ผลของการเสริม *Bacillus licheniformis* ในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การใช้อาหาร และแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลแดง

Effect of Different Levels of *Bacillus licheniformis* Supplements in Diets on Growth Performance, Feed Utilization and Intestinal Bacteria of Hybrid Red Tilapia

คณาธิป พรหมนวล[1*] และสุภฎา คีรีรัฐนิคม[2]
Kanathip Promnuan[1*] and Suphada Kiriratnikom[2]

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการเสริม *B. licheniformis* ในความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 10^5 10^6 10^7 และ 10^8 CFU/กิโลกรัมอาหารในอาหารปลานิลแดง และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมโปรไบโอติก พบว่าปลานิลแดงหลังจากได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร มีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหารสูงกว่าอาหารทดลองอื่นๆ จากการตรวจสอบประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาด้วยเทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) พบว่า การเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มต่างๆ สามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อประชากรแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ และการเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหาร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเสริม *B. licheniformis* ลงในอาหารปลานิลแดงมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาในการเพาะเลี้ยงได้

คำสำคัญ: โปรไบโอติก ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การใช้อาหาร แบคทีเรียในลำไส้ ปลานิลแดง

Abstract

Determination of optimal levels of *B. licheniformis* supplemented in hybrid red tilapia diet at 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 CFU/g and compared to the control diet was investigated. The results found that growth performance and feed utilization after the fish fed supplemented *B. licheniformis* diet at a concentration level of 10^5 CFU/g was better than other concentrations. The fish intestine microbial population was determined by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) technique founded the supplementation *B. licheniformis* at different concentrations can result in changes in the microflora population in intestinal fish *B. licheniformis* at a concentration level of 10^5 CFU/g promoted growth performance and feed utilization. This suggests that supplementation *B. licheniformis* in hybrid red tilapia fish feed promotes growth of the fish in the aquaculture industry.

Keywords: Probiotics, Growth Performance, Feed Utilization, Intestinal Bacteria, Hybrid Red Tilapia

[1] นิสิตปริญญาโท, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210
[2] ผศ.ดร., สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210
[1] Graduate Student, Master Degree, Program in Biotechnology, Faculty of Science Thaksin University, Phatthalung, 93210
[2] Asst. Prof. Dr., Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Science Thaksin University, Phatthalung, 93210
[*] Corresponding author: E-mail address: kanathip.promnuan@gmail.com

บทนำ

ปลานิลแดงจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่ง ของประเทศไทย ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลาในกลุ่มปลานิลในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณ 203,737 ตัน คิดเป็น มูลค่า 5,883,668,000 บาท ไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาในกลุ่มปลานิลในปี พ.ศ. 2549 ประมาณ 11,005 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 620 ล้านบาท การเพาะเลี้ยงปลานิล และปลานิลแดงในไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจากตลาดปลาในกลุ่มปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ [1] ทำให้มีการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของสัตว์น้ำหลายชนิด มีการปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง และการเสริมโปรไบโอติกเป็นทางเลือกหนึ่งที่ยอมรับและเชื่อถืออย่างแพร่หลาย รวมทั้งสกุลสกุลแบซิลัสถูกใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์น้ำและปรับปรุงคุณภาพน้ำ โปรไบโอติกมีประโยชน์ต่อสุขภาพผ่านกลไกต่างๆ คือ 1) แข่งขันยึดเกาะภายในเหงือกและทางเดินอาหารกับเชื้อก่อโรค 2) ผลิตสารยับยั้ง 3) การปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหาร 4) การให้สารอาหาร 5) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และ 6) ปรับปรุงคุณภาพน้ำ [2] อีกทั้งสกุลแบซิลัสเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ เช่น ความร้อนสูง พีเอชต่ำ ความแห้งแล้ง และภาวะขาดสารอาหาร [3] Meidong *et al*. [4] เสริมแบซิลัสลงในอาหารปลาโมง (*Pangasius bocourti*) ส่งผลให้มีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหารที่ดีขึ้น และการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของปลาโมง Aly *et al*. [5] เสริม *B. subtilis* ลงในอาหารปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งนำไปสู่การเจริญเติบโตที่ดีขึ้นของปลานิล และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน คือ กิจกรรมของนิวโทรฟิลและไลโซไซม์ และการเสริม *B. pumilus* ร่วมกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า (Organic Green™) หรือ *B. amyloliquefaciens* ช่วยปรับปรุงการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และเพิ่มภูมิคุ้มกันของปลานิลให้ดียิ่งขึ้น [6-7] ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาระดับที่เหมาะสมของ *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการพัฒนาการเจริญเติบโตและการใช้อาหารของปลานิลแดง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

1. ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแบซิลลัสต่ออัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ในปลานิลแดง

1.1 การเตรียมแบคทีเรียแบซิลลัส

ใช้แบคทีเรียจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) *B. licheniformis* TISTR1109 เลี้ยงในอาหาร TSA เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน

1.2 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) ประกอบด้วยการศึกษาผลของ *B. licheniformis* ในระดับปริมาณเชื้อ 10^5 10^6 10^7 และ 10^8 CFU/กิโลกรัมอาหาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมจุลินทรีย์ รวมทั้งสิ้น 5 ชุดการทดลอง ดำเนินการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

1.3 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลานิลแดงแปลงเพศ ขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร และน้ำหนัก 0.8-1.2 กรัม จำนวน 2,000 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพัทลุงมาเลี้ยงในบ่อคอนกรีตขนาดความจุ 3,000 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง เพื่อปรับสภาพปลาให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม และทำการสุ่มปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 20 ตัว ลงเลี้ยงในตู้ทดลอง ขนาดความจุ 100 ลิตร โดยเลี้ยงปลาทดลองที่ระดับน้ำ 80 ลิตร จำนวน 15 ตู้ ติดตั้งระบบให้อากาศ และระบบเปลี่ยนถ่ายน้ำด้วยระบบเติมน้ำแบบน้ำไหลผ่านตลอด

1.4 การเตรียมเซลล์จุลินทรีย์ สำหรับใช้ผสมอาหารทดลอง

เตรียมเซลล์เพื่อใช้ผสมอาหารทดลอง ตามวิธีการของ Essa *et al*. [8] โดยเลี้ยงหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *B. licheniformis* เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่ปราศจากเชื้อจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขยายปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 10,000 rpm 15 นาที ล้างเซลล์ที่แยกได้ 2 ครั้งด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7 และนำมาใช้ผสมในอาหารทดลองแต่ละสูตร

1.5 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองโดยใช้สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงที่มีปริมาณโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 8-10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กากปาล์ม 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัตถุดิบโปรตีนทดแทนปลาป่นสำหรับใช้ในสูตรอาหารปลานิล [9] ทำอาหารทดลองตามขั้นตอนการผลิตอาหารปลาของ Kiriratnikom, S. and Kiriratnikom, A. [10] อบแห้งอาหารแล้วนำอาหารสำหรับเลี้ยงปลาในแต่ละชุดการทดลองมาผสมเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิด ตามชุดการทดลองโดยฉีดพ่นเซลล์จุลินทรีย์ในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ลงบนอาหารทดลองในปริมาณที่มีเซลล์จุลินทรีย์ 10^6 CFU/g โดยการวัดความขุ่นของสารแขวนลอยเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ของ OD กับจำนวนเซลล์ และเตรียมอาหารผสมจุลินทรีย์ดังกล่าวในปริมาณที่ใช้หมดใน 24 ชั่วโมงส่วนอาหารทดลองชุดควบคุมเตรียมโดยผสมอาหารด้วยสารละลาย PBS ที่ไม่มีจุลินทรีย์ ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/w) อาหารทดลอง เลี้ยงปลานิลแดงด้วยอาหารในแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารวันละ 3 เวลา คือ 08.00-09.00 น. 12.00-13.00 น. และ 16.00-17.00 น. โดยให้อาหารในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์

2. การเก็บข้อมูล

2.1 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทั้งหมดในแต่ละตู้เมื่อเริ่มทดลอง ทุก 2 สัปดาห์ของการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ นับจำนวนปลาทุกครั้งที่มีการชั่งน้ำหนัก บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้ทำการตรวจสอบวัดการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลองด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ตามวิธีการ Aly *et al.* [6] ได้แก่ อัตราการรอดตาย (Survival Rate) การวัดน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain) อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed Conversion Rate) ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed Conversion Efficiency)

