ผลของการใช้เชื้อ *Bacillus brevis* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกต่อการเจริญและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลานิล

Effects of *Bacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and immune responses

เกศินี จันทรโสภณ* และ สัมฤทธิ์ ประวิทย์ธนา

Kesinee Chantharasophon and Sumrit Prawottana

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

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

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติกเป็นอาหารเสริมในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยแบ่งปลานิลเป็น 5 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ กลุ่ม T1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่ม T2 ใช้สารปฏิชีวนะออกซิเตตราซัยคลินเสริมในอาหาร กลุ่ม T3 ใช้เชื้อ *Bacillus brevis* UBRU4 เสริมในอาหาร กลุ่ม T4 ใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เสริมในอาหาร กลุ่ม T5 ใช้เชื้อ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* เสริมในอาหาร หลังจากเลี้ยงปลาในห้องทดลองเป็นเวลา 60 วัน พบว่า ปลานิลกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงสุดคือ กลุ่ม T4 รองลงมาเป็น T5, T2, T1 และ T3 โดยวัดได้ 1.35±0.02, 1.07±0.07, 1.04±0.01, 0.81±0.04 และ 0.77±0.08 กรัมต่อตัวต่อวัน ตามลำดับ ส่วนค่าทางโลหิตวิทยา (จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ และค่าร้อยละของไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง) ของทุกกลุ่มพบว่าไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Challenge test พบว่าค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *A. hydrophila* หลังจากฉีดเชื้อ 7 วัน เรียงจากมากไปน้อยคือกลุ่ม T3, T5, T4, T2 และ T1 โดยวัดได้ 11.0±0.0, 6.67±0.58, 4.0±0.0, 3.67±0.58 และ 2.67±0.58 ตามลำดับ สำหรับอัตราการรอดพบว่า กลุ่ม T3, T5 และ T2 สูงกว่ากลุ่ม T4 และ T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวัดได้ร้อยละ 93.33±11.54, 80.0±0.0, 76.67±5.77, 40.0±34.64 และ 20.0±5.0 ตามลำดับ ดังนั้นการใช้เชื้อผสม *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* (T5) เป็นโพรไบโอติกจะช่วยให้ปลานิลมีทั้งอัตราการเจริญเติบโตและความต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* สูงขึ้น

คำสำคัญ: ปลานิล โพรไบโอติก ไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง แอนติบอดีไตเตอร์

Abstract

The aim of this research was to study the use of probiotics as supplemented feed in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The trial was set up as five treatments with three replications in laboratory scale which were treatment T1, control group; treatment T2, 0.05% oxytetracycline; treatment T3, *B. brevis* UBRU4; treatment T4, *S. cerevisiae*; and treatment T5, *B. brevis* UBRU4 and *S. cerevisiae*. After 60 days of the administration it was found that the highest to the lowest average daily growth were exhibited in T4, T5, T2, T1 and T3, which were 1.35±0.02, 1.07±0.07, 1.04±0.01, 0.81±0.04 and 0.77±0.08 g/fish/day, respectively. All of experimental groups showed no significant ($p<0.05$) differences in hematological parameters (red blood cell count, haematocrit, %lymphocyte, and %micronuclei in erythrocyte). After challenge test by *A. hydrophila* was performed, the highest to the lowest values of antibody titer to *A. hydrophila* at days 7 post-challenged were found in T3, T5, T4, T2 and T1, which were 11.0±0.0, 6.67±0.58, 4.0±0.0, 3.67±0.58 and 2.67±0.58, respectively. Fish survival rates of T3, T5 and T2 were significantly ($p<0.05$) higher than T4 and T1, which were 93.33±11.54%, 80.0±0.0%, 76.67±5.77%, 40.0±34.64% and 20.0±5.0%, respectively. Therefore, the use of mixed *B. brevis* UBRU4 and *S. cerevisiae* (T5) as probiotics could possibly be used for both higher growth rate and more resistance to *A. hydrophila* in Nile tilapia culture.

