สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

Isolation of probiotic bacteria from tilapia (*Oreochromis* sp.)

วรกฤต วรนันทกิจ

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
QH
3 182R
2557
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.. 138163
วัน.เดือน.ปี.. 18 ก.ย. 2558
12907917X
.b.....
.i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล
แหล่งเงิน เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ: นายวรกฤต วรนันทกิจ หน่วยงานต้นสังกัด สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิลแดงที่เลี้ยงในกระชังทั้งหมด 55 ตัว สามารถแยกแบคทีเรียที่คาดว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกทั้งหมด 70 ไอโซเลท หลังจากทดสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* sp. และกลุ่มของ *Bacillus* sp. จำนวน 15 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยดูจากความทนในการเจริญที่สภาวะเป็นกรดและในเกลือน้ำดี และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลแดง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท M202 เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุด (pH 1, 2, 3, 4; เกลือน้ำดี 0.5%, 1%, 2%, 3% NaCl; สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp.) และไอโซเลท B312 และ B315 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีรองลงมา (pH 2, 3, 4; เกลือน้ำดี 0.5%, 1%, 2%, 3% NaCl; สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล *Aeromonas* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp.) จากคุณสมบัติข้างต้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไปได้

คำสำคัญ : ปลานิลแดง, แบคทีเรียโพรไบโอติก, *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Research Title:
Isolation of probiotic bacteria from tilapia (*Oreochromis* sp.)
Researcher: Dr.Worakrit Worananthakij
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Biology

ABSTRACT

In this study, isolation and identification of probiotic bacteria from intestinal tract of red tilapia in cage culture was investigated. The probiotic bacteria total 70 isolates were collected from 55 fish samples. These isolates were classified by the morphology and biochemical test. They were *Lactobacillus* sp. and *Bacillus* sp. as 15 isolates. The probiotic properties including acidic condition tolerance, bile salt condition tolerance and pathogenic bacteria in red tilapia inhibition were tested for probiotic bacteria selection. The result showed that, M202 was the best probiotic bacteria (pH 1, 2, 3, 4; bile salt 0.5, 1, 2, 3% NaCl; inhibiting of *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp.) while B312 and B315 were subsequently probiotic bacteria (pH 2, 3, 4; bile salt 0.5, 1, 2, 3% NaCl; inhibiting of *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp.) The results of this study could be as a probiotic bacteria and applied in aquaculture.

Keywords : Red tilapia, probiotic bacteria, *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ซึ่งสำเร็จด้วยความร่วมมือของนักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงมาด้วยดี

วรกฤต วรนันทกิจ
หัวหน้าโครงการ

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง V
สารบัญภาพ VI
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 5
3.1 การคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 5
3.2 การทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 7
บทที่ 4 ผลการวิจัย 9
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 9
4.2 การทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล 13
4.3 แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก 15
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 17
5.1 สรุปผลการวิจัย 17
5.2 ข้อเสนอแนะ 17
เอกสารอ้างอิง 18
ประวัตินักวิจัย 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล 10

4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ 14

4.3 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

3.1 แผนผังการแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล 8

4.1 แสดงลักษณะโคโลนีที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล 12

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ธุรกิจการเลี้ยงปลานิล ปลานิลแดง มีการขยายตัวอย่างมาก ทำให้เกิดธุรกิจต่างๆ ตามมา เช่น ธุรกิจการทำอาหารแปรรูป ธุรกิจส่งออกอาหารแช่แข็ง ธุรกิจการทำเครื่องหนัง เป็นต้น นำรายได้เข้าสู่ประเทศจำนวนมหาศาล จากข้อมูลกรมประมงในปี 2553 พบว่าปริมาณการผลิตปลานิลของประเทศไทยมีปริมาณ 200,000 ตัน หรือคิดเป็นมูลค่า 7,900 ล้านบาท เมื่อมีการเลี้ยงปลานิลเพิ่มมากขึ้น และเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น ประกอบกับการจัดการการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม ทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมาโดยเฉพาะด้านโรคในปลานิล ส่วนใหญ่เมื่อปลาป่วยแล้วจะไม่กินอาหาร การให้ยาผสมอาหารจึงไม่ได้ผลในการรักษา การจัดการในด้านภูมิคุ้มกันเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคในปลานิลได้ ซึ่งการส่งเสริมให้ปลานิลมีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นโดยใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประโยชน์เติมลงในอาหารเพื่อให้ระบบทางเดินอาหารหรือตัวปลาทำงานได้อย่างปกติ เพื่อปรับสภาพหรือเป็นตัวต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นแนวทางที่ควรศึกษา

ปัจจุบันการใช้โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากเป็นการเพิ่มต้นทุนให้กับเกษตรกรแล้ว จุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศบางสายพันธุ์ไม่เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย ทำให้โพรไบโอติกดังกล่าวทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ และเหมาะสมกับประเทศไทย เพื่อใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล ปลานิลแดงในระดับการค้าต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาชนิดและจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล จากฟาร์มปลานิล และทำการศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกในปลานิลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 คัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้

