



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประยุกต์ใช้ *Bacillus* AQBS01 ในการป้องกันโรค
Streptococcosis ในปลาหมอ

โดย

ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ และ รศ.ดร. นนทวิทย์ อารีย์ชน

มิถุนายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประยุกต์ใช้ *Bacillus* AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลาไนล์

คณะผู้วิจัย

1. ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศีระภูมิ, Ph. D. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. รศ.ดร. นนทวิทย์ อารีรักษ์, Ph. D. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

การเลี้ยงปลานิลของประเทศไทยถือเป็นกิจกรรมทางการประมงที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ซึ่งสร้างรายได้และก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย อย่างไรก็ตามในช่วง 5-7 ปี ที่ผ่านมาธุรกิจการเลี้ยงปลานิลของไทย ได้ประสบปัญหาการเกิดโรคระบาดที่รุนแรงที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและสร้างความเสียหายอย่างหนักและต่อเนื่องจนมาถึงปัจจุบัน เกษตรกรส่วนใหญ่พยายามแก้ไขปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีหลายชนิด ซึ่งพบว่านอกจากจะไม่ได้ผลแล้วยังได้ส่งผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสภาพแวดล้อมและผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ เพื่อเป็นแนวทางแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำเอาแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* AQBS01 ซึ่งแยกได้จากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล ซึ่งได้ทำการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงในพื้นที่จริงในกระชัง พบว่า ผลของการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาโมเลกุลและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสามารถพิสูจน์ให้ทราบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ที่แยกได้จากธรรมชาติและใช้ในการศึกษานี้ เป็นแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* และเมื่อนำแบคทีเรียชนิดดังกล่าวในสภาพเซลล์มีชีวิต (Vegetative cells) นี้ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านทานโรค Streptococcosis ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยการผสมในอาหารให้ปลานิลทดลองขนาดประมาณ 50 กรัม ในอัตราตั้งแต่ 0.5-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม กินติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 หรือ *Bacillus pumilus* นี้ สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลานิลได้อย่างชัดเจนในห้องปฏิบัติการ โดยสังเกตจากระบวนการกลืนกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ซึ่งถือเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกที่ใช้ในการตอบสนองต่อเชื้อโรคภายหลังที่ได้ผ่านสิ่งกีดกันจากภายนอก (Physical barriers) เข้ามาในตัวปลาแล้ว รวมไปถึงปริมาณ O_2^- ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งถึงระดับการเกิด Respiratory burst ของ Phagocytes ที่ทำหน้าที่ในการกลืนกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งพบว่าการให้ *Bacillus pumilus* เป็น Probiotics ผสมในอาหารในอัตรา 1-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 1 เดือน สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ทำให้ปลาทดลองเกิดความผิดปกติทั้งในส่วนของร่างกายและการเจริญเติบโต รวมถึงพฤติกรรมระหว่างการเลี้ยงด้วย ซึ่งการศึกษาดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับการอัตราการรอดตายของปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ผลการศึกษานำแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ไปทดลองใช้กับสภาพการเลี้ยงจริงในกระชังของเกษตรกร ในพื้นที่อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ ๆ มีการระบาดของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* อย่างหนักอยู่ทุก ๆ ปี ในช่วงตั้งแต่เดือนมีนาคมจนถึงเดือนพฤษภาคม โดยใช้เวลาในการเลี้ยงทั้งสิ้น 110 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2552 จนถึง วันที่ 18 มิถุนายน 2552 ระหว่างการเลี้ยงจะไม่มีการใช้ยาและสารเคมีใด ๆ ทั้งสิ้น พบว่าการให้แบคทีเรียดังกล่าวในอาหารอัตรา 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกัน สามารถป้องกันการเกิดโรคได้อย่างชัดเจนและมีอัตราการรอดตายแตกต่างกับปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งในระหว่างทดลอง มีการระบาดของโรคในพื้นที่ทดลองอย่างรุนแรงในเดือนเมษายน 2552 อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในแม่น้ำอย่างต่อเนื่อง ปลาทดลองในทุกกลุ่มและปลาของเกษตรกรเริ่มกินอาหารลดลงและหยุดกินอาหารเป็นเวลานาน รวมทั้งทำให้ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ได้แสดงอาการป่วยของโรคและทยอยตายเช่นเดียวกัน ในช่วงปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายต่ำสุดที่ 20.86% ใกล้เคียงกับปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมที่มีอัตราการตาย 23.33% ขณะที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายใกล้เคียงกันที่ 27.31% และ 29.62% ($P < 0.05$) ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรีย Probiotics 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) ใกล้เคียงกันคือ 1.80 และ 1.78 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าปลาในกลุ่มควบคุมและปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.93 และ 1.91 ตามลำดับ จับและจำหน่ายผลผลิตพบว่าปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 0.5-3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักรวมต่อกระชังเฉลี่ยเป็น 316.47 ± 11.02 , 320.93 ± 28.07 , 342.40 ± 9.26 และ 348.13 ± 20.75 กิโลกรัม ตามลำดับ รวมเป็นน้ำหนักทั้งหมด $3,983.8$ กิโลกรัม คิดเป็นเงินที่ จำหน่ายได้ เท่ากับ $15,502.44 \pm 539.59$, $15,721.24 \pm 1,375.11$, $16,772.81 \pm 453.54$ และ $17,053.66 \pm 1,016.57$ บาท/กระชัง ตามลำดับ รวมเป็นเงินที่ได้จากการขายปลาในโครงการวิจัยนี้ทั้งสิ้น 195,150.30 บาท ผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทุกพารามิเตอร์และอัตราการเจริญเติบโต ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากการศึกษาครั้งนี้ยัง พบว่าปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดโรคของปลานิลคือ คุณภาพน้ำ แม้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* จะสามารถเพิ่มความต้านทานของแบคทีเรียก่อโรคได้ระดับหนึ่ง แต่เมื่อได้ก็ตามที่คุณภาพน้ำในพื้นที่การเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงในทางที่เลวร้ายอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง จะส่งผลต่อปลาที่เลี้ยงอยู่ในหลายด้าน โดยเฉพาะการเพิ่มหรือลดลงของอุณหภูมิในรอบวันที่ สูงมากกว่าปกติ เช่น อุณหภูมิที่สูงกว่า 32°C การลดลงของออกซิเจนในระดับต่ำทำให้ปลาหยุดกินอาหาร จะส่งผลให้ปลามีการปรับตัวทางสรีระวิทยาและใช้พลังงานในการปรับตัวดังกล่าวอย่างมาก ซึ่งอาจส่งผลต่อเนื่องทำให้เกิดความเครียดทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาเกิดการตอบสนองลดลง นอกจากนี้การปรับตัวดังกล่าวอาจทำให้สมดุลของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารเสียไป ซึ่งจะเป็นสาเหตุโน้มนำให้ปลาเกิดโรคได้ง่ายและก่อให้เกิดความเสียหายตามมาในที่สุด นอกจากนี้เพื่อให้การประยุกต์ใช้แบคทีเรียชนิดนี้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด จึงควรมีการศึกษาประสิทธิภาพ ของ *Bacillus pumilus* ในรูปสปอร์เพิ่มเติม เนื่องจากมีบางรายงานให้ข้อมูลปัจจุบันว่า การใช้แบคทีเรีย Probiotics ในรูปของสปอร์นั้นจะสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าและสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่า รวมทั้งการศึกษาความไวของเชื้อชนิดนี้ต่อยาปฏิชีวนะที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งผลของการศึกษาดังกล่าวจะทำให้การประยุกต์ใช้ *Bacillus pumilus* มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของปลานิล ในบ่อเลี้ยงต่อระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคของปลานิล ซึ่งภายหลังจากการนำไปจำแนกชนิดโดยอาศัยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและอณูชีวโมเลกุล พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้คือ *Bacillus pumilus* และเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวในสภาพที่มีชีวิตไปผสมอาหารในอัตรา 0 (กลุ่มควบคุม), 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แล้วนำไปเลี้ยงปลานิลขนาด 50 กรัม ในอัตรา 5% นำหนักตัวทุก ๆ วัน โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยเลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร ตู้อะ 15 ตัว โดยจัดเป็น 4 ซ้ำ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการตรวจสอบ อัตราการเจริญเติบโต ความยาวและจุลพยาธิของลำไส้ ปริมาณเม็ดเลือดขาว จำนวนแบคทีเรียในลำไส้ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และความสามารถในการต้านทานต่อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ใน 3 แบบคือ การแช่ การฉีดเข้าช่องท้องและการป้อนเข้าไปในช่องปาก พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอัตรา 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมสามารถเพิ่มระดับของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยสังเกตจากค่า Phagocytic activity, Phagocytic index และ Phagocytic efficiency รวมถึงปริมาณ Superoxide anion (O_2^-) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการรอดตายของปลาภายหลังจากการแช่ ฉีดและให้กินเชื้อ *S. agalactiae* ที่พบว่าปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอาหารในอัตรา 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และยังพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารไม่ได้แสดงอาการผิดปกติออกมาให้เห็นในช่วงการทดลองแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษา อัตราการเจริญเติบโตของปลาแต่ละกลุ่ม โดยพิจารณาจากความยาวและน้ำหนัก ความยาวลำไส้ของปลาในแต่ละกลุ่มพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดลอง และเมื่อนำเอาแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ไปศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริงกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในแม่น้ำท่าจีนเขตพื้นที่อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี โดยใช้เวลาเลี้ยงทั้งหมด 110 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ถึงวันที่ 18 มิถุนายน 2552 จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าระหว่างการทดลองได้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำอย่างต่อเนื่อง ที่สำคัญได้แก่ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่สูงขึ้นเกิน 32°C รวมทั้งการลดลงของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ได้ส่งผลต่อการกินอาหารของปลา และปริมาณแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ปลาทดลองทุกกลุ่มทยอยเกิดโรคและตายอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามก็พบว่าปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการตายต่ำกว่าปลาในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในช่วงกลางเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคมที่มีการระบาดของโรคเท่านั้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายต่ำสุดที่ 20.86% ใกล้เคียงกับปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีอัตราการตาย 23.33% ขณะที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายใกล้เคียงกันที่ 27.31% และ 29.62% ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($P>0.05$) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ รวมถึงผลผลิตของปลาด้วยที่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ($P>0.05$)

Abstract

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

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้เห็นความสำคัญของปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเลี้ยงปลาของประเทศไทยและได้สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ผศ .มยุรี จัยวัฒน์ ผู้ประสานงานโครงการ “การพัฒนาอาชีพทางเลือกและการจัดการทรัพยากรชายฝั่งจังหวัดสุราษฎร์ธานี” และเจ้าหน้าที่ผู้ประสานงานทุกคน ที่ได้ให้การสนับสนุนและแนะนำกระบวนการต่าง ๆ จนการวิจัยในครั้งนี้เสร็จสิ้นด้วยดีและดำเนินไปด้วยความราบรื่น

ขอขอบคุณคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ที่จำเป็นต่าง ๆ ตลอดจนนักวิชาการและเจ้าหน้าที่บริษัทเบทาโกร (มหาชน) จำกัด ทุกท่าน ที่ได้ช่วยประสานงานกับเกษตรกรในพื้นที่ รวมถึง คุณเฉลิมพล มะยมตัน เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล ในเขตพื้นที่ตำบลนางบวช อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรีที่ได้เสียสละให้ใช้พื้นที่และกระชังในการเลี้ยงปลา และยังช่วยทำหน้าที่ในการดูแล จัดการการให้อาหารปลาในการทดลองในพื้นที่ การเลี้ยงจริงด้วยความตั้งใจและเอาใจใส่เป็นอย่างดี

ท้ายนี้ขอขอบคุณนิสิตในห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำทุกคน ที่ได้มีส่วนร่วมในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงการตรวจวิเคราะห์และรวบรวมข้อมูลงานวิจัย งานวิจัยในครั้งนี้เสร็จสิ้นไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

31 พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หัวเรื่อง	หน้า
1. ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์	15
3. ขั้นตอนการดำเนินงานและระเบียบวิธีวิจัย	16
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้นที่เป็นรูปธรรม	32
5. ผลการทดลอง	33
6. วิจารณ์ผลการทดลอง	93
7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	105
8. เอกสารอ้างอิง	108
ภาคผนวก	119

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 30 วัน	33
2	จุลพยาธิของลำไส้ของปลานิลทดลองที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 30 วัน	34
3	ลักษณะของ Phagocytes (P) และ Latex bead (ลูกศรชี้) ในการเกิดกระบวนการ Phagocytosis	36
4	ค่า Phagocytic Activity ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	36
5	ค่า Phagocytic index ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	37
6	ค่า Phagocytic Efficiency ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	38
7	ปริมาณ O_2^- ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	39
8	ปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total leukocyte count) ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	40
9	ความยาวมาตรฐานของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	41
10	น้ำหนักของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	42
11	ความยาวลำไส้ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	42
12	จำนวนแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> เป็นเวลา 30 วัน	44
13	อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> ในอาหาร ภายหลังได้รับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> โดยวิธีการแช่	45
14	อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus AQBS01</i> ในอาหาร ภายหลังได้รับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง	47
15	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาทดลองที่แสดงอาการป่วยภายหลังจากการได้รับเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	คุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาทดลองที่แสดงอาการป่วย ภายหลังจากการได้รับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 Strep	48
17	อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> AQBS01 ในอาหาร ภายหลังได้รับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> โดยวิธีการกิน Gelatin capsule ที่บรรจุเชื้อความ เข้มข้น 5×10^6 CFU	50
18	ลักษณะการตายของปลานิลที่เกิดโรคระบาดในปี 2551	52
19	พิกัดของฟาร์มทดลอง บนแม่น้ำท่าจีน ซึ่งตั้งอยู่ในเขตพื้นที่ของตำบลนางบวช อำเภอบาง บาล จังหวัดสุพรรณบุรี	55
20	การเตรียมอาหารทดลองของเกษตรกร	56
21	การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์คุณภาพน้ำในฟาร์มทดลอง	56
22	ความยาวลำไส้ของปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ใน อาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	57
23	อัตราการตายสะสมของปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	58
24	ลักษณะของปลาทดลองที่แสดงความผิดปกติของโรคในระหว่างการเตรียมอนุบาลใน การทดลองครั้งที่ 1 และ 2	59
25	น้ำหนักของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ใน อาหารในระดับต่าง ๆ	63
26	ความยาวมาตรฐานของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	63
27	ปริมาณอาหารที่ให้เฉลี่ยในแต่ละกลุ่มตลอดการทดลอง	64
28	อัตราการเพิ่มของน้ำหนักต่อวันของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	64
29	ความยาวของลำไส้ของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	65
30	Log bacterial number ในลำไส้ของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	Log bacterial number ในลำไส้ ที่ผ่านการทำ Heat shock-Cold shock ของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	66
32	อัตราการตายสะสมของปลาทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์หลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	69
33	อัตราการตายสะสมของปลาทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์หลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	69
34	ความเป็นกรด-ด่างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	75
35	ปริมาณออกซิเจนละลายของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	75
36	ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	76
37	ค่าความโปร่งแสงของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	76
38	ปริมาณแอมโมเนียของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	77
39	ปริมาณไนไตรท์ของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	77
40	ค่าความเป็นด่างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	79
41	ค่าความกระด้างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	79
42	ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	80
43	อุณหภูมิของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ	81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
44	การติดตั้งเครื่องบันทึกอุณหภูมิ (Data logger) ในน้ำและอากาศบริเวณที่แขวนกระชังเลี้ยงปลาทดลอง	83
45	อุณหภูมิของน้ำในกระชังระหว่างการเลี้ยงปลานิลทดลอง	84
46	อุณหภูมิของน้ำในกระชังเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของอากาศระหว่างการเลี้ยงปลานิลทดลอง	84
47	แถบ PCR Product ภายหลังการเพิ่มจำนวน DNA ที่สกัดได้จาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 โดยใช้เทคนิค PCR	88
48	Plasmid DNA ที่มีชิ้น Insert ของ PCR Product ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI	88
49	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA gene ที่ได้จากการทำ Sequencing ของ Plasmid ที่มีชิ้น Insert ของ PCR Product ที่ได้จากการใช้ Genomic DNA ของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 เป็นแม่แบบ	89
50	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 และ <i>Bacillus</i> spp. อีก 10 ชนิด 17 Strains <i>Bacillus</i> sp. โดยการสร้าง Phylogenetic tree	92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในรูป Logarithm (Log number) ในลำไส้ของปลานิล ที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> AQBS01	43
2	อัตราการรอดตายและน้ำหนักปลาที่วัดได้ในวันขายผลผลิต	71
3	คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01	86
4	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01	90
5	การเปรียบเทียบค่าความเหมือน (Identity) และความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 กับยีน 16s rRNA ของ แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp.	91

การประยุกต์ใช้ *Bacillus AQBS01* ในการป้องกัน โรค Streptococcosis ในปลานิล

1. ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

1.1 ความสำคัญทางเศรษฐกิจและการเกิดโรค Streptococcosis ของปลานิลในประเทศไทย

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จัดเป็นปลาพื้นเมืองของประเทศแถบ แอฟริกา ที่ได้นำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรก โดยสมเด็จพระจักรพรรดิอากิฮิโตะแห่งประเทศญี่ปุ่น เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารโดยได้จัดส่งมาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช จำนวน 50 ตัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 ซึ่งในระยะแรกได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ในบริเวณพระตำหนักสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต ต่อมาด้วยพระอัจฉริยภาพทางการประมง ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ย้ายปลาไปเลี้ยงในบ่อดิน เมื่อเลี้ยงไว้ในบ่อดินนี้ได้ประมาณ 5 เดือนเศษ ปรากฏว่าปลานิลเหล่านี้ออกลูกเป็นจำนวนมาก จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้เจ้าหน้าที่ชุดบ่อเพิ่มขึ้นและทรงปล่อยปลาลงเลี้ยงในบ่อด้วยพระองค์เอง เมื่อวันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2508 และเมื่อทรงเลี้ยงปลานิลเป็นระยะเวลาเพียง 1 ปี ในวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2509 ได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานปลาให้แก่กรมประมงเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงแพร่ขยายพันธุ์ที่แผนกทดลองและเพาะเลี้ยงในบริเวณเกษตรกลางบางเขน กรุงเทพฯ (ที่ตั้งสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติในปัจจุบัน) และที่สถานีประมงต่าง ๆ ทั่วประเทศอีกจำนวน 15 แห่ง เพื่อดำเนินการเพาะขยายพันธุ์พร้อมกัน พร้อมทั้งได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า “ปลานิล” ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา

ภายหลังจากที่กรมประมงได้เพาะขยายพันธุ์และแจกจ่ายปลานิลไปยังทั่วภูมิภาคของประเทศ นับแต่นั้นปลานิลได้กลายเป็นสัตว์น้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยมากกว่า 40 ปี เนื่องจากเป็นปลาที่แพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว มีรสชาติดี เลี้ยงง่ายและมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็ว นอกจากนี้ยังเป็นปลาที่บริโภคได้ในคนทุก ๆ ชนชั้น จึงมีความต้องการของตลาดอย่างต่อเนื่อง ทั้งในและ

ต่างประเทศ ซึ่งในปัจจุบันนี้ปริมาณความต้องการยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในทุก ๆ ปี จนทำให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมอื่นที่เกี่ยวข้องอย่างรวดเร็ว ที่เห็นได้ชัดคือผู้ค้าปัจจัยการผลิต เช่น อาหาร เคมีภัณฑ์ ยารักษาโรค รวมทั้งอุตสาหกรรมการส่งออกและการแปรรูปด้วย ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตในปี พ.ศ. 2548 เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 99,729 ตัน คิดเป็นเงินมูลค่ากว่าหลายหมื่น ล้านบาท และด้วยเหตุดังกล่าวจึงทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงปลาชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายในทุก ๆ พื้นที่ของประเทศ และมีรูปแบบการเลี้ยงที่พัฒนาไปมากเมื่อเทียบกับระบบการเลี้ยงในอดีต โดยพบว่ามีการเลี้ยงในระบบต่าง ๆ เช่น การเลี้ยงในกระชังทั้งในแหล่งน้ำปิดหรือแหล่งน้ำเปิด เช่น แม่น้ำ ลำคลอง พื้นที่เหนือเขื่อน กั้นน้ำ รวมทั้งการเลี้ยงในพื้นที่ในบ่อดินขนาดใหญ่ตั้งแต่ 20-60 ไร่ โดยพบว่าเกษตรกรมีการปล่อยลูกปลาลงเลี้ยงในอัตราที่หนาแน่นสูงและมีการให้อาหารสำเร็จรูปทางการค้าที่มากเกินไปทั้งปริมาณ และคุณภาพ

