

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกจากลำไส้ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria isolated from the Intestine of *C. macrocephalus* against Fish Pathogens

วอนสมัย ดาราแสน และอัจฉรา รัตนชัย*

สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 34190

E-mail: agachaju@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคปลา พบว่า จากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด 77 ไอโซเลท มี 9 ไอโซเลทซึ่งประกอบไปด้วย *Enterococcus* sp. (6 ไอโซเลท) *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (2 ไอโซเลท) และ *Lactobacillus brevis* (1 ไอโซเลท) แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทุกสายพันธุ์ได้ในระดับดีด้วยวิธี agar spot test เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี disc diffusion assay โดยใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์ ปกติ น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นกลาง และน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูกย่อยด้วย Proteinase K พบว่าขนาดของบริเวณยับยั้งแตกต่างกันบ่งชี้ว่ากลไกการยับยั้งเป็นผลมาจากการผลิตกรดอินทรีย์และแบคทีเรียโอซิน นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus brevis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ได้ดีกว่า *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: ปลาดุกอุย แบคทีเรียกรดแลคติก ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

Abstract

Lactic acid bacteria were isolated from the intestine of *Clarias macrocephalus* for their antibacterial properties against fish pathogens. Of 77 isolates, nine, *Enterococcus* sp. (6 isolates), *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (2 isolates) and *Lactobacillus brevis* (1 isolate), demonstrated great inhibition against all indicator bacteria by the agar spot test. The reduction of inhibition zones were examined by disc diffusion assay using crude cell-free culture supernatants, neutralized culture supernatants, and proteinase K treated culture supernatants. Findings indicated that the mechanism of inhibition resulted from the production of organic acid and bacteriocin. Moreover, *Lactobacillus brevis* showed significantly greater action than *Enterococcus* sp., *Lactococcus lactis* spp. *lactis* on *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, and *Flavobacterium columnare*.

Keywords: *Clarias macrocephalus*; Lactic acid bacteria; Antibacterial activity

บทนำ

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย นอกจากจะเป็นที่นิยมของผู้บริโภคแล้ว

ปลาดุกอุยยังมีความสำคัญยิ่งต่อการเพาะพันธุ์ปลาดุกบักอุยซึ่งเป็นปลาลูกผสมที่ได้จากการผสมเทียมระหว่างแม่ปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) และพ่อปลาดุกอัฟริกัน (*C. gariepinus*) [1] และปลาลูกผสมนี้

เป็นชนิดพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงและซื้อขายกันมากในตลาดภายในประเทศ (ผลผลิตประมาณ 50,000 เมตริกตันต่อปี) และตลาดส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เพื่อตอบสนองต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาดุกบิกอูย จึงมีความต้องการแม่พันธุ์ปลาดุกอูยเพิ่มมากขึ้น ทำให้ปลาดุกอูยในธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์มีจำนวนน้อยลง และยังพบปัญหาการปนเปื้อนทางพันธุกรรมของประชากร ส่งผลต่อการนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์สำหรับการผลิตลูกปลาดุกบิกอูย [2], [3] อีกทั้งมีการใช้แม่พันธุ์ที่ยังไม่สมบูรณ์เพศในการผลิตลูกปลา ส่งผลเสียทำให้มีอัตราการฟักเป็นลูกปลาและอัตราการรอดตายต่ำ นอกจากนี้เกษตรกรบางรายได้นำเข้าแม่พันธุ์ปลาดุกอูยจากประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา และเวียดนาม ทำให้เสี่ยงต่อการทำลายสายพันธุ์ปลาดุกอูยของไทย [4] ดังนั้นการพัฒนาการเลี้ยงปลาดุกอูยให้ประสบความสำเร็จจึงจำเป็นต้องมีการส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตปลาดุกบิกอูยให้ยั่งยืน และเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอูยให้คงอยู่สืบไป

อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาดุกอูยมักประสบปัญหาการระบาดของโรค [5] โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* ซึ่งพบว่า มีการระบาดมากระหว่างการอนุบาลลูกปลา การป้องกันและควบคุมโรคโดยการใชยาปฏิชีวนะทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในตัวปลา และปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคซึ่งจะทำให้การควบคุมโรคเป็นไปด้วยความยากลำบากยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกส์จึงเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับและนำมาใช้ในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ [6], [7]

