

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากน้ำล้างการแปรรูปปลาเพื่อใช้เป็น ส่วนผสมในอาหารเลี้ยงปลานิล

Selection of bacteria with probiotic properties from fish processing wastewater for use as ingredient in *Oreochromis niloticus* (nile tilapia) feed

นิศารัตน์ ตามสมัค^{1*} และ สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์²

Nisarath Thamsamak¹ and Sukhan Rattanloedanusorn²

Received: 11 August 2023 ; Revised: 27 October 2023 ; Accepted: 20 March 2024

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากน้ำล้างการแปรรูปปลา และศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติกเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงปลานิล จากการคัดแยกและจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ FM7 FM11 และ FM12 ที่แยกจากน้ำล้างปลา พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส และไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ ยังสามารถเจริญเติบโตที่ความเป็นกรดต่างในช่วง 2 -10, NaCl ความเข้มข้น 0-10 % (w/v) และน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลานิลที่มีความเข้มข้น 0, 10, 30 และ 50 % (v/v) การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธี Antagonistic test ปรากฏว่าเฉพาะไอโซเลท FM11 แสดงบริเวณยับยั้ง จากการจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลด้วย VITEK[®] 2 Compact และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ตามลำดับ พบว่าไอโซเลท FM11 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus siamensis* KCTC13613 ที่ความเหมือน 99.77 % ผลการเจริญเติบโตของปลานิล ด้วยการผสม 0.3 % แบคทีเรียโพรไบโอติก ในอาหารเลี้ยงปลา พบว่าการเพาะเลี้ยงปลานิลด้วยแบคทีเรีย *B. siamensis* ไอโซเลท FM11 ปลานิลเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเท่ากับ 2.15 ± 0.13 กรัมต่อตัวต่อวัน และมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 87.50 ± 5.89 % ส่วนการเลี้ยงปลาด้วยอาหารเลี้ยงปลาอย่างเดียวน้ำหนักเท่ากับ 0.96 ± 0.11 กรัมต่อตัวต่อวัน อัตราการรอดชีวิต 79.17 ± 29.46 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้น จึงควรเลี้ยงปลานิลโดยให้อาหารร่วมกับแบคทีเรียโพรไบโอติกไอโซเลท FM11 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงปลานิล ส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มน้ำหนัก และเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ซึ่งทดแทนการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเลี้ยงปลาแบบดั้งเดิมเพียงอย่างเดียวได้

คำสำคัญ: การคัดเลือก, การจำแนกลักษณะ, แบคทีเรีย, โพรไบโอติก, น้ำล้างจากกระบวนการแปรรูปปลา, ปลานิล

Abstract

The aim of this research was to select bacteria with probiotic properties from fish processing wastewater and to investigate the effects of using probiotics as an ingredient in feed for Nile tilapia. The isolation and morphological characterization of bacteria including FM7 FM11 and FM12 from fish processing wastewater, found that all isolates could produce protease and amylase enzymes without blood hydrolysis. In addition, all isolates also grow at the pH range of 2.0-10.0, NaCl concentration of 0-10% (w/v), and in fresh sterile bile of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) in the concentration of 10, 30, and 50% (v/v). The pathogenic inhibition of *Aeromonas hydrophila* by antagonistic test revealed that only isolate FM11 showed the inhibition zone. The biochemical and molecular identification by VITEK[®] 2 Compact and 16S rRNA gene sequencing found that isolate FM11 was closely related to *Bacillus siamensis* KCTC13613

¹ นักศึกษาปริญญาโทบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

อีเมล: nisarath_t@mail.mutt.ac.th

² อาจารย์สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อีเมล: sukhana@mail.mutt.ac.th

¹ Student, Department of Applied Biotechnology, Faculty of Science and Technology Rajamangala University of Technology Thanyaburi

² Lecture, Department of Applied Biotechnology, Faculty of Science and Technology Rajamangala University of Technology Thanyaburi

* Corresponding author: nisarath_t@mail.mutt.ac.th

with an identity of 99.77%. The growth measurement of Nile tilapia with 0.3 percent (v/W) probiotic bacteria mixed with feed found that the highest growth was found when culturing Nile tilapia with *B. siamensis* isolate FM11 with a weight of 2.15 ± 0.13 g/fish/day. The survival rate was $87.50 \pm 5.89\%$. While culturing with feed only, the weight was 0.96 ± 0.11 g/fish/day with a survival rate of 79.17 ± 29.46 with statistical significance ($P < 0.05$). Therefore, Nile tilapia should be fed by the conventional feed together with the bacterial isolate FM11 for promotion of the efficiency of the tilapia feed to increase growth, weight gain, and survival rates, which can replace the sole conventional feed.

Keywords: Selection, Characterization, Bacteria, Probiotic, Fish processing wastewater, *Oreochromis niloticus*

บทนำ

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปปลาและสัตว์น้ำ มักมีการทิ้งวัสดุเหลือทิ้งหลังจากการแปรรูป เช่น หัว หาง และไส้ รวมถึงปล่อยน้ำล้างจากการแปรรูปปลาสู่แหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อม หากโรงงานปล่อยน้ำล้างจากการกระบวนการแปรรูปปลา เป็นระยะเวลานาน ๆ จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม คือ ค่าพีเอช (pH) บีโอดี (BOD) ซีโอดี (COD) ปริมาณไนโตรเจนรวม (Total nitrogen) และปริมาณฟอสฟอรัสรวม (Total phosphorus) สูงเกินค่ามาตรฐานที่กรมควบคุมมลพิษกำหนด (Watson *et al.*, 2013) ประกอบในปัจจุบัน ได้มีการนำน้ำและวัสดุเหลือทิ้ง นำกลับมาใช้ประโยชน์ควบคู่ไปกับการบำบัดน้ำทิ้งด้วยธรรมชาติ เช่น น้ำล้างปลา ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปปลา สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ในกระบวนการหมัก โดยใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic microbe)