Key words: Nile tilapia, Probiotics, Micronuclei in erythrocyte, Antibody titer

บทนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเพาะเลี้ยงกันมากในหลายประเทศ ในประเทศไทยนั้นประมาณการผลผลิตของปลานิลในปี 2556 อยู่ที่ 182,841 ตัน คิดเป็นมูลค่า 8,381.43 ล้านบาท ซึ่งความต้องการบริโภคปลานิลเพิ่มขึ้นทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ ขณะที่ผลผลิตปลานิลมีแนวโน้มลดลง (Fisheries Economic Division, 2013: online) ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งที่เกษตรกรพบมากในเพาะเลี้ยงปลานิลคือ โรคระบาดจากการติดเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากในการประมงน้ำจืด (Wangkahart and Rattanasena, 2010) รวมทั้งฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล วิธีการรักษาและควบคุมโรคระบาดดังกล่าวนิยมใช้การผสมสารปฏิชีวนะในอาหารปลา แต่ทว่าการใช้สารปฏิชีวนะที่มากเกินไปของเกษตรกรเป็นเหตุให้มีสารปฏิชีวนะตกค้างในปลาและแหล่งน้ำ ที่สำคัญคือทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาและพัฒนาสายพันธุ์ให้ก่อโรคได้รุนแรงมากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาใหญ่ตามมาคือ เชื้อก่อโรคที่พบทั้งในมนุษย์และสัตว์เศรษฐกิจสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคได้ (Kamgar *et al.,* 2013) เมื่อมีการค้นพบว่าจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกหลายชนิดสามารถผลิต

สารคล้ายสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ การใช้โพรไบโอติกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการแก้ปัญหานี้ ข้อดีของโพรไบโอติกที่น่าสนใจคือเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคและมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคหลายอย่าง เช่น ช่วยระบบย่อยอาหาร กระตุ้นของระบบภูมิต้านทานในร่างกายให้ตอบสนองได้ดีขึ้น ส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์เชื้อเจ้าถิ่นที่ดีต่อสุขภาพ สร้างสารอาหารที่สำคัญบางชนิด และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในร่างกายได้หลายชนิด (Song *et al*., 2006; Dhanasekaran *et al.,* 2008) มีนักวิจัยหลายคณะที่ศึกษาและพบว่า การใช้โพรไบโอติกในปลาที่เพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมให้มีการเจริญและระบบภูมิต้านทานที่สูงขึ้น (Kuta *et al.,* 2009; Arığ *et al.,* 2013)

เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อที่ใช้ในการผลิตอาหารมานาน เชื้อในกลุ่ม Bacilli สร้างสปอร์ได้จึงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และยังเป็นเชื้อที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว มีเชื้อ *Bacillus* spp. บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งเมื่อนำเชื้อกลุ่มนี้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาหรือสัตว์เลี้ยงอื่นๆ จะพบว่าเป็นเชื้อที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและช่วยให้สัตว์มีอัตราการรอดสูงขึ้น (Kamgar *et al.,* 2013) ในขณะที่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าเป็นเชื้อที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารในสัตว์ให้ดีขึ้น (Duart *et al.,* 2012; Prasad *et al.,* 2013)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาของ Chantharasophon *et al.* (2009) ที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU1 เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิล และพบว่าเชื้อบาซิลัสดังกล่าวนั้นสามารถส่งเสริมให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดในสภาวะที่มีเชื้อ *A. hydrophila* ได้ดีกว่าการไม่ใช้โพรไบโอติก แต่ปัญหาที่พบคือปลานิลกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีอาการเลือดจาง เมื่อทดสอบเชื้อในอาหาร Blood agar จึงพบว่าเป็นเชื้อบาซิลัสที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก นอกจากนี้ยังมีประเด็นปัญหาที่ควรศึกษาเพิ่มคือผลกระทบของสารปฏิชีวนะซึ่งจัดเป็นสารเคมีที่สามารถออกฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ การใช้โพรไบโอติกที่ผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะได้ในสัตว์ที่เพาะเลี้ยงนั้น อาจทำให้สัตว์ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ที่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของร่างกาย เนื่องจากไมโครนิวเคลียสเป็นชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่เกิดจากร่างกายได้รับสารก่อกลายพันธุ์เข้าไปเหนี่ยวนำให้โครโมโซมส่วนหนึ่งแตกหัก และแยกตัวออกมาเป็นแท่งสารพันธุกรรมขนาดเล็กในเซลล์เดียวกันของเม็ดเลือดแดงในระหว่างการแบ่งเซลล์ ปริมาณไมโครนิวเคลียสที่มากกว่าปกติจะช่วยบ่งชี้ว่าได้รับสารก่อกลายพันธุ์ที่เข้าไปทำลายโครโมโซม (Ali *et al*., 2008) ดังนั้นการเลือกใช้โพรไบโอติกใดๆ เสริมในอาหารปลานิลจำเป็นต้องมีการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาและไมโครนิวเคลียสเพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยของโพรไบโอติกที่เลือกใช้ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์: *B. brevis* UBRU4 และ *A. hydrophila* TISTR 1321 จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี *S. cerevisiae* (Fermipan Brown; Instant Dry Yeast) จากบริษัท AB Mauri Vietnam จำกัด ประเทศเวียดนาม

