Prawarun Agr. J. Volume 17(1) 2020, 63-74

บทความวิจัย

Received: May 1, 2019; Accepted: May 29, 2020

การใช้จุลินทรีย์จีไบโอติก เสริมอาหารปลานิล เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน

ชาญวิทย์ สุวรรณ์ * และ ชนกันต์ จิตมนัส

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์จีไบโอติกซึ่งมีจุลินทรีย์หลัก คือ *Bacillus subtilis* เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันปลานิลในบ่อดิน จังหวัดเชียงใหม่ โดยสุ่มปล่อยปลานิล (น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 18.41 กรัม/ตัว) จำนวน 40 ตัว/กระชัง ลงในกระชังขนาด 3×3×1 ม. ความหนาแน่น 4.4 ตัว/ลบ.ม. จำนวน 12 กระชัง โดยให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม), 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ให้อาหาร 3 % ของน้ำหนักตัว เลี้ยงนาน 60 วัน ผลการทดลอง พบว่า น้ำหนักสุดท้ายและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (P>0.05) ปลาที่ได้รับโปรไบโอติกผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราแลกเนื้อดีที่สุด ส่วนอัตราการรอดตาย พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ผลของโปรไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 20, 40 และ 60 วัน หลังจากให้อาหารทดลอง ปลานิลมีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวและกิจกรรมไลโซไซม์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่า Nitro Blue Tetrazolium (NBT) ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. หลังให้อาหาร 60 วัน สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากการทดลองสรุปได้ว่า ควรใช้จีไบโอติกผสมอาหารความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. โดยส่งผลในการส่งเสริมภูมิคุ้มกันปลานิลให้ดีขึ้นได้

คำสำคัญ: โปรไบโอติก ปลานิล การเจริญเติบโต และ ภูมิคุ้มกัน

*Corresponding author: E-mail: chanagun1@hotmail.com

Prawarun Agr. J. Volume 17(1) 2020, 63-74

The Use of G Biotic Microorganism supplements in Tilapia Feeds on Growth Performance and Immunity

Chanwit Suwan* **and Chanagun Chitmanat**

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University,

Sansai, Chiang Mai, 50290, Thailand

Abstract

The use of G biotic *Bacillus subtilis* for Nile tilapia was conducted to examine its effects on the growth performances and immunity. 480 (initial average weight of 18.41 grams) tilapia were randomly distributed into (9 m3) cages located in an earthen pond with the density of 4.4 fish/m3; total 12 cages. The 1×10^{7} CFU/g of *Bacillus subtilis* with the concentration of 0, 2, 5 and 10 ml/kg. They were laid out in completely randomized design with 3 replications. Fish were fed experimental diets at a rate of 3% biomass per day for 60 days. The results showed probiotic supplementary diet group had slightly affected on weight gain final weight and the specific growth rate (P> 0.05). The concentration of 2 ml/kg was the best treatment in increasing final weight, specific growth rate and feed conversion ratio (P>0.05). Survival rate was not significantly different (P> 0.05). The results of probiotics on immune system were evaluated after 20, 40 and 60 days of feeding experimental diets. Phagocytosis and Serum lysozyme activity enhanced significantly (P<0.05). NBT values after 60 days increased significantly in fish fed 2 ml/kg when compared with other groups (P < 0.05). It was recommended that this G biotic with the concentration 2 ml/kg supplementation can be used as an alternative method for growth performances and immunity improvement in Nile tilapia.