จากการคัดแยกและการจำแนก การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic) และหัวเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microbe) บนวัสดุอินทรีย์ธรรมชาติ การสกัดสารชีวภาพร่วมกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และโพรไบโอติก ได้แก่ ยีสต์ *Candida ethanolica*, แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, รา *Aspergillus* sp., *Trichoderma asperellum*, *Gliocladium* sp. และ *Penicillium* sp. เพื่อช่วยเร่งการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งให้กลายเป็นสารสกัดชีวภาพที่ประกอบด้วยสารอาหารหลัก สารอาหารรองและสารอาหารเสริมที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก กรดอะมิโนประมาณ 20 ชนิด น้ำตาลรีดิคซ์ กรดแลกติก เกลือแร่ และวิตามินอื่น ๆ หลังกระบวนการย่อยสลายของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) เอนไซม์อะไมเลส (amylase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์แลกเคส (laccase) เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เอนไซม์ไคเนส (kinase) ซึ่งสารสกัดชีวภาพจากกลไกจุลินทรีย์นี้ มีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ (Hanafy *et al.*, 2016) เพิ่มการเจริญเติบโต (Park *et al.*, 2016) เพิ่มภูมิคุ้มกัน (Duarate *et al.*, 2015) เพิ่มรสชาติ ลดต้นทุน ลดสารอันตราย ลดไนเตรตสะสมที่มีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค จากการใช้

สารเคมีกำจัดวัชพืช สารเคมีควบคุมโรคพืชและไล่ศัตรูแมลง ปรับสภาพน้ำและดิน เพื่อผลิตคุณภาพผลผลิตเกษตร ตามมาตรฐานอินทรีย์ไทย (organic Thailand) (Frank, 2005; Ahemad and Malik, 2012; Park *et al.*, 2016) ต่อมา นักวิจัยสุกาญจน์ ร่วมกับสถานประกอบ จึงพัฒนาการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกแบคทีเรียธรรมชาติ *Bacillus subtilis* จุลินทรีย์ปฏิปักษ์รา *Trichoderma asperellum* บนสารอินทรีย์นาโนด้วยชีวเทคโนโลยีและนาโนเทคโนโลยี มาตรฐาน Q และมาตรฐาน IFOAM ภายใต้เครื่องหมายการค้า THAN ในเชิงพาณิชย์ (Organic agriculture certification Thailand, 2018) สำหรับการนำหัวเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ไปใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรโดยการนำชีวภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมกับปุ๋ยชีวภาพหรือปุ๋ยอินทรีย์ ด้านการประมงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยการผสมกับอาหารเลี้ยงปลา สัตว์เลี้ยง ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และด้านการปลูกพืชสวน เพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต เพิ่มภูมิคุ้มกันในการต้านโรคพืช เพิ่มอัตราการรอดลดสารเคมีอันตรายที่มีผลต่อสุขภาพ และช่วยปรับปรุงสภาพน้ำและดิน อื่น ๆ อย่างแพร่หลาย (Mishra and Prasad, 2005; Hanafy *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016; Behera *et al.*, 2017; Rattanaloeadnusorn, 2017; Rattanaloeadnusorn, 2020)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก จากน้ำล้างในกระบวนการแปรรูปปลา การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ การจำแนกทางชีวเคมีโดย vitex 2 compact และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก ผสมกับอาหารเลี้ยงปลานิล ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพอาหารปลา ทดแทนการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารปลาเพียงอย่างเดียว

วิธีการวิจัย

1. การสุ่มเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำล้างจากการแปรรูปปลา

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำล้างจากการแปรรูปปลาของโรงงานแปรรูปตัดแต่งปลา ตำบลโคกขาม อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 3 จุด ได้แก่ น้ำล้างก่อนตัดแต่ง

ปลา (Fm1) น้ำล้างหลังจากกระบวนการตัดแต่งปลา (Fm2) และน้ำทิ้งในบ่อพัก (Fm3) สุ่มเก็บน้ำล้างปลาแต่ละจุดจำนวน 30 ตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลักษณะกายภาพของน้ำล้างจากการแปรรูปปลา ได้แก่ ค่า pH ด้วยเครื่อง pH Meter ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl Method ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (TDS) โดยวิธีทำแห้งที่ 103-105 องศาเซลเซียส ค่าบีโอดี (BOD) โดยวิธี Azide modification ที่ปรับปรุงจากวิธี Winkler method ค่าซีโอดี COD โดยวิธี Rapid COD (Apha *et al.*, 1980) และปริมาณไขมันและน้ำมันด้วยวิธี Soxhlet ปริมาณ Total phosphorus (George and Latimer, 2016) และการย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ตามวิธีของ (Hanafy *et al.*, 2016)

2. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ภายนอกเซลล์

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำล้างปลา ในห้องปฏิบัติการตามวิธีของ (Korgdahl *et al.*, 2005; Harikrishna *et al.*, 2017) โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% (v/v) และเจือจางครั้งละ 10 เท่า (Ten-fold serial dilution) จนถึงความเข้มข้น 10^{-6} จากนั้นนำน้ำล้างปลาที่เจือจาง ในแต่ละความเข้มข้น เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่เติมสารตั้งต้นโปรตีน แป้ง และไขมัน ได้แก่ Skimmed milk ร้อยละ 10 เติมน้ำละลาย starch ร้อยละ 0.2 และน้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของโคโลนี คัดเลือกจุลินทรีย์แบคทีเรียที่สร้างโซนใส (clear zone) ไปทดสอบเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส ในลำดับต่อไปจนกระทั่งได้ single colony ก่อน แล้วจึงนำ single colony ที่แยกได้ไปทดสอบการหลั่งเอนไซม์ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย และจำแนกชนิดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Abushelaibi *et al.*, 2017)

3. ทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.1 การทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยการศึกษาการย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ตามวิธีของ (Hanafy *et al.*, 2016) โดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกลงในอาหาร Blood agar นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณที่เชื้อเชื่อว่าเกิดโซนใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียคือกลุ่ม Beta-hemolysis (β) แบคทีเรียมีความสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงและเกิดโซนใสสีเขียวรอบโคโลนีของแบคทีเรียคือกลุ่ม Alpha-hemolysis (α) และกลุ่ม Gamma-hemolysis (γ) หรือโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าแบคทีเรียไม่มีความสามารถย่อยเม็ดเลือดแดง

3.2 ความทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของ NaCl, pH และน้ำดีส (ดัดแปลงจาก Wang *et al.*, 2010)

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง ศึกษาการเจริญเติบโตในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 0 ถึง 10% (w/v) ทดสอบความทนต่อกรดและด่างที่มีค่า pH 2.0-10.0 และความทนต่อน้ำดีสของปลานิลเข้มข้น 0, 10, 30 และ 50% (w/v) โดยเตรียมผสมกับสารละลายเกลือน้ำดี (Bile salt) ที่มีความเข้มข้น 0.3% (v/v) นำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนิ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยมีเกลือน้ำดีไม่เติมน้ำดีส (pH 6.2) เป็นชุดควบคุมและเติมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ 10^7 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6-12 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (Hanafy *et al.*, 2016) ตรวจดูการเจริญเติบโตของเชือบนผิวหน้าอาหารของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยวิธีนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total plate count)

4. การทดสอบคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคตามวิธีของ Hanafy *et al.*, 2016 โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โดยถ่ายเชื้อและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Spellhaug and Harlander, 1989) นำเชือดังกล่าว streak บนอาหารเป็นเส้นเดียวส่วนเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกได้นำมาเลี้ยงในอาหาร NA อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง มา streak ทับลงบนอาหารที่ streak เชื้อก่อโรคก่อนหน้า โดยขีดในแนวกากบาททับกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อที่คัดแยกจากน้ำล้างปลากับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

5. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้ ศึกษาลักษณะ สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Bowman, 2005) ร่วมกับการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียทางชีวเคมีโดยวิธี Vitex 2 compact จำแนกแบคทีเรียระดับสปีชีส์ ด้วยวิธี molecular technique โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บริเวณ 16S rRNA ด้วยวิธี BLASTN เพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ที่ website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> และสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อที่คัดแยกได้โดยใช้โปรแกรม MEGA11 ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining method

6. การทดสอบการเติบโตและการรอดชีวิตของลูกปลานิลด้วย 0.3 เปอร์เซ็นต์โพรไบโอติกที่คัดแยกและโพรไบโอติกทางการค้า ผสมอาหารเลี้ยงปลานิลสำเร็จรูป

น้ำแบคทีเรียโพรไบโอติกขยายในอาหารเหลว NB ที่เข้มข้นมากกว่า 10^7 CFU/ml และนำทำแห้งแบบฟลินฟอยตามวิธีของ (Fronson and Mary, 1980; Guerra *et al.*, 2017; Rattanaloeadnusorn, 2017) หลังจากนั้น จึงนำ 0.3% ของผงจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากน้ำล้างปลา และโพรไบโอติกในเชิงพาณิชย์ (THAN) 3 สูตรปริมาณ 0.3% ผสมกับอาหารเลี้ยงปลานิลและเคลือบผิวด้วยน้ำมันน้ำมันพืช เพื่อนำไปเลี้ยงลูกปลานิล ที่มีน้ำหนัก ตัวเริ่มต้นเฉลี่ย 8.84 ถึง 8.90 กรัม โดยเฉพาะเลี้ยงในถังไฟเบอร์ที่มีความจุประมาณ 50 ลิตร จำนวน 10 ตัวต่อถัง ที่มีการให้ออกซิเจนตลอด 24 ชั่วโมง ให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน คือ เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. คูดตะกอนทุก ๆ 3 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทุก ๆ 7 วัน โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปยี่ห้อไฮเกรต ที่มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม)

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมโพรไบโอติก FM11 ที่ได้จากการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำล้างแปรรูปปลา นำมา 0.3 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 CFU/g

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมเชื้อโพรไบโอติกทางการค้า *T. asperellum* THAN13 0.3 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 CFU/g

กลุ่มทดลองที่ 4 (T4) เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมเชื้อโพรไบโอติกทางการค้า *B. subtilis* และ *T. asperellum* THAN2 0.3 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 CFU/g

กลุ่มทดลองที่ 5 (T5) เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมเชื้อโพรไบโอติกทางการค้า *B. subtilis* THAN14 0.3 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 CFU/g

บันทึกผลวันที่ 0, 10, 20 และ 30 โดยชั่งน้ำหนักปลาทั้งหมด น้ำหนักอาหารที่เหลือ และจำนวนปลาที่รอดชีวิต เพื่อนำไปคำนวณหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดชีวิต

วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way-ANOVA) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 15.0

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ผลการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่พบในน้ำล้างปลาของโรงงาน

จากการศึกษาลักษณะกายภาพของน้ำล้างปลา 3 จุด ได้แก่ 1) น้ำล้างก่อนตัดแต่ง (Fm1) 2) น้ำล้างหลังตัดแต่งเพื่อเอาส่วนที่เป็นของแข็ง ได้แก่ เกล็ด ก้าง หัว หาง ไส้ และส่วนที่เป็นของเหลว เมื่อกลั่นและกรองผ่านตะแกรง เพื่อแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกก่อนที่จะมีการปล่อยลงสู่อบฟัก (Fm2) และ 3) น้ำล้างในบ่อพัก ก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Fm3) ดังนี้