2.2 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) และค่าการสะสมโปรตีน (Protein Retention)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำปลานิลแดง จากแต่ละชุดการทดลอง สลบให้หมดความรู้สึกด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (Clove Oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาที และนำวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน และปริมาณเถ้า ตามวิธีการของ AOAC. [11] นำผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา คำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) และค่าการสะสมโปรตีน (Protein Retention) ตามวิธีการของ Halver and Hardy [12]

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบ One Way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. การตรวจสอบกลุ่มประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บตัวอย่างลำไส้ของปลา จากแต่ละชุดการทดลอง สกัด Genomic DNA ดัดแปลงวิธีจาก Burrell *et al*. [13] เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณ 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR ประกอบด้วย Primer 27F และ Primer 1525R จากนั้นนำไปแยกแถบ DNA ด้วย Gel Electrophoresis ที่ 60 volt ที่ 60 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบแถบ DNA ที่แยกได้ จากนั้นเพิ่มปริมาณ 16S rDNA บริเวณ V3 โดยใช้เทคนิค PCR ประกอบด้วย Primer 357F และ Primer 518R และนำศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) จากนั้นนำแถบที่แสดงลักษณะสำคัญในการจัดจำแนกไปตรวจสอบลำดับเบส เทียบกับ Gene Bank เพื่อยืนยันกลุ่มแบคทีเรียในลำไส้ของปลาที่ได้รับอาหารแต่ละชุดการทดลอง

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

การเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีในตัวปลานิลแดง

การเสริม *B. licheniformis* ลงในอาหารปลานิลแดงในระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มน้ำหนักปลานิลแดงได้มากกว่าชุดควบคุมร้อยละ 20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ และปลานิลแดงในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^7 และ 10^8 CFU/กิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มน้ำหนักให้ปลานิลแดงได้ร้อยละ 8 และ 5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามการเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/กิโลกรัมอาหาร ทำให้ปลานิลแดงมีน้ำหนักลดลงร้อยละ 1.2 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของปลานิลแดงแปรผันตรงกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละวัน (ตารางที่ 1) ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถผลิตสารอาหารที่จำเป็นบางอย่าง เช่น กรดอะมิโน วิตามินเค และ วิตามินบี 12 [14] เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น และมีส่วนช่วยในกระบวนการย่อยอาหาร โดยการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน เป็นน้ำตาล กรดไขมัน และกรดอะมิโน [15] ทั้งนี้ปลานิลแดงที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตดีที่สุด

ในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในแต่ละชุดการทดลองซึ่งกลุ่มปลานิลแดงที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหารมีประสิทธิภาพการใช้อาหารมากกว่าชุดควบคุมร้อยละ 16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับประสิทธิภาพการใช้โปรตีนที่มากกว่าชุดควบคุม ร้อยละ 16 ซึ่งทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อน้อยกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเป็นสัดส่วนระหว่างปริมาณอาหารที่ได้รับต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลานิลแดง ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของอาหารที่ปลานิลได้รับ จากผลการทดลองอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร ทำให้น้ำหนักของปลานิลเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ และสอดคล้องกับประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและค่าการสะสมโปรตีน อย่างไรก็ตาม ปลานิลแดงกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^6 10^7 และ 10^8 CFU/กิโลกรัมอาหาร มีประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลงร้อยละ 2 6 และ 10 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ทำให้ส่งผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม ในด้านองค์ประกอบทางเคมีในตัวปลานิลแดง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร มีปริมาณโปรตีนในตัวปลาไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่สูงกว่าปริมาณโปรตีนในตัวปลาที่ได้รับ

อาหารเสริม *B. licheniformis* 10^7 และ 10^8 CFU/กิโลกรัมอาหาร (ตารางที่ 3) ทั้งนี้การเสริม *B. licheniformis* 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร เป็นระดับที่เหมาะสม ซึ่งโปรไบโอติกส่วนใหญ่มีคุณสมบัติก่อให้เกิดการปรับปรุงสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ ทำให้เจ้าบ้านมีการย่อยสารอาหารดีขึ้น การดูดซึมที่มีประสิทธิภาพ และเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์มากขึ้น [16] และนอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลสูงเป็นโมเลกุลเปปไทด์และกรดอะมิโนที่เป็นน้ำหนักต่ำ [17] ซึ่งส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพการใช้งานของโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตของปลาและส่งผลให้การใช้โปรตีนในอาหารปลามีประสิทธิภาพมากขึ้น

การตรวจสอบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารในปลานิลแดง

จากผลการตรวจสอบประชากรแบคทีเรียในปลานิลแดงที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้นต่างๆ จากภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียประจำถิ่นของปลานิลแดงในทุกชุดการทดลอง คือ *Enterococcus* sp. และพบกลุ่มของ *Bacillus* sp. ในลำไส้ปลานิลทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ยกเว้นความเข้มข้น 10^6 CFU/กิโลกรัมอาหาร นอกจากนั้นการเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 CFU/กิโลกรัมอาหาร ลงในอาหารพบว่า ทำให้แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* sp. ลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม อีกทั้งการเสริม B. *licheniformis* ในระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหารไม่พบกลุ่ม *Lachnospiraceae* sp. และ *Chitinivibrio* sp. และการเสริม *B. licheniformis* ทุกระดับความเข้มข้น ส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่ม *Escherichia* sp. หายไปจากลำไส้ของปลานิลในทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ดังกล่าวทั้งหมด อาจส่งผลกับการเจริญเติบโตของปลานิลแดง โดยมีรายงานว่า จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญในด้านโภชนาการและภูมิคุ้มกัน ตามการรายงานของ Nayak [18] ได้รายงานว่าจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญในการทำงานทางโภชนาการที่สำคัญ ได้แก่ การย่อยอาหาร การใช้ประโยชน์จากสารอาหาร และการผลิตกรดอะมิโนที่จำเพาะ เอนไซม์ กรดไขมันสายสั้น วิตามิน และแร่ธาตุ และการเสริม B. *subtilis* C-3102 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (10^5 CFU/g) ในอาหารเปลี่ยนแปลงกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลานิลแดง ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น (IL-1b TGF-β และ TNF-α) [19] ดังนั้นการเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำส่งผลต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลได้ดีกว่าการเสริมในระดับที่สูงขึ้น

สรุป

จากการศึกษาปลานิลแดงหลังจากที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหาร มีผลการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากกว่า ระดับอื่นๆ ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นๆ ให้ผลในด้านการเจริญเติบโตได้ดีกว่า ดังนั้น การเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/กิโลกรัมอาหารลงในอาหารปลานิลแดงสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลานิลแดง และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประเภท ทุนวิจัยร่วมบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

อาหารเสริมโปรไบโอติก (CFU/กิโลกรัมอาหาร)	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1. Control (PBS buffer)	3.61 ± 0.010^{a}	53.02 ± 3.55^{a}	1367.32 ± 100.53^{a}	4.79 ± 0.12^{ab}	95.00 ± 5.00^{a}
2. *B. licheniformis* 10^5	3.61 ± 0.010^{a}	63.01 ± 3.69^{b}	1643.95 ± 104.41^{b}	5.10 ± 0.11^{b}	96.67 ± 2.89^{a}
3. *B. licheniformis* 10^6	3.61 ± 0.010^{a}	52.44 ± 7.50^{a}	1351.11 ± 206.47^{a}	4.76 ± 0.26^{a}	96.67 ± 5.77^{a}
4. *B. licheniformis* 10^7	3.61 ± 0.008^{a}	56.91 ± 5.31^{ab}	1477.43 ± 149.66^{ab}	4.92 ± 0.17^{ab}	100.00 ± 0.00^{a}
5. *B. licheniformis* 10^8	3.67 ± 0.074^{a}	56.19 ± 3.27^{ab}	1434.53 ± 113.73^{ab}	4.87 ± 0.13^{ab}	98.33 ± 2.89^{a}

ตัวอักษร a b และc มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ตัวอักษร ab ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง a และ b

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์จากอาหารเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้นต่างกันของปลานิลแดงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