อย่างไรก็ตามในช่วงระยะเวลา 2-3 ปีที่ผ่านมา การเกิดโรคซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. ได้เริ่มเข้ามามีบทบาทและสร้างความเสียหายในทุกพื้นที่การเลี้ยงของประเทศ โดยเฉพาะแถบจังหวัดพื้นที่ภาคกลาง อันได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสาคร ประทุมธานี ชัยนาท นครสวรรค์ ราชบุรี สุพรรณบุรีและนครปฐม ซึ่งถือเป็นพื้นที่การเลี้ยงที่ใหญ่ที่สุด นอกจากนี้การเกิดโรคดังกล่าวได้ขยายวงกว้างออกไปตามพื้นที่การเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น ทั้งในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน ซึ่งได้แก่จังหวัดเพชรบุรี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันออกซึ่งได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา นครนายก สระแก้ว รวมไปถึงพื้นที่ในแถบภาคเหนือและอีสาน ซึ่งมีการเลี้ยงทั้งที่เลี้ยงในบ่อดินและกระชัง จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโรคดังกล่าวมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* โดยอาการที่เกิดขึ้นจะเป็นทั้งแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน ซึ่งปลาที่แสดงอาการของโรคนั้นจะสามารถสังเกตเห็นความผิดปกติในการกินอาหารที่ลดลง ว่ายน้ำเชื่องช้า เมื่อมีอาการมากขึ้นปลาที่ป่วยจะมีการตาโปน ตาขาวขุ่น (Exophthalmia) โคลนครีบต่าง ๆ บวม มีบาดแผลตามลำตัว ท้องบวม (Ascites) เมื่อผ่าดูช่องท้องจะมีของเหลวสีเหลืองใสจำนวนมากทะลักออกมา และเมื่ออาการติดเชื้อรุนแรงขึ้น ปลาที่ป่วยเป็นโรคจะว่ายน้ำควงส่ว้นไร้ทิศทาง (Croak swimming) และตายในที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่อาจทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 70-80% ในการเลี้ยงในบ่อดิน และ

อาจสูงถึง 100% ในการเลี้ยงในกระชัง ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิด และยังมีการพยายามนำเอายาและสารเคมีชนิดใหม่เข้ามาใช้เสมอ ๆ ซึ่งนอกจากจะใช้ไม่ได้ผลในการรักษาแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำที่นำวัตถุดิบหลายประการไม่ว่าจะเป็นผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีผลทำลายสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์อื่นที่มีประโยชน์ตามธรรมชาติ และยังส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้นเกินความจำเป็นอีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นผลของการตกค้างของยาในตัวยังส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรง และเป็นที่น่าสังเกตว่าประเทศ ผู้นำเข้าหลาย ๆ ประเทศมีการปฏิเสธสินค้าปลาที่มีการปนเปื้อนของยาและสารเคมีอยู่บ่อยครั้ง ซึ่งปัญหาดังกล่าวได้ส่งผลกระทบต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงและธุรกิจอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องอย่างรุนแรงทั้งระบบ เพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น นักวิจัยในหลาย ๆ กลุ่มได้พยายามเร่งวิจัย การผลิตวัคซีนที่สามารถป้องกันการเกิดโรคแบคทีเรียชนิดดังกล่าว ซึ่งเป็นแนวทางที่เห็นผลและแก้ไขปัญหาในภาพรวมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะกับสัตว์บกหรือสัตว์ปีก รวมถึงกับสัตว์น้ำเองก็ได้มีการผลิตออกมาในรูปการค้ำและสามารถป้องกันการเกิดโรคในปลาหลายชนิดอย่างได้ผล แต่กับปลานิลเองยังพบว่าการพัฒนาเกิดขึ้นอย่างช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น อาจเป็นเพราะสาเหตุสำคัญประการหนึ่งคือ การขาดความรู้ความเข้าใจในระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลาชนิดนี้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะต้องมีการวิจัยเพื่อหาพื้นฐานขององค์ความรู้ใหม่ที่จะสามารถหาคำตอบเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลนี้กับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคให้เร็วที่สุด

1.2 การเกิดโรค Streptococcosis ในสัตว์น้ำ

การเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนาในทั่วทุกภูมิภาคของโลก ได้ทำให้เกิดผลกระทบทางลบตามมาอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ในส่วนของการเลี้ยงปลานิลโรคแบคทีเรียมักพบเป็นสาเหตุของการสูญเสียหลัก ซึ่งในปัจจุบันได้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมาก และยังพบว่าใน จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีเชื้อแบคทีเรียประมาณ 60-70 ชนิด ที่สามารถก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้ (Plumb, 1999) โรคสเตรฟโตคอคโคซิส (Streptococcosis) ก็เป็นโรคอีกชนิดหนึ่งที่เป็น

อุปสรรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และได้สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งในประเทศและหลายเขตพื้นที่ทั่วโลก (Evans *et al.* 2000; Perera *et al.* 1994; Perera *et al.* 1997) ซึ่งพบว่าโรคชนิดนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* เป็นสำคัญ (Shoemaker *et al.* 2000) ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขาว รูปร่างกลมเดี่ยว ๆ อยู่กันเป็นคู่หรือต่อเป็นโซ่ยาว ไม่เคลื่อนที่และไม่มีการสร้างสปอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7-1.4 ไมโครเมตร ให้ผลการทดสอบ Catalase test เป็นลบเมื่อทดสอบด้วย Hydrogen peroxide และให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบ Oxidase test สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้เป็น 3 แบบคือ α , β หรือ γ (Brochet *et al.* 2006) วิธีการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยทั่วไปจะทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของแอนติเจนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Lancefield group antigen) รวมทั้งการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยพบว่ามีเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่มีแอนติเจนที่ผนังเซลล์เป็น Group B คือ *S. agalactiae* (Evans *et al.* 2002) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค Streptococcosis ในปลาหลาย ๆ ชนิด พบการแพร่ระบาดครั้งแรกในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ที่ประเทศญี่ปุ่นในปี 1957 (Robinson and Meyer, 1966) การแพร่ระบาดของโรคชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล (Inglis *et al.*, 1993; Eldar and Ghittino 1999) นอกจากแบคทีเรียชนิดนี้แล้วเชื้อแบคทีเรียในสกุลนี้ชนิดอื่นที่พบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดและสร้างความเสียหายในปลาโดยทั่วไป ได้แก่ *S. iniae* และ *S. agalactiae* ซึ่งถือได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคระบาดในปลาหลายชนิด เช่น ปลาลูกผสม Striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Evans *et al.* 2002), Red sea (*Pamadasys stridens*) (Coloni *et al.* 2002), Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Eldar *et al.* 1997; Nakanishi *et al.* 2002a), Zebrafish (*Danio rerio*), (Miller and Neely, 2004), Yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) (Matsuyama *et al.* 1992) รวมทั้งในปลานิล Nile tilapia (*O. niloticus*) ด้วย ซึ่งพบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดและสร้างความเสียหายในหลายภูมิภาคของโลก (Whittington *et al.* 2005; Al-Harbi 1994; Perera *et al.* 1997; Klesius *et al.* 2000; Shoemaker *et al.* 2000; Evans *et al.* 2002) รวมทั้งในประเทศไทยเองก็มีการรายงานการระบาดของโรค Streptococcosis

ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังและบ่อดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นิลบล, 2545) และการรายงานการแพร่ระบาดของพื้นที่ภาคใต้ (นเรศและคณะ, 2547) รวมทั้งพื้นที่การเลี้ยงในภาคกลางของประเทศที่จัดเป็นพื้นที่การเลี้ยงที่ใหญ่ที่สุด โดยปัญหาดังกล่าวกำลังกลายเห็นปัญหาหลักของการตายของปลาและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างหนักในปัจจุบัน

ลักษณะอาการของโรค Streptococcosis ที่ปรากฏในปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป โดยลักษณะอาการที่พบทั่วไปในปลาทุกชนิด คือ ปลาจะว่ายน้ำซาลง สีตัวเข้มขึ้น ตาโปนและซุนขาวเนื่องจากมีของเหลวมาคั่งบริเวณหลังลูกตา มีการสะสมของเหลวในช่องท้องทำให้ท้องบวม เกิดอาการตกเลือดที่บริเวณรอบตา ลำตัว รอบขากรรไกร ปาก แผ่นปิดเหงือก ฐานของครีบต่าง ๆ และ ปลาจะมีอาการว่ายน้ำส่ายไปมาไร้ทิศทาง อวัยวะภายใน ตับ ม้าม ไต จะมีสีซีด และมีขนาดใหญ่ ขึ้น (Inglis *et al.*, 1993; Perera *et al.* 1997; Eldar *et al.* 1997) นอกจากนี้ปลาที่ติดเชื้อจะมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นถึง 75% ในการเลี้ยงด้วยระบบปิด (Perera *et al.* 1994; Stoffregen *et al.* 1996) และอัตราการตายที่ 50% ของการเลี้ยงในบ่อ (Eldar *et al.* 1997) และอัตราการตายจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนเกือบ 90% ภายใน 5-7 วัน ในปลานิลนั้นลักษณะอาการภายนอกที่พบจะมีลักษณะคล้ายกับที่มีรายงานในปลาชนิดอื่น แต่จะมีอาการบวมที่คอดหางและบริเวณลำตัวเนื่องจากภายในจะมีหนองมาสะสม (นิลบล, 2545) เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว การพัฒนาวัคซีนในการป้องกันการระบาดของโรค จัดเป็นวิธีหนึ่งที่มีการพัฒนาเพื่อหวังที่จะควบคุมการระบาดของโรคและแก้ไขปัญหาการใช้ยาและสารเคมีตกค้างในสัตว์น้ำ รวมทั้งปลาชนิดต่าง ๆ ที่มี ความสำคัญเศรษฐกิจ ซึ่งวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* spp. ก็มีการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทั้งในส่วนของรูปแบบและวิธีการให้วัคซีนรวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน โดยมีการศึกษาในปลาเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ธีราภรณ์ และคณะ (2548) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรค *S. agalactiae* ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหาร ทำการทดลองกับปลานิลที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 20 กรัม หลังจากได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์แล้ว นำปลามาทดสอบความต้านทานโรคกับเชื้อ *S. agalactiae* โดยพิจารณาจากอัตราการตายและค่า Relative Percent Survival (RPS) พบว่าปลานิลที่ได้รับ

วัคซีนโดยวิธีการผสมอาหารเป็นเวลาตั้งแต่ 6 สัปดาห์ขึ้นไปมีอัตราการตายต่ำกว่าปลากลุ่มควบคุมและมีค่า RPS สูงกว่าปลากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) Eldar *et al.* (1995) ทำการทดสอบ formalin killed วัคซีนของเชื้อ *S. difficile* ในปลานิลลูกผสมน้ำหนักเฉลี่ย 150-180 กรัม ปลาในแต่ละชุด การทดลองได้รับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อสายพันธุ์ที่ต่างกันโดยการฉีดเข้าช่องท้อง ซึ่งผลจากการทดสอบ ความคุ้มโรคต่อเชื้อ *S. difficile* พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการรอดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดย ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคของวัคซีนไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ *S. difficile* ส่วนการ ทดลองให้วัคซีนที่เตรียมจากโปรตีนที่สกัดได้จากเชื้อ *S. difficile* ก็พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อ *S. difficile* ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งการป้องกันการติดเชื้อในปลานิลมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาระดับแอนติบอดี ในซีรัม Evans *et al.* (2004) ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน *S. agalactiae* ในลูกปลานิลขนาด 5 และ 30 กรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้องและการแช่ในสารละลายวัคซีน พบว่าการให้วัคซีนในปลานิลขนาด 30 กรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้องสามารถป้องกันการติดเชื้อ *S. agalactiae* ของแบคทีเรีย Isolate ที่ไม่ได้ใช้ ในการเตรียมวัคซีนได้ ในขณะที่ลูกปลานิลขนาด 5 กรัมที่ได้รับวัคซีนโดยการฉีดเข้าช่องท้อง มีอัตราการตายที่ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้รับวัคซีน ส่วนประสิทธิภาพวัคซีนที่ให้โดยการแช่นั้น พบว่าปลานิลทั้งสอง ขนาด มีอัตราการตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากปลาในชุดควบคุม แต่ประสิทธิภาพของวัคซีน ยังต่ำกว่าการให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปลานิลขนาด 30 กรัม จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การพัฒนาวัคซีนมีแนวโน้มที่ดี ที่จะสามารถป้องกันการเกิดโรค Streptococcosis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และหากมีความรู้ความเข้าใจในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลให้ดียิ่งขึ้นแล้ว ยิ่งจะทำให้การ พัฒนาการเตรียมและรูปแบบการใช้วัคซีน ให้สามารถดำเนินไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ และจะเป็น ผลให้สามารถพัฒนาไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อแก้ไขปัญหาการเกิดโรคชนิดนี้ในสภาพการเลี้ยงจริงได้ ในท้ายที่สุด

1.3 หลักการใช้ Probiotics bacteria ในการป้องกันเชื้อโรคในสัตว์น้ำ

การนำจุลชีพที่มีประโยชน์มาใช้เป็น Probiotics ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้มีการบันทึกไว้แล้วว่ามี การใช้มากกว่า 40 ปี (Kozasa,1986) โดยส่วนใหญ่จุลชีพเหล่านี้จะทั้ง แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ และมี แนวความคิดที่จะมุ่งเน้นในการนำมาใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคในสิ่งมีชีวิตเป็นหลัก เนื่องจากกลุ่ม แบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติพิเศษในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียหรือจุลชีพที่ก่อโรค บางชนิดสามารถสร้าง หรือผลิตวิตามินหรือเอนไซม์ต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของ Host ที่อาจมีผลโดยตรงต่อ Host หรือจุลชีพ ชนิดอื่น ที่อาศัยในร่างกายของสัตว์ให้สามารถทำงานได้ดีขึ้น บางชนิดสามารถผลิตกรดอินทรีย์บางชนิดที่ เมื่อหลั่งออกมาแล้วจะมีผลต่อแบคทีเรียให้โทษทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพนั้น ๆ นอกจากนี้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการแข่งแย่งกับแบคทีเรียก่อโรคในสภาพแวดล้อม ทั้งในและนอก ตัวสัตว์อีกด้วย โดยเฉพาะในสัตว์น้ำนั้นในช่วงกว่า 20 ปี การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีอัตราการเจริญเติบโต เพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี แต่ปัญหาเรื่องการระบาดของโรคมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก ในอดีตมีการใช้ สารเคมี ยาฆ่าแมลง และยาปฏิชีวนะ เพื่อแก้ปัญหาโรคระบาด แต่กลับส่งผลให้เกิดการดื้อยา การตกค้าง ของสารเคมีในสัตว์น้ำ วิธีการแก้ปัญหาที่ดีที่สุด คือ การป้องกันโรค เช่น ควบคุมสภาพแวดล้อมในบ่อ การ ควบคุมการให้อาหาร คุณภาพน้ำ การใช้แบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคควบคุมแบคทีเรียที่ก่อโรค (probiotic biocontrol agents) เป็นอีกแนวทางที่สามารถป้องกันการเกิดโรคระบาด (Austin *et. al.*, 1995, Moriarty, 1997) อาศัยหลักการควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) ใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อควบคุมสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งไม่ให้ เพิ่มจำนวน หรือสร้างความเสียหายให้กับระบบโดยรวม สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จะต้องไม่ส่งผลกระทบ หรือผล เสียหายต่อเจ้าบ้าน หรือระบบนิเวศโดยรวม (Gatesoupe, 1991)

โปรไบโอติก มาจากคำภาษากรีก หมายถึง เพื่อชีวิต โปรไบโอติกโดยทั่วไปนั้นหมายถึง จุลินทรีย์ ซึ่งอาจมีชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น มีผู้ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกไว้หลายความหมายดังนี้

Lilly และ Stillwell (1965) เป็นบุคคลแรกที่อธิบายเกี่ยวกับโปรไบโอติกว่าเป็นสารที่ผลิตขึ้นจาก จุลินทรีย์ที่ดี และส่งเสริมให้สัตว์มีการเจริญเติบโต

Parker (1974) ได้อธิบายว่าโปรไบโอติก คือกลุ่มของจุลินทรีย์หรือสสารที่มีประโยชน์ต่อสัตว์โดยไม่ มีผลกับจุลินทรีย์ที่พบตามปกติภายในลำไส้ สามารถ ปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ในที่นี้รวมถึง จุลินทรีย์ประจำถิ่น และ antibiotics ด้วย

Fuller (1989) ได้ให้ความหมายว่าโปรไบโอติก คือ อาหาร (เสริม) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมี ชีวิตอยู่ และยังก่อให้เกิดประโยชน์ โดยช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบ ทางเดินอาหาร ของสิ่งมีชีวิต

Fuller (1992) อธิบายว่าโปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เลี้ยงได้จากอาหาร มีผลต่อการปรับ สมดุลย์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ จะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและให้สามารถให้กับ host โดยการผสมอาหาร

Havenaar และ Veid 1992 ได้ให้ความหมายว่าโปรไบโอติกต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่ง อาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็น ส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายๆ ชนิด ที่สามารถไปปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ ในระบบทางเดินอาหาร โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปเซลล์แห้ง หรือผลิตภัณฑ์หมัก

SEAFDEC (1996) ได้อธิบายว่าโปรไบโอติกคือ จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือเป็นสารประกอบ จุลินทรีย์ที่ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ แล้วมาประยุกต์ใช้กับระบบการเลี้ยงเพื่อให้เกิดประโยชน์ โดยเป็น จุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำ และตะกอนพื้นบ่อและสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมากและมีผลโดยตรงต่อ การเจริญเติบโต หรือควบคุมความเป็นอยู่ของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งอาจจะใช้ในลักษณะการผสม อาหารให้สัตว์น้ำหรือในสภาวะกับน้ำโดยตรง

Maeda *et. al.*, (1997) ได้อธิบายว่าโปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของ สิ่งมีชีวิตโดยการทำงานแบบ biological control

Moriarty (1998) ให้ความหมายว่าโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะรวมถึงการใส่แบคทีเรียลง ในบ่อหรือถังเลี้ยงสัตว์น้ำ

Gram *et. al.*, (1999) ได้อธิบายว่าโปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิต โดยปรับ สมดุลย์ของจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยที่ไม่จำเป็นต้องให้โปรไบโอติกโดยการผสมอาหาร

Gatesoupe (1999) ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่าหมายถึง เชลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดๆ แล้วสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้าน และมีชีวิตอยู่ได้ และสามารถปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น

Salminen *et. al.*, (1999) ได้อธิบายว่าโปรไบโอติกเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต้องมีชีวิต แต่ได้มาจากเชลล์ของจุลินทรีย์ และมีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับโปรไบโอติกเข้าไป

ซึ่งพิจารณาโดยรวมแล้วจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกได้อาจเป็นแบคทีเรีย รา ยีสต์ ซึ่งมีคุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น จุลินทรีย์บางชนิดสร้างวิตามิน และสารที่ไม่ทราบชนิด ซึ่งจำเป็นต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และให้กรดอะมิโนที่จำเป็น เพื่อสร้างโปรตีนและไขมัน บางกลุ่มสามารถสร้างเอนไซม์ มีเฉพาะเจาะจงที่ย่อยสารประกอบเชิงซ้อนให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ซึ่งสัตว์และจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่สามารถนำไปใช้ได้ นอกจากนี้อาจสร้างเอนไซม์ เช่น Cellulose, xylanase, lipase เป็นต้น ซึ่งช่วยย่อยอาหารและลดปริมาณจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรค ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มความสัมพันธระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกัน และระหว่างจุลินทรีย์กับเจ้าบ้าน จุลินทรีย์เหล่านี้สร้าง Acetate, lactate, volatile acid, วิตามิน, เอนไซม์, สารต้านแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ในสัตว์น้ำที่สำคัญ Gatesoupe (1999) รวบรวมไว้ดังนี้

1. ควรเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถในการแข่งขัน การใช้สารอาหารหรือผลิตสารเพื่อฆ่า หรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
2. มีความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ได้ หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง
3. ทำให้เจ้าบ้านแข็งแรงมีความต้านทานโรคโดยมีการยืนยันด้วยการทดสอบการต้านทานโรค (challenge test)
4. มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

สำหรับคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งในสภาพหลอดทดลองนั้น ไม่ใช่คุณสมบัติที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรีย เพื่อเป็นโปรไบโอติกได้เสมอไป เพราะว่าสารยับยั้งเหล่านี้มีด้วยกันหลายประเภท คือ Antibiotics, organic acid, hydrogen peroxide และ siderophores ซึ่งการสร้างสารแต่ละชนิดของแบคทีเรียขึ้นกับสภาวะที่แตกต่างกันออกไป ทั้งในสภาพหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง

ประเด็นสำคัญประการหนึ่งคือโปรไบโอติกในสัตว์น้ำต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วไป และมีความปลอดภัยต่อคนและสิ่งแวดล้อม ตลอดระยะเวลาในการใช้ ทั้งระยะสั้นและระยะยาวตามมาตรฐาน GRAS (Generally Recognized As Safe Microorganism) FDA และ AAFCO การใช้โปรไบโอติกจะต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ.2539 โดยมีระดับการใช้ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU (colony forming unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กรัม จุลินทรีย์ที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 มีดังนี้

กลุ่มของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus coagulan*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารปฏิชีวนะ), *B. subtilis* strain BN, *B. toyoi*, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Bacteroides suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*

กลุ่มของยีสต์ ได้แก่ *Candida pintolepessi*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pediococcus* spp.

กลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *A. oryzae*

แบคทีเรียที่ก่อปัญหาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น ส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีความสามารถในการปรับตัวสูง จึงมีการใช้ยาต้านจุลชีพและสารเคมี เพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากแบคทีเรียเหล่านี้ แต่ปัจจุบันพบว่าปัญหาเชื้อแบคทีเรียมีการดื้อยา ทำให้การรักษาไม่ได้ผลในบางครั้ง และยังมีปัญหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ยั่งยืนนั้นต้องใช้หลักการควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมการระบาดของโรค และลดปริมาณการใช้ยาและสารเคมีลง จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกมีหลาย ๆ กลไก เช่น โปรไบโอติกแบคทีเรียสามารถ ผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งมักจะปล่อยสารเคมีออกมาโดยสารนั้นจะมีฤทธิ์เป็นสารฆ่าแบคทีเรียหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งคุณสมบัตินี้ก่อให้เกิดการแข่งขันการใช้

พลังงานและสารเคมี ไม่ว่าจะเป็นในลำไส้ของเจ้าบ้าน หรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านแบคทีเรีย โลโซไซม์ กรดอินทรีย์และเอนไซม์ต่าง ๆ ระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะมีลักษณะเป็นการแก่งแย่งสารอาหาร คาร์บอน แหล่งพลังงาน เพื่อการอยู่รอด และไม่ส่งผลกระทบต่อเจ้าบ้าน การแก่งแย่งพื้นที่ในการยึดเกาะบริเวณพื้นผิวของเจ้าบ้านซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค การยึดเกาะไม่จำเป็น ต้องอาศัยความจำเพาะอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยกายภาพ เคมี รวมถึงโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะ และโมเลกุลที่เป็นตัวรับบนผิวเซลล์ การใช้โปรไบโอติกในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน บางครั้งอาจใช้เซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์มาเป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านสูงขึ้นและสามารถต้านทานเชื้อที่ทำให้ก่อโรค โดยการเพิ่มขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม การสร้างแอนติบอดี และการเพิ่มการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนซึ่งเป็นสารจำเป็นในการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้โปรไบโอติกยังมีคุณสมบัติในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำ โดยเฉพาะกลุ่มบาซิลลัส ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถควบคุมปริมาณของเสียที่เป็นสารอินทรีย์ โดยเปลี่ยนให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นเหตุผลว่า ในบ่อที่มีปริมาณแบคทีเรียสูง จะพบว่ามีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำในระหว่างการเลี้ยง นอกจากกลุ่มบาซิลลัสแล้ว ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็น Nitrifying bacteria ที่สามารถลดปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์ในน้ำได้ดีเช่นกัน ซึ่งมีการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติก ได้แก่

Gatesoupe (1991) ศึกษาการต่อต้านการเกิดโรคในลูกปลา turbot โดยใช้สปอร์ของ *Bacillus toyoi* ผสมโรติเฟอร์ และอีกกลุ่มผสมโรติเฟอร์กับยาปฏิชีวนะให้ปลา พบว่าอัตราการรอดตายไม่แตกต่าง แต่จะมีความแตกต่างกันของน้ำหนัก โดยกลุ่มที่ผสมสปอร์ของ *B. toyoi* กับโรติเฟอร์จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าในกลุ่มที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างมีนัยสำคัญ

Austin et. al., (1995) ได้ศึกษาการเติมโปรไบโอติกลงในบ่อเลี้ยงปลาแซลมอน ช่วยให้อัตราการรอดของปลาสูงขึ้นเป็น 74 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมโปรไบโอติกซึ่งเป็น 18% และสามารถป้องกันเชื้อ *V. anguillarum*, *V. ordalii* และ *A. salmonicida* ในปลาเทราท์ และปลาแซลมอน นอกจากนี้ยัง

ได้ทดลองนำโปรไบโอติกที่ใช้สำหรับกุ้งไปประยุกต์ใช้ในบ่อพักน้ำของการเลี้ยงปลาแซลมอนขนาด 21 กรัมเป็นประจำ แล้วเหี่ยวน้ำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio* sp. พบว่าสามารถลดอัตราการตายได้อย่างมีนัยสำคัญ

Moriarty *et. al.*, (1997) ศึกษาการใช้ แบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* sp. กับเชื้อ *Vibrio* sp. ที่ทำให้เกิดโรค Vibriosis โดยทำการเปรียบเทียบกับฟาร์มที่ไม่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบว่าฟาร์มที่ไม่ได้ใช้จะประสบความล้มเหลวหลังจากเลี้ยงได้ 80 วัน ในขณะที่ฟาร์มที่ใช้โปรไบโอติก เลี้ยงนานกว่า 160 วันไม่พบปัญหาตลอดการเลี้ยง และยังพบว่าฟาร์มที่มีการใช้โปรไบโอติกจะมีปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ในน้ำลดลง

Rengpipat *et al.* (1998) รายงานการใช้เชื้อ *Bacillus* S11 และใช้เป็นโปรไบโอติกใส่ลงในไรสีน้ำตาล (*Artemia* sp.) เพื่อเป็นอาหารสำหรับกุ้งกุลาดำ การใช้โปรไบโอติก *Bacillus* S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว และความยาว และเมื่อเหี่ยวน้ำลูกกุ้งให้เกิดโรคโดยเชื้อ *V. harveyi* พบว่าลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงในกลุ่มที่ไม่มีการใช้ *Bacillus* เป็น 85 % ส่วนในกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการตายเพียง 13 % สอดคล้องกับการทดลองของ Phianphak *et. al.* (1999) ได้ศึกษา *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่ ผสมให้กับอาหารกุ้ง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมให้อาหารปกติ พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วย *Lactobacillus* spp. มีอัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตมากกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อเลี้ยงครบ 100 วัน และนำทั้ง 2 กลุ่มมาเหี่ยวน้ำให้เกิดโรค โดยเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 10 วัน พบว่ากลุ่มที่ผสม *Lactobacillus* spp. มีอัตราการรอดตาย 100% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตาย 26%

Rengpipat *et al.* (1998) ได้ทำการแยก *Bacillus* S11 จากกุ้งกุลาดำและผสมในอาหารกุ้งเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก ซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ เซลล์สด เซลล์สดในสารละลายน้ำเกลือ และเซลล์ lyophilized ภายหลังจากที่ให้โปรไบโอติก เป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำระยะ P 30 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติกกับกลุ่มควบคุม หลังจากกุ้งได้รับเชื้อ *V. harveyi* โดยการแช่เป็นเวลา 10 วัน กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก ทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมรอดตาย 26 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น กลุ่มควบคุมแสดงลักษณะภายนอกชัดเจนว่า กุ้งมีสุขภาพไม่ดี

hepatopancreas และลำไส้ไม่ปกติ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกก็จะแข็งแรง hepatopancreas และลำไส้ปกติ

Gram *et al.* (1999) ศึกษาการใช้โปรไบโอติก แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* กับเชื้อ *V. anguillarum* ในบ่อเลี้ยงปลา rainbow trout โดยการแช่ปลาลงในเชื้อ *V. anguillarum* พบว่าสามารถลดอัตราการตายจาก 47 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มที่ไม่มีการใส่โปรไบโอติก แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* เป็น 32 เปอร์เซ็นต์

Rengpipat *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองพบว่าการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 จะดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* S11 มีประสิทธิภาพในการไปกระตุ้น และเพิ่มกระบวนการฟาโกไซโตซิส ซึ่งทราบได้จากการวัดเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส และ phagocytic index (PI) ในเลือด ฟีนอลออกซิเดส และกระบวนการกำจัดแบคทีเรีย (antibacterial activities) ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้ง แต่จะเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้โปรไบโอติก ซึ่งทราบได้โดยการทดลอง หลังจากเลี้ยงกุ้ง 90 วัน โดยให้อาหารที่ผสมและไม่ผสม *Bacillus* S11 และใส่ *V. harveyi* หลังจากนั้น 10 วัน กุ้งที่ให้อาหารผสมกับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดดีกว่า อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อัตราการรอดตายเมื่อใช้โปรไบโอติกคือ 54.3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้ใช้โปรไบโอติกมีอัตราการรอดตาย 35.5 เปอร์เซ็นต์ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ กุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน ในกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกกับกลุ่มควบคุมจะต่างกันอย่างมาก ฟีนอลออกซิเดสมีปริมาณสูงในกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก คือ 2.7 ± 0.8 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มี 0.6 ± 0.3

มณจันทร์และกมลพร (2543) ศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ พบว่ามีศักยภาพในการยับยั้งหลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง และเมื่อนำลักษณะของเชื้อ *V. harveyi* ที่ทดสอบด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไปศึกษาความผิดปกติของเซลล์ด้วยกล้อง Transmission Electron Microscope พบว่ารูปร่างของเซลล์เล็กกว่าปกติ ซึ่งเป็นความผิดปกติที่ถาวร

Spanggaard *et al.* (2001) ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ หนังปลา และเหงือกของปลาเทราท์ พบว่า 2 ใน 3 ของแบคทีเรียที่ได้จากหนังปลาเป็น แบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. และ *Acinetobacter/Moraxella* 1 ใน 4 ของแบคทีเรียที่แยกได้จากเหงือกเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และในส่วนของลำไส้ของปลาเทราท์พบว่า 66 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* sp., Enterobacteriaceae และ Vibrionaceae นอกจากนี้ยังพบยีสต์ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. มีความสามารถในการผลิตสาร Siderophore เมื่อนำแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. มาใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียในการควบคุมเชื้อ *V. anguillarum* พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของปลาเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ ได้ทั้งในสภาพ *in vitro* และ *in vivo*

Irianto *et al.* (2002) ศึกษาการใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของปลา Atlantic salmon, rainbow trout และปลา turbot พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *A. hydrophila*, *V. fluvialis*, *Cannobacterium* sp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. salmonicida* และนำแบคทีเรียที่ได้ผสมในอาหาร สามารถลดอัตราการตายของลูกปลา เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจาก 48 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุมเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลา 7 วัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

Chang and Liu (2002) ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *B. toyoi* และ *Enterococcus faecium* ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ทางการค้า พบว่าสามารถลดการเกิดโรค Edwardsiellosis ในปลาไหลยุโรป (*Anguilla anguilla*) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. toyoi* และ *E. faecium* มีความสามารถการควบคุมการเจริญของเชื้อ *E. tarda* ใน *in vitro* เชื้อแบคทีเรีย *E. faecium* เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้ในมนุษย์ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. toyoi* เป็นโปรไบโอติกที่ใช้ในสัตว์ ซึ่งมีผลช่วยเร่งการเจริญเติบโตของปลา Sheat (*Silurus glanis*) โดยใช้ปริมาณ 2×10^8 CFU ต่ออาหาร 1 g เป็นเวลา 58 วัน พบว่าปลามีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Vaseeharan *et al.* (2003) ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* BT 23 ที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาใช้ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio* sp. พบว่าในชุดการทดลองที่มีการแพร่เชื้อ *B. subtilis* BT 23 ร่วมกับเชื้อ

Vibrio sp. สามารถลดอัตราการตายสะสมจาก 60 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อ *B. subtilis* BT 23 เป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

Brunt and Austin (2005) ศึกษาการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก *A. sobria* GC 2 ในการควบคุมโรค lactococcosis และ streptococcosis ในปลา rainbow trout โดยการให้ผสมอาหารที่ความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 5×10^7 cell/g เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสามารถลดอัตราการตายของปลาลง โดยในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเป็น 75 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ให้เหลือเพียง 0-6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ต่อปลานิล รวมถึงผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา
- 2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพห้องปฏิบัติการ
- 3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 ในการป้องกันโรคในปลานิลในสภาพการเลี้ยงจริงในกระชัง
- 4) เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและทางอณูชีวโมเลกุล

3. ขั้นตอนการดำเนินงาน และระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะมุ่งเน้น ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จาก ลำไส้ของปลานิลใน แหล่งน้ำธรรมชาติ ในการต้านทานเชื้อโรคในสภาพพื้นที่ ๑ เป็นการเลี้ยงในกระชัง ซึ่งมีการระบาดของเชื้อ *S. agalactiae* ที่รุนแรง ซึ่ง แบคทีเรีย ชนิดนี้ได้ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการแล้วว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้วิธี Cross streak และ Agar well diffusion method นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบใช้สารละลายแบคทีเรีย AQBS01 ความเข้มข้น 10^5 และ 10^6 CFU/ml และเชื้อ *S. agalactiae* ที่มีความรุนแรง ความเข้มข้น 10^6 , 10^7 และ 10^8 สาดลงในตู้ทดลองที่มีปลานิลมีชีวิตอยู่ พบว่าเชื้อ AQBS01 ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถลดอัตราการตายของปลาที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* ได้ในทุกความเข้มข้น ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใช้สารละลายแบคทีเรีย AQBS01 อย่างไรก็ตามโดยความเป็นจริงแล้วการประยุกต์ใช้แบคทีเรียในลักษณะ ดังกล่าว คงไม่เหมาะสมกับระบบ การเลี้ยงปลาในกระชัง เนื่องจากการเลี้ยงส่วนใหญ่จะวางกระชังในสภาพแหล่งน้ำที่มีการไหลตลอด การที่จะควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ให้มีระดับคงที่ในบ่อเลี้ยงเป็นไปได้ยาก ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำแบคทีเรียที่มีประโยชน์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในลักษณะผสมอาหารแทน ซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าการ เก็บแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4°C นานไม่เกิน 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด ก่อนการนำไปผสมอาหารโดยไม่ ทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงแตกต่างจากจำนวนแบคทีเรียเมื่อเริ่มต้นทดลองอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้วางแผนศึกษาความปลอดภัยของเชื้อชนิดดังกล่าวต่อปลานิลโดยการผสมอาหาร และหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการใช้ รวมทั้งการศึกษาผลของแบคทีเรียต่อ กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย ซึ่งผลของการทดลองในครั้งนี้จะส่งผลทำให้การประยุกต์ใช้แบคทีเรียชนิดนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในอนาคต

3.1 การศึกษาความปลอดภัยในการใช้เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ AQBS01 ต่อปลานิล และ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา

3.1.1 สัตว์ทดลองและการเตรียมอาหาร

(1) ทำการเลี้ยงปลานิลขนาด ประมาณ 50 กรัม จำนวน 15 ตัว ในตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร จำนวน 20 ตู้ เพื่อปรับสภาพปลาในห้องทดลอง เป็นเวลา 7 วัน ระหว่างนี้ให้อาหารเม็ดวันละ 3-5% ของ น้ำหนักตัว และให้อากาศเต็มที่ และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ 2 วัน

(2) ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นล้างแบคทีเรียด้วยสารละลายเกลือแกง 0.85% ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการปั่นล้างซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดียวกัน

(3) นำสารละลายเชื้อที่ได้ในข้อ 2) กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 45 ไมครอน แล้วนำไปชั่ง เพื่อให้ได้น้ำหนักเปียกของแบคทีเรียเป็น 0.5, 1, 3 และ 5 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้น นำแบคทีเรียที่ เตรียมได้ไปละลายในสารละลายเกลือแกง 0.85% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วคนละลายให้เข้ากัน

(4) นำสารละลายที่ได้ในข้อ 3) มาเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ แต่ไม่ควรเกิน 1 สัปดาห์ แล้วนำสารละลายแบคทีเรีย ใส่มาผสมในอาหารเม็ดสำหรับปลานิล น้ำหนัก 1 กิโลกรัม พร้อมกันนั้นทำการเตรียมอาหารชุดควบคุมโดยการใช้เกลือ 0.85% ปริมาตร 50 โดยคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วนำไปผึ่งลมให้แห้ง จะทำให้ได้อาหารที่มีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 เป็น 0, 0.5, 1, 3 และ 5 กรัม น้ำหนักเปียก/อาหาร 1 กิโลกรัม

3.1.2 การวางแผนการทดลอง

(1) เมื่อเลี้ยงปลาในข้อ 3.1.1 (1) ได้ 7 วัน ทำการเลี้ยงปลาด้วยอาหารที่เตรียมในข้อ 3.1.1

(4) วันละ 3-5% ของน้ำหนักตัว 2 ครั้ง/วัน

(2) ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 5 ชุดการทดลอง (treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ ให้อาหารทดลองวันละ 2 มื้อ ในช่วง 9.00 น. และ 16.00 น. โดยแบ่งให้ตามการวางแผนการทดลองดังต่อไปนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารผสมกับสารละลายเกลือแกงปกติ (กลุ่มควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

(3) ทำการให้อาหารทดลองต่อเนื่องกันเป็นเวลา 30 วัน ระหว่างนี้ทำการบันทึก น้ำหนัก ความยาวของปลาและวัดความยาวลำไส้ของปลาในแต่ละกลุ่มทุก ๆ สัปดาห์และบันทึก อัตราการตายสะสมของปลาแต่ละกลุ่มในทุก ๆ วัน ซึ่งเมื่อพบว่าปลาตายให้นำมาตรวจวินิจฉัย โดยการเขี่ยเชื้อจากตับ ม้ามและไต หากมีเชื้อขึ้นให้นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไปทำการย้อมสีแกรม (Gram's staining) และทดสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ เพื่อยืนยันการตรวจพบเชื้อต่อไป

(4) เมื่อทำการทดลองครบ 30 วัน ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของอัตราการตายสะสมในแต่ละวันของปลา ตามการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลาแต่ละชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.1.3 การศึกษาผลของการผสมเชื้อ *Bacillus AQBS01* ในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ของปลานิล

(1) ทำการศึกษาดัชนีที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่สำคัญคือ

- ค่า Phagocytic activity, Phagocytic index (ตามวิธีของ Puangkaew *et al.*

2004) และ Phagocytic efficiency ตามลำดับ

- ปริมาณ Super oxide anion (O_2^-)(ตามวิธีของ Puangkaew *et al.* 2004)