คุณลักษณะของน้ำล้างจากการแปรรูปปลา เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำล้างจากการแปรรูปปลาของโรงงาน จำนวน 3 จุด และวิเคราะห์ลักษณะกายภาพ ปรากฏว่าคุณลักษณะกายภาพบริเวณจุดน้ำล้างในบ่อพัก มีปริมาณ Total nitrogen, Total fat, Total phosphorus, TDS, BOD, COD และ pH มากกว่าจุด น้ำล้างหลังการตัดแต่ง และน้ำล้างก่อนตัดแต่ง ตามลำดับ

Table 1 Effluent quality of fish wash water.

Constituent	fish washing water sampling		
	Fm1(n=30)	Fm2(n=30)	Fm3(n=30)
pH	7.0±0.2	6.3±0.2	7.9±0.2
Total N (mg/l)	1.56±0.40	14.06±1.42	131.98±2.22
TDS (mg/l)	4.44±0.54	333.01±34.76	412.11±180.43
BOD (mg/l)	5.75±0.66	15.12±2.75	26.88±2.54
COD (mg/l)	4.27±0.30	17.67±0.66	36.03±0.44
Total fat (mg/l)	0.0±0.00	3.49±0.12	5.69±0.43
Total P (mg/l)	0.02±0.00	0.004±0.00	0.36±0.01

Fm1 Fish washing water before cutting of cobia fish.

Fm2 Fish washing water after cutting of cobia fish. Fm3 Fish washing water in septic tank.

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย จากน้ำล้างก่อนตัดแต่ง น้ำล้างหลังการตัดแต่ง และน้ำล้างในบ่อพัก พบเชื้อแบคทีเรียเฉพาะจุด น้ำล้างหลังการตัดแต่ง และน้ำล้างในบ่อพักเท่านั้น จำนวน 13 ไอโซเลท (FM1-FM13) ผลการทดสอบสมบัติสร้างและหลั่งเอนไซม์ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก พบแบคทีเรียโพรไบโอติก 3 ไอโซเลท คือ FM7 FM11 และ FM12 ที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ในอาหาร blood agar ให้ผลเป็นแบบแอมมา (γ) คือไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนีเชื้อ (Hanafy *et al.*, 2016) นอกจากนี้ ไอโซเลท FM7 FM11 และ FM12 ยังมีกรหลังเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลส ออกสู่ภายนอกเซลล์ (Harikrishna *et al.*, 2017) ดัง Table 2

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติก ไอโซเลท FM7 FM11 และ FM12 ที่มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวภายใต้สภาวะ pH 2.0-10.0 เกลือ NaCl 1-10%(w/v) และน้ำดีปลานิลปลอดเชื้อ 0-50%(v/v) พบว่าที่ pH 2 มีจำนวนเชื้อเฉลี่ย $5.24 \pm 0.01 \log \text{CFU/ml}$ ที่ pH 8 มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย FM12 เท่ากับ 9.86 ± 0.02 , FM7 เท่ากับ 9.66 ± 0.08 และ FM11 เท่ากับ $9.58 \pm 0.05 \log \text{CFU/}$

ml ตามลำดับแสดงว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรดแก่ pH 2-8 (Figure 1) นอกจากนี้แบคทีเรียโพรไบโอติกนี้ยังสามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นระดับ 0-10 %(w/v) ดัง Figure 2 และแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในน้ำดีสดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-50 %(v/v) ได้ ดัง Figure 3

Table 2 Extracellular enzyme production of bacteria and hemolysis test

Isolates	Sampling	Colony morphology	Protease	Amylase	Hemolysis test
FM0	Fm1	No enzyme producing	-	-	-
FM1	Fm2	Opaque, Convex Oval shape, Pale white, Entire and Gram negative	++	-	β
FM2	Fm2	Opaque, Flat, Round shape, Pale white, Entire and Gram positive	+	-	α
FM3	Fm2	Opaque, Umbonate, Round shape, White, Undulate, and Gram positive	+	-	α
FM4	Fm2	Transparent, Flat Round shape, White, Entire and Gram negative	++	-	β
FM5	Fm2	Opaque, Convex, Round shape, Pale white, Entire and Gram positive	+	-	α
FM6	Fm2	Opaque, Flat, Irregular shape, White, Undulate and Gram positive	+	-	α
FM7	Fm2	Opaque, Convex, Irregular shape, White, Undulate and Gram positive	+	+++	γ
FM8	Fm3	Opaque, Umbonate, Filamentous shape, White, Undulate and Gram positive	++	-	α
FM9	Fm3	Transparent, Flat, Round shape, White, Undulate and Gram negative	+++	-	β
FM10	Fm3	Opaque, Raised, Round shape, White, Undulate and Gram positive	+++	-	β
FM11	Fm3	Transparent, Raised, Round shape White, Entire and Gram positive	+++	+++	γ
FM12	Fm3	Opaque, Flat, Round shape White, Entire and Gram positive	++	++	γ
FM13	Fm3	Opaque, Flat, Irregular shape, White, Undulate and Gram negative	++	-	β

- = Negative result, + = Diameter of clear zone < 10 mm, ++ = Diameter of clear zone 10.1-20.0 mm and +++ = Diameter of clear zone 20.1-30.0 mm

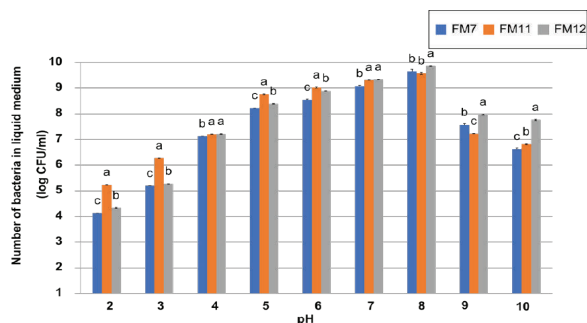


Figure 1 Growth of bacteria in culture media at pH 2.0-10.0. Different letters (above each bar) indicate a significant difference between mean of each sample ($P < 0.05$).

