ผลของการใช้แบคทีเรียแลคติกต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิล

Effect of Lactic Acid Bacteria on Resistance *Streptococcus* sp. in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

วีณา จิรัตฐิวรุตม์กุล ชัยสาร* และดอกรัก ชัยสาร

Weena Jirattiwarutkul Chaisarn* and Dorkrak Chaisarn

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University

*E-mail address: weena026@gmail.com

บทคัดย่อ

การใช้แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลากะพงขาวเพื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงปลานิลครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลานิล โดยการผสมแบคทีเรียแลคติก $3.0X10^7$ CFU/g ลงในอาหารปลาทดลองที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อนำไปเลี้ยงปลานิลขนาด 6.00±0.14 กรัม นาน 4 สัปดาห์ โดยให้อาหาร ร้อยละ 2 ของน้ำหนักตัว 3 มื้อต่อวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ จากการศึกษาพบปลานิลมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเป็น 18.47±0.42 กรัม ในชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลคติก 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งให้ผลดีที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับอัตรารอดตายในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และปลานิลที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ : แบคทีเรียแลคติก, *Streptococcus* sp., ปลานิล

Abstract

The using of Lactic acid bacteria from gastrointestinal tract of Sea bass (*Lates calcarifer*) in feed of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture was conducted to examine on growth rate survival rate and resistance to *Streptococcus* sp. in Nile tilapia. The experiment $3.0X10^7$ CFU/g of Lactic acid bacteria with the concentration of 0, 1, 3 and 5 g/kg of fish feed were used to feed for 4 weeks. They were laid out in completely randomized design with 3 replications. The results showed that the concentration of 1 g/kg was the best treatment in increasing weight (18.47±0.42 grams) which was significantly different ($p \leq 0.05$) from other treatments. There was no significant difference in survival rate. The best lactic acid bacteria 3 g/kg can inhibit *Streptococcus* sp.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Streptococcus* sp., Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญเนื่องจากจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณความต้องการบริโภคอาหารเพิ่มมากขึ้นด้วยในขณะที่ปริมาณสัตว์น้ำในธรรมชาติลดน้อยลง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงมีบทบาทสำคัญในการที่จะผลิตอาหารให้เพียงพอกับความต้องการที่เพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยแล้วปลาเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับสองรองจากกุ้งทะเล จากข้อมูลของกลุ่มเศรษฐกิจการประมง กรมประมง ประจำปี 2560 รายงานว่าช่วง 6 เดือนแรกของปี 2560 ผลผลิตปลานิลมีปริมาณ 94,990 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2559 ถึงร้อยละ 4.7 และมีปริมาณการส่งออกสูงถึง 3,108.7 ตัน คิดเป็นมูลค่า 189.5 ล้านบาท โดยมีตลาดหลักคือประเทศในตะวันออกกลาง คิดเป็นร้อยละ 31.9 โดยนิยมบริโภคเป็นปลานิลแช่แข็งทั้งตัว คิดเป็นร้อยละ 73.7

การเลี้ยงปลานิลในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น (Intensive culture) โอกาสที่ปลาเผชิญกับความเครียดและอ่อนแอจึงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปลาติดเชื้อและเกิดโรคได้ง่าย โรคส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* เป็นต้น เกษตรกรแก้ปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้ระดับหนึ่ง แต่ปัญหาที่ตามมาคือการปนเปื้อนหรือการตกค้างของยาปฏิชีวนะในตัวปลาซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แนวทางที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้คือการกระตุ้นให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อต่อสู้กับเชื้อก่อโรคได้

ในอดีตได้มีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ปัญหาเรื่องโรคระบาด แต่กลับส่งผลให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยาและเกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมได้ ทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย ปัจจุบันจึงได้มีการแก้ปัญหาดังกล่าวโดยนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในการควบคุมการเลี้ยงอาศัยหลักการควบคุมทางชีวภาพ โดยใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อควบคุมสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งไม่ให้เพิ่มจำนวนหรือสร้างความเสียหาย เรียกว่า โพรไบโอติก (Probiotics) การใช้โพรไบโอติกจึงเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ได้รับความนิยมมากในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน (Gatesoupe, 1999; Gomes-Gil *et al*., 2000) เนื่องจากหลักการดังกล่าวเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรและผู้บริโภค อีกทั้งช่วยในการเจริญเติบโต ต้านทานโรค มีอัตราการรอดสูง ทั้งนี้มีการรายงานการใช้โพรไบโอติกที่มีศักยภาพในการนำมาผสมอาหารปลาแล้วหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus farciminis*, *Psychrobacter namhaensis* และ *Pseudomonas fluorescens* (Suwan and Chitmanat, 2017) และการใช้โพรไบโอติกในการเสริมอาหารสัตว์จะเป็นการลดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอีกด้วย อีกทั้งสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นรวมทั้งผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเจริญเติบโตต่อไป (Rodmongkoldee, *et al*., 2017)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก

คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารปลากะพงขาวด้วยเทคนิคการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทุกขั้นตอนดำเนินการด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เริ่มจากนำตัวอย่างปลากะพงขาวมาทำความสะอาดผิวด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น ร้อยละ 70 (v/v) ผ่าตัดเปิดช่องท้องนำเฉพาะส่วนลำไส้ออกมาตัดตามยาวและตามขวางชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบดให้ละเอียดโดยผสมกับสารละลายเกลือเข้มข้น ร้อยละ 0.85 (w/v) จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเกลือ ทำการคัดแยกแบคทีเรียโดยเทคนิค Pour plate ด้วยอาหารแข็ง De Man Rogosa Sharpe (MRS) ที่เติม Bromocresol purple ความเข้มข้น ร้อยละ 0.004 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 และเกลือแกง (NaCl) ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ จากนั้นจึงสุ่มเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองที่เกิดวงใสรอบๆ โคโลนี มาเขี่ยบนอาหารแข็ง MRS เก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ในอาหารแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง

จากนั้นตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ ย้อมแกรม การเคลื่อนที่ การสร้างสปอร์ การสร้างก๊าซ การผลิตเอนไซม์ Catalase ความสามารถในการทนเกลือที่ระดับต่างๆ และการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Siripoke *et al*. (2007) เลือกไอโซเลตที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุดจากค่า Bacteriocin activity (AU/ml) ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ค่า AU (AU/ml)} = \frac{\text{ค่าความเจือจางเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้ง X 1,000}}{\text{ปริมาณเชื้อที่ใช้}}$$

2. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ด้วยวิธี Agar well diffusion

เตรียมสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่เลี้ยงบนอาหาร MRS Agar เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 แล้วปรับความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 10^5 CFU/ml แล้วทำการทดสอบบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 ด้วยการนำสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. เกลี่ย (Swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารในจานและวางให้แห้ง จากนั้นเจาะผิวหน้าอาหารแล้วหยอดสารละลายแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้และใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินเป็นชุดควบคุม (Control) ลงหลุมละ 60 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (Clear zone)

3. การเตรียมอาหารปลานิลทดลอง

เลี้ยงแบคทีเรียแลคติกไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุดให้ได้ปริมาณ $3.0X10^7$ CFU/g ในอาหารเหลว MRS แล้วนำไปประเหยแห้งเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำผงเชื้อที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วผสมลงในอาหารทดลองด้วยวิธีการสเปรย์แล้วผึ่งให้แห้ง เก็บรักษาอาหารทดลองที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งตัวอย่างอาหารทดลองที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โดยทำการวิเคราะห์ค่าโปรตีน (Crude protein), ไขมัน (Crude fat), ความชื้น (Moisture), เถ้า (Ash) คาร์โบไฮเดรตและกากใย (Carbohydrate) ในอาหารทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete ramdomized design, CRD) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 20 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารทดลองไม่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารทดลองผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารทดลองผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ความเข้มข้น 3 กรัมต่อ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารทดลองผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ความเข้มข้น 5 กรัมต่อ 1 กิโลกรัม

4. การเลี้ยงปลานิลทดลอง

เลี้ยงปลานิลน้ำหนัก 6.00±0.14 กรัม จำนวน 240 ตัว ในถังพลาสติกความจุน้ำ 250 ลิตร ปรับสภาพปลาให้คุ้นกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เริ่มการทดลองผสมแบคทีเรียแลคติกความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ลงในอาหารทดลองตามชุดการทดลอง แล้วให้ปลานิลกินอาหารปริมาณร้อยละ 2 ของน้ำหนักตัว วันละ 3 ครั้ง เวลา 07.00 น. 12.00 น. และ 17.00 น. นาน 4 สัปดาห์ ตลอดการทดลองควบคุมคุณภาพน้ำในถังเลี้ยงปลานิลให้อยู่ในช่วงมาตรฐานการเลี้ยง ดังนี้ ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 5-7 ppm ค่าแอมโมเนีย น้อยกว่า 0.02 mg/l ค่าไนไตร์ท น้อยกว่า 0.1 mg/l และค่าไนเตรทให้อยู่ในช่วง 0.01 – 0.5 mg/l วิเคราะห์คุณภาพน้ำด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 วัน ตามวิธีการของ Longmutcha *et al*. (2015)

