ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผสมในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต พารามิเตอร์โลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในระดับฟาร์ม

Effects of dietary supplement probiotics bacteria on growth, hematological and immunological parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in farm scale

กมลาส จามาศ

นันทิตา ฐานะกอง

นันธิชา แจ่มแจ้ง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effects of dietary supplement probiotics bacteria on growth, hematological and immunological parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in farm scale

KAMALAS CHAMAS
NANTITA THANAKONG
NANTHICHA JAEMJANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต พารามิเตอร์โลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในระดับฟาร์ม Effects of dietary supplement probiotics bacteria on growth, hematological and immunological parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in farm scale
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกมลาส จามาศ รหัสนักศึกษา 58050854 นางสาวนันทิตา ฐานะกอง รหัสนักศึกษา 58050907 นางสาวนันธิชา แจ่มแจ้ง รหัสนักศึกษา 58050908
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้ให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต พารามิเตอร์โลหิตวิทยา และระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในระดับฟาร์ม
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกมลาส จามาศ รหัสนักศึกษา 58050854 นางสาวนันทิตา ฐานะกอง รหัสนักศึกษา 58050907 นางสาวนันธิชา แจ่มแจ้ง รหัสนักศึกษา 58050908
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโต พารามิเตอร์โลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยให้อาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้น $1.5x10^8$ CFU/ml กับปลานิล 300 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลองคือ *Lactobacillus* sp. (M104) *Bacillus* sp. (T311) และ *Bacillus* sp. (T318) กลุ่มทดลองละ 100 ตัวต่อกระชัง และกลุ่มควบคุมคือปลา 100 ตัว จะให้อาหารที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก ให้อาหารร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักตัว (น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 46.4 กรัม) วันละสองครั้งในตอนเช้าและตอนเย็น หลังจากเลี้ยงครบ 3 เดือน หาค่าพารามิเตอร์การเจริญ พารามิเตอร์โลหิตวิทยาและพารามิเตอร์ภูมิคุ้มกัน พบว่าปลาในกลุ่มทดลอง M104 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด สังเกตได้จากน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายเท่ากับ 130.00±18.25 กรัม ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายเป็น 127.50±16.20 กรัม ซึ่งพบว่า ทุกพารามิเตอร์ของปลาในกลุ่มทดลอง M104 ทั้งพารามิเตอร์การเจริญเติบโต พารามิเตอร์โลหิตวิทยา และพารามิเตอร์ภูมิคุ้มกัน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของพลาสมาโปรตีน อิมมูโนโกลบูลิน และค่ากิจกรรมไลโซไซม์ของปลาในกลุ่มทดลอง M104 ซึ่งมีค่าเป็น 125.27±9.22, 79.02±24.55 และ210.52±41.29 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองกลุ่มอื่นและกลุ่มควบคุม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลาให้ดีขึ้น รวมทั้งทำให้ปลาสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาในอนาคต

คำสำคัญ : แบคทีเรียโพรไบโอติก โลหิตวิทยา ภูมิคุ้มกัน ปลานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effects of dietary supplement probiotics bacteria on growth, hematological and immunological parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in farm scale.
Students	Miss Kamalas Chamas Student ID 58050854
	Miss Nantita Thanakong Student ID 58050907
	Miss Nanthicha Jaemjaeng Student ID 58050908
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst. Prof. Dr.Worakrit Worananthakij

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of probiotic bacteria dietary supplement on growth, hematological and immunological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). A diet supplemented with $1.5x10^8$ CFU/ml concentrations of probiotic bacteria (*Lactobacillus* sp. and *Bacillus* sp.) was fed to 300 fish, while the control group of 100 fish was fed with a plain diet with no supplement. The fish were divided to a control group and 3 treatment groups, 100 fish per treatment and fish cage, and fed food at 5 percent body weight (average initial weight of 46.4 g) twice a day, in the morning and evening. The three treatments were foods supplemented with the following: *Lactobacillus* sp. (M104); *Bacillus* sp. (T311); and *Bacillus* sp. (T318). After 3 months, their growth, hematological, and immunological parameters were determined. The fish of M104 group with highest values grew to an average final weight of130.00±18.25 g, while those in the control group grew to an average final weight of 127.50±16.20 g. All growth, hematological, and immunological parameters of the fish in the M104 treatment group were significantly enhanced at $p<0.05$ compared to the control group. Specifically, the significantly highest values of plasma protein immunoglobulin, and lysozyme activity exhibited by the fish in the M104 group were 125.27±9.22, 79.02±24.55 and 210.52±41.29 respectively, among all treatment and control groups. These findings indicate that supplementing fish food with probiotic bacteria promotes growth and good health to the fish as well as their tolerance to a non-optimum environment. They can be suitably applied to the future fish farm industry.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : Probiotics bacteria, hematological, Immunological, Nile Tilapia

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบันฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรกฤต วรนันทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งให้คำปรึกษา และแนะนำแก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดการดำเนินงานรวมทั้งยังให้ความรู้เกี่ยวกับงานวิจัยในทุกด้าน ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่ให้คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของเล่มโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ในสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมทุกท่าน ที่ได้สอนและมอบความรู้ ทักษะในการปฏิบัติงานต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาปรับใช้ในการทำโครงงานพิเศษได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณเจ๊ตาพันธุ์ปลา 6/1 ม.4 ต.หนองตีนนก อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการดำเนินงาน และพันธุ์ปลาที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจน ให้การช่วยเหลือในด้านการอำนวยความสะดวกต่างๆ ทำให้คณะผู้จัดทำดำเนินงานอย่างราบรื่น

ขอกราบขอบพระคุณคุณสุภานนท์ แจ่มแจ้ง ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการเดินทางไปยังสถานที่ปฏิบัติงาน ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณบุคลากรและเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งคำชี้แนะในการใช้เครื่องมือและการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาของคณะผู้วิจัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดี สนับสนุนทั้งกำลังกาย และกำลังทรัพย์ตั้งแต่เข้ารับการศึกษาตลอดจนการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือให้ข้อคิดเห็นแนะนำสิ่งต่างๆ และมิตรภาพที่ดีตลอดมา

กมลาส จามาศ
นันทิตา ฐานะกอง
นันธิชา แจ่มแจ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ปลานิล 3
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของปลานิล 3
2.1.2 การเพาะเลี้ยงปลานิลในกระชัง 4
2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการกินอาหารของปลานิล 4
2.2 โลหิตวิทยาของปลา 5
2.2.1 ส่วนประกอบของเลือดปลา 5
2.3 ภูมิคุ้มกันวิทยาของปลา 6
2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 6
2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ 7
2.4 คุณภาพน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 7
2.4.1 อุณหภูมิ 7
2.4.2 พีเอชของน้ำ 7
2.4.3 ออกซิเจนละลายน้ำ 8
2.4.4 ความเป็นด่างของน้ำ 8
2.4.5 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 8
2.4.6 ความกระด้างของน้ำ 8
2.4.7 ความเค็ม 8
2.4.8 แอมโมเนีย 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

2.4.8 ไนไตรท์ 9
2.5 อาหารต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ 9
2.6 โพรไบโอติก 9
2.6.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก 10
2.6.2 กลไกการทำงานของแบคทีเรียโพรไบโอติก 10
2.6.3 การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และความสามารถในการต้านทานโรค 11
2.6.4 การเร่งการเจริญเติบโต และลดอัตราการตาย 11
2.7 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17
3.1 ปลานิล 17
3.2 อาหารที่ใช้เลี้ยงและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย 17
3.3 สารเคมี 17
3.4 วัสดุและอุปกรณ์ 18
3.5 เครื่องมือ 18
3.6 วิธีการ 19
3.6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น 19
3.6.2 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก 20
3.6.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงปลานิล 21
3.6.4 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงปลา 22
3.6.5 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ 22
3.6.6 การตรวจสอบด้านโลหิตวิทยา 22
3.6.7 การตรวจสอบด้านภูมิคุ้มกันวิทยา 23
3.6.8 การตรวจสอบแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ปลานิล 24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 25
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติก 25
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก 25
4.2.1 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด 25
4.2.2 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น 25
4.2.3 ผลการตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง และการย่อยโปรตีน 26
4.3 ผลการตรวจสอบย้อนกลับปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารปลา 28
4.4 ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงปลา 29
4.5 ผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของปลา 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

4.6 ผลการตรวจสอบด้านโลหิตวิทยา....32
4.6.1 ผลการนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว..... 32
4.6.2 ผลการตรวจสอบค่าฮีโมโกลบิน 32
4.7 ผลการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันวิทยา 34
4.7.1 ผลการตรวจสอบค่าพลาสมาโปรตีน 34
4.7.2 ผลการตรวจสอบค่าอิมโมโนโกลบูลิน 34
4.7.3 ผลการตรวจสอบค่ากิจกรรมไลโซไซม์..... 34
4.8 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล..... 36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง..... 38
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดลองทางชีวเคมี 44
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ในการทดลอง 46
ภาคผนวก ค การทดสอบความเป็นโพรไบโอติก..... 48
ภาคผนวก ง วิธีการดำเนินงาน..... 50
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ข้อมูล 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติก 27
4.2 ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด และสภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น 28
4.3 น้ำหนักปลาเฉลี่ย 3 เดือน 30
4.4 ความยาวปลาเฉลี่ย 3 เดือน 30
4.5 พารามิเตอร์การเจริญเติบโตของปลานิลหลังจากเลี้ยงระยะเวลา 3 เดือน 31
4.6 พารามิเตอร์โลหิตวิทยาของปลานิลหลังจากเลี้ยงระยะเวลา 3 เดือน 32
4.7 พารามิเตอร์ภูมิคุ้มกันของปลานิลหลังจากเลี้ยงระยะเวลา 3 เดือน 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
3.1 การเจาะเลือดปลานิล	23
4.1 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง	26
4.2 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน	26
4.3 น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิล	30
4.4 ความยาวเฉลี่ยของปลานิล	31
4.5 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (10^6 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของปลานิล	33
4.6 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวเฉลี่ย (10^4 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของปลานิล	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยมีมูลค่าผลผลิตต่อปีสูงสุดในบรรดาสัตว์น้ำจืดทั้งหมด เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่ายขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เป็นที่ต้องการของตลาด ทั้งตลาดภายในประเทศและตลาดต่างประเทศ สามารถเลี้ยงได้หลากหลายรูปแบบในทุกภูมิภาคของประเทศ (กรมประมง, 2556) อัตราการขยายตัวของผลผลิตปลานิลของไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา จากรายงานสถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี 2559 ระบุว่าปลานิลมีผลผลิต 200,800 ตัน มีมูลค่าสูงถึง 11,844.7 ล้านบาท คิดเป็น 52.62% ของมูลค่าผลผลิตสัตว์น้ำจืดทั้งหมดในประเทศไทย ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง จนเป็นระบบการเลี้ยงเชิงพาณิชย์มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าหน่วยงานภาครัฐและเอกชนพยายามปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่ประสบปัญหาหลายประการในการเพาะเลี้ยง เช่น ปัญหาด้านต้นทุนที่เพิ่มสูงขึ้นตามภาวะเศรษฐกิจ ปัญหาการตายของปลาที่เกิดจากหลายสาเหตุ คือ ตัวปลา สภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ เช่น สภาวะที่ร้อนจัดฝนตกหรือมืดครึ้มติดต่อกันหลายวันทำให้อุณหภูมิของน้ำในรอบวันแตกต่างกันมาก ส่งผลถึงกระบวนการย่อยสลายของเสียภายในบ่อ เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์และสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม รวมถึงตัวก่อโรค เช่น ปรสิต แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ที่ทำให้ปลาอ่อนแอ มีภูมิคุ้มกันต่ำ เกิดการตายอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสร้างความเสียหายแก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก (ประพันธ์ศักดิ์ และนนทวิทย์, 2552)

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นผู้เลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่ ใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีจำนวนมากในการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ ทำให้เกิดสารตกค้างในเนื้อปลารวมถึงในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย จึงมีการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ โดยใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกผสมลงในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โพรไบโอติกจะช่วยส่งเสริมกระบวนการย่อย ปรับสมดุลในลำไส้ของปลาสามารถต้านทานเชื้อโรคเมื่อเข้าสู่ร่างกาย โดยสร้างกรดและหลั่งสารพิษที่ทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (สุญาณี, 2549) นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลานิลได้อีกด้วย (Abarikeb *et al.*, 2018) แต่ในปัจจุบันการใช้โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำต้องนำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากเป็นการเพิ่มต้นทุนให้กับเกษตรกรแล้ว จุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศบางสายพันธุ์ไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ทำให้โพรไบโอติกทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus* sp. (M104), *Bacillus* sp. (T311 และ T318) ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลานิลแดง (ชัชนาภรณ์ และคณะ, 2556) นำมาผสมในอาหาร เพื่อทดสอบในระดับฟาร์ม โดยดูผลของการส่งเสริมการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลานิลที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาผลของการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล
2) เพื่อศึกษาผลของการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus* sp. (M104), *Bacillus* sp. (T311 และ T318) ที่แยกได้จากลำไส้ปลานิล โดยการศึกษาของ ชัชนาภรณ์ และคณะ (2556) โดยนำมาผสมลงในอาหาร เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 3 เดือน และแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มทดลอง M104 กลุ่มทดลอง T311 และกลุ่มทดลอง T318 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต โดยทำการวัดขนาดชั่งน้ำหนักของปลานิลก่อนและหลังทำการทดลอง ศึกษาพารามิเตอร์โลหิตวิทยาของปลานิล ได้แก่ ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงเซลล์ ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว ปริมาณฮีโมโกลบิน และศึกษาพารามิเตอร์ภูมิคุ้มกันได้แก่ ค่าพลาสมาโปรตีน และค่าไลโซไซม์ ของปลาในแต่ละกลุ่มทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) อาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต พารามิเตอร์โลหิตวิทยาและระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลได้สำเร็จ
2) สามารถนำอาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลานิลในระดับฟาร์มได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลานิล

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่อยู่ในตระกูล Cichlidae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ปลานิลเป็นปลาที่ไม่ใช่ปลาพื้นเมืองของไทย ซึ่งปลาชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่าย เหมาะที่จะเพาะเลี้ยงในบ่อได้เป็นอย่างดี จึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยปลานิลถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2508 สมเด็จพระจักรพรรดิอากิฮิโตะ ซึ่งในขณะนั้นทรงดำรงพระอิสริยยศเป็นมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ได้น้อมเกล้าน้อมถวายปลาน้ำจืดในตระกูล Tilapia จำนวน 50 ตัว ขนาด 9 เซนติเมตร มาทูลถวายแด่พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช และพระองค์ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าให้เลี้ยงปลานิลในบ่อดินขนาด 10 ตารางเมตร ในบริเวณสวนจิตรดา ต่อมาทรงพระกรุณาโปรดเกล้าพระราชทานพันธุ์ปลานิลขนาด 3-4 เซนติเมตร จำนวน 10,000 ตัว ให้กรมประมงไปดำเนินการขยายพันธุ์ เพื่อแจกจ่ายให้เกษตรกรนำไปเพาะเลี้ยง พร้อมกับพระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า “ปลานิล” (อดุลย์, 2532) ตามชื่อต้นในภาษาอังกฤษคำว่า "นิล" ยังมีความหมายถึง สีดำที่เป็นลายปรากฏอยู่บนลำตัวของปลา นอกจากนี้ยังเป็นคำสั้นๆ ที่ประชาชนนั้นสามารถเรียกและจดจำได้ง่าย (กรมประมง, 2556)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในตระกูล Cichlidae มีรูปร่างคล้ายปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ซึ่งแตกต่างกับปลานิลตรงที่ปลานิลมีลายสีดำ และมีจุดสีขาวสลับกันไปมีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน มีเกล็ด 3 แถว ตรงบริเวณแก้ม และอีก 1 แถว ตรงบริเวณเหนือเส้นข้างลำตัวเล็กน้อย มีลายพาดขวางลำตัวประมาณ 9-10 แถบ ลักษณะเป็นลายที่สมบูรณ์ จากส่วนหลังสู่ส่วนท้อง บริเวณครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 ก้าน และก้านครีบอ่อน 12-14 ก้าน ที่ครีบก้นมีก้านแข็ง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อน 9-10 ก้าน และบริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบก้น ครีบหาง จะมีจุดขาว และเส้นสีดำตัดขวางอยู่ เกล็ดตามแนวเส้นข้างลำตัวมี 33 เกล็ด ทางด้านข้างมีเกล็ดตามแนวเฉียงจากตอนต้นของครีบหลังลงมาถึงเส้นข้างลำตัว 2 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงส่วนหน้าของครีบก้น 13 เกล็ด ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้ม 1 จุด ปลานิลชนิดนี้ มีความยาวสูงสุดถึง 16 นิ้ว (กรมประมง, 2556) ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลายดำพาดขวางลำตัว มีความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร

ปลานิลเพศผู้ : ปลาที่มีขนาดโตเต็มที่แล้วจะมีสีเข้มตรงบริเวณใต้คางและลำตัว ยิ่งใกล้ฤดูผสมพันธุ์ สีก็จะยิ่งเข้มขึ้น อวัยวะเพศอยู่บริเวณใกล้กับช่องทวาร โดยอวัยวะเพศมีลักษณะเรียวยื่นออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลานิลเพศเมีย : บริเวณใต้คางและลำตัวของปลานิลเพศเมียจะมีสีอ่อน อวัยวะเพศมีลักษณะเป็นรู กลม และค่อนข้างใหญ่

อย่างไรก็ตามลูกปลาที่เป็นตัวใหม่ๆ ยังไม่มีการพัฒนาเป็นเพศใดเพศหนึ่งอย่างชัดเจน การเพิ่มฮอร์โมนจากภายนอกในช่วงดังกล่าว จึงสามารถควบคุมให้แสดงออกเป็นเพศใดเพศหนึ่งได้ ขึ้นอยู่กับฮอร์โมน โดยฮอร์โมนแอนโดรเจน (Androgen) ทำให้ปลาเป็นเพศผู้ และฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) กลายเป็นปลาเพศเมีย ส่วนปลานิลแปลงเพศนั้น จะได้รับฮอร์โมน 17α-methyltestosterone (MT) ซึ่งเป็นฮอร์โมนแอนโดรเจนที่นิยมใช้ในการแปลงเพศปลาให้เป็นเพศผู้ โดยใช้ผสมในอาหารให้กินทันทีที่ถุงไข่แดงของลูกปลาลดลง ซึ่งปัจจุบันในการเพาะเลี้ยงปลานิลนิยมใช้ปลานิลเพศผู้ล้วน เนื่องจากปลานิลเพศผู้เจริญเติบโตได้ดีกว่าปลานิลเพศเมีย ทำให้ปลาที่อยู่ในกระชังเดียวกันมีขนาดสม่ำเสมอ ในขณะที่ปลานิลเพศเมียเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะวางไข่ได้ตลอดปี โดยในช่วงฟักไข่และอนุบาลลูกปลาในปาก ปลานิลเพศเมียจะไม่กินอาหารทำให้น้ำหนัก และขนาดตัวไม่เพิ่มขึ้น

2.1.2 การเพาะเลี้ยงปลานิลในกระชัง

การเลี้ยงปลานิลในกระชัง กระชังควรมีขนาด 3x3x2 เมตร หรือ 3x5x2 เมตร หรือ 4x4x2 เมตร ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพื้นที่ โดยสถานที่ในการวางกระชังควรมีระดับน้ำลึกพอประมาณตลอดระยะเวลาการเลี้ยง พื้นกระชังควรอยู่สูงจากพื้นดินและอยู่ใต้น้ำไม่ต่ำกว่า 1 เมตร ควรมีช่องว่างระหว่างกระชังโดยมีระยะห่างอย่างน้อย 3 เมตร เพื่อป้องกันการเกิดมุมอับระหว่างกระชัง รวมทั้งทำให้กระแสน้ำไหลผ่านได้สะดวก ลดภาวการณ์ขาดออกซิเจน และเพื่อการไหลระบายของน้ำ (นวลมณี, 2553)

สำหรับปลาที่จะปล่อยลงเลี้ยงในกระชังควรมีขนาด 50-100 กรัมและปล่อยในอัตราความหนาแน่น 50-120 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร โดยปกติทั่วๆไปจะใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 75-90วัน จึงจะได้ปลาที่มีน้ำหนัก 2-3 ตัวต่อกิโลกรัม และผลผลิตที่ได้ประมาณ 25-60 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร (วิเชียร, 2542) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลานิลในกระชังให้มีการเจริญเติบโตดีและได้ผลผลิตสูงขึ้นอยู่กับปริมาณการให้อาหาร คุณภาพของอาหาร คุณภาพของน้ำ และอัตราการปล่อยปลา

2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการกินอาหารของปลานิล

โดยทั่วไปปลานิลเป็นปลาที่มีการบริโภคอาหารได้ทั้งกลางวัน และกลางคืน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมามีหลายงานวิจัยได้รายงาน (นวลมณี, 2553; ชาญวิทย์ และคณะ, 2560) เกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการกินอาหาร พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการกินอาหารของปลานิลมีอยู่ 2 ปัจจัยหลักๆ คือ