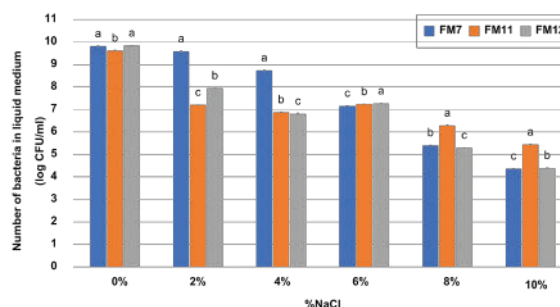


Figure 2 Growth of bacteria in culture media with a 0-10% (w/v) NaCl. Different letters (above each bar) indicate a significant difference between mean of each sample ($P < 0.05$).

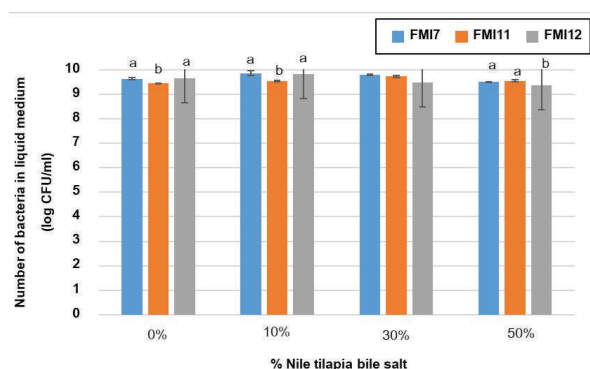


Figure 3 Growth of bacteria in culture media with a Nile tilapia bile salt at 0-50% (v/v). Different letters (above each bar) indicate a significant difference between mean of each sample ($P < 0.05$).

การทดสอบกับเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ *A. hydrophila* พบว่าไอโซเลท FM7 และ FM12 ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ แต่ไอโซเลท FM11 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคลายพันธุ์ *A. hydrophila* ได้ โดยมีการสร้างโซนใสระหว่างไอโซเลท FM11 และ *A. hydrophila* ดัง Figure 4 จากการจัดจำแนกแบคทีเรียโปรไบโอติกไอโซเลท FM11 จากลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท FM11 มีลักษณะเป็นท่อนยาว แกรมบวก ดัง Figure 5 ส่วนผลการทดสอบทางชีวเคมีโดย vitex 2 compact พบว่าไอโซเลท FM11 มีคุณสมบัติเหมือนกับ *B. siamensis* ดัง Table 3 เมื่อจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ด้วยวิธี BLASTN ของแบคทีเรียโปรไบโอติก ไอโซเลท FM11 เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ของ NCBI พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท FM11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ *B. siamensis* KCTC13613 โดยมีความเหมือนเท่ากับ 99.77 เปอร์เซ็นต์ *B. subtilis* NCIB3610 99.62 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DSM7 99.55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำยีน 16S rRNA ของไอโซเลท

FM11 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree ดัง Figure 6 พบว่าไอโซเลท FM11 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *B. siamensis* KCTC13613AJ^T (VF01000043)

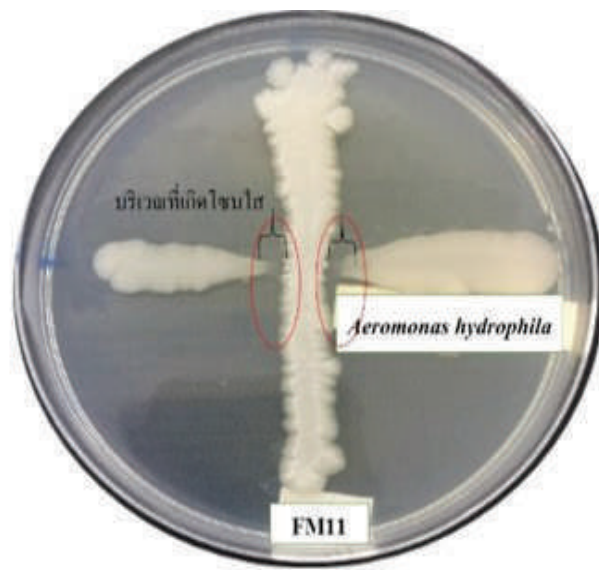


Figure 4 The formation of a clear zone of the bacterial isolate FM11 inhibiting the *A. hydrophila*.

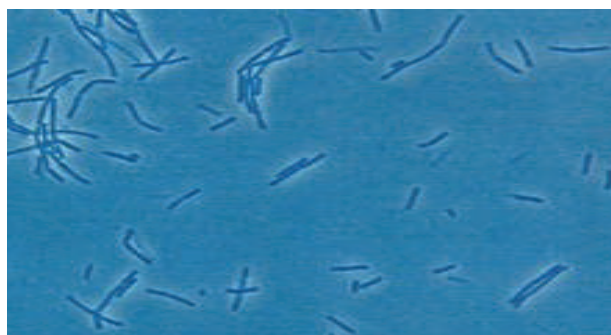


Figure 5 Cell morphology of probiotic bacteria isolate FM11.

Table 3 Biochemical tests by Vitex 2 compact of probiotic bacteria isolate FM11.