- ปริมาณเม็ดเลือดขาวรวม โดยการใช้ Hemacytometer

โดยทำการวิเคราะห์ดัชนีเหล่านี้ทุก ๆ สัปดาห์ ภายหลังจากการได้รับอาหารทดลอง

(2) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของดัชนีดังกล่าวข้างต้นของปลาทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยดัชนีดังกล่าวของปลาในแต่ละชุดทดลองและแต่ละสัปดาห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.1.4 การตรวจจำนวนแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในปลากลุ่มต่าง ๆ ภายหลังจากการได้รับอาหารผสมแบคทีเรียในระดับต่าง ๆ กัน

(1) ระหว่างการทดลองในข้อ 3.1.2 ในทุก ๆ สัปดาห์ ให้ นำปลาตัวอย่างกลุ่มละ 3 ตัวมาผ่าเอาลำไส้และตัดนำไปแช่น้ำหนักให้ได้ประมาณ 1 กรัม มาบดด้วยโกร่งบดในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ $80^{\circ}C$ เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการ Cold shock ด้วยน้ำประปาอย่างน้อย 1 นาที

(2) นำสารละลายที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง ไปทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ด้วยน้ำเกลือ 0.85% แล้วนำสารละลายที่เจือจางในแต่ละหลอดมา 100 ไมโครลิตร ไป Spread ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar แล้วนำ Plate ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนแบคทีเรียใน Plate ที่มีเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

(3) นำแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรีย แล้วนำจำนวนแบคทีเรียที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาจำนวนแบคทีเรียต่อหน่วยน้ำหนัก (CFU/กรัม)

(4) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของแบคทีเรียในข้อ (3) ในแต่ละกลุ่มทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ยดัชนีดังกล่าวของปลาในแต่ละชุดทดลองและแต่ละสัปดาห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2 การศึกษาผลของการใช้ เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ AQBS01 ต่อการต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิล ในห้องปฏิบัติการ

3.2.1 การทดสอบความต้านทานโรคโดยการแช่ปลาทดลองด้วยเชื้อ *S. agalactiae*

(1) ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1 โดยเมื่อเลี้ยงปลาจนครบ 1 เดือน จึงทำการทดสอบความต้านทานโรค **Streptococcosis** ของปลาในแต่ละกลุ่ม

(2) เมื่อเลี้ยงปลาทดลองแล้ว 1 เดือนแล้ว ทำการใส่สารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เตรียมในสารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเป็น 10^6 CFU/ml

(3) ทำการเลี้ยงปลาในสภาพดังกล่าวและให้อาหารทดลองต่อไป เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการของปลาและบันทึกอัตราการตายสะสมทุก ๆ วัน หากปลาแสดงอาการของโรค และใกล้ตายให้นำปลามาแยกเชื้อโดยใช้เข็มเย็บที่ตักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อเป็นการยืนยันผล

(4) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของอัตราการตายสะสมของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของปลาในแต่ละชุดทดลองและแต่ละสัปดาห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.2 การทดสอบความต้านทานโรคโดยการฉีดเข้าช่องท้อง

(1) ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1 โดยเมื่อเลี้ยงปลาจนครบ 1 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานโรค **Streptococcosis** ของปลาในแต่ละกลุ่ม โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง โดยการฉีดสารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในทุก ๆ ตัว

ของแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งจะทำให้ปลาทุกตัว ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 CFU/มิลลิลิตร เท่ากัน

(2) ทำการเลี้ยงปลาในสภาพดังกล่าวและให้อาหารทดลองต่อไป เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ ระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการของปลาและบันทึกอัตราการตายสะสมทุก ๆ วัน หากปลาแสดงอาการของโรค และใกล้ตายให้นำปลามาแยกเชื้อโดยใช้เข็มเย็บที่ตักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อเป็นการยืนยันผล

(3) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของอัตราการตายสะสมของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของปลาในแต่ละชุดทดลองและแต่ละสัปดาห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.3 การทดสอบความต้านทานโรคโดยการกิน

(1) ทำการทดลองต่อจากข้อ 1 โดยเมื่อเลี้ยงปลาจนครบ 1 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานโรค **Streptococcosis** ของปลาในแต่ละกลุ่ม โดยการกิน โดยการเตรียมสารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ความเข้มข้น 2.5×10^7 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ใน Gelatin capsule แล้วจึงทำการป้อนเข้าไปในปากโดยใช้หลอดแก้วใส่ฟันเข้าไปเพื่อให้แน่ใจว่า Capsule ของเชื้อได้เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารอย่างสมบูรณ์ โดยทำการป้อนในทุก ๆ ตัว ของแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งจะทำให้ปลาทุกตัวจะได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 CFU เช่นเดียวกับปริมาณที่ใช้ในการทดสอบด้วยการฉีด

(2) ทำการเลี้ยงปลาในสภาพดังกล่าวและให้อาหารทดลองต่อไป เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการของปลาและบันทึกอัตราการตายสะสมทุก ๆ วัน หากปลาแสดงอาการของโรค และใกล้ตายให้นำปลามาแยกเชื้อโดยใช้เข็มเย็บที่ตักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อเป็นการยืนยันผล

(3) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของอัตราการตายสะสมของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของปลาในแต่ละชุดทดลองและแต่ละสัปดาห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ต่อปลานิล ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณที่มีการระบาดของโรค Streptococcosis

การทดลองนี้จะเป็นการประยุกต์ใช้แบคทีเรีย สายพันธุ์ AQBS01 ในสภาพการเลี้ยงจริง (พื้นที่อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี) ซึ่งพบว่ามี การระบาดของโรค Streptococcosis บ่อยครั้ง โดยจะเริ่มทำการทดลองในช่วงต้นเดือน กุมภาพันธ์ และจะเลี้ยงปลาต่อไปอีก 4 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่จับขาย โดยในสภาพการเลี้ยงจริงจะพบว่าในช่วงเดือน เมษายนถึงเดือนกรกฎาคม ของทุกปีจะเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรคมากที่สุด โดยจะทำการทดลองดังต่อไปนี้

(1) ทำการเริ่มเลี้ยงปลานิลขนาด 50 กรัม/ตัว ในช่วงต้นเดือนมีนาคม จำนวน 800 ตัว/กระชัง ในกระชังขนาด 3x3x2 เมตร จำนวน 12 กระชังและปรับสภาพของปลาให้เข้ากับสภาพของแหล่งเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์

(2) ทำการเตรียมอาหารทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1.1 และทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง (Treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ให้อาหารทดลองวันละ 2 มื้อ ในช่วง 9.00 น. และ 16.00 น. โดยแบ่งให้ตามการวางแผนการทดลองดังต่อไปนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารปกติผสมสารละลายเกลือแกง 0.85% (กลุ่มควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

(3) ทำการให้อาหารทดลองไปจนครบ 4 เดือน ระหว่างนี้ทำการบันทึกอัตราการตายสะสม และทำการสุ่มปลามาชั่งน้ำหนักและความยาวทุก ๆ เดือน และเมื่อปลาเกิดการตายให้นำมาตรวจวินิจฉัยโดยนำตับม้ามไต มาแช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และเมื่อมีเชื้อขึ้น นำเชื้อที่ได้ไปย้อมสีแกรมและจำแนก

ชนิดด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป ระหว่างการเลี้ยงจะไม่มีการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะโดยเด็ดขาดและทำการวัดดัชนีที่เกี่ยวข้อง ทุก ๆ 15 วัน ที่สำคัญได้แก่

- ความยาวทั้งหมด
- น้ำหนัก
- อัตราเจริญเติบโต
- อัตราการตายสะสม
- ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* ในทางเดินอาหารในส่วนของลำไส้ ทั้ง Total bacterial count และ

Heat shock count

- ความยาวลำไส้และเก็บเนื้อเยื่อ拿去ศึกษา Histology
- รวมทั้งการวัดคุณภาพน้ำ (ภาพที่ 9) ที่สำคัญได้แก่
- ออกซิเจนละลาย
 - ความเป็นด่าง
 - ความเป็นกรด-ด่าง
 - แอมโมเนีย
 - ไนไตรท์
 - ค่าความโปร่งแสง
 - ค่าความนำไฟฟ้า

และหากมีการป่วยหรือปลาแสดงความผิดปกติหรือตาย จะทำการแยกเชื้อจากตัวปลาเพื่อการตรวจวินิจฉัย

ปรสิตรภายนอก และแบคทีเรียจากส่วนของตับ และเก็บเนื้อเยื่อส่วนตับ ม้าม ไตและสมองเพื่อศึกษาการ

เปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ โดยใช้เทคนิคทางอนุพยาธิวิทยาด้วยวิธีมาตรฐาน ระหว่างการเลี้ยงจะไม่มี การใช้ยาหรือสารเคมีทุกชนิดแต่อย่างใด

(4) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของน้ำหนัก ความยาว อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* ในทางเดินอาหาร และอัตราการตายสะสมของปลาทดลอง ตลอดจนคุณภาพน้ำต่าง ๆ ที่ก่อนการทดลอง และวันที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 120 วัน ของการทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของดัชนีดังกล่าวของปลาในแต่ละช่วงเวลาด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และทำการคำนวณต้นทุนการผลิตของแบคทีเรียที่ใช้ในขั้นตอนสุดท้ายต่อไป

3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและทางอนุชีวโมเลกุล

การศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและทางอนุชีวโมเลกุล เพื่อให้ทราบถึงชนิด (Species) ของแบคทีเรีย ควบคู่กับการใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาทั่วไป ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการศึกษาทางกายภาพ (Morphology) และคุณสมบัติของแบคทีเรียในการสร้างสารหรือเอนไซม์บางชนิดเพื่อทำ ปฏิกิริยาทางชีวเคมี อย่างจำเพาะกับ Substrates โดยวัตถุประสงค์การใช้ เทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลของสารพันธุกรรมและเทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้ เพื่อให้สามารถทราบข้อมูลและใช้เป็นเครื่องบ่งลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ของแบคทีเรียในการศึกษาและจะเป็นประโยชน์ในการเอาไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต โดยการศึกษาในส่วนนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนที่สำคัญดังนี้

3.4.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

(1) นำโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 ที่แยกได้จากธรรมชาติมาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน Incubator shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้านบนออกให้หมด ระวังอย่าให้รบกวนตะกอนของแบคทีเรียด้านล่างทั้งหมด

(3) ล้างทำความสะอาดตะกอนแบคทีเรียโดยการเติมสารละลายเกลือแกง 0.85% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายแบคทีเรียที่ได้ด้วย Vortex mixer แล้วนำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วรอบ 2,500 รอบ เป็นเวลา 15 นาที แล้วใช้ Pipette ดูดเอาสารละลายเกลือแกงด้านบนออกให้หมด ระวังอย่าให้รบกวนตะกอนของแบคทีเรียด้านล่างทั้งหมด ทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีกครั้ง

(4) ละลายตะกอนแบคทีเรียที่ได้ด้วยสารละลายเกลือแกง 0.85% เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วทำการปรับความขุ่นของแบคทีเรียที่ได้ให้มีความหนาแน่นสุดท้ายให้ได้ความขุ่นสุดท้ายประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร โดยเทียบกับสารละลาย McFarland's number 0.4

(5) จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปทำการย้อมสีด้วยเทคนิค Gram's straining เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาและการติดสี Gram ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

(6) นำแบคทีเรียในข้อ 4 ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

- 1) Oxidase
- 2) Catalase
- 3) O/F test
- 4) Motility test
- 5) Indol production
- 6) Voges-Proskauer (V.P.) tests
- 7) Methyl red (M.R.) test
- 8) H₂S production
- 9) Citrate utilization test
- 10) Starch hydrolysis
- 11) Gelatin test
- 12) Acid from:

Glucose	Arabinose	Nitrate
Sorbitol	Salicin	Arginine dihydrolase
Sucrose	Fructose	Lysine decarboxylase
Manitol	Xylose	
Maltose	Tween 80	
Glycerol	Ornithine	

3.4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์

AQBS01 ด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

3.4.2.1 การสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรีย

(1) นำโคลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 ที่แยกได้จากธรรมชาติมาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ใน Incubator shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบ เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้านบนออกให้หมด ระวังอย่าให้รบกวนตะกอนของแบคทีเรียด้านล่างหลอด

(3) นำแบคทีเรียที่ได้มาสกัด Genomic DNA ด้วย Wizard® SV Genomic DNA purification system ตามวิธีที่แนะนำของบริษัท (Promega) แล้วทำการวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ตามลำดับ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ng/ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

3.4.2.2 การเพิ่มจำนวนของ 16s rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

(1) นำ Genomic DNA ของ แบคทีเรียที่ได้ในข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 100 ng) มาใช้เป็นต้นแบบ ในการสังเคราะห์และเพิ่มจำนวน 16s rRNA gene ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Specific primer ดังนี้ Forward primer P1 5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC -3' และ Reverse primer P2 5'-CACCTTCCGATACGGCTACC-3' ซึ่งใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene ในแบคทีเรีย ตามการรายงานของ Green *et al.* (1999) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาในหลอดทดลองปริมาตรทั้งหมด 30 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

Taq DNA polymerase (5 U/UI)	0.40	ไมโครลิตร
10X Taq buffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ -MgCl ₂	3.00	ไมโครลิตร
1.25 mM MgCl ₂	3.75	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP mix	3.20	ไมโครลิตร
10 μM Forward primer	3.00	ไมโครลิตร
10 μM Reverse primer	3.00	ไมโครลิตร
Distillated water	13.65	ไมโครลิตร
รวมปริมาตรทั้งหมด	30.00	ไมโครลิตร

(2) นำหลอดทดลองที่ได้ไปเพิ่มจำนวน 16s rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR ในเครื่อง

Thermal cycler (Takara, Japan) โดยมี Initiation or Predenaturation step ที่ 95°C นาน 5 นาที และตามด้วย 30 รอบของ Denaturation step ที่ 95°C นาน 30 วินาที, Annealing step ที่ 55°C นาน 30 วินาที และ Extension step ที่ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที และ Post Extension step ที่ 72°C นาน 10 นาที

(3) นำ PCR Products ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยการ Load 10 ไมโครลิตร ของปริมาตร PCR ใน 1.0% Agarose gel แล้วนำ Gel ที่ได้ไปผ่านกระแสไฟฟ้า 100 Volt นาน 30 นาที และตรวจสอบขนาดของ PCR Products และบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ Gel documentation system

3.4.2.3 การโคลนและการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรีย

(1) นำ PCR Products บน Agarose gel ที่ได้ในข้อ (3) ของข้อ 3.4.2.2 โดยการตัดเอาเฉพาะ ส่วนที่มี DNA ของ PCR products มาทำการสกัดเอาเฉพาะ DNA โดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience)

(2) นำเอา DNA ที่ได้ไปเชื่อมต่อ (Ligate) กับ T-Easy cloning vector (Promega) แล้วนำ Ligation product ที่ได้ไป Transform เข้าสู่ เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย (Competent cells) *Escherichia coli*

สายพันธุ์ JM109 แล้วนำไปทำการ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Ampicillin, X-gal และ IPTG บ่ม Agar plate ที่ได้ใน Incubator ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C

(3) ทำการคัดเลือกเอาเฉพาะโคโลนีแบคทีเรียที่มีสีขาว มาสกัดเอา Plasmid ด้วย QuickPrep plasmid DNA extraction kit (Sonulin) แล้ว นำไปตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco RI*

(4) นำ Plasmid ที่มีชิ้น Insert ขนาดใกล้เคียงกับ PCR product มาทำการตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ ทางด้าน 5' และ 3' ด้วย M13 Forward และ M13 Reverse primer โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham pharmacia biotech) โดย Macrogen, Inc. (Korea)

(5) หลังจากที่ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากเครื่อง DNA sequencer แล้วนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทำการตัดส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vector และ Adaptor ที่อยู่ในรูปของ Chromatogram file โดยใช้โปรแกรม Genetyx version 7.0 แล้วนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละโคลนมาทำการเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บันทึกไว้แล้วใน GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BLASTN โดยกำหนดให้มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching น้อยกว่า 10^{-4} และใช้โปรแกรม BLASTX เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน โดยบริเวณที่เหมือนกันต้องมีจำนวนของกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 10 Residues มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนไม่น้อยกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ และค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching ที่น้อยกว่า 10^{-4} (Cao *et al.*, 2001)

3.4.2.4 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01

(1) ภายหลังจากได้รับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01แล้ว ในข้อ 3.4.2.3 แล้ว ทำการเปรียบเทียบและหาค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับ นิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโน (Alignment, similarity and identity) กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่ได้

รายงานไว้แล้วใน GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม CLUSTALW และ EMBOSS Pairwise alignment algorithms (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) ตามลำดับ

(2) จากนั้นหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน ยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 ตามวิธีการของ Neighbour-joining method (Tamura *et al.*, 2007) โดยการเลือกใช้ค่า bootstrap ที่ 1,000

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1) เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทั่วไป

- เครื่องทำน้ำกลั่น ระบบ Reverse Osmosis
- เครื่อง spectrophotometer
- เครื่อง Autoclave
- เครื่องให้อากาศแบบ Electrical blower และอุปกรณ์เครื่องให้อากาศอื่น ๆ
- ถังไฟเบอร์กลาส ตู้กระจกและบ่อซีเมนต์สำหรับเลี้ยงปลาไนล์
- เครื่อง Refrigerated centrifuge
- Automatic pipette ขนาด 10, 100 และ 1000 μ l
- Incubator สำหรับ บ่มเชื้อและเครื่องเขย่าสารแบบสามารถควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลอง (Thermal cycler, Takara)

2) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01

3) อาหารเลี้ยงเชื้อและยาที่ใช้ในการทดลอง

- Nutrient Agar (NA) Nutrient Broth (NB)
- Plate Count Agar (PCA)
- Tryptic Soy Broth (TSB) Tryptic Soy Agar (TSA)
- Todd-Hewitt Broth

- Brain Heart Infusion (BHI) Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

4) อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย

- เครื่องเหวี่ยงแยกสาร
- เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 401; Milton Roy)
- หม้อนิ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert รุ่น WB 14)
- ตู้แช่แข็ง
- ตู้บ่มเชื้อ (Sibata รุ่น SAI-600)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- กล้องจุลทรรศน์
- เครื่องแก้ว

5) อุปกรณ์และสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง

- ตู้กระจกทดลองขนาด 80 ลิตร
- ปลานิล ขนาด 50 กรัม จำนวน 5,000 ตัว
- กระชังขนาด 3x3x2 เมตร จำนวน 15 กระชัง
- อาหารเม็ดลอยน้ำ
- อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงปลา
- ตาข่ายและอุปกรณ์วัดความยาว

ตารางกิจกรรมต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการวิจัย

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	กิจกรรม	ระยะเวลาการดำเนินงาน (เดือนที่)																							
		ปีที่ 1												ปีที่ 2											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	ค้นหาและรวบรวมข้อมูล	↕	↕	↕	↕	↕	↕	↕	↕	↕	↕	↕	↕												
2	การศึกษาความปลอดภัยในการใช้เชื้อ แบคทีเรีย สายพันธุ์ AQSBS01 ต่อปลาไนล์ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา				↕					↕															
3	การทดสอบความสามารถของเชื้อ แบคทีเรีย AQSBS01 ในการต้านทานเชื้อ Streptococcus ในปลาไนล์ ในสภาพ ห้องทดลอง								↕				↕												
4	การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ AQSBS01 ต่อปลาไนล์ ที่เลี้ยงใน กระชังบริเวณที่มีการระบาดของโรค Streptococcosis					↕											↕								
5	รวบรวมข้อมูล																			↕					
6	วิเคราะห์และสรุปผล เพื่อเขียนรายงานฉบับ สมบูรณ์																			↕					↕

