การแยกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างกรดอินทรีย์ยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* จากลำไส้ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Isolation of Lactic Acid Bacteria Producing Organic Acids and Possessing Anti-*Aeromonas hydrophila* Activity from Gastrointestinal Tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

สุทธิลักษณ์ ขวัญไตรรัตน์ (Sutthiluck Kwantrairat)[1*]
วิทยา ยศศิริ (Wittaya Yossiri)[2]
สินีนาฏ ศิริ (Sineenat Siri)[3]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกและศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างกรดอินทรีย์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ก่อโรคในปลาเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในอนาคต ผลการศึกษาพบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกขึ้นอยู่กับอายุของปลาและสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ และจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต พบว่ามี 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ คือ FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 ซึ่งมีค่าการยับยั้ง (% Inhibition ratio) เท่ากับ 20.0%, 15.7% และ 15.7% ตามลำดับ แบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวอยู่เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม สามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลส เจริญได้ใน pH 9 และทนต่อ 10% NaCl สำหรับการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ Api 20E พบว่า FNE-2 และ FNE-3 มีสมบัติที่เหมือนกัน คือให้ผลบวกต่อ ADH, TDA, VP, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY และ ARA ส่วน FNE-1 มีความแตกต่างกับ FNE-2 และ FNE-3 ที่ให้ผลลบต่อ ADH, VP และ AMY ผลการศึกษาสามารถระบุว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งสามจัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus* sp. เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงการเจริญของแบคทีเรียแลคติกทั้งสามชนิดพบว่ามีการลดลงของ pH จาก 4.8 เป็น 3.2 ในชั่วโมงที่ 0-32 จากนั้น pH เพิ่มขึ้นเป็น 5.4 ในชั่วโมงที่ 48-72 เมื่อทดสอบอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ปรับเป็น 6.5 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ดังนั้นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* คือ สภาวะกรดที่เกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3

[1] *อาจารย์ สาขวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2] *นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3] *ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[*] *corresponding author, e-mail: sutqua@nkc.kku.ac.th*

Abstract

In this study lactic acid bacteria (LAB) that produced organic acids and possessed anti-Aeromonas hydrophila activity, which might be used as a probiotic, were isolated and the biological properties of these bacteria studied. The results show that the quantity of LAB depends on the age and environment of the fish. Out of 30 LAB isolates, 3 isolates (FNE-1, FNE-2 and FNE-3) exhibited anti-Aeromonas hydrophila activity with % inhibition ratios of 20.0%, 15.7% and 15.7%, respectively. All three LAB isolates were gram positive cocci, arranged in two or more cells, produced catalase, grew in culture medium of pH 9 and resisted 10% NaCl. In addition, biochemical study by Api 20E assay showed that FNE-2 and FNE-3 were similar in giving positive results to ADH, TDA, VP, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY and ARA, while FNE-1 differed from FNE-2 and FNE-3 only in yielding negative results on ADH and AMY. The results clearly identify that these LAB are Pediococcus sp. The bacterial growth and pH changes in a time course of 72 h were also studied. The results show a pH reduction from 4.8 to 3.2 during 0-32 h of bacterial culture, which gradually increased to 5.4 during 48-72h. The LAB culture, pH adjusted to 6.5, exhibited no anti- A. hydrophila activity, which suggests that the acidic environment produced by LAB is one of the mechanisms for inhibiting A. hydrophila growth.

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก, กรดอินทรีย์, แอโรโมแนสไฮโดรฟิลา, ปลานิล

Keywords: Lactic acid bacteria, Organic acids, Aeromonas hydrophila, Nile tilapia (Oreochromis niloticus)