1.4.2 สามารถนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ และเหมาะสมกับประเทศไทยเพื่อใช้ในการส่งเสริมให้ปลานิลมีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น เป็นการพัฒนาการเพาะเลี้ยง เพิ่มคุณภาพและปริมาณของผลผลิตปลานิล ปลานิลแดงให้ดียิ่งขึ้นในระดับการค้าได้

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลานิลและปลานิลแดง (*Oreochromis* sp.) เป็นพันธุ์ปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี จึงเป็นที่นิยมบริโภคของคนทั่วไป เกษตรกรจึงนิยมหันมาเลี้ยงปลานิลกันมากขึ้น และเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น มีการให้อาหารสำเร็จรูปในปริมาณมากเกินพอ เพื่อเพิ่มผลผลิต อาหารที่มากเกินพอดังกล่าวทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ในระบบการเลี้ยงสูงขึ้น เป็นสาเหตุให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสมกับการเลี้ยง รวมถึงเกษตรกรขาดความรู้การจัดการที่ดี ส่งผลให้ปลาเกิดความเครียด ภูมิคุ้มกันลดลง และป่วยเป็นโรคง่าย ก่อให้เกิดโรคระบาดตามมา สำหรับวิธีการที่เหมาะสมและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมวิธีหนึ่ง คือ การเพิ่มภูมิคุ้มกันให้ปลา โดยการใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารให้ปลากิน

สุบัณฑิต และวีรพงศ์ (2552) ให้ความหมายของโพรไบโอติกในเชิงการเลี้ยงสัตว์น้ำว่า “โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลผลิตจากแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วไปมีผลช่วยให้สัตว์ดังกล่าวมีสุขภาพดีขึ้น” โพรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้ (1) เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ก่อประโยชน์ (2) สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตต่อสัตว์น้ำ (3) ไม่ก่อให้เกิดโรค (4) เป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่มจำนวน (5) เจริญและทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร (6) มีความคงทนต่อการเก็บรักษา

การใช้โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ ทำให้ระบบเพาะเลี้ยงรักษาสมดุลได้มากขึ้น ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และส่งเสริมการทำงานของระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและให้ผลผลิตที่ยั่งยืน แบคทีเรียกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกและนิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) (สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาแบคทีเรียบาซิลลัส (Bacillus bacteria) สามารถยับยั้งการก่อโรคจากแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย (ประพันธ์ ศักดิ์ และคณะ, 2554; Aly *et al*., 2008)

แบคทีเรียแลคติก เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างแบบกลม หรือท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครม สามารถจริญได้ดีในที่สภาพที่มีอากาศปริมาณน้อยๆ หรือเจริญได้ในที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศก็ได้ ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเติบโต และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล ประกอบด้วยสกุลต่างๆ ได้แก่ *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Carnobacterium, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Oenococcus* และ *Weissella* (สิรินดา และกาญจนา, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

แบคทีเรียบาซิลลัส เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน (rods) สร้างสปอร์ทนความร้อน เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ และพบการกระจายทั่วไปในธรรมชาติ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีมากกว่า 25 ชนิด โดยชนิดที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ ได้แก่ *B. subtilis, B. licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. megaterium และ B. pumilus* (ยุทธพล และนงนุช, 2554; สุวรรณา, 2549)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์น้ำ เช่น จากการศึกษาของประพันธ์ศักดิ์ และคณะ (2554) พบว่า *Bacillus pumilus* ที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลในบ่อเลี้ยง สามารถต้านทานต่อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อให้เกิดโรค Streptococcosis ในปลานิล และพบว่าสามารถเพิ่มระดับของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง จากรายงานของศิริรัตน์ (2551) พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus rhamnosus* มีผลช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิลให้มีความสามารถต้านโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*ได้ดียิ่งขึ้น และจากการศึกษาของ Heo และYang (2002) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกมาจากลำไส้ปลา ปลาหมักและกิมจิ จำนวน 20 ไอโซเลทพบว่า *Lactobacillus sakei* BK19 มีความสามารถทนกรดได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ก่อโรคในปลาได้

สายพันธุ์จุลินทรีย์ เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญของการนำโพรไบโอติกมาใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ และปัจจุบันโพรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำต้องนำเข้าจากต่างประเทศ บางสายพันธุ์ไม่เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย ทำให้โพรไบโอติกดังกล่าวทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ การศึกษาครั้งนี้ จึงทำการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล ปลานิลแดง ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์และเหมาะสมกับประเทศไทย เพื่อใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงในระดับการค้าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

