การใช้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 และคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิล

The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 and soy milk kefir as probiotics in Nile tilapia

เกศินี จันทรโสภณ*, สัมฤทธิ์ ประวิทย์ธนา และเสรี จันทรโสภณ

Kesinee Chantharasophon, Sumrit Prawitthana and Seree Chantarasopon

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani, 34000

* Corresponding author: 045-352000, FAX 045-352070, E-mail:kesineechan@yahoomail.co.th

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 และคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) แบ่งปลานิลขนาด 35±5 กรัม เป็น 3 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่ม T1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่ม T2 ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ($4.89\pm1.23\times10^8$ CFU/mL) ร้อยละ 6 และกลุ่ม T3 ใช้คีเฟอร์ ($2.83\pm1.5\times10^8$ CFU/mL) ร้อยละ 6 เลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 30 วัน พบว่า กลุ่ม T3 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่ม T2 และ T1 วัดได้ 1.09±0.09, 0.84±0.17 และ 0.80±0.06 กรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ ส่วนค่าทางโลหิตวิทยา ไมโครนิวเคลียส และนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดงของทุกกลุ่มการทดลอง มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าอัตราการรอดของกลุ่ม T3 สูงกว่ากลุ่ม T2 และ T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) วัดได้ร้อยละ 83.33±5.77, 70.0±0.0 และ 46.67±5.77 ตามลำดับ ผลการใช้คีเฟอร์ที่ร้อยละ 3 และร้อยละ 6 เลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 60 วัน พบว่าปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโต 1.31±0.07 และ 1.92±0.08 กรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่ระดับร้อยละ 6 เป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกในปลานิล

คำสำคัญ : ปลานิล โพรไบโอติก ไมโครนิวเคลียส นิวเคลียแอบนอมัลลิตี Challenge test

Abstract

The aim of this research was to study the use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 and soy milk kefir as probiotics in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Nile tilapia fish, 35±5 g were divided into 3 groups, T1 was control, T2 was 6% of *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ($4.89\pm1.23\times10^8$ CFU/mL) supplemented, and T3 was 6% of kefir ($2.83\pm1.5\times10^8$ CFU/mL) supplemented. After 30 days of fish cultivation, the highest growth rate was found in T3 and the next were T2 and T1 which were 1.09±0.09, 0.84±0.17 and 0.80±0.06 g/fish/ days, respectively. Hematological parameters, micronucleus and nuclear abnormalities in erythrocytes of each groups were not significantly

($P<0.05$) affected by all treatments. After challenge test with *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection, survival rate of T3 exhibited the highest in significance level ($P<0.05$), consequently with T2, and T1, that were 83.33±5.77%, 70.0±0.0%, and 46.67±5.77%, respectively. The supplementation of kefir, 3% and 6% in Nile tilapia feed was studied and after rearing for 60 days growth rate were significantly different ($P<0.05$) which were 2.65±0.09 and 2.78±0.21 g/fish/day, respectively. These results indicated that dietary supplementation of 6% kefir is an alternative use as probiotics in Nile tilapia culture.

Keywords: Nile tilapia, Probiotics, Micronucleus, Nuclear abnormalities, Challenge test

