

ผลของการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
Aeromonas hydrophila และ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)
Effect of *Bacillus* spp. on Inhibition of Pathogenic Bacteria *Aeromonas hydrophila* and
Streptococcus agalactiae in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ภัทริดา ไปฏุก¹ ชลล ลิมสุวรรณ¹ วชิรียา ภูริวิโรจน์กุล² และ นิตี ชูเชิด¹
Patarida Podok¹ Chalor Limsuwan¹ Watchariya Purivirojkul² and Niti Chuchird¹

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Aeromonas hydrophila* ABRC A1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRC S1) ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยวิธี cross streak method พบว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ABRC A1 ส่วนเชื้อ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญครอบครองโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRC S1 หลังจากนำไปหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการเจริญครอบครองโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณเชื้อก่อโรคในอาหารเหลว โดยวิธี broth co-culture โดยนำ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* เลี้ยงร่วมกับ *S. agalactiae* ABRC S1 ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันคือ 10^5 CFU/มิลลิลิตร พบว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถลดจำนวน *S. agalactiae* ABRC S1 ได้ 46.79%, 53.58% และ 44.22% ตามลำดับ โดยที่ปริมาณของเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิดไม่เปลี่ยนแปลง การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิดมีคุณสมบัติที่ดีในการนำไปใช้ลดปริมาณเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงปลานิลต่อไป

Abstract

Experiment has been carried out to determine the efficacy of three species of *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. subtilis*) on inhibition of pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila* ABRC A1 and *Streptococcus agalactiae* ABRC S1) from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The bacterial antagonistic activity by cross streak method showed that *B. licheniformis* could inhibit *A. hydrophila* ABRC A1 after 48 hours of incubation at 37°C. *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. subtilis* could colonize over *S. agalactiae* ABRC S1 after 48 hours of incubation at 37°C. Three species of *Bacillus* spp. which shown colonization ability were tested for ability to decrease pathogenic bacteria *S. agalactiae* ABRC S1 by broth co-culture method. *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and *S. agalactiae* ABRC S1 were cultured with the initial concentration about 10^5 CFU/ml. After 48 hrs of culture, *S. agalactiae* ABRC S1 when co-cultured in nutrient broth (NB) with *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. subtilis* respectively were decreased by 46.84%, 53.57% and 44.28%, respectively. The results from this study can suggest that these *Bacillus* spp. strains can use for decrease pathogenic bacteria in *Oreochromis niloticus* culture.

Key word: *Bacillus* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Oreochromis niloticus*

Email address: or_nuy14@hotmail.com

¹ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

¹Aquaculture Business Reserch Center, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok. 10900

²ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

²Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

คำนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลขยายกำลังผลิตขึ้นทุกปี ประเทศในแถบเอเชียและลาตินอเมริกาเป็นสองกลุ่มประเทศหลักที่เป็นแหล่งผลิตปลานิล ได้แก่ จีน อียิปต์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เม็กซิโก ไต้หวัน บราซิล และทั้งนี้รวมถึงประเทศไทยด้วย ปลานิลเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ทั้งเพื่อการบริโภคในประเทศ และการส่งออกไปยังต่างประเทศ ทั้งสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และ เอเชีย ด้วยเหตุนี้เกษตรกรจึงหันมาเพาะเลี้ยงปลานิลกันเพิ่มขึ้น อีกทั้งปัจจุบันรูปแบบการเลี้ยงปลานิลได้มีการเปลี่ยนแปลงจากการเลี้ยงแบบดั้งเดิมมาเป็นระบบการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา โดยการปล่อยลูกพันธุ์ในอัตราความหนาแน่นที่สูงขึ้น ให้อาหารสำเร็จรูปทดแทนอาหารธรรมชาติ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตให้สูงขึ้นได้ แต่ถ้ามีการจัดการไม่ดีพอรูปแบบการเลี้ยงเช่นนี้ ทำให้มีการขยับถ่ายของเสียในบ่อเลี้ยงปริมาณมาก ถ้ามีอาหารเหลือตกค้างในบ่อด้วยจะเกิดปัญหาการสะสมของสารอินทรีย์มากจนถึงระดับที่ทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ปลาเกิดความเครียดและยอมรับเชื้อโรคจากสภาพแวดล้อมได้ง่ายขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาโรคระบาดตามมา ในอดีตได้มีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ปัญหาเรื่องโรคระบาด แต่กลับส่งผลให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม (Esiobu *et al.*, 2002) ทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการแก้ปัญหาดังกล่าวโดยนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในการควบคุมสภาพการเลี้ยง โดยอาศัยหลักการควบคุมทางชีวภาพ โดยใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อควบคุมสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งไม่ให้เกิดเพิ่มจำนวนหรือสร้างความเสียหาย เรียกว่า โพรไบโอติก (Probiotics) (Gatesoupe, 1999) การใช้โพรไบโอติกเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากหลักการดังกล่าวเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรและผู้บริโภค อีกทั้งช่วยในการป้องกันโรค และลดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอีกด้วย มีการนำแบคทีเรียสกุล *Bacillus spp.* มาใช้เป็นโพรไบโอติกกันมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้ทนความร้อน อีกทั้งยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเติบโต นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้ปริมาณมาก ง่ายต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง (Green *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 2000; Oggioni *et al.*, 2003; Van Rijn *et al.*, 1995)

สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรีย *Bacillus spp.* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) 2 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* ABRC1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRC51

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB (bioMérieux) จำแนกแบคทีเรียสกุล *Bacillus spp.*

นำแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Novozymes Biological, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการเลี้ยงให้ได้โคโลนีเดี่ยวมีอายุ 18-24 ชั่วโมง ใส่ใน API 50 CHB medium ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland No.2 หยดสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ในหลุมของชุดทดสอบ และเติม Mineral oil จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการอ่านผลโดยหลุมที่เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองจะเป็นผลบวก ยกเว้นหลุมที่ 25 จะให้ผลบวกเมื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ และวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยโปรแกรม API50CHB version 4.0

2. การทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบคุณสมบัติ 2 ประการคือ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และคุณสมบัติในการแข่งขันในการเติบโตระหว่างแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์กับเชื้อก่อโรค

2.1 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลานิลที่สำคัญได้แก่ *Aeromonas hydrophila* ABRCA1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRC1 ซึ่งแยกจากปลานิลที่ป่วย ได้รับเชื้อบริสุทธิ์มาจากศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคบนอาหารแข็ง โดยวิธี cross streak method โดยนำแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด และเชื้อก่อโรค (*A. hydrophila* ABRCA1 และ *S. agalactiae* ABRC1) เลี้ยงบนอาหาร NA (Nutrient agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อก่อโรคที่ต้องการทดสอบขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยขีดเป็นเส้นเดียว และนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด มาทำการขีดทับลงไปบนแนวกากบาท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละเชื้อทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 1 ชนิด โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งขีดเชื้อเป็นเส้นเดียว

2.2 ทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันของ *Bacillus* spp. และเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในอาหารเหลว

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเข้าครอบครองโคโลนีเชื้อก่อโรคในการศึกษา 1.1 มาทำการทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อก่อโรค โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* 3 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* และเชื้อ *S. agalactiae* ABRC1 ในอาหาร NB (Nutrient broth) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl เจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ชนิดละประมาณ 10^5 CFU/มิลลิลิตร โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 *S. agalactiae*

ชุดการทดลองที่ 2 *B. licheniformis*

ชุดการทดลองที่ 3 *B. pumilus*

ชุดการทดลองที่ 4 *B. subtilis*

ชุดการทดลองที่ 5 *S. agalactiae* + *B. licheniformis*

ชุดการทดลองที่ 6 *S. agalactiae* + *B. pumilus*

ชุดการทดลองที่ 7 *S. agalactiae* + *B. subtilis*

นับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง โดยในชุดการทดลองที่ 5-7 แยกนับปริมาณแบคทีเรียระหว่าง *S. agalactiae* และ *Bacillus* spp. โดยแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ลดลง เมื่อเลี้ยงร่วมกับ