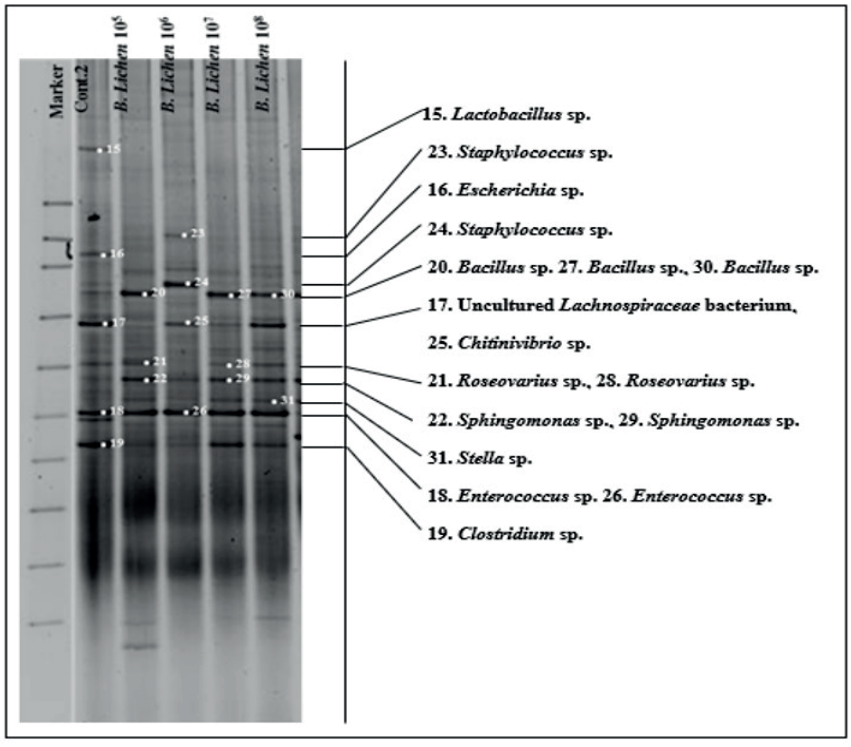
อาหารเสริมโปรไบโอติก (CFU/กิโลกรัมอาหาร)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	ค่าการสะสมโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	ค่าการสะสมไขมัน (เปอร์เซ็นต์)
1. Control (PBS buffer)	1.59 ± 0.05^{ab}	0.63 ± 0.02^{a}	2.10 ± 0.07^{a}	29.53 ± 0.94^{bc}	68.69 ± 2.19^{b}
2. *B. licheniformis* 10^5	1.37 ± 0.09^{a}	0.73 ± 0.05^{b}	2.45 ± 0.16^{b}	36.85 ± 2.38^{d}	63.30 ± 4.18^{b}
3. *B. licheniformis* 10^6	1.61 ± 0.15^{ab}	0.62 ± 0.06^{a}	2.09 ± 0.18^{a}	30.85 ± 2.73^{c}	49.83 ± 4.61^{a}
4. *B. licheniformis* 10^7	1.71 ± 0.17^{b}	0.59 ± 0.06^{a}	1.97 ± 0.20^{a}	25.78 ± 2.63^{ab}	60.47 ± 6.18^{b}
5. *B. licheniformis* 10^8	1.78 ± 0.17^{b}	0.57 ± 0.06^{a}	1.90 ± 0.19^{a}	22.70 ± 2.31^{a}	60.80 ± 6.14^{b}

ตัวอักษรa b และc มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ตัวอักษร ab ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง a และ b ตัวอักษร bc ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง b และ c

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลานิลแดงหลังจากได้รับอาหารเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้นต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

อาหารเสริมโปรไบโอติก (CFU/กิโลกรัมอาหาร)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)		
		โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
1. Control (PBS buffer)	73.29 ± 1.29^{a}	52.83 ± 1.78^{abc}	23.226 ± 5.14^{a}	15.88 ± 1.70^{ab}
2. *B. licheniformis* 10^5	73.99 ± 0.89^{a}	57.88 ± 1.79^{c}	19.188 ± 7.06^{a}	13.33 ± 1.15^{ab}
3. *B. licheniformis* 10^6	74.08 ± 0.57^{a}	57.09 ± 4.61^{bc}	18.000 ± 1.32^{a}	13.32 ± 3.66^{ab}
4. *B. licheniformis* 10^7	72.66 ± 2.08^{a}	48.17 ± 5.23^{ab}	21.341 ± 3.14^{a}	12.11 ± 1.60^{a}
5. *B. licheniformis* 10^8	74.14 ± 1.93^{a}	47.00 ± 7.77^{a}	23.533 ± 0.65^{a}	16.65 ± 1.42^{b}

ตัวอักษร a, b และc มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ตัวอักษร ab ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง a และ b ตัวอักษร bc ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง b และ c ตัวอักษร abc ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง a, b และ c



ภาพที่ 1 ความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค DGGE จากตัวอย่างลำไส้ปลานิลแดงที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

[1] Pongthana, N. (2010). **Factors Cultured Tilapia and Red Tilapia Success.** Extension Paper No. 2/2010 Pathumthani Fisheries Test and Research Center Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute 1-47.

