ผลของการใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองในกบนา (*Rana rugulosa*)

Effect of using probiotic soybean kefir on common lowland frog (*Rana rugulosa*)

วารีรัตน์ แสนมาโนช และเกศินี จันทรโสภณ

Wareerat Sanmanoch and Kasinee Chantharasophon

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: wareerat.s@ubru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ในกบนา (*Rana rugarosa*) พบว่า การใช้คีเฟอร์เสริมในกบระยะลูกอ๊อดจนถึงระยะตัวเต็มวัยขนาดเล็กเป็นเวลา 60 วัน กลุ่ม T1 (Control) T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 10) และ T3 (คีเฟอร์ร้อยละ 20) มีอัตราการรอดคิดเป็นร้อยละ 64±1.45, 67±2.40 และ 71±1.76 ตามลำดับ ค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีวัดได้ร้อยละ 8.9±6.78, 0.66±1.96 และ 6.17±4.81 ตามลำดับ อัตราการรอดของกบหลังทดสอบการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* มีค่าเป็นร้อยละ 50±6.67, 40±8.82 และ 70±5.77 ตามลำดับ เมื่อใช้คีเฟอร์เสริมในกบอายุ 6 เดือนเป็นเวลา 60 วัน พบว่า กลุ่ม T1 (Control) และกลุ่ม T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 7.5) มีอัตราการรอดร้อยละ 100±0.0 ทั้งสองกลุ่ม อัตราการเจริญของกลุ่ม T1 กบเพศเมียและเพศผู้วัดได้ 1.46±0.09 และ 0.88±0.02 กรัมต่อวัน กลุ่ม T2 กบเพศเมียและเพศผู้เป็น 1.92±0.10 และ 1.14±0.05 กรัมต่อวัน ตามลำดับ ค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีของกลุ่ม T1 และ T2 วัดได้ร้อยละ 0.55±0.11 และ 0.60±0.07 ตามลำดับ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกบด้วยวิธี Microtiter plate agglutination technique พบว่า กลุ่ม T2 มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 4 ในขณะที่กลุ่ม T1 ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ทุกระดับความเจือจางของซีรั่ม ดังนั้นการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองร้อยละ 20 เป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกสามารถเพิ่มอัตราการรอดในกบนาระยะลูกอ๊อดและที่คีเฟอร์นมถั่วเหลืองร้อยละ 7.5 ส่งเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกบนาระยะตัวเต็มวัย

คำสำคัญ: โพรไบโอติก คีเฟอร์นมถั่วเหลือง โรคที่เกิดในกบ อาหารเสริม

Abstract

The effect of soy milk kefir as probiotic supplemented on growth promoting and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* of frog (*Rana rugarosa*) was studied. The result found that tadpole stage to frog stage of rearing with kefir supplemented for 60 days, revealed survival rate of each treated groups, T1 (Control), T2 (10% kefir), and T3 (20% kefir) were 64±1.45, 67±2.40 and 71±1.76%, respectively. Micronucleus and nuclear abnormalities were 8.9±6.78, 0.66±1.96 and 6.17±4.81%, respectively. After challenge test with *A. hydrophila*, survival rate were 50±6.67,

40±8.82 and 70±5.77%, respectively. The use of kefir as feed supplementation in 6 months frog was performed and it was found that survival rate of each treated groups, T1 (Control), and T2 (7.5% kefir) were 100±0.0% of both groups, survival rate in female and male frog of T1 and T2 were 1.46±0.09 and 0.88±0.02, and 1.92±0.10 and 1.14±0.05 g/d, respectively. Micronucleus and nuclear abnormalities were 0.55±0.11, and 0.60±0.07%, respectively. Immune response as antibody titers by Microtiter plate agglutination technique at days 3 post-challenged of T2 was 4.00±0.0 while there was no agglutination reaction in every dilution of control group serum. In conclusion, the probiotics in soy milk kefir at 20% concentation that increasing survival rate of tadpole and soy milk kefir at 7.5% concentration stimulate immune response of mature common lowland frog.