Bacillus spp. ทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี T-test (Independent-sample) และ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

เมื่อนำแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้ง (inhibition) หรือเจริญครอบครองโคโลนี (colonization) เชื้อก่อโรค 2 ชนิดที่พบในปลานิล ได้แก่ *A. hydrophila* ABRC A1 และ *S. agalactiae* ABRC S1 โดยวิธี cross streak method ภายหลังจากบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* สามารถยับยั้ง (inhibition) เชื้อ *A. hydrophila* ABRC A1 ได้ (ภาพที่ 1) ส่วนเชื้อ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถเข้าครอบครองโคโลนี (colonization) เชื้อ *S. agalactiae* ABRC S1 ได้ (ภาพที่ 2)

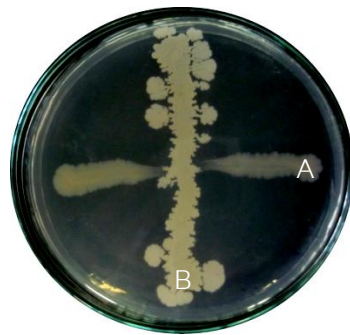


Figure 1 Inhibition effect of *Bacillus licheniformis* (B) against *Aeromonas hydrophila* (A) ABRC A1 at 48 hours



Figure 2 Colonization activities of *Bacillus* spp. against *Streptococcus agalactiae* (S) ABRC S1 at 48 hours (A) *B. licheniformis* (B) *B. pumilus* (C) *B. subtilis*

2. ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *Bacillus* spp. และเชื้อ *S. agalactiae* ในอาหารเหลว

การทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันระหว่างแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* และเชื้อ *S. agalactiae* ABRC S1 พบว่า *S. agalactiae* ABRC S1 เพิ่มจำนวนสูงสุดที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และลดลงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่า

B. licheniformis, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS1 จาก 5.45×10^6 CFU/มิลลิลิตร ลดลงเหลือ 2.90×10^6 CFU/มิลลิลิตร, 2.53×10^6 CFU/มิลลิลิตร และ 3.04×10^6 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 3) หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 46.79%, 53.58% และ 44.22% ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* เมื่อเลี้ยงเดี่ยว และเจริญร่วมกันกับเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS1 พบว่า มีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตลอดการทดลอง 120 ชั่วโมง ดังตารางที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

Table 1 Number of *Streptococcus agalactiae* ABRCS1 colonies at different hours after co-culture with *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis*, respectively

Bacteria	Number of <i>S. agalactiae</i> ($\times 10^4$ CFU/ml)					
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
<i>S. agalactiae</i> (Control)	15.0 ^a	127.8 ^a	545.6 ^a	360.0 ^a	219.0 ^a	144.0 ^a
+ <i>B. licheniformis</i>	15.0 ^a	76.7 ^b	290.0 ^b	84.4 ^b	47.7 ^b	41.1 ^b
+ <i>B. pumilus</i>	14.7 ^a	93.3 ^{ab}	253.3 ^b	123.3 ^b	42.2 ^b	33.3 ^b
+ <i>B. subtilis</i>	10.7 ^a	86.7 ^b	304.0 ^b	76.7 ^b	54.4 ^b	37.8 ^b

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($P < 0.05$)

Table 2 Number of *Bacillus licheniformis* colonies at different hours after monoculture and co-culture with *Streptococcus agalactiae* ABRCS1

Bacteria	Number of <i>B. licheniformis</i> ($\times 10^5$ CFU/ml)					
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
monoculture	1.1 ^a	14.3 ^a	155.5 ^a	113.3 ^a	122.2 ^a	106.7 ^a
co-culture	1.2 ^a	13.0 ^a	135.0 ^a	155.5 ^a	135.5 ^a	115.5 ^a