บทนำ

ปัญหาหนึ่งที่มักพบในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือปัญหาการติดเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ ทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียรายได้และมีต้นทุนการผลิตสูงขึ้นในการป้องกันหรือรักษาสัตว์น้ำที่ติดโรค ส่วนใหญ่เป็นการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะซึ่งนอกจากมีราคาสูงแล้ว ยังทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดปัญหามลพิษทางดินและน้ำ สารเคมีตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่มีอันตรายต่อผู้บริโภค และไม่สามารถส่งจำหน่ายในตลาดต่างประเทศ (ณัฏฐา, 2549; Purivirojkul et al., 2005) ทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจในการแก้ปัญหาข้างต้น คือการให้สัตว์น้ำกินอาหารที่ผสมกับโปรไบโอติก (Probiotic) เพื่อป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำโดยไม่ต้องใช้สารเคมี ซึ่งวิธีนี้นอกจากจะช่วยเพิ่มและปรับสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำแล้ว ยังทำให้เกิดการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในตัวสัตว์น้ำอีกด้วย โดยทั่วไปในลำไส้ของสัตว์น้ำมีจุลินทรีย์ที่เรียกว่าเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) ประมาณ 3 x 10^8 เซลล์ต่ออุจจาระ 1 กรัม (Hoshino, 2001) จุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อการช่วยย่อยอาหาร การป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และการสังเคราะห์วิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เชื้อประจำถิ่นเหล่านี้จึงมีประโยชน์และส่งผลดีต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ (Buntin et al., 2008) เชื้อประจำถิ่นในลำไส้ที่ได้รับความสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์มากกลุ่มหนึ่ง คือ กลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เช่น แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) และกรดอินทรีย์หลายชนิด (โดยเฉพาะกรดแลคติก) สามารถนำไปใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดของสัตว์น้ำได้ (Beasley, 2004) แบคทีเรียแลคติกยังสามารถช่วยลดความเป็นพิษ

ของสารเมแทบอไลท์ที่เป็นพิษ เช่น การย่อยไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine) และสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นพิษ ให้เป็นกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และแก๊ส นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสามารถสังเคราะห์สารที่เป็นประโยชน์ เช่น เอนไซม์ วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ (Beasley, 2004) แบคทีเรียแลคติกมีอยู่ในหลายจีนัส เช่น *Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcús, Aerococcus, Leuconostoc Canobacterium, Lactococcus, Lactosphaera, Melissococcus* และ *Oenococcus* เป็นต้น (Beasley, 2004) ซึ่งมีรายงานการวิจัยถึงแบคทีเรียหลายชนิดที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ เช่น *Pediococcus acidilactici* ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Ratanapibulsawat et al., 2005) และการใช้ *Bacillus pumilus, B. sphaericus* และ *B. subtilis* ในกุ้ง (Purivirojkul et al., 2005)

ในกลุ่มสัตว์น้ำจืด ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญและนิยมเพาะเลี้ยงมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากแพร่ขยายพันธุ์ง่าย มีรสชาติดี และสามารถเพาะเลี้ยงได้ในทุกภูมิภาคของประเทศรวมถึงในพื้นที่จังหวัดหนองคาย โดยการเพาะเลี้ยงในบริเวณนี้นิยมการเลี้ยงปลานิลแบบกระชังในแม่น้ำโขง ในเขตบ้านเดื่อ อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย พบการเพาะเลี้ยงปลานิลแบบกระชังจำนวนมาก เกษตรกรส่วนใหญ่ให้สารเคมีและยาปฏิชีวนะแก่ปลาที่เพาะเลี้ยงในบ่ออนุบาลและในกระชัง โดยมีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะกับลูกปลาวัยอนุบาลจนถึง 1 เดือนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารที่ทำให้ปลามีอาการท้องอืด ท้องบวม อาหารไม่ย่อย ไม่กินอาหาร ตาโปน มีน้ำเหลืองในช่องท้อง ไตบวม เกิดจากการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila, Corynebacterium sp.* และ *Streptococcus sp.* นอกจากการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเหล่านี้จะทำให้มีค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงที่สูงแล้ว ยังก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีและยาปฏิชีวนะในแม่น้ำโขง ซึ่งเป็นน้ำที่ถูกนำไปใช้ในการอุปโภคและบริโภคของประชาชนในบริเวณสองชายฝั่งและพื้นที่ใกล้เคียง และอาจทำให้เกิดปัญหาสุขภาพของประชาชนในบริเวณดังกล่าวได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเชื้อโปรไบโอติกเพื่อทดแทนสารเคมีและยาปฏิชีวนะสำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลแบบกระชังของเกษตรกรในพื้นที่ โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* จากทางเดินอาหารปลานิล สำหรับพัฒนาไปสู่โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลในวัยอนุบาลที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในทางเดินอาหารสูง ทำให้สามารถลดการติดเชื้อและเพิ่มอัตราการรอดของลูกปลาโดยไม่ต้องใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง ลดสารตกค้างในปลาและผลิตภัณฑ์ปลา และลดปัญหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลานิล 3 กลุ่มๆ ละ 6 กิโลกรัม โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 คือ ปลานิลวัย 1 เดือน (FN1) และวัย 4 เดือน (FN4) ตามลำดับ ซึ่งเลี้ยงแบบกระชังในแม่น้ำโขง บริเวณตำบลบ้านเดื่อ อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย ส่วนกลุ่มที่ 3 คือ ปลานิลวัย 4 เดือนที่เลี้ยงแบบธรรมชาติในบ่อดินที่มีการเลี้ยงไก่เหนือบ่อ (FNE) เขตตำบลเวียงคุก อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย โดยประมาณอายุปลาวัย 4 เดือนจากน้ำหนักที่ 800 กรัม/ตัว

