การใช้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิลต่อเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์

The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 from gastro-intestinal tract of Nile tilapia on fish pathogens and canker disease

เกศินี จันทรโสภณ[1]

Kesinee Chantharasophon

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

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

[1] Corresponding author: 045-352000, FAX 045-352070, E-mail:kesineechan@gmail.com

บทคัดย่อ

การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิลยับยั้งเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำคือ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* KJ720207 และเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ คือ *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 และ *X. campestris* UBRU1 ด้วยวิธี Spot on lawn พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สร้างวงใสยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ วัดรัศมีวงใสได้ 6.0±1.0, 9.33±2.07, 7.75±1.71 และ 2.5±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ผสมในอาหารปลานิล โดยปลานิลกลุ่ม T1 ให้อาหารปกติ กลุ่ม T2 ให้อาหารผสม 10^9 CFU *B. amyloliquefaciens* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่ม T3 ให้อาหารผสม 0.05% Oxytetracyclie เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของกลุ่ม T2 และ T3 สูงกว่ากลุ่ม T1 โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 4.97±0.13, 4.57±0.14 และ 3.56±0.10 กรัมต่อวัน ตามลำดับ ค่าทางโลหิตวิทยาและการเกิดไมโครนิวเคลียสของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ยกเว้นค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่ม T3 มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบความต้านทานโรคจากเชื้อผสม *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี Challenge test พบว่า หลังจากฉีดเชื้อเข้าช่องท้องในวันที่ 7 ปลานิลกลุ่ม T2 มีอัตรารอดที่ร้อยละ 64.92±5.27 ขณะที่กลุ่ม T1 และ T3 มีค่าเป็นร้อยละ 0.0 และ 28.58±9.53 ตามลำดับ ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ *X. campestris* UBRU1 ที่ปลูกบนผลและใบมะนาวแบบ Puncture inoculation เป็นเวลา 14 วัน พบว่า กลุ่มทดลองเกิดรอยโรคแคงเกอร์เฉพาะจุดที่ปลูกเชื้อ ขณะที่กลุ่มควบคุมเกิดรอยโรคทั้งจุดที่ปลูกและขยายไปบริเวณรอบจุดที่ปลูกเชื้อ กล่าวได้ว่า เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถใช้เป็นทางเลือกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในปลา (*A. hydrophila* และ *F. columnare* KJ720207) และเชื้อก่อโรคแคงเกอร์แบบชีววิธีได้

คำสำคัญ : *A. hydrophila*, *F. columnare*, *X. campestris,* ปลานิล

Abstract

The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 from gastro-intestinal tract of Nile tilapia to inhibit fish pathogens which were *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* KJ720207 and the 2 strains of canker disease, *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 and *X. campestris* UBRU1. By spot on lawn method, *B. amyloliquefaciens* KJ720206 exhibited 6.0±1.0, 9.33±2.07, 7.75±1.71 and 2.5±0.58 mm. of clear zone radius to those 4 pathogenic strains, respectively. For rearing of Nile tilapia, T1, T2 and T3 that were control groups, mixed 10^9 CFU of *B. amyloliquefaciens* per 1 kg. feed groups and 0.05% Oxytetracycline mixed feed group, respectively, were studied for 30 days. The results showed that growth rate in average weight per fish of T2 and T3 were higher than T1 which were 4.97±0.13, 4.57±0.14 and 3.56±0.10 g/d, respectively. Hematological parameters and micronuclei in erythrocyte were not affected by all treatment groups with significantly ($P<0.05$), except hematocrit value of T3 was significantly lower than the others. The disease resistance of Nile tilapia groups, T1, T2 and T3 was studied by challenge test with the mixed of *A. hydrophila* and *F. columnare* and at the day 7 post–challenged, survival rate of T2 was 64.92±5.27% while T1 and T3 were 0.0% and 28.58±9.53%, respectively. The use of *B. amyloliquefaciens* KJ720206 to control the growth of *X. campestris* UBRU1 that was puncture inoculated on fruit and leaves of lime by covering inoculation was performed for 14 days. It was found that the treatment group was occurred the canker lesions only on the growing spotted, but in the control group, there was canker lesions on the growing spotted and progressed around. Therefore, *B. amyloliquefaciens* KJ720206 can be an alternative agent to use as biocontrol in fish pathogens; *A. hydrophila* and *F. columnare* KJ720207 and canker disease.

