

รายงานการวิจัย

ผลของการใช้โพรไบโอติกบาซิลลัสที่คัดเลือกจากระบบ
ทางเดินอาหารปลานิลและยีสต์ขนมปังต่อการยับยั้งเชื้อ

Aeromonas hydrophila และ *Flavobacterium columnare*

Effect of Using Selective probiotics *Bacillus* from Nile tilapia

Gastrointestinal Flora and Bakers' yeast to *A. hydrophila*

and *F. columnare* inhibition

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ว่าที่ ร.ต. (หญิง) ดร. เกศินี จันทโรสภณ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

นายสัมฤทธิ์ ประวิทย์ธนา

นายตระหนัก สมเนตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

(ปีงบประมาณ 2555)

ตุลาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง ผลของการใช้โพรไบโอติกบาซิลลัสที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารปลา
นิลและยีสต์ขนมปังต่อการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* เป็น
โครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณ 2555 ก่อตั้งโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย ลีลาวัณาส อาจารย์ประจำภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ และผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการหมักและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะ
เทคโนโลยี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิรุบล กิจอันเจริญ อาจารย์ประจำภาควิชาประมง คณะ
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสนอ
ภิรมจิตรผ่อง ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา รวมถึงกรรมการผู้เข้าฟังการรายงาน
ความก้าวหน้าทุกท่าน ที่ช่วยให้คำแนะนำในการทำวิจัยและเขียนรูปเล่ม ขอขอบคุณอาจารย์ใน
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเจ้าหน้าที่ ตลอดจนนักศึกษาสาขาวิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณอดิเทพไชยกานต์ ภาชนะวรรณ นักศึกษาปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างเลือดปลา

สุดท้าย ขอขอบพระคุณบุพการี คณาจารย์ และครอบครัวของคณะผู้วิจัยทุกท่าน

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2555

ผลของการใช้โพรไบโอติกบาซิลลัสที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารปลานิลและยีสต์ขนมปังต่อ

การยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare*

เกศินี จันทรโสภณ* สัมฤทธิ์ ประวิทย์ธนา ตระหนัก สมเนตร

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

*email: kesineechan@yahoo.co.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เชื้อ *Bacillus* ที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารปลานิลและยีสต์ขนมปังเป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ ขยายเชื้อ *Bacillus* และถ่ายทอดให้เกษตรกรนำไปใช้ในฟาร์มจริง โดยเก็บตัวอย่างปลานิลกระชัง อาหาร ดิน และแบคทีเรียบำบัดน้ำเพื่อคัดแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัส ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และเชื้อ *F. columnare* UBRU1 โดยวิธี Spot on lawn และ Agar well diffusion พบว่า คัดแยกได้เชื้อ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้งสองได้ 6 ไอโซเลตจาก 118 ไอโซเลต ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากไส้ปลานิลคือ *Bacillus* sp. UBRU22 ยับยั้งการเจริญได้สูงสุด โดยมีรัศมีบริเวณใสต่อเชื้อทั้งสองเป็น 5.3 ± 0.2 และ 20.0 ± 0.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการจัดจำแนกเชื้อพบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 มีสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีตรงกับเชื้อ *B. licheniformis* TISTR004 วิธีการขยายเชื้อคือ เพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารดัดแปลงข้าวสุกแล้วถ่ายเชื้อในอาหารดัดแปลงนมถั่วเหลืองยูเอชทีร้อยละ 25 หรือสารละลายอาหารปลาร้อยละ 5 ที่มีเกลือร้อยละ 3 โดยให้อากาศใต้มากพอเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผสมอาหารปลา 20 เท่า (ปริมาตร/น้ำหนัก) เพื่อให้ปลากินรักษาโรค ผลการใช้ยีสต์ขนมปังเป็นโพรไบโอติกในปลานิลกระชัง พบว่าปลานิลมีอัตราการเจริญสูงกว่าการใช้ Oxytetracyclin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การใช้ *Bacillus* เป็นโพรไบโอติกในปลานิลกระชัง พบว่าหลังจาก challenge test ด้วยเชื้อ *A. hydrophila* และเชื้อ *F. columnare* UBRU1 ปลานิลกลุ่มที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 และกลุ่มที่ใช้ *B. licheniformis* มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้โพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ ร้อยละ 86.7 ± 0.0 , 73.4 ± 1.09 และ 13.4 ± 0.5 ตามลำดับ เมื่อถ่ายทอดการขยายเชื้อและการใช้โพรไบโอติกในปลานิลให้เกษตรกรนำไปใช้ในฟาร์มจริง พบว่าการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* ช่วยรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรียในปลานิลได้ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ และการใช้โพรไบโอติกยีสต์ช่วยให้ปลานิลเติบโตมากกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ โดยเกษตรกรกลุ่มเป้าหมายมีความพึงพอใจในการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลาที่ระดับมากที่สุดร้อยละ 100

Effect of Using Selective probiotics *Bacillus* from Nile tilapia Gastrointestinal Flora and Bakers' yeast to *A. hydrophila* and *F. columnare* inhibition

ABSTRACT

The aim of this research were to use the isolated bacilli from Nile tilapia gastro-intestinal tracts and bakers' yeast as probiotics in Nile tilapia cultures for antibiotics substitution and to train the farmers to use these probiotics in their fish farms. Infected Nile tilapia samples, as same as the samples from food, soil, and waste water treated bacteria were collected and isolated for bacilli which were showed the growth inhibition of *A. hydrophila* and *F. columnare* UBRU1 by Spot on lawn and Agar well diffusion techniques. The results revealed that there were 6 from 118 isolates of the isolated bacilli showed the inhibitory effect on *A. hydrophila* and *F. columnare* UBRU1. *Bacillus* sp. UBRU22 which was isolated from Nile tilapia intestines expressed the highest clear zone radius to both pathogens that were 5.3 ± 0.2 and 20.0 ± 0.0 mm, respectively. For identification, morphological and biochemical properties of *Bacillus* sp. UBRU22 were similar to *B. licheniformis* TISTR004. Cells production of *Bacillus* sp. UBRU22 was scaled up, modified cooked rice was used to culture an inoculum before transferred to modified broth medium that were 25% UHT Soybean milk or 5% fish feed added with 3% NaCl. After aeration was provided for 24 h, cell suspension from modified broth medium was mixed with 20 fold fish feed (volume/weight) and was fed to cure fish disease. The use of bakers' yeast as feed supplemented in cage-cultures Nile tilapia was found that growth rate of probiotic yeast groups was higher than Oxytetracyclin groups, significantly ($P < 0.05$). The use of *Bacillus* as probiotic in cage-cultures Nile tilapia were found that after challenge test with *A. hydrophila* and *F. columnare* UBRU1, survival rate of probiotics *Bacillus* sp. UBRU22 groups and *B. licheniformis* groups were higher than the control groups, significantly ($P < 0.05$) which were $86.7 \pm 0.0\%$, $73.4 \pm 1.09\%$ and $13.4 \pm 0.5\%$, respectively. After the methods to scale up and to use the probiotics in Nile tilapia was trained to culture's farmers and were demonstrated at their fish farms, it was found that, the use of *Bacillus* probiotic can cure Nile tilapia from fish diseases outbreaks better than antibiotic using. The use of probiotic yeast can promote Nile tilapia growth more than antibiotic using, too. And all of the target farmer groups were pleased by the use of these probiotics in fish-cultures at the maximum rate for 100%.