รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลที่เพาะเลี้ยงในกระชัง

Characterization and identification of probiotic bacteria from intestinal tract of tilapia (*Oreochromis* sp.) grown in cage culture

วรกฤต วรนันทกิจ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลที่เพาะเลี้ยงในกระชัง

Characterization and identification of probiotic bacteria from intestinal tract of tilapia (*Oreochromis* sp.) grown in cage culture

วรกฤต วรนันทกิจ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาคุณลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลที่เพาะเลี้ยงในกระชัง

แหล่งเงิน เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ: นายวรกฤต วรนันทกิจ หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลทั้งหมด 54 ไอโซเลท นำไปทดสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. และ *Lactobacillus* spp. เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยดูจากความทนในการเจริญที่สภาวะเป็นกรดและในเกลือน้ำดี ความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีน ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ และจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยการหาลำดับเบสยีน 16s rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท M104 (*Lactobacillus* sp.), T311 (*Bacillus cereus*) และ T318 (*Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*) สามารถทนเกลือได้ 0.5-3% NaCl, สามารถย่อยแป้งและโปรตีน และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ในขณะที่ความสามารถทนกรดของ M104 สามารถทนกรดได้ pH 1-4, T311 และ T318 สามารถทนกรดได้ pH 2-4 นอกจากนี้ผลการทดสอบความาสามารถต้านทายาปฏิชีวนะของ M104 พบว่าสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol และ Trimethoprim ในขณะที่ T311 และ T318 มีความสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้ 3 ตัวยา จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท M104, T311 และ T318 สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในระบบการเพาะเลี้ยงปลานิลต่อไปได้

คำสำคัญ : ปลานิล, แบคทีเรียโพรไบโอติก, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp.

Research Title:
Characterization and identification of probiotic bacteria from intestinal tract of tilapia (*Oreochromis* sp.) grown in cage culture
Researcher: Asst.Dr.Worakrit Worananthakij
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Biology

ABSTRACT

The intestinal tract bacteria of tilapia (*Oreochromis* sp.) were isolated and identified. Total of 54 bacteria isolates were classified by morphology and biochemical test. They were *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* spp. The bacterial isolates were evaluated for their probiotic properties including acidic and bile salt condition tolerance, digestibility of starch and protein, phatogenic bacteria inhibition and capability of antibiotic resistant for probiotic bacteria selection. The 16s rRNA gene of the probiotic bacteria were investigated for identity. The result showed that the isolate M104 (*Lactobacillus* sp.), T311 (*Bacillus cereus*) and T318 (*Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*) capable to tolerate the bile salt from 0.5 to 3% NaCl. Those strains had digestible property on starch and protein, and fish pathogen inhibitory, *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. and *Pseudomons* sp. Whilst, M104 was able to tolerate from pH 1 to 4, T311 and T318 were able to tolerate from pH 2 to 4. M104 also resisted to Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol and Trimethoprim, while T311 and T318 resisted only 3 antibiotics. The isolate M104, T311 and T318, therefore may be used as probiotics in tilapia culture.

Keywords : Tilapia, Probiotic bacteria, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ซึ่งสำเร็จด้วยความร่วมมือของนักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงมาด้วยดี

วรกฤต วรนันทกิจ
หัวหน้าโครงการ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง V
สารบัญภาพ VI
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 5
3.1 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล 6
3.2 การศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 7
3.3 การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากลำไส้ปลานิล 8
บทที่ 4 ผลการวิจัย 9
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 9
4.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 10
4.3 ผลแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี 19
4.4 ผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากลำไส้ปลานิล 22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25
5.1 สรุปผลการวิจัย 25
5.2 ข้อเสนอแนะ 25
เอกสารอ้างอิง 26
ประวัตินักวิจัย 29

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 รหัสไอโซเลทของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกกลุ่มต่างๆ 10

4.2 เปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ 11

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งและความสามารถในการย่อยโปรตีน 16

4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 17

4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ 20

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล 22

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลานิล และปลานิลแดงเป็นธุรกิจที่สร้างรายได้กับเกษตรกร และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องอย่างมาก เช่น การค้าปัจจัยการผลิต การทำอาหารแปรรูป การส่งออกอาหารแช่แข็ง การทำเครื่องหนัง เป็นต้น ทำให้มีการมีการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นขึ้น ซึ่งสามารถเลี้ยงได้ทั้งในกระชังในบ่อดิน กระชังในคลอง กระชังในแม่น้ำ รวมถึงการเลี้ยงในบ่อดิน เพื่อให้มีผลผลิตเพียงพอกับความต้องการของตลาด อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิล และปลานิลแดงในรูปแบบดังกล่าวต้องเจออุปสรรคและปัญหามากมาย เช่น ปัญหาปลาสูญหาย ปัญหาพันธุ์ปลานิลลูกผสม ปัญหาปลานิลราคาต่ำ และปัญหาที่สำคัญ คือ ปัญหาทางด้านโรคสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเลี้ยงปลานิล และปลานิลแดงในกระชังที่มีการควบคุมได้ยากกว่าการเลี้ยงในบ่อ ทั้งในด้านปัญหาการควบคุมคุณภาพของน้ำ การควบคุมโรคจากปลานอกกระชัง และการเกิดความหนาแน่นในการเลี้ยง

แบคทีเรียโพรไบโอติกเป็นแนวทางหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อช่วยลดปัญหาด้านโรคปลานิลได้ กล่าวคือ แบคทีเรียโพรไบโอติก มีคุณสมบัติในการส่งเสริมให้ปลานิลมีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการช่วยย่อยอาหารให้มีโมเลกุลเล็กลง ทำให้ปลาสามารถนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ โดยใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประโยชน์เติมลงในอาหาร เมื่อปลาได้รับเข้าไปแล้วจะช่วยทำให้ตัวปลาทำงานได้อย่างปกติ มีภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น ปรับสภาพหรือเป็นตัวต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้

การศึกษาครั้งนี้ จึงทำการศึกษาคุณลักษณะแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลานิลเพื่อคัดเลือกและจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย สำหรับใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล และปลานิลแดงในระดับการค้าต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลานิล

1.2.2 เพื่อจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียจากลำไส้ปลานิลที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีในปลานิล และจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียดังกล่าวด้วยการทดสอบทางชีวเคมี และชีวโมเลกุล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 คัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีจากลำไส้ปลานิลได้

1.4.2 สามารถนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การนำไปผสมกับอาหารปลานิล เพื่อส่งเสริมให้ปลานิลมีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น และต้านทานต่อโรคที่เกิดกับปลานิลได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันปลานิล และปลานิลแดงเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี ทำให้มีการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลแดงกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น โดยรูปแบบการเลี้ยงปลานิลแดงมีทั้งการเลี้ยงในบ่อ และในกระชัง สำหรับการเลี้ยงปลาในกระชังเป็นรูปแบบการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูงก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในเชิงเศรษฐศาสตร์ และการใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำทั่วไป อีกทั้งยังช่วยให้ผู้ที่ไม่มีที่ดินทำกินสามารถหันมาเลี้ยงปลาได้ (คีรี และจุฬ, 2549) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาในกระชังเกษตรกรจำเป็นต้องยอมรับความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทางน้ำ ได้แก่ คุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการทำเกษตรกรรมประเภทอื่น ๆ หรือน้ำเสียที่ปล่อยออกจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นผลให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมกับการเลี้ยงปลา อาจส่งผลให้ปลาตายแบบเฉียบพลัน หรือปลาอ่อนแอและเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นได้ง่าย (สุดา และคณะ, มปป)

จากรายงานข้อมูลโรคปลานิล และปลานิลแดงของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง ที่แบ่งตัวก่อโรคที่พบออกเป็นกลุ่ม ได้แก่ (1) โรคที่เกิดจากปรสิตทั้งกลุ่มปรสิตภายนอก แบ่งออกเป็น 1. กลุ่มปรสิตเซลล์เดียว ได้แก่ เห็บระฆัง (*Trichodina*) อิ๊ก (Ich, *Ichthyopthirius multifilis*) ชิโลโดเนลล่า (*Chilodonella*) ไซฟิเดีย (*Scyphidia*) อิพิสไทลิส (*Epistylis*) คอสเตีย (*Costia*) 2. กลุ่มหนอนพยาธิ ได้แก่ ปลิงใส (Monogene) 3. กลุ่มปรสิตเปลือกแข็ง ได้แก่ เออกาซิลัส (*Ergasilus*) แลมโพรกลีน่า (*Lamproglena*) เห็บปลา (*Argulus*) หนอนสมอ (Anchor worm) หมัดปลา (Isopod) 4. ตัวอ่อนหอย ได้แก่ โกลซิเดีย (Glochidia) และกลุ่มปรสิตภายใน ได้แก่ โรคเหงาหลับในปลา (Sleeping sickness in fish) เฮกซามิต้า (*Hexamita*) อิเมอเรีย (Eimeria) (2) โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ได้แก่ โรคตัวด่าง (*Flavobacterium* spp.) โรคสเตรปโตคอคโคซิส (*Streptococcus algalactiae*) โรคติดเชื้อแอโรโมแนส (*Aeromonas* sp.) โรคตาขุ่น (*Pseudomonas* sp.) โรคอีพิทีลิโอซิสทิส (Epitheliocystis) (3) โรคที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม *Achly* sp., *Saprolegnia* sp. และ (4) โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรครีโอ-ไลค์ไวรัส (Reo-like virus)

การรักษาปลาที่ป่วยเป็นโรคต่างๆ ข้างต้นนั้นทำได้โดยการใช้ยาและสารเคมีให้เหมาะสมกับกลุ่มตัวก่อโรค ซึ่งมีข้อจำกัด คือ เมื่อปลาป่วยแล้วจะไม่กินอาหาร การให้ยาผสมอาหารจึงไม่ได้ผลในการรักษา และหากมีการใช้ยาที่ไม่ถูกต้องจะส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อก่อโรค และก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาและสารเคมีในตัวปลา ทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย วิธีการที่เหมาะสมและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมวิธีหนึ่ง คือ การจัดการด้านภูมิคุ้มกันโดยการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประโยชน์เติมลงในอาหารเพื่อให้

ระบบทางเดินอาหาร หรือตัวปลาทำงานได้อย่างปกติ เพื่อปรับสภาพเป็นตัวต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นแนวทางที่ควรศึกษา

โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน ช่วยปรับสมดุลให้จุลินทรีย์ในลำไส้ สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (อัจฉรา, 2550) ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลแข็งแรงขึ้น (Pirarat *et al*., 2011) สามารถต่อต้านโรคอันอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ หรือจากแบคทีเรียชนิดที่ก่อโรค (ภัทริดาและคณะ, 2554) สำหรับความหมายโพรไบโอติกในเชิงการเลี้ยงสัตว์น้ำ จากสุบัณฑิต และวีรพงศ์ (2552) หมายถึง จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลผลิตจากแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วไปมีผลช่วยให้สัตว์ดังกล่าวมีสุขภาพดีขึ้น” โพรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้ (1) เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ก่อประโยชน์ (2) สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตต่อสัตว์น้ำ (3) ไม่ก่อให้เกิดโรค (4) เป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่มจำนวน (5) เจริญและทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร (6) มีความคงทนต่อการเก็บรักษา

การนำโพรไบโอติกมาใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำทำให้ระบบเพาะเลี้ยงรักษาสมดุลได้มากขึ้น ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และส่งเสริมการทำงานของระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและให้ผลผลิตที่ยั่งยืน แบคทีเรียกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกและนิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) (สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาแบคทีเรียบาซิลลัส (Bacillus bacteria) สามารถยับยั้งการก่อโรคจากแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย (ประพันธ์ ศักดิ์ และคณะ, 2554; Aly *et al*., 2008)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์น้ำ เช่น จากการศึกษาของ Aly *et al*. (2008) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางด้านแบคทีเรีย และพยาธิวิทยาจากแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่ามี 15 ไอโซเลท ที่ผ่านการทดสอบการเป็นโพรไบโอติก ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท (*Bacillus pumilus*, *Bacillus firmus* และ *Citrobacter freundii*) เท่านั้นที่สามารถยังยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ จากนั้นนำเชื้อโพรไบโอติกไปใช้เป็นอาหารเสริม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมด้วยโพรไบโอติกจะไม่ก่อโรค และอาหารที่เสริมด้วย *Bacillus pumilus* มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดตามด้วย *Citrobacter freundii* และ *Bacillus firmus* ตามลำดับ จากรายงานของ Del’Duca *et al*. (2013) ใช้ *Bacillus* sp. และ *Enterococcus* sp.

