowski, W., Kowalczyk, P., Kramkowski, K. & Dobrzynski, J. (2023). Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(6), 4964. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617.
- Zhang, Z., Deng, Q., Wan, L., Cao, X., Zhou, Y., & Song, C. (2021). Bacterial communities and enzymatic activities in sediments of long-term fish and crab aquaculture ponds. *Microorganisms*, 9(3), 501.