Key words: Probiotic, Soybean Kefir, Frog diseases, Feed supplement

บทนำ

กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่นิยมบริโภคเป็นอาหารทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่การจับกบในแหล่งธรรมชาตินั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่ทำให้แหล่งที่อยู่อาศัยเลี้ยงตัวตามธรรมชาติของกบลดลง ปริมาณกบในธรรมชาติจึงไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงกบแบบสัตว์เศรษฐกิจทั้งเพื่อจำหน่ายและบริโภคเองในครัวเรือนของเกษตรกร ทำให้แนวโน้มการเลี้ยงกบในลักษณะนี้มีการขยายตัวมากขึ้น สายพันธุ์กบที่เหมาะสมนำมาเพาะเลี้ยงในลักษณะนี้ ได้แก่ กบนา ซึ่งเป็นกบพื้นเมือง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rana rugulosa* เป็นกบที่มีการเจริญเติบโตเร็ว และนิยมนำไปประกอบอาหารบริโภคกันมากกว่ากบสายพันธุ์อื่น (Imsilp *et al*., 2010) ในการเพาะเลี้ยงกบนั้นเกษตรกรมักประสบปัญหาด้านการดูแลรักษาสถานที่เพาะเลี้ยง การถ่ายเทแหล่งน้ำไม่ให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค การติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนใหญ่โรคที่พบได้บ่อยในกบเลี้ยง คือ โรคขาแดงที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อกลุ่ม *Aeromonas* อาการของกบที่ป่วยนั้นจะมีผิวหนังบริเวณท้องและหน้าขา ตกเลือดเป็นผื่นสีชมพูถึงแดงเข้ม บางตัวท้องบวมและมีน้ำเหลืองปนเลือดในช่องท้อง (Somsiri *et al*.,1998; Boontha *et al*., 2012) ซึ่งการรักษาโรคที่ติดเชื้อในกบส่วนใหญ่รักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างในตัวกบและอาจมีผลกระทบต่อผู้บริโภคต่อไป

การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในการเพาะเลี้ยงกบโดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคเป็นรูปแบบหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ในการทดแทนสารปฏิชีวนะ เรียกวิธีนี้ว่าเป็นการควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) ซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์มีชีวิตกลุ่มโพรไบโอติกในการควบคุมการติดโรคระบาดจากแบคทีเรียในกบได้ ทั้งนี้การใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์ช่วยควบคุมและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เพิ่มความต้านทานโรค ความแข็งแรง การเจริญเติบโต และผลผลิตของสัตว์ นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์ได้ด้วย งานวิจัยของ Patel *et al.* (2015) ได้ศึกษากลไกของโพรไบโอติกที่ใช้

เสริมในอาหารสัตว์ต่อการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง และรายงานว่าโพรไบโอติกมีส่วนช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับระบบเยื่อเมือกทางเดินหายใจของสัตว์ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดได้ นอกจากนี้ Chantharasophon and Prawottana (2014) มีการศึกษาการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเพาะเลี้ยงปลานิลที่เติมเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคคือ *A. hydrophila* พบว่าปลานิลมีอัตราการรอดในสภาวะที่มีเชื้อ และช่วยให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเป็น 1.09 กรัมต่อตัวต่อวัน ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองในกบสายพันธุ์กบนา ซึ่งเป็นทางเลือกในการให้อาหารเสริม เพิ่มน้ำหนักตัว ตลอดจนสามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ลดความรุนแรงของโรคที่อาจดื้อต่อยาปฏิชีวนะเหล่านั้นในการกำจัดโรคของกบได้ อีกทั้งยังลดความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมีปนเปื้อนและตกค้างของทั้งผู้บริโภคและเกษตรกร

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สถานที่ทดลองเพาะเลี้ยงกบและเก็บตัวอย่างลูกอ๊อด

Site I สถานที่ทดลองเพาะเลี้ยงกบนา (*Rana rugulosa*) โตเต็มวัยและเก็บตัวอย่างลูกอ๊อด จากฟาร์มนางสาวทองใบ มูลสิน บ้านเลขที่ 72 หมู่ 4 บ้านกระโสบ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