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ สามารถสร้างกรด และสารอื่นๆ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค แบคทีเรียกรดแลคติกหลายๆชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของปลาที่มีสุขภาพดี และสามารถ

พบได้ในทางเดินอาหารของปลาวัยอ่อน และในน้ำที่ใช้เลี้ยง [8], [9] แบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารช่วยป้องกันการตั้งรกรากและการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรคหรือเชื้อฉวยโอกาสอันจะส่งผลให้ปลาเกิดการเจ็บป่วย [10] นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการผลิตเอนไซม์ในการย่อยอาหาร การสังเคราะห์วิตามินและกรดไขมันที่จำเป็น [11], [12] และยังช่วยกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรค [13], [14], [15] ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารจึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคของปลาเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารปลาดุกอูย โดยเฉพาะการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาน้ำจืด

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการเป็นโปรไบโอติกตัวใหม่จากลำไส้ปลาดุกอูย โดยตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลาน้ำจืด ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปใช้เป็นแนวทางในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาดุกอูยวัยรุ่นขนาด 10 ± 2.4 กรัม จำนวน 30 ตัว ซึ่งได้จากฟาร์มประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยนำปลามาขังไว้ในตู้ทดลอง และให้อาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการแยกเชื้อ จากนั้นทำการสลบลูกปลาด้วยน้ำแข็ง และใช้เครื่องมือผ่าตัดในการเปิดช่องท้องโดยวิธีที่ปลอดเชื้อ แยกตัวอย่างลำไส้ออกมา ล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.85% บดตัวอย่างในน้ำเกลือ และนำสารละลายที่ได้ไปทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า จนถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-7} และแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี spread plate อาหารแข็ง MRS (de Man – Rogosa and Sharp) ที่ผสม แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ความเข้มข้น 1 % และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็น

เวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน จากนั้น สุ่มเก็บโคโลนีที่สร้างบริเวณใส (clear zone) นำมา เลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS จานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อที่ บริสุทธิ์ และนำโคโลนีไปทดสอบการย้อมแกรม และการสร้างเอนไซม์แคตาเลส เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่ ให้ผลการย้อมแกรมเป็นบวก และไม่สร้างเอนไซม์ คตะเลส และนำเชื้อไปเก็บรักษาในสารละลาย กลีเซอรอล ความเข้มข้น 15 % ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถของ แบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

2.1 แบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria)

แบคทีเรียก่อโรคในปลาที่นำมา ใช้ในการศึกษานี้ประกอบไปด้วย *Aeromonas hydrophila* AHAQH001 และ AHAQH002 *Streptococcus agalactiae* SAAQH001 และ SAAQH00 และ *Flavobacterium columnare* FCAQH001 และ FCAQH002 ซึ่งได้รับความ อนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์ น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำมาเพาะและเก็บ รักษาไว้ในอาหารแข็ง TSA

2.2 วิธี Agar spot test

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้บน อาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาปลูก เชื้อแบบจุดบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่ไม่ ใช้ออกซิเจน และเททับด้วยอาหารกึ่งแข็ง TSA YE (TSB ผสมกับ Yeast Extract 0.75 % และ Agar 0.75 %) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ซึ่งผสมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml และนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน สภาพที่ไม่ใช้ออกซิเจน ตรวจสอบการสร้างสารยับยั้ง แบคทีเรียทดสอบจากบริเวณใส (inhibition zone) รอบ รอยเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปลูกไว้

2.3 วิธี Disc diffusion method

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีผลการยับยั้ง แบคทีเรียทดสอบทุกสายพันธุ์ในระดับดีมากจากวิธี Agar spot test มาศึกษาความสามารถในการสร้างสาร ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion assay โดยนำ แบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์โดยการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บน้ำเลี้ยง เซลล์และแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้ คือ 1) ส่วนที่ไม่ ปรับค่า pH 2) ส่วนที่นำมาปรับค่า pH ให้เป็นกลาง เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความ เข้มข้น 10 นอร์มัล และ 3) ส่วนที่เป็นกลางซึ่งนำมา ผ่านการย่อยด้วย proteinase K และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 min จากนั้นกรองน้ำเลี้ยง เซลล์ทั้ง 3 ส่วนด้วยแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด ความพรุน 0.2 ไมโครเมตร (syling filter, Satorius) นำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยด ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร ที่วางบนผิวหน้าอาหารกึ่งแข็ง TSA YE ซึ่งผสมเชื้อ แบคทีเรียทดสอบความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml ทำการทดสอบทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่ ไม่ใช้ออกซิเจน ตรวจสอบการสร้างสารยับยั้ง แบคทีเรียทดสอบจากบริเวณใส (inhibition zone) รอบ แผ่นกระดาษกรอง และวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุดควบคุม (negative control)

การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มาทำการ จัดจำแนกเบื้องต้นในระดับสกุล (genus level) ตาม วิธีการของ Axelsson [16] โดยการศึกษาลักษณะทาง สรีระวิทยา การเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS และสภาวะการบ่มเชื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่ รูปร่างและ การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างแก๊ส การเจริญที่ อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญใน อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18% และ

การเจริญในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) 4.4 และ 9.6

สำหรับการจำแนกในระดับชนิด (species level) ได้ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป API 20 strep และ API 50 CHL (BioMérieux, USA) ภายใต้คำแนะนำของบริษัท

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของเส้นผ่าศูนย์กลางของแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (inhibition zone) โดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple rang test (DMRT)

ผลการวิจัย

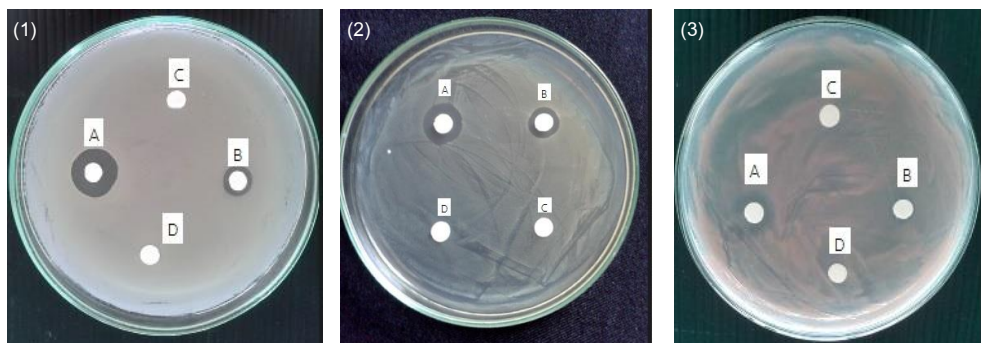
1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลาคูคูลู

จากการนำลำไส้ปลาคูคูลูมาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสามารถเจริญ และสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี บนอาหารแข็ง MRS ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% พบว่า จากแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 150 ไอโซเลท มีแบคทีเรียกรดแลคติก

ทั้งสิ้น 77 ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียรูปร่างกลม (cocci) จำนวน 65 ไอโซเลท และรูปร่างท่อน (bacilli) จำนวน 12 ไอโซเลท ที่ให้ผลการย้อมแกรมเป็นบวก และไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส อันเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติก

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลา

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 77 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar spot test พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 77 ไอโซเลท แสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบที่นำมาทดสอบ โดยความสามารถในการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับไอโซเลท และสายพันธุ์ของแบคทีเรียทดสอบ (รูปที่ 1) และมีแบคทีเรียจำนวน 31 ไอโซเลท หรือประมาณ 40 % เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 6 สายพันธุ์ และพบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 9 ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดที่สุด โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งอยู่ระหว่าง 10 - 49 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (1) *Aeromonas hydrophila* (2) *Streptococcus agalactiae* และ (3) *Flavobacterium columnare* ของสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์ *Lactobacillus brevis* A) cell-free culture supernatant B) neutralized supernatant C) proteinase K-treated culture supernatant และ D) control

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Aeromonas hydrophila* AHAQH001, 002, *Streptococcus agalactiae* SAAQH001, 002 และ *Flavobacterium columnare* FCAQH001, 002 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้โดยวิธี agar spot test

ไอโซเลท	แบคทีเรียทดสอบ					
	AHAQH 001	AHAQH 002	SAAQH 001	SAAQH 002	FCAQH 001	FCAQH 002
5	+	+++	++	++	++	++
15	++	++	++	++	+++	+++
28	+	++	+	+	+	+
30	++	+++	++	+++	+++	+++
47	++	++	+	+	++	++
53	+	+	+	+	+	++
68	+	++	+	+	++	++
76	+	++	+	++	+++	+++
106	+	+++	+	++	++	++