ที่แยกได้จากลำไส้ของปลานิลและเศษดินตะกอน ตามลำดับ เพื่อใช้ในการเลี้ยงปลานิล พบว่าสามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescens* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการศึกษาของทศพร (2547) ทำการศึกษาถึงแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer* โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกด้วยเทคนิค Well agar diffusion พบว่ามี 5 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล

สุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ของปลานิล โดยนำลำไส้มาบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ในอัตราส่วนลำไส้ปลาต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1 และทำการเจือจาง (tenfold serial dilution) สารละลายตัวอย่างลำไส้ปลา และทำการ spread plate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่ความเจือจาง 10^{-4} -10^{-9} เท่า ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) , Bacillus agar และ Lactobacillus MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่คัดแยกได้โดยเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีจากข้อมูลงานวิจัยที่รายงานมาแล้ว (จำรูญ และคณะ, 2552; พรพรรณ , 2550; Tsai *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Chiaramonte *et al.*, 2009; Waldeck *et al.*, 2006 และ Parry *et al.*, 1983) นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับที่ทำการ spread plate แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เจริญบนอาหารแข็งมาย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การย้อมแกรมตรวจสอบรูปร่างเซลล์ การย้อมสปอร์ตรวจดูการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การย้อมแกรม, การย้อมสปอร์, การสร้างเอนไซม์คะตะเลส, ความสามารถในการย่อยแป้ง, การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI), การทดสอบ MR-VP (Methyl red-Voges-proskauer) และการทดสอบ Indole ตามแผนผังการแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิลปลานิลแดง (วรกฤต, 2557) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกสำหรับการทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิลต่อไป

3.2 การศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก โดยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วข้างต้น แต่ละไอโซเลทมา 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว TSB, Bacillus broth หรือ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียให้มีปริมาณเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร) เพื่อเตรียม

ทดสอบความทนกรด ความทนเกลือ ความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีน ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล และความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ ดังนี้

3.2.1 การทดสอบความทนกรด (ดัดแปลงจาก คมแข และคณะ, 2553ก)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 1, 2, 3 และ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ โดยใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 เป็นตัวควบคุม โดยเปลี่ยนเป็นค่า Log แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทนกรด

3.2.2 การทดสอบความทนเกลือ (ดัดแปลงจาก คมแข และคณะ, 2553ก)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ โดยเปลี่ยนเป็นค่า Log แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทนเกลือ

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีน

3.2.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (ดัดแปลงจาก Mitidieri *et al*., 2006) โดยวางดิสก์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ soluble starch ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นหยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนดิสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ลงไป 5-10 นาที หากเกิด clear zone แสดงว่าเชื้อผลิตเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งได้

3.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน (ดัดแปลงจาก Michael and Pelezar, 1995) โดยวางดิสก์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ skim milk ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นหยดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนดิสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากมีการย่อยโปรตีนจะเกิด clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงว่าเชื้อแสดงมีการย่อยโปรตีน

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปลานิล

นำแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. (6 สายพันธุ์ ดังนี้ *Streptococcus* sp. (T008), *Streptococcus* sp. (T148), *Aeromonas* sp. (T114), *Aeromonas* sp. (T119), *Pseudomonas* sp. (T075) และ *Pseudomonas* sp. (T141)) มาปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อ ให้มีปริมาณเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ทำการเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยวิธี Spread plate จากนั้นวางดิสก์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบผลด้วยการดูการเกิด Clear zone เพื่อดูการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียไพรไบโอติกต่อเชื้อก่อโรค

3.2.5 การทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ (ดัดแปลงจากหทัยรัตน์, 2551)

การทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ ทำการปรับความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียโพรไบโอติกให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard เลี้ยงเชื้อลงบนอาหารแข็ง ด้วยวิธีการ Spread plate จากนั้นวางดิสก์ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Gentamicin เข้มข้น 10 ไมโครกรัม (GM-10), Tetracycline เข้มข้น 30 ไมโครกรัม (TE-30), Trimethoprim เข้มข้น 5 ไมโครกรัม (TMP-5) และ Chloramphenicol เข้มข้น 30 ไมโครกรัม (C-30) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบผลด้วยวิธีการวัด Clear zone และแปลผลตาม Becton, Dickinson and Company

3.3 การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากลำไส้ปลานิล

จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบทางชีวโมเลกุลโดยการหาลำดับเบส บริเวณยีน 16S rRNA และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จาก www.ezbiocloud.net

ทำการสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยชุดสกัด Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, Geneaid วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องดูดกลืนแสงให้ได้ความเข้มข้น 25-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปทำ PCR โดยมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม, สารสละลายบัฟเฟอร์ 1 เท่า, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTPs, 0.2 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 27F, 0.2 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 1492R, 0.3 U Taq DNA Polymerase และเติม dH_2O ให้ครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม 95 °C นาน 5 นาที ตามด้วย 95 °C นาน 45 วินาที 50 °C นาน 1 นาที 72 °C นาน 1.30 นาที จำวน 35 รอบ และ 72 °C นาน 5 นาที จัดเก็บไว้ที่ 4-8 °C หลังจากนั้นส่งหาลำดับเบสที่ SolGent Co.,Ltd., ประเทศเกาหลี นำผลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล Eztaxon เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

การแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ของปลานิล โดยสุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชังนำมาแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติก ด้วยวิธี Total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA), *Bacillus* agar และ *Lactobacillus* MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่คัดแยกได้โดยเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีจากข้อมูลงานวิจัยที่รายงานมาแล้ว และนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล จำนวน 54 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) ได้แก่ 1) แยกได้จากอาหาร TSA จำนวน 24 ไอโซเลท (รหัส T) โดยพบลักษณะโคโลนีของเชื้อ มีรูปร่างแบ่งออกเป็นรูปร่าง กลมและรูปร่างไม่แน่นอน, สีของโคโลนีแบ่งออกเป็นสีขาว สีขาวขุ่น สีครีม และสีส้ม, ระดับความนูนแบ่งออกเป็นนูน และแบน, ผิวหน้าแบ่งออกเป็นผิวหน้าเรียบและขรุขระ และขอบโคโลนีแบ่งออกเป็นขอบเรียบและขอบขรุขระ 2) แยกได้จากอาหาร *Bacillus* agar จำนวน 22 ไอโซเลท (รหัส B) โดยพบลักษณะโคโลนีของเชื้อมีรูปร่างแบ่งออกเป็นรูปร่างกลมและรูปร่างไม่แน่นอน, สีโคโลนีแบ่งออกเป็นสีขาว สีเหลือง และใส, ระดับความนูนแบ่งออกเป็นนูนและแบน, ผิวหน้าแบ่งออกเป็นผิวหน้าเรียบและขรุขระ และขอบโคโลนีแบ่งออกเป็นขอบเกลี้ยงและขอบขรุขระ และ 3) แยกได้จากอาหาร *Lactobacillus* MRS agar จำนวน 8 ไอโซเลท (รหัส M) โดยพบลักษณะโคโลนีของเชื้อ มีรูปร่างแบ่งออกเป็นรูปร่างกลมและรูปร่างไม่แน่นอน, สีของโคโลนีแบ่งออกเป็นสีขาว สีเหลือง และใส, ระดับความนูนแบ่งออกเป็นนูนและแบน, ผิวหน้าแบ่งออกเป็นผิวหน้าเรียบและขรุขระ และขอบโคโลนีแบ่งออกเป็นขอบเรียบและขอบขรุขระ

ผลการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น พบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล จำนวน 54 ไอโซเลทนั้น เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง จัดเป็นกลุ่ม *Bacillus* spp. จำนวน 46 ไอโซเลท ได้แก่ แยกได้จากอาหาร TSA และ *Bacillus* agar จำนวน 24 และ 22 ไอโซเลท ตามลำดับ สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ และกลุ่ม *Lactobacillus* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท แยกได้จากอาหาร *Lactobacillus* MRS agar ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และไม่สร้างเอนไซม์ Tryptophanase ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวรกฤต (2557) จึงนำไปสู่ขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลต่อไป

ตารางที่ 4.1 รหัสไอโซเลทของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกกลุ่มต่างๆ

กลุ่มแบคทีเรีย	รหัสไอโซเลท
T	T101, T102, T201, T202, T203, T204, T205, T301, T302, T303, T304, T305, T306, T307, T308, T309, T310, T311, T312, T313, T314, T316, T317, T318
B	B102, B104, B105, B106, B108, B109, B201, B301, B302, B306, B307, B308, B310, B312, B313, B315, B317, B318, B319, B321, B322, B323
M	M101, M103, M104, M105, M106, M201, M202, M301

4.2 การศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

4.2.1 ผลการทดสอบทนกรด

จากการทดสอบความทนกรดของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ Spread plate ที่ระดับพีเอช 1, 2, 3 และ 4 พบว่ามีเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 1, 2, 3 และ 4 ได้แก่ T201, T302, T308, T310, T312, B104, B106, B201, B301, B310, B313, M101, M104, M201 และ M202 และมีเชื้อจำนวน 13 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2, 3 และ 4 ได้แก่ T306, T307, T311, T313, T314, T316, T318, B108, B306, B308, B312, B315 และ B317, ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2.2 ผลการทดสอบทนเกลือ

จากการทดสอบความทนเกลือของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ Spread plate ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเชื้อจำนวน 45 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ T101, T102, T202, T204, T205, T301, T302, T303, T304, T305, T306, T307, T308, T309, T310, T311, T312, T313, T314, T316, T318, B102, B104, B105, B106, B108, B109, B301, B302, B306, B312, B315, B317, B318, B319, B321, B323, M101, M103, M104, M105, M106, M201, M202 และ M301 และมีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.5, 1, และ 2 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ T201, T317 และ B322 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ

รหัสไอโซเลท	T101	T102	T201	T202	T203	T204	T205	T301	T302	T303	T304	T305	T306	T307
การทดสอบความทนกรด														
- **พีเอช 1**	-	-	46.53	-	-	-	-	-	33.70	-	-	-	-	-
- **พีเอช 2**	-	-	40.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51.46	31.05
- **พีเอช 3**	76.00	27.36	65.25	41.60	-	60.83	31.00	-	34.91	35.48	-	54.78	51.59	48.81
- **พีเอช 4**	129.20	82.83	104.27	99.51	64.37	79.80	74.95	95.71	80.16	75.64	-	-	70.88	89.55
การทดสอบความทนเกลือ														
- **ความเข้มข้น 0.5%**	66.06	81.48	54.88	57.73	76.13	71.22	96.20	56.64	69.95	48.16	67.25	80.78	48.37	57.80
- **ความเข้มข้น 1%**	64.34	81.39	56.13	54.45	63.16	71.44	95.44	46.95	79.18	62.11	62.76	78.58	50.48	63.81
- **ความเข้มข้น 2%**	50.27	54.11	52.86	51.18	-	71.86	90.39	40.69	79.18	70.50	65.39	73.39	38.55	64.87
- **ความเข้มข้น 3%**	59.79	67.22	-	50.11	-	72.98	79.24	44.89	79.06	51.16	69.88	55.70	40.58	64.49