Keywords: Probiotics, Nile tilapia, Growth performance and Immunity

*Corresponding author: E-mail: chanagun1@hotmail.com

บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลานิลของไทยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทำให้เกิดความมั่นคงทางอาหารและสร้างงานสร้างอาชีพ ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลานิลในปี พ.ศ. 2560 มีปริมาณ 185,902 ตัน ปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ของประเทศไทยในปี 2560 ปริมาณ 5,817.8 ตัน คิดเป็นมูลค่า 344.7 ล้านบาท (เกวลิน, 2560) การเพาะเลี้ยงปลานิลในไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจาก ตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หากมีการพัฒนาการเลี้ยงให้ได้มาตรฐานและปลอดภัยต่อการบริโภค

ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีฟาร์มเลี้ยงปลานิลทั้งหมด 221,320 ฟาร์ม โดยมีจำนวนฟาร์มเลี้ยงปลานิลมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 126,260 ฟาร์ม (เกวลิน, 2556) อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ปัจจุบันปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและการขาดแคลนน้ำ จะขับเคลื่อนให้เกษตรกรและผู้มีส่วนได้ส่วนเสียปรับตัว ในขณะที่ลูกค้ามีความต้องการผลผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมทั้งผู้ผลิตต้องมีความรับผิดชอบต่อสิ่งแวดล้อมและสังคมด้วย การผลิตที่มีการใช้ยาและสารเคมีอาจจะไม่ใช่สิ่งที่ผู้บริโภคต้องการ

โปรไบโอติก (Probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตถูกนำใช้ผสมในอาหารแล้วส่งผลดีต่อสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำโตเร็วและมีความต้านทานโรคสูงขึ้น การที่สัตว์น้ำต้องสัมผัสกับจุลินทรีย์ในน้ำตลอดเวลา ซึ่งมีทั้งจุลินทรีย์ที่ดีและไม่ดี การรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือโปรไบโอติกให้แก่สัตว์น้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น จุลินทรีย์โปรโบโอติกจะแย่งพื้นที่ยึดเกาะทั้งบนและในตัวสัตว์น้ำ (Gismondo *et al*., 1999)

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่แสดงให้เห็นผลดีต่อการเจริญเติบโตและการสร้างภูมิคุ้มกันปลาจำนวนมาก (ชาญวิทย์ และชนกันต์, 2560) แต่ผลยืนยันทางวิชาการของการใช้ในฟาร์มปลานิลมีน้อย การใช้จุลินทรีย์ในปริมาณและเวลาที่ไม่เหมาะสมอาจจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตทำให้ไม่สามารถแข่งขันทางการค้าได้ อย่างไรก็ตาม เกษตรกรจำนวนมากยังคงยึดติดกับแนวปฏิบัติแบบเดิม ๆ การให้ความรู้ อบรมและจัดหาบ่อสาธิตสำหรับเกษตรกรจึงเป็นสิ่งจำเป็น งานวิจัยนี้ต้องการสร้างทางเลือกให้กับเกษตรกร โดยการใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดการใช้ยาและสารเคมี ลดการใช้น้ำในการเปลี่ยนถ่าย ซึ่งเป็นการลดการใช้พลังงานไปด้วย ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ G Biotic ซึ่งมีจุลินทรีย์หลัก คือ *Bacillus subtilis* มีการใช้งานในฟาร์มกุ้งทะเลอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่นำมาใช้ในฟาร์มปลานิล ทางผู้วิจัย จึงต้องการนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาทดลองใช้เพิ่มเติมในฟาร์มปลานิลเพื่อให้ปลาแข็งแรง โตเร็วและทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศในเขตภาคเหนือ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design : CRD) เลี้ยงปลานิล ให้อาหารแตกต่างกัน 4 ชุดการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก 5 มล./อาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กิโลกรัม

2. วิธีการทดลอง

2.1 อาหารทดลอง ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลานิลที่เกษตรกรนิยมใช้ ผสมกับ G biotic ที่ปริมาณความเข้มข้น 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ผึ่งลมให้แห้งสนิท ก่อนเก็บไว้ในที่ร่มจนกว่าจะนำไปใช้ เตรียมอาหารใหม่ทุก 2 วัน