Biochemical test	Result	Biochemical test	Result
Gram stain	positive	Glycine arylamidase	-
β -xylosidase	+	D-mannitol	+
L-lysine arylamidase	-	D-mannose	+
L-aspartate arylamidase	-	D-melezitose	-
Leucine arylamidase	(+)	N-acetyl-D-glucosamine	-
Phenylalanine arylamidase	+	Palatinose	+
L-pyrrolidonyl arylamidase	-	L-rhamnose	-

Table 3 Biochemical tests by Vitex 2 compact of probiotic bacteria isolate FM11. (cont.)

Biochemical test	Result	Biochemical test	Result
β -galactosidase	-	β -glucosidase	+
L-pyrrolidonyl arylamidase	+	β -mannosidase	-
α -galactosidase	+	Phosphoryl choline	-
Alanine arylamidase	-	Pyruvate	-
Tyrosine arylamidase	+	α -glucosidase	-
β -N-acetyl-glucosaminidase	-	D-tagatose	-
Ala-Phe-Pro arylamidase	(-)	D-thehalose	-
Cyclodextrine	-	Inulin	-
D-galactose	-	D-glucose	+
Glycogene	-	D-ribose	(-)
Myo-inositol	-	Putrescine assimilation	-
Methyl- α -D-glucopyranoside acidification	+	Growth in 6.5% NaCl	+
Ellman	-	Kanamycin resistance	-
Methyl-D-xyloside	-	Oleandomycin resistance	-
α -mannosidase	-	Esculin hydrolyse	+
Maltotriose	-	Tetrazolium red	-
		Polymixin_B resistance	-

(+) = Weak-positive reaction; + = Positive reaction; (-) = Weak-negative reaction
and - = Negative reaction

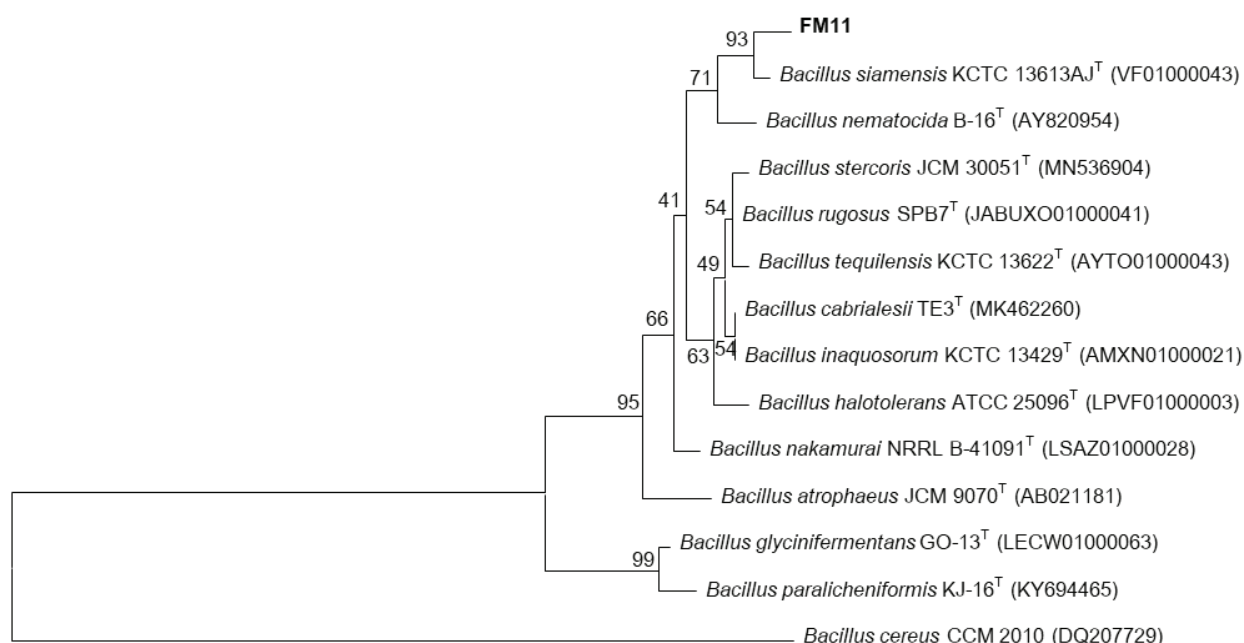


Figure 6 Phylogenetic relationships of FM11 with some species of the genus *Bacillus* and related taxa based on 16S rRNA gene sequence analysis. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method Alignment with ClustalW with Bioedit program and Sequence phylogenetic tree with MEGA11 program.

Table 4 Comparison of nile tilapia growth and water quality

Parameters	Treatments				
	T1(n=30)	T2(n=30)	T3(n=30)	T4(n=30)	T5(n=30)
Initial weight (g)	8.93±0.06	8.94±0.07	8.94±0.80	8.88±1.00	8.84±0.91
Final weight (g)	11.93±0.33 ^c	17.06±0.53 ^a	13.17±1.54 ^{bc}	14.04±2.94 ^b	14.11±1.99 ^b
Average daily weight gain (g/day)	0.96±0.1 ^{1c}	2.15±0.13 ^a	1.29±0.02 ^{bc}	1.52±0.27 ^b	1.56±0.02 ^b
Feed conversion ratio (FCR)	2.97±1.18	2.32±0.10	2.00±0.04	2.04±0.15	2.06±0.04
Survival rate (%)	79.17±29.46	87.50±5.89	100±0.00	100±0.00	100±0.00
Temperature (°C)	25.33±0.58	26.33±1.53	26.00±0.00	26.67±0.58	27.00±1.00
pH	7.00±0.50	6.93±0.51	7.10±0.36	6.70±0.20	6.67±0.29
DO (mg/l)	4.17±0.76 ^{bc}	4.83±0.29 ^a	4.83±0.29 ^a	3.90±0.53 ^{bc}	4.33±0.29 ^b