[2] Middlemiss, K.L., Daniels, C.L., Urbina, M.A. and Wilson, R.W. (2015). "Combined Effects of UV Irradiation, Ozonation, and the Probiotic *Bacillu*s spp. on Growth, Survival and General Fitness in European Lobster (*Homarus gammarus*)", **Aquaculture**. 444, 99-107.

[3] Lee, S., Lee, J., Jin, Y.I., Jeong, J.C., Chang, Y.H., Lee, Y., Jeong, Y. and Kim, M. (2017). "Probiotic Characteristics of Bacillus Strains Isolated from Korean Traditional Soy Sauce", **LWT - Food Science and Technology**. 79, 518-524.

[4] Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K. and Tongpim, S. (2018). "Evaluation of Probiotic *Bacillus aerius* B81e Isolated from Healthy Hybrid Catfish on Growth, Disease Resistance and Innate Immunity of Pla-Mong *Pangasius bocourti*", **Fish & Shellfish Immunology**. 73, 1-10.

[5] Aly, S.M., Abdel-Galil, A.Y., Abdel-Aziz, G.A. and 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 & Shellfish Immunology**. 25(1), 128-136.

[6] Aly, S.M., Mohamed, M.F. and John, G. (2008). "Effect of Probiotics on the Survival, Growth and Challenge Infection in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*)", **Aquaculture Research**. 39(6), 647-656.

[7] Ridha, M.T. and Azad, I.S. (2012). "Preliminary Evaluation of Growth Performance and Immune Response of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Supplemented with Two Putative Probiotic Bacteria", **Aquaculture Research**. 43(6), 843-852.

[8] Essa, M.A., EL- Serafy, S.S., El-Ezabi, M.M., Daboor, S.M., Esmael, N.A. and Lall, S.P. (2010). "Effect of Different Dietary Probiotics on Growth, Feed Utilization and Digestive Enzymes Activities of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*", **Journal of the Arabian Aquaculture Society**. 5, 143-162.

[9] Sukkasem, N. and Ruangsri, J. (2007). "Effects of Plam Kernel Cake (PKC) on Growth Performance, Blood Components and Liver Histopathology of Sex Reversed Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*)", **Songklanakarin Journal**. 29, 1283-1299.

[10] Kiriratnikom, S. and Kiriratnikom, A. (2012). "Growth, Feed Utilization, Survival and Body Composition of Fingerlings of Slender Walking catfish, *Clarias nieuhofii*, Fed Diets Containing Different Protein Levels", **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 34, 37-43.

[11] AOAC. (1990). **Official Method of Analysis AOAC**. 15th ed. Washington, DC: The Association of official Analytical Chemists.

[12] Halver, J.E. and Hardy, R.W. (2002). **Fish Nutrition,** 3rd ed. New York: Academic Press.

[13] Burrell, P.C., Keller, J. and Blackall, L.L. (1998). "Microbiology of a Nitrite-Oxidizing Bioreactor", **Applied and Environmental Microbiology**. 64, 1878-1883.

[14] Sanders, M.E., Morelli, L. and Tompkins, T.A. (2003). "Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*", **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 2, 101-110.

[15] Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (1993). ***Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics**. (1sted). Washington, DC: American Society of Microbiology.

[16] Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R. and Lésel, R. (2002). "Effect of Live Yeast Incorporation in Compound Diet on Digestive Enzyme Activity in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Larvae", **Aquaculture**. 204, 113-123.

[17] De Schrijver, R. and Ollevier, F. (2000). "Protein Digestion in Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Effects of Dietary Administration of *Vibrio proteolyticus*", **Aquaculture**. 186, 107-116.

[18] Nayak, S.K. (2010). "Role of Gastrointestinal Microbiota in Fish", **Aquaculture Research**. 41, 1553-1573.

[19] He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z. and Yao, B. (2013). "Effects of Dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the Production, Intestinal Cytokine Expression and Autochthonous Bacteria of Hybrid Tilapia *Oreochromis niloticus* ×*Oreochromis aureus*", **Aquaculture**. 412-413, 125-130.