2.2 ปล่อยปลานิลขนาดเริ่มต้นตัวละ 18.41 ±1.02 กรัม/ตัว ความหนาแน่น 4.4 ตัว/ตร.ม. ให้อาหาร 3% ของน้ำหนักปลา รวม 2 เวลา เช้าและเย็น ตรวจสอบการมีชีวิตของโปรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์ และปรับปริมาณอาหาร ตรวจวัดคุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์

2.3 การบันทึกผล

2.3.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองชั่งน้ำหนักปลาทั้งหมด จากนั้นหาค่าเฉลี่ยเพื่อไปประเมินค่า น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และนับจำนวนปลาที่เหลือเพื่อหาอัตรารอดตาย

2.3.2 ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis activity) ด้วยวิธีการของ Yoshida and Kitao (1991) โดยการใช้เม็ดเลือดขาว 200 µL (2 x 10^6 cells/mL) หยดลงบนกระจกปิดสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดด้วย RPMI 1640 จากนั้นเติมเม็ด latex beads (Sigma) 2 x 10^7 of beads mL^{-1} จำนวน 200 µL ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จึงล้างออก แล้วตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล ย้อมสีด้วย Diff-Quick staining dye (Sigma) 10 วินาที ล้างออกด้วย PBS (pH 7.4) ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วสุ่มนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 300 เซลล์ คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอม

2.3.3 กิจกรรมไลโซไซม์

สุ่มเก็บเลือดปลาทุก 20 วัน เพื่อตรวจวัดไลโซไซม์ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก R.M. Parry et al, (1965) โดยใช้ซีรั่มปลาจำนวน 25 µL ใส่ลงในสารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) 175 µL (0.3 mg/mL ใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 5.8) วัดการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น OD_{540nm} ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง microplate reader

2.3.4 การศึกษา respiratory burst โดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium)

ทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (Respiratory burst) ทดสอบตามวิธีการของ Secombes (1990) โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว 175 µL (6 x 10^6 cells/mL^{-1}) ใน PBS เติมลงในถาดหลุม 96-well microtiter เติม Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 25 µL (1 mg/mL) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งสารละลายส่วนใสด้านบน ล้างด้วยเมธานอล 125 µL เทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วล้างด้วยเมธานอล 70% หลุมละ 125 µL จำนวนสองครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติม 2N KOH จำนวน 125 µL และ DMSO 150 µL จากนั้นไปวัด $OD_{655\ nm}$

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way-ANOVA) ของค่าการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย

ของปลานิล และค่าคุณภาพน้ำ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป และหาความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธี Tukey's HSD test

ผลการวิจัย

1. ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตรารอดตาย

การทดลองเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูป ซึ่งมีจุลินทรีย์หลักคือ *Bacillus subtillis* ในปริมาณความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ในอัตราการให้อาหาร 3% biomass พบว่า การเจริญเติบโตดีขึ้น โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (P>0.05)

น้ำหนักสุดท้ายของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กิโลกรัม สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) ดังแสดงใน Table 1

อัตราแลกเนื้อของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงใน Table 1

อัตรารอดตายของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกในอัตราส่วนที่ต่างกัน พบว่า อัตราการรอดตายของปลานิลแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงในTable 1

2. ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว พบว่า ในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3% ของน้ำหนักตัว หลังได้รับโปรไบโอติก 20 วัน มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง (P>0.05) ที่ปลาอายุ 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 5 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงดัง Fig. 1

3. ผลของโปรไบโอติกต่อกิจกรรมไลโซไซม์

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อกิจกรรมไลโซไซม์ในปลานิล พบว่า กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว ที่อายุปลา 20 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. กิจกรรมไลโซไซม์เฉลี่ยมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 0 และ 5 มล./อาหาร 1 กก. แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) กับชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. ที่อายุปลา 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. กิจกรรมไลโซไซม์เฉลี่ยมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 0 และ 2 มล./อาหาร 1 กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. กิจกรรมไลโซไซม์เฉลี่ยมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงดัง Fig. 2