บทนำ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 เป็นต้นมา ประเทศไทยประสบปัญหาภัยแล้งและขาดแคลนน้ำอย่างต่อเนื่อง ผลผลิตปลานิลในปี พ.ศ. 2557 ได้เพียง 204,787 ตัน ซึ่งลดลงร้อยละ 3.7 และมีแนวโน้มลดลงร้อยละ 4 ในปีต่อไป (Noorit, 2016) ปลานิลที่เลี้ยงอย่างหนาแน่นจะเกิดความเครียดและติดเชื้อก่อโรคได้ง่าย เชื้อก่อโรคในปลานิลที่จัดเป็นเชื้อประจำถิ่นและก่อโรคได้รุนแรงคือแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* โดยเฉพาะเชื้อ *A. hydrophila* (Wangkahart and Rattanasena, 2012; Kamgar *et al.,* 2013) การใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารปลาเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคระบาดในปลาได้ มีรายงานที่ใช้เชื้อ *Bacillus* บางสายพันธุ์เป็นโพรไบโอติกที่ 10^7-10^9 CFU/g ในปลานิลและปลาชนิดอื่น พบว่าช่วยให้ปลามีภูมิต้านทานต่อเชื้อก่อโรคและมีอัตราการรอดสูงขึ้น (Chantharasophon and Prawitthana, 2015; Das *et al.,* 2013; Kamgar *et al.,* 2013) เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลานิลในจังหวัดอุบลราชธานี (Chatharasophon, 2016) จึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจนำมาทดลองใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ตลอดปีในการเลี้ยงปลานิล นอกจากนี้โพรไบโอติกที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งคือ คีเฟอร์ (Kefir) เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักเปรี้ยวที่นิยมเรียกว่านมเปรี้ยวบัวหิมะทิเบต (Chantharasophon and Muthikul, 2014) ได้จากการใช้กล้าเชื้อผสมที่เรียกว่าคีเฟอร์เกรน (kefir grain) หมักกับนมจากสัตว์หรือพืชจนได้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสข้นหนืด มีรสเปรี้ยว มีฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีแอลกอฮอล์เล็กน้อยและมีสารที่ให้กลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์ (Kesenkas *et al.,* 2011) เชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* ในคีเฟอร์เป็นเชื้อที่ผลิตสาร exopolysaccharides เรียกว่า Kefiran ซึ่งมีสมบัติละลายได้ในน้ำ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายโซ่ที่แตกเป็นกิ่งของ glucogalactan ที่ประกอบด้วย D-glucose และ D-galactose ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่เป็นกล้าเชื้อในสัดส่วนที่เท่ากัน (Kesmen and Kacmaz, 2011) มีรายงานว่า kefiran สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ต่อต้านการอักเสบ และกระตุ้นให้ระดับสารที่เป็นภูมิต้านทานของร่างกายชนิด IgA ในเนื้อเยื่อผนังลำไส้เล็กของหนูทดลองที่ได้กิน kefiran ให้เพิ่มสูงขึ้น จึงนิยมใช้ kefiran ในงานทางเภสัชอุตสาหกรรม (Dailin *et al.,* 2016; Prado *et al.,* 2015) แต่ยังไม่เคยมีการทดลองใช้คีเฟอร์ในปลานิล การวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาการใช้โพรไบโอติก *B. amyloliquefaciens* และคีเฟอร์เพื่อยับยั้งการติดโรคระบาดจากเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิล

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์: *B. amyloliquefaciens* KJ720206, *A. hydrophila* และกล้าเชื้อผลิตคีเฟอร์ จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

2.2 การเตรียมเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 และคีเฟอร์นมถั่วเหลือง

1) เพาะเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ในอาหารนมถั่วเหลืองยูเอชทีโดยใช้กล้าเชื้อจากอาหาร Nutrient broth อายุ 24 ชั่วโมงปริมาณร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแบบเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อแบบ Total count ด้วยอาหาร Nutrient agar

2) ผลิตคีเฟอร์นมถั่วเหลือง โดยนำกล้าเชื้อผลิตคีเฟอร์ที่เก็บรักษาในนมโคยูเอชทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาหมักในนมถั่วเหลืองยูเอชทีโดยมีกล้าเชื้อร้อยละ 10 ในถุง HD ไล่อากาศออกจากถุงและพับเก็บปากถุงรัดยางแบบกึ่งปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแบบนิ่ง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อแบบ Total count ด้วยอาหาร *De* Man, Rogosa and Sharpe agar (Chantharasophon and Muthikul, 2014)

2.3 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 และคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิล

นำปลานิลจากฟาร์มปลาของนายศักดินา นักรำ เลขที่ 5 หมู่ 3 ตำบลหนองไฮ อำเภอสำโรง จังหวัดอุบลราชธานี น้ำหนัก 35$\pm$5 กรัม จำนวน 400 ตัว ไปเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เพื่อให้ปลาปรับตัวในถังพลาสติกขนาด 1x1.2x1.5 เมตร^3 ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเป็นเวลา 14 วัน แบ่งปลาที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันเป็น 3 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว ในถังเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 250 ลิตร ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลา เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่ม T1 อาหารปลาปกติ (กลุ่มควบคุม)

