การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากทางเดินอาหารในปลากะพงขาว

Isolation of Lactic acid Bacteria Capable of Pathogen Inhibitory Activity from Gastrointestinal tract of Sea bass (*Lates calcarifer*)

วีณา จิรัตฐิวรุตม์กุล[1*] และดอกรัก ชัยสาร[2]

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

โทร 0-7735-5666 โทรสาร 0-7735-5666 *อีเมลล์ weena026@gmail.com.

Weena Jirattiwarutkul[1*] and Dorkrak Chaisarn[2]

[1,2]Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Suratthani, 84100, Thailand

Tel: 0-7735-5666, Fax: 0-7735-5666 *E-mail: weena026@gmail.com.

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว สามารถคัดแยกได้จำนวน 121 โคโลนี เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และทดสอบการผลิตเอนไซม์ Catalase พบว่า มี 88 ไอโซเลต ที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และเมื่อทำปฏิกิริยา Catalase แล้วให้ผลเป็นลบ เมื่อนำไปทดสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า มีแบคทีเรียรูปร่างท่อน (Rod) 4 ไอโซเลต รูปไข่ (Medium rod) 7 ไอโซเลต และทรงกลม (Cocci) 77 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบการสร้างก๊าซ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดไม่มีการสร้างก๊าซ (Homofermentative) จากการทดลองมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 48 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus* sp. ได้ โดยไอโซเลตที่ 1/84 (LAB 33) สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13.17±0.29 เซนติเมตร และไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 21.00 ±1.00 เซนติเมตร และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลา 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Aeromonas hydrophila* พบว่า ไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) มีค่า Bacteriocin activity สูงสุดคือ 800 AU/ml.

คำสำคัญ : แบคทีเรียแลคติก, ทางเดินอาหาร, แบคทีเรียก่อโรคในปลา, โปรไบโอติก

ABSTRACT

The research aimed isolation of lactic acid bacteria capable of pathogen inhibitory activity from gastrointestinal tract of sea bass (*Lates calcarifer*). Collection of 121 yellow colonies on the selective medium, MRS agar added with bromocresol purple and $CaCo_3$ 88 isolates are gram-positive, non- sporulation and catalase negative. Lactic acid bacteria are rods 4 isolates, medium rod 7 isolates, cocci 77 isolates and Homofermentative. The research 48 isolates lactic acid bacteria can inhibits *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. The best Isolates 1/84 (LAB 33) can inhibits *Aeromonas hydrophila* with a diameter about 13.17±0.29 cm. and Isolates 1/69 (LAB25) can inhibits *Streptococcus* sp. with a diameter about 21.00 ±1.00 cm. Therefore the bacteriocin activity of isolates 1/69 (LAB25) was calculated as 800 AU/ml.

Keywords : Lactic acid becteria, Gastrointestinal, Fish pathogen, Pprobiotic

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศ ทำรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นอย่างมาก อันเป็นผลมาจากความไม่สมดุลระหว่างความต้องการบริโภคของประชากรที่เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณสัตว์น้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติกลับลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้สัตว์น้ำที่เกษตรกรโดยเฉพาะในภาคใต้นิยมเลี้ยงหนึ่งในหลายชนิดคือปลากะพงขาว เพราะมีวิธีการเลี้ยงไม่ยุ่งยากสามารถเพาะเลี้ยงได้หลายลุ่มน้ำทั่วประเทศ เป็นปลาที่มีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคในหลายประเทศ

ปลากะพงขาวจัดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เป็นปลาที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม เลี้ยงกันแพร่หลายในเขตจังหวัดชายทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน โดยจะเลี้ยงอยู่ในแหล่งน้ำใกล้ฝั่ง พบมากบริเวณปากแม่น้ำ ลำคลองและปากทะเลสาบ เนื่องจากเป็นปลาที่เพาะเลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดีและมีราคาสูง ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันประเทศไทยสามารถเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวได้เป็นจำนวนมาก ทั้งเพื่อเลี้ยงภายในประเทศและส่งออกขายยังต่างประเทศ แม้การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวจะให้ผลตอบแทนกับเกษตรกรเป็นที่น่าพอใจ แต่เกษตรกรต้องประสบกับปัญหาหลายด้าน ทั้งปัญหาเกี่ยวกับการบริหารจัดการในระหว่างการเลี้ยง สิ่งแวดล้อม ยาปฏิชีวนะ พ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติลดน้อยลงไม่สมบูรณ์ และโรคระบาดซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของปลากะพงขาว เมื่อเกิดการระบาดของโรคทำให้มีอัตราการตายสูง ส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงขาดทุนและเสียเวลา จากสาเหตุนี้ทำให้เกิดความต้องการลูกพันธุ์ปลากะพงขาวที่แข็งแรงต้านทานโรคในหมู่ของเกษตรกร

จากปัญหาด้านโรคระบาด ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาและสารเคมีในการยับยั้งโรคซึ่งอาจเป็นการแก้ปัญหาที่ไม่ตรงจุด เพราะสาเหตุการป่วยของสัตว์น้ำอาจเกิดจากคุณภาพน้ำในบ่อ คุณภาพของอาหาร หรือการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม การใช้ยาหรือสารเคมีในการบำบัดโรคนั้นควรจะเหมาะสมกับสัตว์น้ำป่วย เนื่องจากมีการติดเชื้อแบคทีเรีย ปรสิต หรือ เชื้อรา (สุปราณี ชินบุตร และคณะ, 2545) ถ้าเกษตรกรใช้สารปฏิชีวนะมากเกินความจำเป็นอาจเกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในปลากะพงขาวได้ แนวทางหนึ่งในการป้องกันและแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือการใช้โปรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่เป็นประโยชน์ซึ่งจะช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคและเสริมภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านให้แข็งแรง ดังนั้นการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาวจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่จะนำไปสู่การค้นพบสายพันธุ์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคในปลากะพงขาวต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาจากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างปลากะพงขาว เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัวประมาณ 3-5 นิ้ว จากกระชังเลี้ยงปลาในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี นำปลาที่ได้มาใส่ถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ รีดอากาศออกมัดปากถุงให้แน่น นำไปใส่ในลังน้ำแข็งและนำไปห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

2. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารปลากะพงขาว คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารปลากะพงขาวด้วยเทคนิคการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทุกขั้นตอนดำเนินการด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

เริ่มจากนำตัวอย่างปลากะพงขาวมาทำความสะอาดผิวด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 (v/v) ผ่าตัดเปิดช่องท้อง นำเฉพาะส่วนลำไส้ออกมาตัดตามยาวและตามขวางชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบดให้ละเอียดโดยผสมกับสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเกลือคัดแยกแบคทีเรียโดยเทคนิค Pour plate ด้วยอาหารแข็ง de Man Rogosa Sharpe (MRS) ที่เติม Bromocresol purple ร้อยละ 0.004 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และเกลือแกง (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ สุ่มเลือกโคโลนีที่มีสีเหลือง เกิดวงใสรอบๆ โคโลนี มาเขี่ยบนอาหารแข็ง MRS เพื่อย้อมสีแกรมและตรวจสอบความบริสุทธิ์ ทดสอบการสร้างสปอร์และการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ได้ในอาหารแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง

3. การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น เลือกไอโซเลตแบคทีเรียแลคติกที่ให้ผลยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาได้ดีมาตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ ความสามารถในการทนเกลือที่ระดับต่างๆ และการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส นำเชื้อเก็บในอาหารเหลว MRS เติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4. การทดสอบคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลา 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Aeromonas hydrophila* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay จากนั้นเลือกไอโซเลตที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ ทำได้โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเชื้อที่ได้ 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) เพื่อตกตะกอนเซลล์ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเจือจางแบบสองเท่าเป็นลำดับ (Two-fold serial dilution) ดูดสารละลายที่ผ่านเจือจางแต่ละความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร TSA ที่มีเชื้อก่อโรคอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ละไอโซเลตทำ 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยนำค่าความเจือจางที่มีความเข้มข้นมากที่สุดที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคมาคำนวณค่า Bacteriocin activity (AU/ml)