4. ผลของโปรไบโอติกต่อ respiratory burst โดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium)

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ในปลานิล พบว่า ค่า NBT ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว ที่อายุปลา 20 และ 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงดัง Fig. 3

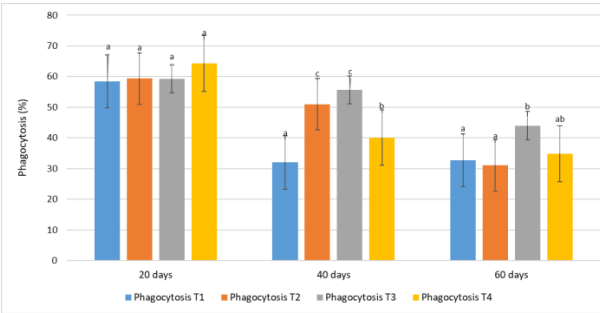

Fig. 1 Percentage of phagocytosis. Data are presented as mean ± S.E of three replications. Different letters are significantly different (p < 0.05) among treatments.

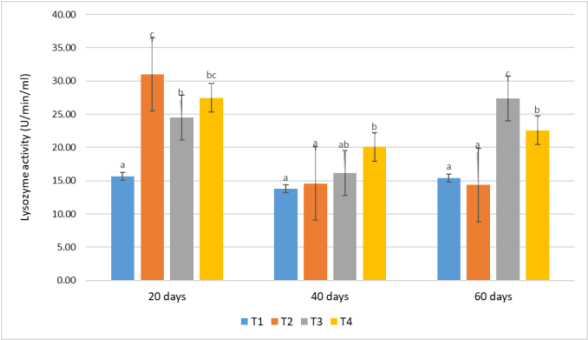

Fig. 2 Lysozyme activity. Data are presented as mean ± S.E of three replications. Different letters are significantly different (p < 0.05) among treatments.

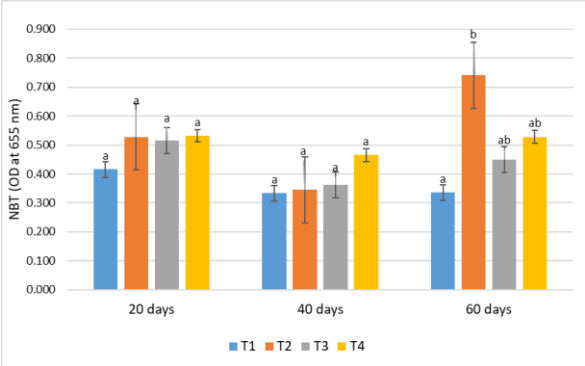

Fig. 3 Nitroblue Tetrazolium (NBT) Data are presented as mean ± S.E of three replications. Different letters are significantly different (p < 0.05) among treatments.

Table 1 Growth performances of tilapia; initial weight, final weight, weight gain, average daily gain (ADG), feed conversion ratio (FCR) and survival rate (%) (mean±SE)

Growth Performances	Treatments			
	T1 – control	T2 –adding 2 ml kg^{-1}	T3 –adding 5 ml kg^{-1}	T4 –adding 10 ml kg^{-1}
Initial weight (g $fish^{-1}$)	19.89±0.86	18.07±0.32	18.08±0.51	17.58±1.72
Final weight (g $fish^{-1}$)	107.74±2.95[a]	111.53±0.98[b]	108.04±9.61[a]	107.40±1.77[a]
Weight gain (g $fish^{-1}$)	87.85±2.32	93.46±1.25	89.95±9.94	89.82±1.88
ADG (g day^{-1})	1.46±0.04	1.56±0.02	1.50±0.17	1.50±0.03
FCR	0.91±0.01	0.85±0.04	0.87±0.1	0.86±0.03
Survival rate (%)	97.50±2.5	98.33±2.89	100	99.17±1.44

Data are presented as mean ± SE of three replicates Values in each row with different superscripts show significantly difference among treatments at $p \leq 0.05$ using ANOVA followed by Tukey's HSD test.