3.11 สุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลแดงจากการเพาะเลี้ยงในฟาร์ม บริเวณคลอง 13 อ.หนองเสือ จ. ปทุมธานี ครั้งละ 15-20 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างปลา 3 ครั้ง โดยเก็บทุก 1 เดือน

3.1.2 ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ปลา โดยนำลำไส้มาบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ในอัตราส่วนลำไส้ปลาต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1:1

3.1.3 ทำการเจือจาง (tenfold serial dilution) สารละลายตัวอย่างลำไส้ปลา และทำการ spread plate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} เท่า ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus agar และ Lactobacillus MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.1.4 เลือกโคโลนีนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับที่ทำการ spread plate แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.1.5 เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เจริญบนอาหารแข็งมาย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การย้อมแกรมตรวจสอบรูปร่างเซลล์ การย้อมสปอร์ตรวจดูการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การย้อมแกรม, การย้อมสปอร์, การสร้างเอนไซม์คะตะเลส, ความสามารถในการย่อยแป้ง, การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI), การทดสอบ MR-VP (Methyl red-Voges-proskauer) และการทดสอบ Indole ตามแผนผังการแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล ปลานิลแดง (ภาพที่ 3.1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกสำหรับการทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิลต่อไป

3.1.5.1 การย้อมแกรม (Ted และ Chistine, 2000)

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด ใช้ loop แตะเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้เกลี่ยเชื้อ (smear) ให้เชื้อกระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆปล่อยให้แห้งในอากาศ นำมาตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นหยดสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที แล้วเททิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที แล้วเททิ้ง ล้างสีออกด้วย Ethyl alcohol 95% ทิ้งไว้ 15 วินาที เพื่อชะล้างสีส่วนเกินออกล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง วางแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตรวจสอบลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์ติดสีม่วง แสดงว่าเป็นแกรมบวก ถ้าเซลล์ติดสีแดง แสดงว่าเป็นแกรมลบ

3.1.5.2 การย้อมสปอร์ (Ted and Chistine, 2000)

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์1 หยด ใช้ loop แตะเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เกลี่ยเชื้อ (smear)ให้เชื้อกระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆปล่อยให้แห้งในอากาศ นำมาตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งอย่างรวดเร็ว หยดสารละลาย malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมบริเวณที่มีแบคทีเรียวางภาชนะที่มีน้ำบนเครื่องให้ความร้อน (hot plate) ใช้ตะแกรงพาดบนปากภาชนะหม้อ แล้วจึงวางสไลด์ที่เกลี่ยและตรึงเชื้อแล้ว อังบนไอน้ำเดือดเป็นเวลาประมาณ 5 นาที ระวังอย่าให้สีย้อมแห้งคอยเติมสีย้อมเมื่อสีใกล้แห้ง ทิ้งสไลด์จนเย็น จากนั้นล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้งหยดสารละลาย safranin O ลงไป ทิ้งไว้นาน 30-60 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้งนำไปตรวจดูด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100x

3.1.5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Collins *et al.*,1995)

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อลงบนสไลด์และหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3% บนสไลด์ 1 หยด สังเกตผล หากเกิดฟองอากาศขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ให้ผลเป็นบวก และไม่มีฟองอากาศแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผลเป็นลบ

3.1.5.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Ted and Chistine, 2000)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมา streak plate ในอาหาร starch agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร starch agar ทิ้งไว้ 5-10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลการทดลอง หากแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส จะเกิด clear zone รอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย

3.1.5.5 การทดสอบTriple Sugar Iron (TSI) (Collins *et al.*,1995)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกแทงตรงๆลงในอาหารและ streak บนผิวหน้าอาหารนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงบันทึกผลการทดลอง

- K/A แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคสเพียงตัวเดียว
- A/A แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคสแลกโตสและ/หรือซูโครส (หมักน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตัว)
- A/A g,H_2S แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคสแลกโตสและ/หรือซูโครสสร้างแก๊สและผลิต H_2S
- A/A g แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคสแลกโตสและ/หรือซูโครสสร้างแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.1.5.6 การทดสอบโดยวิธีMethyl red (Collins *et al.*,1995)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว Methylred-Voges proskauer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยด methyl red 5 หยด ต่ออาหารเหลว Methyl red–Voges proskauer 5 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทันทีหลังหยด methyl red โดยจุลินทรีย์ที่สร้างกรดได้มาก เมื่อหยดสารละลาย methyl red อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

3.1.5.7 การทดสอบโดยวิธี Voges proskauer (Collins *et al.*,1995)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว Methyl red-Voges proskauer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย 5% naphthol 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นหยดสารละลาย 40% KOH 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที ทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการสร้าง acetyl methylcarbinol จากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดย acetyl methylcarbinol จะถูกออกซิไดซ์เกิดเป็น diacetyl ซึ่งเมื่อหยดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) จะให้ผลเป็นสีแดง