(+) 10 – 25 mm, (++) 26 – 38 mm, (+++) 39 – 50 mm

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

จากการจัดจำแนกระดับจีนสโดยใช้การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา การเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS และสภาวะการบ่มเชื้อที่แตกต่างกัน ตามวิธีการของ Axelsson [16] และการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป API 20 strep และ API 50 CHL (BioMérieux, USA) เพื่อจัดจำแนกระดับชนิด (species level) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาทั้ง 9 ไอโซเลทประกอบด้วย *Enterococcus* sp. จำนวน 6 ไอโซเลท *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Lactobacillus brevis* 1 ไอโซเลท

4. การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion assay พบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารยับยั้งที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับค่า pH (cell-free culture supernatant) จะมีค่าแตกต่างกันไปโดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 6.6 – 17.0 มิลลิเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับไอโซเลทและสายพันธุ์ของแบคทีเรียทดสอบ เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ปรากฏบนแบคทีเรียทดสอบพบว่า *Flavobacterium columnare* มีความไวต่อสารยับยั้งที่สร้างจาก *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* มากกว่า *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus*

agalactiae อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งอยู่ระหว่าง 16.0 – 16.8 มิลลิเมตร และ 15.6 – 16.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *Lactobacillus brevis* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ดีกว่า *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคนี้เป็นผลมาจากสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทต่างๆที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดสภาพเป็นกรด เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH (neutralized culture supernatant) เพื่อกำจัดความสามารถในการยับยั้งที่เป็นผลมาจากกรดอินทรีย์พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งอยู่ระหว่าง 6.1 – 10.8 มิลลิเมตร

เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ปรากฏบนแบคทีเรียทดสอบพบว่า *A. hydrophila* มีความไวต่อสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactobacillus brevis* ได้มากกว่า *F. columnare* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) และ *Lactobacillus brevis* ยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila*, *S. agalactiae* และ *F. columnare* ได้ดีกว่า *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ในขณะที่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาพเป็นกลางและผ่านการย่อยด้วย proteinase K (proteinase K - treated culture supernatant) (รูปที่ 1) ยืนยันได้ว่า นอกเหนือจากการดื้ออินทรีย์แล้ว แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลทนี้สามารถสร้างสารยับยั้งประเภทโปรตีน หรือแบคทีเรียโอซินได้

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลำไส้ปลาดุกอุยต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญใน

ปลาน้ำจืดโดยคำนึงถึงกิจกรรมของสารยับยั้งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 9 ไอโซเลทจากแบคทีเรียทั้งสิ้น 77 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ทั้ง 6 สายพันธุ์

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะสกุล *Lactobacillus* ได้ถูกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกอย่างกว้างขวาง [17] เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำและผูบริโภค อีกทั้งยังสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมก่อโรค [18] โดยเฉพาะสารยับยั้งประเภทโปรตีนหรือแบคทีเรียโอซินบางชนิด เช่น acidophilin และ lactocidin ที่ให้ผลการยับยั้งในวงกว้างต่อแบคทีเรียก่อโรค และไม่ก่อโรคหลายสกุล [19]

โดยทั่วไปประสิทธิภาพและขอบเขตความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคมีพื้นฐานมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (bacteriocins) และผลรวมของสารยับยั้งประเภทอื่น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอฟาจ [20] ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้วิธี Agar spot test และ Disc diffusion method ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งต่างๆ ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Agar spot test เป็นวิธีการเบื้องต้นที่นำมาใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวกต่อผู้ปฏิบัติงาน [21] โดยบริเวณใสที่ปรากฏบนเชื้อก่อโรคนั้นเป็นผลมาจากสารยับยั้งทุกประเภทที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ แบคทีเรียโอซิน เป็นต้น ส่วนวิธี disc diffusion method เป็นการทดสอบกิจกรรมการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว โดยเฉพาะการสร้างสารยับยั้งประเภทโปรตีน หรือ แบคทีเรียโอซิน ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH เพื่อกำจัดกรดอินทรีย์ และได้ดำเนินการทดสอบภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อยับยั้ง

การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [22] โดยกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสามารถประเมินได้จากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนแบคทีเรียทดสอบ [23]

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากการศึกษานี้ประกอบด้วย *Enterococcus* sp. (6) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (2) และ *Lactobacillus brevis* (1) โดยความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคปลาทั้ง 6 สายพันธุ์นั้นมาจากสารยับยั้งประเภทต่างๆ ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ซึ่งเมื่อตรวจสอบได้ด้วยวิธี Disc diffusion assay โดยใช้แผ่นกระดาษซับแบบต่างๆ พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH มีขนาดลดลงไปจากเดิมที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับค่า pH บ่งชี้ว่ากลไกหนึ่งของการยับยั้งมาจากการสร้างกรดอินทรีย์ ส่วนบริเวณใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH นั้นเป็นผลมาจากการผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นสาร

ยับยั้งประเภทโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพให้เป็นกลางและนำไปย่อยด้วย Proteinase K แล้วไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบใดๆเลย [24] เมื่อพิจารณาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion assay แล้วพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus brevis* มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบคือ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium columnare* ได้ดีกว่า *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (ตารางที่ 2 และ 3) อันบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์นี้ผลิตขึ้น ดังนั้น *Lactobacillus brevis* ที่แยกได้จากการศึกษารังนี้จึงควรถูกพิจารณาในฐานะแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *Aeromonas hydrophila* AHQ001, 002, *Streptococcus agalactiae* SAAQ001, 002 และ *Flavobacterium columnare* FCAQ001, 002 ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับค่า pH (cell-free culture supernatants) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

แบคทีเรียกรดแลคติก	แบคทีเรียทดสอบ					
	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน), mm ^a					
	AHAQH 001	AHAQH 002	SAAQH 001	SAAQH 002	FCAQH 001	FCAQH 002
<i>Enterococcus</i> sp. (n=6)	6.6(0.01) Bb	8.8(0.03) Bb	7.2(0.03) Bb	7.3(0.01) Bb	16.8(0.03) Aab	16.0(0.04) Aa
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (n=2)	7.1(0.01) Bb	9.0(0.01) Bb	7.2(0.04) Bb	7.3(0.01) Bb	15.6(0.01) Ab	16.0(0.03) Aa
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=1)	16.0(0.05) Aa	16.0(0.03))Aa	14.5(0.05))Aa	15.6(0.03))Aa	17.0(0.00) Aa	16.0(0.10) Aa

^aอักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลท (แนวนอน)

อักษรตัวพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบความสามารถของสารยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (แนวตั้ง)

ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *Aeromonas hydrophila* AHQH001,002, *Streptococcus agalactiae* SAAQH001, 002 และ *Flavobacterium columnare* FCAQH001, 002 โดยสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับค่า pH (neutralized culture supernatants) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

แบคทีเรียกรดแลคติก	แบคทีเรียทดสอบ					
	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน), mm ^a					
	AHAQH 001	AHAQH 002	SAAQH 001	SAAQH 002	FCAQH 001	FCAQH 002
<i>Enterococcus</i> sp. (n=6)	6.4(0.02)* Ab	6.6(0.02) Ab	6.3(0.02) Ab	6.5(0.02) Ab	6.4(0.02) Ab	6.6(0.01) Ab
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (n=2)	6.3(0.00) Ab	6.3(0.00) Ab	6.2(0.01) Ab	6.1(0.02) Ab	6.2(0.02) Ab	6.7(0.02) Ab
<i>Lactobacillus brevis</i> (n=1)	10.8(0.05) Aa	10.7(0.03) Aa	10.5(0.08) ABa	10.2(0.07) Aa	8.9(0.02) Ca	9.0(0.03) BCa

^aอักษรตัวพิมพ์ใหญ่แสดงการเปรียบเทียบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต (แนวนอน)

อักษรตัวพิมพ์เล็กแสดงการเปรียบเทียบความสามารถของสารยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (แนวตั้ง)

ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานความร่วมมือเพื่อการพัฒนาระหว่างประเทศ (สพร.) กระทรวงการต่างประเทศ และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

- [1] กรมประมง. 2543. "การเพาะเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย." จุลสาร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 30 หน้า
- [2] Na Nakorn, U., Kamonrat W. and Ngamsiri T. 2004. 'Genetic Diversity of Walking Catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and Evidence of Genetic Introgression from Introduced Farmed *C. gariepinus*.' **Aquac.** 240: 145-163.
- [3] Senanan, W. and et al. 2004. "Genetic Impacts of Hybrid Catfish Farming (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) on Native

Catfish Populations in Central Thailand."