Site II สถานที่ทดลองเพาะเลี้ยงลูกอ๊อดของกบนา (*Rana rugulosa*) ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

2. การเตรียมโพรไบโอติกคีเฟอร์

การผลิตคีเฟอร์นมถั่วเหลือง นำกล้าเชื้อคีเฟอร์นมถั่วเหลือง ซึ่งเป็นเชื้อผสมในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี มาเพาะเลี้ยงในอาหารนมถั่วเหลืองยูเอชทีรส Original classic จากบริษัทแลกตาซอย จำกัด โดยเติมกล้าเชื้อคีเฟอร์นมถั่วเหลืองน้ำหนัก 30 กรัม ลงไปในนมถั่วเหลืองยูเอชที 300 มิลลิลิตรแบบกึ่งปลอดเชื้อ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Chantharasophon and Prawottana, 2014) ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dilution plate count ในอาหาร MRS แบบมีและไม่มีอากาศ เก็บคีเฟอร์โดยการแช่แข็งที่ -18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 และ 60 วัน และตรวจนับจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน

3. การเพาะเลี้ยงกบในระยะลูกอ๊อดโดยใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์

3.1 การเตรียมสถานที่ เลี้ยงลูกอ๊อดในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ถังพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร น้ำเลี้ยงใช้น้ำประปาที่ระเหยคลอรีนแล้ว 4 ลิตรต่อถัง ทำความสะอาดถังและเปลี่ยนน้ำทุกวัน ส่วนด้านบนปากถังใช้ตาข่ายสีฟ้าคลุมป้องกันไม่ให้สัตว์อื่นรบกวนตลอดการทดลอง

3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง นำลูกอ๊อด อายุ 2 สัปดาห์ จากฟาร์ม (Site I) จำนวน 500 ตัว มาพักปรับสภาพในถังทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยความหนาแน่น 50 ตัวต่อถัง ปรับสภาพให้คุ้นเคยกับอาหารและสถานที่

3.3 การจัดการด้านอาหาร อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเม็ดสำหรับปลาดุกชนิดเม็ดลอยน้ำ ซึ่งแต่ละช่วงการเจริญของกบจะใช้อาหารขนาดแตกต่างกัน โดยลูกอ๊อดใช้อาหารปลาดุกเล็ก เบอร์ 9920 (ยี่ห้อฟิชเฟริส) เพื่อให้เหมาะต่อการกินอาหารของลูกอ๊อด โดยมีระดับโปรตีนในอาหารทดลองประมาณร้อยละ 30 ให้อาหารร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 1 ครั้งต่อวัน เลี้ยงให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน

3.4 การใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์เลี้ยงกบระยะลูกอ๊อด

แบ่งกลุ่มลูกอ๊อดออกเป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 50 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ดังนี้

กลุ่ม T1 ให้อาหารกบปกติ (Control)

กลุ่ม T2 ให้อาหารปกติ + คีเฟอร์ 100 g/1 kg Feed (ร้อยละ 10)

กลุ่ม T3 ให้อาหารกบ + คีเฟอร์ 200 g/1 kg Feed (ร้อยละ 20) เมื่อครบ 60 วันตรวจวัดดังนี้

1) อัตราการรอดชีวิตของกบเล็ก (Survival rate; %)

Survival rate = (จำนวนกบที่เหลือรอดในแต่ละซ้ำ (ตัว)/ จำนวนกบที่ใช้ทดลองในแต่ละซ้ำ (ตัว) x 100

2) การตรวจสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดง โดยสุ่มกบจากกลุ่มการทดลองละ 10 ตัว (ดัดแปลงจาก Chantharasophon *et al*., 2014 credited in Ali *et al*., 2008)

เจาะเลือดกบเพื่อนำเลือดไปตรวจหาลักษณะของนิวเคลียสที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการย้อมเลือดแดงด้วยสี Wright-Giemsa stain ตรวจหาเม็ดเลือดแดงจำนวน 2,000 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x และคำนวณเป็นร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่เกิดไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตี

3) การตรวจสอบความต้านทานโรคติดเชื้อ (Challenge test) ต่อเชื้อ *A. hydrophila* มีขั้นตอนดังนี้

สุ่มกบเล็กที่มีน้ำหนักประมาณ 60$\pm$5 กรัม กลุ่มการทดลองละ 10 ตัว และปรับความเข้มข้นของเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ให้เป็น 4.58×10^9 CFU/mL (กบตายมากกว่าร้อยละ 50) ฉีดเชื้อแบบ Intraperitoneal ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เลี้ยงกบเล็กต่ออีก 3 วัน เพื่อดูอัตราการรอดชีวิต เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophila* ปริมาณสูง ทำให้ใช้ระยะเวลาการติดตามผลสั้นลง ในช่วงเวลา 3-7 วัน

4. การเพาะเลี้ยงกบตัวเต็มวัยโดยใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์

4.1 สถานที่เลี้ยงกบ (Site I) การเตรียมอุปกรณ์ จัดเตรียมคอกดินขนาดกว้าง 80 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร น้ำเลี้ยงใช้น้ำประปาโดยเปลี่ยนน้ำร้อยละ 70 ทุกวัน ส่วนด้านข้างบ่อใช้ตาข่ายสีฟ้าสูง 1 เมตร ควบคุมการเจริญของกบภายใต้สภาวะแบบเปิดตามธรรมชาติ

4.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง กบตัวเต็มวัย คละเพศ อายุ 6 เดือน น้ำหนัก 80-100 กรัมต่อตัว โดยมีความหนาแน่นที่ 35 ตัวต่อบ่อ

4.3 การจัดการด้านอาหาร อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเม็ดสำหรับปลาดุก ชนิดเม็ดลอยน้ำ (เบอร์ 9921 และ 9922 ยี่ห้อฟิชเฟริส) เพื่อให้เหมาะต่อการกินอาหารของกบวัยนี้ โดยมีระดับโปรตีนในอาหารทดลองประมาณร้อยละ 25 ให้อาหารร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 2 ครั้งต่อวัน โดยปรับปริมาณอาหารที่ให้ทุกๆ 14 วัน ในแต่ละบ่อของแต่ละกลุ่มการทดลอง และทำความสะอาดเปลี่ยนน้ำเลี้ยงทุกวันตอนเย็น

4.4 การใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์เลี้ยงกบ แบ่งกลุ่มกบออกเป็น 2 ชุดการทดลองๆ ละ 2 ซ้ำๆ ละ 35 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ดังนี้ กลุ่ม T1 ให้อาหารกบปกติ (Control)

กลุ่ม T2 ให้อาหารปกติ + คีเฟอร์ร้อยละ 7.5 การใช้ปริมาณของคีเฟอร์ในอาหารเม็ดลอยสำหรับกบใหญ่มีข้อจำกัด จากการทดลองนี้ถ้าใช้ปริมาณคีเฟอร์มากเกินร้อยละ 7.5 ทำให้อาหารกบเละไม่สามารถลอยน้ำได้ ซึ่งกบจะกินเฉพาะอาหารที่ลอยบนผิวน้ำ เมื่อครบ 60 วันตรวจวัดดังนี้

1) อัตราการเจริญ และอัตราการรอดชีวิตของกบ โดยอัตราการเจริญเติบโตต่อวันมีหน่วยเป็นกรัมต่อวัน (Average daily growth; ADG; gram/days; g/d)

2) ร้อยละของค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดง

3) ตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ (Kituncharoen, 2006; Mohanty *et al*., 2007)

การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรั่มของกบ โดยวิธี Microtiter plate agglutination technique เป็นการวัดระดับการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มเป็นแผ่นระหว่างแอนติเจน (*A. hydrophila*) กับแอนติบอดีในซีรั่มของกบที่ทดลอง โดยการนำซีรั่มมาเจือจางแบบ Twofold dilution ใน 96 Wells microtiter plate ซึ่งค่าแอนติบอดีไตเตอร์อ่านจากส่วนกลับของระดับความเจือจางสุดท้ายของซีรั่มใน Microtiter plate ที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา (Minimal positive agglutinin)