3.1.5.8 การทดสอบโดยวิธี Indole (Collins *et al.*,1995)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหาร Tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อ่านผลโดยหยดสารละลาย Kovac's reagent 5 หยดสังเกตสีอาหารที่เปลี่ยนแปลง ซึ่ง tryptophan จะถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรีย ได้สาร indole, skatole และ indoleacetic acid (โดยเอนไซม์ tryptophanase) โดย indole จะทำปฏิกิริยากับ aldehyde หากมีวงแหวนสีชมพูอมม่วงเกิดที่ผิวหน้าแสดงว่าให้ผลบวก

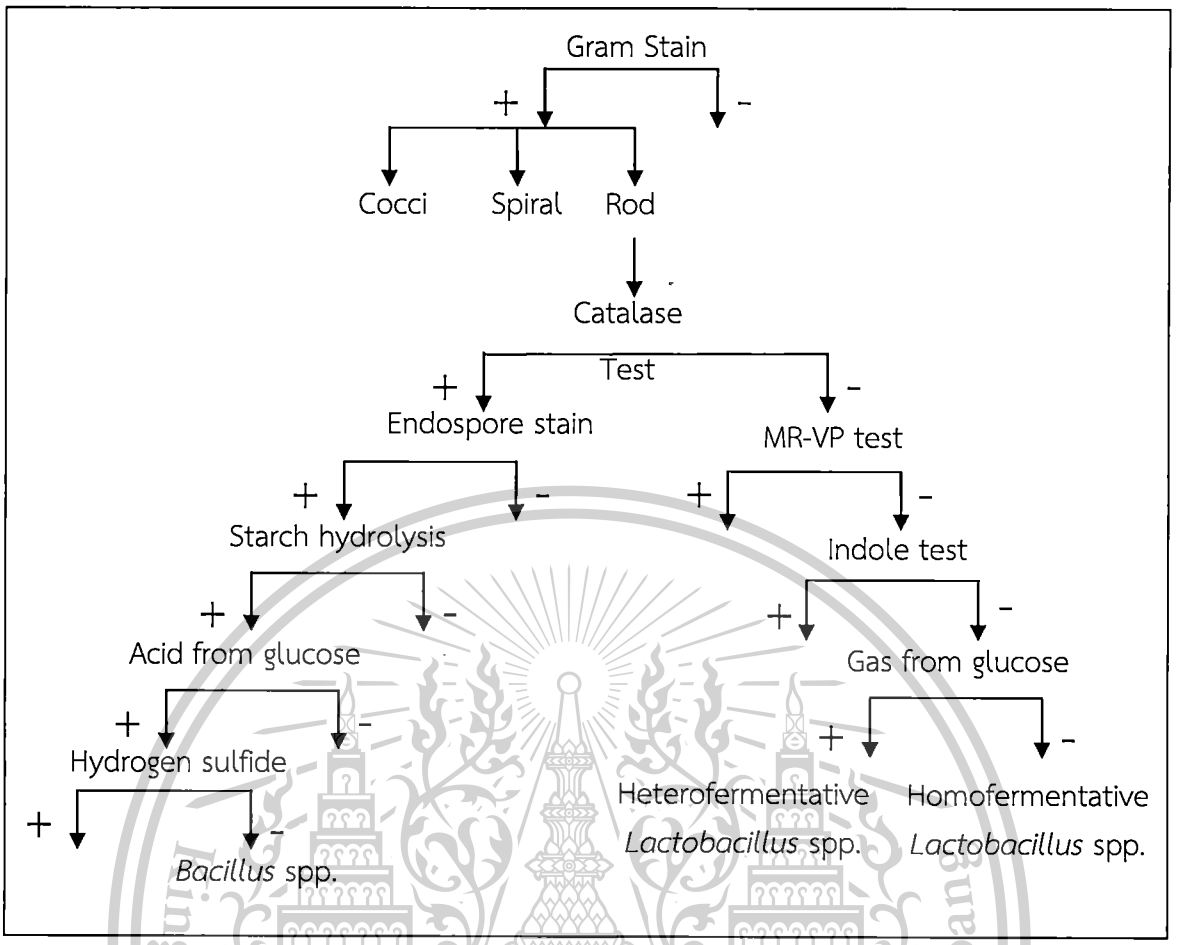
3.2 การทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก โดยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วข้างต้น แต่ละไอโซเลตมา 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว Bacillus broth หรือ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียโพรไบโอติกให้มีปริมาณเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 10^8 CFU/mL) เพื่อเตรียมทดสอบความทนกรด ความทนเกลือ และความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในปลานิล

3.2.1 การทดสอบความทนกรด (ดัดแปลงจาก คมแข และคณะ, 2553)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 1, 2, 3 และ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา spread palte บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ โดยใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 เป็นตัวควบคุม โดยเปลี่ยนเป็นค่า Log แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทนกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 3.1 แสดงแผนผังการแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล (ดัดแปลงจาก Vos, *et al*., 2009)