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้นที่เป็นรูปธรรม

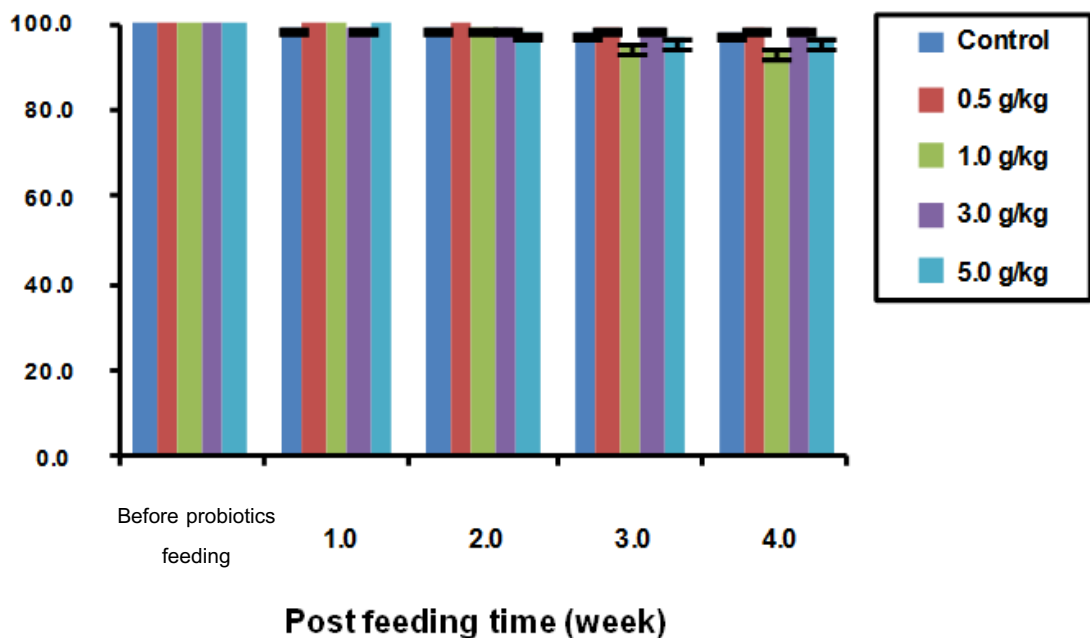
1. สามารถพัฒนาแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบคทีเรียในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังได้
2. ทราบถึงกลไกการทำงาน of แบคทีเรียที่จะใช้ในการควบคุมโรค เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสภาพการเลี้ยงจริงให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด
3. สามารถถ่ายทอดความรู้ที่เกิดขึ้นให้กับเกษตรกรนำไปใช้ในสภาพการเลี้ยงจริงในอนาคต
4. ลดต้นทุนการผลิตอันเกิดจากการใช้ยาและสารเคมี ทั้งยังลดผลกระทบทางลบที่เกิดจากการใช้ยาและสารเคมี
5. เสริมสร้างธุรกิจการเลี้ยงปลานิลในกระชังให้เข้มแข็ง และผลิตสินค้าปลานิลที่มีคุณภาพสูง ปราศจากการตกค้างของยาและสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และทำให้การเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นกิจกรรมที่เป็นมิตรและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม

5. ผลการทดลอง

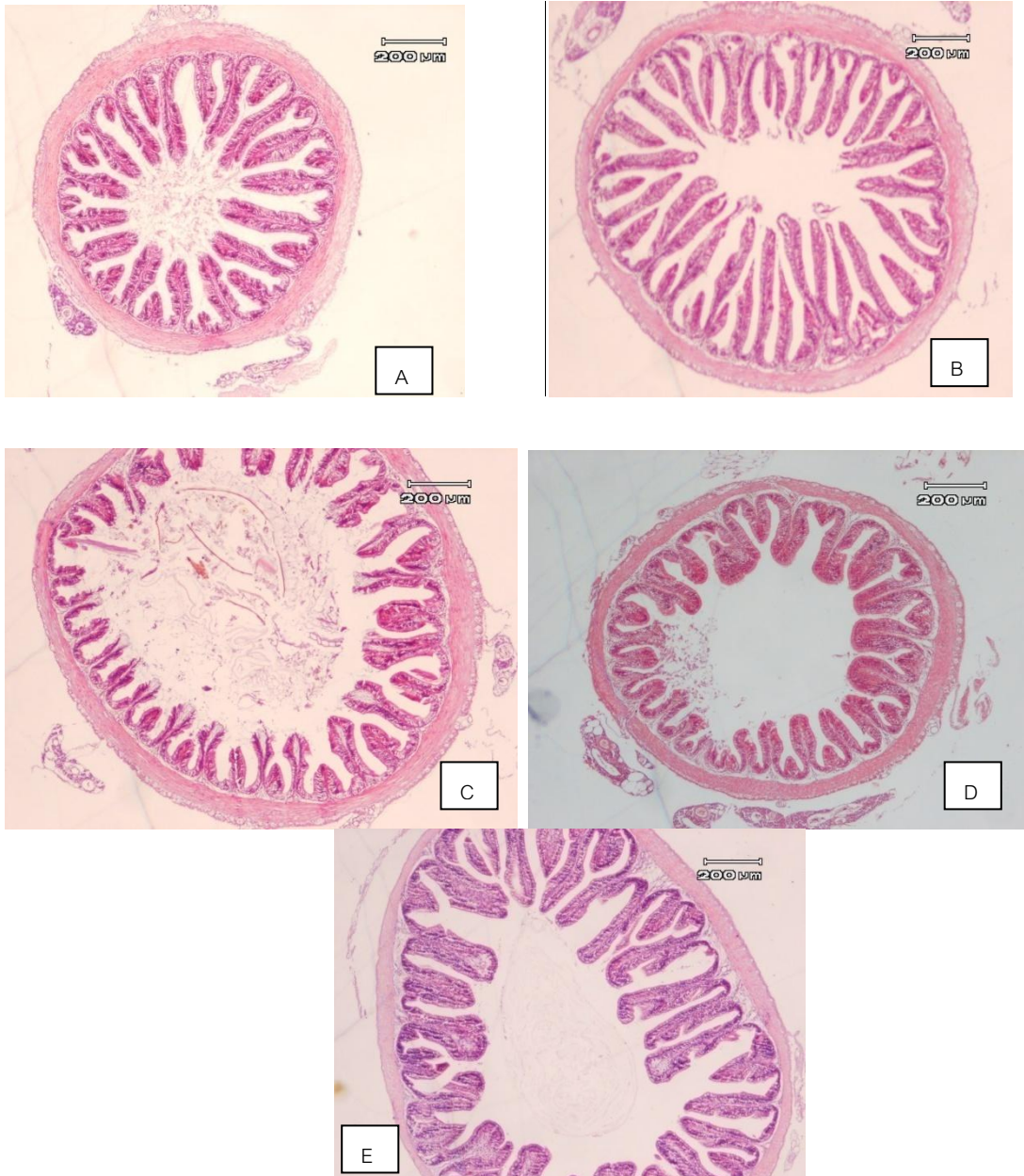
5.1 การศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในปลานิลในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการสามารถชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ลงในอาหารทดลองโดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-5.0 g/kg diet นั้น ไม่มีผลทำให้ปลานิลทดลองขนาดประมาณ 50 กรัมตาย โดยเป็นผลมาจากการก่อโรคของแบคทีเรียที่ใช้ผสมในอาหาร ซึ่งภายหลังจากที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแล้วเป็นเวลานานถึง 1 เดือน ผลจากการสังเกตอัตราการตายสะสมของปลาทดลองพบว่า ปลาทุ่ทุกกลุ่มมีอัตราการรอดตายสูงกว่า 93% ภายหลังจากสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 1) โดยปลาบางส่วนที่ตายนั้นส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากการเกิดภาวะความเครียดในช่วงแรก ๆ ของการทดลอง โดยจากการสังเกต พบว่าปลาบางตัวจะกัดและวิ่งไล่กันในตัวทดลอง ทำให้เกิดการชำเล็ดและบาดแผลบอบช้ำตามลำตัว เป็นผลให้ปลาเฉื่อยชาไม่กินอาหาร แสดงความผิดปกติเรื้อรังและตายในที่สุด แต่เมื่อนำเอาตับ ม้ามหรือไต ของปลาที่ใกล้ตายเหล่านี้ไปเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อปรากฏว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้น นอกจากนี้เมื่อสังเกตพฤติกรรมและลักษณะความผิดปกติภายนอกและภายใน (Gross external and internal) ของปลาทุ่ทุกกลุ่ม ไม่พบความผิดปกติใด ๆ จากการสังเกตดังกล่าว และเมื่อนำเอาลำไส้ของปลาทดลองทุกกลุ่มไปตรวจจุลพยาธิ ก็ไม่พบความผิดปกติใด ๆ ในลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2)

Survival rate (%)



ภาพที่ 1 อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 2 จุลพยาธิของลำไส้ของปลานิลทดลองที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ A; กลุ่มควบคุม B-E; กลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในระดับ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 g/kg diet ตามลำดับ

แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าปลาทดลองในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 1.0-5.0 g/kg diet จะมีเยื่อลำไส้บางกว่ากลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในระดับ 0.5 g/kg diet และกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 2)

5.2 ผลของการผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลในห้องปฏิบัติการ

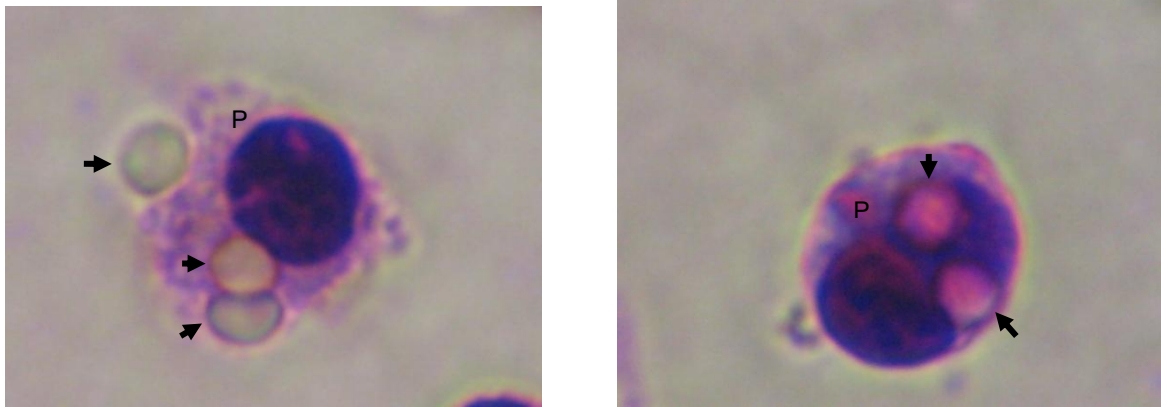
การศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยทำการทดลองต่อเนื่องจากการศึกษาความปลอดภัยของแบคทีเรีย Probiotic *Bacillus AQBS01* ที่ผสมลงในอาหารทดลอง แล้วทำการทดสอบการตอบสนองของระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immune response) ซึ่งได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytosis), ปริมาณ Superoxide anion (O_2^-) ของเม็ดเลือดขาวจำพวก Phagocytes ในกระบวนการ Respiratory burst และปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ซึ่งได้ผลการทดลองโดยสรุปดังต่อไปนี้

5.2.1 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytosis)

การศึกษากระบวนการ Phagocytosis ของปลานิลที่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus AQBS01* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยทำการสกัด เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของปลา โดยการใช้ Procoll gradient density ซึ่งส่วนที่เลือกเอามาศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นเม็ดเลือดชนิด Monocytes ในการดักจับกินสิ่งแปลกปลอม โดยในการทดลองครั้งนี้จะใช้ Latex bead ขนาด $2\ \mu m$ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ 3 ดัชนี ดังนี้

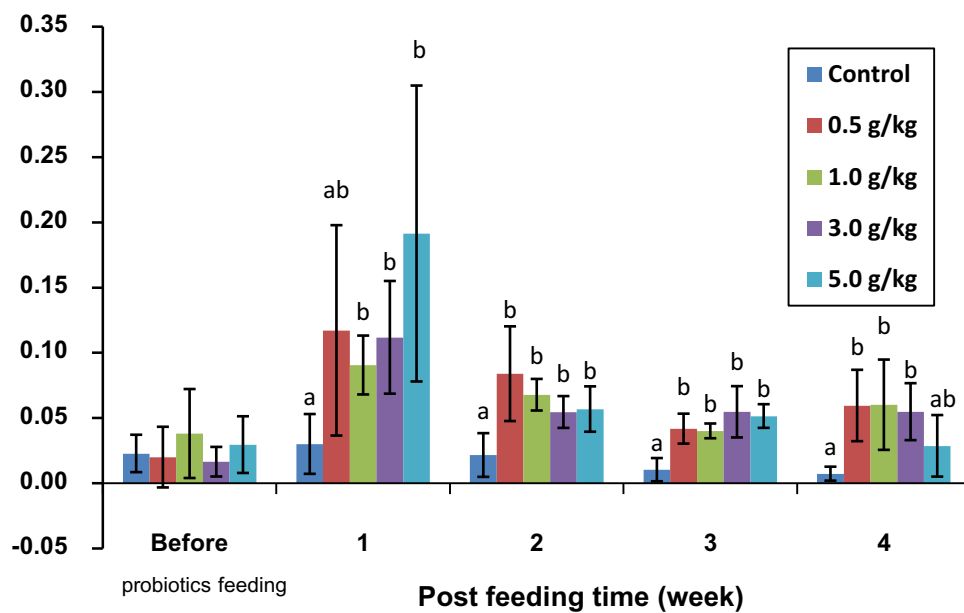
5.2.1.1 ค่า Phagocytic Activity (PA)

เป็นดัชนีที่แสดงถึงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Monocytes โดยรวมที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ Phagocytosis โดยจะทำการนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทุกเซลล์ที่กำลังเกิดกิจกรรมการกินเม็ด Latex bead ทั้งที่ติดอยู่บนผิวเซลล์และถูกกลืนกินเข้าไปใน Cytoplasm ของเซลล์แล้ว (ภาพที่ 3) พบว่า ในช่วงก่อนการทดลอง ปลาทุกกลุ่มมีค่า PA อยู่ในระดับต่ำประมาณ 0.02-0.04 เท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อปลาเริ่มได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ค่า PA ของปลาในทุก ๆ กลุ่ม รวมทั้งกลุ่มควบคุม มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปลาในกลุ่มที่ได้รับ แบคทีเรียในอาหารในระดับ 5.0 g/Kg จะมีค่า PA สูงถึง 0.19 ซึ่งสูงกว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในปริมาณ 0.5, 1.0 และ 3.0 g/Kg โดยมีค่า PA เป็น 0.12, 0.09 และ 0.11 ตามลำดับ ขณะที่ ปลาในกลุ่มควบคุมมีค่า PA ต่ำสุดเพียง 0.03 เท่านั้น อย่างไรก็ตาม ค่า PA ของปลาทดลองในแต่ละกลุ่มจะมีแนวโน้มลดลง ในสัปดาห์ที่ 2 จนถึงสิ้นสุดการทดลองภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่า ค่า PA ของปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารทุกกลุ่มจะมีค่าสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุม ทั้งในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 ของการทดลอง (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ลักษณะของ Phagocytes (P) และ Latex bead (ลูกศรชี้) ในการเกิดกระบวนการ Phagocytosis (Wright & Giemsa 100X)

Phagocytic activity

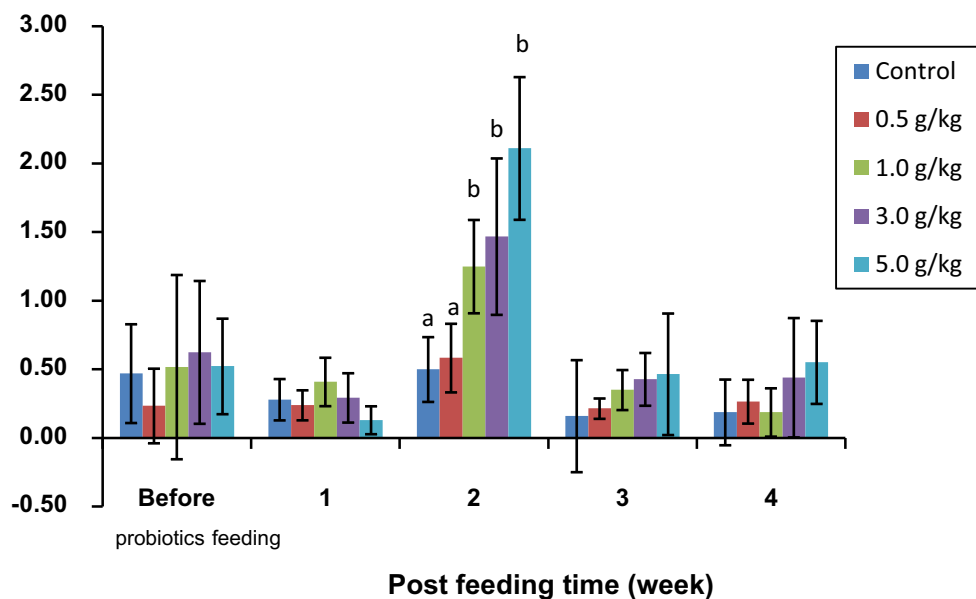


ภาพที่ 4 ค่า Phagocytic Activity ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับแท่งกราฟที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

5.2.1.2 ค่า Phagocytic Index (PI)

ค่า PI นี้เป็นดัชนีที่แสดงให้เห็นถึงอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยจำนวน Latex bead ทั้งที่ติดอยู่บนผิวและถูกกินเข้าไปใน Cytoplasm ของ Phagocytes ต่อจำนวน Phagocytes ที่กำลังเกิดกระบวนการ Phagocytosis ทั้งหมด ซึ่งแสดงถึงความว่องไวในการเกิดกระบวนการ Phagocytosis ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาในทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองมีค่า PI ในก่อนการทดลอง และ 1 สัปดาห์ภายหลังการได้รับอาหารทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากอาหารทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้วเท่านั้นที่ ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 1.0, 3.0 และ 5.0 g/kg มีค่า PI เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5 g/kg อย่างชัดเจน โดยพบว่า มีค่า PI เป็น 1.25 ± 0.34 , 1.47 ± 0.57 และ 2.11 ± 0.52 ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5 g/kg มีค่า PI เป็น 0.50 ± 0.41 และ 0.58 ± 0.25 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ของการทดลอง ค่า PI ของปลาในปลาทุกกลุ่มมีแนวโน้มลดลง แต่ยังพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 3.0 และ 5.0 g/kg เท่านั้นที่มีค่า PI สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 5)

Phagocytic index

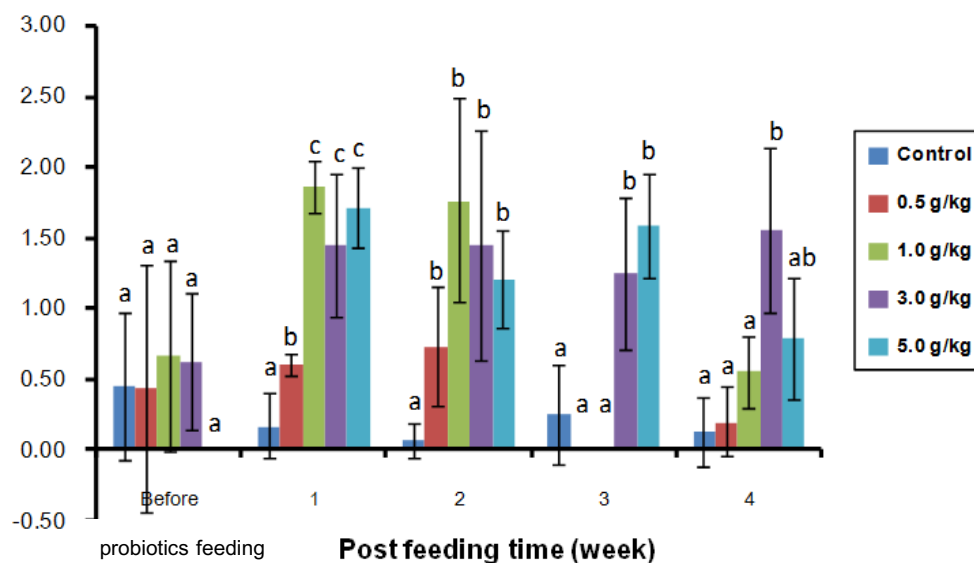


ภาพที่ 5 ค่า Phagocytic index ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็น 4 สัปดาห์ พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับแบ่งกราฟที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

5.2.1.3 ค่า Phagocytic Efficiency (PE)