ผลและวิจารณ์ผล

1. ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ของคีเฟอร์นมถั่วเหลือง

ผลการตรวจจำนวนจุลินทรีย์ในคีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่หมักอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และแช่แข็งเก็บรักษาไว้นาน 30 และ 60 วัน พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศเป็น $6.12 \pm 2.18 \times 10^{8}$, $3.61 \pm 1.47 \times 10^{6}$ และ $3.27 \pm 1.54 \times 10^{5}$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ให้อากาศมีจำนวนจุลินทรีย์เป็น $5.90 \pm 1.96 \times 10^{8}$, $2.34 \pm 0.73 \times 10^{6}$ และ $1.80 \pm 0.52 \times 10^{5}$ CFU/ml ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al*. (2005) ที่ตรวจนับจุลินทรีย์ในคีเฟอร์แกรนหมักนมแพะที่อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส พบว่ามีจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^{6}-10^{7} CFU เช่นเดียวกับ Chantharasophon and Mutthikul (2013) ที่พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในคีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่หมักในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศอยู่ที่ 10^{6}-10^{7} CFU/g คีเฟอร์มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในระดับ 10^{5}-10^{8} CFU/ml จะเห็นได้ว่าผลการเก็บรักษาคีเฟอร์แบบแช่แข็งทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือรอดน้อยลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการแช่แข็งแบบ Slow freezing จะทำให้เกิดส่วนของน้ำทั้งภายในและภายนอกเซลล์เปลี่ยนเป็นเกล็ดน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเมื่อทำการละลาย (Thawing) จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกทำลายไปด้วยส่วนหนึ่ง จึงทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาด้วย

2. ผลของการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองต่อกบในระยะลูกอ๊อด

เมื่อเลี้ยงลูกอ๊อดเป็นเวลา 60 วัน ลูกอ๊อดเริ่มมีการเจริญงอกขาหลังและพัฒนาไปเป็นลูกกบ ในแต่ละชุดการทดลองมีระยะการเจริญที่เท่าๆ กัน อย่างไรก็ตามในช่วงการหดหางสั้นเพื่อพัฒนาเป็นลูกกบ การพัฒนารูปร่างในระยะนี้เป็นช่วงที่ลูกอ๊อดอ่อนแอมาก ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยพบว่า กบเล็กกลุ่ม T1 (Control) กลุ่ม T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 10) และกลุ่ม T3 (20% คีเฟอร์) มีอัตราการรอดชีวิตเป็นร้อยละ 64±1.45, 67±2.40 และ 71±1.76 ตามลำดับ (Table 1) จากผลการศึกษาที่พบว่า การเจริญเติบโตของลูกกบทั้ง 3 กลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกัน สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าอาจเนื่องมาจาก ระยะของการเจริญที่มีการเปลี่ยนผ่านรูปร่างของลูกอ๊อดเป็นกบนั้นเป็นระยะที่ไม่อาจนำมาคำนวณในเรื่องของอัตราการเจริญได้ แต่ควรศึกษาในเรื่องของการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างหรือเปลี่ยนเฟสของการเจริญมากกว่า ดังที่พบจากรายงานการทดลองของ Kaewtapee *et al*. (2011) ที่ศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโตของลูกอ๊อดกบนาด้วยกวาวเครือขาวและกวาวเครือแดง และพบว่ากวาวเครือขาวและกวาวเครือแดงผสมในอาหารให้ผลการพัฒนาของลูกอ๊อดไปเป็นกบนาดีกว่ากลุ่มควบคุม

Table 1 Survival rate, Micronucleus and Nuclear abnormalities in red blood cells of tadpoles were feeding with probiotic kefir after 60 days and survival rate after challenge test

Treatment*	T1	T2	T3
Survival Rate (%); after 60 days of feeding	64±1.45[a]	67±2.40[a]	71±1.76[a]
Micronucleus & Nuclear abnormalities (%) ; after 60 days of feeding	8.9±6.78[a]	0.66±1.96[b]	6.17±4.81[a]
Survival Rate (%); after 3 days of challenged	50±6.67[b]	40±8.82[b]	70±5.77[a]