การใช้ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิล

นำปลานิลจากฟาร์มปลากระชัง(แม่น้ำมูล) ของนายวรพจน์ สว่างบุก 114 หมู่ 6 บ้านคูเดื่อ ตำบลแจระแม อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี น้ำหนักประมาณ 30~40 กรัม จำนวน 400 ตัว ไปเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เพื่อให้ปลาปรับตัวในถังพลาสติกขนาด 1x1.2x1.5 เมตร^3 ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเป็นเวลา 14 วัน แบ่งปลานิลที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันเป็น 5 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ในถังพลาสติกขนาด 150 ลิตร ใช้น้ำ 100 ลิตรต่อถัง เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่ม T1 อาหารปลาปกติ (กลุ่มควบคุม)

กลุ่ม T2 อาหารปลา + 0.05% oxytetracycline

กลุ่ม T3 อาหารปลา + *B. brevis* UBRU4 (10^{12} CFU/ 1 kg)

กลุ่ม T4 อาหารปลา + *S. cerevisiae* (10^{12} CFU/ 1 kg)

กลุ่ม T5 อาหารปลา +[(*B. brevis* UBRU4; 10^6 CFU + *S. cerevisiae*; 10^6 CFU)/ 1 kg]

ผสมยาปฏิชีวนะหรือโพรไบโอติกกับอาหารโดยทำละลายยาหรือเชื้อตามความเข้มข้นของแต่ละกลุ่มที่กำหนดใน 0.85% NaCl จำนวน 100 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงปลา 60 วัน วัดอัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ค่าการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์และไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง (Kitancharoen *et al.,* 2006; Ali *et al.,* 2008; Boonta *et al.,* 2012) ดังนี้

1) อัตราการรอด (Survival rate; %)

= (จำนวนปลาที่เหลือรอดในแต่ละซ้ำ / จำนวนปลาที่ใช้ทดลองในแต่ละซ้ำ) x 100

2) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily growth; ADG; กรัมต่อตัวต่อวัน)

= (น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักเมื่อเริ่มทดลอง) / จำนวนวันที่ทำการทดลอง

3) อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR)

= น้ำหนักอาหารที่ให้ / น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

4) ค่าการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (Red blood cell count มีหน่วยเป็น Million cell/microlitre; M/µL) และฮีมาโตคริต (Haematocrit) ร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ (%Lymphocyte) และร้อยละของไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง (%Micronuclei in erythrocyte) โดยเก็บตัวอย่างเลือดปลาจากทุกตัวและทุกกลุ่มการทดลองบริเวณ caudal vein ส่วนที่ 1 นำเลือดใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (heparinized tube) และส่งไปตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและฮีมาโตคริต โดยใช้เครื่อง Flow-cytometer (บริษัท อุบล อาร์ ไอ เอ จำกัด สาขาอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี) ส่วนที่ 2 ทำการสเมียร์แบบฟิล์มบาง ย้อมด้วยสีจิมซา (10% Giemsa (v/v) staining) ตรวจนับร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ จากเม็ดเลือดขาวจำนวน

200 เซลล์ และตรวจนับร้อยละของไมโครนิวเคลียสจากเม็ดเลือดแดงจำนวน 2,000 เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลที่ใช้ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติก (Challenge test)

ศึกษาการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลทั้ง 5 กลุ่มการทดลอง (Kitancharoen *et al.,* 2006; Ali *et al.,* 2008; Wangkahart and Rattanasena, 2010) ดังนี้

1) เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองและทุกตัวก่อนทำ Challenge test แยกเอาเฉพาะซีรัมไปตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *A. hydrophila* (day 0 titer) ด้วยวิธี Microtiter plate agglutination ซึ่งวัดระดับการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนเป็นแผ่นระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในซีรัมที่มีการเจือจางแบบ serial twofold dilution ดังนี้