กลุ่ม T2 อาหารปลา + เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ที่เพาะเลี้ยงในนมถั่วเหลือง (6%)

กลุ่ม T3 อาหารปลา + คีเฟอร์นมถั่วเหลือง (6%)

ทดลองเลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วันและตรวจวัดอัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ จำนวนเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต ค่าร้อยละของไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดง และศึกษาการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธี Challenge test ที่ฉีดเชื้อแบบ Intraperitoneal (ตามวิธีของ Boonta *et al.,* 2012; Chantharasophon and Prawitthana, 2015)

2.4 ศึกษาปริมาณคีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่ใช้เป็นโพรไบโอติกเลี้ยงปลานิล

ใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิลต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0 (K0) ร้อยละ 3 (K3) และร้อยละ 6 (K6) เลี้ยงปลาเป็นเวลา 60 วันและตรวจวัดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.3

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ: วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ One-way analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ Duncan's new multiple range test

ผลการทดลอง

3.1 ผลการนับจำนวนเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 และคีเฟอร์นมถั่วเหลือง

จำนวนเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ในอาหารนมถั่วเหลือง และในคีเฟอร์นมถั่วเหลืองมีค่าเป็น $4.89\pm1.23\times10^{8}$ และ $2.83\pm1.5\times10^{8}$ CFU/mL ตามลำดับ

3.2 ผลการใช้ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 และคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิล

เมื่อใช้โพรไบโอติกในปลานิล 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม T1 กลุ่มควบคุม กลุ่ม T2 (*B. amyloliquefaciens* KJ720206) กลุ่ม T3 (คีเฟอร์นมถั่วเหลือง) เป็นเวลา 30 วัน พบว่า อัตราการรอดและอัตราการเจริญของกลุ่ม T3 มีค่าสูงกว่ากลุ่ม T2 และ T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเป็นร้อยละ 100±0.0, 93.33±6.67 และ 90.00±0 และ 1.09±0.09, 0.84±0.17 และ 0.80±0.06 กรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ (Table 1)

Table 1. Survival rate, ADG, FCR, haematological values, %micronuclei and %nuclear abnormalities in erythrocytes expression, antibody titer and survival rate after challenge test of Nile tilapia after rearing for 30 days with 0% probiotic (T1), 6% *B. amyloliquefaciens* KJ72020 (T2) and 6% soy milk kefir (T3) supplemented

Treatments	T1	T2	T3
Survival rate (%)	90.0±0.0[a]	93.33±5.77[a]	100±0.0[b]
ADG (g/f/d)	0.80±0.06[a]	0.84±0.17[a]	1.09±0.09[b]
FCR	2.8±0.10[ab]	3.07±0.68[b]	2.2±0.10[a]
WBC (K/Cu.mm)	859.67±116.41[a]	847.67±92.09[a]	724.67±17.95[a]
RBC (M/µL)	1.85±0.19[a]	1.97±0.52[a]	1.83±0.21[a]
HCT (%)	30.07±1.91[a]	29.57±2.72[a]	29.43±5.55[a]
Micronucleus (%)	0.03±0.03[a]	0.03±0.03[a]	0.07±0.05[a]
Nuclear abnormalities (%)	0.40±0.10[a]	0.40±0.10[a]	0.18±0.02[b]
Antibody titer (day 7 post–challenged)	>12	>12	11.67±0.58
Survival rate (%) (day 14 post–challenged)	46.67±5.77[a]	70.0±10.0[ab]	83.33±5.77[b]

[ab] Mean(±SD) in the same row with a different superscript letter are significantly different ($P<0.05$).