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

*T1 = Control groups

T2 = 10% kefir supplemented groups

T3 = 20% kefir supplemented groups

ค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดงของกบเล็ก ซึ่งค่าที่ได้จะบ่งชี้ความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของอาหารเสริมต่อสัตว์ทดลอง ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม T1 มีค่าเป็นร้อยละ 8.9±6.78 กลุ่ม T2 วัดได้ร้อยละ 0.66±1.96 และกลุ่ม T3 วัดได้ร้อยละ 6.17±4.81 ตามลำดับ (Table 1) จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมในกบนาระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบเล็กนั้น ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมกบ เนื่องจากพบว่าไมโครนิวเคลียสของกลุ่มการทดลองที่ได้รับคีเฟอร์ มีค่าจำนวนของไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีที่ให้ผลต่ำกว่าในกลุ่ม T2 และให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม T3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (T1) การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chantharasophon *et al*., (2017) ที่รายงานว่า การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิล ไม่มีผล

เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมในเม็ดเลือดแดงของปลานิลที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่า คีเฟอร์ไม่เป็นพิษต่อกบในระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบเล็กเช่นเดียวกับที่มีรายงานการศึกษาในปลานิล

ความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophila* เพื่อใช้ทำการทดสอบความต้านทานโรค ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ 2 เท่าของปริมาณเซลล์เริ่มต้นจำนวน 2.28×10^9 CFU/ml ทำให้กบแสดงอาการของโรคติดเชื้อ *A. hydrophilla* คือ ท้องบวม มีรอยจ้ำแดงบริเวณท้องและขา และเมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของลูกกบหลังการทดสอบความต้านทานโรค เป็นเวลา 3 วัน พบว่า กลุ่ม T1 (Control) มีค่าเป็นร้อยละ 50±6.67 กลุ่ม T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 10) วัดได้ร้อยละ 40±8.82 และกลุ่ม T3 (20% คีเฟอร์) วัดได้ร้อยละ 70±5.77 ตามลำดับ (Table 1) จากผลการทดลองพบว่ากบเล็กที่ได้รับคีเฟอร์ร้อยละ 20 มีอัตราการรอดชีวิต สูงกว่าทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองนี้คาดว่าสารสำคัญที่มีอยู่ในคีเฟอร์และส่งผลต่ออัตราการรอดของกบเล็กนี้ อาจเกิดเนื่องจากสารคีเฟอแรน ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกในคีเฟอร์ โดยจากรายงานของ Medrano *et al.* (2008) ที่ได้ศึกษาผลของคีเฟอแรนต่อการยับยั้งการติดเชื้อ *Bacillus cereus* ในเซลล์มนุษย์แบบหลอดทดลอง คือ Caco-2 cell line และ Human erythrocytes พบว่าการใช้คีเฟอแรนที่ระดับความเข้มข้น 300-1,000 mg/L สามารถยับยั้งการทำลายเซลล์ทั้งสองแบบของเชื้อดังกล่าวได้ จากผลการทำการทดสอบความต้านทานโรคในการศึกษาครั้งนี้ สามารถกล่าวได้ว่า การใช้คีเฟอร์เป็นอาหารเสริมนั้นสามารถกระตุ้นภูมิต้านทานโรคของลูกอ๊อดจนถึงระยะตัวเต็มวัยได้สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าการใช้คีเฟอร์เป็นโพรไบโอติกในลูกอ๊อดกบน่าจะเป็นทางเลือกสำหรับใช้ลดการติดเชื้อก่อโรคของกบระยะนี้ได้