1.1) เตรียมแอนติเจน โดยเพาะเลี้ยง *A. hydrophila* ในอาหาร tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl (3,000 rpm 15 นาที) โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำให้เป็นสารละลายใน 0.85% NaCl เติมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 35% (1.5 มิลลิลิตร 60 นาที) ปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl (3,000 rpm 15 นาที) โดยล้าง 3 ซ้ำ ปรับให้มีปริมาณเซลล์ที่ 10^7 CFU/ml ในสารละลาย 0.85% NaCl และทดสอบการตายของเชื้อโดยนำไปเพาะในอาหาร tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยจะต้องไม่มีการเจริญของเชื้อ

1.2) นำซีรั่มของปลานิล (50 μL) มาเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer solution (ที่มี Ca^{2+} และ Mg^{2+}) เติมแอนติเจน (50 μL) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.3) อ่านค่าปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยอ่านจากส่วนกลับของระดับความเจือจางสุดท้ายของซีรัม (minimal positive agglutinin) และเปลี่ยนเป็นค่าของ Log ฐาน 2 (Log_2 N, เมื่อ N เป็นส่วนกลับของ microtiter plate สุดท้ายที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา)

2) เตรียมเชื้อทดสอบ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* ในอาหาร tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และทำเป็นสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ 10^7 CFU/ml ในสารละลาย 0.85% NaCl

3) นำเชื้อ *A. hydrophila* ฉีดให้ปลานิลในทุกกลุ่มการทดลองแบบ intraperitoneal ในปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักต่อตัว 100 กรัม

4) หลังการฉีดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองเพื่อนำซีรั่มไปตรวจค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *A. hydrophila* (Day 7 titer) และในวันที่ 14 นับจำนวนปลานิลจากทุกกลุ่มที่เหลือเพื่อคำนวณอัตราการรอด เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลเพื่อตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ ร้อยละของไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง และค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *A. hydrophila* (Day 14 titer)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทดสอบแบบ One-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างทดสอบแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลการทดลอง

ผลของการใช้ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิล

ผลการทดลองใช้โพรไบโอติกเสริมในปลานิล 5 กลุ่ม (T1: กลุ่มควบคุม, T2: ใช้ oxytetracycline, T3: ใช้ *B. brevis* UBRU4, T4: ใช้ *S. cerevisiae*, และ T5: ใช้ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae*) หลังจากเลี้ยงปลา 60 วัน พบว่า อัตราการรอดของปลานิลเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ กลุ่ม T3, T2, T5, T1 และ T4 โดยมีค่าเป็นร้อยละ 100±0.0, 93.33±6.67, 86.67±11.54, 66.67±11.54 และ 60.0±20.0 ตามลำดับ (Table 1)

อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) ของปลานิลเรียงจากมากไปน้อยคือ กลุ่ม T4, T5, T2, T1 และ T3 โดยมีค่าเป็น 1.35±0.02, 1.07±0.07, 1.04±0.01, 0.81±0.04 และ 0.77±0.08 กรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ ในทางกลับกันอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของปลานิลเรียงจากน้อยไปมากคือ กลุ่ม T4, T5, T2, T1 และ T3 โดยมีค่าเป็น 2.14±0.22, 2.51±0.12, 2.73±0.19, 2.85±0.18 และ 2.87±0.57 ตามลำดับ (Table 1)

กลุ่ม T1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม พบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์และค่าร้อยละของไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าหรือไม่แตกต่างกันกับกลุ่มการทดลองที่ใช้โพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 1)

Table 1. Survival rate, growth performance, red blood cell count, haematocrit and micronuclei in erythrocytes expression of Nile tilapia after rearing for 60 days with probiotics in five different feed treatments