Keywords: *A. hydrophila*, *F. columnare*, *X. campestris,* Nile tilapia

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* และ *Flavobacterium* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นและสามารถก่อโรคในสัตว์น้ำได้ หากมีการเกิดโรคระบาดในแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลากระชังแล้ว เกษตรกรมักเชื่อว่าสาเหตุส่วนใหญ่มาจากแบคทีเรียก่อโรค (Das *et al*., 2013, Chitmanat *et al*., 2016) โดยทั่วไปในสภาวะปกติและช่วงที่น้ำหลากมักเกิดการระบาดของเชื้อก่อโรคในสกุล *Aeromonas* หากเป็นช่วงที่มีสภาวะอากาศแปรปรวนในช่วงวันจะเหมาะกับการระบาดของเชื้อในสกุล *Flavobacterium* แต่ในความเป็นจริงการระบาดของแบคทีเรียก่อโรคในปลากระชังเป็นผลจากการติดเชื้อแบบผสมหลายสายพันธุ์ ขึ้นกับสภาพของ

สิ่งแวดล้อมว่าเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อในสกุลใดมากกว่ากัน อาการที่แสดงออกว่าเกิดการติดเชื้อโรคระบาดจะมีลักษณะไปในทิศทางของเชื้อสายพันธุ์ที่มีปริมาณมากกว่า

ในจังหวัดอุบลราชธานีมีการเพาะเลี้ยงปลาในกระชังมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่น เมื่อเกษตรกรพบว่ามีโรคระบาดเกิดกับปลาในกระชังจะใช้สารปฏิชีวนะในการรักษา แต่การใช้ยาที่ไม่ตรงกับสายพันธุ์เชื้อก่อโรคนอกจากสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและการรักษาไม่ได้ผลแล้ว ยังอาจพบว่ามีสารปฏิชีวนะตกค้างในผลผลิตได้ (Chantharasophon and Prawitthana, 2015) วิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้ลดอัตราการตายของสัตว์น้ำทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ คือ การควบคุมแบบชีววิธี โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงมายับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้แต่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยง (Pal, 2015)

โรคแคงเกอร์จากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. citri เป็นโรคพืชที่สำคัญของมะนาว (Hussain *et al*., 2010) ในประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีความชื้นในอากาศต่ำเชื้อจะเจริญได้ดีและเข้าทำลายมะนาวในทุกส่วน ที่สุดทำให้ดอกหรือผลที่ติดแล้วร่วงทิ้งไปเป็นจำนวนมาก วิธีการรักษาโรคแคงเกอร์ที่ใช้กันคือการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียก่อโรคนี้สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารเคมีได้ นอกจากจะรักษาโรคไม่ได้ผลแล้วยังทำให้มีสารตกค้างในผลผลิตและในธรรมชาติมากขึ้น (Sampath *et al*., 2011) เช่นเดียวกับการใช้สารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การควบคุมแบบชีววิธีจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจนำมาทดแทนการใช้สารเคมีทั้งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการเพาะปลูกพืช

เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* พบครั้งแรกโดยชาวญี่ปุ่นชื่อ Fukumoto และเป็นผู้ให้ชื่อตามลักษณะเด่นของเชื้อคือ ผลิตสารเหลวที่เป็นเอนไซม์อไมเลสที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Wang *et al*., 2017) เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคแต่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้หลายกลุ่ม (Gotor-Vila *et al*., 2017) เช่น สาร Difficidin และ Bacilysin ที่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Erwinia amylovora* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ (Chen *et al.,* 2009) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อคือ *Fusarium solani* และ *Ralstonia solanacearum* ได้ (Ajilogba *et al*., 2013; Tan *et al*., 2013) ที่มาของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาในจังหวัดอุบลราชธานี (Chantharasophon, 2016) จึงจัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่น่าสนใจในการนำมาทดลองใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลานิลกระชัง และโรคแคงเกอร์มะนาวที่พบการระบาดในเขตจังหวัดอุบลราชธานี

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์: จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ดังนี้

2.1 เชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และเชื้อ *X. campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.2 เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 และเชื้อ *F. columnare* KJ720207