3. ผลของโพรไบโอติกคีเฟอร์ต่อกบในระยะตัวเต็มวัย

กบในระยะตัวเต็มวัย อายุ 6 เดือน เลี้ยงในบ่อดิน โดยแบ่งกบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม T1 ให้อาหารกบปกติ (Control) และกลุ่ม T2 ให้อาหารปกติเสริมคีเฟอร์ร้อยละ 7.5 เมื่อครบ 60 วัน พบว่า กบในระยะตัวเต็มวัยทั้งสองกลุ่มมีอัตราการรอดเท่ากัน วัดได้ร้อยละ 100±0.0 ส่วนอัตราการเจริญของกบ พบว่ากบกลุ่ม T2 ที่ให้อาหารผสมกับคีเฟอร์ มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน (ADG) สูงกว่ากบกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยกบตัวเมียของกลุ่ม T2 มีอัตราการเจริญเป็น 1.92±0.10 กรัมต่อวัน และกบตัวผู้เป็น 1.14±0.05 กรัมต่อวัน สำหรับกลุ่ม T1 กบตัวเมียมีอัตราการเจริญเป็น 1.46±0.09 กรัมต่อวัน กบตัวผู้วัดได้ 0.88±0.02 กรัมต่อวัน (Table 2) ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่า คีเฟอร์สามารถส่งเสริมการเจริญต่อกบนาในระยะตัวเต็มวัยได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chantharasophon *et al.* (2017) ที่รายงานว่า การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโพรไบโอติกในปลานิลช่วยให้ปลานิลมีอัตราการเจริญสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือสามารถใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมช่วยกระตุ้นการเจริญของกบนาตัวเต็มวัยที่ศึกษาได้ ในทำนองเดียวกันงานวิจัยของ Promnuan *et al.* (2015) ได้รายงานว่า โพรไบโอติกสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาทับทิมได้ดี แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นกับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายด้วย

ผลการตรวจนับจำนวนไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียแอบนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดงของกบในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า มีผลที่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใน T1 และกลุ่ม T2 วัดได้ร้อยละ 0.55±0.11 และ 0.60±0.07 ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งเป็นผลที่ยืนยันให้เห็นว่า คีเฟอร์ไม่เป็นพิษต่อกบนาทั้งในระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบเล็กและระยะตัวเต็มวัย

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกบตรวจวัดโดยใช้วิธีวิเคราะห์ค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรัมของกบแบบ Microtiter plate agglutination technique พบว่า กบที่ให้อาหารผสมกับคีเฟอร์ (T2) มีระดับการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มที่ระดับความเจือจางสุดท้ายของซีรัม เท่ากับ 1: 4 หรือในซีรัมมีแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 4 (Table 2) ในขณะที่กบที่ให้อาหารปกติ (กลุ่มที่ 1) ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ทุกระดับความเจือจางของซีรั่ม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจาก คีเฟอร์ที่ใช้เสริมในอาหารมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาของระบบภูมิต้านทานร่างกายกบตัวเต็มวัยที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ โดยถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารแอนติบอดีออกมา ในขณะที่กบกลุ่มควบคุมไม่มีการหลั่งสารแอนติบอดีออกมา จากผลที่เกิดขึ้นเช่นนี้จะทำให้กบที่ได้รับคีเฟอร์เป็นอาหารเสริม มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคได้ดี ดังจะเห็นผลได้ในการทดลอง การทดสอบความต้านทานโรคของกบในระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบระยะตัวเต็มวัยขนาดเล็กที่มีอัตราการรอดหลังการทดสอบความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุม

Table 2 Survival Rate, Average daily growth, Micronucleus & Nuclear abnormalities in red blood cells and Antibody titer of mature frog groups treated with probiotic kefir for 60 days

Treatment*	T1	T2
Survival Rate (%); after 60 days of feeding	100±0.0[a]	100±0.0[a]
ADG of male (g/d)	0.88±0.02[a]	1.14±0.05[b]
ADG of female (g/d)	1.46±0.09[a]	1.92±0.10[b]
Micronucleus & Nuclear abnormalities (%)	7.48±0.59[a]	8.18±2.47[a]
Antibody titer; after 60 days of feeding	0.0	4.0±0.0