Treatment*	T1	T2	T3	T4	T5
Survival rate (%)	66.67±11.54^{ab}	93.33±6.67^{c}	100±0.0^{c}	60.0±20.0^{a}	86.67±11.54^{bc}
ADG (g/d)	0.81±0.04^{a}	1.04±0.01^{b}	0.77±0.08^{a}	1.35±0.02^{c}	1.07±0.07^{b}
FCR	2.85±0.18^{b}	2.73±0.19^{b}	2.87±0.57^{b}	2.14±0.22^{a}	2.51±0.12^{ab}
Red blood cell (M/μL)	1.91±0.05^{a}	2.07±0.08^{ab}	1.79±0.04^{a}	2.38±0.08^{b}	1.94±0.49^{a}
Haematocrit (%)	28.23±0.85^{a}	34.7±1.95^{b}	27.5±1.40^{a}	33.87±1.34^{b}	27.6±5.11^{a}
Lymphocyte (%)	58.07±20.20^{a}	59.97±21.51^{a}	62.90±8.90^{a}	52.10±22.43^{a}	66.03±3.51^{a}
Micronuclei (%)	0.42±0.28^{a}	0.27±0.31^{a}	0.62±0.81^{a}	0.35±0.22^{a}	0.30±0.10^{a}

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

*T1 = control, T2 = 0.05% oxytetracycline, T3 = 10^{12} CFU/kg of *B. brevis* UBRU4,

T4 = 10^{12} CFU/kg of *S. cerevisiae*, T5 = 10^{6} CFU/kg of each *B. brevis* UBRU4 & *S. cerevisiae*

ผลการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลที่ใช้ *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติก

เก็บตัวอย่างเลือดของปลานิลทั้ง 5 กลุ่ม ตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *A. hydrophila* ที่ Day 0 titer จากนั้นจึงฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ให้ปลานิลทุกกลุ่ม แล้วจึงตรวจค่าแอนติบอดีไตเตอร์ ที่ Day 7 titer และ Day 14 titer ผลการทดลองพบว่า T3 มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่ Day 0 titer สูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือ T1, T4, T5 และ T2 โดยวัดได้ 5.33±1.15, 4.0±0.0, 4.0±0.0, 4.0±0.0 และ 3.0±0.0 ตามลำดับ ส่วนค่า Day 7 titer พบว่า T3 มีค่าสูงสุด รองลงมาคือ T5, T4, T2 และ T1 โดยทุกกลุ่มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ยกเว้น T2 กับ T4 ซึ่งวัดได้ 11.0±0.0, 6.67±0.58, 4.0±0.0, 3.67±0.58 และ 2.67±0.58 ตามลำดับ สำหรับค่า Day 7 titer ของปลาทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 2)

หลังจาก Challenge test ที่เวลา 14 วัน พบว่าอัตราการรอดของปลานิลเรียงจากมากไปน้อยคือ กลุ่ม T3, T5, T2, T4 และ T1 โดยมีค่าเป็นร้อยละ 93.33±6.67, 80.0±0, 76.67±5.77, 40.00±34.64 และ 20.0±5.0 ตามลำดับ สำหรับค่าการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ และค่าร้อยละของไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงระหว่างกลุ่มที่ใช้และไม่ใช้โพรไบโอติกมีค่าทั้งแตกต่างและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 2) แต่ทั้งนี้หลังการทำ Challenge test เป็นเวลา 7 วัน ปลาทุกกลุ่มการทดลองไม่มีการตายเพิ่มอีก

Table 2. Antibody titer to *A. hydrophila*, survival rate, red blood cell count, haematocrit and micronuclei in erythrocytes expression of five different feed treatments Nile tilapia after challenged with *A. hydrophila*

Treatment*	1	2	3	4	5
Antibody titers					
Day 0 titer	4.0±0.0^{a}	3.0±0.0^{a}	5.33±1.15^{b}	4.0±0.0^{a}	4.0±0.0^{a}
Day 7 titer	2.67±0.58^{a}	3.67±0.58^{b}	11.0±0.0^{d}	4.0±0.0^{b}	6.67±0.58^{a}
Day 14 titer	3.0±1.0^{a}	4.0±1.0^{a}	3.67±0.58^{a}	4.0±0.0^{a}	4.0±0.0^{a}
Survival rate (%)	20.0±5.0^{a}	76.67±5.77^{a}	93.33±6.67^{a}	40.0±34.64^{a}	80.0±0.0^{b}
Red blood cell (M/μL)	2.01±0.3^{b}	1.66±0.08^{a}	1.67±0.01^{a}	1.89±0.35^{ab}	1.95±0.07^{ab}
Haematocrit (%)	28.77±1.44^{b}	27.43±1.15^{ab}	27.47±0.93^{ab}	26.17±1.52^{a}	30.37±1.11^{c}
Lymphocyte (%)	65.50±16.76^{b}	36.56±8.28^{ab}	30.37±8.13^{a}	60.83±30.50^{ab}	65.13±11.13^{b}
Micronuclei (%)	0.15±0.10^{a}	0.57±0.25^{b}	0.25±0.01^{ab}	0.47±0.24^{ab}	0.22±0.18^{a}