2.2 คัดแยกเชื้อก่อโรคแคงเกอร์จากมะนาว

เก็บตัวอย่างผลมะนาวที่จำหน่ายเป็นผักปลอดสารพิษ ณ ห้างสรรพสินค้าสุนีย์ ทาวเวอร์ อุบลราชธานี ถนนชยางกูร อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เลือกผลที่มีรอยโรคแคงเกอร์สดใหม่ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อขูดเอาเชื้อที่จุดรอยโรคไปเพาะบนอาหาร Nutrient broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงถ่ายเชื้อแบบ Cross streak technique บนอาหาร Nutrient agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเชื้อที่สัณฐานวิทยามีลักษณะ โคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม รูปร่างกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมัน เยิ้ม ไปคัดแยกซ้ำให้บริสุทธิ์มากขึ้นอีก 7 ครั้ง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจแกรมด้วย 3% KOH ตรวจรูปร่างเซลล์ ทดสอบการย่อยเจลาตินและการย่อยแป้ง และนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปทดสอบการก่อโรคบนผลและใบมะนาว

2.3 ศึกษาการเจริญต่อต้านเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* (ตามวิธีการของ Chantharasophon 2016; Chantharasophon and Prawitthana, 2015)

2.3.1 การเตรียมเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์

1) นำเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 ที่อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร Trypic soy broth (37 องศาเซลเซียส) จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Tryptic soy agar

2) นำเชื้อ *F. columnare* ที่อายุ 7 วัน ในอาหาร Cytophaga broth (25 องศาเซลเซียส) จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Cytophaga agar

3) นำเชื้อ *X. campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 หรือเชื้อ *X. campestris* UBRU1 ที่อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร Nutrient broth (37 องศาเซลเซียส) จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Nutrient agar

2.3.2 วิธี Spot on lawn: ถ่ายเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ที่อายุ 24 ชั่วโมงในอาหาร Tryptic soy agar ทับลงบนรอยที่ขีดลากเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ๆ ละ 3 ซ้ำ แบบ Spot on lawn นำไปบ่มตามสภาวะของแต่ละเชื้อ ตรวจการสร้างบริเวณใส (Inhibition zone)

2.4 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ในปลานิลเพื่อทดสอบความต้านทานโรคติดเชื้อจากเชื้อผสม *A. hydrophila* และ *F. columnare* (ดัดแปลงวิธีการของ Chantharasophon and Prawitthana, 2015)

นำปลานิลหมันที่มีน้ำหนัก 40-50 กรัม คัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว เลี้ยงปลาในถังเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 250 ลิตร ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลา โดยเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ให้ปลาปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) อาหารปลา

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) อาหารปลา + 10^9 CFU *B. amyloliquefaciens* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) ให้อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

เลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วัน ตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยาและการเกิด ไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง จากนั้นจึงฉีดเชื้อผสมของเชื้อ *A. hydrophila* (10^7 CFU/

มิลลิลิตร) และเชื้อ *F. columnare* (10^7 CFU/มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 เข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection) จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักต่อตัว 100 กรัม เลี้ยงปลาต่ออีก 7 วัน ตรวจวัดค่าของแอนติบอดีไตเตอร์ (แบบ Direct agglutination โดยอ่านค่าจาก Minimal positive agglutinin และเปลี่ยนเป็น $Log_2 N$, เมื่อ N เป็นส่วนกลับของ Microtiter plate สุดท้ายที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา) และอัตราการรอดของปลานิลทุกกลุ่มทุกตัว

2.5 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ควบคุมการเจริญของเชื้อ *X. campestris* UBRU1 บนมะนาว

ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* โดยทดลองบนผิวใบและผลของมะนาวที่ปลูกในกระถางแบบ Spray on lawn (ดัดแปลงวิธีการทดลองของ Huang *et al.,* 2012) เป็นเวลา 14 วัน ประเมินผลการยับยั้งเชื้อจากการเจริญของเชื้อ *X. campestris* ที่เพาะบนผิวใบและผลของมะนาว

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

ผลการทดลอง

3.1 คัดแยกเชื้อก่อโรคแคงเกอร์จากมะนาว

เชื้อที่คัดแยกได้จากรอยโรคแคงเกอร์มะนาวมีโคโลนีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมัน เยิ้ม บนอาหาร Nutrient agar เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สามารถย่อยเจลาตินและแป้งได้ เมื่อปลูกเชื้อนี้ลงบนผลมะนาวพบว่าเกิดรอยแผลเป็นจุดนูน รอบขอบแผลเยิ้มเหมือนเป็นน้ำ จากนั้นเปลี่ยนเป็นสะเก็ดแผลนูนมีรอยบุ๋มลงไปตรงกลางซึ่งเป็นลักษณะของโรคแคงเกอร์ จึงให้เชื้อก่อโรคที่คัดแยกได้เป็น *X. campestris* UBRU1