หมายเหตุ - = ไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ

รหัสไอโซเลท	T308	T309	T310	T311	T312	T313	T314	T316	T317	T318	B102	B104	B105	B106
การทดสอบความทนกรด														
- **พีเอช 1**	33.61	-	41.05	-	45.93	-	-	-	-	-	-	44.89	-	39.87
- **พีเอช 2**	30.03	-	36.98	40.33	39.09	38.09	28.59	35.40	-	63.29	-	42.80	-	41.02
- **พีเอช 3**	46.07	46.97	48.63	49.85	42.47	48.89	29.99	52.09	-	45.12	-	47.54	-	61.39
- **พีเอช 4**	90.01	80.82	83.47	87.81	77.87	82.34	82.76	83.01	91.96	80.46	-	58.03	73.40	-
การทดสอบความทนเกลือ														
- **ความเข้มข้น 0.5%**	72.74	57.51	56.56	58.68	54.01	63.96	51.26	97.55	62.55	95.87	57.70	59.53	58.90	77.93
- **ความเข้มข้น 1%**	71.74	57.57	56.17	58.68	54.01	66.99	51.81	97.42	42.46	97.02	58.21	59.93	59.12	76.57
- **ความเข้มข้น 2%**	72.37	59.55	55.95	57.91	53.37	58.04	46.47	84.71	43.24	92.49	57.88	59.73	58.90	96.48
- **ความเข้มข้น 3%**	72.17	58.57	56.42	57.62	53.70	61.27	74.74	82.77	-	87.23	58.51	57.97	58.90	28.11

หมายเหตุ - = ไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ

รหัสไอโซเลท	B108	B109	B201	B301	B302	B306	B307	B308	B310	B312	B313	B315	B317	B318
การทดสอบความทนกรด														
- **พีเอช 1**	-	-	54.36	41.18	-	-	-	-	64.91	-	44.15	-	-	-
- **พีเอช 2**	42.08	-	47.96	58.58	-	56.35	-	61.50	73.54	35.35	41.18	56.91	54.90	-
- **พีเอช 3**	58.33	24.40	46.66	57.22	-	67.23	-	47.96	77.83	45.13	46.31	41.97	50.91	43.53
- **พีเอช 4**	72.37	-	70.04	72.42	-	77.44	-	52.64	101.93	57.83	70.90	71.48	72.01	50.91
การทดสอบความทนเกลือ														
- **ความเข้มข้น 0.5%**	53.93	55.02	48.53	81.35	58.17	57.83	30.58	33.51	35.48	57.75	70.86	59.32	68.86	87.33
- **ความเข้มข้น 1%**	49.59	94.54	77.05	75.22	59.70	59.38	28.06	27.50	29.28	57.99	-	57.24	68.65	82.13
- **ความเข้มข้น 2%**	62.34	54.25	-	81.99	58.43	59.38	-	-	-	58.35	-	57.16	66.77	84.25
- **ความเข้มข้น 3%**	36.98	88.70	-	81.93	57.88	59.59	-	-	-	58.22	-	55.96	66.77	62.78

หมายเหตุ - = ไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ

รหัสไอโซเลท	B319	B321	B322	B323	M101	M103	M104	M105	M106	M201	M202	M301
การทดสอบความทนกรด												
- **พีเอช 1**	-	-	-	-	46.96	-	56.95	-	-	53.44	51.53	-
- **พีเอช 2**	-	-	-	-	35.48	-	66.69	-	-	50.74	60.95	-
- **พีเอช 3**	60.80	54.47	-	-	28.64	68.25	56.95	-	-	72.04	84.95	-
- **พีเอช 4**	76.00	63.16	-	-	88.03	83.18	79.39	-	-	88.97	43.09	67.84
การทดสอบความทนเกลือ												
- **ความเข้มข้น 0.5%**	94.36	60.45	97.58	79.73	48.28	51.47	64.25	58.22	73.90	59.08	61.26	51.04
- **ความเข้มข้น 1%**	93.26	55.56	87.06	80.05	65.62	61.48	56.32	47.37	70.13	59.35	57.44	52.19
- **ความเข้มข้น 2%**	84.17	54.83	66.83	74.24	47.46	59.02	54.44	56.84	73.77	57.50	56.87	55.11
- **ความเข้มข้น 3%**	85.56	54.64	-	78.24	47.03	58.83	49.33	56.54	60.12	59.08	56.87	59.08

หมายเหตุ - = ไม่สามารถเจริญได้

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด และการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 15 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด และสามารถเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ได้แก่ T201, T302, T308, T310, T312, B104, B106, B301, B302, B310, B313, M101, M104, M201 และ M202 และมีเชื้อ 13 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด และสามารถเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพรองลงมา ได้แก่ T306, T307, T311, T313, T314, T316, T318, B108, B306, B308, B312, B315 และ B317

4.2.3 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีน

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกทั้งหมด 54 ไอโซเลท พบว่าเชื้อ 20 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยแป้งได้ ได้แก่ T202, T204, T205, T302, T305, T311, T313, T318, B102, B105, B108, B201, B308, B315, B317, B322, M101, M104, M106 และ M202 และจากการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน พบเชื้อ พบว่าเชื้อ 32 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ ได้แก่ T201, T202, T204, T306, T307, T308, T309, T310, T311, T312, T314, T317, T318, B102, B104, B105, B106, B108, B109, B201, B315, B318, B319, B321, B322, B323, M101, M104, M105, M106, M202 และ M301 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.2.4 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปลานิล

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้ง 54 ไอโซเลท ด้วยวิธี Spread plate ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในปลานิลจำนวน 3 กลุ่มได้แก่ *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. (6 สายพันธุ์ ดังนี้ *Streptococcus* sp. (T008), *Streptococcus* sp. (T148), *Aeromonas* sp. (T114), *Aeromonas* sp. (T119), *Pseudomonas* sp. (T075) และ *Pseudomonas* sp. (T141)) และจากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ T205 และมี 5 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ T204, T305, T306 และ T307 และ M105 และมี 13 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ T203, T301, T304, T308, T309, T310, B105, B106, B109, B322, M101, M103 และ M104 และมี 9 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งได้ 3 กลุ่ม ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ T303, T311, T313, T317, T318, B102, B104, B319 และ M202 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งและความสามารถในการย่อยโปรตีน