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($P < 0.05$)

Table 3 Number of *Bacillus pumilus* colonies at different hours after monoculture and co-culture with *Streptococcus agalactiae* ABRCS1

Bacteria	Number of <i>B. pumilus</i> ($\times 10^5$ CFU/ml)					
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
monoculture	1.2 ^a	13.2 ^a	101.1 ^a	183.3 ^a	130.0 ^a	83.3 ^a
co-culture	1.3 ^a	10.3 ^a	73.3 ^a	155.6 ^a	101.1 ^a	85.5 ^a

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($P < 0.05$)

Table 4 Number of *Bacillus subtilis* colonies at different hours after monoculture and co-culture with *Streptococcus agalactiae* ABRCS1

Bacteria	Number of <i>B. subtilis</i> ($\times 10^5$ CFU/ml)					
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
monoculture	1.0 ^a	66.6 ^a	86.7 ^a	77.8 ^a	82.2 ^a	60.0 ^a
co-culture	1.5 ^a	78.9 ^a	116.7 ^a	100.0 ^a	93.3 ^a	86.6 ^a

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($P < 0.05$)

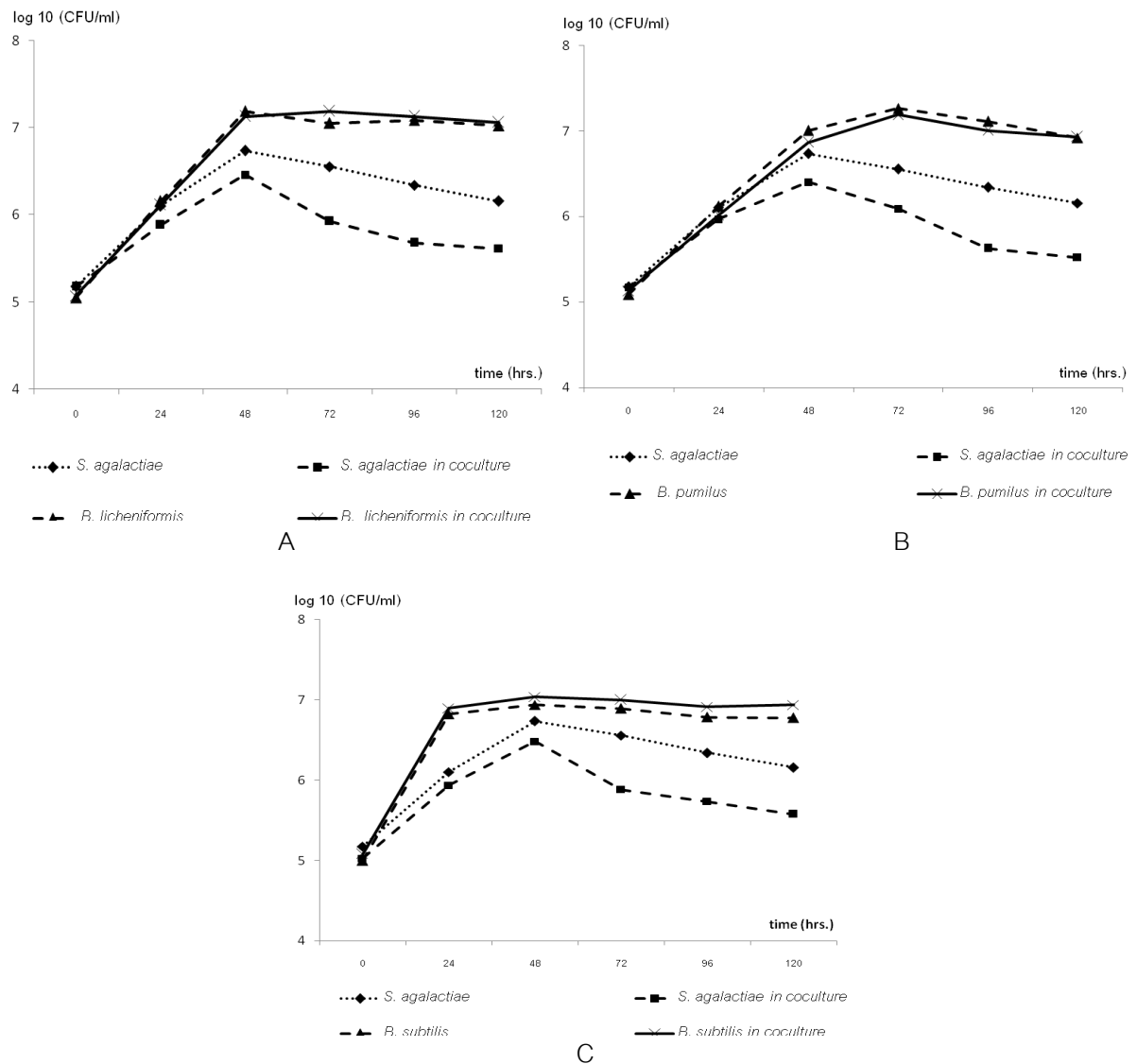


Figure 3 Growth of *Bacillus* spp. and *Streptococcus agalactiae* ABRCS1 in nutrient broth at monoculture and co-culture system (A) *B. licheniformis* (B) *B. pumilus* (C) *B. subtilis*

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิด ในการยับยั้ง (inhibition) หรือการครอบครอง (colonization) เชื้อก่อโรคในปลาชนิด พบว่า แบคทีเรีย *B. licheniformis* สามารถยับยั้ง (inhibition) เชื้อ *A. hydrophila* ABRC A1 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cladera-Olivera *et al.* (2004) ที่พบว่าแบคทีเรีย *B. licheniformis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชนิด bacteriocin-like substance ได้ โดยสารปฏิชีวนะชนิดนี้ เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่สร้างจากแบคทีเรีย สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้ง *B. licheniformis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชนิด bacitracin ได้อีกด้วย

ถึงแม้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะไม่สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. agalactiae* ABRC S1 ได้ แต่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิด ก็มีคุณสมบัติในการครอบครองโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRC S1 ได้ โดยสามารถที่จะแข่งขันในการใช้สารอาหารในการเติบโตได้ดี ดังแสดงให้เห็นจากผลการทดลองในการทดสอบการเจริญร่วมกันในอาหารเหลว ซึ่ง *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถลดจำนวน *S. agalactiae* ABRC S1 ได้ 46.79%, 53.58% และ 44.22% ตามลำดับ ซึ่งวัชรียา และเนนทวิทย์ (2549) ได้ทดสอบการเจริญร่วมกันในอาหารเหลว *B. licheniformis* W806 และ *B. licheniformis* W902 พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. agalactiae* AQST ได้ 11.98% และ 11.97% ตามลำดับ *Bacillus* หลายชนิดได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติก เช่นในการศึกษาของ Aly *et al.* (2008a) ได้นำ *B. subtilis* มาใช้เป็นโพรไบโอติก พบว่า ภายหลังจากนำมาผสมในอาหาร ปริมาณ 1×10^7 CFU/มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 กรัม เลี้ยงปลาชนิด น้ำหนักประมาณ 5 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน อัตราการเติบโต และอัตราการรอดตายของปลานิลในกลุ่มที่ใช้โพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Aly *et al.* (2008b) ศึกษาผลของการนำ *B. pumilus* ซึ่งแยกเชื้อจาก gonad ของปลานิล มาใช้เป็นโพรไบโอติก พบว่า เมื่อนำมาผสมในอาหารปริมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 กรัม เลี้ยงปลานิลน้ำหนักประมาณ 6.5 กรัม เป็นเวลา 2 เดือน อัตราการเติบโตของปลานิลในกลุ่มที่ใช้โพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ EL-Haroun *et al.* (2006) ศึกษาผลของโพรไบโอติก Biogen ซึ่งประกอบด้วย *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ต่ออัตราการเติบโต พบว่า ภายหลังจากผสมอาหารเลี้ยงปลานิล น้ำหนักประมาณ 22.96-26.4 กรัม เป็นเวลา 120 วัน กลุ่มที่ใช้โพรไบโอติก มีอัตราการเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Sun *et al.* (2010) พบว่า เมื่อใช้ *B. pumilus* ซึ่งแยกจากทางเดินอาหารของปลากะรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) ผสมในอาหารปริมาณ 1×10^7 CFU/มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 กรัม เลี้ยงปลากะรังจุดส้ม น้ำหนักประมาณ 45 กรัม เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อัตราแลกเนื้อ (FCR) ของปลาในกลุ่มที่ใช้โพรไบโอติกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย นอกจากนี้ นิตยา (2549) ทดลองใช้ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ซึ่งแยกเชื้อจากลำไส้กุ้งกุลาดำเป็นโพรไบโอติก โดยนำมาผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเมื่อใช้ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ในอัตราส่วน 1:1 ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับ วัชรียา และเนนทวิทย์ (2549) พบว่า เมื่อใช้ *B. subtilis* ซึ่งแยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำเพื่อเป็นโพรไบโอติก โดยผสมอาหารที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ของกุ้งกุลาดำได้

จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นว่า แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความสามารถในการที่จะนำมาใช้ในการเป็นโพรไบโอติกเพื่อควบคุมโรคปลานิลได้ดี

สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 3 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิล ได้แก่ *A. hydrophila* ABRCA1 และ *S. agalactiae* ABRC51 โดยวิธี cross streak method พบว่า *B. licheniformis* สามารถแสดงการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ABRCA1 ได้ ส่วนเชื้อ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถแสดงลักษณะการครอบครองโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRC51 ได้ และเมื่อนำ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 species มาทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกับ *S. agalactiae* ABRC51 ในอาหารเหลว (Nutrient broth) พบว่า *Bacillus* spp. ทั้ง 3 species สามารถลดปริมาณ *S. agalactiae* ABRC51 ได้

คำนิยม

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัท Novozymes Biological, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารอ้างอิง

- นิตยา ยิมเจริญ. 2549. **การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วัชรวิภา ภูรีวิโรจน์กุล และ นนทวิทย์ อารีรัตน์. 2549. **การใช้ *Bacillus* spp. เพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำ**. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ 2549. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 92 น.
- อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 350 น.
- Aly, S.M., Y.A-G. Ahmed, A.A-A. Ghareeb and M.F. Mohamed. 2008a. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infection. **Immunology**. 25: 128-136.
- Aly, S.M., M.F. Mohamed and G. John. 2008b. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**. 39: 647-656.
- Cladera-Olivera, F., G.R. Caron and A. Brandelli. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Microbiology**. 38: 251-256.
- EL-Haroun, E.R., A.M.A-S. Goda and M.A. Kabir Chowdhury. 2006. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**. 37: 1473-1480.
- Esiobu, N., L. Armenta and J. Ike. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. **Int J Environ Health**. 12: 133-44.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**. 180: 147-65.
- Green, D.H., P.R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca and S.M. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Appl. Environ. Microbiol**. 65: 4288-4291.
- Nicholson, W.L., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh and P. Setlow. 2000. Resistance of endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiol. Mol. Biol**. 64: 548-572.
- Oggioni, M.R., A. Ciabattini, A.M. Cuppone, G. Pozzi. 2003. *Bacillus* spores for vaccine delivery. **Vaccine**. 21: 96-101.
- Sun, Y.Z., H.L. Yang, R.L. Ma And W.Y. Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**. 29: 803-809.
- Van Rijn, J., N. Fonarev and B. Berkowitz. 1995. Anaerobic treatment of fish culture effluents: digestion of fish feed and release of volatile fatty acids. **Aquaculture**. 33: 9-20.