3.2.2 การทดสอบความทนเกลือ (ดัดแปลงจาก คมแข และคณะ, 2553)

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 2, และ 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา spread palte บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ โดยเปลี่ยนเป็นค่า Log แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทนเกลือ

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล

นำแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. มาปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อ ให้มีปริมาณเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 10^8 CFU/mL) ทำการเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยวิธี Spread plate จากนั้นวางดิสก์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบผลด้วยการดูการเกิด Clear zone เพื่อดูการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อเชื้อก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

จากการนำตัวอย่างปลานิลแดงมาทำการแยกเชื้อจากระบบทางเดินอาหาร โดยนำลำไส้ของปลานิลแดงมาบดด้วยน้ำเกลืออัตราส่วน 1:1 แล้วเจือจางตัวอย่างลำไส้ (tenfold serial dilution) ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปิเปตสารละลายมาปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร แล้ว spread plate ลงในอาหาร Bacillus agar และ Lactobacillus MRS agar บ่มเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหาร Lactobacillus MRS agar จะใช้ระยะเวลาการเจริญและนับโคโลนีที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งนานกว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหาร Bacillus agar ซึ่งมีระยะเวลาการเจริญและนับโคโลนีที่ 24 ชั่วโมง

จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีในตัวอย่างปลานิลแดง โดยผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียจากลำไส้ปลานิลแดงหลังจากการ Spread plate พบว่าการสุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลแดงครั้งที่ 1 จำนวน 15 ตัว ในอาหาร Bacillus agar มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 2.3×10^{6}-1.87×10^{7} cells/ml อาหาร Lactobacillus MRS agar อยู่ในช่วง 1.5×10^{6}-1.05×10^{9} cells/ml ครั้งที่ 2 จำนวน 20 ตัว ในอาหาร Bacillus agar มีจำนวนโคโลนี 3.18×10^{7} cells/ml อาหาร Lactobacillus MRS agar อยู่ในช่วง 1.94×10^{7}-1.25×10^{8} cells/ml และครั้งที่ 3 จำนวน 20 ตัว ในอาหาร Bacillus agar มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 6×10^{3}-8×10^{6} cells/ml อาหาร Lactobacillus MRS agar อยู่ในช่วง 2×10^{3}-1.3×10^{6} cells/ml

หลังจากการแยกเชื้อจากลำไส้ปลานิลแดงแล้วได้ทำการคัดเลือกโคโลนีที่คัดแยกได้ในแต่ละครั้งโดยเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีจากงานวิจัย (จำรูญ และคณะ, 2552; พรพรรณ , 2550; Tsai *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Chiaramonte *et al.*, 2009; Waldeck *et al.*, 2006 และ Parry *et al.*, 1983;) จากอาหารทั้ง 2 ชนิด ได้จำนวนทั้งหมด 70 ไอโซเลทในเบื้องต้น และนำทั้ง 70 ไอโซเลทดังกล่าวไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. และกลุ่มของ *Lactobacillus* sp. จำนวน 15 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และลักษณะโคโลนีดังแสดงในภาพที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	*Bacillus* agar								
	B201	B301	B302	B308	B312	B315	B318	B319	B321
การย้อมแกรม	+	+	+	+	+	+	+	+	+
รูปร่างเซลล์	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
การย้อมสปอร์	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง									
- รูปร่าง (form)	ไม่แน่นอน	กลม	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน
- สีโคโลนี	ขาวขุ่น	ส้ม	ใส	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น
- ระดับความนูน (elavation)	แบน	นูน	แบน	แบน	แบน	แบน	แบน	แบน	แบน
- ผิวหน้า (surface)	รอยย่น	เรียบ	เรียบ	ขรุขระ	ขรุขระ	ขรุขระ	ขรุขระ	ย่น	ขรุขระ
- ขอบโคโลนี	หยัก	หยัก	คลื่น	เกลี้ยง	คลื่น	เกลี้ยง	เกลี้ยง	หยัก	เกลี้ยง
การทดสอบคะตะเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบ TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/N	K/A	K/A
การทดสอบ Methyl red	-	+	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ Voges-proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบการย่อยแป้ง	-	-	+	-	-	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = เจริญได้ ; - = เจริญไม่ได้ ; K/A = หมักน้ำตาลกลูโคสและผลิตกรด ; A/A= ผลิตกรด ; NA = ไม่เปลี่ยนแปลง

ลิขสิทธิ์ของเอกสารนี้เป็นของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้า
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