3.2 ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์

การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำคือเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* KJ720207 และเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ คือ *X. campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 และ *X. campestris* UBRU1 ด้วยวิธี Spot on lawn พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ได้โดยมีวัดรัศมีวงใสเป็น 6.0±1.0, 9.33±2.07, 7.75±1.71และ 2.5±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ

3.3 ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ในปลานิลเพื่อทดสอบความต้านทานโรคติดเชื้อจากเชื้อผสม *A. hydrophila* และ *F. columnare*

3.4.1 หลังจากเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 30 วัน ตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง พบว่า T1, T2 และ T3 มีอัตราการรอดร้อยละ 66.66±13.34, 86.67±6.66 และ 73.34±6.66 ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตของกลุ่ม T2 และ T3 สูงกว่ากลุ่ม T1 โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันคือ 4.97±0.13, 4.57±0.14 และ 3.56±0.10 กรัมต่อวัน ตามลำดับ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อกลุ่ม T2 และ T3 น้อยกว่ากลุ่ม T1 คือ 1.22±0.14, 1.58±0.02 และ 1.72±0.14

ตามลำดับ ค่าทางโลหิตวิทยาและการเกิดไมโครนิวเคลียสของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและเกล็ดเลือดของกลุ่ม T3 (Table 1)

3.4.2 เมื่อฉีดเชื้อผสมของ *A. hydrophila* และ *F. columnare* เข้าช่องท้อง และเลี้ยงปลาต่ออีก 7 วัน พบว่า ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิล (ก่อนการฉีดเชื้อและหลังการฉีดเชื้อ 7 วัน) กลุ่ม T2 มีค่าสูงสุด (8.0±0.0 และ 8.33±0.58) รองลงมาคือ กลุ่ม T3 (5.0±0.0 และ 6.33±0.58) และกลุ่ม T1 (2.33±0.67 และไม่ได้ตรวจวัดเนื่องจากตายหมด) เช่นเดียวกับอัตราการรอดที่ T2, T3 และ T1 มีค่าเป็น 64.92±5.27, 28.58±9.53 และ 0 ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Survival rate, growth performance, hematology, micronuclei in erythrocyte expression and antibody titer of Nile tilapia after rearing for 30 days and challenging with pathogenic bacteria in three different treatments

Treatment*	T1	T2	T3
Survival rate (day 0 post–challenged; %)	66.66±13.34[a]	86.67±6.66[b]	73.34±6.66[c]
ADG (g/d)	3.56±0.10[a]	4.97±0.13[b]	4.57±0.14[c]
FCR	1.72±0.14[a]	1.22±0.14[b]	1.58±0.02[c]
Lymphocyte (%)	99.0±0.50[a]	99.33±0.67[a]	99.33±0.67[a]
WBC (K/Cu.mm)	595.85±75.06[a]	565.96±31.13[a]	463.56±209.08[a]
RBC (M/uL)	1.72±0.12[a]	1.49±0.15[a]	1.03±0.76[a]
HCT (%)	28.67±2.72[a]	25.82±2.47[a]	14.35±10.25[b]
Micronucleus (%)	0.52±0.03[a]	0.49±0.03[a]	0.51±0.04[a]
Antibody titer (day 0 post–challenged)	2.33±0.67[a]	8.0±0.0[b]	5.0±0.0[c]
Antibody titer (day 7 post–challenged)	ND**	8.33±0.58	6.33±0.58
Survival Rate (day 7 post-challenged; %)	0±0.0[a]	64.92±5.27[b]	28.58±9.53[c]

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

*T1 = Feed

T2 = Feed + 10^9 CFU *B. amyloliquefaciens* KJ720206 (per Kg. feed)

T3 = Feed + 0.05% Oxytetracycline

** ND = Not detected

3.4 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ควบคุมการเจริญของเชื้อ *X. campestris* UBRU1 บนมะนาว

กลุ่มทดลองที่ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ปลูกทับเชื้อ *X. campestris* ทั้งบนผิวใบและผลของมะนาวแบบ Spray on lawn แสดงรอยของโรคแคงเกอร์เฉพาะจุดที่ปลูกเชื้อ ขณะที่กลุ่มควบคุมเกิดรอยโรคแคงเกอร์ทั้งจุดที่ปลูกและขยายไปบริเวณรอบจุดที่ปลูกเชื้อ จึงประเมินว่าผลการเกิดโรคแคงเกอร์ของกลุ่มทดลองต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ปลูกเฉพาะเชื้อโรคแคงเกอร์อย่างเดียว