วิจารณ์ผลการวิจัยผลการวิจัย

จากการทดลองเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป เลี้ยงปลานิล 60 วัน พบว่า การเจริญเติบโตดีขึ้น โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (P>0.05) สอดคล้องกับการศึกษาของ เมธาวี และคณะ (2560) ที่ศึกษาพบว่า การเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ในอาหาร 10^9 CFU/กรัม โดยใช้โปรไบโอติกผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปอัตราส่วนแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (P>0.05) คณาธิปและคณะ (2558) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ในอาหาร 10^6 CFU/กรัม พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อาจเนื่องจากปริมาณโปรไบโอติกที่ผสมในอาหาร ระยะเวลาหรือวิธีการให้ไม่เหมาะสมที่จะเสริมการเจริญเติบโตจำเพาะของปลา

อย่างไรก็ตามน้ำหนักสุดท้ายของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Liu et al. (2012) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* E20 ในปลาเก๋า ขนาดเฉลี่ยเริ่มต้น 2.8 กรัม ผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 10^4, 10^6 และ 10^8 CFU/กรัม เลี้ยงที่ระยะเวลา 28 วัน พบว่าในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณการใช้โปรไบโอติกที่มากขึ้น สูงกว่าชุดควบคุมอย่างแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) และ Aly et al. (2008) ที่ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *Bacillus pumilus* ทำให้อัตราการเจริญเติบโตปลานิลดีขึ้น ในงานทดลองนี้เลี้ยงระยะเวลา 4 สัปดาห์ ขนาดปลาเริ่มต้น 50±5 กรัม/ตัว พบว่าปลาในกลุ่มทดลอง 10^6 และ 10^{12} CFU/กรัม ค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการ

เจริญเติบโตจำเพาะ สูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (P<0.05) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสุดท้าย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกมีแนวโน้มที่สูงขึ้น อาจเนื่องจากโปรไบโอติก ส่งเสริมให้ปลากินอาหารดีขึ้น ทำให้การดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตดี อัตราการแลกเนื้อต่ำลง และ การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โปรเตส และไลเปสในลำไส้ปลานิลที่กินอาหารเสริม *B. subtilis* และ *L. rhamnosus* ดีขึ้น ซึ่งอาจจะมีส่วนทำให้ปลาโตได้เร็วขึ้น (Eissa and Abou, 2014) ดังรายงานของ Apun et al. (2009) กล่าวว่า การใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. และแบคทีเรียกลุ่ม Lactic acid bacteria ไม่ว่าจะเป็นอย่างใดอย่างหนึ่งหรือผสมรวมกัน ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลานิล

อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตาย พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง (P>0.05) แต่มีแนวโน้มดีขึ้นในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ridha and Azad (2012) ได้ทดสอบการเสริมโปรไบโอติกชนิด *B. amyloliquefaciens* พบว่า นอกจากจะเพิ่มการเจริญเติบโตแล้วยังทำให้อัตราแลกเนื้อลดลง ปลานิลที่ได้รับการผสม *L. acidophilus* มีอัตราการรอดสูงขึ้น เมื่อทดสอบกับเชื้อ *A. hydrophila* (Villamil *et al*., 2014) และยังมีรายงานว่าการใช้โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* 6×10^6 CFU และ *Saccharomyces cerevisiae* 1.5×10^{10} CFU/มล. เสริมอาหารเลี้ยงปลานิลทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตดี มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในอาหารสูงขึ้น และลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร (Marzouk *et al*., 2008) ตามรายงานของ Newaj *et al*. (2014) กล่าวว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมจุลินทรีย์โปรไบโอติก มีการกินอาหารดีขึ้น ทำให้การดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตดี และอัตราแลกเนื้อต่ำลง