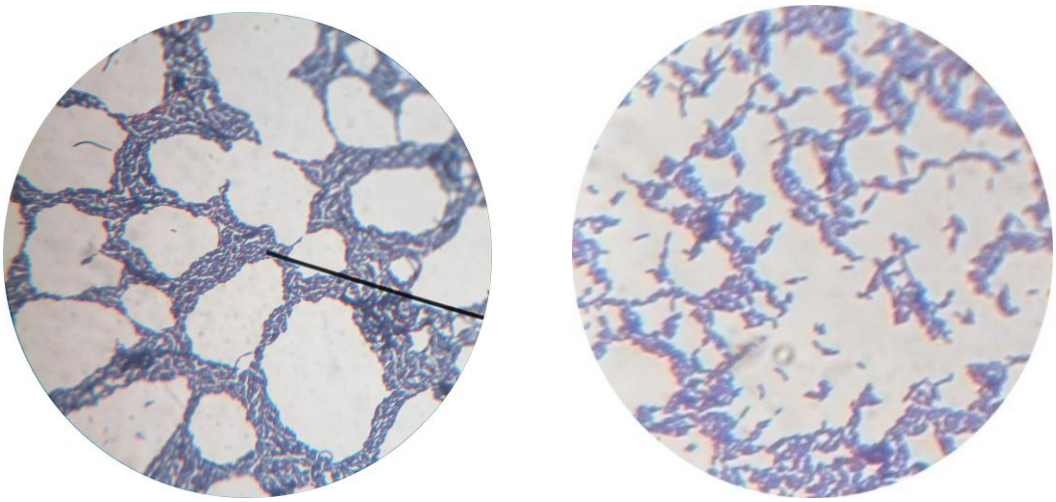
ผลการวิจัยและอภิปราย

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารปลากะพงขาว จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาวในเดือนพฤศจิกายน 2553 และมีนาคม 2554 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS Agar) ที่เติม Bromocresol purple ร้อยละ 0.004 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และเกลือแกง (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ1.5 ด้วยเทคนิค Pour plate บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกด้วยอาหาร de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS Agar) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) มีลักษณะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตกรด และทำปฏิกิริยากับแคลเซียมในอาหาร ซึ่งผลจากการทดลอง พบแบคทีเรียที่เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและมีลักษณะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี จำนวน 121 โคโลนี ดังภาพที่ 3

เมื่อนำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยใช้คุณสมบัติการติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และทดสอบการผลิตเอนไซม์ Catalase พบว่า มี 88 ไอโซเลต ที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และทำปฏิกิริยา Catalase แล้วให้ผลเป็นลบ เมื่อนำไปทดสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า มีแบคทีเรียรูปร่างท่อน (Rod) 4 ไอโซเลต รูปไข่ (Medium rod) 7 ไอโซเลต และทรงกลม (Cocci) 77 ไอโซเลต ดังภาพที่ 4

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของมงคล ปัญญารัตน์ (2552) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดอง ผัก ผลไม้ นม ผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ปลา น้ำหมักชีวภาพ EM ตัวอย่างจากช่องปาก ตัวอย่าง Rectal swabs ทวารของสุกร และดิน จำนวน 91 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 145 ไอโซเลต ทุกไอโซเลตให้ผลการติดสี แกรมเป็นบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยมีรูปแท่ง 63 ไอโซเลต และทรงกลม 82 ไอโซเลต เช่นเดียวกับการศึกษาของนฤมล ทองงาม (2552) ที่คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อ และปลาหมักของไทย จำนวน 93 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด จำนวน 152 ไอโซเลต โดยมีรูปท่อน 79 ไอโซเลต และรูปไข่ 73 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของสมใจ ศิริโภค และคณะ (2550) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จำนวน 131 ไอโซเลต มีรูปท่อน 110 ไอโซเลต รูปไข่ 7 ไอโซเลต และทรงกลม 14 ไอโซเลต