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila F. columnare* KJ720207 *X. campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 และเชื้อ *X. campestris* UBRU1 ในระดับหลอดทดลองได้โดยมีวัดรัศมีวงใส 6.0±1.0, 9.33±2.07, 7.75±1.71 และ 2.5±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาในจังหวัดอุบลราชธานีสามารถผลิตสารสำคัญที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้งจากสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์มะนาวได้ และคาดว่าสารสำคัญดังกล่าวน่าจะประกอบด้วยสารหลายชนิดจึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันได้ถึง 4 สายพันธุ์ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cao *et al*. (2011) ที่พบว่า สามารถใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ที่คัดแยกจากปลาได้ และผลการทดลองนี้ยังสนับสนุนงานของ Reda *et al*. (2016) ที่รายงานว่า สารประกอบที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* S5I4 สร้างขึ้นและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่มเชื้อดื้อยาที่นำมาศึกษาคือ *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้นั้นประกอบด้วย กรด butanedioic, octadecyl 1(1carboxy1methylethyl) และ 4octyl ester และผลการศึกษาของ Gotor-Vila *et al*. (2017) ที่รายงานว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CPA-8 ผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคในเชอรี่คือเชื้อ *Monilinia laxa, M. fructicola* และ *Botrytis cinera* ได้ โดยพบว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นประกอบอินทรีย์ระเหยได้คือ 1,3 pentadiene, acetoin (3-hydroxy-2-butanone) และ thiophene โดยสารประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแต่ละสายพันธุ์อาจมีกลไกการสร้างที่แตกต่างกันและมีผลต่อเชื้อที่แตกต่างกันไป ดังนั้นจึงควรศึกษาสารชนิดใดจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila F. columnare* KJ720207 *X. campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 และเชื้อ *X. campestris* UBRU1 ว่าสามารถใช้ส่วนใดจากเชื้อใดๆ ที่ศึกษาในการควบคุมเชื้อก่อโรคกลุ่มเป้าหมายเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์และสัมฤทธิ์ผลตามความต้องการ

อย่างไรก็ตาม การที่พบว่ารัศมีวงใสของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ต่อเชื้อโรคแคงเกอร์ *X. campestris* UBRU1 ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ครั้งนี้มีค่าต่ำที่สุดคือ 2.5±0.58 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อ *X. campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 มีค่าสูงถึง 7.75±1.71มิลลิเมตรซึ่งใกล้เคียงกับของเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำอีก 2 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จึงคาดว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจาก *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ครั้งนี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับใช้ยับยั้งเชื้อโรคแคงเกอร์ *X. campestris* UBRU1 ซึ่งยืนยันได้จากผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ยับยั้งเชื้อ *X. campestris* บนผิวใบและผลของมะนาว และพบว่า บนผิวใบและผลของมะนาวกลุ่มทดลองเกิดโรคแคงเกอร์แต่มีรอยโรคที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Huang *et al.* (2012) ที่ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ฉีดพ่นบนผิวใบมะนาวสายพันธุ์ Mexican ก่อนที่จะเพาะเชื้อโรคแคงเกอร์ลงบนใบมะนาว และพบว่าการเจริญของเชื้อโรคแคงเกอร์ต่ำกว่าใบมะนาวกลุ่มควบคุม

การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ผสมในอาหารปลานิลที่พบว่า ทำให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้อาหารผสม Oxytetracycline แสดงว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens*

KJ720206 สามารถกระตุ้นการเจริญของปลานิลได้ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ แต่การศึกษานี้พบว่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสูงผิดปกติคือร้อยละ 99 ขึ้นไป ขณะที่ Şahan *et al*. (2015) รายงานว่าปลานิลกลุ่มควบคุมที่ใช้ศึกษามีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte อยู่ที่ร้อยละ 79.67±2.41 และกลุ่มการทดลองที่เสริมอาหารด้วยสาหร่ายพบ lymphocyte อยู่ที่ไม่เกินร้อยละ 85 สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าปลานิลที่นำมาใช้ในการศึกษาน่าจะเป็นปลาที่มีการติดเชื้อมาก่อน จึงพบ lymphocyte ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบเซลล์สูงมาก และยืนยันได้จากค่า Antibody titer (0 post–challenged) ของกลุ่มควบคุมที่มีค่า 2.33±0.67 แทนที่จะเป็น 0.0 ทั้งนี้เนื่องจากปลานิลหมันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจากบ่อปลาอนุบาลของเกษตรกรในพื้นที่ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการทดลองที่ไม่ได้ผลิตลูกปลาเอง จึงใช้ค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมเป็นตัวเปรียบเทียบ