Phagocytic cells มีบทบาทที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน จัดเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะตัวในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (Secombes, 1990) โดยค่าพารามิเตอร์เลือดของปลา ถือเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญ สำหรับการตรวจหาความผิดปกติ ที่เกี่ยวข้องกับการให้อาหาร ความเครียดจากสิ่งแวดล้อม จากโรค และการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน (Dawood *et al*., 2016) จากการทดลองพบว่า ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวหลังจากได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 20 วัน มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. (P>0.05) ที่ปลาอายุ 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น (P<0.05) ส่วนที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 5 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น (P<0.05) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Telli *et al*. (2014) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในปลานิล ขนาดเฉลี่ยเริ่มต้น 32.63 กรัม ผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 5×10^6 CFU/กรัม เลี้ยงที่ระยะเวลา 84 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก มีค่า phagocytic activities สูงกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (P> 0.05) และ Salinas et al. (2005) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในปลา Gilthead seabream ที่ความเข้มข้น 0.5×10^7 CFU/กรัม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ วัดค่า phagocytic activity ทุก 1 สัปดาห์ พบว่าค่า

Phagocytic activity สูงขึ้น ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ไลโซไซม์เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก สามารถพบได้ในเมือกปลา ซีรั่ม และเนื้อเยื่อ (Magnadottir, 2006) มีการศึกษาในปลาสวายที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ชนิด *Bacillus licheniformis* Dahb1 10^7 CFU/มิลิลิตร มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ที่เพิ่มขึ้น (Das *et al*., 2013) และ ในปลากระโห้ ที่ได้รับอาหารผสม *B. amyloliquefaciens* 10^8 และ 10^9 CFU/กรัม มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ที่เพิ่มขึ้น (Gobi *et al*., 2018) จากการทดลองพบว่า กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ชนกันต์ (2545) กล่าวว่า การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ เช่น ส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย กลูแคน วิตามินและสารสังเคราะห์ต่าง ๆ จะช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการเพิ่มการผลิตไลโซไซม์

Respiratory burst เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ มีความสามารถในการทำลายเชื้อโรคโดยขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่ดีขึ้น (Secombes, 1990) ปลาส่วนมากเมื่อได้รับโปรไบโอติกในปริมาณที่เหมาะสม จะมีค่า Respiratory burst ของ Phagocytes ที่สูง (Kumar *et al*., 2008) จากการทดลองพบว่า Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ที่อายุปลา 20 และ 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สอดคล้องกับการทดลองของ Liu *et al*. (2017) ศึกษาการใช้โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* HAINUP40 ในการเลี้ยงปลานิล พบว่า Respiratory burst ของ Phagocytes ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ Zaineldin *et al*. (2018) ศึกษาการใช้โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในการเลี้ยงปลาจานแดง ซึ่งพบว่าค่า NBT สูงขึ้นในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก Siwicki *et al*. (1994) กล่าวว่า การทดสอบ NBT reduction เพื่อตรวจหาการเกิดอนุมูลอิสระในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อประเมินความสามารถในการป้องกันกับเชื้อโรค ถือเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือ

จากการทดลองจะเห็นว่าผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ G Biotic ซึ่งมีจุลินทรีย์หลัก คือ *Bacillus subtilis* มีความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาใช้ในการเป็นโปรไบโอติกเพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันได้ดี

สรุปผลการวิจัย

การเสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. ในอัตราการให้อาหาร 3% Biomass ส่งผลให้การเจริญเติบโตสูงที่สุด และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด

ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลเพิ่มสูงขึ้น ในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติกการเสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. จึงเป็นความเข้มข้นที่คุ้มค่าและเหมาะสมที่สุดในการเลือกใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม และ บจก. กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัย

References

Aly, S.M., Abd-El-Rahman, A.M., John, G. and Mohamed, M.F. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquacult. 277(1): 1-6.