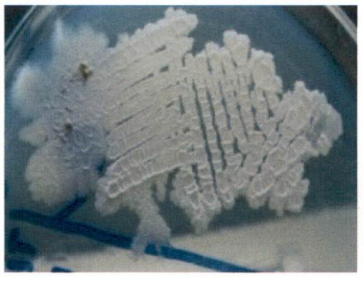
10

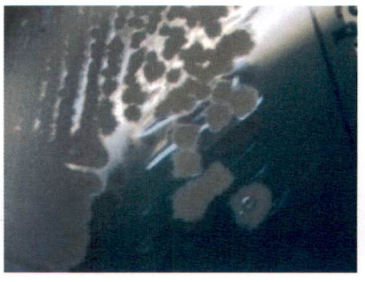
ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	*Bacillus* agar		MRS			
	B322	B323	M105	M201	M202	M301
การย้อมแกรม	+	+	+	+	+	+
รูปร่างเซลล์	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
การย้อมสปอร์	+	+	-	-	-	-
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง						
- รูปร่าง (form)	ไม่แน่นอน	ไม่แน่นอน	กลม	กลม	กลม	กลม
- สีโคโลนี	ครีม	ขาวขุ่น	ขาว	เหลือง	เหลือง	ขาว
- ระดับความนูน (elavation)	แบน	แบน	นูน	นูน	นูน	นูน
- ผิวหน้า (surface)	ขรุขระ คลื่น	ขรุขระ คลื่น	เรียบ เกลี้ยง	เรียบ เกลี้ยง	ขรุขระ เกลี้ยง	เรียบ เกลี้ยง
การทดสอบคะตะเลส	+	+	-	-	-	-
การทดสอบ TSI	K/A	K/A	NA	A/A	A/A	A/A
การทดสอบ Methyl red	-	-	-	-	-	-
การทดสอบ Voges-proskauer	-	-	-	-	-	-
การทดสอบIndole	-	-	-	-	-	-
การทดสอบการย่อยแป้ง	+	+	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = เจริญได้ ; - = เจริญไม่ได้ ; K/A = หมักน้ำตาลกลูโคสและผลิตกรด ; A/A= ผลิตกรด ; NA = ไม่เปลี่ยนแปลง

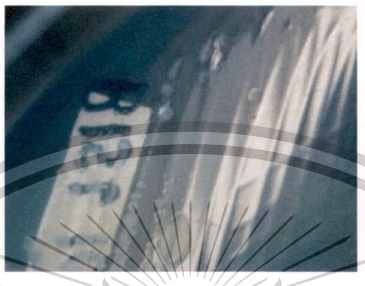
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.


B201


B301

B302

B308


B312

B315

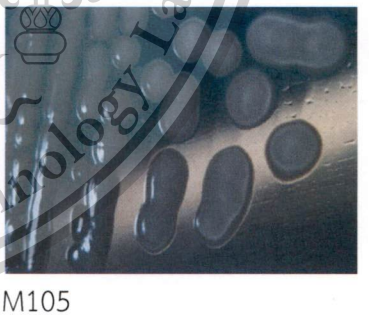
B318

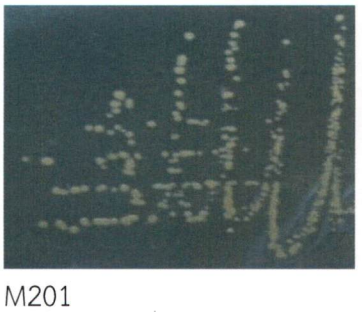
B319

B321

B322

B323


M105


M201

M202

M301

ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.2 การทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล

4.2.1 ผลการทดสอบความทนกรด

จากการทดสอบความทนกรดของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ Spread plate ที่ระดับพีเอช 1, 2, 3 และ 4 พบว่ามีเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 1, 2, 3 และ 4 ได้แก่ B201, B301, M201 และ M202 และมีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2, 3 และ 4 ได้แก่ B308, B312 และ B315 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2.2 ผลการทดสอบความทนเกลือ

จากการทดสอบความทนเกลือของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ Spread plate ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ B301, B302, B312, B315, B318, B319, B321, B323, M105, M201, M202 และ M301 และมีเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท ที่มีแนวโน้มสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.5, 1, และ 2 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ B322 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ 15 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในปลานิลแดงจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นโพรไบโอติกที่คัดแยกได้ พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ B312, B315, M105 และ M202 และมี 6 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 2 ชนิด ได้แก่ B302, B318, B322, B323, M201 และ M301 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความทนกรดของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าพีเอชระดับต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ความทนเกลือของเชื้อแบคทีเรียที่ค่าความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ

รหัสไอโซเลท	B201	B301	B302	B308	B312	B315	B318	B319	B321	B322	B323	M105	M201	M202	M301
การทดสอบความทนกรด															
- พีเอช 2	54.36	41.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53.44	51.53	-
- พีเอช 3	47.96	58.58	-	61.50	35.35	56.91	-	-	-	-	-	-	50.74	60.95	-
- พีเอช 3	46.66	57.22	-	47.96	45.13	41.97	43.53	60.80	54.47	-	-	-	72.04	84.95	-
- พีเอช 4	70.04	72.42	-	52.64	57.83	71.48	50.91	76.00	63.16	-	-	-	88.97	43.09	67.84
การทดสอบความทนเกลือ															
- ความเข้มข้น 0.5%	48.53	81.35	58.17	33.51	57.75	59.32	87.33	94.36	60.45	97.58	79.73	58.22	59.08	61.26	51.04
- ความเข้มข้น 1%	77.05	75.22	59.70	27.50	57.99	57.24	82.13	93.26	55.56	87.06	80.05	47.37	59.35	57.44	52.19
- ความเข้มข้น 2%	-	81.99	58.43	-	58.35	57.16	84.25	84.17	54.83	66.83	74.24	56.84	57.50	56.87	55.11
- ความเข้มข้น 3%	-	81.93	57.88	-	58.22	55.96	62.78	85.56	54.64	-	78.24	56.54	59.08	56.87	59.08

หมายเหตุ: - = ไม่สามารถเจริญได้

Class Phylum 2.2.2 Myxozoa Order Myxosporea Bivalvulida

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

รหัสไอโซเลท	แบคทีเรียก่อโรค		
	Streptococcus sp.	*Aeromonas* sp.	*Pseudomonas* sp.
B201	-	+	-
B301	+	-	-
B302	+	-	+
B308	+	-	-
B312	+	+	+
B315	+	+	+
B318	+	+	-
B319	-	+	-
B321	+	-	-
B322	+	-	+
B323	+	-	+
M105	+	+	+
M201	+	+	-
M202	+	+	+
M301	+	+	-

4.3 แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก

จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นพบว่ารหัสไอโซเลทที่มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพที่สุด คือ M202 และรหัสไอโซเลท B312 และ B315 มีประสิทธิภาพรองลงมา ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติ การเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี กล่าวคือ มีความสามารถในการเจริญได้ภายใต้สภาวะความเป็นกรด มีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดี และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีนั้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท M202 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Lactobacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีในอาหารทดสอบที่มีค่าพีเอช 1-4 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chowhury *et al.* (2012) ที่ทำการทดสอบความสามารถในการทนกรดของ *L. plantarum* พบว่าสามารถเจริญได้ที่พีเอชระหว่าง 4-8 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 1-9% และงานวิจัยของ สุนทรี (2551) ระบุว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้ที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 2-10 และยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือถึง 6% ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลท B312 และ B315 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ได้ดีในอาหารทดสอบที่มีค่าพีเอช 2-4 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% สอดคล้องกับงานวิจัยของพรพรรณ (2550) ที่กล่าวว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถทนเกลือได้ที่ความเข้มข้น 2-10% และสามารถเจริญได้ที่พีเอชแตกต่างกันคือ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่พีเอช 2-6 และ *B. alcalophilus* สามารถเจริญได้ที่พีเอช 9-10

จากการทดลองความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท M202 ที่เป็น *Lactobacillus* sp และ B312 กับ B315 ที่เป็น *Bacillus* sp. สามารถยับยั้ง *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของภัทริดา และคณะ (2554) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Aeromonas hydrophila* ABRCA1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRCS1) ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยวิธี Cross streak method พบว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ABRCA1 ส่วนเชื้อ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญทับโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS1 ได้ และมีความสอดคล้องกับการศึกษาของวิศัย (2555) ซึ่งได้ทำการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เพื่อใช้เป็นแหล่งของโพรไบโอติก โดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมัก 6 ตัวอย่าง และนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา พบว่าสามารถยับยั้งก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ได้

ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นฐานข้อมูลแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้นในการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติก สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยนำไปทำโพรไบโอติกที่เติมในอาหารสัตว์น้ำ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ยับยั้งเชื้อก่อโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ เพื่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร โดยโพรไบโอติกจะย่อยสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก ช่วยให้สัตว์น้ำดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงปลานิลแดงในลูกปลาที่มีอัตราการตายสูงอันเป็นผลมาจากแบคทีเรียก่อโรค การนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ในด้านอาหารสัตว์ ทำได้โดยการเตรียมหัวเชื้อผสมกับอาหารปลา เพื่อให้เชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารโดยที่เชื้อยังคงคุณสมบัติโพรไบโอติก มีผลลดอัตราการตายและทำให้ปลาที่เพาะเลี้ยงมีภูมิคุ้มกันที่แข็งแรงขึ้นโรค นอกจากนี้ยังสามารถนำโพรไบโอติกไปใช้ย่อยสลายเศษอาหารและสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำและลดความเครียดอันเกิดจากมลพิษในน้ำได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ของปลานิลแดง 55 ตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลแดงที่เลี้ยงในกระชังนำมาแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติก ด้วยวิธี Total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* agar และ *Lactobacillus* MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่คัดแยกได้โดยเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีจากข้อมูลงานวิจัยที่รายงานมาแล้ว ได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลท หลังจากนั้นนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น พบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิลแดง จำนวน 15 ไอโซเลท จัดเป็นกลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ B201, B301, B302, B308, B312, B315, B318, B319, B321, B322 และ B323 และกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ M105, M201, M202 และ M301

การทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล จากทั้งหมด 15 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท M202 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Lactobacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีในอาหารทดสอบที่มีค่าพีเอช 1-4 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ได้อีกด้วย จึงจัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุด และไอโซเลท B312 และ B315 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีในอาหารทดสอบที่มีค่าพีเอช 2-4 และทนเกลือได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-3% และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ได้อีกด้วย จัดว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีรองลงมา

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการแยกและจัดจำแนกชนิดของโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล และทดสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกเบื้องต้น ดังนั้นจึงควรทดสอบความเป็นคุณสมบัติโพรไบโอติกอื่นๆ เช่น ความสามารถในการย่อยโปรตีน และความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ

2. ควรศึกษาชนิดสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA หรือทดสอบ API20E เพื่อระบุสายพันธุ์โพรไบโอติก

3. ควรศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปประยุกต์ใช้ในการทำอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

138163

เอกสารอ้างอิง

คมแข พิลาสมบัติ, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 28, 1-8.

จำรูญ มณีวรรณ, มงคล ถิรบุญญานนท์ และกิตติพงษ์ ทิพยะ. 2552. การใช้โพรไบโอติกเพื่อเพิ่ม ศักยภาพของการผลิตและทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในแม่สุกรอุ้มท้องและแม่สุกรเลี้ยง ลูก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์ และนนทวิทย์ อารีย์ชน. 2554. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ต่อระบบภูมิคุ้มกันและการยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554: 73-82.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ภัทริดา โปฎก, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และนิติ ชูเชิด. 2554. ผลของการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค. ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ยุทธพล คงกระจ่าง และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2554. การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และปริมาณเชื้อวิบริโอในกุ้งขาวแวนนาไม. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554: 400-407.

วิศัย พรหมเทพ และสุวภร ยศตะโคตร. 2555. การแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เพื่อใช้เป็นแหล่งของโปรไบโอติก. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.

สิรินดา ยุ่นฉลาด และกาญจนา นนทะเสน. 2554. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) จากแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ที่สามารถใช้แทนสารกันบูดในผลิตภัณฑ์อาหาร. วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 19: 1-10.

สุนทรี เซ็นติยะนนท์. 2551. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก่กระทง. ปัญหาพิเศษ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุวรรณา วรสิงห์. 2549. การตรวจหาแบคทีเรียบาซิลลัสและแลคโตบาซิลในดิน น้ำ และเนื้อกุ้งของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจังหวัดตราด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 44/2549. กรมประมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของ จุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้ในโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 222-264.

ศิริรัตน์ กองวงศ์. 2551. ผลของโปรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* ต่อการเจริญเติบโตและการต้านทานโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ปัญหาพิเศษ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

Chiaramonte, F., Blugeon, S., Chaillou, S., Langella, P. and Zagorec, M. 2009. Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei*during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice.*Applied* and Environmental Microbiology.75, 4498–4505.

Chowdhury, A., Hossain, N., Mostazir, J. N., Fakruddin, Billah, M. and Ahmed, M. 2012. Screening of *Lactobacillus* spp.from buffalo yoghurt for probiotic and antibacterial activity. Journal Bacteriol Parasitol.3, 8.

Collins,C. H., Lynes, P. M. and Grange, J. M. 1995. Microbiological methods. Butterwort-Heinemann Ltd., Britain, 175-190.

Heo, M.S. and Yang, B.K. 2002. Screening of probiotic strains for use in aquaculture. Journal of Fisheries Science and Technology.5, 200-205.

Parry, J.M., Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R. 1983. A colour atlas of *Bacillus* species. Ipswich, England. W.S. Cowell Ltd.

Ted, R. J. and Chistine, L. C. 2000. Laboratory experiments in microbiology. 6th ed. Benjamin Cummings. New York.

Tsai, C.C.,Lai, H.C.,Yu,B.and Tsen, Y.H. 2010. Use of PCR primers and probes based on the 23S rRNA and internal transcription spacer (ITS) gene sequence for the detection and enumerization of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in feed supplements. Molecular Biology and Genetics.16, 270–277.

Vos, D. P., Garrity, M. G., Jones, D., Krieg, R. N., Ludwig, W., Rainey, A. F., Schleifer, K-H. and Whitman, B. W. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. Springer. 1450.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล : นายวรกฤต วรนันทกิจ

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาและอักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอกการศึกษา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2539	ปริญญาตรี วท.บ.	ประมง	เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2553	ปริญญาเอก วท.ด.	พันธุวิศวกรรม	พันธุวิศวกรรม	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา): โรคสัตว์น้ำ, โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.