ค่าดัชนี PE นี้ เป็นการวัดความสามารถของ Phagocytes ในการนำเอา Latex bead ซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมเข้าไปทำลายใน Cytoplasm ของเซลล์ โดยเป็นอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยจำนวน Latex bead ต่อเซลล์ ต่อจำนวน Phagocytes ที่กำลังเกิดกิจกรรม Phagocytosis ทั้งหมด ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อเริ่มการทดลอง ปลาทดลองทุกกลุ่มมีค่า PE ไม่แตกต่างกันโดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.40-0.66 เท่านั้น อย่างไรก็ตาม ในสัปดาห์ที่ 1 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0, 3.0 และ 5.0 g/kg มีค่า PE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปลากลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ในสัปดาห์ที่ 2 ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารทุกกลุ่มมีค่า PE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปลากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยมีค่าเป็น $0.73\pm0.43, 1.76\pm0.72, 1.45\pm0.81$ และ 1.20 ± 0.35 ตามลำดับ ขณะที่ในสัปดาห์ที่ 3 ค่า PE ของปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 3.0 และ 5.0 g/Kg เท่านั้น ที่มีค่า PE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5-1.0 g/kg diet โดยมีค่า PE ต่ำมากที่ 0.0 ± 0.0 เท่ากัน ขณะที่ในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองเท่านั้นที่พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 3.0 g/kg diet มีค่า PE แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (ภาพที่ 6)

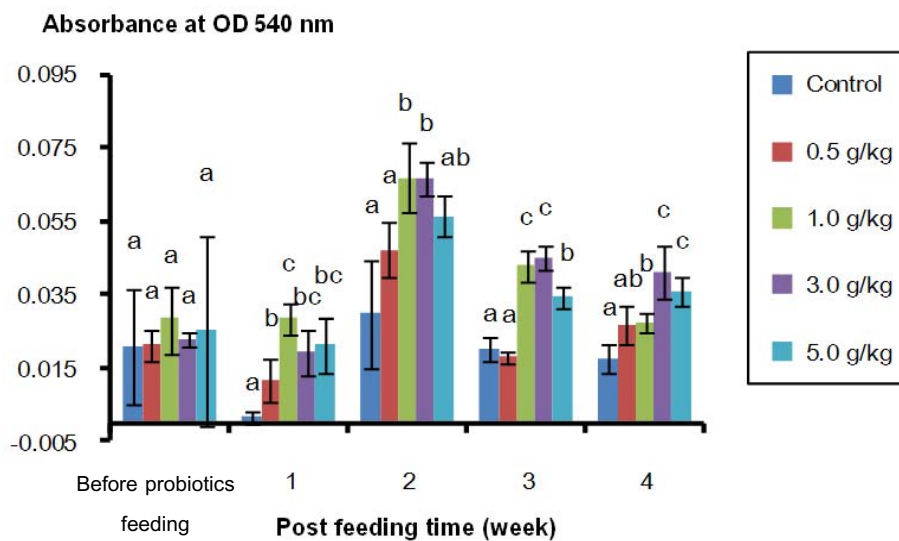
Phagocytic efficiency



ภาพที่ 6 ค่า Phagocytic Efficiency ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับแท่งกราฟที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

5.2.2 ปริมาณ Superoxide anion (O_2^-) ของเม็ดเลือดขาว

เป็นการทดสอบความสามารถของ Phagocytes ในการผลิตสาร Reactive Oxygen Intermediates (ROIs) โดยอาศัยปฏิกิริยาที่เรียกว่า “Nitroblue Tetrazolium Dye Reaction Test (NBT)” โดยการทำปฏิกิริยา Reduction กับ O_2^- โดยสาร O_2^- นั้นถือได้ว่าเป็นสารที่ Phagocytes ผลิตออกมาเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อโรคโดยตรงและยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารหลายชนิดแล้วทำให้เกิด สารที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อโรคภายในเซลล์ (Reactive oxygen species) หลายชนิดตามมา โดยเมื่อ O_2^- ทำปฏิกิริยา Reduction กับ NBT จากสีเหลืองแล้วให้สารผลิตภัณฑ์เป็น Formazan blue เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งความเข้มข้นของ Formazan blue ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณ O_2^- ที่ถูกสร้างขึ้นใน Phagocytes ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ภายหลังจากการให้อาหารทดลองไปแล้ว 1 สัปดาห์ ปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียทุกกลุ่ม มีค่า O_2^- สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 2 นั้น ความเข้มข้นของ O_2^- ในทุกกลุ่มจะมีค่าสูงกว่าสัปดาห์อื่น โดยมีค่าเป็น 0.012 ± 0.006 , 0.029 ± 0.004 , 0.019 ± 0.006 และ 0.021 ± 0.008 ตามลำดับ และเป็นที่น่าสังเกตว่าในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1.0 และ 3.0 g/kg diet จะมีค่า O_2^- สูงสุดและแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน โดยมีค่าสูงถึง 0.067 ± 0.009 และ 0.067 ± 0.005 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 ปริมาณ O_2^- ของเซลล์ Phagocytes ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสม

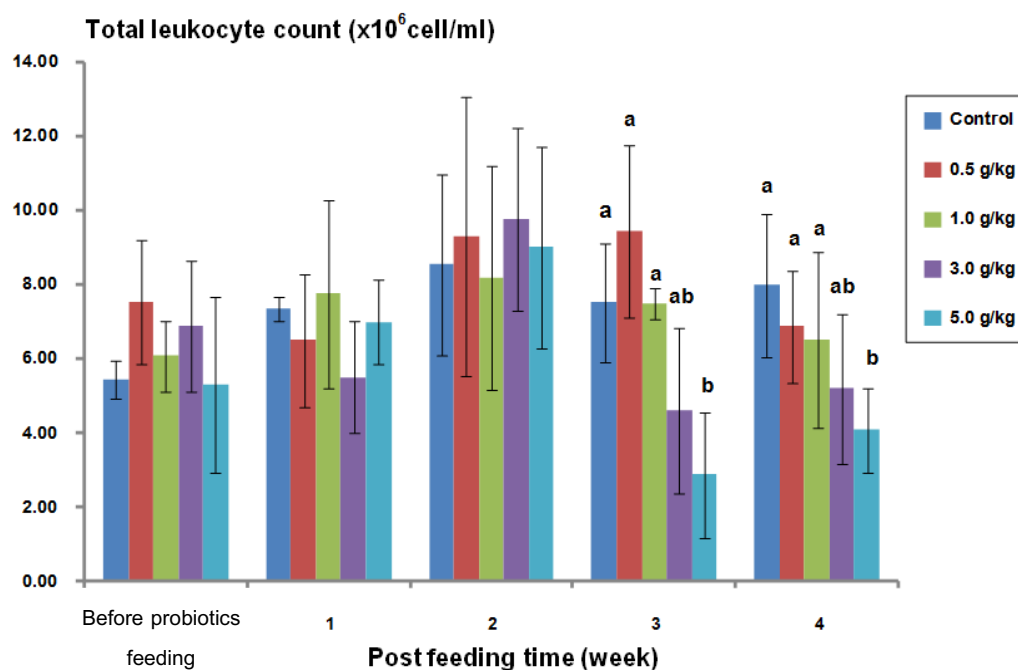
แบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับแท่ง

กราฟที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นของ O_2^- จะมีค่าลดลงและให้ผลคล้ายกันในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 โดยในสัปดาห์ที่ 4 นั้นพบว่า ปลาในลที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในทุกระดับ ตั้งแต่ 0.5-5.0 g/kg มีค่า O_2^- เป็น 0.027 ± 0.005 , 0.027 ± 0.002 , 0.041 ± 0.007 และ 0.036 ± 0.004 ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเป็น 0.0175 ± 0.004 ซึ่งพบว่าเฉพาะปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1.0-5.0 เท่านั้นที่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 7)

5.2.3 ปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด Total Leukocyte Count (TLC)

การวัดปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยทั่วไปแล้ว สามารถใช้เป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงสภาพภูมิคุ้มกันของปลาได้ ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ภายหลังจากปลาได้รับอาหารทดลองไปแล้ว 2 สัปดาห์ ปริมาณเม็ดเลือดขาวรวมทั้งหมดในปลาแต่ละกลุ่ม มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 5.0 g/kg diet มีปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมดลดลงแตกต่างกับปลาในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังคงมีแนวโน้มในการแสดงออกคล้าย ๆ กันเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่สัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 8)

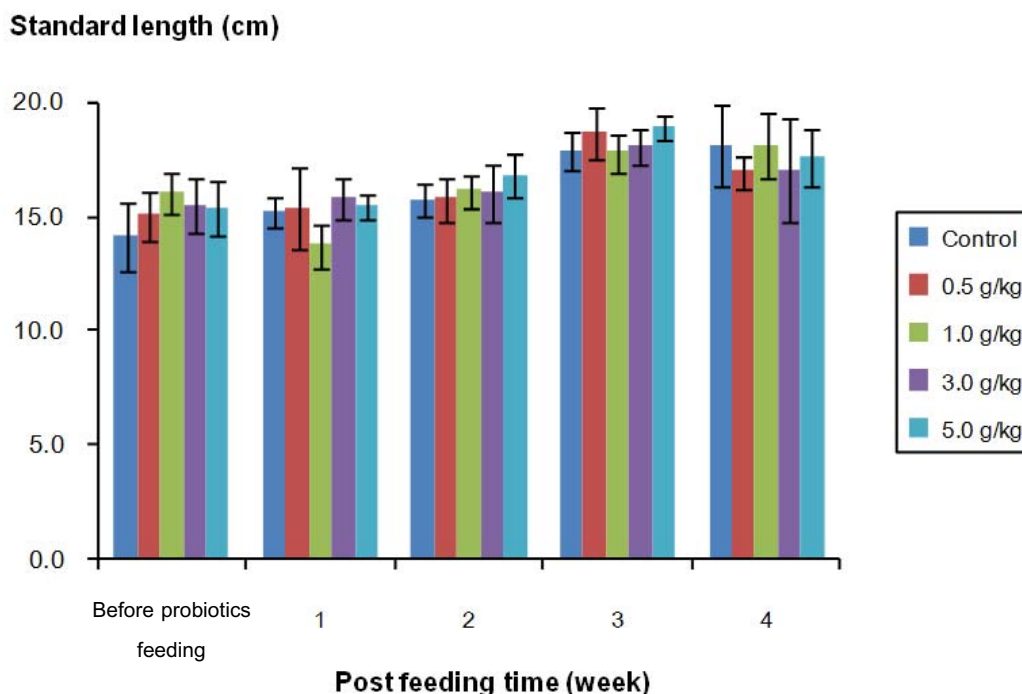


ภาพที่ 8 ปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total leukocyte count) ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พยาธิษฐานภาษาอังกฤษกำกับแท่งกราฟที่ต่างกัน ในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

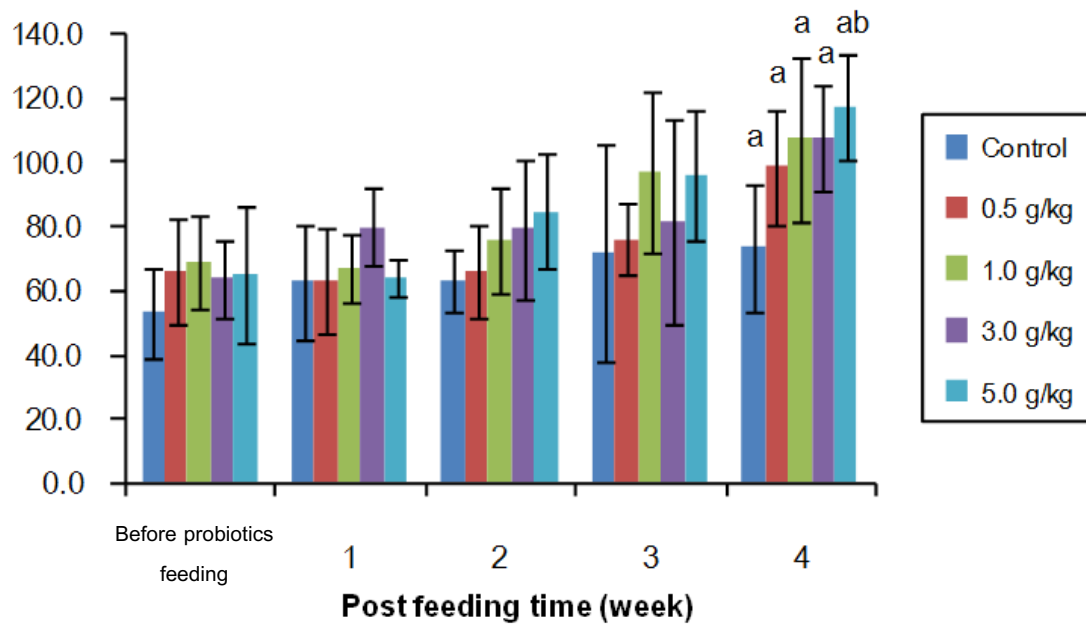
5.3 ผลของการผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากการศึกษาความปลอดภัยและผลต่อระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการประยุกต์ใช้ แบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ผสมในอาหารปลานิลแล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังทำการตรวจสอบผลของการผสมแบคทีเรียในอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลานิล ซึ่งได้ทำการวัดน้ำหนักความยาวลำตัวมาตรฐาน (Standard length) และอัตราส่วนระหว่างความยาวของลำไส้และน้ำหนัก

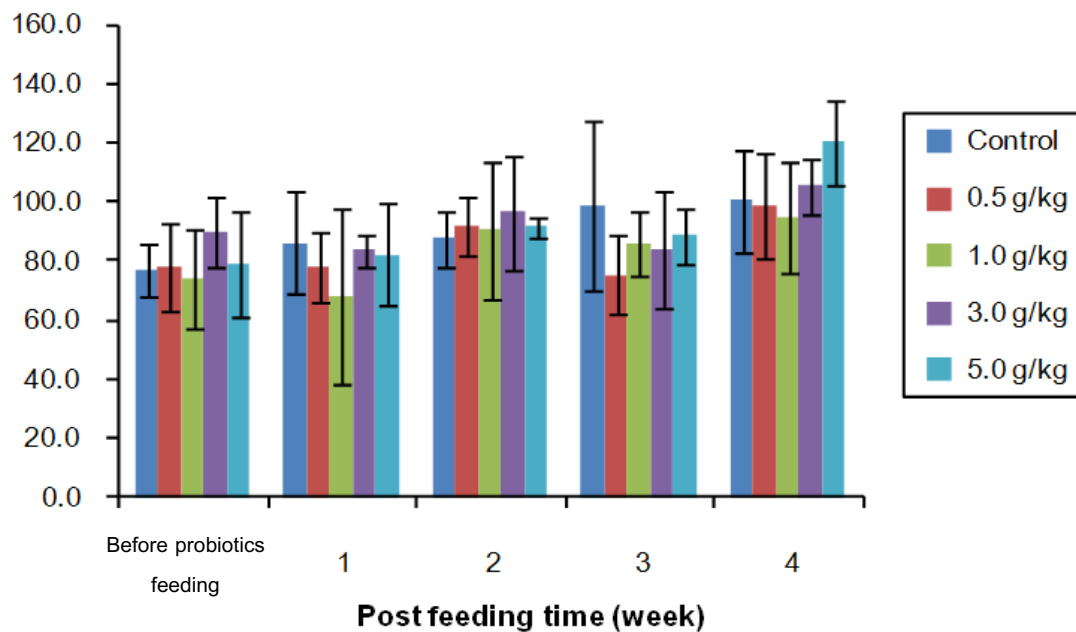
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าตลอดระยะเวลา 30 วัน ที่ได้รับอาหารทดลองนั้น ปลาทุกกลุ่มจะมีความยาวลำตัวมาตรฐาน ความยาวลำไส้ และอัตราส่วนระหว่างความยาวลำตัวมาตรฐานและลำไส้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงเวลา ขณะที่น้ำหนักของปลานั้น พบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารมีแนวโน้มที่จะแตกต่างกับกลุ่มอื่นในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง (ภาพที่ 9, 10 และ 11 ตามลำดับ)



ภาพที่ 9 ความยาวมาตรฐานของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับแท่ง กราฟที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

Body weight (g)

ภาพที่ 10 น้ำหนักของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็นเวลา 4 สัปดาห์วัน พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับแท่ง กราฟที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

Intestine length (cm)

ภาพที่ 11 ความยาวลำไส้ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* เป็นเวลา 4 สัปดาห์

หมายเหตุ: ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

5.4 การตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียระหว่างการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ทั้งหมด (Total bacterial count; TBC) และจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อการใช้เทคนิค Heat-cold shock เพื่อตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* อย่างคร่าว ๆ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้จะมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนเช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การได้รับอุณหภูมิสูง

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในรูป Logarithm (Log number) ในลำไส้ของปลานิล ที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Treatment	Log number of bacteria/gram intestine (Log Number/g)				
	Before probiotics feeding	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Control	5.48±0.68a	6.37±0.97a	6.43±0.30a	6.47±0.97a	6.36±0.48
0.5 g/kg	4.44±1.72a	6.72±0.42a	7.53±0.54ab	7.31±0.56a	6.57±0.47
1.0 g/kg	5.18±1.16a	7.07±0.35a	8.18±0.77b	7.35±0.86ab	>10*
3.0 g/kg	6.46±0.23a	5.80±0.97a	7.42±0.49ab	8.34±1.23b	>10*
5.0 g/kg	5.41±0.77a	5.72±1.57a	8.17±1.20b	8.39±0.37b	>10*

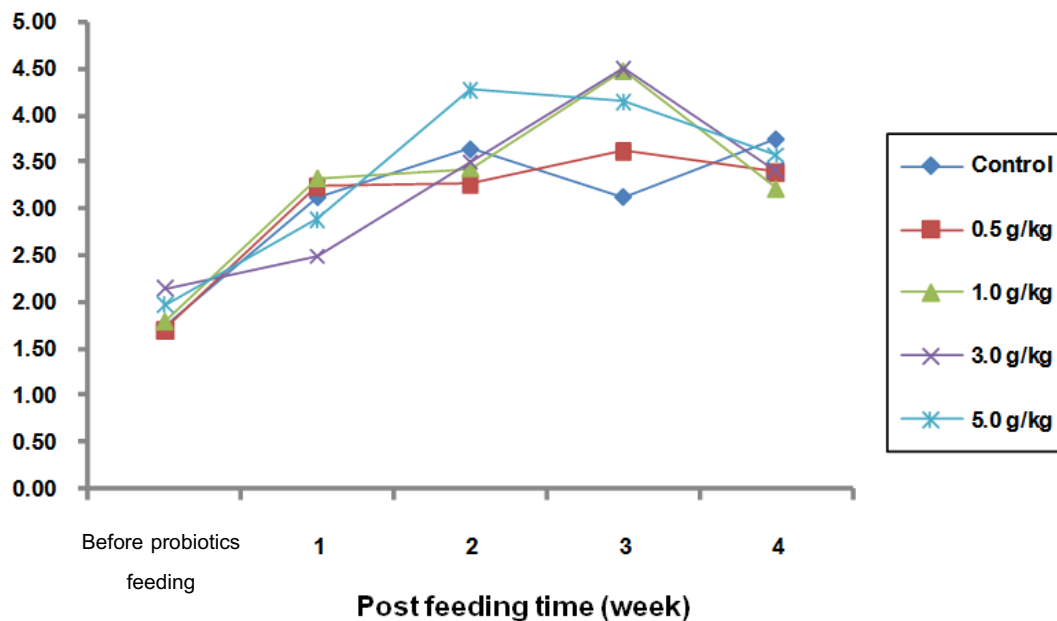
หมายเหตุ : พยัญชนะภาษาอังกฤษกำกับตัวเลขที่ต่างกันในแต่ละสัปดาห์ในคอลัมน์ แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$), *; แบคทีเรียมากจนไม่สามารถนับจำนวนได้

จากการสังเกตพบว่าในช่วงเริ่มการทดลอง จำนวน TBC ที่พบในลำไส้ของปลามีค่า Log Number อยู่ ระหว่าง 4.44-6.46/g ของลำไส้ และมีแนวโน้มคงที่ในช่วง 1 สัปดาห์แรกของการทดลอง แต่เมื่อปลาได้รับอาหารทดลองไปแล้วเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอาหารระดับ 1.0 และ 5.0 g/kg diet มีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีจำนวนแบคทีเรียเป็น 8.18 และ 8.17 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ของการทดลองนั้น ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับตั้งแต่ 1.0-5.0 g/kg diet จะมีแนวโน้มของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้สูงกว่ากลุ่มปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 g/kg diet และกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัปดาห์ที่ 4 นั้น ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1.0-5.0 g/kg diet จะมีจำนวน Log ของแบคทีเรียสูงเกิน 10/g ลำไส้ ขณะที่ปลา

กลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5 g/kg diet และกลุ่มควบคุม จะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วงระหว่าง 6.36-6.57/g ลำไส้ เท่านั้น (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้จากการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียด้วยเทคนิค Heat-cold shock พบว่า ก่อนการทดลองนั้นปลาทุกกลุ่มนั้นมี จำนวน Log ของแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้อยู่ในช่วง 1.71-2.15/g ลำไส้ ในจำนวนนี้พบว่าบางส่วนนั้น เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ แต่มีลักษณะของโคโลนีต่างกับแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองอย่างชัดเจนเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

Log number of bacteria/g intestine



ภาพที่ 12 จำนวนแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (รายงานเป็น Log number bacteria/g ลำไส้)

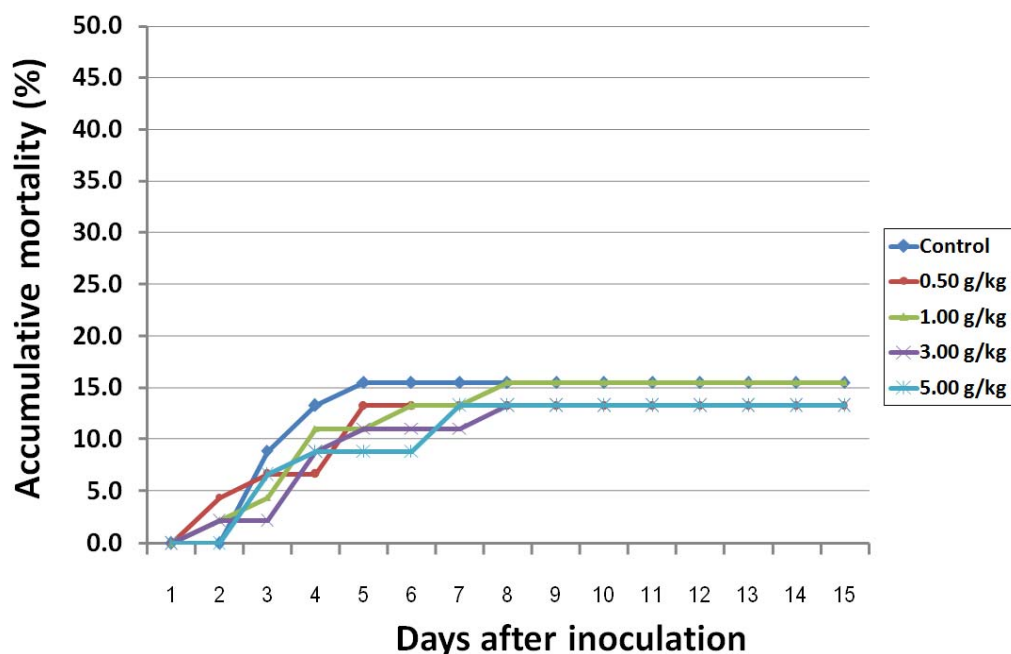
ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ภายหลังจากการได้รับอาหารทดลองแล้ว จำนวนแบคทีเรียในลำไส้ของปลาทุกกลุ่มมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในสัปดาห์ที่ 1 และคงที่ในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีจำนวนของแบคทีเรียที่ทดสอบด้วยเทคนิค Heat-cold shock ไม่แตกต่างกันยกเว้น ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 เท่านั้น ที่สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเป็น 4.28 ขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5-3.0 g/kg diet จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3.27-3.64 และที่สัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1.0, 3.0 และ 5.0 g/kg diet มีค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียอยู่ในระดับใกล้เคียงกันคือมีค่าเท่ากับ 4.48, 4.51 และ 4.14 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5 g/kg diet และกลุ่มควบคุม โดยมีค่าเป็น 3.13 และ 3.62 อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการทดลอง Log จำนวนแบคทีเรีย ในปลาทุกกลุ่มนั้นมีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง

3.21-3.75 ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อเริ่มการทดลองในทุก ๆ กลุ่ม (ภาพที่ 12) นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า เป็นชนิดเดียวกับแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ที่ใส่ลงไปให้อาหาร

5.5 การศึกษา ผลของการใช้ เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ AQBS01 ต่อการต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิลในห้องปฏิบัติการ

5.5.1 การทดสอบความต้านทานโรคโดยการแช่ปลาทดลองด้วยเชื้อ *S. agalactiae*

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อทำการเติมเชื้อ *S. agalactiae* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 CFU/ml ในทุกตู้ทดลอง ปลาทดลองในทุกกลุ่มจะเริ่มแสดงการตายในช่วงวันที่ 2-4 และอัตราการตายจะเริ่มคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดของการทดลอง เมื่อนำปลาที่มีแสดงอาการของโรคไปตรวจสอบการติดเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อจากตับและม้ามของปลา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA พบว่าปลาที่แสดงอาการผิดปกติเหล่านั้นมีเชื้อ *S. agalactiae* เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงอัตราการตายที่เกิดขึ้นเป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการตายของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีอัตราการตายค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 10-15% เท่านั้น และยังพบว่าอัตราการตายของปลาในทุกกลุ่มภายหลังจากการเติมเชื้อ *S. agalactiae* ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 15 วัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในอาหาร ภายหลังได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่

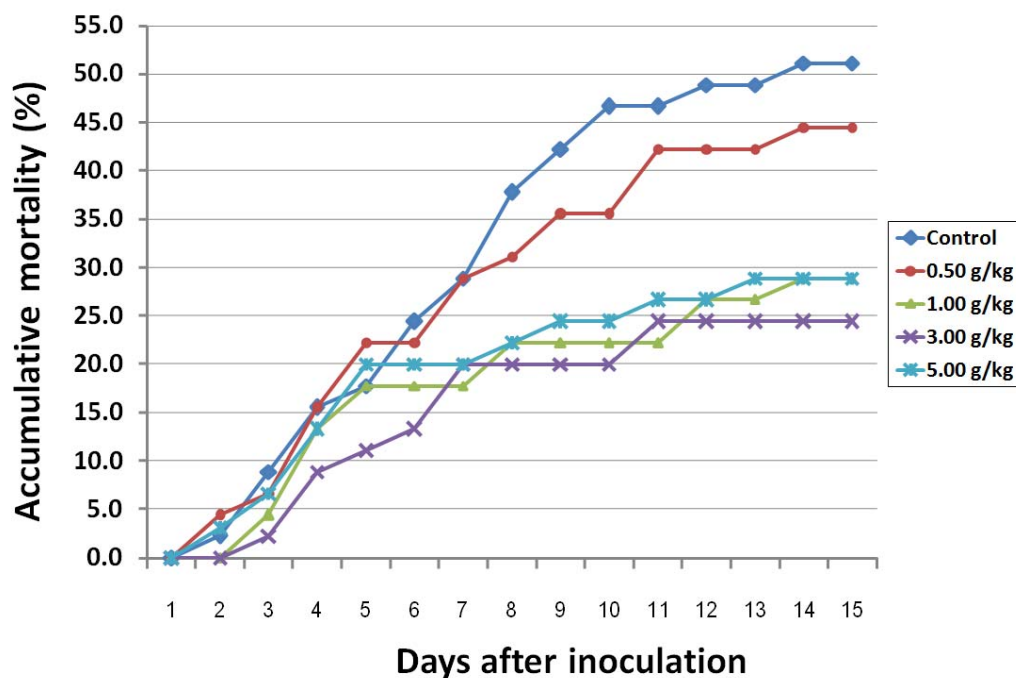
5.5.2 การทดสอบความต้านทานโรคโดยการฉีดเข้าช่องท้อง

ทำการทดลองโดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 5.1 โดยเมื่อเลี้ยงปลาจนครบ 1 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานโรค **Streptococcosis** ของปลาในแต่ละกลุ่ม โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง โดยการฉีดสารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในทุก ๆ ตัว ของแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งจะทำให้ปลาทุกตัวจะได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 CFU/มิลลิลิตร เท่ากัน ทำการเลี้ยงปลาในสภาพดังกล่าวและให้อาหารทดลองต่อไป เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการของปลาและบันทึกอัตราการตายสะสมทุก ๆ วัน หากปลาแสดงอาการของโรคและใกล้ตายให้นำปลามาแยกเชื้อโดยใช้เข็มเย็บที่ดับในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อเป็นการยืนยันผล

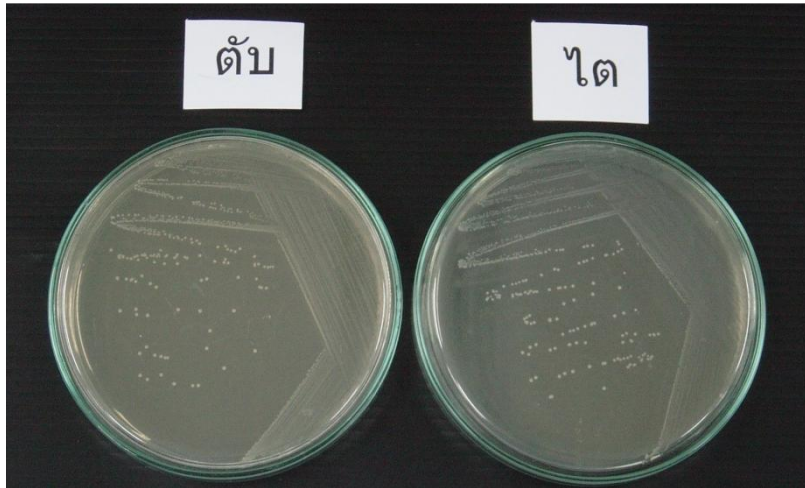
ผลการศึกษาพบว่า เมื่อทำการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* เข้าช่องท้องในปลาทุกตัวของทุกกลุ่มให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 CFU/ml ในทุกชุดทดลอง พบว่าปลาทดลองในทุกกลุ่มจะเริ่มแสดงการตายในช่วงวันที่ 2 ยกเว้นปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร ในอัตรา 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และอัตราการตายจะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3-5 อย่างไรก็ตาม ก็พบว่าปลาทดลองในทุกกลุ่มมีอัตราการตายสะสมภายหลังการได้รับการฉีดเชื้อไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 14)

เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงวันที่ 5-6 ปลาทดลองในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียในอัตรา 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเท่านั้น ที่แสดงอัตราการตายต่ำกว่าปลาในกลุ่มอื่น ๆ โดยมีอัตราการตายสะสมในวันที่ 6 เป็น $13.33 \pm 3.43\%$ ขณะที่ปลาในกลุ่มควบคุมและปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5, 1.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมเป็น 24.44 ± 3.85 , 22.22 ± 7.70 , 17.78 ± 3.85 และ $20.00 \pm 6.67\%$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเข้าสู่วันที่ 8 ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น 22.22 ± 3.85 , 20.00 ± 6.67 , $22.22 \pm 10.18\%$ ขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 37.78 ± 6.67 และ $31.11 \pm 10.18\%$ ตามลำดับ และยังพบว่าปลาในกลุ่มควบคุมและปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ในช่วงวันที่ 9 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงวันที่ 10-11 ในระดับประมาณ 25% และยังมีอัตราการตายสะสมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

เพื่อเป็นการยืนยันผลของการตายของปลาที่เกิดขึ้น ระหว่างทำการทดลองเมื่อนำปลาที่มีแสดงอาการของโรคไปตรวจสอบการติดเชื้อโดยการดูจากลักษณะภายนอกพบว่าปลาที่แสดงอาการผิดปกติจะมีครีบหูและครีบหางกร่อนตกลือด ในระยะเริ่มแรกจะเห็นเป็นสีคล้ำอย่างชัดเจนและไม่กินอาหาร บางตัวแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงโดยการเสียสมดุลการทรงตัวและว่ายน้ำผิดปกติอย่างชัดเจน แต่ก็ไม่พบว่าปลามีอาการตาโปนเหมือนกับที่พบในการเกิดโรคในสภาพการเลี้ยงทั่วไป ยกเว้นช่วงท้ายๆ ของการทดลองประมาณวันที่ 7-10 ปลาบางตัวจะแสดงอาการตาขุ่นหรือตาโปนให้เห็นอย่างชัดเจนและเมื่อนำปลาเหล่านี้ไปทำการเขี่ยเชื้อจากตับและไตของปลา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA พบว่าปลาที่แสดงอาการผิดปกติเหล่านั้น มีเชื้อ *S. agalactiae* เกิดขึ้นอย่างชัดเจน โดยสังเกตได้จากลักษณะของโคโลนีที่มีสีขาวขนาดเล็กและผลจากการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep (ภาพที่ 15 และ 16 ตามลำดับ)



ภาพที่ 14 อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในอาหาร ภายหลังได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง



ภาพที่ 15 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาทดลองที่แสดงอาการป่วยภายหลังจากการได้รับเชื้อ *S. agalactiae*



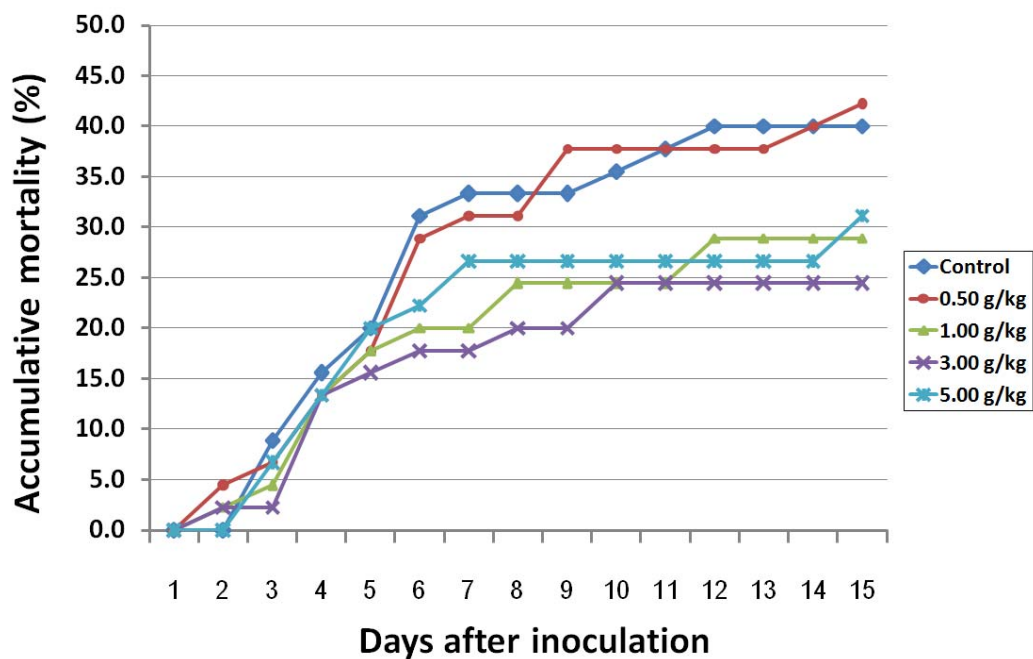
ภาพที่ 16 คุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาทดลองที่แสดงอาการป่วยภายหลังจากการได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 Strep

5.5.3 การทดสอบความต้านทานโรคโดยการกิน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยเมื่อเลี้ยงปลาจนครบ 1 เดือน ทำการทดสอบความต้านทานโรค **Streptococcosis** ของปลาในแต่ละกลุ่ม โดยการกิน โดยการเตรียมสารละลายแบคทีเรีย *S. agalactiae* ความเข้มข้น 2.5×10^7 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ใน Gelatin capsule แล้วจึงทำการป้อนเข้าไปในปากโดยใช้หลอดแก้วใส่ฟันเข้าไปเพื่อให้แน่ใจว่า Capsule ของเชื้อได้เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารอย่างสมบูรณ์ โดยทำการป้อนในทุก ๆ ตัว ของแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งจะทำให้ปลาทุกตัวจะได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 CFU เช่นเดียวกับปริมาณที่ใช้ในการทดสอบด้วยการฉีด ทำการเลี้ยงปลาในสภาพดังกล่าวและให้อาหารทดลองต่อไป เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการของปลาและบันทึกอัตราการตายสะสมทุก ๆ วัน หากปลาแสดงอาการของโรคและใกล้ตายให้นำปลามาแยกเชื้อโดยการใช้น้ำแช่แช่ที่ดับในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เพื่อเป็นการยืนยันผล

ผลการศึกษาในการทดลองในส่วนนี้ให้ผลมีแนวโน้มคล้ายกับการทดสอบด้วยการฉีด เนื่องจากพบว่า เมื่อทำการให้เชื้อ *S. agalactiae* เข้าทางระบบทางเดินอาหารในปลาทุกตัวของทุกกลุ่ม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 CFU ในทุกตู้ทดลอง พบว่าปลาทดลองในทุกกลุ่มจะเริ่มแสดงการตายในช่วงวันที่ 2 และอัตราการตายจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3-5 ของการทดลอง โดยพบว่าในช่วงดังกล่าวปลาทุกกลุ่มจะมีอัตราการตายสะสมที่ใกล้เคียงกันและแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยอัตราการตายสะสมที่สังเกตพบมีค่าอยู่ระหว่าง 15-20% เท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อทำการสังเกตอัตราการตายสะสมของปลาทดลองในวันที่ 6 พบว่า ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 1-5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมเป็น 31.11 ± 3.85 ขณะที่กลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารมีค่าเป็น 28.89 ± 10.18 , 20.00 ± 6.67 , 17.78 ± 7.70 และ $22.22 \pm 7.70\%$ ตามลำดับ และยังพบว่าอัตราการตายของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับ แบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 1-5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างชัดเจน ที่พบว่าอัตราการตายของปลาในกลุ่มนี้จะเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในวันที่ 8 ของการทดลอง และมีแนวโน้มของการตายคงที่ตั้งแต่วันที่ 9 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาในกลุ่มแรก ($P < 0.05$) ตลอดช่วงเวลา ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วเห็นว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาในกลุ่มนี้ จะมีอัตราการตายสะสมเพียง 28.89 ± 0.0 , 28.44 ± 3.85 และ $31.11 \pm 3.85\%$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมและปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีอัตราการตายสูงถึง 40.00 ± 2.34 และ $42.22 \pm 3.85\%$ ตามลำดับ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 17)

เช่นเดียวกับการทดลองในข้างต้น เพื่อเป็นการยืนยันผลของการตายของปลาที่เกิดขึ้น ระหว่างทำการทดลองเมื่อนำปลาที่แสดงอาการของโรคไปตรวจสอบการติดเชื้อโดยการดูจากลักษณะภายนอกพบว่าปลาที่แสดงอาการผิดปกติจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับการทดลองโดยการฉีดเชื้อ เช่น ในระยะเริ่มแรกจะเห็นเป็นสีแดงอย่างชัดเจนและไม่กินอาหาร บางตัวจะมีครีบหูและครีบก้นหงิกงอและหลุด บางตัวแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงโดยการเสียสมดุลการทรงตัวและว่ายน้ำผิดปกติที่พื้นตู้ทดลองอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ยังพบว่าปลาบางตัวมีอาการตาโปนเหมือนกับที่พบในการเกิดโรคในสภาพการเลี้ยงทั่วไปอย่างชัดเจนและที่สำคัญคือปลาที่ป่วยจากการทดลองนี้ จะเห็นรอยโรคที่มีลักษณะเป็นเนื้อตาย เกล็ดหลุดเป็นวงกว้าง โดยเฉพาะบริเวณด้านท้อง เมื่อทำการผ่าดูภายในพบว่ามีน้ำสีเหลืองปนแดงทะลักออกมาเป็นจำนวนมาก และเมื่อนำปลาเหล่านี้ ไปทำการเขี่ยเชื้อจากตับและไตของปลา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA พบว่าปลาที่แสดงอาการผิดปกติเหล่านั้น มีเชื้อ *S. agalactiae* เกิดขึ้นอย่างชัดเจน โดยสังเกตได้จากลักษณะของโคโลนีที่มีสีขาวขนาดเล็กและผลจากการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 Strep ก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดลอง โดยการฉีดเชื้อ