Apún-Molina, J. P., Santamaría- Miranda, A., Luna-González, A., Martínez-Díaz, S. F. & Rojas-Contreras, M. 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. Aquacult. Res. 40(8): 887-894.

Chitmanat, C. 2002. Immunostimulants in aquaculture. Songklanakarin J. Sci. Tech. 24(4): 739-747.

Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S. & Kamilya, D. 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). Fish & Shellfish Immun. 35(5): 1547-1553.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban, M.A. and Zaineldin, A.I. 2016. Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, *Pagrus major* growth, immune response and oxidative status. Fish & Shellfish Immun. 57: 170-178.

Eissa, N., and Abou-ElGheit, E. 2014. Dietary supplementation impacts of potential nonpathogenic isolates on growth performance, hematological parameters and disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Veterinary Adv. 4(10): 712-719.

Gismondo, M.R., Drago, L. and Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. Int. J. Antimicrob. Ag. 12(4): 287-292.

Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J.-C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M. and Iswarya, A. 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immun. 74: 501-508.

Kumar, R., Mukherjee, S. C., Ranjan, R. and Nayak, S. K. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish & Shellfish Immun. 24(2): 168-172.

Liu, C.-H., Chiu, C.-H., Wang, S.-W. and Cheng, W. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immun. 33(4): 699-706.

Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W. and Zhou, Y. 2017. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immun. 60: 326-333.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immun. 20(2): 137-151.

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H. and Austin, B. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquacult. 431: 1-11.

Mongkoldee, M., Leerapat, W. & Thaimuangphol, W. 2017. Effect of Probiotics on Growth Performance and Survival Rate in *Anabas testudineus*. J. Sci. Tech., Ubon Ratchathani University, 19(1), 82-89.

Noorit, K., 2014. Tilapia status and its products in B.C 2014 and trend in year 2014. http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Doc/fis hnews_164.pdf (in Thai)

Noorit, K. 2017. Situation of Nile tilapia on the production, trading and products of the year 2017 and trend of year 2018. (Online). Available from: http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Pdf (2018, October 15). (in Thai)

Parry, R.M. R.C. Chandau and R.M. Shahani. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. exp. Biol. Med, 119: 384-386.

Promnuan, K., Klawech, W. and Kiriratnikom, S. 2015. Application of probiotics for increasing of growth performance, feed utilization and disease resistance in hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). Proceedings of Kasetsart University Annual Conference. Kasetsart University. (in Thai)

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. Aquacult. Res. 43(6): 843-852.

Secombes, C.J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. Tech. Fish Immun., NJ 07704-3303: 139-154.

Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. Á. and Meseguer, J. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrüeckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. Fish & Shellfish Immun. 19(1): 67-77.

Siwicki, A. K., Anderson, D. P. and Rumsey, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immun. Immunopath., 41(1): 125-139.

Suwan, C. and Chitmanat, C. (2017). Review of The application of probiotics for Tilapia culture. Chiang Mai Vet. J. 15(1): 15-24.

Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J. T., Dias, D. d. C., Sussel, F. R., Ishikawa, C. M. & Tachibana, L. 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. Fish & Shellfish Immun. 39(2): 305-311.

Villamil, L., Reyes, C. and Martínez-Silva, M. A. 2014. In vivo and in vitro assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes: Cichlidae) culture improvement. Aquacult. Res. 45(7): 1116-1125.

Yoshida, T. and Kitao, T. 1991. The Opsonic Effect of Specific Immune Serum on the Phagocytic and Chemiluminescent Response in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* Phagocytes. Fish Patho. 26(1): 29-33.

Zaineldin, A. I., Hegazi, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Bakr, A., El-Keredy, A. M. S., Dawood, M. A. O., Dossou, S., Wang, W. & Yukun, Z. 2018. *Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream: Growth performance, oxidative status, and immune response traits. Fish & Shellfish Immun. 79: 303-312.