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

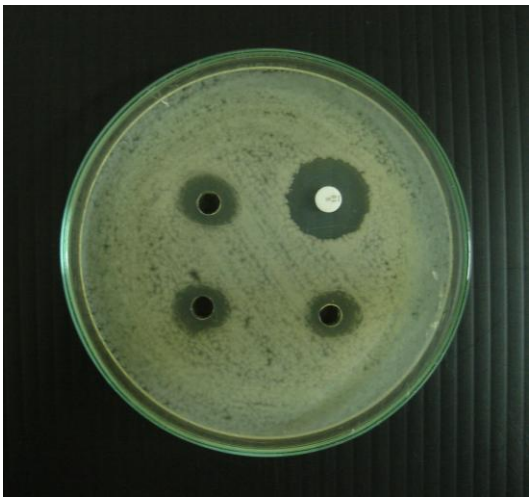


ภาพที่ 4 แสดงรูปร่างแบคทีเรียและการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)
(ซ้าย) ลักษณะแบคทีเรียรูปร่างท่อน สายโซ่ อยู่เป็นกลุ่ม
(ขวา) ลักษณะแบคทีเรียรูปไข่ สายโซ่ อยู่เป็นกลุ่ม

2. การทดสอบคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Aeromonas hydrophila* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. และ *Aeromonas hydrophila* ได้ โดยไอโซเลตที่ 1/69 (LAB23) สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 21.00 ± 1.00 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 5 และไอโซเลตที่ 1/84 (LAB 33) สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 13.17 ± 0.29 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 6

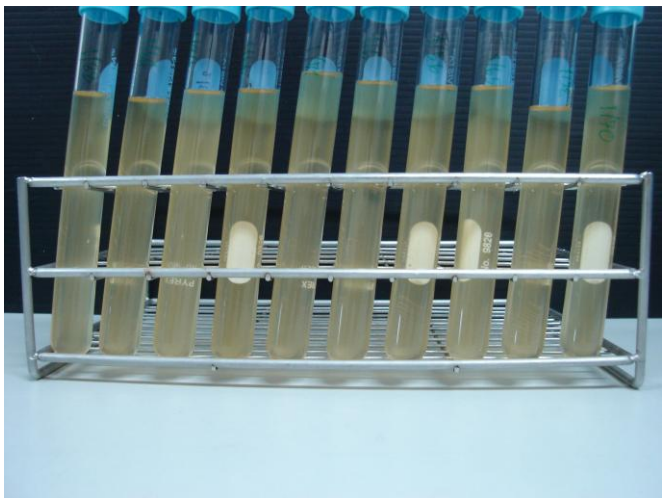
สอดคล้องกับการศึกษาของสมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ (2548) ที่คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารของปลากะพงขาวที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ โดยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 5 ไอโซเลต กำหนดแต่ละไอโซเลตเป็น LAB 1 - LAB 5 โดยไอโซเลต LAB 4 เมื่อทดลองเสริมลงในอาหารปลากะพงขาว พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวและการต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAB 4 มีความใกล้เคียงกับ *Weissella* sp. เช่นเดียวกับการศึกษาของปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ และคณะ (2547) ที่ประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเพื่อลดการปนเปื้อนของ *E.coli* ในกุ้งกุลาดำ โดยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากปลาส้มฟักได้ 118 ไอโซเลต พบว่ามี 49 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* TISTR527 ได้ โดยไอโซเลต SF72-93 สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* TISTR527 ได้ดีที่สุด และเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเป็น *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

ภาพที่ 5 แสดงวงใสการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ไอโซเลตที่ 1/69



ภาพที่ 6 แสดงวงใสการยับยั้งแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ไอโซเลตที่ 1/84

3. การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น จากการเลือกไอโซเลตแบคทีเรียแลคติกที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลามาตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ การสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาทั้ง 2 ชนิด สูงสุดจำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ LAB 1, LAB 7, LAB 9, LAB 10, LAB 17, LAB 20, LAB 21, LAB 22, LAB 23, LAB 25, LAB 26, LAB 27, LAB 30, LAB 32, LAB 33, LAB 35, LAB 37, LAB 40, LAB 47 และ LAB 48 โดยทั้ง 20 สายพันธุ์ ไม่สามารถสร้างก๊าซ จัดเป็นกลุ่ม Homofermentative ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สามารถสร้างก๊าซ

4. การทดสอบคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Aeromonas hydrophila* พบว่าไอโซเลต 1/69 (LAB) มีค่า Bacteriocin activity สูงสุดคือ 800 AU/ml.

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว ได้ 121 โคโลนี เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม การสร้างสปอร์ และทดสอบการผลิตเอนไซม์ Catalase พบว่า มี 88 ไอโซเลต ที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และเมื่อทำปฏิกิริยา Catalase แล้วให้ผลเป็นลบ เมื่อนำไปทดสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า มีแบคทีเรียรูปร่างท่อน (Rod) 4 ไอโซเลต รูปไข่ (Medium rod) 7 ไอโซเลต และทรงกลม (Cocci) 77 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบการสร้างก๊าซ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดไม่มีการสร้างก๊าซ

2. จากการทดลองมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 48 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus* sp. ได้ โดยไอโซเลตที่ 1/84 (LAB 33) สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13.17±0.29 เซนติเมตร และไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 21.00 ±1.00 เซนติเมตร

3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา ได้แก่ *Streptococcus* sp. และ *Aeromonas hydrophila* พบว่า ไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) มีค่า Bacteriocin activity สูงสุดคือ 800 AU/ml.

ข้อเสนอแนะ

นำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) ที่แยกบริสุทธิ์แล้วไปทดสอบด้วยเทคนิคทาง 16S RNA เพื่อให้ทราบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด และศึกษาคุณสมบัติการใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว โดยการผสมแบคทีเรียไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) ลงในอาหารปลากะพงขาว เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค และภูมิคุ้มกันวิทยาของปลากะพงขาวต่อไป

การนำผลการวิจัยไปประโยชน์

เชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเพื่อใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว รวมทั้งนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่และสามารถนำไปศึกษาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ทางเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพดล ศุกระกาญจน์ และอาจารย์ณัฐพล เมฆแดง สำหรับการตรวจสอบความถูกต้อง ข้อควรปรับปรุงและข้อเสนอแนะเพื่อปรับแก้งานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และศูนย์วิจัยสุภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และผู้ช่วยศาสตราจารย์นพดล ศุกระกาญจน์ สำหรับการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำหรับการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคคลากรสาขาวิชาชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำหรับสถานที่ทำการศึกษา

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่สนับสนุนทุนวิจัย หมวดเงินรายได้ประจำปี 2553

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ นักศึกษา ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

นฤมล ทองงาม, อรนงค์ พริ้งศุลกะ และณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย. (2552). “การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคทิริโอซินจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทย”. ใน **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35,** (หน้า 1-7). วันที่ 15 ตุลาคม 2552 กรุงเทพ ฯ

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ, บดินทร์ อิทธิพงษ์, สิริรัตน์ จงฤทธิพร และอัธยา กังสุวรรณ. (2547). “การประยุกต์ใช้แลคติกแบคทีเรียเพื่อลดการปนเปื้อนของ *E.Coli* ในกุ้งกุลาดำ”. ใน **การสัมมนาวิชาการประมงประจำปี 2547,** วันที่ 7-9 กรกฎาคม 2547.

มงคล ปัญญารัตน์. (2552). **การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *Escherichia coli* บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกร.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุปราณี ชินบุตร เต็มดวง สมศิริ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. (2545). **“ยาและสารเคมีเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ”.** สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ. กรมประมง.

สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. (2548). **แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer*.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2550). “การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้”. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 23 (2).