5. การเก็บข้อมูลปลานิลและทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ชั่งน้ำหนักปลานิลในทุกหน่วยการทดลอง ทุกๆ 7 วัน เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักสำหรับคำนวณอัตราการเจริญเติบโต และหลังจากปลาได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 4 สัปดาห์ แล้วทำการฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 CFU/ml โดยฉีดเข้าไปในช่องท้องของปลานิล บันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาไปนับจำนวนแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ต่อไป

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. **ด้วยวิธี** Agar well diffusion

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบแบคทีเรียจำนวน 121 โคโลนี เมื่อนำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยใช้คุณสมบัติการติดสีแกรม การสร้างสปอร์ การเคลื่อนที่ การสร้างก๊าซ และทดสอบการผลิตเอนไซม์ Catalase พบว่า มี 88 ไอโซเลต ที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างก๊าซ และทำปฏิกิริยา Catalase แล้วให้ผลเป็นลบ เมื่อนำไปทดสอบลักษณะทางสัณฐานพบว่า แบคทีเรียมีรูปร่างท่อน (Rod) จำนวน 4 ไอโซเลต มีรูปไข่ (Medium rod) จำนวน 7 ไอโซเลต และมีทรงกลม (Cocci) จำนวน 77 ไอโซเลต

Figure 1. Colony appearance of Lactic acid bacteria in MRS agar plate from sample of gastrointestinal tract of Sea bass

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลมนูน และหลังจากการศึกษาสัณฐานวิทยาพบการติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ Catalase ไม่สร้างก๊าซ และมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 21.00±1.00 มิลลิเมตร และมีค่า Bacteriocin activity สูงสุดคือ 800 AU/ml. จึงใช้ไอโซเลตดังกล่าวผสมลงในอาหารเลี้ยงปลานิลเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของปลานิลต่อไป

Figure 2. Inhibitions zone effect of Lactic acid bacteria against *Streptococcus* sp. on MHA plate

2. การศึกษาผลจากแบคทีเรียกรดแลคติกเสริมอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

2.1 การเจริญเติบโตของปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองพบว่า มีโปรตีน (Crude protein) ร้อยละ 32.35, ไขมัน (Crude fat) ร้อยละ 12.51, ความชื้น (Moisture) ร้อยละ 9.4, เถ้า (Ash) ร้อยละ 13.19 และคาร์โบไฮเดรตและกากใย (Carbohydrate) ร้อยละ 32.55 ตามลำดับ

จากการทดลองเลี้ยง พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 3 และ 5 ตามลำดับ มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ โดยชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด คือ 18.47±0.42 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 0, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ 17.31±0.55, 17.04±0.77 และ 17.25±2.39 กรัม ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Weight of Nile tilapia fed with different levels of Lactic acid bacteria supplemental diets

Treatment	week 1	week 2	week 3	week 4
Control (T1)	9.14±0.79 [a]	11.42±0.39 [a]	14.83±0.88 [a]	17.31±0.55 [a]
LAB 1 g Kg^{-1} (T2)	9.39±0.48 [a]	11.82±0.37 [a]	15.20±0.67 [b]	18.47±0.42 [b]
LAB 3 g Kg^{-1} (T3)	9.13±0.22 [a]	11.05±0.97 [a]	14.30±0.02 [a]	17.04±0.77 [a]
LAB 5 g Kg^{-1} (T4)	8.78±0.76 [a]	11.16±1.18 [a]	14.65±1.35 [a]	17.25±2.39 [a]

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($p \leq 0.05$)

2.2 อัตราการรอดตายของปลานิลในที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก

เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์ ทำการฉีดสารละลาย *Streptococcus* sp. ปริมาณ 10^7 CFU/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าทางช่องท้องของปลานิล จากการทดลองพบว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดตายสูงสุดคือ ร้อยละ 100 รองลงมาเป็นชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ ร้อยละ 98.33 อัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และชุดที่ได้รับอาหารผสมกรดแลคติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดตายต่ำสุดคือ ร้อยละ 81.66 ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Survival rates of Nile tilapia with different levels of Lactic acid bacteria supplemental diets

Treatment	Survival rate (%)
Control (T1)	100 ± 00^a
LAB 1 g Kg^{-1} (T2)	100 ± 00^a
LAB 3 g Kg^{-1} (T3)	98.3 ± 0.51^a
LAB 5 g Kg^{-1} (T4)	81.65 ± 5.51^b

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($p\leq0.05$)

2.3 ปริมาณ *Streptococcus* sp. ในเลือดปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ในเลือดของปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 4 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ในเลือดมากที่สุด คือ $11.40\pm8.96 \times 10^4$ CFU/ml รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 0, 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ $9.23\pm6.35 \times 10^4$, $7.66\pm6.48 \times 10^4$ และ $4.13\pm1.51 \times 10^4$ CFU/ml ตามลำดับ (Table 3) โดยชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่ำสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) กับชุดการทดลองอื่น