The different letters in the same row indicated statistically significant difference ($P < 0.05$)

2. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการเติบโตและรอดชีวิตของลูกปลานิล

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดชีวิตของลูกปลานิล เมื่อนำ 0.3 เปอร์เซ็นต์แบคทีเรียโพรไบโอติก ไอโซเลท FM11 และโพรไบโอติก ในเชิงพาณิชย์ 3 ชนิด คือ รา *T. asperellum* (T3), รา *T. asperellum* และแบคทีเรีย *B. subtilis* และแบคทีเรีย *B. subtilis* (T5) ปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวนเชื้อมากกว่า 10^7 CFU/g ผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้เฉพาะอาหารปลาอย่างเดี่ยว (T1) การเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกดีขึ้น โดยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติก ($P < 0.05$) ดังนี้ (Table 4) คือ ผลน้ำหนักสุดท้ายที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโพรไบโอติกปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ ไอโซเลท FM11 (T2) ดีที่สุด (2.15 ± 0.13 กรัมต่อตัวต่อวัน) รองลงมาแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtilis* (T5) (1.56 ± 0.02 กรัมต่อตัวต่อวัน) ราและแบคทีเรีย (T4) (1.52 ± 0.27 กรัมต่อตัวต่อวัน) และรา *T. asperellum* (T3) (1.29 ± 0.02 กรัมต่อตัวต่อวัน) ตามลำดับ

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม 0.3 เปอร์เซ็นต์โพรไบโอติก มีแนวโน้มต่ำกว่าชุดทดลองอื่น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดัง Table 4 (Park *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017) และอัตราการรอดชีวิตของปลา ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม 0.3 เปอร์เซ็นต์โพรไบโอติกไอโซเลท FM11 มีอัตราการรอดตาย 87.50 ± 5.89 เปอร์เซ็นต์ แต่แบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtilis* (T5) และราและแบคทีเรีย (T4) มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งการที่การเจริญเติบโตของปลาที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติก เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกมีส่วนช่วยเร่งย่อยสลายสารประกอบอาหารหลักและเสริม ที่มีขนาดเล็กโมเลกุลเล็ก ๆ กรดอะมิโน 20 ชนิด น้ำตาลรีดิวซ์ เอนไซม์โปรติเอส (protease) อะไมเลส ไลเปส เพอร์ออกซิเดส ไคเนส และกรดแลกติก อื่นๆ ที่ช่วยในการชักนำการเจริญเติบโต (ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปลานิลได้ดี (Inoue *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2016; Afrilasari *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Villamil *et al.*, 2017; Rattanaloeadnusorn, 2017) นอกจากนี้ แบคทีเรียโพรไบโอติกช่วยกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ทำให้เม็ดเลือดแดงมีความสมบูรณ์ และสามารถผลิตสาร Bacteriocin ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Aeromonas hydrophila* (Sumpavaporn *et al.*, 2010; Selim and Reda, 2015; Meidong *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Harikrishna *et al.*, 2017; Jahangiri *et al.*, 2018) การยืดเกาะส่วนผนังลำไส้และร่องวิลไล (Villi) และการแย่งพื้นที่การเกาะติดผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียโพรไบโอติก ที่แยกจากน้ำล้างในการแปรรูปปลา จำนวน 13 ไอโซเลท พบแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ FM7 FM11 และ FM12 ที่สามารถผลิตและผลิตเอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลส แบคทีเรีย และเจริญเติบโตได้ ที่ความเป็นกรดต่าง pH 2-10 ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0-10% (v/v) และในน้ำดีสทอปอดเชื้อของปลานิลที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-50% (v/v) แต่ไม่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้

แบคทีเรียโพรไบโอติก ไอโซเลท FM11 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ได้ ซึ่งผลการจำแนกแบคทีเรียโพรไบโอติก ไอโซเลท FM11 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีโดยวิธี Vitex 2 compact และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA พบว่าไอโซเลท FM11 พบว่ามีความคล้ายกับ *B. siamensis* KCTC13613 99.77 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. siamensis* ไอโซเลท FM11 ปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10^7 CFU/g ผสมกับอาหารปลา ปรากฏว่าการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตปลาชนิดดีที่สุด คือ 2.15 ± 0.13 กรัมต่อตัววัน และ 87.50 ± 5.89 เปอร์เซ็นต์ ดีกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารปลาลอยอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้น ควรนำปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์จุลินทรีย์โพรไบโอติก ไอโซเลท FM11 ที่มีจำนวนมากกว่า 10^7 CFU/g ผสมกับอาหารปลาเลี้ยงปลาชนิด เพื่อใช้เป็นทางเลือกทดแทนการใช้สารเคมีเร่งการเจริญเติบโตในปลานิล อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาทดลองกับปลานิลที่เลี้ยงในบ่อดิน เพื่อศึกษาผลในด้านการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของปลานิล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาคีวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน ในความอนุเคราะห์สายพันธุ์เชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำเพื่อการวิจัยในครั้งนี้ และ ผศ.ดร. สุกาญจน์รัตน์เลิศคุณสรณ์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่จุดประกายการวิจัยต่อยอดการพัฒนาการประมงอินทรีย์ด้วยกลไกจุลินทรีย์โพรไบโอติก