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อกลุ่ม T3 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม T1 และ T2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) วัดได้ 2.2±0.10, 2.8±0.10 และ 3.07±0.68 ตามลำดับ สำหรับค่าทางโลหิตวิทยาและค่าร้อยละของไมโครนิวเคลียสของทุกกลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มีเฉพาะค่านิวเคลียสที่ผิดปกติในเม็ดเลือดแดงของกลุ่ม T3 (ร้อยละ 0.18±0.02) ต่ำกว่ากลุ่ม T1 และ T2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

โดยกลุ่ม T2 กับ T1 มีค่าเท่ากันคือ ร้อยละ 0.4±0.1 หลังจาก Challenge test พบว่ากลุ่ม T1 และ T2 มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์มากกว่า 12 ส่วนกลุ่ม T3 มีค่าเป็น 11.67±0.58 อัตราการรอดของกลุ่ม T3 (83.33±5.77%) สูงกว่ากลุ่ม T1 (46.67±5.77%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่ไม่ต่างจากกลุ่ม T2 (70.0±10.0%) (Table 1) จึงเลือกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองไปศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เป็นโพรไบโอติกในปลานิลต่อไป

3.3 ผลการศึกษาปริมาณคีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในปลานิล

ผลการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิลต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0 (K0) ร้อยละ 3 (K3) และร้อยละ 6 (K6) พบว่าอัตราการเจริญของกลุ่ม K0, K3 และ K6 มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยมีค่าเป็น 0.87±0.04, 1.31±0.07 และ 1.92±0.08 กรัม/ตัว/วัน (Table 2)

Table 2. Survival rate, ADG, FCR, haematological values, **%**micronuclei and %nuclear abnormalities in erythrocytes expression, antibody titer and survival rate after challenge test of Nile tilapia after rearing for 60 days with 0% (K0), 3% (K3) and 6% (K6) soy milk kefir supplemented

Treatments	K0	K3	K6
Survival rate (%)	96.67±2.89^{a}	96.67±2.89^{a}	100.0±0.0^{a}
ADG (g/f/d)	0.87±0.04^{a}	1.31±0.07^{b}	1.92±0.08^{c}
FCR	2.78±0.21^{b}	2.65±0.09^{b}	2.23±0.14^{a}
WBC (K/Cu.mm)	858.1±100.31^{b}	724.2±15.03^{a}	726.13±16.85^{a}
RBC (M/µL)	1.81±0.27^{ab}	2.03±0.06^{b}	1.58±0.06^{a}
HCT (%)	28.83±3.19^{a}	35.5±2.88^{b}	24.6±1.45^{a}
Micronucleus (%)	0.02±0.02^{a}	0.08±0.03^{b}	0.12±0.03^{b}
Nuclear abnormalities (%)	0.31±0.10^{a}	0.46±0.07^{a}	0.46±0.05^{a}
Antibody titer (day 7 post–challenged)	11.0±0.0^{a}	11.0±0.0^{a}	11.67±0.58^{a}
Survival Rate (%) (day 14 post–challenged)	55.0±8.66^{a}	93.33±2.87^{b}	98.33±2.87^{b}

^{abc} Mean(±SD) in the same row with a different superscript letter are significantly different (P<0.05).

อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อกลุ่ม K6 มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับกลุ่ม K0 และ K3 โดยวัดได้ 2.23±0.14, 2.78±0.21 และ 2.65±0.09 ตามลำดับ สำหรับค่าทางโลหิตวิทยา ไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดงของทุกกลุ่ม พบว่า มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) บ้าง หลังจาก Challenge test พบว่า ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่อัตราการรอดหลังของกลุ่ม K0, K3 และ K6 มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยวัดได้ร้อยละ 55.0±08.66, 93.33±2.87 และ 98.33±2.87 ตามลำดับ (Table 2)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิล พบว่าช่วยให้ปลานิลมีอัตราการเจริญสูงที่สุด (1.09±0.09 กรัม/ตัว/วัน) มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด (2.2±0.10) และนอกจากนี้ยังพบว่าช่วยให้ปลานิลมีอัตราการรอดหลังทำ Challenge test สูงกว่าทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 (83.33±5.77) โดยคาดว่าสารที่ออกฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญและการต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลานิลนี้เป็นสารกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ที่เรียกว่าคีเฟอแรน ซึ่งสามารถกระตุ้นทั้งการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลที่นำมาทดลองได้พร้อมกัน จึงช่วยให้ปลานิลกลุ่มที่ใช้คีเฟอร์เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารมีอัตราการเจริญและอัตราการรอดหลังทำ Challenge test สูงที่สุด ซึ่งยืนยันด้วยค่าของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่มีค่าต่ำที่สุด ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานว่า สารข้นหนืดที่พบในคีเฟอร์มีฤทธิ์ทางเภสัชที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิต้านทานของร่างกาย เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นมิตรและลดจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Prado *et al*., 2015) อย่างไรก็ตามในการนำคีเฟอร์ไปใช้จริงควรมีการศึกษาต้นทุนกับความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ว่ามีความเป็นไปได้เพียงใด ที่สำคัญคือการเพาะเลี้ยงหรือการขยายเชื้อคีเฟอร์นั้นต้องบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 เป็นโพรไบโอติกในปลานิลพบว่า ปลานิลมีอัตราการเจริญและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อใกล้เคียงกับปลานิลในกลุ่มควบคุม แต่มีอัตราการรอดหลังทำ Challenge test สูงกว่าคือร้อยละ 70.0±10 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเป็นร้อยละ 46.67±5.77 แสดงว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถลดการติดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ในปลานิลได้ระดับหนึ่ง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* สามารถผลิตสารคล้ายกลุ่มสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนนี้คือ เชื้อ *B. amyloliquefaciens* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะได้ เช่น Difficidin และ Bacilysin สารดังกล่าวต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Erwinia amylovora* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ (Chen *et al*., 2009) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยวเขียวจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Ralstonia solanacearum* ในมะเขือเทศได้ (Ajilogba *et al*., 2012; Ji *et al*., 2013; Tan *et al*., 2013) แต่เมื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในปลานิลยังให้ผลที่ไม่ดีเท่ากับการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลือง ทั้งในด้านของอัตราการเจริญ อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดหลังทำ Challenge test ผลการศึกษาที่ได้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Chantharasophon and Prawitthana (2015) ที่ใช้โพรไบโอติก *B. brevis* UBRU4 เพาะเลี้ยงปลานิลกระชัง และพบว่าโพรไบโอติกดังกล่าวไม่ช่วยส่งเสริมการเจริญของปลานิล แต่ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากของ Merrifield *et al.* (2009) ที่รายงานว่า การใช้โพรไบโอติก *B. subtilis* ผสมกับ *B. licheniformis* ในอาหารปลาเทร้าสายรุ้งนั้น ส่งเสริมให้อัตราการกินอาหาร อัตราการเจริญ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นในการใช้โพรไบโอติกบาซิลัสเพาะเลี้ยงปลานิลจำเป็นต้องมีการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อไป

การที่ปลานิลกลุ่มควบคุมมีค่าทางโลหิตวิทยา ค่าไมโครนิวเคลียส และค่านิวเคลียแอบนอมัลลิตี ในเม็ดเลือดแดง ส่วนมากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ใช้โพรไบโอติก ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองและเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 เป็นโพรไบโอติกในปลานิลไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อค่า

เหล่านี้ ทั้งนี้คาดว่าสารคล้ายสารปฏิชีวนะและสารกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ที่โพรไบโอติกทั้งสองกลุ่มนี้ผลิต ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในปลานิลที่ศึกษา ผลที่ได้นี้แตกต่างจากการใช้เชื้อ *Bacillus* sp. UBRU1 เป็นโพรไบโอติกในปลานิล เนื่องจากพบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลานิลพบปริมาณไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงมากกว่าปกติ ซึ่งบ่งชี้ว่าได้รับสารก่อกลายพันธุ์ที่เข้าไปทำลายโครโมโซม (Ali *et al*., 2008; Abu Bakar *et al*., 2014) อย่างไรก็ตามผลการวิจัยที่ได้นี้สอดคล้องกับการรายงานของ Chantharasophon and Prawitthana (2015) ที่พบว่าการใช้เชื้อ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกในปลานิล ไม่ทำให้ค่าทางโลหิตวิทยาและค่าไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ใช้โพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สรุปผลการทดลอง

การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกเสริมในปลานิลที่ระดับร้อยละ 6 ของอาหารปกติ ทำให้ปลานิลมีอัตราการเจริญสูงที่สุดวัดได้ 1.92±0.08 กรัม/ตัว/วัน และอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุดวัดได้ 2.23±0.14 ที่สำคัญคือหลังทำ Challenge test ปลานิลมีอัตราการรอดสูงถึงร้อยละ 98.33±2.87 ซึ่งเป็นค่าที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นคีเฟอร์จึงเป็นโพรไบโอติกที่น่าสนใจในการนำมาใช้ควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยเฉพาะเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ตลอดปีในการเลี้ยงปลานิลและสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดอื่น แต่ควรมีการศึกษาในระดับภาคสนามก่อนนำไปใช้จริง

เอกสารอ้างอิง

Abu Bakar, S.N.N., Ashriya, A., Shuib, A.S., and Razak, S.A. 2014. Genotoxic effect of zinc and cadmium following single and binary mixture exposures in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using micronucleus test. Sains Malaysiana. 43(7): 1053–1059.

Ajilogba, C.F., Babalola, O.O., and Ahmad, F. 2013. Antagonistic Effects of Bacillus Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. Ethno Medicine. 7(3): 205-216.

Ali, F.K., El-Shehawi, A.M., and Seehy, M.A. 2008. Micronucleus test in fish genome: A sensitivity monitor for aquatic pollution. African Journal of Biotechnology. 7(5): 606-612.

Boonta, T., Chitmanat, C., and Promya, J. 2012. Effects of *Spirulina platensis*, *Cladophora* sp. and *Allium sativum* supplementary diets on growth performance, reproductive maturity, and phagocytic activity in common lowland frog (*Rana rugulosa*). Journal of Fisheries Technology Research. 6(1): 23-35. [in Thai]

Chantharasophon, K. 2016. Isolation of *Flavobacterium columnare* and *Bacillus* sp. from Nile tilapia and Catfish. Journal of Fisheries Technology Research. 10(1): [in press]

Chantharasophon, K., and Muthikul, R. 2014. Fermented Milk Products: Kefir. Journal of Science and Technology. 27(27): 15-23. [in Thai]

Chantharasophon, K., and Prawitthana, S. 2015. Effects of *Bacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and immune responses. Journal of Fisheries Technology Research. 6(1): 23-35. [in Thai]

Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., and Borriss, R. 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. Journal of Biotechnology. 140(1-2): 38-44.

Dailin, D.J., Elsayed, E.A., Othman, N.Z., Malek, R., Phin, H.S., Aziz, R., Wadaan, M., and Enshasy, H.A.E. 2016. Bioprocess development for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in semi industrial scale bioreactor. Saudi Journal of Biological Sciences. 23: 495–502.

Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S., and Kamilya, D. 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). Fish & Shellfish Immunology. 35(5): 1547-1553.

Ji, SH., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.S., and Yu, S.H. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. Mycobiology. 41(4): 234-242.

Kamgar, M., Pourgholam, R., Ghiasi, M., and Ghane, M. 2013. Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge Infections. Advanced Studies in Biology. 5(1): 37-50.

Kesmen, Z., and Kacmaz, N. 2011. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. Journal of Food Science. 76: M276–M283.

Kesenkas, H., Ddnkcd, N., Seckdn, K., Kinik, Ö., Gonc, S., Ergonul, P.G., and Kavas, G. 2011. Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of Soymilk Kefir. African Journal of Microbiology Research. 5(22): 3737-3746.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., and Davies, S.J. 2009. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. [Online]. Available from: http://www.spc.int/aquaculture/site/pubbications/documents/Tilapia.pdf [2014 Jun, 5]

Noorit, K. 2015. Situation of Nile tilapia on the production, trading and products of the year 2015 and trend of year 2016. [Online]. Available from: http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Pdf [2016, January 24]. [in Thai]

Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C.R. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Frontiers in Microbiology. 6 (1177): 1-10.

Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., and Xu, Y. 2013. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. Crop Protection. 43: 134-140.

Wangkahart, E., and Rattanasena, P. 2012. Efficacy of injectable formalin-killed *Aeromonas hydrophila* vaccine in hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). Journal of Fishies Technology Research. 6(1): 53-64. [in Thai]