

## บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของป้านิล ในปอเลี้ยงต่อระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคของป้านิล ซึ่งภายหลังจากการนำไปจำแนกชนิดโดย อาศัยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและอณูชีวโมเลกุล พบร่วมกับแบคทีเรียชนิดนี้คือ *Bacillus pumilus* และเมื่อนำ แบคทีเรียดังกล่าวในสภาพที่มีชีวิตไปผสมอาหารในอัตรา 0 (กลุ่มควบคุม), 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และนำไปเลี้ยงป้านิลขนาด 50 กรัม ในอัตรา 5% นำหนักตัวทุก ๆ วัน โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยเลี้ยงในตู้ท่อทดลองขนาด 80 ลิตร ตู้ละ 15 ตัว โดยจัดเป็น 4 ชั้น เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ใน ห้องปฏิบัติการ โดยทำการตรวจสอบ อัตราการเจริญเติบโต ความยาวและจุลพยาธิของลำไส้ ปริมาณเม็ด เลือดขาว จำนวนแบคทีเรียในลำไส้ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และความสามารถ ในการต้านทานต่อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ใน 3 แบบคือ การแข็ง การนิดเข้าซ่องห้องและการ ป้อนเข้าไปในช่องปาก พบร่วม แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอัตรา 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมสามารถ เพิ่มระดับของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยสังเกตจากค่า Phagocytic activity, Phagocytic index และ Phagocytic efficiency รวมถึงปริมาณ Superoxide anion ( $O_2^-$ ) มากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการลดตายของปลาภายหลังจากการแข็ง นิดและ ให้กินเชื้อ *S. agalactiae* ที่พบว่าปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอาหารในอัตรา 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการลดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) และ ยังพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารไม่ได้แสดงอาการผิดปกติอย่างให้เห็นในช่วงการทดลองแต่ อย่างใด อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษา อัตราการเจริญเติบโตของปลาแต่ละกลุ่ม โดยพิจารณาจากความ ยาวและน้ำหนัก ความยาวลำไส้ของปลา ในแต่ละกลุ่มพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ตลอด ระยะเวลาการทดลอง และเมื่อนำเอาแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ไปศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริงกับปลา นิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำท่าจีนเขตพื้นที่อำเภอเดิมบางนางบัวช จังหวัดสุพรรณบุรี โดยใช้เวลาเลี้ยง ทั้งหมด 110 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ถึงวันที่ 18 มิถุนายน 2552 จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ระหว่างการทดลองได้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำอย่างต่อเนื่อง ที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ที่สูงขึ้นเกิน  $32^{\circ}\text{C}$  รวมทั้งการลดลงของออกซิเจนที่ละลายน้ำ ( $\text{DO}$ ) ได้ส่งผลต่อการกินอาหารของปลา และปริมาณแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ปลาทดลองทุกกลุ่มทอยเกิดโรคและตายอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามก็พบว่าปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการตาย ต่ำกว่าปลาในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) ในช่วงกลางเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคมที่มี การระบาดของโรคเท่านั้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ใน อาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายต่ำสุดที่ 20.86% ใกล้เคียงกับปลาในกลุ่มที่ได้รับ แบคทีเรียในอาหาร 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีอัตราการตาย 23.33% ขณะที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับ แบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายใกล้เคียงกันที่ 27.31% และ 29.62% ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ( $P>0.05$ ) ซึ่งให้ผล เช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อร่วมถึงผลผลิตของปลาด้วยที่พบว่าไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ( $P>0.05$ )

## Abstract

Efficacy of a *Bacillus* bacterium strain AQBS01 isolated from Nile tilapia intestine on immune system and antibacterial activity was carried out in both lab and on-farm scales. Identification by molecular and micro-biochemical techniques revealed that this bacterium showed highly identical to *Bacillus pumilus*. In laboratory scale, viable form of this bacterium was supplemented at 0 (control), 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 g/kg diet to feed 5 different groups of Nile tilapia for 4 weeks. This bacterium had no any side effects on growth and mortality of fish when they were fed with 0.5-5.0 g/kg diet and fish that received feed supplemented with *B. pumilus* showed no evidences of disease during feeding periods. The non-specific immune responses of fish were determined and showed that fish fed with 1.0-5.0 g of *B. pumilus* expressed significant higher of phagocytic activity, phagocytic index and phagocytic efficiency including superoxide anion ( $O_2^-$ ) levels than that of control. Interestingly, challenging experimental fish with bath infection, intraperitoneal injection and orally infected route of viable *S. agalactiae* exhibited high performance of *B. pumilus* application against this pathogenic bacterium. The fish mortality during 15 days after oral and intraperitoneal injection with *S. agalactiae* was found to be decreased dramatically in fish group fed on diet supplemented with *Bacillus pumilus* at concentration of 1.0-5.0 g/kg diet ( $P<0.05$ ). However, significant differences of growth rate among fish groups were not found. These indicated that intestinal tracts of experimental fish may be successfully colonized by adding 1.0-5.0 g of *Bacillus pumilus*/kg diet, which exhibited improved health than that control. Additionally, application of *B. pumilus* on cage culture fish farm was also conducted on Tachin River, at Dermbang-Nangbuach district, Suphanburi province where streptococcosis usually occurs in summer. The trial was 110 days carrying from February 2<sup>nd</sup> to June 18<sup>th</sup>, 2009. Four different groups of fish were fed 5% body weight with commercial diet containing 0, 0.5, 1.0 and 3.0 g of *Bacillus pumilus*/kg diet along experimental periods. Surprisingly, clinical signs of streptococcosis were not recorded in this experiment. But experimental fish were seriously sick with other bacterial diseases mainly caused by *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp. and some kinds of external parasites in the middle to the end of April. Performance of *B. pumilus* application at concentration of 1.0 and 3.0 g *B. pumilus* /kg diet against fish diseases were discovered in short period, since fish fed with those concentrations were showed significantly low mortality than the control and 0.5 g *B. pumilus*/kg feed in out-breaking times ( $P<0.05$ ). At the end of trail, the mortality rates of fish consuming 1.0 and 3.0 g probiotics/kg diet were 20.86% and 23.33% while control and fish fed with 0.5 g *B. pumilus*/kg diet were 29.62% and 27.31%, respectively. However, no significant differences of survival rate and growth parameters were either not found in this experiment ( $P>0.05$ ).