เอกสารอ้างอิง

- Abushelaibi, A., Mahadin, A.I., Tarabily, E.I., Nagendra P.S. and Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk LWT. *Food Science and Technology*, 79, 316-325
- Afrilasari, W., Widanarni, Meryandini and Meryandini, A. 2016. Effect of probiotic *Bacillus megaterium* PTB14 on the population of intestinal microflora, digestive enzyme activity and the growth of catfish (*Clarias* sp.). *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(4), 168-172.
- Ahemad, M. and Malik, A. (2012). Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriology Journal*, 2(1), 12-21.
- APHA, AWWA and WPCF. (1980). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 16th ED. APHA Inc. New York.
- Behera, B.C., Yadav, H., Singh S.K., Mishra R.R., Set hi B.K., Dutta S.K. and Thatoi H.N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi River delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169-178.
- Bowman, J.P. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology volume II (The proteobacteria), Part C (The Alpha, Beta, Delta and Epsilonproteobacteria)*. Springer, New York, USA.
- Duarte, J.G., Silva, L.L.S., Freire, D.M.G., Cammarota, M.C. and Gutarra, M.L.E. (2015). Enzymatic hydrolysis and anaerobic biological treatment of fish industry effluent: Evaluation of the mesophilic and thermophilic conditions. *Renewable Energy*, 83, 455-462.
- Frank, A.B. (2005). *Mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecology theory* Mycorrhiza, 15(4), 277-281.
- Fronson and Mary Ann H. (1980). *Standard method for examination water and wastewater (15th ed.)*. American public health Publisher Inc., New York, USA.
- George, W. and Latimer, Jr. (2016). *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements (19th Ed.)*. AOAC International Inc. Gaithersburg MD, USA.
- Guerra, B.S., José, F. L.O., Bruno, O.M., Alice, B.B., Denise, S.P.P., Francisco, J.S.V., Robson, B.C., Ricardo, C.B.A. and Rodrigo F.S. (2017). Synchronization to light and mealtime of daily rhythms of locomotor activity, plasma glucose and digestive enzymes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 204, 40-47.
- Hanafy, A.M., Al-Mutairi, A.A., Al-Reedy, R.M. and Al-Garni, S.M. (2016). Phylogenetic affiliations of *Bacillus amyloliquefaciens* isolates produced by a bacteriocin-like substance in goat milk. *Journal of Taibah University for Science*, 10, 631-641.
- Harikrishna, N., Mahalakshmi, S., Kiran Kumar, K. and Reddy, G. (2017). Fish scales as potential substrate for production of alkaline protease and amino acid rich aqua hydrolyzate by *Bacillus altitudinis* GVC11. *Indian Journal of Microbiology*, 57, 339-343.

- Inoue, S., Suzuki-Utsunomiya, K., Komori, Y., Kamijo, A., Yumura, I. and Tanabe, K. (2013). Fermentation of non-sterilized fish biomass with a mixed culture of film-forming yeasts and lactobacilli and its effect on innate and adaptive immunity in mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(6), 682-687.
- Jahangiri, L., Sudagar, M., Ashayerizadeh, O., Kolangi, H. and Tabarraei, A. (2018). Isolation of probiotic bacteria from Guppy *Poeciliareticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(6), 809-815.
- Korgdahl, A., Hemra, G.I. and Mommsem, T.P. (2005). Carbohydrate in fish nutrition: digestion and absorption in postlar stages. *Aquaculture nutrition*, 11, 103-122.
- Liu, H., Shifeng, W., Yan, C., Xiaohui, G., Zhenjie, C., Yongzheng, Z., Shubin, L., Wei, Y., Weiwei, Z., Yu, Z., Zhenyu, X., Weiliang, G. and Yongcan, Z. (2017). Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 60, 326-333.
- Meidong, R., Doolgindachbaporn, S., Jamjan, W., Sakai, K., Tashiro, Y. and Okugawa, Y.A. (2017). A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (Phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63(4), 246-253.
- Mishra, V. and Prasad, D.N. (2005). Application of in vitro method for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 109-115.
- Organic agriculture certification Thailand (ACT). (2018). *Generic Manual for ACT Organic Certification*. 7thed, organic agriculture certification Thailand, 801/21 Ngamwongwan 27 Rd., Tambon Bangkhen, Muang District, Nonthaburi Thailand.
- Park, Y., Moniruzzaman, M., Lee, S., Hong, J., Won, S., Lee, J.M., Yun, H., Kim, K.W., Ko, D. and Bai, S.C. (2016). Comparison of the effects of dietary single and multi-probiotics on growth, non-specific immune responses and disease resistance in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 351-357.
- Raquel, O., Cristóvão Cidália, M., BotelhoRamiro, J.E., Martins, R. and Boaventura, A.R. (2014). Primary treatment Optimization of a fish canning wastewater from a Portuguese plant. *Water Resources and Industry*, 6, 51-63.
- Rattanaloeadnusorn, S. (2017). Inoculants Fungal *Trichoderma*, *Mucor* and *Bacillus* for Community Development based on sufficiency economy philosophy. *International Journal of GEOMATE*, 13(40), 16-23.
- Rattanaloeadnusorn, S. (2020). Antagonistic Microbe on Palm Soil for Producing of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Yeast and Fungal (PGPR) Mixed Microbe. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal*, 12(2), 240-243. (in Thai)
- Selim, K.M. and Reda, R.M. (2015). Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44, 496-503.
- Spelhaug, S.R. and Harlander S.K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*, 52, 856-62.
- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P. and Visessanguan, W. (2010). *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2364-2370.
- Tang, L., Huang, K., Xie, J., Yu, D., Sun, L. and Huang, Q. (2017). 1-Deoxynojirimycin from *Bacillus subtilis* improves antioxidant and antibacterial activities of juvenile Yoshitomi tilapia. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 39-47.
- Villamil, O., Váquiro, H. and Solanilla, J.F. 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224, 160-171.
- Wang, C.Y., Lin, P.R., Chang-Chai, N.G. and Shyu, Y.T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Clinical Microbiology Anaerobe*, 16, 578-585.
- Watson, J.D., Gann A., and Levine.M. (2013). *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). Pearson Education, Inc., San Francisco, USA.