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

*T1 = control, T2 = 0.05% oxytetracycline, T3 = 10^{12} CFU/kg of *B. brevis* UBRU4,

T4 = 10^{12} CFU/kg of *S. cerevisiae*, T5 = 10^{6} CFU/kg of each *B. brevis* UBRU4 & *S. cerevisiae*

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *B. brevis* UBRU4 ทั้งก่อนและหลังการทำ Challenge test มีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารปฏิชีวนะและทุกๆ กลุ่มการทดลอง ซึ่งวัดได้ร้อยละ 100±0.0 และ 93.33±6.67 ตามลำดับ แต่ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่ Day 0 titer และ Day 7 titer ในปลานิลกลุ่มนี้มีค่าสูงกว่าทุกกลุ่ม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ *B. brevis* UBRU4 มีผลต่อระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลทั้งก่อนและหลังฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ซึ่งคาดว่าเชื้อดังกล่าวมีการผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะออกมาช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* และช่วยกระตุ้นระบบภูมิต้านทานในปลานิลให้ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรคชนิดนี้ให้สูงขึ้นทั้งก่อนและหลังการฉีดเชื้อก่อโรค ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Berditsch *et al.* (2007) ที่รายงานว่าเชื้อ *B. brevis* ATCC 9999 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Gramicidin S ได้ นอกจากนี้ยังมี Aly *et al.* (2008), Arığ *et al.* (2013) และ Kamgar *et al.* (2013) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานของปลาได้ อย่างไรก็ตาม ปลานิลที่นำมาใช้ในการทดลองนี้มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อ *A. hydrophila* อยู่ก่อนแล้วเพราะที่ Day 0 titer ปลานิลกลุ่มควบคุมมีค่าเป็น 4.0 เนื่องจากเป็นปลานิลที่นำมาจากฟาร์มของผู้ประกอบการที่เข้าร่วมโครงการ

จากผลการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *S. cerevisiae* มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันสูงสุดและมีอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด คือ 1.35±0.02 g/d และ 2.14±0.22 ตามลำดับ แม้ว่าอัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้นของปลานิลมาจากหลายสาเหตุ แต่หนึ่งในสาเหตุนั้นอาจเนื่องมาจากว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถกระตุ้นการย่อยสลายและการดูดซึมอาหารของปลานิลให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นจึงมีการเจริญมากขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Duart *et al.* (2012) และ Prasad *et al.* (2013) ที่รายงานว่าการเสริมเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารสัตว์เป็นการช่วยเพิ่มวิตามิน กรดอมิโนทั้งที่จำเป็นและไม่จำเป็น ตลอดจนเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร จึงทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์ดีขึ้น Lara-Flores *et al.* (2010) พบว่าการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* เสริมในอาหารสามารถทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตได้มากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* ในปริมาณสูงถึง 10^{12} CFU/ 1 kg อาจส่งผลต่อสมดุลบางอย่างในปลานิลจึงทำให้ T4 มีอัตราการรอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (T1) แต่เมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคแล้ว T4 มีอัตราการรอดสูงกว่า T1 การที่ใช้เชื้อ *S. cerevisiae* ในปริมาณที่ต่ำลงและใช้ร่วมกับเชื้อ *B. brevis* UBRU4 (T5) จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่า ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปลานิลกลุ่ม T5 มีอัตราการเจริญต่อวัน มีอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และมีอัตราการรอดหลังจากฉีดเชื้อก่อโรคที่ดีรองมาจากอันดับสูงสุด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าปริมาณและชนิดของเชื้อผสมที่ใช้อาจเป็นปริมาณที่เหมาะสมจึงทำงานส่งเสริมกันและกันได้ดีกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียวในปริมาณที่มาก จึงเกิดผลดีต่อปลานิลทั้งในเรื่องความต้านทานเชื้อก่อโรคและการเจริญเติบโต ดังเช่นการทดลองของ Rad *et al.* (2013) และ Abdel-tawwab *et al.* (2008) ที่รายงานว่า การใช้เชื้อ *S. cerevisiae* เสริมในอาหารที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับ

การใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิล หากใช้ในปริมาณที่มากกว่านี้ผลของการเจริญและความต้านทานต่อเชื้อที่ได้มีแนวโน้มลดลง

การที่ปลานิลกลุ่มที่ไม่ใช้โพรไบโอติกมีค่าการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ค่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ และค่าร้อยละของไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง ต่ำกว่าหรือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มการทดลองที่ใช้โพรไบโอติกนั้น บ่งชี้ว่าการใช้เชื้อ *B. brevis* UBRU4 และเชื้อ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกนั้นไม่ทำให้ปลานิลมีอาการโลหิตจางเหมือนเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU1 (Chatharasophon *et al*., 2009) ซึ่งคาดว่าสารคล้ายสารปฏิชีวนะที่ผลิตนั้นไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในปลานิลที่ศึกษา ดังนั้นเพื่อช่วยให้ปลานิลมีทั้งอัตราการเจริญเติบโตและความต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* ได้สูงจึงควรเลือกใช้เชื้อผสม *B. brevis* UBRU4 และ *S. cerevisiae* (T5) ในปริมาณชนิดละ 10^6 CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย ลีลาวัชมาศ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการหมักและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีและมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่อนุเคราะห์ให้คำปรึกษาในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Tawwab M, Abdel-Rahman AM, Ismael NEM. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila.* Aquaculture. 280.(1-4):185-189.

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

Aly S.M., Ahmed, Y.A., Ghareeb, A.A., Mohamed, M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology. 25:128–136.

Arığ, N., Süzer, C., Gökvardar, A., Başaran, F., Çoban, D., Yıldırım, Ş., Kamacı, H.O., Fırat, K., Saka, Ş. 2013. Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 13:407-414.

Berditsch, M., Afonin, S., Ulrich, A.S. 2007. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. Applied and Environmental Microbiology. 73.(20):6620-6628.

Boonta, T., Chitmanat, C., 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., Moonsin, P., Prawitthana, S. 2009. The potential of using and producing selective *Bacillus* sp. and *Saccharomyces* sp. from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) gastrointestinal flora as probiotics. Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University. 102 pages. [in Thai]

Dhanasekaran, D., Saha, S., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. 2008. Probiotic Effect of *Lactobacillus* isolates against bacterial pathogens in *Clarias orientalis*. Medicine and Biology. 15.(3):97-102.

Duart, K.M.R., Gomes, L.H., Sampaio, A.C.K., Issakowicz, J., Rocha, F., Granato, T.P., Terra, S.R. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* used as probiotic: strains characterization and cell viability. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 1.(2):17-19.

Fisheries Economic Division, Department of Fisheries, Thailand. Report of tilapia production and its product during 6 first months of year 2013. [Online] Available from http://fishco.fisheries.go.th/ fisheconomic/Doc/fishnew_164pdf [2014, March 3] [in Thai]

Kuta, F.A., Nimzing, L., Orka'A, P.Y. 2009. Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. Applied Medical Informatics. 24.(1-2):42-46.

Kamgar, M., Pourgholam, R., Ghiasi, M., 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.

Kitancharoen, N., Hanjavanij, C., Suwannapeng, N. 2006. Efficiency of vaccination with *Streptococcus agalactiae* bacteria on Streptococcosis prevention in Nile Tilapia. KKU Research. 11.(1):53-61. [in Thai]

Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L., Olvera-Novoa, M.A. 2010. Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium and Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia. Fisheries and Aquaculture. 2.(4):93-101.

Prasad, L., Nayak, B.B., Srivastava, P.P., Reddy, A.K., Kohli, M.P.S. 2013. Use of brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoter in Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) post larvae. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 13:447-452.

Rad, M.A., Zakeri, M., Yavari, V., Mosavi, S.M. 2013. Effect of different levels of dietary supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, feed utilization and body biochemical composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. World Journal of Fish and Marine Sciences. 5.(1):88-95.

Song, Z., Tian-xing, W., Li-sheng, C., Li-jing, Z., Xiao-dong, Z. 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichtys miiuy*. Zhejiang University Science B. 7.(7):596-602.

Wangkahart, E., 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]