รหัสไอโซเลท	แป้ง	โปรตีน	รหัสไอโซเลท	แป้ง	โปรตีน
T101	-	-	B106	-	+
T102	-	-	B108	+	+
T201	-	+	B109	-	+
T202	+	+	B201	+	+
T203	-	-	B301	-	-
T204	+	+	B302	-	-
T205	+	-	B306	-	-
T301	-	-	B307	-	-
T302	+	-	B308	+	-
T303	-	-	B310	-	-
T304	-	-	B312	-	-
T305	+	-	B313	-	-
T306	-	+	B315	+	+
T307	-	+	B317	+	-
T308	-	+	B318	-	+
T309	-	+	B319	-	+
T310	-	+	B321	-	+
T311	+	+	B322	+	+
T312	-	+	B323	-	+
T313	+	-	M101	+	+
T314	-	+	M103	-	-
T316	-	-	M104	+	+
T317	-	+	M105	-	+
T318	+	+	M106	+	+
B102	+	+	M201	-	-
B104	-	+	M202	+	+
B105	+	+	M301	-	+

หมายเหตุ + = มีความสามารถในการย่อย/เกิด Clear zone

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

รหัสไอโซเลท	แบคทีเรียก่อโรค					
	Streptococcus sp. (T008)	*Streptococcus* sp. (T148)	*Aeromonas* sp. (T114)	*Aeromonas* sp. (T119)	*Pseudomonas* sp. (T075)	*Pseudomonas* sp. (T141)
T101	-	-	+	-	-	-
T102	-	-	+	-	+	-
T201	-	+	+	+	-	-
T202	+	-	+	+	-	-
T203	+	-	+	++	+	-
T204	+	+	+	+	+	-
T205	+	+	+	+	+	+
T301	-	+	+	+	+	-
T302	-	-	-	-	+	-
T303	-	+	+	-	+	-
T304	+	+	+	-	+	-
T305	+	+	+	+	+	-
T306	+	-	+	+	+	+
T307	+	+	+	+	+	-
T308	+	-	+	++	+	-
T309	+	-	+	++	+	-
T310	+	-	+	+	+	-
T311	+	-	+	-	+	-
T312	-	-	+	-	+	-
T313	-	+	-	+	+	-
T314	+	+	-	-	+	-
T316	+	-	-	-	+	-
T317	+	-	+	-	+	-
T318	+	-	-	+	+	-
B102	-	+	+	-	-	+
B104	-	+	+	-	-	+
B105	-	+	+	+	-	+

หมายเหตุ - = ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง, + = ประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ, ++ = ประสิทธิภาพการยับยั้งสูง

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

รหัสไอโซเลท	แบคทีเรียก่อโรค					
	Streptococcus sp. (T008)	*Streptococcus* sp. (T148)	*Aeromonas* sp. (T114)	*Aeromonas* sp. (T119)	*Pseudomonas* sp. (T075)	*Pseudomonas* sp. (T141)
B106	-	+	++	+	-	+
B108	-	+	++	+	-	-
B109	-	+	+	+	-	+
B201	-	-	-	+	-	-
B301	++	+	-	-	-	-
B302	-	+	-	-	+	-
B306	-	-	-	-	-	-
B307	+	+	-	-	-	-
B308	-	+	-	-	-	-
B310	-	+	+	-	-	+
B312	-	+	+	-	-	+
B313	-	+	+	+	-	+
B315	-	+	++	+	-	+
B317	-	+	++	+	-	-
B318	-	+	+	+	-	+
B319	-	-	-	+	-	-
B321	++	+	-	-	-	-
B322	-	+	-	-	+	-
B323	-	+	-	-	-	+
M101	+	+	+	-	+	-
M103	+	+	+	-	+	-
M104	-	+	+	++	+	-
M105	+	+	+	++	+	-
M106	-	-	+	-	+	-
M201	+	-	+	-	-	-
M202	-	+	+	-	+	-
M301	+	-	+	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง, + = ประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ, ++ = ประสิทธิภาพการยับยั้งสูง

4.2.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้ง 54 ไอโซเลท โดยวิธี Spread plate ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบจะคัดเลือกจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides คือ Gentamicin เข้มข้น 10 ไมโครกรัม (GM-10), ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracyclines คือ Tetracycline เข้มข้น 30 ไมโครกรัม (TE-30), ยาปฏิชีวนะกลุ่มPhenicols คือ Chloramphenicol เข้มข้น 30 ไมโครกรัม (C-30) และยาปฏิชีวนะกลุ่ม Diaminopyrimidines คือ Trimethoprim เข้มข้น 5 ไมโครกรัม (TMP-5) โดยจากการทดสอบพบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่สามารถต้านทาน Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol และ Trimethoprim ได้แก่ M103, M104 และ M201 และมี 6 ไอโซเลท ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้ 3 ตัว โดยที่มี 5 ไอโซเลท ที่สามารถต้านทาน Tetracycline, Chloramphenicol และ Trimethoprim ได้แก่ B306, B310, B313, B317 และ T311 และมี 1 ไอโซเลท ที่สามารถต้านทาน Gentamicin, Tetracycline และ Chloramphenicol คือ T318 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

4.3 ผลแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี

ผลการทดสอบคุณลักษณะการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล จากทั้งหมด 54 ไอโซเลท พบว่ารหัสไอโซเลทที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ M104 (ภาพที่ 4.1) เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่ pH 1, 2, 3 และ 4 มีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้นที่ 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการย่อยได้ทั้งแป้งและโปรตีนได้ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. และมีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol และ Trimethoprim

รหัสไอโซเลทที่มีคุณลักษณะการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพรองลงมา ได้แก่ T311 และ T318 เนื่องจาก T311 และ T318 (ภาพที่ 4.1) มีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่ pH 2, 3 และ 4 มีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้นที่ 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการย่อยได้ทั้งแป้งและโปรตีนได้ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. และความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะได้ 3 ตัว โดยที่ T311 สามารถต้านทาน Tetracycline, Chloramphenicol และ Trimethoprim ได้ และ T318 สามารถต้านทาน Gentamicin, Tetracycline และ Chloramphenicol