Aquac. 235: 167-184.

- [4] Panpommin, D., Poompuang S. and Srisapoom. P. 2008. "Molecular Characterization and Seasonal Expression of Vitellogenin Gene from Gunther's Walking Catfish *Clarias macrocephalus*." **Aquac.** 276: 60-68.
- [5] โสภา อาริรัตน์ และอุมาลัย สะตวกดี. 2534. "โรคปลาดุกอุยในบ่อเลี้ยง." ใน: รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2534. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง.
- [6] Verschuere, L. and et al. 2000. "Probiotic Bacteria as Biological Control Agent in Aquaculture." **Microbiol Mol Biol Rev** 64: 655-671.
- [7] Pirarat, N., and et al. 2006. "Protective Effects and Mechanisms of a Probiotic Bacterium

- Lactobacillus rhamnosus* against Experimental *Edwardsiella tarda* Infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)." **Vet Immunol Immunophatol.** 113: 339-347.
- [8] Strom, E. and Ringo E. 1993. "Changes in the Bacterial Composition of Early Developing Cod, *Gadus morhua* (L.) Larvae Following Inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the Water." In **Physiology and Biochemical Aspects of Fish Development**, edited by B.T. Walther and H.J. Fyhn. Bergen, University of Bergen.
- [9] Ringo, E. and Gatesoupe F.J. 1998. "Lactic Acid Bacteria in Fish: Review." **Aquac.** 160:177-203.
- [10] Ringo, E. and et al. 2003. "Electron Microscopy of the Intestinal Microflora of Fish." **Aquac.** 227 395-415.
- [11] Sugita, H, Miyajima C. and Deguchi Y. 1991. "The Vitamin B12 Producing Ability of the Intestinal Microflora of Fresh-Water Fish." **Aquac.** 92: 267-276.
- [12] Ringo, E. and Birkbeck T.K. 1999. "Intestinal Microflora of Fish Larvae and Fry." **Aquac. Res** 30: 73-93.
- [13] Olafsen, J.A. 2001. "Interactions between Fish Larvae and Bacteria in Marine Aquaculture." **Aquac.** 200: 223-247.
- [14] Sugita, H. and et al. 2002. "Antibacterial Abilities of Intestinal Bacteria from Larval and Juvenile Japanese Flounder against Fish Pathogens." **Fish Sci** .68: 1004-1011.
- [15] Gomes, G.D. and J.L. Balcazar. 2008. "A Review on the Interactions between Gut Microbiota and Innate Immunity of Fish." **FEMS Immunol Med Microbiol.** 52: 145-154.
- [16] Axelsson, L. 1998. "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology". In **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**, edited by S. Salminen, A. von Wright. New York: Marcel Dekker Inc.
- [17] Perez-Sanchez, T. and et al. 2013. "Probiotics in Aquaculture: a Current Assessment." **Rev Aquac.** 5: 1-14.
- [18] Farzanfar, A. 2006. "The Use of Probiotics in Shrimp Aquaculture." **FEMS Immunol & Med Microbiol.** 48 (2): 149-158.
- [19] Rammelsberg, M. and Radler F. 1990. "Antibacterial Polypeptides of *Lactobacillus* species." **J Appl Bacteriol** .69: 177-184.
- [20] Gilliland, S.E. and Speck M.L. 1972. Interactions of Food Starter Cultures and Foodborne Pathogens: Lactic Streptococci versus Staphylococci and Salmonellae." **J Milk Food Technol.** 35: 307-310.
- [21] Cadirci, B.H. and Citak S. 2005. "A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria." **Pak J Nutr** 4(4): 237-241.
- [22] Lima, E.D. and et al. 2007. "Evaluation in Vitro of the Antagonistic Substances Produced by *Lactobacillus* spp. Isolated from Chickens." **Can J Vet Res** 71: 103-107.
- [23] Mayr-Harting, A., Hedges A.J. and Berkeley R.C.W. 1972. "Medthods for Studying Bacteriocins". In **Medthods in Microbiology**, edited by J.R. Norris and D.W. Ribbons. Now York: Academic Press
- [24] Demerdash, H.E. and Mostafa H. 2008. "Antimicrobial Activity of Lactobacilli and Bifidobacteria Isolations." **J Genet Eng Biotechnol.** 6 (2): 9-14