1) ขนาดของปลาต่อการกินอาหาร

ขนาดของปลามีผลต่อการกินอาหารเนื่องจากปลาขนาดเล็กมีความต้องการสารอาหารและพลังงานที่สูงกว่าปลาขนาดใหญ่ อาจเป็นเพราะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าโดยอัตราการกินอาหารของปลานิลขนาดเล็ก (1 กรัม) อาจต้องการอาหารสูงถึง 30 % ของน้ำหนักตัว จากนั้นจึงค่อยๆลดลงเมื่อปลามีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น เหลือ 3 % เมื่อปลานิลมีน้ำหนักมากกว่า 100 กรัม (ชาญวิทย์ และคณะ, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) อุณหภูมิของน้ำต่อการกินอาหาร

อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อขบวนการต่างๆ ภายในร่างกายของปลา เนื่องจากปลานิลเป็นสัตว์เลือดเย็น มีการปรับอุณหภูมิของร่างกายให้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิของน้ำ เมื่อน้ำมีอุณหภูมิสูงขึ้นปลานิลจะกินอาหารมากขึ้น เพื่อสร้างพลังงานความร้อนทำให้ร่างกายมีอุณหภูมิสูงขึ้น หากอุณหภูมิน้ำลดลงปลานิลจะกินอาหารลดลงไปด้วย ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ในช่วง 19-28 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิน้ำต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ปลานิลจะไม่กินอาหาร และไม่เจริญเติบโต (นวลมณี, 2553)

2.2 โลหิตวิทยาของปลา

เลือดปลาเป็นตัวกลางในการลำเลียงสารต่างๆ ได้แก่ ออกซิเจน สารอาหาร และวิตามิน เป็นต้น ซึ่งปลามีระบบหมุนเวียนเลือดแบบปิด โดยเลือดที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำเนื่องจากผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ มาแล้วจะไหลเข้าสู่หัวใจ เพื่อนำไปแลกเปลี่ยนก๊าซที่บริเวณเหงือก แล้วลำเลียงไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลง หรือความผิดปกติของระบบในร่างกายปลาจะส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบเลือดโดยตรง ดังนั้นการศึกษาค่าโลหิตวิทยา และองค์ประกอบของเลือด เช่น ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น และปริมาณฮีโมโกลบิน สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขภาพปลา อันเนื่องมาจากภาวะความเครียด ปัจจัยเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม ภาวะโภชนาการของปลา และการติดเชื้อของปลาได้ (นพดล และคณะ, 2552)

2.2.1 ส่วนประกอบของเลือดปลา

เลือดปลามีส่วนประกอบเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยทั่วไปเลือดปลาประกอบด้วย ส่วนที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำเลือดหรือพลาสมา และส่วนที่เป็นของแข็ง ซึ่งเป็นส่วนของเซลล์เม็ดเลือด และเกล็ดเลือด

2.2.1.1 น้ำเลือดหรือพลาสมา

น้ำเลือดหรือพลาสมาเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน ประกอบไปด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ ส่วนที่เหลือคือโปรตีน วิตามิน เกลือแร่ เอนไซม์ และฮอร์โมน มีหน้าที่ในการช่วยละลายเกลือ แร่ธาตุ ดูดซึมอาหารที่ผ่านการย่อยแล้ว อีกทั้งยังรับของเสียจากเนื้อเยื่อ เอนไซม์ แอนติบอดี้ รวมถึงก๊าซที่ละลายอยู่และขับออกจากร่างกาย (วาสนา, 2555)

2.2.1.2 เซลล์เม็ดเลือดแดง

เม็ดเลือดแดงของปลามีลักษณะเป็นเซลล์รูปไข่ มีขนาดแตกต่างกัน (7-36 ไมครอน) และมีอายุประมาณ 13-500 วัน ซึ่งเม็ดเลือดแดงมีหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนที่ได้จากการนำเลือดส่วนต่างๆ ของร่างกายที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำไปแลกเปลี่ยนก๊าซที่บริเวณเหงือก โดยจำนวนเม็ดเลือดแดงจะมากหรือน้อยนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น เพศของปลา อายุ การให้อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุณหภูมิของน้ำ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Witeska, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.3 เซลล์เม็ดเลือดขาว

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่ไม่มีสี ส่วนใหญ่มีรูปไข่หรือทรงกลม มีปริมาณ 20,000-150,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 ไมครอน มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ มีอายุ 2-14 วัน ทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรคด้วยวิธีต่าง ๆ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) เซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูล (Granules) อยู่ในไซโตพลาสซึม

- นิวโทรฟิล (Neutrophil) ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา มีปริมาณร้อยละ 5-25 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Iwama, 1996) เป็นด่านแรกที่จะมาทำลายเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาทำให้เกิดการอักเสบขึ้น

- อีโอซิโนฟิล (Eosinophil) มีบทบาทในการต้านการอักเสบในปลา มีหน้าที่ป้องกันปรสิตเช่น พยาธิ โดยวิธีฟาโกไซโทซิส (Iwama, 1996)

- เบโซฟิล (Basophil) มีหน้าที่หลั่งสารป้องกันไม่ให้เลือดในร่างกายแข็งตัว (Heparin) และสร้างฮิสตามีน (Histamine) เพื่อช่วยในการขยายหลอดเลือด

2) เซลล์เม็ดเลือดขาวประเภทที่ไม่มีแกรนูลอยู่ในไซโตพลาสซึม

- ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ทำหน้าที่สร้างภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เนื่องจากมีความสามารถในการแบ่งตัวของ memory cell ทำให้จดจำแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ

- โมโนไซต์ (Monocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะคล้ายเมล็ดถั่ว สามารถพัฒนาไปเป็น Macrophage ซึ่งทำหน้าที่กำจัด แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิต โดยวิธีฟาโกไซโทซิส (Iwama, 1996)

2.1.1.4 เกล็ดเลือด

เป็นเซลล์ขนาดเล็กที่ไม่มีนิวเคลียส ทำหน้าที่ช่วยให้เลือดแข็งตัวเพื่อไปอุดบาดแผล โดยกลุ่มโปรตีนที่อยู่ในเลือด (Thromboplastin) ไปทำปฏิกิริยากับสารในพลาสมาและจับกันเป็นร่างแห จากนั้นเม็ดเลือดจะมาติดกับร่างแห เกิดการแข็งตัวเพื่ออุดบาดแผล โดยเส้นร่างแห จะยึดกับผนังหลอดเลือดและเนื้อเยื่ออย่างช้าๆ และหดตัวแน่นทำให้บาดแปลเชื่อมติดกัน

2.3 ภูมิคุ้มกันวิทยาของปลา

ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลังรวมทั้งปลาแบ่งได้ 2 แบบ คือ

2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เป็นภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เป็นด่านแรกในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยไม่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อซึ่งการอาศัยอยู่ในน้ำของปลาที่มีปัจจัยต่างๆ มากระทบต่อการเจริญ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตัวเองของปลา เพราะทำงานได้รวดเร็วและมีผลต่อสิ่งแปลกปลอมทุกชนิด (Watts *et al.*, 2001) ได้แก่ ไลโซไซม์ พลาสมาโปรตีน เอนไซม์และโปรตีนอื่นๆเป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อโรค ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำจัดแบคทีเรีย สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคเรีย ที่เป็นพันธะระหว่างน้ำตาล N-acetylmuramic acid (NAG) และ N-acetylglucosamine (NAM) ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด (Iwama, 1996)

พลาสมาโปรตีน เป็นองค์ประกอบที่ทำให้เลือดมีความหนืด และมีบทบาทที่สำคัญต่อการรักษาสมดุลความดันออสโมติก และสมดุล pH ของเลือดเช่นเดียวกับเกลือแร่ โดย Plasma proteins บางชนิดยังทำหน้าที่เฉพาะบางอย่าง เช่น globulins (โกลบูลิน) ซึ่งสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte (ลิมโฟไซต์) ทำหน้าที่เป็น แอนติบอดี สร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย โดยทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (ฤทัย, 2539)

2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เป็นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อโรคและจดจำชนิดของเชื้อโรคได้หากเกิดขึ้นซ้ำอีก ได้แก่ อิมมูโนโกลบูลิน ที่ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อในบริเวณเยื่อบุต่างๆ โดยทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) จะเกิดขึ้นภายหลังจากแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย โดยแอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนแล้วเกิดการตกตะกอน ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากระดูกแข็งไม่ซับซ้อนเท่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบอิมมูโนโกลบูลิน 2 ชนิด ได้แก่ IgM และ IgD ต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีถึง 5 ชนิด ได้แก่ IgG, IgM, IgE, IgA และ IgD ซึ่งปลามีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่ดีนัก ปลาจึงต้องใช้ระบบภูมิคุ้มกันที่มีความหลากหลายและแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Anderson, 1990)

2.4 คุณภาพน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อสัตว์น้ำเช่น ปลา ผู้เลี้ยงควรคำนึงถึงคุณสมบัติเบื้องต้น ดังต่อไปนี้

2.4.1 อุณหภูมิ

โดยปกติอุณหภูมิของน้ำจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิอากาศ ขึ้นอยู่กับฤดูกาล สภาพภูมิประเทศ ความเข้มข้นของแสงอาทิตย์ กระแสลม ความลึก และปริมาณสารแขวนลอย เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น ไม่สามารถรักษาอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำอย่างรวดเร็ว (Temperature shock) จะทำให้เกิดอันตรายต่อปลาโดยตรง ร่างกายอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นยังทำให้สารพิษต่างๆในน้ำมีความรุนแรงมากขึ้น (ประเทือง, 2534)

2.4.2 พีเอชของน้ำ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นการวัดหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่มีอยู่ ซึ่งความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-9 และในรอบวันค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำควรจะเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 2 หน่วยในรอบวัน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง จะทำให้คุณสมบัติของน้ำเปลี่ยนแปลง และมีผลต่อความเป็นพิษของสารบางชนิดได้ เช่น ความเป็นพิษของแอมโมเนียในน้ำ (ประเทือง, 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 ออกซิเจนละลายน้ำ

ปริมาณออกซิเจนในน้ำ มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ เนื่องจากต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการต่างๆในร่างกาย เพื่อการเจริญเติบโต ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่ม-ลดของออกซิเจนในน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็มและแรงดันบรรยากาศ โดยทั่วไปปริมาณออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำมีอุณหภูมิและความเค็มต่ำ ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมไม่ควรต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อปริมาณออกซิเจนต่ำให้ใช้เครื่องตีน้ำ หรือสูบพ่นน้ำไปในอากาศ เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำ (อารีย์, 2553)

2.4.4 ความเป็นด่างของน้ำ

ความเป็นด่างของน้ำประกอบด้วย คาร์บอเนต ไบคาร์บอเนต และไฮดรอกไซด์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นค่าที่ควบคุมไม่ให้แหล่งน้ำมีการเปลี่ยนแปลงตามความเป็นกรด-ด่าง รวดเร็วจนเกินไป ถ้าความเป็นด่างต่ำ การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ในรวบวันในรอบวันจะเปลี่ยนแปลงรวดเร็ว ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ซึ่งความเป็นด่างที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ระหว่าง 50-300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไพฑูรย์, 2555)

2.4.5 ความกระด้างของน้ำ

ความกระด้างของน้ำ เกิดจากปริมาณของเกลือแคลเซียมที่ละลายอยู่ในน้ำทั้งหมด ซึ่งปริมาณเกลือเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ การฟัก และการเจริญของตัวอ่อนน้ำ ในบ่อปลานิลควรมีความกระด้างอยู่ที่ 15-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าในบ่อเลี้ยงปลามีค่าความกระด้างต่ำกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ปลาเจริญเติบโตช้า เครียด และตายได้ (วิรัช, 2544)

2.4.6 ความเค็ม

ความเค็ม หมายถึง ปริมาณของเกลือแร่ต่างๆ โดยเฉพาะโซเดียมคลอไรด์ที่ละลายอยู่ในน้ำ ความเค็มของน้ำมีผลต่อระบบควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกายของปลา การเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำอย่างกะทันหันทำให้ปลาตายได้ ปลานิลเป็นปลาที่สามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มได้ในช่วงกว้าง สามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความเค็ม 0-25 ppt. (นวลมณี, 2553)

2.4.7 แอมโมเนีย

แอมโมเนีย คือสารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในลักษณะ Unionized form (NH_3) หรือ Ionized form (NH_4^+) โดยแอมโมเนียที่ละลายน้ำและไหลผ่านเหงือกของปลา แล้วเข้าสู่หลอดเลือด จะมีผลให้ฮีโมโกลบินในเลือดไม่สามารถรวมกับออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ ปริมาณของแอมโมเนียในน้ำไม่ควรเกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณแอมโมเนียสูงมากเกินไปอาจพบปลาว่ายน้ำขึ้นมาหายใจบริเวณผิวน้ำ บริเวณลำตัวหรือครีบเป็นรอยแดง เหงือกเปลี่ยนเป็นสีม่วงคล้ำ เนื่องจากไม่มีการแลกเปลี่ยนออกซิเจน วิธีการป้องกันคือ ควบคุมการให้อาหาร เปลี่ยนถ่ายน้ำ และถ้ามีปริมาณของแอมโมเนียสูงมากๆ สามารถใส่เกลือแกง เพื่อลดความเป็นพิษได้ โดยใส่ในอัตรา 200-250 กิโลกรัมต่อไร่และทุก 1-2 สัปดาห์ เพิ่มเครื่องตีน้ำ (มั่นสิน และไพพรรณ, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.8 ไนไตรท์

แหล่งของสารประกอบไนไตรท์ในน้ำส่วนใหญ่มาจากสารอินทรีย์ ซึ่งเกิดจากขบวนการเน่าสลายของเศษอาหารที่เหลือ แพลงก์ตอนที่ตาย เศษซากพืชซากสัตว์ สารอินทรีย์อื่นๆ โดยไนไตรท์จะไปรบกวนการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของเม็ดเลือด ทำให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจนได้ ถ้ามีปริมาณมากทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ ภูมิต้านทานโรคต่ำ และติดเชื้อได้ง่าย โดยปริมาณไนไตรท์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิล ไม่ควรสูงเกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (มั่นสิน และไพพรรณ, 2539)

2.5 อาหารต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ

อาหารสัตว์น้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต การดำรงชีวิตและการสืบพันธุ์ โดยสารอาหารที่สัตว์น้ำต้องการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่และน้ำ เป็นต้น เมื่อร่างกายได้รับสารอาหารเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในการเผาผลาญเพื่อให้ได้พลังงาน เสริมสร้างการเจริญเติบโต ทำให้ร่างกายสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ โดยสารอาหารนั้นต้องเพียงพอต่อความต้องการบริโภคของสัตว์น้ำ ตามชนิดและขนาดของสัตว์น้ำ (พันทิพา, 2543) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ นวลมณี (2553) ที่ได้ศึกษาปัจจัยการเพาะเลี้ยงปลานิลและปลานิลแดงให้ประสบความสำเร็จ กล่าวว่า อาหารที่มีคุณภาพดีเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่ง ทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งปลานิลควรได้รับสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น ปลานิลขนาด 1-10 กรัมจะต้องการโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างกล้ามเนื้อประมาณร้อยละ 34-36 ปริมาณไขมันสำหรับการเจริญเติบโตและเป็นโครงสร้างของเซลล์ประมาณร้อยละ 0.5-1 และ คาร์โบไฮเดรตสำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานไม่ควรเกิน ร้อยละ 35 เพราะจะทำให้ปลาเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการแลกเนื้อต่ำ อีกปัจจัยที่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของปลานิลได้ คือการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมกับอาหารสำเร็จรูป พบว่าปลานิลมีการเจริญเติบโตดี มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ช่วยลดอัตราการตายและช่วยให้ปลามีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Midhan (2019) ที่ว่า การเสริมอาหารด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วย *Bacillus licheniformis* HGA8B ช่วยเพิ่มพารามิเตอร์ของการเจริญเติบโตของปลานิล เช่น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weigth gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) และยังช่วยปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพารามิเตอร์ทางชีวเคมีต่างๆได้ ซึ่งการเสริมอาหารด้วยโพรไบโอติกนี้สามารถนำมาใช้เพื่อปรับปรุงการผลิตสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

2.6 โพรไบโอติก

โดยทั่วไปร่างกายมนุษย์และสัตว์ รวมถึงสัตว์น้ำ เช่น ปลา มักจะพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) จุลินทรีย์เหล่านี้มีปริมาณมากในระบบทางเดินอาหาร เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และมีมากมายหลายชนิด อาศัยอยู่ในร่างกายตามปกติ ซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรค และช่วยในการควบคุมปริมาณซึ่งกันและกันไม่ส่งผลให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งมากจนเกินไป ประโยชน์ของโพรไบโอติก เช่น โพรไบโอติกเข้าไปยึดเกาะพื้นที่ในลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เชื้อโรคมีโอกาสยึดเกาะเพื่อทำลายลำไส้ยากขึ้น โพรไบโอติกสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรค ช่วยในการดูดซึม และช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

2.6.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก

โพรไบโอติกที่ในเชิงการเลี้ยงสัตว์น้ำ หมายถึง จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลผลิตจากแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ แล้วไปมีผลช่วยให้สัตว์ดังกล่าวมีสุขภาพดีขึ้น (สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

คุณสมบัติที่สำคัญที่นำมาใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ (เกรียงศักดิ์, 2535) มีดังนี้

1) โดยส่วนมากเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Gram positive) เนื่องจากสามารถทนทานต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative)

2) สามารถเจริญเติบโตได้ที่ช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ ระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส ทำให้เจริญเติบโตได้ง่าย และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว

3) สามารถยึดเกาะกับลำไส้ได้ หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ช่วงระยะเวลาหนึ่ง

4) สามารถต้านทานแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยเมื่อทำการทดลองในหลอดทดลอง พบว่ามีความสามารถในการแข่งขัน เช่น การใช้สารอาหารหรือผลิตสาร เพื่อฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

5) สามารถช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้

6) สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งมักพบหรือใช้ในการผลิตอาหารสัตว์

7) ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดพันธุกรรมการต้านยาปฏิชีวนะ เพราะอาจถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียก่อโรค ทำให้แบคทีเรียก่อโรคสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้

8) สามารถทนต่อสภาพแห้งได้นาน และนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์

2.6.2 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกช่วยทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Merrifield *et al.*, 2010) เพราะเป็นแบคทีเรียที่มีชีวิต หากมีการคงอยู่หรือเพิ่มจำนวนขึ้น อาจทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานดีกว่าสารกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต เมื่อแบคทีเรียโพรไบโอติกเข้าสู่ทางเดินอาหารของตัวปลา จากการศึกษาของ Shelby *et al.* (2006) พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถมีชีวิตในทางเดินอาหารปลานิลได้นานถึง 48 ชั่วโมง หลังจากที่ปลากินเข้าไปแบคทีเรียโพรไบโอติก จะเจริญเติบโตและยึดเกาะกับผนังลำไส้ทุกส่วน ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่มีพื้นที่ในการยึดเกาะ ซึ่งเป็นกลไกแรกในการทำงานของแบคทีเรียโพรโอติก นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการสร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ (Oranic acid) กรดไขมันอิสระ (Free fatty acids) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และสารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) ซึ่งจะช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งเมื่อแบคทีเรียโพรไบโอติกมีการย่อยกากอาหารจะมีการผลิตกรดแลคติก (Lactic acid) ที่มีส่วนช่วยในการทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และความสามารถในการต้านทานโรค

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกเข้ามาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำ อย่างแพร่หลาย (รัตนสุดา, 2554) โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกมีส่วนช่วยในการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ให้เกิดการสังเคราะห์และหลั่งโปรตีน ไซโตไคน์ (Cytokine) ซึ่งมีผลในการยับยั้งการอักเสบ ต้านไวรัส ซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อเกิดการติดเชื้อ (Shelby *et al.*, 2006) นอกจากนี้แบคทีเรียโพรไบโอติกยังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เช่น การกระตุ้นการทำงานของ แมคโครฟาร์จ และไลโซไซม์ ทำให้สัตว์น้ำมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคที่เข้ามาสู่ร่างกายเพิ่มมากขึ้น (Pourgholam *et al.*, 2017) นำไปสู่การเพิ่มความสามารถในการต้านโรค ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Iwashita *et al.* (2015) โดยทำการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสมโพรไบโอติก 3 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis, Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus oryzae* เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยในระหว่างการทดลอง ได้ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus iniae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเข้าสู่ตัวปลา และสังเกตผล เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ปลานิลที่กินอาหารผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกมีอัตราการตายที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีการทำงานของ Respiratory burst activity ที่ดีขึ้น ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโพรไบโอติกดังกล่าวช่วยให้ส่งเสริมให้ปลามีความสามารถในการต้านทานโรคได้ดียิ่งขึ้น

2.6.4 การเร่งการเจริญเติบโต และลดอัตราการตาย

แบคทีเรียโพรไบโอติกถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างแพร่หลาย โดยการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในปลานิลนั้น นิยมนำมาผสมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงปลา ซึ่งสามารถช่วยกระตุ้นให้เกิดการกินอาหาร เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร ส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี (คึกฤทธิ์, 2561) โดยพบว่าปลานิลที่กินอาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และมีอัตราแลกเนื้อลดลง (วิลาวัณย์ และคณะ, 2554) เช่น ในการศึกษาของ Eissa *et al.* (2014) พบว่าปลานิลที่กินอาหารผสมแบคทีโพรไบโอติก *B. Subtilis* และ *L. rhamnosus* มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้โพรไบโอติกยังมีผลทำให้ปลานิลมีอัตราการตายลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Aly *et al.* (2008) พบว่าปลาที่กินอาหารผสมโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* ในปริมาณ 3.01×10^7 CFU/g มีอัตราการตายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลมาจากโพรไบโอติกเข้าไปช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมคุ้มกันของปลา ทำให้ปลามีสุขภาพแข็งแรง