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ

รหัสไอโซเลท	**ยาปฏิชีวนะ (ไมโครกรัม)**			
	Gentamicin (10)	**Tetracycline (30)**	**Chloramphenicol (30)**	**Trimethoprim (5)**
T101	S	I	R*	S
T102	S	I	R*	S
T201	S	R	R	S
T202	S	R	R	S
T203	S	R	R	S
T204	S	R	R*	S
T205	S	R	R*	S
T301	S	R	R	S
T302	S	R	R	S
T303	S	R	R	S
T304	S	R	R	S
T305	S	R	R*	S
T306	S	R	R	S
T307	S	R	R	S
T308	S	R	R	S
T309	S	R	R*	S
T310	S	R	R	S
T311	S	R	R	R
T312	S	R	S	R
T313	S	R	S	R
T314	S	R	S	R
T316	S	R	S	R
T317	S	R	S	R*
T318	R	R	S	R
B102	S	R	R*	S
B104	S	R*	R*	S
B105	S	R	R	S

หมายเหตุ R* = Resistant (ไม่เกิด Clear zone), R = Resistant (เกิด Clear zone),
I = Intermediate, S = Susceptible

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ

รหัสไอโซเลท	ยาปฏิชีวนะ (ไมโครกรัม)			
	Gentamicin (10)	Tetracycline (30)	Chloramphenicol (30)	Trimethoprim (5)
B106	S	R	R*	S
B108	S	R	R*	S
B109	S	R	R*	S
B201	S	R	R	S
B301	S	I	R*	S
B302	S	I	R	S
B306	S	R	R	R*
B307	S	I	R	S
B308	S	R	R*	S
B310	S	R	R*	R*
B312	S	I	R	S
B313	S	R	R	R*
B315	S	R	R	S
B317	S	R	R	R*
B318	S	R	R	S
B319	S	R	R	S
B321	S	R	R	S
B322	S	R	R	S
B323	S	R	R*	S
M101	S	R	S	R*
M103	R*	R*	R*	R*
M104	R*	R*	R*	R*
M105	S	R	S	R
M106	S	R	S	R
M201	R*	R*	R*	R*
M202	S	R	S	R
M301	S	R	S	R

หมายเหตุ R* = Resistant (ไม่เกิด Clear zone), R = Resistant (เกิด Clear zone),
I = Intermediate, S = Susceptible

M104 T311 T318

ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล

4.4 ผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากลำไส้ปลานิล

จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบทางทางชีวโมเลกุลโดยการหาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล Eztaxon (www.ezbiocloud.net) พบว่า M104: *Lactobacillus* sp., T311: *Bacillus cereus* 99.93% และ T318: *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* 99.67%

จากผลการทดสอบความทนกรดและทนเกลือดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อพีเอชยิ่งน้อยอัตราการเจริญของเชื้อโดยส่วนใหญ่จะยิ่งลดน้อยลง หากเชื้อใดที่สามารถมีชีวิตรอดได้จะแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทนั้นเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกได้ ซึ่งจะเหมาะกับการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในร่างกายของสัตว์น้ำได้ โดยค่าพีเอชของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารปลานิลมีค่าอยู่ระหว่าง 1-3 และทางเดินอาหารโดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กตอนต้นจะมีเกลือน้ำดีหลั่งออกมาจากตับอ่อน เพื่อเข้ามาช่วยย่อยอาหารจำพวกไขมันซึ่งจะมีความเข้มข้น 0.13-0.15 เปอร์เซ็นต์ (จุฬาลักษณ์, 2553) สอดคล้องกับการศึกษาของพรพรรณ (2550) ที่รายงานว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถทนเกลือได้ที่ความเข้มข้น 2-10 เปอร์เซ็นต์ และ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่ pH 2-6 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Chowhury *et al*. (2012) ที่ทำการทดสอบความสามารถในการทนกรดของ *L. plantarum* พบว่าสามารถเจริญได้ที่ pH 4-8 ทนเกลือที่ระดับความเข้มข้น 1-9 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นได้

ความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารจำพวกแป้ง โปรตีน และไขมันเป็นคุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Austin *et al.*, 1995) พบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยแป้งและโปรตีนจะช่วยส่งเสริม

การเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ การที่แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากลำไส้ของปลานิลสามารถย่อยแป้งและโปรตีนได้นั้น จะส่งผลดีต่อการทำงานในกระบวนการย่อยอาหารของสัตว์ ซึ่งสนับสนุนคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในการเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ที่แบคทีเรียโพรไบโอติกอาศัยอยู่ได้ เนื่องจากทำให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ได้เร็วยิ่งขึ้น (หทัยรัตน์, 2551) ซึ่งจากผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งและความสามารถในการย่อยโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงการมีคุณสมบัติดังกล่าว และยังมีความสอดคล้องกับการศึกษาของมณฑกานต์ (2547) ที่รายงานความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีนของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของกุ้ง จำนวน 150 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 150 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้ทั้งหมด และมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ 7 สายพันธุ์

แบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถทำให้เจ้าบ้านแข็งแรง มีความต้านทานโรค โดยเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน และอาจแย่งชิงสารอาหารหรือพื้นที่อยู่อาศัยจากแบคทีเรียก่อโรคที่หลุดเข้าไปในร่างกาย รวมทั้งปล่อยสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค จากผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (ตารางที่ 4.4) ก็แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติข้อนี้ รวมถึงสอดคล้องกับการศึกษาของภัทริดา และคณะ (2554) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Aeromonas hydrophila* ABRCA1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRCS1) ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยวิธี Cross streak method พบว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ABRCA1 ส่วนเชื้อ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญทับโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS1 ได้ และสอดคล้องกับการศึกษาของวิศัย และสุวภร (2555) ซึ่งได้ทำการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เพื่อใช้เป็นแหล่งของโพรไบโอติก โดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมัก 6 ตัวอย่าง และนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา พบว่าสามารถยับยั้งก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ได้

สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะดังตารางที่ 4.5 มีความสอดคล้องกับการศึกษาของคมแข และคณะ (2553ข) ที่รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง มีคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamycin, Kanamycin, Naldixic acid, Neomycin, Norfloxacin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ Oxolinic acid และการศึกษาของหทัยรัตน์ (2551) ที่รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่กระทงและไก่พื้นเมืองของประเทศไทยสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol, Erythromycin และ Tetracycline ได้ทุกสายพันธุ์ ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งในการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ (ปรีชา, 2550) เนื่องจากบางครั้งอาจมีการ