การแยก วัดปริมาณ และระบุชนิดเชื้อแบคทีเรียแลคติก

แยกกระเพาะและลำไส้จากปลาในแต่ละกลุ่มที่มีน้ำหนักกลุ่มละ 6 กิโลกรัม จากนั้นนำกระเพาะและลำไส้ของปลามาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ชั่งตัวอย่างที่ปั่นได้จากตัวอย่างในแต่ละกลุ่มปริมาณ 25 กรัมมาผสมกับ 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มล. เจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่าด้วย 0.85% NaCl เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 x10^{-1} - 1x10^{-9} กรัม/มล. นำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มล.

มากระจายบนอาหาร MRS (de Mann Rogosa Sharpe; Difgo, USA) ความเข้มข้นละ 3 เพลท บ่มที่ 30 °C นาน 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด จากนั้นแยกโคโลนีที่น่าจะเป็นแบคทีเรียแลคติก คือ มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มม. มาทดสอบเบื้องต้นว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นำแบคมีเรียแลกติกที่ได้มาศึกษารูปร่างการเรียงตัว และคุณสมบัติการติดสีแกรม ทำการระบุชนิดของแบคทีเรียแลคติกด้วยชุดทดสอบ Api 20E (นภดล, 2549) นอกจากนี้ทำการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่ pH = 9 และความสามารถในการทนต่อสารละลาย 10% NaCl เก็บรักษาแบคมีเรียแลกติกในอาหารเหลว MRS ที่มีกลีเซอรอล 30% และเก็บที่อุณหภูมิ -30 °C

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

การทดสอบแบคมีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (TISTR 1321, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) เบื้องต้นด้วยวิธี Agar layer assay (Nair and Surendram, 2005) โดยเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* ในอาหารเหลว TSB (Tryptic soy broth) และเลี้ยงแบคมีเรียแลกติกที่แยกได้ในอาหารเหลว MRS ที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง นำแบคมีเรียแลกติกมา 0.1 มล. มากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จากนั้นเททับด้วย TSA soft agar ที่ผสมเชื้อ *A. hydrophila* ปริมาณ 1 มล. ที่ความขุ่นเท่ากับ Mcfarland No. 0.5 นำไปบ่มที่ 30°C นาน 24-48 ชั่วโมง ค่าการยับยั้งแบคทีเรีย *A. hydrophila* วัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น

สำหรับการทดสอบว่าการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* เกิดจากสภาวะที่เป็นกรดจากการเจริญของแบคทีเรียแลคติกหรือไม่ ศึกษาโดยใช้วิธี Agar well diffusion assay (Vaseeharan and Ramasamy, 2003) ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* ในอาหารเหลว TSB และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว MRS ที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อ A. hydrophila ให้เท่ากับ Mcfarland No. 0.5 นำมา 0.1 มล. กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. นำแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลวข้างต้นที่ไม่ปรับ pH และที่ปรับ pH เท่ากับ 6.5 มาเติมลงในหลุมๆละ 120 ไมโครลิตร บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุดควบคุมแบบลบ (Negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol disk ขนาด 30 มิลลิกรัม เป็นชุดควบคุมแบบบวก (Positive control) คำนวณการยับยั้งเป็นค่า % Inhibition ratio (IR) เทียบกับ positive control จากสูตร (Kwantrairat, 1999)

$$\%IR = \frac{(Ø \text{ โซนใสของเชื้อทดสอบ} - Ø \text{หลุม}) \times 100}{(Ø \text{โซนใสของยาปฏิชีวนะ} - Ø \text{ของแผ่น Disk})}$$

การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

เลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อมา 8 มล. เติมลงในอาหารเหลว MRS ปริมาณ 72 มล. เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มล. ทุก 8 ชั่วโมง จากชั่วโมงที่ 0 - 72 จากนั้นวัด pH วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี Plate count คำนวณรอบในการแบ่งเซลล์ (generation time) ของเชื้อจากสูตร

$$G = \frac{t}{3.3\log(N/N0)}$$

G = generation time
N = จำนวนเซลล์สุดท้าย
N_0 = จำนวนเซลล์ตั้งต้น
t = เวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (นาที)

วิธีการทดสอบทางสถิติ

ข้อมูลเชิงปริมาณแสดงผลเป็นค่า mean ± S.D. และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วย One-way ANOVA ($p < 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียแลคติกในปลาวัย 1 เดือน และวัย 4 เดือน

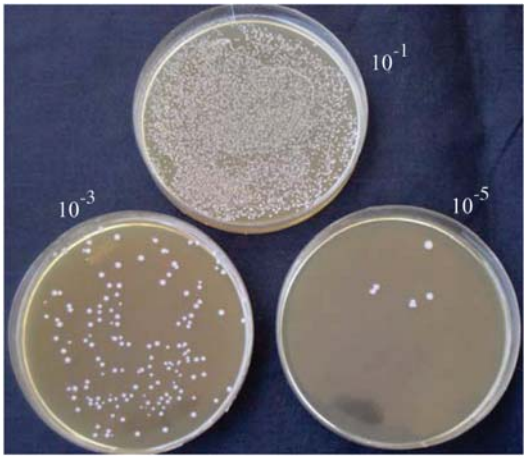
จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติกจากกระเพาะและลำไส้ปลานิลวัย 1 และ 4 เดือน ที่ได้จากเพาะเลี้ยงแบบกระชังในแม่น้ำโขง ที่ตำบลบ้านเดื่อ อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย และปลานิลวัย 4 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบธรรมชาติในบ่อดิน ที่ตำบลเวียงคุก อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าปลาจากทั้งสามแหล่งมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ $6.8\pm2.2 \times 10^3$, $3.0\pm1.1 \times 10^5$ และ $7.5\pm1.2 \times 10^5$ CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยปลานิลกระชังวัย 1 เดือนมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่าปลานิลวัย 4 เดือนจากทั้งสองแหล่ง นอกจากนี้พบว่าปลานิลกระชังวัย 1 เดือน ยังมีจำนวนไอโซเลตของเชื้อที่แยกได้น้อยกว่าปลานิลวัย 4 เดือนที่เลี้ยงในแหล่งเดียวกัน (9 และ 13 ไอโซเลต ตามลำดับ) แต่ปลานิลวัย 4 เดือนที่เลี้ยงจากคนละแหล่งมีจำนวนไอโซเลตของเชื้อต่ำกว่าปลานิลกระชังวัย 4 เดือน แสดงให้เห็นว่าชนิดของแบคทีเรียแลคติกในกระเพาะและลำไส้ของปลาขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมและอายุของปลา ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ระบุว่าปริมาณเชื้อในลำไส้ปลาวัยอ่อนจะน้อยกว่าปลาตัวเต็มวัยที่มีอายุมากกว่า โดยเมื่อแรกเกิดปลาจะมีเชื้อประจำถิ่นในปริมาณต่ำ และปริมาณเชื้อประจำถิ่นในปลาจะเพิ่มขึ้นตามอายุเนื่องจากได้รับเชื้อเหล่านี้จากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นปริมาณและชนิดของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ปลาจึงขึ้นอยู่กับอายุและสิ่งแวดล้อม (Galindo, 2004; Verschuere et al., 2000)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้เบื้องต้นจำนวน 30 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนี ขาว กลมนูน และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 มม. (รูปที่ 1) มาทดสอบเอนไซม์แคทตาเลส (Catalase) พบว่ามี 9 ไอโซเลต ที่ให้ผลลบต่อเอนไซม์แคทตาเลส (ตารางที่ 2) จากนั้นทดสอบการติดสีย้อมแกรม พบว่าแบคมีเรียทั้ง 9 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปกลม มีการเรียงตัวเป็นคู่และเป็นกลุ่ม (ตารางที่ 2) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลตได้นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ต่อไป

ตารางที่ 1. ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลวัย 1 เดือน และวัย 4 เดือน (N = 3, $p < 0.05$)