2.7 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คณาธิป และสุภฎา (2561) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริม *Bacillus licheniformis* ในความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 10^5 10^6 10^7และ 10^8 CFU/kg. ในอาหารปลานิลแดง และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมโพรไบโอติก พบว่าปลานิลแดงหลังจากได้รับอาหารเสริม *B. Licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/kg. มีการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหารทดลองอื่นๆ จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาด้วยเทคนิค DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) พบว่าการเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มต่างๆ สามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ และการเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/kg สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตซึ่งชี้ให้เห็นวาการเสริม *B. licheniformis* ลงในอาหารปลานิลแดงมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาในการเพาะเลี้ยงได้

ประพันธ์ศักดิ์ และนนทวิทย์ (2560) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จาก *Bacillus pumilus* AQAHBS01 ที่แยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล ซึ่งถือเป็นเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยทำการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับฟาร์มสำหรับห้องปฏิบัติการผู้วิจัยทำการทดลองโดยการให้อาหารปลา (ประมาณ 50 กรัม) ด้วยอาหารที่มีเชื้อ *B. pumilus* ที่ความเข้มข้น 1×10^7-10^9 CFU/kg. พบว่าปลามีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในระดับสูงดังแสดงในกิจกรรม phagocytic และระดับของ superoxide anion นำไปสู่การต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่ออาหารที่ความเข้มข้นเหล่านี้ถูกนำไปใช้กับการเลี้ยงปลานิลในระดับฟาร์มมีเพียง *B. pumilus* AQAHBS01 ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 และ 1×10^9 CFU/kg ที่สามารถเพิ่มความต้านทานโรคต่อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงแรก และเมื่อเข้าสู่ในช่วงกลางเดือนเมษายนที่อุณหภูมิน้ำสูงถึง 33° C พบว่าปลาในกลุ่มควบคุมและปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วย *B. pumilus* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^7 CFU/kg มีการตายที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* อย่างรวดเร็วมาก อย่างไรก็ตามในช่วงปลายเดือนเมษายนน้ำที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์จำนวนมากได้ไหลเข้าสู่พื้นที่เพาะเลี้ยงทำให้กลุ่มปลาทั้งหมดติดเชื้อ *Flavobacterium columnare* ยิ่งกว่านั้นระดับออกซิเจนที่ละลายในแม่น้ำก็ลดลงถึงระดับวิกฤตประมาณ 1.0–1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อให้เกิดผลกระทบต่อปลาซึ่งอาจจะค่อยๆฆ่าปลาที่เพาะเลี้ยงไปเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้ที่มีประสิทธิภาพของ *B. pumilus* เป็นโพรไบโอติกสำหรับการต้านทานโรคต่อ *S. agalactiae* ทั้งในห้องปฏิบัติการและในระดับฟาร์ม อย่างไรก็ตามสำหรับการเลี้ยงในกระชังในฟาร์มนั้นความผันผวนของคุณภาพน้ำยังคงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญสำหรับการใช้ โพรไบโอติก เนื่องจากมักก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพปลาทำให้ปลามีความเปราะบางและอ่อนไหวต่อปัญหาจากโรคติดเชื้อและไม่ติดเชื้อซึ่งเกษตรกรต้องพิจารณาอย่างรอบคอบ

Abarike *et al.* (2018) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียโพรโอติก BS เชิงพาณิชย์ที่ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลานิล (BS หมายถึง ส่วนผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. subtilis* และ *B. licheniformis*) โดยในการวิจัยได้ทำการทดลองในปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 53.01 ± 1.0 กรัม ให้อาหารสูตรพื้นฐานที่มีการเสริมด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก BS ซึ่งในระหว่างการทดลองปลาในกลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารพื้นฐานที่ไม่ผสมเชื้อ โพรไบโอติกขณะที่ปลาในกลุ่ม BS3, BS5, BS7 และ BS10 จะได้รับอาหารที่เสริมด้วย BS ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 3 g/kg, 5 g/kg, 7 g/kg และ 10 g/kg ตามลำดับ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 1.5% ของน้ำหนักตัว ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) ในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติก BS เพิ่มขึ้น แต่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในกลุ่ม BS10 และพบว่าค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (Lysozyme activity) เอนไซม์โพรติเอส (Protease) แอนติโพรติเอส(Antiprotease) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD) และระดับของIgM เพิ่มขึ้นสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในกลุ่ม BS10 กล่าวโยสรุปได้ว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก BS เสริมในอาหารที่ความเข้มข้น10 g/kg (BS10) สามารถนำมาพิจารณาเพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในการเลี้ยงปลานิล

Galagarza *et al.* (2018) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะในปลานิลโดยการเสริมอาหารด้วยสปอร์ของ *Bacillus subtilis* โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ NZ86 (NRRL B-50136) และ O14VRQ (NRRL B-67221) ของ *B. subtilis* ต่อพารามิเตอร์ต่างๆของระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะในปลานิล โดยการทดลองให้อาหารเป็นเวลา 51 วัน พบว่าการเสริมอาหารด้วยสปอร์ของ *B. subtilis* ของทั้งสองสายพันธุ์มีผลทำให้ความเข้มข้นของไลโซไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ขณะเดียวกันยังส่งเสริมให้ค่า alternative complement activity เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในการเสริมอาหารด้วยสายพันธุ์ NZ86 หลังจากผ่านไป 14 และ 51 วัน ในทางตรงกันข้ามการเสริมอาหารด้วยสายพันธุ์ O14VRQ ส่งผลให้ร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากการเจาะเลือดของปลานิลในวันที่ 28 และนอกจากนี้การเกิดขึ้นของผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันบางส่วนและระบบภูมิคุ้มกันทั้งหมดของปลานิล

Telli *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาผลที่เกิดจากอาหารผสม *Bacillus subtilis* ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต องค์ประกอบของร่างกายระบบโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจงของปลานิล (*O. niloticus*) รวมไปถึงการทำงานของโพรไบโอติกหากเข้าไปอยู่ในระบบทางเดินอาหารเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอัตราความหนาแน่นที่แตกต่างกัน พบว่า *B. subtilis* ยังคงทำงานได้หลังจากที่นำไปผสมกับอาหาร ภายหลังเก็บรักษาตลอดจนเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร และสังเกตได้ว่าปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง มีปริมาณเม็ดเลือดแดงและระดับฮีมาโทคริต (hematocrit) ต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นเป็นตัวกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียด และทำให้อัตราการเจริญเติบโตของปลาลดลง โดยปลาที่กินอาหารควบคุมและเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูงจะมีระดับไลโซไซม์ต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยกลุ่มทดลองอื่น แต่ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมโพรไบโอติกและเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูงจะมีค่าของระดับไลโซไซม์ (lysozyme) และกิจกรรม phagocytic ในพลาสมาที่สูงที่สุด ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผสมโพรไบโอติก *B. subtilis* ในปริมาณ 5×10^6 CFU/g ลงไปในอาหารนั้น เป็นประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกันธรรมชาติของปลานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการลดความเครียดที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงด้วยอัตราความหนาแน่นสูง เพิ่มค่าฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH) และปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันธรรมชาติของปลา

Han *et al.* (2015) กล่าวว่า ปลานิลเป็นปลาที่มีความสำคัญในกลุ่มของปลาเพาะเลี้ยงที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากโตเร็ว, การให้อาหารน้อย, สามารถต้านทานโรคได้และมีรสชาติดี สาเหตุหลักของโรคในปลานิลเกิดจาก *Streptococcus iniae* ทำให้ปลานิลมีการว่ายน้ำผิดปกติ เสียการทรงตัว ตาโปน ขาวขุ่น และมีเลือดออกในลูกตา สีของตัวปลาจะเข้ม มีจุดเลือดออกบริเวณแผ่นปิดเหงือก รอบปาก มีอัตราการตายสูงและทำให้ชาวประมงเสียรายได้ จึงมีการป้องกันการเกิดโรคโดยใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีที่มากขึ้น แต่โทษของการใช้ยาปฏิชีวนะทำให้กลุ่มแบคทีเรียก่อโรคเกิด การต้านทานต่อยาต้านจุลินทรีย์ ทำให้เกิดความสนใจในการใช้โพรไบโอติกหรือแบคทีเรียที่มีประโยชน์ซึ่งเป็นอีกทางเลือกแทนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเพราะนอกจากจะต้านทานเชื้อก่อโรคได้ ยังส่งผลดีต่อสุขภาพของปลาด้วย โดยได้ทำการทดลองใช้อาหารผสม *Bacillus licheniformis* ในการเลี้ยงปลานิลซึ่งพบว่าสามารถทำให้ปลานิลมีความสามารถในการเจริญเพิ่มมากขึ้น และเมื่อทำการทดสอบการติดเชื้อโดยใช้แบคทีเรีย *S. inniae* พบว่าปลาในกลุ่มทดลองที่ใช้อาหารผสม *B. licheniformis* มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น แสดงว่าอาหารมีผลต่อการเพิ่มความต้านทานโรคในปลา มีการพัฒนาภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของปลาและแบคทีเรีย *Bacillus* ยังสามารถต้านแบคทีเรียตัวอื่นที่จะเข้ามาหาอาหารหรือจะเข้ามาบริเวณเดียวกันได้ รวมถึงส่งผลต่อการฟื้นฟูโครงสร้างของวิลไลให้มีความสมบูรณ์

Khalil *et al.* (2014) ทำการทดลองโดยใช้ *Lactobacillus acidophilus* เป็นโพรไบโอติกในการผสมอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) เป็นระยะเวลา 70 วัน เพื่อตรวจสอบการรอดชีวิต และความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยแบ่งปลาเป็น 6 กลุ่มการทดลองและผสมโพรไบโอติกในปริมาณ 0, 1, 2, 3, 4 และ5 x 10^9 CFU/kg. ตามลำดับ ในระหว่างการทดลองได้มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* เข้าไปในตัวของปลา และสังเกตผลเป็นเวลา 14 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าปลาที่กินอาหารที่มีการผสม *L.acidophilus* มีสุขภาพดีและสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และมีอัตราการตายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

Liu *et al.* (2013) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของแบคทีเรีย *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ *L. brevis* JCM 1170 (HALB) และ *L. acidophilus* JCM 1132 (LALB) โดยเปรียบเทียบความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้ รวมถึงประเมินผลที่มีต่อการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของปลานิลลูกผสม ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ โดยปลาจะได้รับอาหารที่มีการผสมเชื้อ *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในปริมาณ 0 ถึง 10^9CFU/g จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างปลาเพื่อวิเคราะห์ลำไส้ไตและม้าม ในวันที่ 10, 20, และ 35 ของการทดลอง โดยในวันที่ 14 ของการทดลองได้มีการผสมเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* NJ-1 ลงไปในอาหารเพื่อดูความสามารถ ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การต้านทานเชื้อก่อโรค ผลการศึกษาพบว่า ปลาที่กินอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีอัตราการรอดชีวิต และน้ำหนักที่ใกล้เคียงกัน หรือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ แต่ปลาที่กินอาหารที่ผสม *L. brevis* JCM 1170 (HALB) มีความสามารถในการยึดเกาะกับลำไส้ และมีความสามารถในการต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* ได้มากกว่า ($P < 0.05$) ปลาที่กินอาหาร ที่ผสม *L. acidophilus* JCM1132 (LALB)

Midhan *et al.* (2019) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเสริมอาหารด้วย *Bacillus licheniformis* HGA8B ที่ช่วยเพิ่มพารามิเตอร์ของการเจริญเติบโตของปลานิล พบว่าการศึกษาในปัจจุบันถูกออกแบบมาเพื่อตรวจสอบศักยภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* HGA8B ในปลานิล จึงทำการเลี้ยงปลาโดยการให้อาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ความเข้มข้นสองระดับคือ 1×10^6 และ 1×10^8 CFU/g เป็นเวลา 60 วันจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเพิ่มพารามิเตอร์ของการเจริญเติบโตได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เช่น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) เป็นต้น ขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ความเข้มข้น 1×10^6และ 1×10^8 CFU/g ยังสามารถช่วยปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพารามิเตอร์ทางชีวเคมีต่างๆได้ และพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโตก็เพิ่มขึ้นด้วยเนื่องจากการให้อาหารที่เสริมด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก จากผลลัพธ์ทั้งหมดที่กล่าวมานี้เป็นข้อบ่งชี้ว่าแบคทีเรียโพรไบโอติก *B. licheniformis* HGA8B สามารถนำมาใช้เพื่อปรับปรุงการผลิตสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Ramos *et al.* (2017) ได้ศึกษาการทำงานของโพรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเพิ่มประสิทธิภาพของการเจริญเติบโต โดยทำการทดลองเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus*) ด้วยอาหารที่มีการผสมโพรไบโอติก *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., และ *Lactobacillus* sp. จากนั้นประเมินประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ปลานิลโดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก), กลุ่มการทดลองที่ 2 ใส่เชื้อผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติก ในปริมาณ 1×10^6 CFU/g และกลุ่มการทดลองที่ 3 ใส่เชื้อผสมของแบคทีเรียโพรไบโอติกในปริมาณ 2.3×10^6 CFU/g ทำการทดลองระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าปลาที่กินอาหารผสมโพรไบโอติก (กลุ่มการทดลองที่ 2 และ3) มีน้ำหนักอัตราการเติบโตจำเพาะ และค่าพลาสมาโปรตีนที่มากกว่ากลุ่มการทดลองที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ พบว่าปลาที่กินอาหารผสมโพรไบโอติก สำไส้จะมีความสมบูรณ์ และมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโพรไบโอติกมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการดูดซึมสารอาหารและการเจริญเติบโตของปลานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhou *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกที่มีต่อประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล (*O. niloticus*) ดำเนินการทดลองโดยการใช้โพรไบโอติกผสมลงไปในน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลา เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 40 วัน แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ และใช้โพรไบโอติกที่แตกต่างกัน โดยกลุ่มการทดลองที่ 1 (T-1) ใช้โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* B10 กลุ่มการทดลองที่ 2 (T-2) ใช้โพรไบโอติก *B. coagulans* B16 กลุ่มการทดลองที่ 3 (T-3) ใช้โพรไบโอติก *Rhodopseudomonas palustris* G06 และกลุ่มการทดลองที่ 4 (T-4) เป็นกลุ่มควบคุม โดยโพรไบโอติกที่กล่าวมาข้างต้นจะถูกใส่ลงไปในน้ำในปริมาณ 1×10^7 CFU/ml ทุกๆ 2 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ปลาที่ถูกเลี้ยงในกลุ่มการทดลองที่มีการเสริมด้วย *B. coagulans* B16 และ *R. palustris* G06 มีน้ำหนักและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูง ($P<0.05$)เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การเสริมด้วยโพรไบโอติก *B. coagulans* B16 และ *R. palustris* G06 ลงไปในน้ำ สามารถใช้ในการเพิ่มน้ำหนักและประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของปลานิล (*O. niloticus*) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ปลานิล

ลูกปลานิลน้ำหนักเริ่มต้น 47 กรัม อายุประมาณ 3 เดือน ได้รับความอนุเคราะห์จาก เจ๊ ตาพันธุ์ปลา 6/1 ม.4 ต.หนองตีนนก อ.บ้านโพธิ์ จ. ฉะเชิงเทรา (101°7'439.32"E13°34' 2066.05''N) เลี้ยงปลาในกระชังขนาด 1x1x1.5 เมตร และแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง โดยในแต่ละกลุ่มการทดลองเลี้ยงปลาจำนวน 100 ตัว เลี้ยงปลาโดยใช้อาหารปลายี่ห้อ ฟิชเฟิร์ส สูตร 443 ผลิตโดยบริษัท อินเทคค์ ฟีด จำกัด ที่อยู่ 77/2 หมู่ 2 ถ. พระราม 2 ต.นาโคก อ.เมือง จ.สมุทรสาคร ที่ประกอบไปด้วย โปรตีนร้อยละ 16 ไขมันร้อยละ 5 และกากใยอาหารร้อยละ 10 แบ่งเลี้ยงวันละ 2 ครั้ง ด้วยอัตราร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักตัว เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 3 เดือน และทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกๆเดือนโดยวัดค่าพารามิเตอร์ของน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ค่าออกซิเจนละลายน้ำ แอมโมเนีย ความเป็นด่างของน้ำ และความกระด้างของน้ำ

3.2 อาหารที่ใช้เลี้ยงและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย

3.2.1 Trypticase soy agar (TSA)

3.2.2 Trypticase soy borth (TSB)

3.2.3 Triple sugar iron agar (TSI)

3.2.4 Starch agar

3.2.5 Skimmilk agar

3.3 สารเคมี

3.3.1 ชุดย้อมแกรม

3.3.2 สารละลาย Malachite green

3.3.3 สารละลาย Kovac's reagent

3.3.4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.3.5 Skim milk ความเข้มข้น 2 ร้อยละ

3.3.6 สารละลายไอโอดีน ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

3.3.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

3.3.8 สารละลาย Soluble starch ความเข้มข้นร้อยละ 2

3.3.9 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 5% EDTA

3.3.10 Absolute methanol

3.3.11 สี Dip Quick Solution A

3.3.12 สี Dip Quick Solution B

3.3.13 สารละลาย Drabkin's solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.14 สารละลาย alkaline copper

3.3.15 Folin reagent

3.3.16 แอลกอฮอล์ 95% และแอลกอฮอล์ 70%

3.4 วัสดุและอุปกรณ์

3.4.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร

3.4.2 ขวดเพาะเชื้อ (Duran) ขนาด 250 500 และ 1000

3.4.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.4 หลอดทดลอง (Test tube)

3.4.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle & loop)

3.4.6 บีกเกอร์ (Beaker)

3.4.7 กระบอกตวง (Cylinder)

3.4.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.4.9 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

3.4.10 แผ่นสไลด์ (Slide)

3.4.11 ปิเปต (Pipette)

3.4.12 หลอดหยด (Dropper)

3.4.13 ลูกยาง (Rubber bulb)

3.4.14 ปากคีบ (Forceps)

3.4.15 แท่งแก้วสามเหลี่ยมมีด้าน (Spreader)

3.4.16 กระชังตาข่าย ขนาด 1.5 x1.5 x1.5 เมตร

3.4.17 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัดปลา

3.4.18 เข็มฉีดยาเบอร์ 26 และ เบอร์27

3.4.19 Syringe ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.4.20 คิวเวท (Cuevate)

3.4.21 หลอดเซนทริฟิว (Centrifuge tube)

3.4.22 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.4.23 ทิป (Tip)

3.4.24 ถุงมือยาง/ถุงมือพลาสติก

3.4.25 เครื่องชั่ง

3.5.26 ไม้บรรทัด

3.5 เครื่องมือ

3.5.1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

3.5.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.5.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)

3.5.4 เตาอบไมโครเวฟ (Microwave Oven)

3.3.5 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 เครื่องวัดความเป็น กรด-ด่าง (pH meter)
3.5.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)
3.5.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3.5.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator shaker) อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส
3.5.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
3.5.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.6 วิธีการ

3.6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

ทำการแยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 จาก stock -80 องศาเซลเซียส (ชัชนาภรณ์ และคณะ, 2556) เพื่อนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกในการผสมในอาหารเม็ดสำหรับใช้เลี้ยงปลา

3.6.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งโดยสังเกตรูปร่าง สี โคโลนี ระดับความนูน ผิวหน้า และขอบโคโลนี โดยนำแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 มาเขี่ยลงบนผิวหน้าอาหารโดยวิธีการ Cross Streak และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว และตรวจสอบลักษณะของโคโลนี (ชัชนาภรณ์ และคณะ, 2556)

3.6.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยนำแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 มาทำการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น ดังนี้

1) การย้อมแกรมตามวิธี Huker staining method

วิธีการย้อมแกรม ดัดแปลงจาก Murray *et al.* 1994 โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แตะเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับเกลี่ยเชื้อ (Smear) ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำมาตรึง (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นหยดสารละลาย Crystal violet เป็นเวลา 1 นาที แล้วเททิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นหยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้นาน 1นาที แล้วเททิ้ง ล้างออกด้วย Ethyl alcohol ร้อยละ 95 ทิ้งไว้ 15 วินาที เพื่อชะล้างส่วนเกินออก ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วหยดสารละลาย Safranin O เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นวางแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งและนำไปตรวจลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์ติดสีม่วงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก หากติดสีแดงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

2) การย้อมสปอร์

ย้อมสปอร์ตามวิธีมาตรฐานของ APHA, 1992 โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้สำหรับเกลี่ยเชื้อ (Smear) ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำมาตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นหยดสารละลาย Malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมบริเวณ ที่มีแบคทีเรีย นำไปวางบนเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) โดยใช้ตะแกรงพาดบนปากภาชนะหม้อ อังบนไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ระวังอย่าให้สีย้อมแห้ง คอยเติมสีย้อมเมื่อใกล้แห้ง ทิ้งไว้จนสไลด์เย็น

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นและซับให้แห้ง หยดสารละลาย Safranin O เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งและนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100X

3) การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ดัดแปลงวิธีจาก เจนนุช, 2560 โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อลงบนสไลด์ และหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น ร้อยละ 3 ลงบนสไลด์ 1 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้น หากเกิดฟองอากาศขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ให้ผลเป็นบวก และหากไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ให้ผลเป็นลบ

4) การทดสอบโดยวิธี Indole

ทดสอบ Indole ดัดแปลงจาก Collins *et al.*, 1995 โดยนำแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 มาเลี้ยงในอาหาร Tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยหยดสารละลาย Kovac'reagent 3-4 หยด สังเกตสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลง ซึ่ง Tryptophan จะถูกแบคทีเรียออกซิไดซ์ได้เป็นสาร Indole, Skatole และ Indoleacetic acid (โดยเอนไซม์ Tryptophanae) Indole จะทำปฏิกิริยากับแอลดีไฮด์ (Aldehyde) หากมีวงแหวนชมพูอมม่วงแสดงว่าให้ผลบวก

5) การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI)

ทดสอบ TSI ดัดแปลงวิธีจาก Collins *et al.*, 1995 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 จากนั้นนำมา Stap ลงในอาหาร และ Streak บนผิวอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกผลการทดลองดังนี้

- K/A แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคสเพียงตัวเดียว
- A/A แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคส แลกโตส และ/หรือซูโครส (หมักน้ำตาลย่างน้อย 2 ตัว)
- A/A g, H_2S แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคส แลกโตส และ/หรือซูโครส สร้างแก๊ส และผลิต H_2S
- A/A g แสดงว่า มีการหมักน้ำตาลกลูโคส แลกโตส และ/หรือซูโครส สร้างแก๊ส

หมายเหตุ:

K	=	อาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง
A	=	อาหารมีการเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง
g	=	อาหารมีรอยแตก
g, H_2S	=	อาหารมีรอยแตกและมีสีดำ

3.6.2 การตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก

3.6.2.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด ดัดแปลงวิธีจากรายงานของ Hyronimus *et al.*, 2000 ถ่ายแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 (โดยปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อโพรไบโอติกให้มีปริมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml (เปรียบเทียบจาก McFarland Standard No 0.5) ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชค่าต่างๆ ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 โดยใช้กรด ไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้นำไปดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีกลุ่มควบคุม คืออาหารที่ไม่ปรับค่าพีเอช (พีเอช 7.0 ± 0.2) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร TSA โดยวิธี Spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่มีชีวิตรอด

3.6.2.2 การตรวจสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่เป็นเกลือ

ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น ดัดแปลงจากวิธีของ Gilliland *et al.*, 1984 ถ่ายแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104 , T311 และ T318 (โดยปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อให้มีปริมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml (เปรียบเทียบจาก McFarland Standard No 0.5) ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีส่วนประกอบของเกลือโซเดียมครอไรด์ (NaCl) 0.5, 1, 2 และ 3 ร้อยละ โดยมีกลุ่มควบคุม คืออาหารที่ไม่มีส่วนประกอบของเกลือโซเดียมครอไรด์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร TSA โดยวิธี Spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่มีชีวิตรอด

3.6.2.3 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีน

1) การตรวจสอบความสารถในการย่อยแป้ง

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง ดัดแปลงจากวิธี Mitidieri *et al.*, 2006 โดยวางดิสก์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Soluble starch ความเข้มข้น 2 ร้อยละ เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นหยดสารละลายเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาทดสอบการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีน ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ลงไป 5-10 นาที หากเกิด Clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

2) การตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนดัดแปลงจาก Michael and Pelezer, 1995 โดยวางดิสก์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ Skim milk ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นหยดสารละลายเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากเกิด Clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการย่อยโปรตีน

3.6.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงปลานิล

เตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส คือ M104, T311 และ T318 โดยทำการเพิ่มปริมาณเชื้อและนำไปผสมในอาหาร

3.6.3.1 นำแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส มาเลี้ยงในอาหารเหลว Trypticase soy broth (TSB) โดยใช้การเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 18-24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อยู่ในอาหารเหลวใส่ในหลอดพลาสติกสำหรับ ปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนที่ 5000 รอบ/นาที จากนั้นเทอาหารส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน และปิเปตน้ำเกลือ 0.85% ปริมาณ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไป ปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการล้างตะกอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อและทำซ้ำ 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.2 นำเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทำการเจือจางกับน้ำเกลือ 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเป็น $1.5x10^8$ CFU/ml (เทียบจาก McFarland Standard No0.5) จากนั้นนำอาหารปลาแบบเม็ดสำเร็จรูปมาจุ่มลงในแบคทีเรียโพรไบโอติก ที่ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว นำมาแช่จนซึมทั่วทุกเม็ดเพื่อให้แบคทีเรียโพรไบโอติกเกาะติดที่ผิวของอาหารเม็ด จากนั้นนำอาหารไปเกลี่ยบนตะแกรงแล้วนำไปผึ่งบริเวณกลางแจ้งที่มีลมโกรกแต่ไม่ควรให้โดนแสงแดดโดยตรง

3.6.3.3 คำนวณอัตราส่วนการให้อาหารในแต่ละมื้อต่อจำนวนปลาที่ทำการเลี้ยง โดยคำนวณร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ให้อาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก 3 ชนิด ในปลาแต่ละกลุ่มทดลอง ซึ่งแต่ละกลุ่มมีปลาจำนวน 100 ตัว และให้อาหารปกติที่ไม่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก ในกลุ่มควบคุม จำนวน 100 ตัว

3.6.3.4 ตรวจสอบย้อนกลับของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารปลา สุ่มตัวอย่างอาหารปลาในแต่ละเดือนที่ทำอาหาร มาตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อยู่ในอาหาร โดยนำอาหารทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง ปริมาณ 1 กรัม แช่ในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำเกลือที่ได้มาทำการเจือจางดังนี้ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}และ10^{-9} โดยทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง TSA ด้วยวิธี Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูผลโดยการนับจำนวนโคโลนี และบันทึกผล

3.6.4 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงปลา

3.6.4.1 เตรียมกระชังสำหรับเลี้ยงปลาโดยใช้กระชังขนาด 1 x 1 x 1.5 เมตร ปล่อยปลาในอัตราความหนาแน่นเท่ากับ 100 ตัวต่อกระชัง

3.6.4.2 ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ วัดอุณหภูมิ โดยใช้ Thermometer วัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำ โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) วัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ ค่าแอมโมเนียมของน้ำ ค่าความเป็นด่าง และค่าความกระด้างของน้ำโดยใช้ชุดทดสอบยี่ห้อ VUNIQE ทำการวัดค่าพารามิเตอร์เหล่านี้ ทุกๆเดือน

3.6.5 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ

3.6.5.1 ทำการวัดขนาด และชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของปลาแต่ละตัว ทั้ง 3 กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม บันทึกข้อมูลก่อนที่จะปล่อยลงกระชัง ทำการวัดขนาด และชั่งน้ำหนักทุกเดือน โดยสุ่มตัวอย่างปลาในแต่ละกลุ่มทดลองจำนวนกลุ่มละ 10 ตัว พร้อมทั้งจดบันทึกผล

3.6.6 การตรวจสอบทางด้านโลหิตวิทยา

3.6.6.1 การเจาะเลือดปลา

เจาะเลือดปลาโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 26 หรือ 27 และ Syringe ความจุ 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณโคนหาง (รูปที่ 3.1) มาตัวละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใส่ 0.5% EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าทางด้านโลหิตวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.1 การเจาะเลือดปลานิล

3.6.6.2 การนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว

วิธีการนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวใช้การนับปริมาณโดยตรง (Straight-edged-method) ดัดแปลงจากวิธีของ ประสิทธิ์ และสุชาดา, 2534 โดยนำเลือดที่เจาะได้มาหยดลงบนสไลด์ แล้วเสมียร์ให้ทั่วแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้น fix ด้วย absolute methanol 3 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นจุ่มสี Dip Quick Solution A 5 นาที ตามด้วยสี Dip Quick Solution B 5นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์วิธีการนับจะนับจากซ้ายไปขวาหรือขวาไปซ้ายที่กำลังขยาย 100x ส่อง oil immersion นับอย่างน้อย 10 field แล้วนำจำนวนเซลล์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

3.6.6.3 การตรวจสอบค่าฮีโมโกลบิน

ตรวจสอบหาค่าฮีโมโกลบินในเลือดตามวิธี Larsen and Snieszko, 1961 โดยใช้ ปิเปตดูดตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Drabkin's solution 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเทใส่คิวเวทประมาณ 2 มิลลิลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยมี Drabkin's solution เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานฮีโมโกลบิน

3.6.7 การตรวจสอบทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา

3.6.7.1 การตรวจสอบค่าพลาสมาโปรตีน

ตรวจสอบค่าพลาสมาโปรตีนตามวิธี Lowry *et al.*, 1951 โดยผสมซีรั่มปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย alkaline copper 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย folin reagent 1:10 (folin reagent 1 ส่วน : น้ำกลั่น 10 ส่วน) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) และนำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานอัลบูมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.7.2 การตรวจสอบค่าอิมโมโนโกลบูลิน

ตรวจสอบหาค่าอิมโมโนโกลบูลิน ดัดแปลงจากวิธีของ Al-Dohail *et al.*, 2009 นำซีรั่มปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ 12% Polyethyleneglycol solution (PEG) 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง ที่ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำซีรั่มส่วนใสด้านบนไปทำวิธีการหาค่าพลาสมาโปรตีนต่อ จากนั้นนำมาค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

อิมโมโนโกลบูลินทั้งหมด = ค่าพลาสม่าโปรตีนในตัวอย่าง-ค่าพลาสม่าโปรตีนที่เหลือจากการใส่ PEG

3.6.7.3 การตรวจสอบค่ากิจกรรมไลโซไซม์

ตรวจสอบค่ากิจกรรมไลโซไซม์ ดัดแปลงจากวิธีของ Lie *et al.*, 1989 เตรียม Phosphate Citrate Buffer ปริมาตร 490 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.8 และเตรียมสารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้มาผสมลงใน Phosphate Citrate Buffer แล้วนำมาเท plate (ทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและไม่เกิดฟอง) เมื่อวุ้นแข็งทำการเจาะวุ้น เพลทละ 6 หลุม จากนั้นนำซีรั่มปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 ไมโครลิตร แล้วนำมาใส่ในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการวัด Clear zone และหักลบกับขนาดหลุมที่เจาะ บันทึกผล นำผลที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ hen egg white lysozyme เป็นมาตรฐาน

3.6.8 การตรวจสอบแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ปลานิล

นำลำไส้ของปลานิลมาตรวจสอบเพื่อยืนยันว่ามีเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมอยู่กับอาหารโดยทำการสุ่มจับปลามากลุ่มการทดลองละ 3 ตัว ทำการผ่าปลาและนำลำไส้ของปลานิลออกมา นำไปบดผสมกับน้ำเกลือ 0.85% ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} , 10^{-7}และ 10^{-8} ทำเช่นเดียวกันนี้กับอาหารปลาในกลุ่มควบคุมจากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนอาหารแข็งด้วยวิธี Spread plate นับจำนวนโคโลนี หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส ได้แก่ M104 (*Lactobacillus* sp.) T311 และT318 (*Bacillus* sp.) จาก stock -80 องศาเซลเซียส ทำการเขี่ยลงบนอาหารแข็ง TSA ด้วยเทคนิค Cross Streak และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การย้อมแกรม การย้อมสปอร์ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส การทดสอบทางเคมีโดยวิธี indole และ Triple Sugar Iron (TSI) ผลการทดสอบการย้อมแกรมพบว่า แบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส ตัวเซลล์ติดสีม่วงของแกรมบวก ลักษณะของตัวเซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ผลทดสอบการย้อมสปอร์พบว่ารหัส T311 และT318 มีการสร้างสปอร์เนื่องจากเป็นแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ขณะที่รหัส M104 ไม่มีการสร้างสปอร์เนื่องจากเป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. ผลของการทดสอบทางชีวเคมีโดยวิธี indole พบว่าทั้งสามรหัสให้ผลเป็น Negative เนื่องจากไม่เกิดวงแหวนสีชมพูเพราะแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole แต่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ผลการทดสอบทางชีวเคมีของ Triple Sugar Iron (TSI) พบว่าแบคทีเรียรหัส T311 และรหัส T318 เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีเหลือง แสดงผลเป็น K/A แสดงว่ามีการหมักน้ำตาลกลูโคสเพียงตัวเดียว และสามารถผลิตกรดได้ ในขณะที่รหัส M104 แสดงผลเป็น A/A คือสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส/แลคโตส หรือกลูโคส/ซูโครส (หมักน้ำตาลได้ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป) และสามารถสร้างกรดได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของชัชนาภรณ์ และคณะ (2556) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และT318 แสดงไว้ดังตารางที่ 4.1

4.2 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก

4.2.1 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด

จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด ของแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และT318 พบว่า แบคทีเรียรหัส M104 และ T311 สามารถเจริญได้ที่พีเอช 1, 2, 3, 4 , 5 และ 6 ส่วนแบคทีเรียรหัส T318 สามารถเจริญได้ที่พีเอช 2, 3, 4, 5 และ 6 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2

4.2.2 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น

จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยการทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะเกลือน้ำดีเข้มข้น ของแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส สามารถเจริญได้ดีภายใต้สภาวะความเป็นเกลือที่ความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 2.0% และ 3.0% ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลการตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง และความสามารถในการย่อยโปรตีน

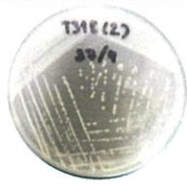
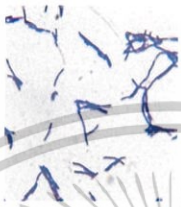
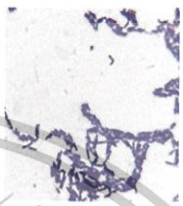
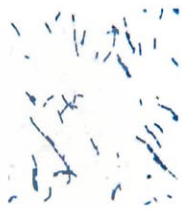
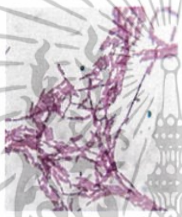
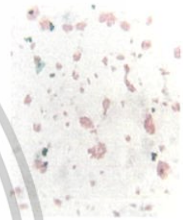
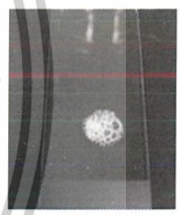
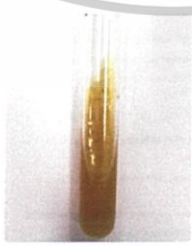
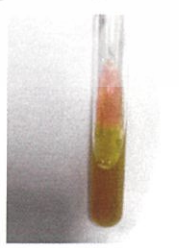
จากการตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง และความสามารถในการย่อยโปรตีนพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส มีความสามารถในการย่อยแป้ง โดยเมื่อหยดสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ลงไปพบว่าเกิด Clear zone รอบๆ โคโลนีของเชื้อ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.1 และมีความสามารถในการย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร Skim milk medium ได้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.2

รูปที่ 4.1 : การตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง
(A) ควบคุมใส่น้ำกลั่นแทนแบคทีเรียโพรไบโอติก (-)
(B) M104 ในอาหาร Starch agar (+)
(C) T311 ในอาหาร Starch agar(+)
(D) T318 ในอาหาร Starch agar (+)

รูปที่ 4.2 : การตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน
(A) ควบคุมใส่น้ำกลั่นแทนแบคทีเรียโพรไบโอติก
(B) M104 ในอาหาร Skim milk medium (+)
(C) T311 ในอาหาร Skim milk medium (+)
(D) T318 ในอาหาร Skim milk medium (+)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 : ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติก

การทดสอบ	M104	T311	T318
ลักษณะโคโลนี			
การย้อมแกรม			
การย้อมสปอร์			
ทดสอบ Catalase			
ทดสอบ Indole	+	+	+
ทดสอบ TSI			
	-	-	-
			
	A/A	K/A	K/A

หมายเหตุ : + = เกิดปฏิกิริยา

\- = ไม่เกิดปฏิกิริยา

K/A = หมักน้ำตาลกลูโคส และผลิตกรด

A/A = หมักน้ำตาลกลูโคส/แลคโตส/ซูโครส และผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 : ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรดและเกลือน้ำดีเข้มข้น

การทดสอบ	M104	T311	T318
การทดสอบความเป็นกรด			
- พีเอช 1	+	+	-
- พีเอช 2	+	+	+
- พีเอช 3	+	+	+
- พีเอช 4	+	+	+
- พีเอช 5	+	+	+
- พีเอช 6	+	+	+
การทดสอบความทนเกลือ			
- ความเข้มข้นเกลือ 0.5 %	+	+	+
- ความเข้มข้นเกลือ 1.0 %	+	+	+
- ความเข้มข้นเกลือ 2.0 %	+	+	+
- ความเข้มข้นเกลือ 3.0 %	+	+	+

หมายเหตุ : - = ไม่สามารถทนได้
+ = สามารถทนได้

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส สามารถทนกรดและทนเกลือน้ำดีเข้มข้นได้ สอดคล้องกับการรายงานของ สุบัณฑิต และวีรพงศ์ (2552) ที่กล่าวว่า โพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการเจริญ และทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากภายในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดสูง จากการหลั่งกรดไฮโดรคลอลิกเพื่อให้น้ำย่อยที่อยู่ในกระเพาะอาหารทำงานได้ดี เช่น เปปซิน (ย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน) และจากรายงานของ ภณิดา และคณะ (2557) ได้กล่าวว่า โพรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติในการเจริญได้ในเกลือน้ำดี เนื่องจากลำไส้เล็กมีเกลือน้ำดีที่ผลิตจากตับอ่อนเพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมอาหาร และในการทดสอบการย่อยแป้งและโปรตีนของแบคทีเรียโพรไบโอติกพบว่าเกิดโซนใส สอดคล้องกับการรายงาน Eissa and El-Gheit (2014) ที่พบว่าโพรไอติกสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร เช่น อะไมเลส (ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล) โปรเตส (ย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน) และไลเปส (ย่อยไขมันเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล) รวมทั้งช่วยเพิ่มการดูดซึมอาหารของปลานิลได้อีกด้วย ซึ่งโพรไบโอโอติก กลุ่ม M104 มีขนาดของโซนใสกว้างที่สุด

4.3 ผลการตรวจสอบย้อนกลับปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารปลา

ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104, T311 และ T318 ความเข้มข้น $1.5x10^8$ CFU/ml (เทียบจาก McFarland Standard No 0.5) กับอาหารปลา ทำการตรวจสอบย้อนกลับอาหารปลาเพื่อให้ทราบปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส เทียบกับอาหารควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่ได้ผสมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยในการตรียมอาหารครั้งที่ 1 อาหารควบคุม และอาหารที่ ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก M104, T311 และT318 มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียอยู่ที่ $5.8x10^4$, $6.5.x10^8$, $5.4x10^8$, $5.2x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การตรียมอาหารครั้งที่ 2 มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียอยู่ที่ $6.7x10^4$, $5.8x10^8$, $6.2x10^8$และ $5.5x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและการเตรียมอาหารครั้งที่ 3 มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียอยู่ที่ $5.7x10^4$, $3.5x10^7$, $2.9x10^7$และ $2.8x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.4 ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงปลา

การเลี้ยงปลาแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม, กลุ่ม M104, กลุ่ม T311 และกลุ่ม T318 จำนวน 100 ตัวต่อบ่อ อัตราการให้อาหารอยู่ที่ 5 ร้อยละของน้ำหนักตัว แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น โดยมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำทุกๆ 1 เดือนพบว่า เดือนที่ 1 2 และ3 มีค่า pH 7.6, 7.8 และ7.8 อุณหภูมิ 30, 33 และ35°Cค่าออกซิเจนละลายน้ำ 5.5, 5.5 และ5.5 mg/L แอมโมเนีย 0.6, 1 และ2 mg/L ความเป็นด่างของน้ำเท่ากับ 63, 85 และ85 mg/Lและความกระด้างของน้ำเท่ากับ 306, 306 และ 306 mg/L ตามลำดับ

จากการตรวจสอบคุณภาพของน้ำในแต่ละเดือน และทดสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยคุณสมบัติของน้ำที่อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามการรายงานของมานพ และคณะ (2536) กล่าวว่า ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมคือ ได้แก่ pH 6.5-8.5 อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ 3-5mg/L ตามลำดับ ตามรายงานของนวลมณี (2553) ได้กล่าวไว้ว่าหากค่าพารามิเตอร์ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดผลกระทบต่อปลาได้ จากรายงานของนันทริกา และมนทกานติ์ (2006) รายงานว่า ค่าความเป็นด่างควรจะอยู่ในช่วง 75 - 200 mg/L ค่าความกระด้างของน้ำที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 100-250 mg/L และแอมโมเนียมซึ่งเกิดจากการขับถ่ายของเสียโดยปกติความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 0-0.02 พีพีเอ็ม ซึ่งผลที่ได้จากการวัดคุณภาพน้ำพบว่าน้ำมีค่าความกระด้างสูงเกินกำหนด