เมื่อทดสอบความต้านทานโรคจากเชื้อ *A. hydrophila* ผสมกับเชื้อ *F. columnare* KJ720207 พบว่าปลานิลกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดเป็นร้อยละ 64.92±5.27 ในขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้อาหารผสม Oxytetracycline มีอัตรารอดเป็นร้อยละ 0.0 และ 28.58±9.53 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ปลานิลกลุ่มทดลองสามารถสร้างภูมิต้านทานขึ้นมาต่อสู้กับเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะเป็นตัวกระตุ้นดังที่เกษตรกรนิยมใช้กัน ผลการทดลองนี้ให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกในปลานิลของ Chantharasophon and Prawitthana (2015) ซึ่งรายงานว่า เชื้อดังกล่าวใช้ได้ผลดีเฉพาะการเจริญแต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิต้านทานเชื้อก่อโรคได้ดีเท่ากับกลุ่มที่ใช้สารปฏิชีวนะ Oxytetracycline

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำคือเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* KJ720207 และเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ คือ *X. campestris* UBRU1 ได้ทั้งในระดับหลอดทดลอง (In-Vitro) และในปลานิล รวมทั้งบนผลและใบมะนาว (In-Vivo) ซึ่งจะเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะกับปลานิลที่เพาะเลี้ยง และลดการใช้สารเคมีกับมะนาว ซึ่งนอกจากจะลดภาระค่าใช้จ่ายสารเคมีและสารปฏิชีวนะแล้ว ยังลดความเสี่ยงของเกษตรกรและผู้บริโภคไปพร้อมกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่สนับสนุนงบประมาณและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Ajilogba, CF., Babalola, OO., and Ahmad, F. 2013. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. Ethno Medicine. 7(3): 205-216.

AlGburi, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E.M., Chistyakov, V.A., Mazanko, M.S., Bren, A.B., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L. 2016. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. Advances in Microbiology. 6: 432-452.

Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M., and Lu, L. 2011. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A potential antagonistic bacterium against Eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Evidence-base Complementary and Alternative Medicine. 2011: 1-7.

Chantharasophon, K. 2016. Isolation of *Flavobacterium columnare* and *Bacillus* sp. from Nile tilapia and Catfish. Journal of Fisheries Technology Research. 10(1): 77-87.

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 Biotech. 140(1-2): 38-44.

Chitmanat, C, Lebel, P., Whangchai, N., Promya, J., and Lebel, L. 2016. Tilapia diseases and management in river-based cage aquaculture in Northern Thailand. Journal of applied aquaculture. 28(1): 1-8.

Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, and S., 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.

Gotor-Vila, A., Teixido, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., and Mari, M. 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. Food Microbiology. 64: 219225.

Huang, T.P., Tzeng, D.D.S., Wong, A.C.L., Chen, C.H., and Lu K.M. 2012. DNA Polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. Plos One. 7(7): e42124.

Hussain, K, Nawaz, K., Majeed, A., Ikram-ul-Haq, Lin, F., Ali, K., Afghan, S., Khan, F., Ghani, A., and Raza, G. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathotypes. African Journal of Biotechnology. 9(54): 9092-9095.

Pal, S. 2015. Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 8(9): 68-81.

Reda, F.M., Shafi, S.A., and Ismail, M. 2016. Efficient inhibition of some multi-drug resistant pathogenic bacteria by bioactive metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* S5I4 isolated from archaeological soil in Egypt. Applied Biochemistry and Microbiology. 52.(6): 593–601.

Şahan, A., AHAN, Tasbozan, O., Aydin, F., Özutok, S., Erbas, C., Duman, S., Uslu, L., and Özcan, F. 2015. Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research. 1(3): 133-139.

Sampath, A., Vishwanatha, T., Sathishagouda, S., Jain, S.N., Divyashree, B.C., Reena, V., Siddhalingeshwara, K.G., Venugopal, N., and Dayanad A. 2011. Bacteriophage: Novel biocontrol agent against citrus canker. Asiatic Journal of Biotechnology Resources. 2(6): 775-779.

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.

Wang, J., Zhang, Y., Zhang, C., Lu, J., Quan, C. 2017. Effect of the environmental factors on diketopiperazine cyclo (Pro-Phe) production and antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. Annals of Biological Sciences. 5(1): 47-53.