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)				จำนวนเชื้อที่แยกได้
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± S.D.	
ปลานิลกระชังวัย 1 เดือน (FN1)	8.5×10^3	7.7×10^3	4.2×10^3	$6.8\pm2.2 \times 10^3$ (a)	9
ปลานิลกระชังวัย 4 เดือน (FN2)	2.0×10^5	1.9×10^5	2.4×10^5	$3.0\pm1.1 \times 10^5$ (b)	13
ปลานิลบ่อธรรมชาติวัยประมาณ 4 เดือน (FNE)	8.7×10^5	6.5×10^5	7.3×10^5	$7.5\pm1.2 \times 10^5$ (c)	8

a, b, c = สัญลักษณ์แสดงความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$



รูปที่ 1. ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียแลคติกบนอาหารแข็ง MRS

ความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลตต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยวิธี Agar layer assay บนอาหารแข็ง MRS พบแบคทีเรียแลคติกที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* จำนวน 3 ไอโซเลตได้แก่ FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 โดยสังเกตจากลักษณะของโซนใส (Clear zone) รอบโคโลนีของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งแบคทีเรียแลกคติกทั้ง 3 ไอโซเลตมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเท่ากันที่ 5 มม. (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2. ลักษณะโคโลนีและผลทดสอบเอนไซม์แคทตาเลสของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

แบคทีเรียแลคติก	ลักษณะโคโลนี	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	คุณสมบัติการติดสีย้อมแกรม/รูปร่าง	การทดสอบเอนไซม์แคทตาเลส
FN1-1	กลมนูน ขาว	5	แกรมบวก / กลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม	ผลลบ
FN1-7	กลมนูน ขาว	3	แกรมบวก / กลม เรียงตัวอยู่เป็นคู่	ผลลบ
FN1-8	กลมนูน ขาว	5	แกรมบวก / กลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม	ผลลบ
FN1-9	กลมนูน ขาว	2	แกรมบวก / กลมเรียงตัวอยู่เป็นคู่	ผลลบ
FN4-8	กลมนูน ขาว	5	แกรมบวก / กลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม	ผลลบ
FN4-13	กลมนูน ขาว	2	แกรมบวก / กลมเรียงตัวเป็นกลุ่ม	ผลลบ
FNE-1	กลมนูน ขาว	3	แกรมบวก / กลม เรียงตัวเป็นคู่	ผลลบ
FNE-2	กลมนูน ขาว	3	แกรมบวก / กลมขนาดเล็กอยู่เป็นกลุ่ม	ผลลบ
FNE-3	กลมนูน ขาว	3	แกรมบวก/กลม ขนาดเล็กกว่า FNE-1 อยู่เป็นคู่	ผลลบ

ตารางที่ 3. การยับยั้งการเจริญของ A. hydrophila ของแบคทีเรียแลคติก ด้วยวิธี Agar layer assay

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส(มม.)
FN1-1	0
FN1-7	0
FN1-8	0
FN1-9	0
FN4-8	0
FN4-13	0
FNE-1	5
FNE-2	5
FNE-3	5