4.5 ผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของปลา

วัดขนาด ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของปลาแต่ละตัว ทั้ง 3 กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม บันทึกข้อมูลก่อนปล่อยลงกระชัง จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละกลุ่มการทดลองมาวัดขนาด และชั่งน้ำหนักทุกๆ เดือน เมื่อครบ 3 เดือน พบว่าความยาว น้ำหนักเฉลี่ยของปลาทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง มีค่าเพิ่มขึ้นระหว่างการเลี้ยงครบ 1 เดือนและ 2 เดือน แต่การเลี้ยงในช่วงเดือนที่ 3 พบว่าค่าน้ำหนักและความยาวของปลาทั้ง 4 กลุ่มทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 กราฟความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยรวมทั้ง 3 เดือนแสดงดังรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ เนื่องจากเดือนที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ของน้ำบางประการ เช่น อุณหภูมิและความกระด้างของน้ำ อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลให้ปลากินอาหารได้น้อย เคลื่อนไหวช้า เจริญเติบโตช้าลงและอาจทำให้ปลาอ่อนแอได้ (นวลมณี, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3: น้ำหนักปลาเฉลี่ย 3 เดือน

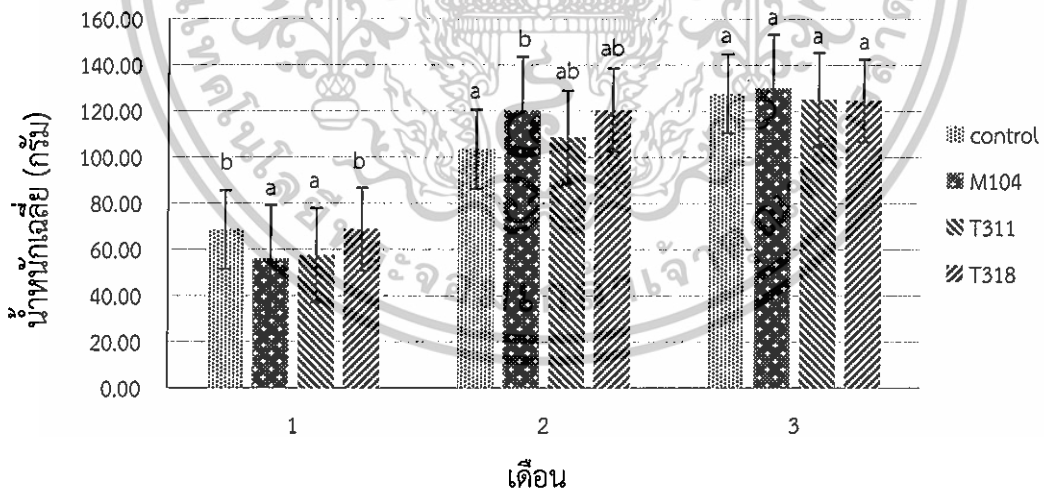
เดือน	Control	M104	T311	T318
1	68.50±11.32^{b}	55.93±10.30^{a}	57.55±9.20^{a}	68.80±11.39^{b}
2	103.40±4.08^{a}	120.30±18.96^{b}	108.50±6.25^{ab}	120.50±18.07^{ab}
3	127.50±16.20^{a}	130.00±18.25^{a}	125.00±10.00^{a}	124.50±23.26^{a}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.4: ความยาวปลาเฉลี่ย 3 เดือน

เดือน	Control	M104	T311	T318
1	14.68±0.87^{b}	13.23±0.86^{a}	13.23±1.17^{a}	15.67±1.21^{c}
2	16.72±0.48^{a}	18.05±0.98^{b}	17.87±0.43	18.12±1.14^{b}
3	18.73±0.80^{a}	19.26±1.33^{a}	18.46±0.88^{a}	18.21±1.57^{a}

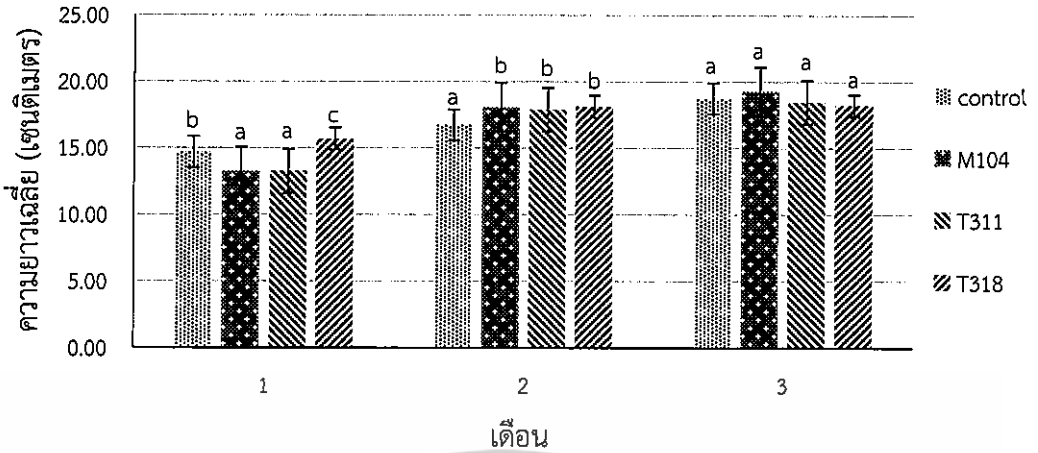
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



รูปที่ 4.3 : น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิล

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 : ความยาวเฉลี่ยของปลานิล

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

หลังจากเลี้ยงปลานิลเป็นระยะเวลา 3 เดือน และนำมาวัดค่าความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยเรียบร้อยแล้วจากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ของการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าน้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (Daily weight gain) และอัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio) พบว่าในกลุ่มทดลอง M104 มีค่าพารามิเตอร์การเจริญ ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มต่อวันและอัตราการแลกเนื้อแตกต่างจากกลุ่มทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 : พารามิเตอร์การเจริญเติบโตของปลานิลหลังจากเลี้ยงระยะเวลา 3 เดือน

พารามิเตอร์การเจริญเติบโต	Control	M104	T311	T318
น้ำหนักเพิ่มต่อวัน	0.89±0.11	0.92±0.11	0.68±.011	0.84±0.11
อัตราแลกเนื้อ	13.06±2.16	13.02±2.16	17.62±2.16	14.18±2.16

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของปลานิลได้แก่ น้ำหนัก ความยาว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันและอัตราการแลกเนื้อ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 3 เดือน พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมโพรไบโอติกมีการเจริญเติบโตดีเมื่อกับเทียบกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มทดลอง M104 สังเกตได้จากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันมีค่าสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Al-Dohail *et al.* (2009) พบว่า การผสมโพรไบโอติกในอาหาร ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีเนื่องจากโพรไบโอติก สามารถช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ในลำไส้ให้ทำงานได้ดีขึ้น มีส่วนช่วยในการกระตุ้นระบบย่อยอาหาร ทำให้การกินและดูดซึมอาหารของปลานิลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการตรวจสอบด้านโลหิตวิทยา

4.6.1 ผลการนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงและปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่า กลุ่มที่มีปริมาณเม็ดเลือดแดงสูงสุด คือ กลุ่ม M104 รองลงมาคือ กลุ่ม T318, กลุ่ม T311 และกลุ่มควบคุมมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงเฉลี่ย$2.64x10^6$, $2.46x10^6$, $2.56x10^6$ และ $2.22x10^6$ เซลล์ต่อไมโครลิตรตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่ผสมโพรไบโอติก มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ผลของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงในกลุ่ม T311 พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าในกลุ่มควบคุมมีปริมาณเฉลี่ยเป็น $4.24x10^4$ เซลล์ต่อไมโครลิตร ในขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวของกลุ่มทดลองที่ผสมโพรไบโอติกได้แก่ กลุ่ม M104, กลุ่ม T311 และกลุ่ม T318 มีค่าเฉลี่ยเป็น $14.5x10^4$, $8.18x10^4$ และ $7.61x10^4$ เซลล์ต่อไมโครลิตรตามลำดับ จากการผลการศึกษาพบว่ากลุ่ม M104 แตกต่างจากทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่กลุ่ม T311 และกลุ่ม T318 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.6.2 ผลการตรวจสอบค่าฮีโมโกลบิน

ผลการทดสอบหาค่าฮีโมโกลบินพบว่าในกลุ่มที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกได้แก่ กลุ่ม M104, กลุ่ม T311 และกลุ่ม T318 มีปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ย 220.87, 187.73 และ 148.13 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยเท่ากับ 192.07 กรัมต่อเดซิลิตร จะเห็นได้ว่ากลุ่ม M104 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม, กลุ่ม T311 และกลุ่ม T318 เมื่อพิจารณากลุ่ม M104 พบว่าแตกต่างจากทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 : พารามิเตอร์โลหิตวิทยาของปลานิลหลังจากเลี้ยงระยะเวลา 3 เดือน

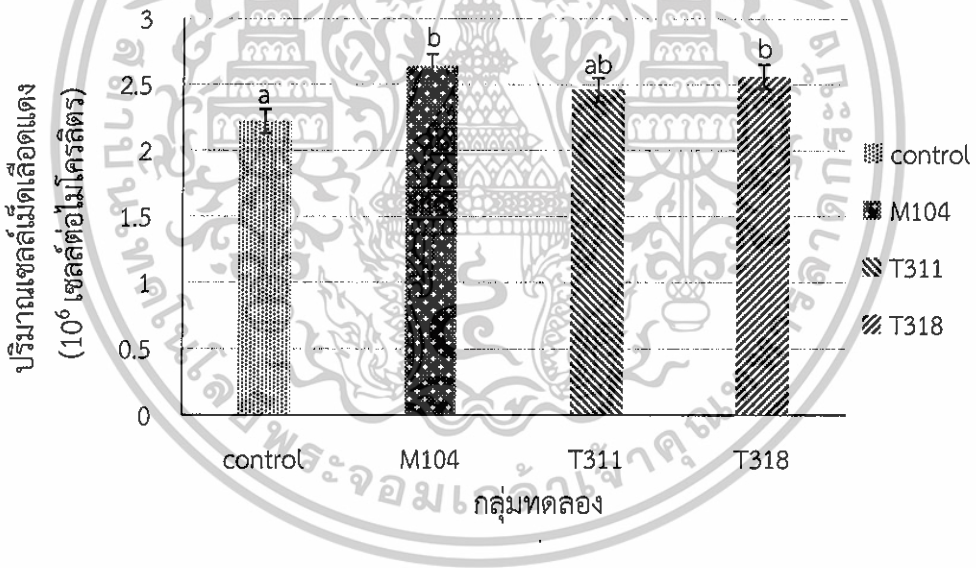
พารามิเตอร์โลหิตวิทยา	กลุ่มทดลอง			
	Control	M104	T311	T318
เม็ดเลือดแดง (10^6เซลล์ต่อไมโครลิตร)	2.22 ± 146.16^a	2.64 ± 315.50^b	2.46 ± 289.48^{ab}	2.56 ± 333.23^b
เม็ดเลือดขาว (10^4เซลล์ต่อไมโครลิตร)	4.24 ± 7.04^a	14.5 ± 39.57^c	8.18 ± 13.29^b	7.61 ± 16.70^b
ฮีโมโกลบิน (กรัมต่อเดซิลิตร)	192.07 ± 26.11^b	220.87 ± 30.83^c	187.73 ± 26.91^b	148.13 ± 24.61^a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

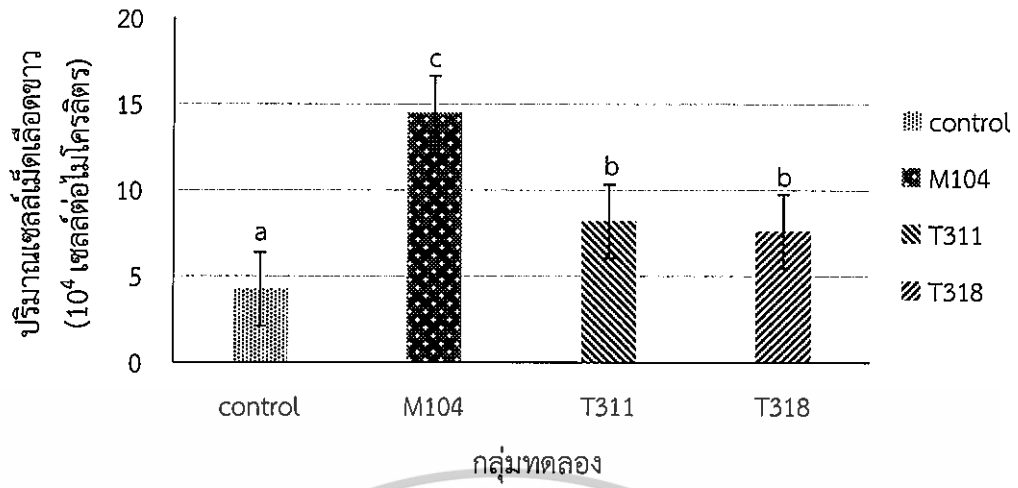
จากการศึกษาพารามิเตอร์โลหิตวิทยา พบว่ากลุ่ม M104 มีค่ามากที่สุดทุกพารามิเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Renuka *et al.* (2014) ที่ศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ *Lactobacillus acidophilus* ที่มีผลต่อพารามิเตอร์โลหิตวิทยาของปลากระโห้ *Catla catla* (Hamilton) โดยผสม *L. acidophilus* ในอาหารที่ความเข้มข้นต่างกัน ทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า *L. acidophilus* ทำให้ค่าของระบบโลหิตวิทยาเพิ่มสูงขึ้นในปลากระโห้ โดยมีการเพิ่มของปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบิน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการผสมโพรไบโอติกในอาหารทำให้ปลามีการเจริญเติบโตมากขึ้น มีสุขภาพดีขึ้นจึงส่งผลให้ค่าพารามิเตอร์โลหิตวิทยาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

การศึกษาปริมาณเม็ดเลือกขาวพบว่าในกลุ่ม M104 มีปริมาณเม็ดเลือดขาวเฉลี่ยสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเสริมด้วยโพรไบโอติกในอาหารปลาและสอดคล้องกับการศึกษาของ Pourgholam *et al.* (2017) ที่ได้ทำการศึกษาผลของ *Lactobacillus plantarum* ของปลาสเตอเจียนไซบีเรีย (*Acipencer baerii*) ต่อประสิทธิภาพในการเจริญและค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา โดยพบว่าโพรไบโอติกที่ผสมในอาหารสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดขาว และยังส่งผลต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน เช่น เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล เป็นต้น รวมทั้งเสริมการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเซลล์อีกด้วย



รูปที่ 4.5 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงเฉลี่ย (10^6 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของปลานิล
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวเฉลี่ย (10^4 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของปลานิล
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.7 ผลการตรวจสอบด้านภูมิคุ้มกันวิทยา

4.7.1 ผลการตรวจสอบค่าพลาสมาโปรตีน

หาค่าพลาสมาโปรตีนพบว่า กลุ่ม M104 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ผสมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมีค่าพลาสมาโปรตีนเฉลี่ยมากที่สุดคือ 125.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่ม T311 และ T318 มีค่าพลาสมาโปรตีนเฉลี่ย 111.27 และ 105.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่าพลาสมาโปรตีนเฉลี่ย 60.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่ากลุ่ม M104 แตกต่างจากทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7

4.7.2 ผลการตรวจสอบค่าอิมโมโนโกลบูลิน

จากการหาค่าอิมมูโนโกลบูลิน พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าอิมโมโนโกลบูลินเฉลี่ย 41.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่ผสมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกคือ M104, T311 และ T318 มีค่าอิมโมโนโกลบูลินเฉลี่ย 79.02, 49.82 และ 44.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณากลุ่ม M104 เทียบกับกลุ่มควบคุม, T311 และ T318 พบว่ากลุ่ม M104 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยอิมมูโนโกลบูลิน คือ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากระดูกแข็ง หลังจากเสริมด้วยโพรไบโอติกในอาหารปลาพบว่าในกลุ่มทดลอง M104 มีค่าอิมมูโนโกลบูลินมากที่สุด

4.7.3 ผลการตรวจสอบค่ากิจกรรมไลโซไซม์

จากการหาค่ากิจกรรมไลโซไซม์ โดยทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* จะเกิดโซนใส จากนั้นวัดขนาด และหาค่าเฉลี่ยของโซนใสพบว่า กลุ่มทดลอง M104 ซึ่งผสมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมีค่ากิจกรรมไลโซไซม์สูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 : พารามิเตอร์ภูมิคุ้มกันของปลานิลหลังจากเลี้ยงระยะเวลา 3 เดือน

พารามิเตอร์ภูมิคุ้มกัน	กลุ่มทดลอง			
	Control	M104	T311	T318
พลาสมาโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	60.63±10.46[a]	125.27±9.22[c]	111.27±7.62[b]	105.92±7.23[b]
อิมมูโนโกลบูลิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	41.86±7.28[a]	79.02±24.55[b]	49.82±14.00[a]	44.63±10.84[a]
ไลโซไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	68.96±47.5[a]	210.52±41.29[b]	103.86±26.64[a]	81.12±57.74[a]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษไม่เหมือนกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาพารามิเตอร์ภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ค่าพลาสมาโปรตีน อิมมูโนโกลบูลินและค่ากิจกรรมไลโซไซม์พบว่ากลุ่มทดลองที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก M104 มีค่าสูงที่สุดในทุกพารามิเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Talpur *et al.* (2014) ที่ทดลองเลี้ยงปลาช่อนโดยใช้อาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกคือ *L. acidophilus* และอาหารที่ไม่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกมีค่าพลาสมาโปรตีนในปริมาณมาก ซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากพลาสมาโปรตีนทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอม และเป็นภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายในขณะที่ค่าอิมมูโนโกลบูลินของกลุ่ม M104 ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ นั้นสอดคล้องกับการรายงานของ Carroll and Prodeus, (1998) ที่พบว่าโพรไบโอติกสามารถเพิ่มระดับ IgM ในปลาได้ เพราะอิมมูโนโกลบูลินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของปลา ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายแบคทีเรีย toxin ไวรัส การกระตุ้นคอมพลีเมนต์ และสามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ รวมทั้งช่วยส่งเสริมค่ากิจกรรมไลโซไซม์ ที่เป็นการทำงานของระบบภูมิกันแบบไม่จำเพาะ มีหน้าที่ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรีย (สุทธิพันธ์และคณะ, 2543) ซึ่งไลโซไซม์ในปลา สามารถทำลายผนังเซลล์ที่เป็นพันธะระหว่างน้ำตาล N-acetylmuramic acid (NAG) และ N-acetylglucosamine (NAM) ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Iwama, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมโพรไบโอติกในอาหารของปลานิล ทำให้เกิดการพัฒนาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน ซึ่งดูจากปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ค่าไลโซไซม์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Saurabh, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ของปลานิล

ผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิล พบว่ากลุ่มควบคุม มีปริมาณของแบคทีเรียเท่ากับ $3.5x10^5$ CFU/กรัม ส่วนในกลุ่มทดลองที่ได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ กลุ่ม M104, กลุ่ม T311 และกลุ่ม T318 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ $3.1x10^5$, $9.1x10^5$, และ $7.3x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ

เมื่อทำการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ แบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104T311 และ T318มาทำการคัดแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิค Cross Streak และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การย้อมแกรม, การย้อมสปอร์, การสร้างเอนไซม์คะตะเลส, การทดสอบทางเคมีโดยวิธี indole และการทดสอบทางเคมีของ Triple Sugar Iron (TSI) เพื่อเป็นการยืนยันผลว่าแบคทีเรียโพรไบโอติก สามารถเข้าไปอยู่ในระบบทางเดินอาหารของปลาได้ และยืนยันว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้ปลามีโพรไบโอติก รหัส M104 T311 และ T318 ผลการทดสอบพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีที่คัดเลือกมานี้ มีผลเช่นเดียวกันกับแบคทีเรียโพรไบโอติกรหัส M104 T311 และ T318 ที่ได้ทำการทดสอบไว้ก่อนหน้านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ทำการทดลองโดยผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/ml (McFarland Standard No 0.5) กับอาหารปลาสำเร็จรูป โดยให้อาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกกับ 3 กลุ่มทดลอง ได้แก่ *Lactobacillus* sp. (กลุ่ม M104) *Bacillus* sp. (กลุ่ม T311) และ *Bacillus* sp. (กลุ่ม T318) และกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ให้อาหารที่ไม่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยอัตราการให้อาหารคิดเป็นร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ทดลองเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 3 เดือน ในแต่ละเดือนจะทำการสุ่มจับปลา 10 ตัวต่อกลุ่มทดลองเพื่อนำมาหาพารามิเตอร์การเจริญเติบโต และเมื่อครบสามเดือนจะสุ่มจับมาเจาะเลือดและนำไปวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์โลหิตวิทยาและพารามิเตอร์ภูมิคุ้มกันต่อไป

จากผลการตรวจสอบค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนัก ความยาว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน และอัตราการแลกเนื้อ พบว่ากลุ่มที่ผสมอาหารด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก M104 มีค่าพารามิเตอร์ของการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือมีค่าเป็น 19.26±1.33, 130.00±18.25, 0.92±0.11 และ13.02±2.16 ตามลำดับ มีความแตกต่างจากกลุ่มทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) ซึ่งการผสมอาหารด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเพิ่มน้ำหนัก และความยาวของปลานิลได้มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก

ผลการตรวจสอบพารามิเตอร์โลหิตวิทยา ได้แก่ ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว และค่าฮีโมโกลบิน พบว่าในกลุ่มทดลอง M104 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ มีค่ากับ $2.64±315.50 \times 10^6$ เซลล์ต่อไมโครลิตร $14.5±39.57x10^4$ เซลล์ต่อไมโครลิตร และ220.87±30.83 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มทดลอง และผลการตรวจสอบพารามิเตอร์ภูมิคุ้มกันได้แก่ ค่าพลาสมาโปรตีน ค่าอิมมูโนโกลบูลิน และค่ากิจกรรมไลโซไซม์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม M104 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 125.27±9.2 279.02±24.55 และ210.52±41.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกกลุ่มทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus* sp. (M104) ในอาหารเลี้ยงปลาให้ผลดีที่สุด ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น เพิ่มค่าทางโลหิตวิทยา และสามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ได้รองลงมาคือ กลุ่ม T311 และ กลุ่มT318 ที่เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* sp.