Table 3 Average *Streptococcus* sp. of Nile tilapia with different levels of Lactic acid bacteria supplemental diets

Treatment	Average *Streptococcus* sp. (CFU/ml)
Control (T1)	$9.23\pm6.35^a \times 10^4$
LAB 1 g Kg^{-1} (T2)	$7.66\pm6.48^a \times 10^4$
LAB 3 g Kg^{-1} (T3)	$4.13\pm1.51^b \times 10^4$
LAB 5 g Kg^{-1} (T4)	$11.40\pm8.96^a \times 10^4$

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($p\leq0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงปลานิลโดยใช้อาหารปกติไม่ผสมแบคทีเรียแลคติก (ชุดควบคุม) เปรียบเทียบกับอาหารปลาที่ผสมแบคทีเรียแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 1, 3 และ 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่า ตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดที่ได้รับอาหารผสมกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดคือ 18.47±0.42 กรัม และอัตรารอดของปลานิลชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 1 และ 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอดไม่แตกต่างจากชุดควมคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Senasri (2015) ที่ได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกผสมลงในอาหารเลี้ยงปลานิล และจากการทดลองพบว่า ปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดการทดลองที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เช่นกัน และอัตราการรอดตายไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rumruairuen *et al*. (2011) พบว่าการเสริมโพรไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการรอดของปลานิล แต่โพรไบโอติกมีผลต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากโพรไบโอติกจะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็ก ทำให้มีการย่อยสลายกากอาหารและสร้างกรดแลกติกขึ้น ซึ่งกรดแลกติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้การเกาะติดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะกระจายทั่วทางเดินอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่มีพื้นที่สำหรับการเกาะติด ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารและมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ผนังทางเดินอาหาร โดยเพิ่มการสร้างสารอาหาร เช่น วิตามิน เพิ่มอัตราการหมักสร้างเอนไซม์ เช่น ไลเปส โปรติเอส และอะไมเลส กระตุ้นการสร้างและการหลั่งเอนไซม์ย่อยอาหารช่วยการย่อยอาหาร และเพิ่มประสิทธิภาพในการนำอาหารไปใช้ ทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น (Rodmongkoldee, *et al*., 2017)

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียแลคติกที่ผสมลงในอาหารต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลานิลที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกมีน้ำหนักเฉลี่ยที่สูงกว่าปลานิลที่ไม่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก โดยแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ผสมอาหารที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ผสมอาหารที่ความเข้มข้น 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้ปลานิลมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะพัฒนาแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากปลากะพงขาวเป็นโพรไบโอติก เพื่อประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตปลานิลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่เอื้อเฟื้อในการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา และสาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวนารีหม๊ะ วายะโยะ นางสาวรีดา โต๊ะเจ๊ะ และนายไฟซอล หลียะลา นักศึกษาสาขาชีววิทยา รวมทั้งบุคคลากรและเจ้าหน้าที่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Gatesoupe, F. J. 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture. 180: 147-165.

Gomes-Gil, B., A. Roque. and J.F. Turnbull. 2000. The Use and Selection of Probiotic Bacteria for Use in the Culture of Larval Aquatic Organisms. Aquaculture. 191: 259-270.

Longmutcha, N., Phichai, K., Hanmoungjai, W. and Rojtinnakorn, J. 2015. Use of Yeast Supplemental Diet for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Fisheries Technology Research. Vol.9 No.2: 1-11. [in Thai]

Rodmongkoldee, M., Leelapat, W. and Thaimuangpon, W. 2017. Effect of Probiotics on Growth Performance and Survival rate in *Anabas testudineus*. Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University. Vol.19 No1. [in Thai]

Rumruairuen, W., Chalersantisaklu, S., Silarudee, S. and Kesronpikun, J. 2011. Effects of Q.P. Probiotics™ on Growth Performance in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Faculty of Animal Science and Agricultural Technology, Silpakorn University. 2: 1-7. [in Thai]

Senasri, N. 2015. Effect of *Bacillus* spp. as Probiotic in Feed on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Culture. Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Journal. Vol. 8 No.2: 61-66. [in Thai]

Siripoke, S., Aungpraphapornchai, P., Pothivejkul, K. and Pringsulaka, O. 2007. Screening and Identification of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods and Preliminary Characterization of the Bacteriocin. Journal of Science and Technology. Vol. 23 No. 2: 92-114. [in Thai]

Suwan, C and Chitmanat, C. 2017. The Application of Probiotics for Tilapia Culture. Chiang Mai Veterinary Journal; 15(1): 15-24. [in Thai]