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3

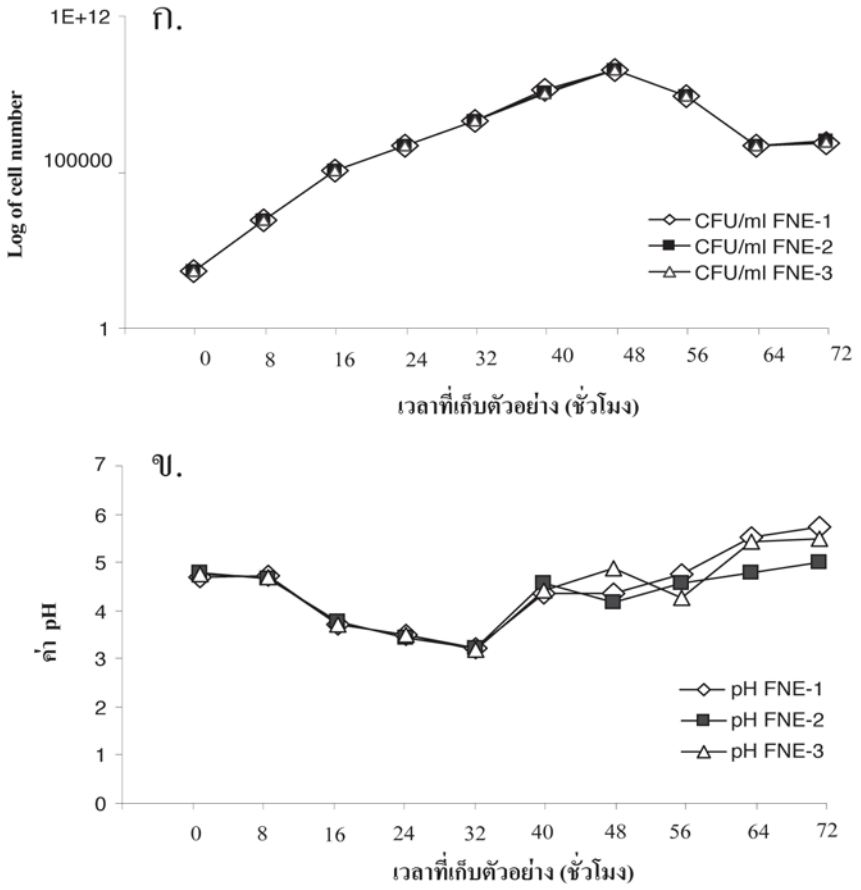
นอกจากการศึกษาคุณสมบัติการติดสีแกรมและการสร้างเอนไซม์แคทตาเลสของแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 แล้ว ยังได้ศึกษาความสามารถในการเจริญที่ pH 9 การทนต่อเกลือความเข้มข้น 10% และคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ Api 20E ของเชื้อ FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถเจริญใน pH 9 และทนต่อ 10 % NaCl ได้ การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ Api 20E ของแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 พบว่า FNE-2 และ FNE-3 มีคุณสมบัติที่เหมือนกัน คือให้ผลบวกต่อ ADHs, TDA, VP, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY และ ARA (ตารางที่ 4) สำหรับ FNE-1 มีความแตกต่างกับ FNE-2 และ FNE-3 ที่ให้ผลลบต่อ ADH, VP และ AMY จากข้อมูลที่ศึกษาทั้งหมดสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งสามจัดอยู่ในสกุล *Pediococcus* sp. สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* sp. มีรายงานว่ามักพบในปลาน้ำจืด โดยพบแบคทีเรียในสกุลนี้ประมาณ 10% ของเชื้อทั้งหมด (Nair and Surendram, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคมีเรียในสกุลนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เช่น Pediococcus acidophilus ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Ratanapibulsawat et al., 2005)

ตารางที่ 4. คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 โดย Api 20E

สมบัติ	FNE-1	FNE-2	FNE-3	สมบัติ	FNE-1	FNE-2	FNE-3
ONPG	-	-	-	GEL	-	-	-
ADH	-	+	+	GLU	+	+	+
LDC	-	-	-	MAN	+	+	+
ODC	-	-	-	INO	+	+	+
CIT	-	-	-	SOR	+	+	+
H_2S	-	-	-	RHA	+	+	+
URE	-	-	-	SAC	+	+	+
TDA	+	+	+	MEL	+	+	+
IND	-	-	-	AMY	-	+	+
VP	-	+	+	ARA	+	+	+

การเจริญของแบคทีเรียแลคติก

ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลต มีกราฟการเจริญที่คล้ายกัน (รูปที่ 2) โดยมี generation time เท่ากับ 1.6, 1.7 และ 1.7 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ในขณะที่มีการเจริญ พบว่ามีการลดลงของ pH จาก 4.8 - 3.2 ในชั่วโมงที่ 0 - 32 ชั่วโมง จากนั้นพบว่า pH ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 5.4 ในชั่วโมงที่ 72 (รูปที่ 2) ทั้งนี้การลดลงของ pH ใน 32 ชั่วโมงน่าจะเกิดจากแบคทีเรียแลคติกมีการเจริญและสลายน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติก ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลดลง (Beasley, 2004) และเมื่อเซลล์แก่และตายทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ในปริมาณต่ำหรือไม่มีการผลิตกรดอินทรีย์ จึงมีผลให้สภาพความเป็นกรดลดลง