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกผลของแบคทีเรียโพรไบโอติก (*Lactobacillus* sp. และ *Bacillus* sp.) ที่ผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงควรศึกษาการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกในขั้นตอนการผลิตอาหารปลา เพื่อทำให้เก็บรักษาได้นานขึ้น โดยที่จำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผสมในอาหารยังคงเพียงพอต่อการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2556. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย 2554.** กรุงเทพฯ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2535. "ตัวเสริมปฏิชีวนะ(Probiotic)". *สัตว์เศรษฐกิจ,* 10(204) : 76-78

คณาธิป พรหมนวล และสุภฎา คีรีรัฐนิคม. 2561. "ผลของการเสริม *Bacillus licheniformis* ในอาหารที่ระดับต่างๆ ต่อประสิทธิภาพ การเจริญเติบโต การใช้อาหาร และแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลแดง". *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*. 21(2) : 43-50.

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย. 2561. "โพรไบโอติกที่ใช้ประโยชน์ในปศุสัตว์". *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*. 36(1): 152-160.

เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2560. **โรคติดเชื้อและการจัดการสุขภาพปลานิลเพาะเลี้ยง**. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชัชนาภรณ์ กสิฤกษ์, ชุติมา วิทูรสุนทร และณิศศา อินยอด. 2556. "การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลแดง". โครงงานพิเศษ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชาญวิทย์ สุวรรณ์ และชนกันต์ จิตมนัส. 2560. "การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงปลานิล". *เชียงใหม่สัตวแพทย์สาร*.15(1): 15-24.

นพดล ศุกระกาญจน์, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, กฤษณะ เรืองคล้าย และพันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร. 2552. "การศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) ในระบบการเพาะเลี้ยง". โครงงานวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.

นันทริกา ชันซื่อ และมนทกานติ์วงศ์ภากร. 2006. "ค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกของเลือดปลาหมอตาลในบ่อเพาะเลี้ยงจังหวัดสุพรรณบุรี". *Thai-NIAH eJournal,* 1(2): 108-115

นวลมณี พงศ์ธนา. 2553. "ปัจจัยการเพาะเลี้ยงปลานิลแดงให้ประสบความสำเร็จ". เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2553. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.

ประเทือง เชาว์วันกลาง. 2534. **คุณภาพน้ำทางการประมง**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ฟิสิกส์เซ็นเตอร์.

ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ และนนทวิทย์ อารีย์ชน. 2552. "โรคที่เป็นสาเหตุของการตายที่รุนแรงของปลานิลในประเทศ."*วารสารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.*

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ และสุชาดา ไชยสวัสดิ์. 1991. การควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจสอบแผ่นเสมียร์เลือด. เชียงใหม่ : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2534. **หลักการอาหารสัตว์เล่ม 1 โภชนะ.** กรุงเทพฯ. : โอเดียนสโตร์

ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข. (2555). **การวิเคราะห์น้ำและน้ำเสียเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ: กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

ภนิดา เกื้อสุวรรณ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ. 2557. "การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง". *Graduate Research Conference*. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 667-676.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา.2539. **การจัดการคุณภาพน้ำ และบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, พรรณศรี จริโมภาส, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ, วีระวัชรกรโยธิน และวิมล จันทรโรทัย. 2536. "การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล". เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 23/2536. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดกรมประมง. 87 หน้า.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมสิริ. 2528. **คุณสมบัติของน้ำและวิธีการวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางการประมง.** กรุงเทพฯ: สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

รัตนสุดา ไชยเชษฐ์. 2554. "การใช้อีเอ็มเป็นโปรไบโอติกในอาหารปลาโมง". *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.* 16: 136-144.

วิรัช จิ๋วแหยม. 2544. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ และวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิลาวัณย์ รุ่มรวย, สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล สมฤดี ศิลาฤดี และจารุณี เกสรพิกุล. 2554. "ผลของคิว. พี. โปรไบโอติกส์ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล". วารสารคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัย ศิลปากร. 2: 1-7.

วิเชียร หวัดสนิท. **ปลานิล.** กรุงเทพฯ: เกษตรวิชาการ.

สุญาณี พงษ์นานิกร.2549. **พรีไบโอติกและโพรไบโอติก : อาหารสุขภาพ.**กรุงเทพฯ : ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์เสนะวงษ์ และสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. 2543. **อิมมูโนวิทยา.**กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล. 414 หน้า..

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. **การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน : บทบาทของจุลินทรีย์ และการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 222-264.

ศิริรัตน์ สีหานาท, ลือชัย บุตคุป, สมคิด แข็งกลาง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2548. "การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกราม". *วารสารสงขลานครินทร์วทท.* 27(ฉบับพิเศษ 1) : 265-274.

อดุลย์ พงษ์สุวรรณ. 2532. **ปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย.**ศูนย์ผลิตตำราการเกษตรเพื่อชนบท.นนทบุรี : 26-27

อัมพร ภิญโญวิทย์. 2545. **มีนวิทยา.** กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันราชภัฏรำไพพรรณี. 314 น.

อารีย์ แก้วเขียว. 2553. **คู่มือการตรวจวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO).** กรุงเทพฯ : สำนักงานสิ่งแวดล้อม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

อุดม เรืองนพคุณ. 2552. **การเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลานิล.** พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ : ธนธัชการพิมพ์.

อุดมลักษณ์ สมพงษ์. 2556. "ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรคติดเชื้อในปลานิล (Nile tilapia: *Oreochromis niloticus*)." งานวิจัยคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. 2539. วิทยาภูมิคุ้มกัน. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Abarike, E. D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L. and Kuebutornye, F. K. A. 2018. "Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis on* growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromisniloticus". Fish & Shellfish Immunology,* 82: 229-238

Al-Dohail, M. A., Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M. 2009. "Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling". *Aquac. Res,* 40(14) : 1642- 1652

Aly, M. S., Abdel-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.

Anderson, D. P. 1990. "Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks". *American Fisheries Society Symposium*, 8, 38-50.

Carroll, M. C. and Prodeus, A. P. 1998. "Linkages of innate and adaptive immunity". *Current Opinion Immunolgy*, 10: 36-40.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Galagarza, O. A., Smith, S. A., Drahos, D. J., Eifert, J. D., Williams, R. C. and Kuhn, D. D. 2018. "Modulation of innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary supplementation of *Bacillus subtilis* endospores". *Fish & Shellfish Immunology,* 83: 171-179.

Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. 1984. "Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct". *Journal of Dairy Science*, 67(12): 3045-3051

Han, B., Long, W., He, J., Liu, Y., Si, Y., and Tian, L. 2015. "Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections". *Fish & Shellfish Immunology,* 46(2): 225–231.

Hyronimus, B., Le-Marrec, C., Sassi, A. H. and Deschamps, A. 2000. "Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria". *International Journal of Food Microbiology*, 61(2-3): 193-197.

Iwama, G. and Nakanishi, T. 1996. *The fish Immune System*. San Dieago : Acadamic Press.

Iwashita, P. K. M., Nakandakare, B. I., Terhune, S. J., Wood, T. and Ranzani-Paiva, T. J. M. 2015. "Dietarysupplementation with *Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*". *Fish Shellfish Immunol*, 43: 60-66.

Khalil, R. H., Talaat, T. S., Tenikhy, M., Sherif, A. H. and Amina, S. 2014. "Effect of *Lactobacillus acidophilus* on the growth and immune response in cultured Oreochromis niloticus". *Global Journal of Fisheries and Aquaculture Researches*, 1(2): 57-69.

Larsen, H. N. and Snieszko, S. F. 1961. "Modification of the microhematocrit technique with trout Blood". *Transactions of the American Fisheries Society*, 90 : 139-142.

Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Froysadal, E. 1989. "Study on lysozyme activity in some fish species". *Diseases of Aquatic Organisms*, 6: 1-5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Liu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z. and Zhou, Z. 2013. "Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains". *Fish Shellfish Immunol*, 35 (1), 54-62.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent". *Journal of biological chemistry*, 140: 879-885.

Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, T.M.R., Bogwald, J., Castex, M. and Ringo, E. 2010. "The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids". *Aquaculture,* 302: 1-18.

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. "Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid". *Laboratory exercises in microbiology*, New York : MC Graw Hill. 126-188.

Midhun, S. J., Neethu, S., Arun, D., Vysakh, A., Divya, L., Radhakrishnan, E.K. and Jyothis, M. 2019. "Dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* HGA8B improves growth parameters, enzymatic profile and gene expression of *Oreochromis niloticus*". *Aquaculture*, 505,289-296

Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2006. "Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulation". *Bioresource Technol.*, 97: 1217-1224

Murray, R. G. E., Doetsch, R. N. and Robinow, C. F. 1994. **Determinative and Cytological Light Microscopy.**Methods for General and Molecular Bacteriology P. Gerhardt, editor-in-chief. ASM Press, Washington, DC, 21-41.

Pourgholam, A. M., Khara, H., Safari, R., Sadati, Y. A. M. and Aramli, S. M. 2017. "Influence of Lactobacillus plantarum Inclusion in the Diet of Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) on Performance and Hematological Parameters". *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,* 17: 1-5.

Ramos, M. A., Batista, S., Pires, M.A., Silva, A.P., Pereira, L. F., Saavedra, M. J., Ozorio, R. O. A. and Rema, P. 2017. "Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia". *The Animal Consortium*, 11(8): 1259–1269.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Renuka, P. K., Venkateshwarlu, M. and Naik, T. A. R. 2014. "Effect of Probiotic (*Lactobacillus acidophilus*) on Haematological parameters of *Catla catla* (Hamilton)". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,* 3(8): 326-385.

Roberts, R. J. 1978. **Fish Pathology.** London : Bailliere Tindall.

Saurabh, S. and Sahoo, K. P. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture.*

Shelby, A. R., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M. and Delaney, A.M. 2006. "Effects of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*)". *Journal of applied aquaculture*, 18: 23-34.

Talpur, D. A., Munir, B. M., Mary, A. and Hashim, R. 2014. "Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parametersand disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead *(Channa striata)* fingerlings" . *Aquaculture*, 14(20): 426-427.

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

Wang, Y. B., Li, J. R. and Lin, L. 2008. "Probiotics in aquaculture : Challenges and outlook". *Aquaculture,* 281: 1-4.

Watts, M., Munday, B. L. and Burke, C. M. 2001. "Immune responses of teleost fish". *Australian Veterinary Journal.* 79(8): 570-574.

Witeska, M. 2013. "Erythrocytes in teleost fishes: a review". *Zoology and Ecology,* 6(10).

Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y. and Li, W. 2010. "Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response". *Fish Physiol Biochem,* 36: 501–509.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดลองทางชีวเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Trypticase soy both (TSB)

Pancreatic digest of casein	15	กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 30กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปรับพีเอช 7.3 ± 0.2 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.2 Trypticase soy agar (TSA)

Pancreatic digest of casein	15	กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 30กรัม และชั่ง agar กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร ปรับพีเอช 7.3 ± 0.2 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.3 Man Rogosa Sharpe (MRS) medium

Protease peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Manganese sulphate ($MnSO_4$)	0.01	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSo_4$)	0.01	กรัม
Polysorbate80 (Tween80)	1	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55.5กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ปรับพีเอช 6.5 ± 0.2 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ห้ามมิให้ผู้ใดนำไปใช้ประโยชน์ในทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ก่อนการนำไปใช้ทุกครั้ง

2. อาหารทดสอบทางชีวเคมี

2.1 Triple sugar iron (TSI) agar

Peptic digest of animal tissue	10	กรัม
Casein enzymic hydrolsate	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 62.52 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอช 7.4 ± 0.2 2 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.2 Casein hydrolysis/Skim milk ager

Skim milk 10 %	10	มิลลิลิตร
MRS agar	990	มิลลิลิตร

เตรียมอาหาร MRS agar ปรับปริมาตรในน้ำกลั่นปริมาตร 990 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และเตรียมสารละลาย Skim milk 10 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ผสมลงใน MRS agar

2.3 Soluble starch (Starchhydrolysis test)

Soluble starch	2	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอช 6.8 ± 0.2 2 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ชุดสีย้อมแกรม

1.1 Crystal violet solution

สารละลาย A

Crystal violet	2	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20	มิลลิลิตร

ละลายสีใน Ethyl alcohol 95% จนสีละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ และถ้าเข้มข้นเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น1 : 10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

1.2Safranin O counterstrain (Stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100	มิลลิลิตร

ละลายสีใน Ethyl alcohol 95% จนสีละลายหมด

1.3Gram' iodine solution

Iodine(Crystal)	1	กรัม
Potassium iodine	2	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

ละลาย Iodine และ KI ในน้ำกลั่น ค่อยๆปรับปริมาตรให้ครบ 300 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา (ไม่ให้โดนแสง)

1.4 Alcohol-acetone

Ethyl alcohol 95%	250	มิลลิลิตร
Acetone	250	มิลลิลิตร

2. Malachite greensolution

Malachite green	5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. 3% Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

4. Kovac's Indole Reagent

Para-dimethylamino benzaldehyde	5	กรัม
Amyl alcohol	75	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid, concentrated	25	มิลลิลิตร

ละลาย Para-dimethylamino benzaldehyde ใน Amyl alcohol อุ่นส่วนผสมโดยใช้ Water bath จนกระทั่งส่วนผสมละลายเข้ากันดีแล้ว เติม HCl แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

5. Mcfarland standard

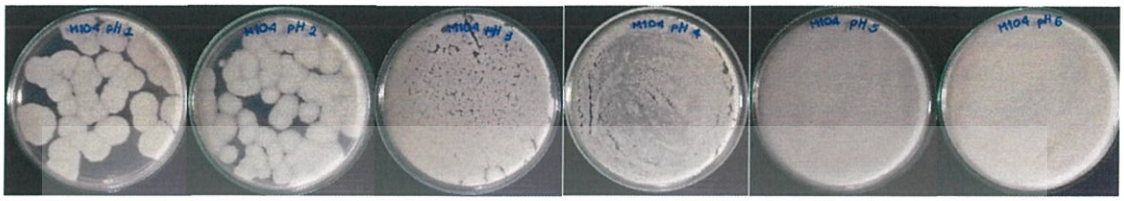
Mcfarland standard No.	ปริมาตร (ml)				
	0.5	1	2	3	4
$BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.175%)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
H_2SO_4 (1%)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.8
Approx, cell density ($1X10^8$CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
%Transmittance (wavelength of 600 nm)	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

ที่มา: กรมประมง (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

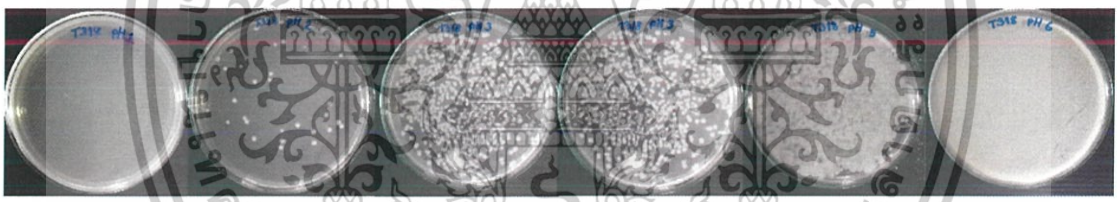
ภาคผนวก ค
การทดสอบความเป็นโพรไบโอติก

1. การทดสอบการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรด



M104 pH 1 M104 pH 2 M104 pH 3 M104 pH 4 M104 pH 5 M104 pH 6

T311 pH1 T311 pH2 T311 pH 3 T311 pH 4 T311 pH 5 T311 pH 6



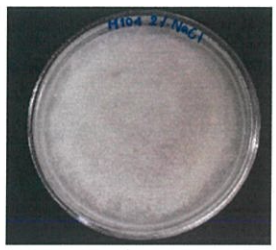
T318 pH1 T318 pH 2 T318 pH 3 T318 pH 4 T318 pH 5 T318 pH 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

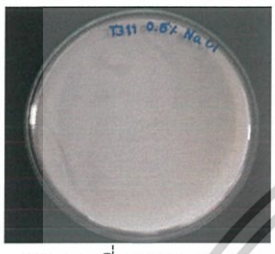
2.การทดสอบการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นเกลือ

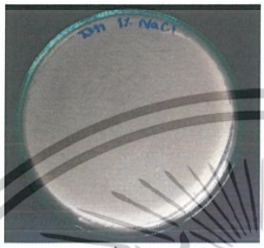
M104 ที่ 0.5% NaCl

M104 ที่ 1% NaCl


M104 ที่ 2% NaCl

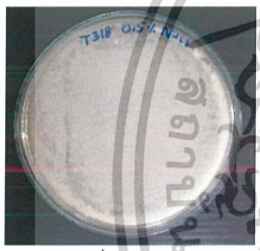
M104 ที่3% NaCl


T311 ที่ 0.5% NaCl


T311 ที่ 1% NaCl

T311 ที่ 2% NaCl

T311 ที่ 3% NaCl


T318 ที่ 0.5% NaCl

T318 ที่ 1% NaCl

T318 ที่ 2% NaCl

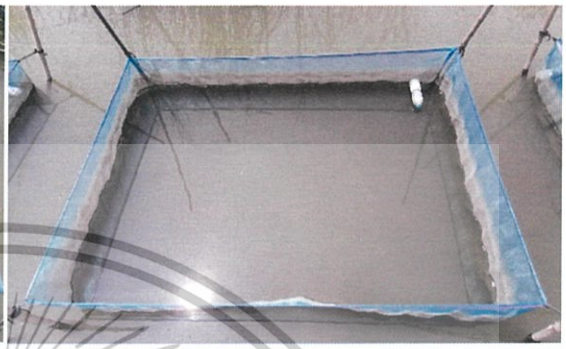
T318 ที่ 3% NaCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การเลี้ยงปลา

การเตรียมกระชังสำหรับเลี้ยงปลานิล

กลุ่มควบคุม



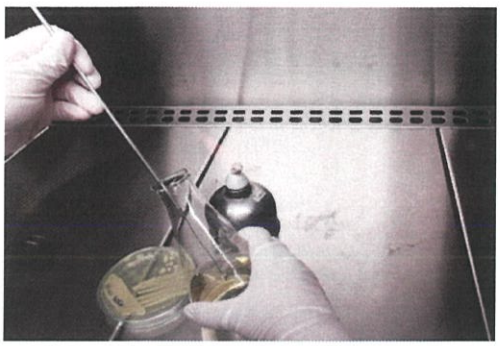
กลุ่มทดลอง M104

กลุ่มทดลอง T311

กลุ่มทดลอง T318

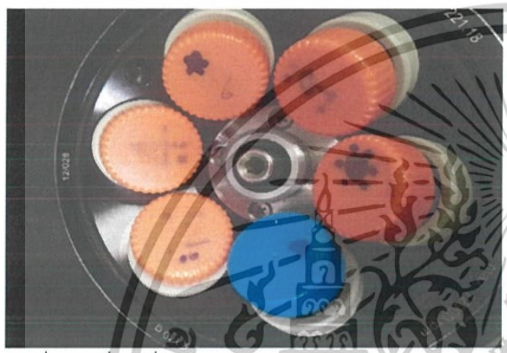
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงปลา

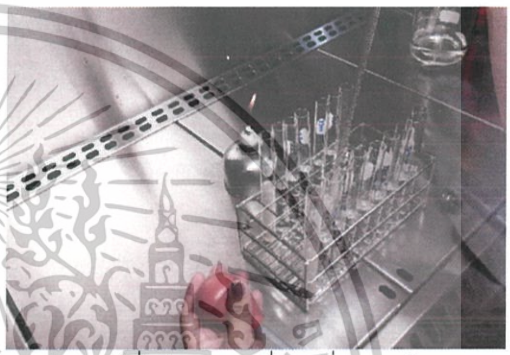


นำเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 รหัส มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB

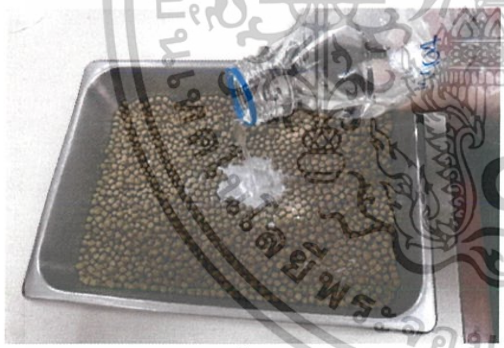
Shaker ที่ 200 รอบ/นาที 24 ชั่วโมง



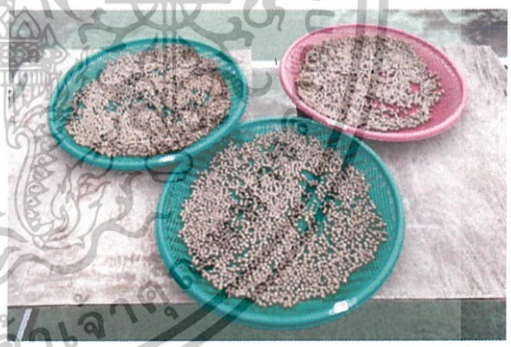
ปั่นเหวี่ยงที่5000 รอบ/นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย NaCl 0.85% 3 รอบ



นำเซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางกับ NaCl0.85% จนได้10^8 CFU/ml



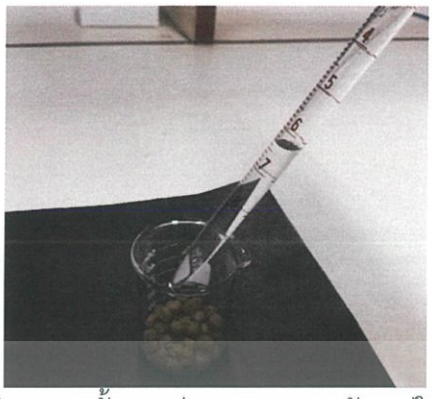
นำสารละลายเซลล์ที่ได้มาคลุกเคล้าอาหารปลาสำเร็จรูป แช่จนซึมทั่วทุกเม็ด



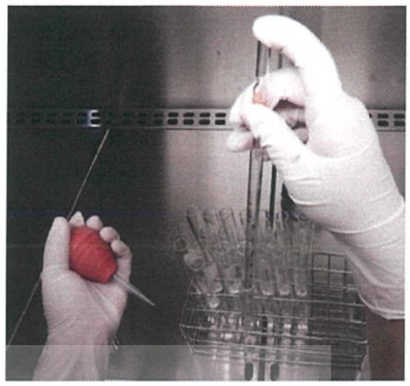
นำอาหารไปเกลี่ยบนตะแกรงแล้วนำไปผึ่งบริเวณกลางแจ้งที่มีลมโกรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบย้อนกลับอาหารปลา

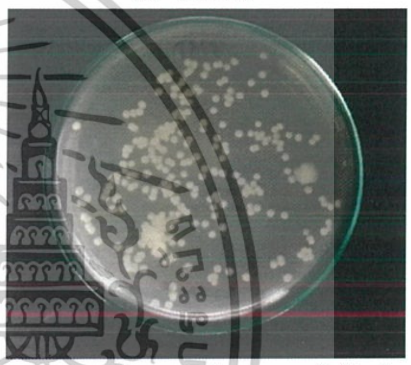


นำอาหารทั้ง 4 กลุ่มทดลอง 1 กรัม แช่ใน NaCl 0.85% 9 มิลลิลิตร 10 นาที



เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}และ10^{-9}

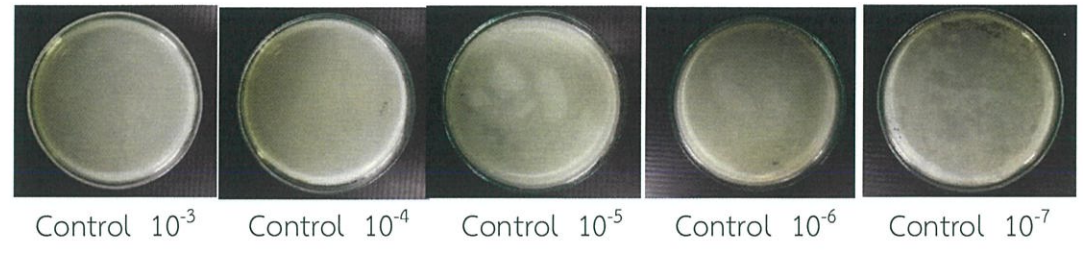
ถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนTSA ด้วยวิธี Spread plate บ่มที่ 37 °C , 24 ชม.



ตรวจดูผลโดยการนับจำนวนโคโลนีและบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการตรวจสอบย้อนกลับอาหารปลา
เดือนที่ 1



Control 10^{-3} Control 10^{-4} Control 10^{-5} Control 10^{-6} Control 10^{-7}

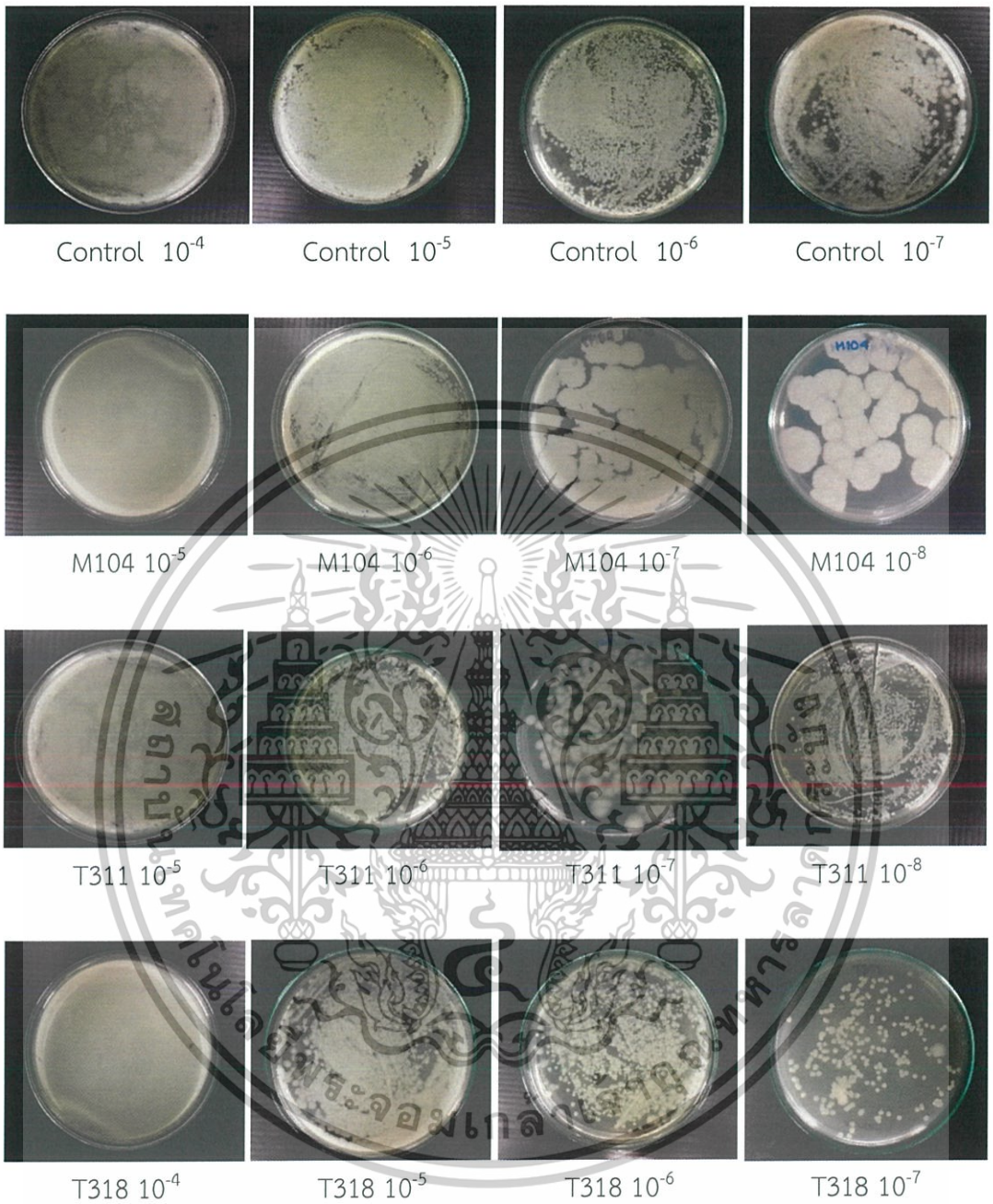
M104 10^{-4} M104 10^{-5} M104 10^{-6} M104 10^{-7} M104 10^{-8}

T311 10^{-4} T311 10^{-5} T311 10^{-6} T311 10^{-7} T311 10^{-8}

T318 10^{-3} T318 10^{-4} T318 10^{-5} T318 10^{-6} T318 10^{-7}

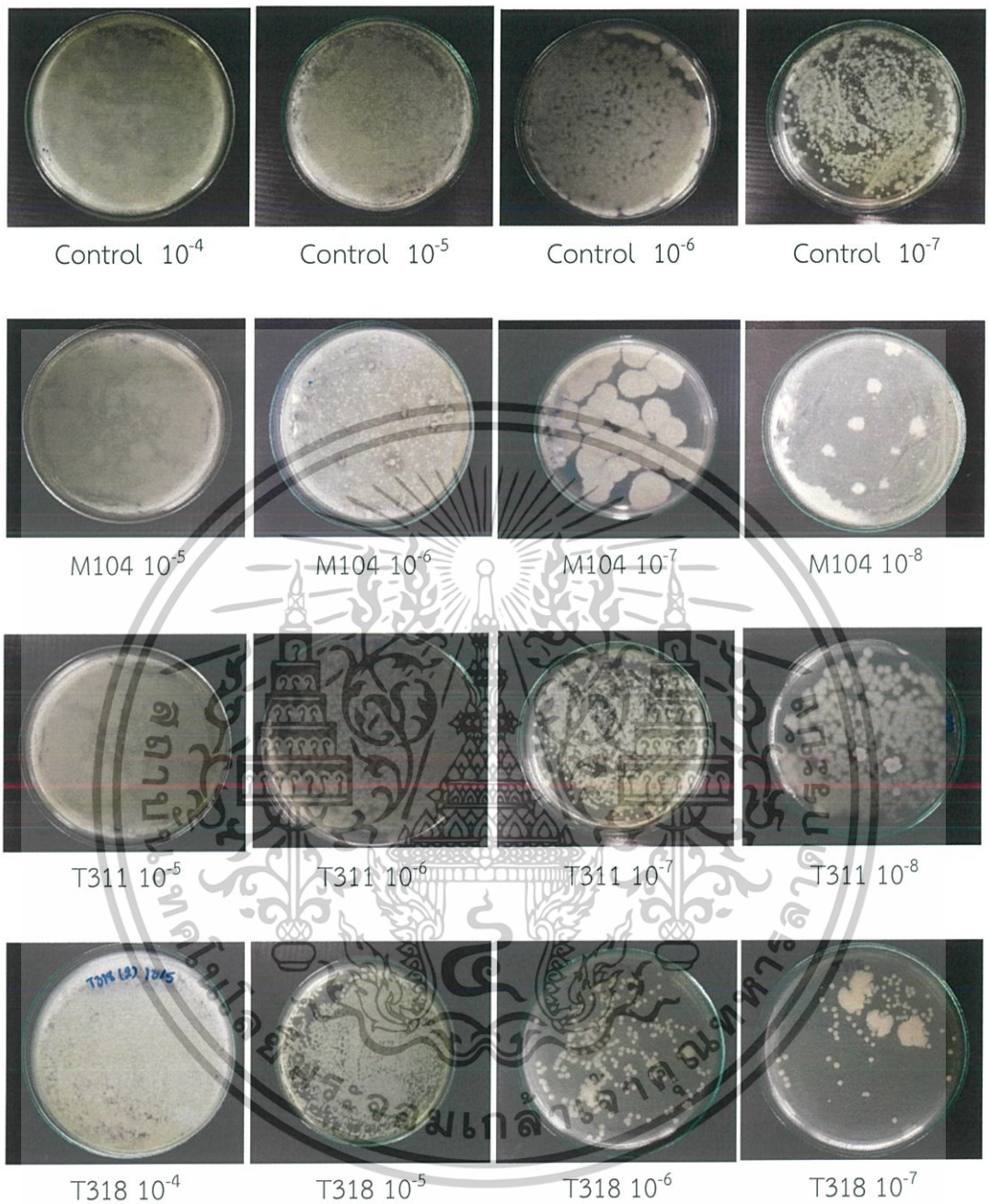
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

การวัดความเป็นกรด-ด่าง

การวัดความกระด้าง

การวัดค่าความเป็นด่าง

การวัดปริมาณไนไตร์ท

การวัดปริมาณแอมโมเนีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างปลา

เดือนที่ 1 : กลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 1 : กลุ่มทดลอง M104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 1 : กลุ่มทดลอง T311

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

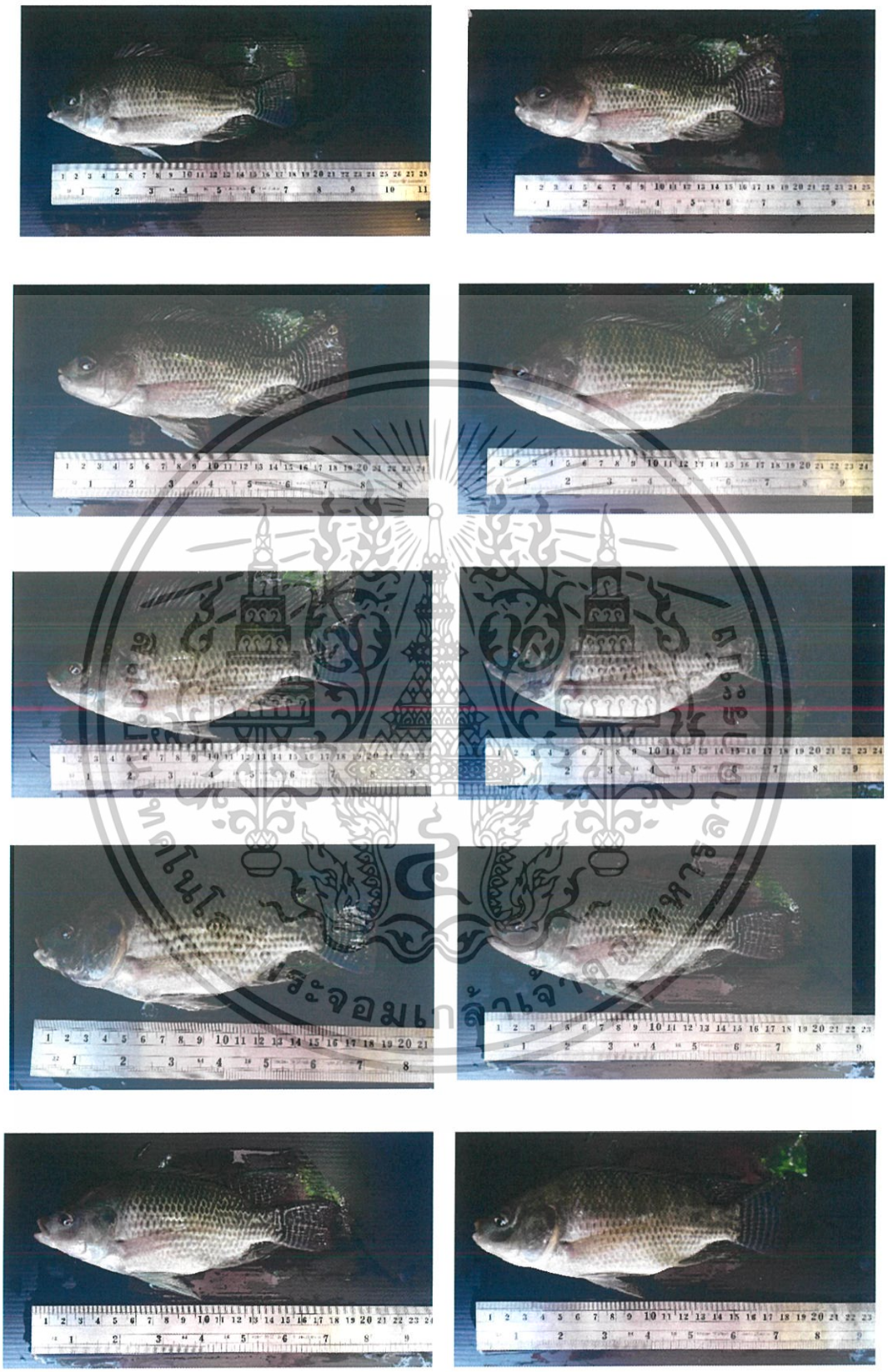
เดือนที่ 1 : กลุ่มทดลอง T318

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 2 : กลุ่มควบคุม

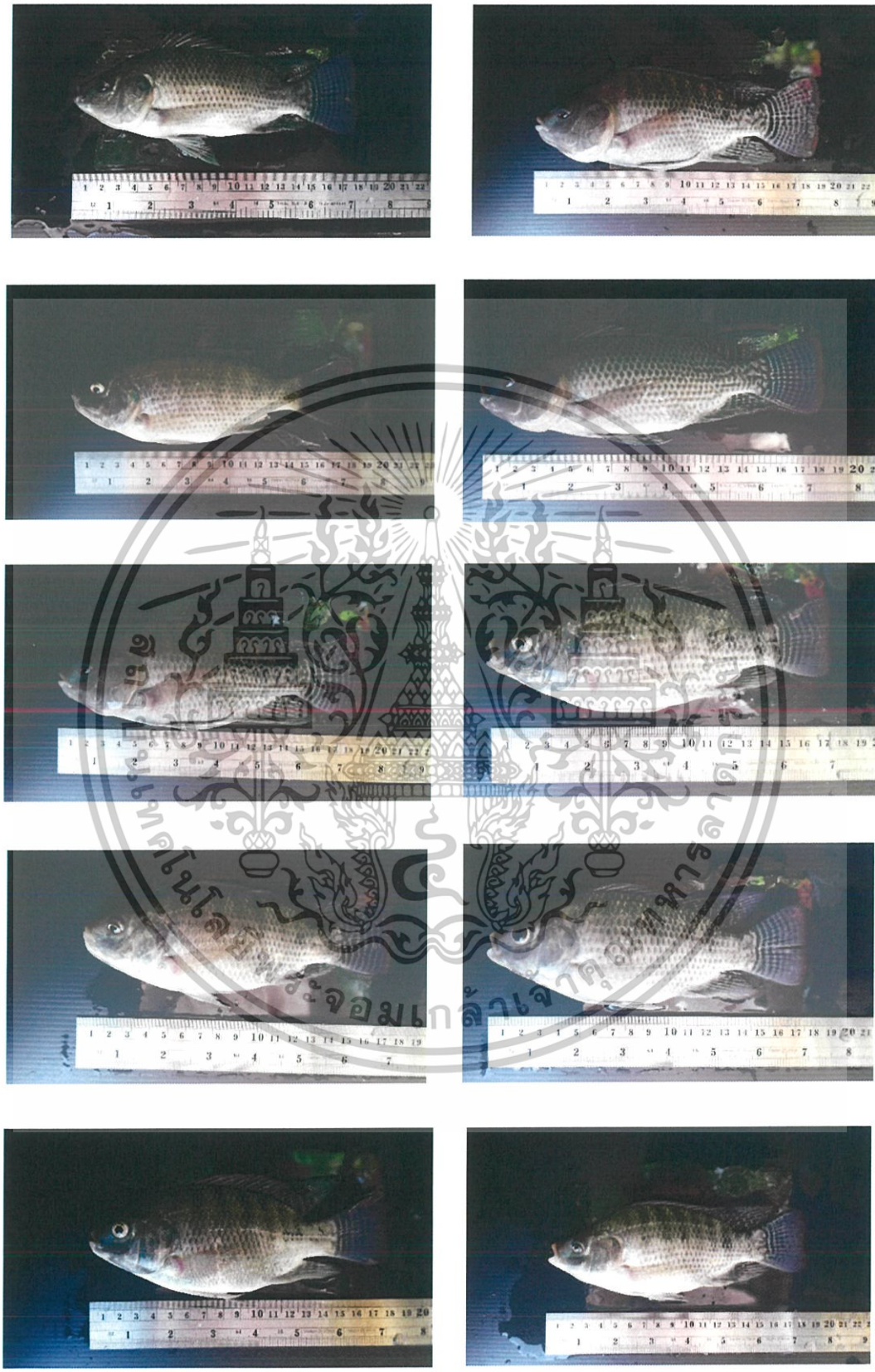
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 2 : กลุ่มทดลอง M104