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

*T1 = Control groups

T2 = 7.5% kefir supplemented groups

สรุปผล

การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมในกบระยะลูกอ๊อด ในปริมาณของอาหารเสริมคีเฟอร์ร้อยละ 10 และ 20 เทียบกับการให้อาหารปกติ ระยะเวลาการทดลอง 60 วัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตในชุดการทดลองให้อาหารเสริมคีเฟอร์ร้อยละ 20 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 71±1.76 ซึ่งการใช้อาหารเสริมคีเฟอร์นมถั่วเหลืองไม่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ต่อกบนา และยังส่งเสริมความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ของ

ลูกกบได้ ในทำนองเดียวกันผลของโพรไบโอติกคีเฟอร์ต่อกบในระยะตัวเต็มวัย อายุ 6 เดือน เลี้ยงในบ่อดินโดยแบ่งกบออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มให้อาหารกบปกติ และกลุ่มให้อาหารปกติผสมคีเฟอร์ร้อยละ 7.5 เมื่อครบ 60 วัน พบว่า กบมีอัตราการรอดชีวิตในระยะตัวเต็มวัยทั้งสองกลุ่มการทดลองโดยวัดได้ร้อยละ 100±0.0 อีกทั้งส่งเสริมการเจริญของกบในระยะตัวเต็มวัย โดยกบกลุ่มที่ให้อาหารผสมกับคีเฟอร์ มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงกว่ากบกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคีเฟอร์นมถั่วเหลืองสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมจะมีปริมาณของจุลินทรีย์มีชีวิตในคีเฟอร์ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย สำหรับคณาจารย์และบุคลากรจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

Boontha, 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., Prawottana, S., and Chantharasophon, S. 2017. The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 and soy as probiotics in Nile tilapia. Journal of Fisheries Technology Research. 11(1): (inpress) [in Thai]

Chantharasophon, K. and Mutthikul, R. 2013. The immobilization of microorganisms by carrageenan and resistant starch to produce soy milk kefir. Journal of Research and Development Buriram Rajabhat University. 12(2): 74-88. [in Thai]

Chantharasophon, K. and Prawottana, S. 2014. Effects of *Bacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and immune responses. Journal of Fisheries Technology Research. 8(2) : 31-41. [in Thai]

Chen, M.J., Liu, J.R., Lin, C.W., and Yeh, Y.T. 2005. Study of the microbial and chemical properties of goat milk kefir produced by inoculation with taiwanese kefir grains. Asian-Aust. Journal of Animal Science. 18(5): 711-715.

Imsilp, U., Somsueb, P., and Imsilp, M. 2010. Replacing fish meal with soybean meal in common lowland frog, *Rana rugulosa* (Wiegmann) feed. Technical paper of Inland Fisheries Research and Delvelopment Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 25(1): 16 p. [in Thai]

Kaewtapee, V., Wadwijid, P., and Smitasiri, Y. 2011. Induction of frog tadpole development with *Pueraria mirifica* dried tuber and *Butea superba* root powder. Khon Kaen Agiculture Journal. 39(1): 260-264. [in Thai]

Kituncharoen, N., Hanjavanij, C., and Suwannapeng, N. 2006. Efficiency of vaccination with *Streptococcus agalactiae* bacteria on Streptococcosis prevention in Nile tilapia. Khon Kaen University Research Journal. 11(1): 53-61.

Medrano, M., Pérez, P.F., and Abraham, A.G. 2008. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. International Journal of Food Microbiology. 122(1): 1-7.

Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., Mahapatra, K.D., and Saha, J.N. 2007. Innate immunity response in families of Indian major carp, *Labeo rohita,* differing in their resistance to *Edwardsiella tarda* infection. Current Science. 92(9): 1270-1274.

Patel, S., Shukla, R., and Goyal A. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. Journal of Functional Foods. 14(1): 549–561.

Promnuan, K., Klawech, W., and Kiriratnikom, S. 2015. Application of probiotics for increasing of growth performance, feed utilization and disease resistance in hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference. Bangkok. 1595 p. [in Thai]

Somsiri, T., Chinabut, S., Phanwichien, K., Soontornvit, S., and Damrongphol, Y. 1998. Virulence of *Aeromonas* spp. isolated from red leg disease frog. Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference. Bangkok. 297 p. [in Thai]