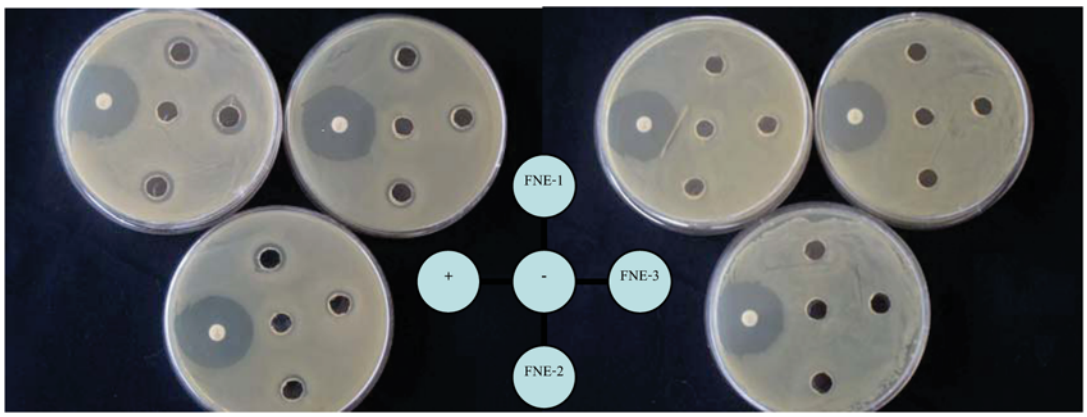


รูปที่ 2. การเจริญ (ก) และการเปลี่ยนแปลง pH (ข) ของเชื้อ FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 ใน 72 ชั่วโมง

ผลของสภาวะที่เป็นกรดจากแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

แบคทีเรียแลคติกมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้โดย 2 กลไกหลัก คือ 1) แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เช่น การผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) และ 2) แบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอินทรีย์ทำให้สิ่งแวดล้อมรอบๆแบคทีเรียมี pH ในช่วงกรด จึงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไวต่อความเป็นกรด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทดสอบผลของสภาวะที่เป็นกรดจากแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เลี้ยงเชื้อ FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 อายุ 32 ชั่วโมง มาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธี Agar well diffusion assay โดยเปรียบเทียบผลของ pH ที่ไม่มีและมีการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5สำหรับในการทดลองนี้ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม ใช้เป็นชุดควบคุมแบบบวก (Positive control) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้ และมีค่า % inhibition ratio (IR) เป็น 100% ส่วนชุดควบคุมแบบลบ (Negative control) เป็นการใช้อาหารเหลว MRS ซึ่งมีค่า %IR เท่ากับ 0% (ตารางที่ 5)

จากการศึกษาพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ไม่มีการปรับ pH สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้ดี โดยมีค่า %IR เท่ากับ 20.0%, 15.7% และ 15.7% ตามลำดับ (รูปที่ 3 และตารางที่ 5) แต่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่มีการปรับ pH เป็น 6.5 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้ (ตารางที่ 5) ดังนั้นในเบื้องต้นจึงคาดว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลตในช่วงการเจริญที่ 32 ชั่วโมงแรก คือ pH ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการเจริญในช่วง 32 ชั่วโมงแรก ที่พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมี pH ต่ำถึง 3.2 ที่ชั่วโมงที่ 32 ของการเจริญ ซึ่งสภาวะที่เป็นกรดนี้น่าจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila*



ก ข

รูปที่ 3. ลักษณะโซนใสจากการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 ที่ไม่ได้ปรับ pH (ก) และเมื่อปรับ pH เป็น 6.5 (ข) โดยมียาปฏิชีวนะ Chloramphenicol เป็นชุดควบคุมแบบบวก (+) และใช้อาหารเหลว MRS ปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมแบบลบ (-)

ตารางที่ 5. การยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ปรับและปรับ pH เป็น 6.5 (N = 5, $p < 0.05$)

ตัวอย่าง	อาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ปรับ pH						อาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ปรับ pH= 6.5					
	∅ โซนใส (มม.)				∅ โซนใส - ∅ Disk หรือหลุม	%IR	∅ โซนใส (มม.)				∅ โซนใส - ∅ Disk หรือหลุม	%IR
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย ± S.D.			1	2	3	เฉลี่ย		
FNE-1	14	12	12	12.7±1.1(a)	4.7	20.0	0	0	0	0	0	0
FNE-2	13	12	10	11.7±1.1(a)	3.7	15.7	0	0	0	0	0	0
FNE-3	13	11	11	11.7±1.1(a)	3.7	15.7	0	0	0	0	0	0
Chloramphenicol	30	30	28	29.3±1.1(b)	23.37	100.0	-	-	-	-	-	-
MRS ปลอดเชื้อ	0	0	0	0(c)	0	0	0	0	0	0	0	0

∅ = เส้นผ่านศูนย์กลาง โดย ∅ disk = 6 มม. และ ∅ หลุม = 8 มม.