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 2 : กลุ่มทดลอง T311



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

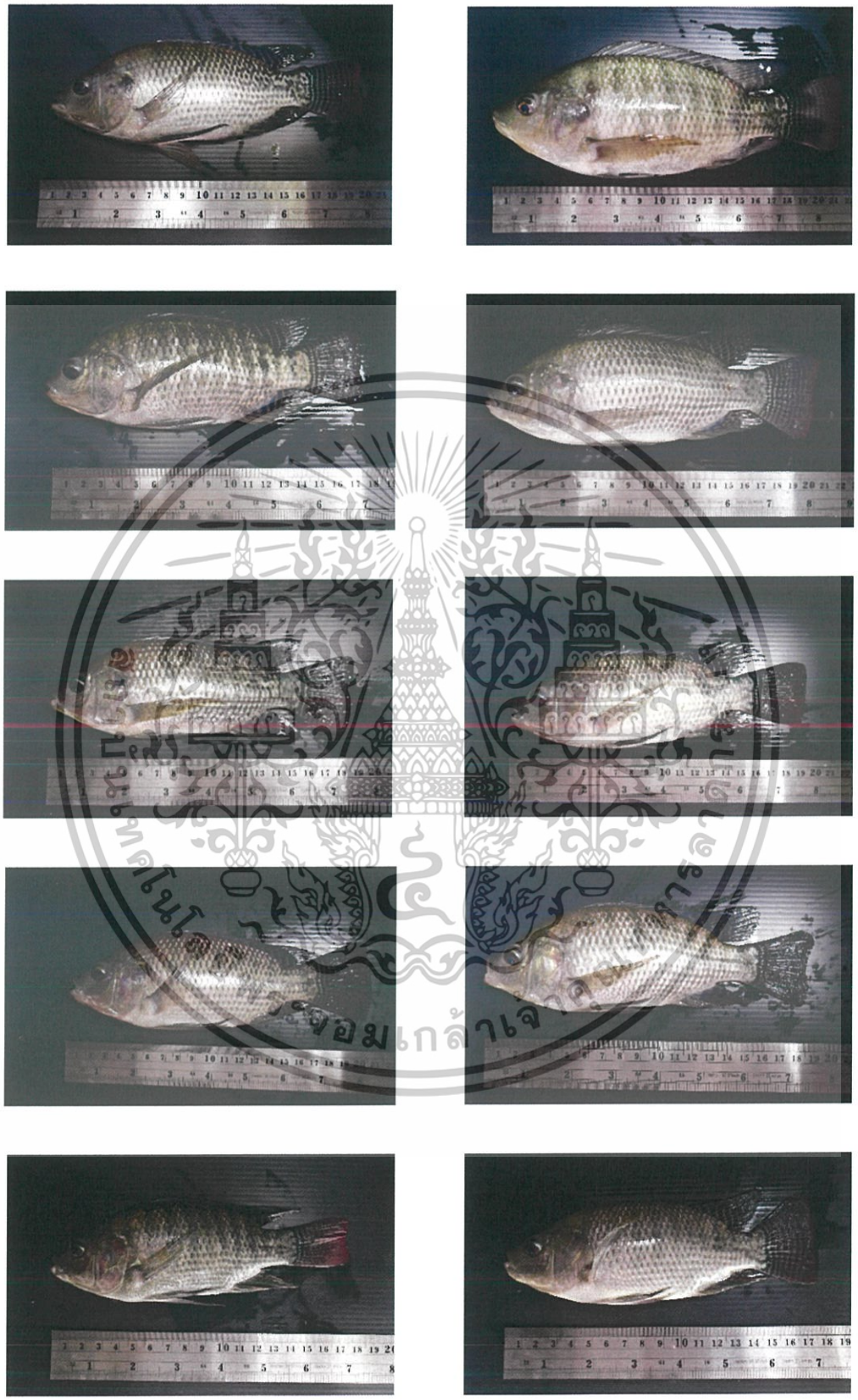
เดือนที่ 2 : กลุ่มทดลอง T318

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 3 : กลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 3 : กลุ่มทดลอง M104

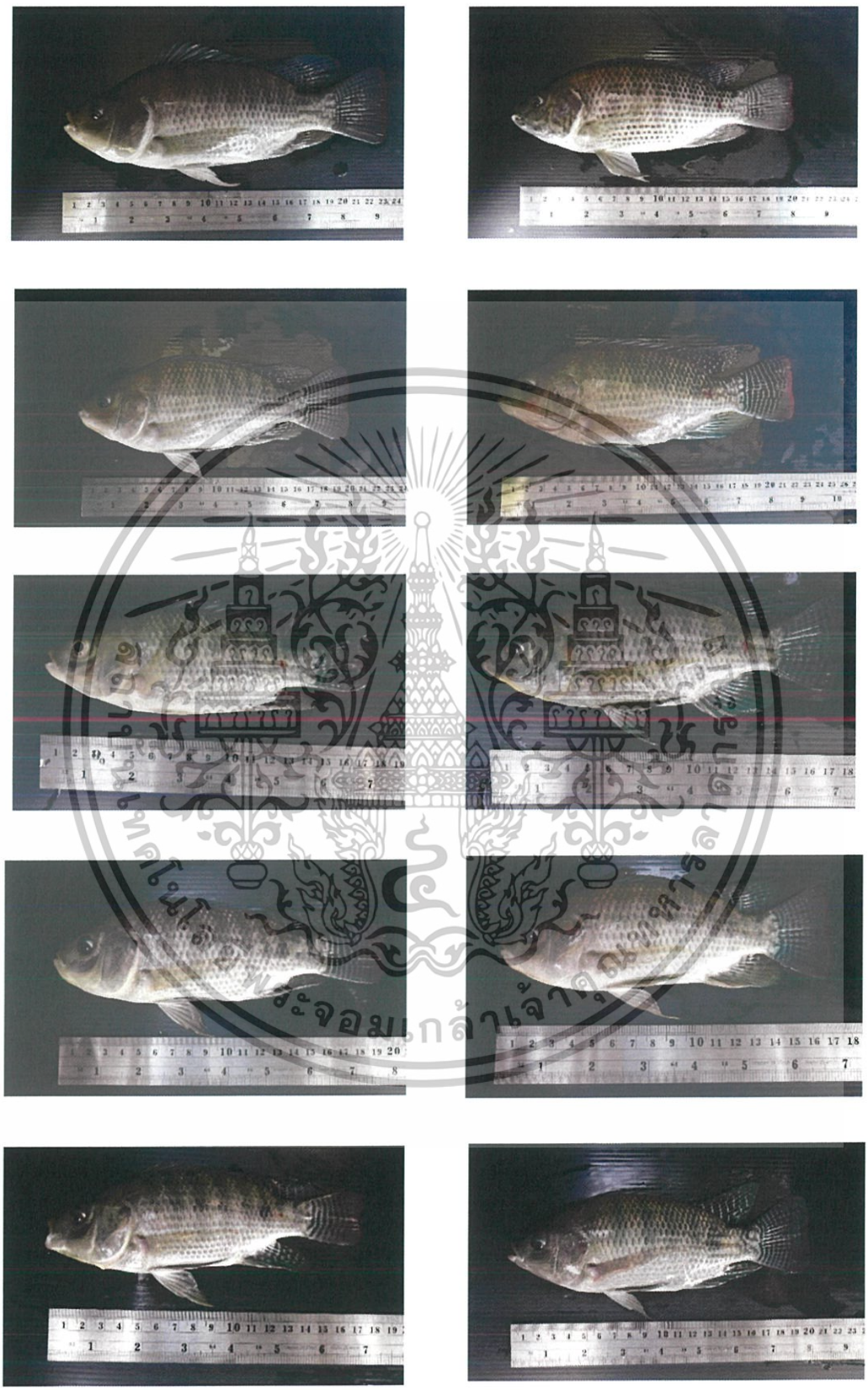


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 3 : กลุ่มทดลอง T311

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือนที่ 3 : กลุ่มทดลอง T318

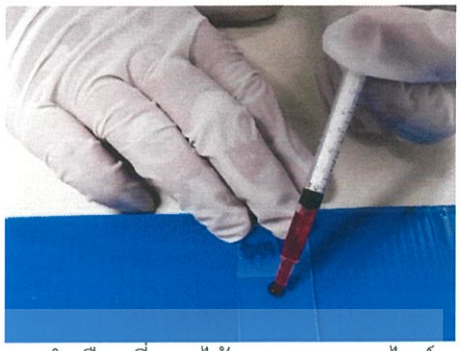


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาด้านโลหิตวิทยา

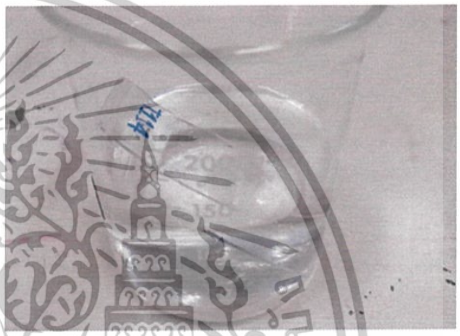
การเจาะเลือดและการนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง/ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว

ดูดเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณโคนหางมาตัวละ 0.5ml



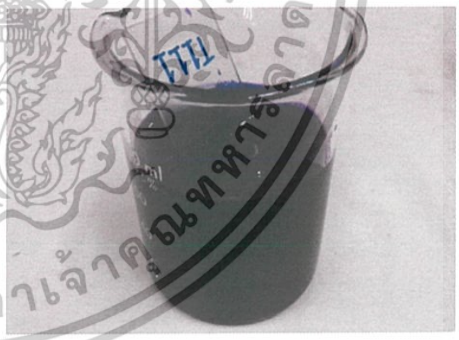
นำเลือดที่เจาะได้มาหยดลงบนสไลด์

เสมียร์ให้ทั่วแผ่นสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

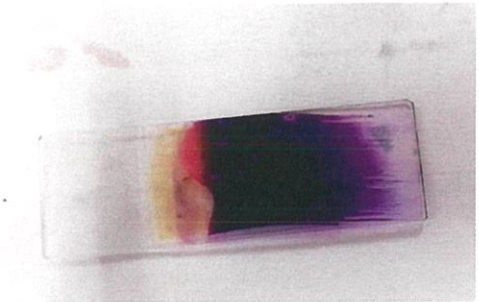


fix ด้วย absolute methanol 3 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

จุ่มสี Dip Quick Solution A 5 นาที



จุ่มสี Dip Quick Solution B 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด



นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ปลานิล

สุ่มจับปลามากลุ่มการทดลองละ 3 ตัว และทำการผ่าท้อง

นำลำไส้ของปลานิลออกมา

ชั่งไส้ปลา 1 กรัม แล้วนำมาบดผสมกับน้ำเกลือ 0.85%

เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-8}

การถ่ายเชื้อปริมาตร 0.1ml ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธี Spread plate

นับจำนวนโคโลนีหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ ,24 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าน้ำหนักและความยาว

ตารางที่ จ.1 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่าน้ำหนักแต่ละเดือน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
เดือนที่ 1	Between Groups	1441.275	3	480.425	4.282	.011
	Within Groups	4039.500	36	112.208		
	Total	5480.775	39			
เดือนที่ 2	Between Groups	1582.900	3	527.633	2.843	.051
	Within Groups	6681.000	36	185.583		
	Total	8263.900	39			
เดือนที่ 3	Between Groups	192.500	3	64.167	.207	.891
	Within Groups	11135.000	36	309.306		
	Total	11327.500	39			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ตารางที่ จ.2 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่าน้ำหนักเดือนที่ 1

น้ำหนักเดือนที่ 1

Duncan

ปัจจัย	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
M104	10	55.9000	
T311	10	57.5000	
Control	10		68.5000
T318	10		68.8000
Sig.		.738	.950

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่าน้ำหนักเดือนที่ 2

น้ำหนักเดือนที่ 2

Duncan

ปัจจัย	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Control	10	103.4000	
T311	10	108.5000	108.5000
T318	10	114.0000	114.0000
M104	10		120.3000
Sig.		.108	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

ตารางที่ จ.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่าน้ำหนักเดือนที่ 3

น้ำหนักเดือนที่3

Duncan

ปัจจัย	N	Subset for alpha = 0.05
		1
T318	10	124.5000
T311	10	125.0000
Control	10	127.5000
M104	10	130.0000
Sig.		.531

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.5 น้ำหนักและความยาวของปลาเมื่ออายุครบ 1 เดือน

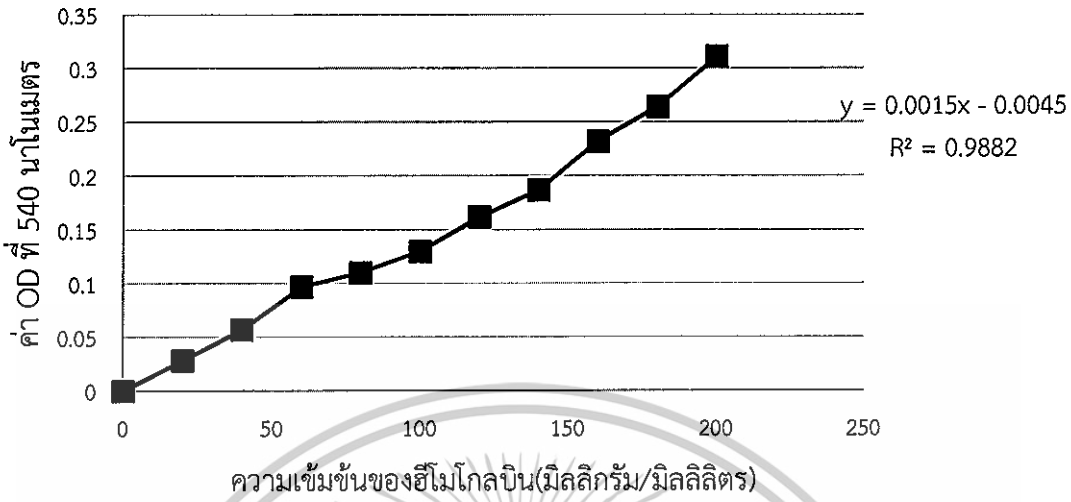
เดือนที่ 1	Control		M104		T311		T318	
	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)
1	70.00	15.00	51.00	13.70	60.00	14.00	70.00	15.00
2	50.00	13.10	50.00	12.30	50.00	12.20	70.00	18.30
3	75.00	14.90	75.00	14.50	50.00	12.00	75.00	15.00
4	70.00	14.00	75.00	13.50	50.00	11.80	70.00	16.50
5	60.00	14.00	50.00	12.70	60.00	14.50	60.00	15.60
6	75.00	15.00	50.00	13.30	60.00	14.00	50.00	14.50
7	60.00	14.30	55.00	14.50	55.00	13.40	55.00	15.70
8	60.00	14.70	49.00	12.00	80.00	15.00	73.00	14.00
9	90.00	16.00	49.00	12.50	50.00	11.90	90.00	16.50
10	75.00	15.80	55.00	13.30	60.00	13.50	75.00	15.60
ค่าเฉลี่ย	68.50±11.32	14.68±0.87	55.90±10.30	13.23±0.86	57.50±9.20	13.23±1.17	68.80±11.39	15.67±1.21

ตารางที่ จ.6 น้ำหนักปลาและความยาวของปลาเมื่ออายุครบ 2 เดือน

เดือนที่ 2	Control		M104		T311		T318	
	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)
1	100.00	16.50	140.00	19.50	105.00	18.50	130.00	17.50
2	110.00	17.50	145.00	19.50	105.00	18.00	110.00	18.20
3	105.00	17.50	150.00	19.00	115.00	18.50	120.00	16.50
4	105.00	17.00	130.00	18.00	105.00	17.50	100.00	16.50
5	104.00	17.00	110.00	18.00	115.00	18.00	120.00.	18.50
6	100.00	16.50	105.00	17.50	100.00	17.00	125.00	18.00
7	100.00	16.00	110.00	17.50	110.00	17.00	135.00	19.50
8	100.00	16.50	110.00	17.50	115.00	18.00	100.00	17.50
9	110.00	17.00	103.00	17.50	115.00	18.20	125.00	19.50
10	100.00	16.50	100.00	16.50	100.00	18.00	140.00	19.50
ค่าเฉลี่ย	103.40±4.08	16.72±0.48	120.30±18.96	18.05±0.98	108.50±6.25	17.87±0.43	120.50±18.07	18.12±1.14

ตารางที่ จ.7น้ำหนักและความยาวของปลาเมื่ออายุครบ 3 เดือน

เดือนที่ 3	Control		M104		T311		T318	
	น้ำหนัก(กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (ซม.)
1	120.00	18.50	130.00	19.70	120.00	17.60	165.00	20.50
2	130.00	19.30	170.00	21.50	120.00	18.00	150.00	19.80
3	130.00	19.40	120.00	17.50	140.00	20.00	145.00	19.50
4	145.00	19.00	150.00	20.00	125.00	18.50	100.00	16.80
5	140.00	19.00	120.00	19.00	120.00	19.00	100.00	17.50
6	100.00	17.80	140.00	21.20	135.00	17.50	130.00	20.00
7	130.00	19.30	120.00	18.50	120.00	19.00	130.00	18.00
8	140.00	18.50	120.00	18.90	120.00	18.00	115.00	16.50
9	140.00	19.50	120.00	18.50	140.00	19.50	100.00	16.80
10	100.00	17.00	110.00	17.80	110.00	17.50	110.00	16.70
ค่าเฉลี่ย	127.50±16.20	18.73±0.80	130.00±18.25	19.26±1.33	125.00±10.00	18.46±0.88	124.50±23.26	18.21±1.57



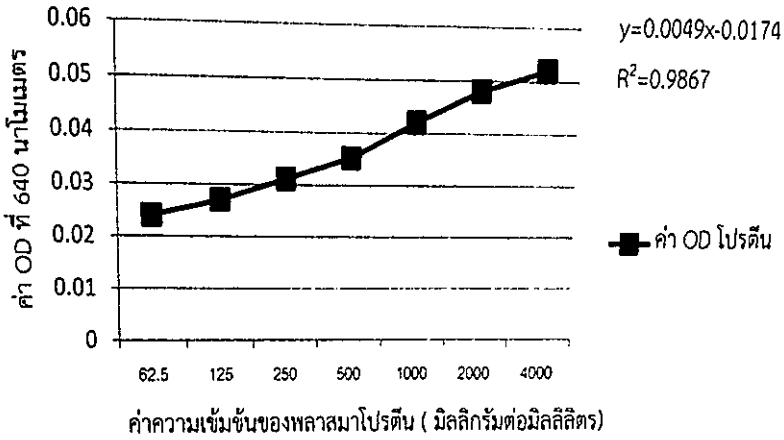
รูปที่ จ.1 กราฟฮีโมโกลบินมาตรฐาน

ตารางที่ จ.8 ข้อมูลค่าฮีโมโกลบิน

x = (y+0.0045)/0.0015 x = ค่าฮีโมโกลบิน y = ค่า OD

	Control	M104	T311	T318
1	203.00	216.33	233.67	167.00
2	176.33	269.67	191.00	163.67
3	216.33	200.33	163.00	122.33
4	169.67	229.67	181.67	159.67
5	160.33	196.33	171.00	195.00
6	209.67	249.67	213.00	157.00
7	183.00	263.00	205.67	141.00
8	216.33	191.00	181.67	115.67
9	229.67	183.00	197.67	133.00
10	156.33	209.67	139.00	127.00
ค่าเฉลี่ย	192.07±26.11	220.87±30.83	187.73±26.91	148.13±24.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.2 กราฟมาตรฐานพลาสมาโปรตีน

ตารางที่ จ.9 ข้อมูลค่าพลาสมาโปรตีน

x = (y+0.0174)/0.0049 x = ค่าพลาสมาโปรตีน y = ค่า OD

	Control	M104	T311	T318
1	66.61	116.00	110.29	113.76
2	70.90	116.20	122.53	111.71
3	57.84	141.10	118.04	111.10
4	61.51	139.06	106.82	113.14
5	68.86	120.69	116.00	113.76
6	42.73	128.86	108.45	95.18
7	52.33	129.06	114.98	100.69
8	76.61	124.78	100.08	101.51
9	49.67	124.98	101.31	99.27
10	59.27	111.92	114.16	99.06
ค่าเฉลี่ย	60.63±10.46	125.27±9.22	111.27±7.62	105.92±7.23

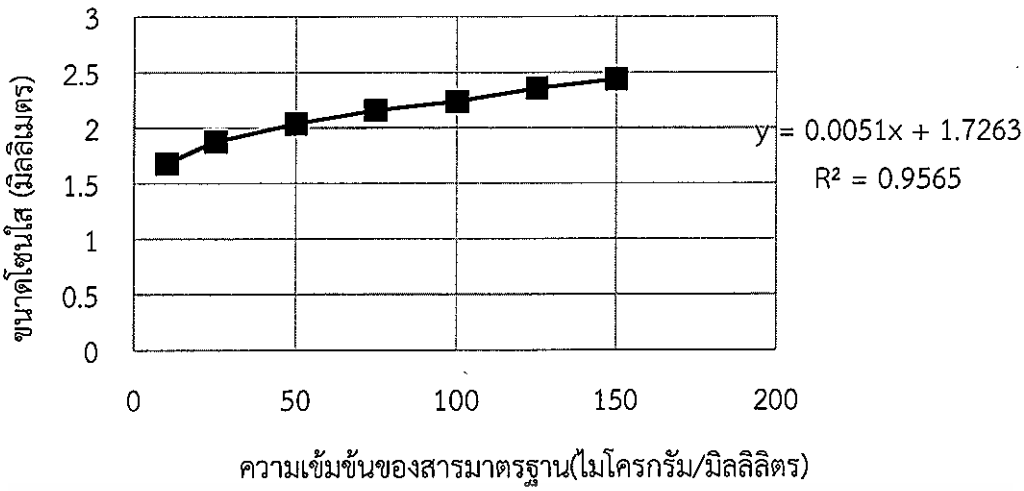
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.10 ข้อมูลค่าอิมมูโนโกลบูลิน

x = (y+0.0174)/0.0049 x = ค่าพลาสม่าโปรตีน y = ค่า OD

	Control	M104	T311	T318
1	52.12	69.67	60.08	57.63
2	48.04	96.20	30.69	36.00
3	45.18	117.43	63.96	26.82
4	36.41	88.04	60.49	60.29
5	40.29	84.57	62.73	33.55
6	30.08	54.37	36.20	46.61
7	41.51	71.92	25.39	38.65
8	51.31	109.67	53.14	53.76
9	39.27	42.94	53.76	46.00
10	34.37	55.39	51.71	47.02
ค่าเฉลี่ย	41.86±7.28	79.02±24.55	49.82±14.00	44.63±10.84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.3กราฟมาตรฐาน Hen egg white lysozyme

ตารางที่ จ.11 ข้อมูลค่าไลโซไซม์

	Control	M104	T311	T318
1	65.43	155.63	73.27	65.43
2	45.82	187.00	143.86	73.27
3	14.45	222.29	124.25	104.64
4	116.41	257.58	77.19	6.60
5	88.96	163.47	104.64	73.27
6	2.68	202.68	128.17	88.96
7	22.29	206.61	124.25	77.19
8	136.02	273.27	73.27	163.47
9	124.25	257.58	77.19	155.62
10	73.27	179.15	112.49	2.68
ค่าเฉลี่ย	68.96±47.5	210.52±41.29	103.86±26.64	81.12±57.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้