ใช้ยาปฏิชีวนะควบคู่กับแบคทีเรียโพรไบโอติกหากแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะจะทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถอยู่รอดได้ และช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลานิลให้ดียิ่งขึ้น

ดังนั้น จากผลการทดสอบคุณลักษณะของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท M104, T311 และ T318 เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่เหมาะสม สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงปลานิลเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ของปลานิล โดยสุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในกระชังนำมาแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติก ด้วยวิธี Total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA, *Bacillus* agar และ *Lactobacillus* MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่คัดแยกได้โดยเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีจากข้อมูลงานวิจัยที่รายงานมาแล้ว แล้วนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น พบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล จำนวน 54 ไอโซเลท เป็นแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง แบ่งเป็นกลุ่มที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ จำนวน 46 ไอโซเลท กลุ่มที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและไม่สร้าง จำนวน 8 ไอโซเลท โดยจัดเป็นกลุ่ม *Bacillus* sp. และกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ตามลำดับ

การทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล จากทั้งหมด 54 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท M104 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Lactobacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีในอาหารทดสอบที่มีค่าพีเอช 1-4 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% NaCl, สามารถย่อยแป้งและโปรตีน, ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. รวมถึงสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim จึงจัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุด และไอโซเลท T311 (*Bacillus cereus*) และ T318 (*Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*) สามารถเจริญได้ดีในอาหารทดสอบที่มีค่าพีเอช 2-4 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% NaCl, สามารถย่อยแป้งและโปรตีน, ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. รวมถึงสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะต้านทานยาปฏิชีวนะ Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim (T311) และต้านทานยาปฏิชีวนะ Gentamicin, Tetracycline, Chloramphenicol (T318) จัดว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีรองลงมา จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท M104, T311 และ T318 สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในระบบการเพาะเลี้ยงปลานิลต่อไปได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปประยุกต์ใช้ในการทำอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและภาคสนาม เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

คมแข พิลาสมบัติ, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553ก. สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 28 (3): 1-8.

คมแข พิลาสมบัติ, นวลพรรณ งามยี่สุ่น และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553ข. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 28 (2): 19-28.

คีรี กออนันตกุล และจุฬ สินชัยพานิช. 2549. การเลี้ยงปลานิลในกระชัง. กรมประมง. 24 หน้า.

จุฬารัตน์ ชูพรหม. 2553. การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จำรูญ มณีวรรณ, มงคล ถิรบุญญานนท์ และกิตติพงษ์ ทิพยะ. 2552. การใช้โพรไบโอติกเพื่อเพิ่มศักยภาพของการผลิตและทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในแม่สุกรอุ้มท้องและแม่สุกรเลี้ยงลูก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ทศพร เรืองรักษ์ลิขิต. 2547. แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์ และนนทวิทย์ อารีย์ชน. 2554. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ต่อระบบภูมิคุ้มกันและการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554: 73-82.

ปรีชา ภูมิพื้นผล. 2550. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ภัทริดา โปฎก, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และนิติ ชูเชิด. 2554. ผลของการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค. ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรกฤต วรนันทกิจ. 2557. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิศัย พรหมเทพ และสุวภร ยศตะโคตร. 2555. การแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพื่อใช้เป็นแหล่งของโปรไบโอติก. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. 4(8): 49-66.

สุดา ตัณฑวณิช, เต็มดวง สมศิริ, วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ, จารี ผลชนะ, วารินี ปัญญาวชิร, ฐิติพร หลาวประเสริฐ, สมเกียรติ กาญจนาคาร, พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล, เบญจพร สัมฤทธิเวช และจิราภรณ์ บำรุงกิจ. มปป. โรคปลานิล. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด, กรมประมง

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของ จุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้ในโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 222-264.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 170 น.

Aly, M.S., Abd-El-Rahman M.A., John G. and Mohamed F.M. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture. 277: 1-6.

Austin, B. Struckey, L.F., Roderson, P.A.W., Effendi, I. and Griffith, D.R.W. 1995. A probiotic strains of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases.18: 93-96.

Chiaramonte, F., Blugeon, S., Chaillou, S., Langella, P. and Zagorec, M. 2009. Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei* during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice. Applied and Environmental Microbiology.75, 4498–4505.

Chowdhury, A., Hossain, N., Mostazir, J. N., Fakruddin, Billah, M. and Ahmed, M. 2012. Screening of *Lactobacillus* spp. from buffalo yoghurt for probiotic and antibacterial activity. Journal of Bacteriology and Parasitology. 3: 156. doi: 10.4172/2155-9597.1000156

Del'Duca, A., Cesar, D.E., Diniz, C.G. and Abreu, P.C. 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent *in situ* hybridization technique. Aquaculture. 388-391: 115-121 http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.0169

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of Polysaccharide, Protein and Lipid. *In* Laboratory Exercises in Microbiology. Graw-Hill, New York : 126-188.

Mitidieri S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulation. Technology 97 : 1217-1224.

Parry, J.M., Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R. 1983. A colour atlas of *Bacillus* species. Ipswich, England. W.S. Cowell Ltd.

Pirarat, N., Pinpimaiet, K. and Endo, M. 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Research in Veterinary Science. 91, 92–97.

Tsai, C.C.,Lai, H.C.,Yu,B.and Tsen, Y.H. 2010. Use of PCR primers and probes based on the 23S rRNA and internal transcription spacer (ITS) gene sequence for the detection and enumerization of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in feed supplements. Molecular Biology and Genetics.16, 270–277.

Waldeck, J., Daum, G., Bisping, B. and Mainhardt, F. 2006. Isolation and molecular characterization of chitinase-Deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. *Applied* and Environmental Microbiology.12, 7879-7885.

Wang, Y.,Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., and Bai, X. 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet kefir. Journal Carbohydrate Polymers. 82, 895–903.

ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล : นายวรกฤต วรนันทกิจ

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาและอักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอกการศึกษา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2539	ปริญญาตรี วท.บ.	ประมง	เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2553	ปริญญาเอก วท.ด.	พันธุวิศวกรรม	พันธุวิศวกรรม	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา): โรคสัตว์น้ำ, ภูมิคุ้มกันวิทยา และโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