a, b, c = สัญลักษณ์แสดงความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

สรุปผลการทดลอง

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากลำไส้ปลานิลจากตัวอย่างปลานิล 3 กลุ่ม คือ 1) ปลานิลวัย 1 เดือน 2) ปลานิลวัย 4 เดือน จากกระชังแม่น้ำโขง และ 3) ปลานิลวัย 4 เดือน จากบ่อดินที่เลี้ยงแบบธรรมชาติ พบว่าปลานิลวัย 1 เดือน มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกน้อยที่สุด และปลานิลวัย 4 เดือนที่ได้จาก 2 แหล่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกแตกต่างกัน จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติก 30 ไอโซเลต พบ 3 ไอโซเลต (FNE-1, FNE-2 และ FNE-3) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้โดยให้ %IR เท่ากับ 20.0%, 15.7% และ 15.7% ตามลำดับ โดย FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวอยู่เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม สามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลส เจริญได้ใน pH 9 และทนต่อ 10% NaCl สำหรับการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ Api 20E ของแบคทีเรียแลคติก FNE-1, FNE-2 และ FNE-3 พบว่า FNE-2 และ FNE-3 มีสมบัติที่เหมือนกัน คือให้ผลบวกต่อ ADH, TDA, VP, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY และ ARA ส่วน FNE-1 มีความแตกต่างกับ FNE-2 และ FNE-3 ที่ให้ผลลบต่อ ADH, VP และ AMY ผลการศึกษาข้างต้นสามารถระบุว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งสามจัดอยู่ในจีนัส Pediococcus sp. จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงการเจริญของแบคทีเรียแลคติกทั้งสามพบว่าใน 32 ชั่วโมงแรกมีการลดลงของ pH จาก 4.8 เป็น 3.2 จากนั้น pH ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 5.4 ในชั่วโมงที่ 72 เมื่อทดสอบผลของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ปรับและปรับ pH= 6.5 พบว่าอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ปรับ pH ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ดังนั้นกลไกหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* คือ สภาวะกรดที่เกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะมีประโยชน์ต่อการประยุกต์

ใช้แบคทีเรียแลคติกเหล่านี้เป็นโปรไบโอติกในลูกปลาวัยอ่อนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยสำหรับนักวิจัยหน้าใหม่ ปี พ.ศ.2550 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณ วิทยาเขตหนองคาย ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณ ผศ.ดร. สินีนาฏ ศิริ และ ผศ.ดร. ประสาท โพธิ์นิ่มแดง เป็นอย่างสูงสำหรับการสนับสนุนและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์แก่โครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร. 2549. ยาต้านจุลชีพกับการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ. **วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.** 14: 45-53.

นภดล ศุกระกาญจน์. 2549. **คู่มือปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.

Beasley, S. 2004. Isolation, Identification and exploitation of lactic acid bacteria for human and animal microbiota. **Academic dissertation in microbiology,** Department of applied chemistry and microbiology, University of Helsinki.

Buntin, N., Chanthachum, S. and Hongpattarakere T. 2008. Screening of lactic bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. **Songkhanakarin J. Sci.Technol.** 30 (suppl. 1):141-148.

Galindo, A.B. 2004. Lactobacillus plantarum 44A as alive feed supplement for freshwater fish: bacteria of freshwater fish and its environment. **Ph.D Thesis Wageningen University.**

Hoshino, T. 2001. Lactobacillary drink for fish: New breeding method with the best use of intestinal symbiotic bacteria. **J. Biohistory.** 32: 1-2.

Kwantrairat, S. 1999. HIV-1 reverse transcriptase inhibitors from Thai medicinal plants and *Elephantopus scaber* Linn. **Thesis Master Degree** in Biopharmaceutical, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Bangkok, Thailand.

Nair, P.S. and Surendram, P.K. 2005. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. **J. Culture Collections.** 4: 48-52.

Purivirojkul, W., Maketon, M. and Areechon, N. 2005. Probiotic roperties of *Bacillus pumilus, Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) culture. **Kasetsart J. Nat. Sci.** 39: 262 - 237

Ratanapibulsawat, C., Kroujkaew, P., Sadahiro, O. and Nitisinprasert, S. 2005. Screening and characterization of lactic acid bacteria producing antimicrobial substance against *Staphyloccus aureus.* **Kasetsart J. Nat. Sci..** 39: 284-293.

Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon.* **Letters in Applied Microbiology.** 36:83-88.

Verschuere, L., Rombaut G., Sorgeloos, P. and Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture. **Microbiol and Mol Biol Rev.** 64: 655-671.