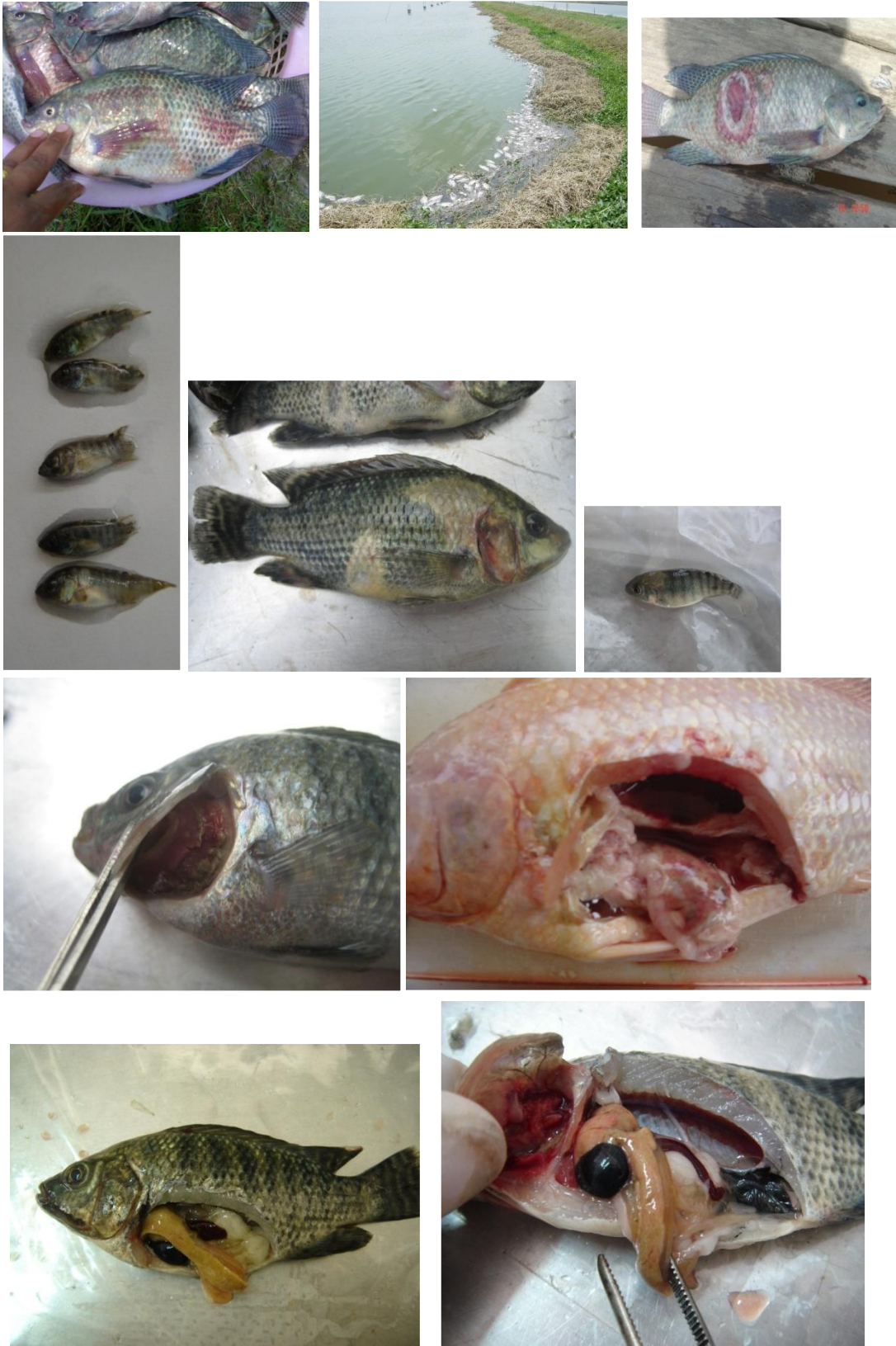


ภาพที่ 17 อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* ในอาหาร
ภายหลังได้รับเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการกิน Gelatin capsule ที่บรรจุเชื้อความเข้มข้น
 5×10^6 CFU

5.6 การศึกษาประสิทธิภาพของ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ต่อปลาไนล์ ที่เลี้ยงในกระชังบริเวณที่มีการระบาดของโรค Streptococcosis

การทดลองนี้จะเป็นการประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในสภาพการเลี้ยงจริง โดยในเบื้องต้นได้วางแผนจะใช้พื้นที่อำเภอเมืองจังหวัดชัยนาท ซึ่งพบว่ามี การระบาดของโรค Streptococcosis บ่อยครั้ง โดยจะเริ่มทำการทดลองในช่วงต้นเดือน มีนาคม และจะเลี้ยงปลาต่อไปอีก 4 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่จับขาย โดยในสภาพการเลี้ยงจริงจะพบว่าในช่วงเดือน เมษายน ถึง เดือนกรกฎาคม ของทุกปีจะเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรคมากที่สุด อย่างไรก็ตามในช่วงปี 2551 ที่ผ่านมากเกษตรกรในพื้นที่ดังกล่าว รวมทั้งเกษตรกรในพื้นที่การเลี้ยงอื่นทั่วประเทศ ได้ประสบปัญหาการตายอย่างหนักของ ปลาในกระชังรวมทั้งพื้นที่การเลี้ยงในบ่อดินที่ใช้ น้ำจากแหล่ง น้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ลำคลอง ที่ได้สร้างความเสียหายตลอดทั้งปีต่อเนื่องมาถึงปัจจุบัน ซึ่งจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าปลาที่ป่วยจะมี ขนาดตั้งแต่ปลายนิ้วจนขนาดโตมาขนาดไปจนถึงขนาดจับขาย สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งกับปลาไนล์ดำและ ปลาไนล์ทึบดำ แต่ที่สร้างความเสียหายมากที่สุดจะอยู่ในช่วงอายุของปลา 2-4 เดือน หรือมีขนาดปลา ประมาณ 300-800 กรัม โดยลักษณะของปลาที่ป่วยจะพบว่ามียอยต่างเป็นปื้นขาว เกล็ดหลุดร่วงเป็น ดวงขนาดตั้งแต่ 1-3 นิ้ว บริเวณลำตัว ครีบหูและครีบหลังกร่อนและตกลีบ (ภาพที่ 18) ปลาจะลอย ตายเป็นจำนวนมากในช่วงสายของวัน อัตราความเสียหายโดยประเมินจากการตายของปลาจะพบตั้งแต่ 30-90% เกษตรกรในพื้นที่ส่วนใหญ่พยายามแก้ไขโดยการใช้อาหารชีวและสารเคมี แต่ก็ไม่สามารถลด ความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ ทำให้เกษตรกรต้องขาดทุนเป็นจำนวนมาก นอกเหนือจากการเกิดโรค ดังกล่าวแล้วในช่วงปีที่ผ่านมา เกษตรกรยังต้องประสบปัญหาต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น โดยเฉพาะอาหาร ซึ่ง พบว่าในปี 2551 ราคาอาหารได้ขยับตัวสูงขึ้นถึง 20-30% โดยพบว่ามี การปรับราคาถึง 5 ครั้ง ซึ่งเป็น ส่วนที่ซ้ำเติมเกษตรกรอย่างมาก ส่งผลให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาต้องเลิกเลี้ยงเป็นจำนวนมาก

นอกจากนี้ยังจากข้อมูลสำรวจและการตรวจวินิจฉัยทั้งภาคสนามและห้องปฏิบัติการ พบว่าปลา ที่ป่วยสามารถตรวจพบปรสิตภายนอกเช่น ปลิงใส (*Monogene*) เห็บระฆัง (*Trichodina*) หรือบางครั้งจะ พบเห็บปลาจำพวก Isopod รวมทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Flavobacterium* เคลื่อนที่ไปมาอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อตรวจสอบอวัยวะภายในจะพบว่าตับมีสีซีดกว่าปกติ ถุงน้ำดีมีขนาดบวมใหญ่และมีสี เข้ม ทางเดิน อาหารโดยเฉพาะลำไส้ไม่มีอาหารอยู่และมีการอักเสบอย่างรุนแรง เหงือกอักเสบและเซลล์เหงือกตาย เป็นหย่อม ๆ ผลจากการแยกเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในห้อง ปฏิบัติการ สามารถพบเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *Aeromonas hydrophilla*, *A. sorbea*, *S. agalactiae* และรวมทั้งเชื้อ *Flavobacterium* ด้วย ผู้วิจัยจึงทดลองเอาเชื้อ *Bacillus* AQBS01 มา ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มดังกล่าวด้วย และได้ผลที่น่าสนใจมาก โดยพบว่า นอกเหนือจากเชื้อ *S. agalactiae* แล้ว แบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 นี้ ยังมีคุณสมบัติและสามารถใน การยับยั้งการเจริญของเชื้อที่แยกได้อย่างมีประสิทธิภาพในระดับที่แตกต่างกัน โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophilla* และ *A. sorbea*, ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อ *S. agalactiae* และ *Flavobacterium* ตามลำดับ



ภาพที่ 18 ลักษณะการตายของปลานิลที่เกิดโรครระบาดในปี 2551

ด้วยสาเหตุการตายอย่างหนักดังกล่าวทำให้ผลผลิตของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดชัยนาทเสียหายและขาดทุนอย่างต่อเนื่อง จนไม่สามารถเข้าร่วมโครงการได้ ผู้วิจัยจึงทำการออกสำรวจและเลือกเกษตรกรผู้เข้าร่วมโครงการอีกครั้ง โดยสามารถเลือกเกษตรกรผู้เข้าร่วมโครงการใหม่ได้ในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี ในพื้นที่อำเภอเดิมบางนางบวช คือ นายเฉลิมพล มะยมตัน อยู่บ้านเลขที่ 50/2 หมู่ 6 ตำบลนางบวช ซึ่งเป็นเกษตรกรที่มีประสบการณ์การเลี้ยงปลานิลในกระชังมากกว่า 10 ปี และประสบปัญหาการตายของปลานิลอันมีสาเหตุมาจากโรค Streptococcosis มาอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งโรคระบาดที่เกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2551 ด้วยเช่นกัน โดยพื้นที่ของฟาร์มตั้งอยู่บนแม่น้ำท่าจีน ในพื้นที่ของตำบลนางบวช อำเภอเดิมบางนางบวช โดยมีพิกัดของฟาร์มคือ **N 14°49'.575 E 100°06'.591 (ภาพที่ 19)**

ในการทดลองครั้งนี้ได้ ทำการเริ่มเลี้ยงปลานิลขนาด 50 กรัม/ตัว ในช่วงต้นเดือน กุมภาพันธ์ จำนวน 620 ตัว/กระชัง ในกระชังขนาด 3x3x2 เมตร จำนวน 12 กระชังและปรับสภาพของปลาให้เข้ากับสภาพของแหล่งเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วทำการเตรียมอาหารทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1 และทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง (treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ให้อาหารทดลองวันละ 2 มื้อ ในช่วง 9.00 น. และ 16.00 น. โดยแบ่งให้ตามการวางแผนการทดลองดังต่อไปนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารปกติ (กลุ่มควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus AQBS01* 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

โดยก่อนการทดลองผู้วิจัยได้แนะนำรายละเอียด ตลอดจนวิธีการเตรียมและการให้อาหารแก่เกษตรกรผู้ร่วมโครงการวิจัยทราบ (ภาพที่ 20)

ทำการให้อาหารทดลองไปจนครบ 4 เดือน ระหว่างนี้ทำการบันทึกอัตราการตายสะสมและทำการสุ่มปลามาชั่งน้ำหนักและความยาวทุก ๆ เดือน และเมื่อปลาเกิดการตายให้นำมาตรวจวินิจฉัยโดยนำตับ ม้ามและไต ไปเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และเมื่อมีเชื้อขึ้น นำเชื้อที่ได้ไปย้อมสีแกรมและจำแนกชนิดด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป ระหว่างการเลี้ยงจะไม่มีการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะโดยเด็ดขาด และทำการวัดพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับปลา ซึ่งได้แก่

- ความยาว
- น้ำหนัก
- อัตราเจริญเติบโต
- อัตราการตายสะสม
- ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* ในทางเดินอาหารในส่วนของลำไส้ ทั้ง Total bacterial count และ

Heat shock count

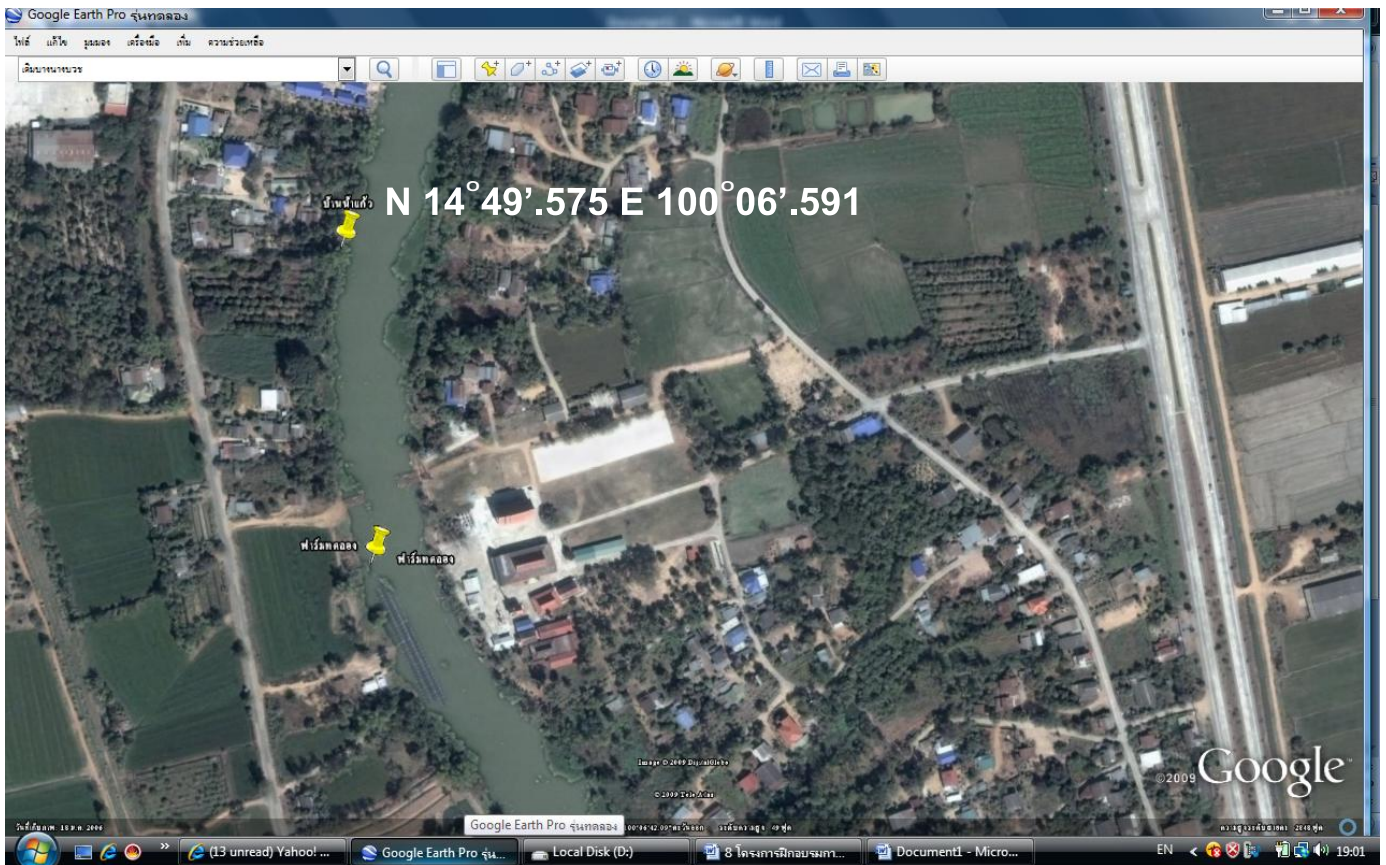
- ความยาวลำไส้และเก็บเนื้อเยื่อไปศึกษา Histology

รวมทั้งการวัดคุณภาพน้ำ (ภาพที่ 21) เช่น

- ออกซิเจนละลาย
- ความเป็นด่าง
- ความเป็นกรด-ด่าง
- แอมโมเนีย
- ไนไตรท์
- ค่าความโปร่งแสง
- ค่าความนำไฟฟ้า

เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาประกอบการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยจะทำการเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 15 วัน (ทุก 2 สัปดาห์) ระหว่างการเลี้ยงและหากพบว่าการป่วยหรือปลาแสดงความผิดปกติหรือตาย จะทำการแยกเชื้อจากตัวปลาเพื่อการตรวจวินิจฉัย และเก็บเนื้อเยื่อส่วนตับ ม้าม ไตและสมองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ โดยใช้เทคนิคทางอนุพยาธิวิทยาด้วยวิธีมาตรฐาน

(5) การทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของน้ำหนัก ความยาวอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* ในทางเดินอาหาร และอัตราการตายสะสมของปลาทดลอง ที่ก่อนการทดลอง และทุก ๆ 2 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้เวลาประมาณ 4 เดือนของการทดลอง ตามการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของดัชนีดังกล่าวของปลาในแต่ละเดือนด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 19 พิกัดของฟาร์มทดลอง บนแม่น้ำท่าจีน ซึ่งตั้งอยู่ในเขตพื้นที่ของตำบลนางบวช อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี



ภาพที่ 20 การเตรียมอาหารทดลองของเกษตรกร

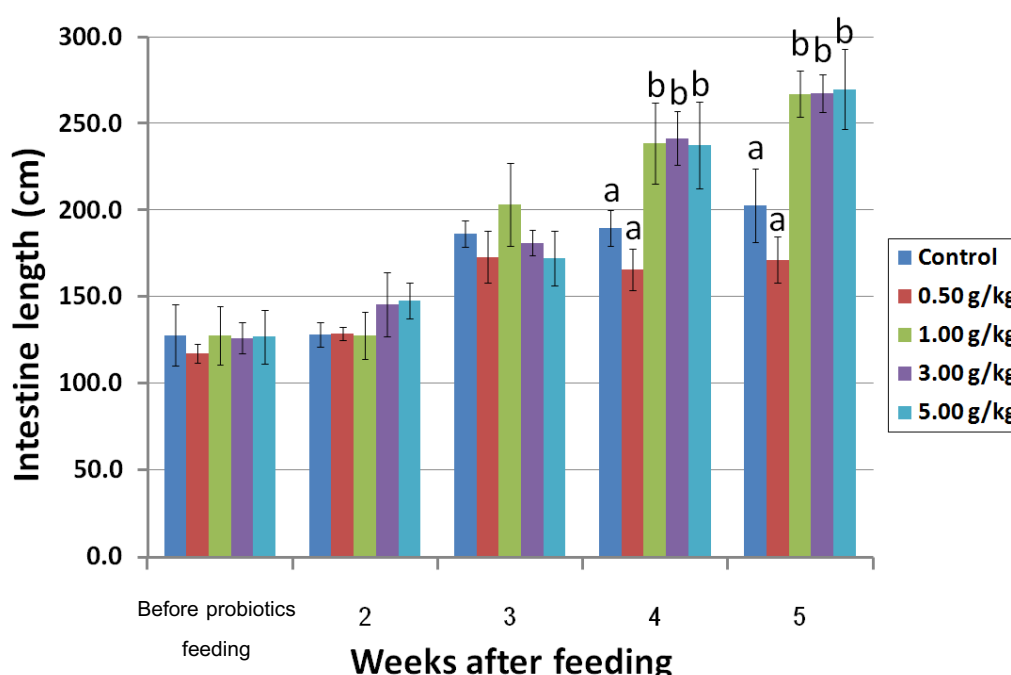


ภาพที่ 21 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์คุณภาพน้ำในฟาร์มทดลอง

ผลการทดลองในส่วนนี้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ดังนี้

5.6.1 ผลการทดลองเบื้องต้น

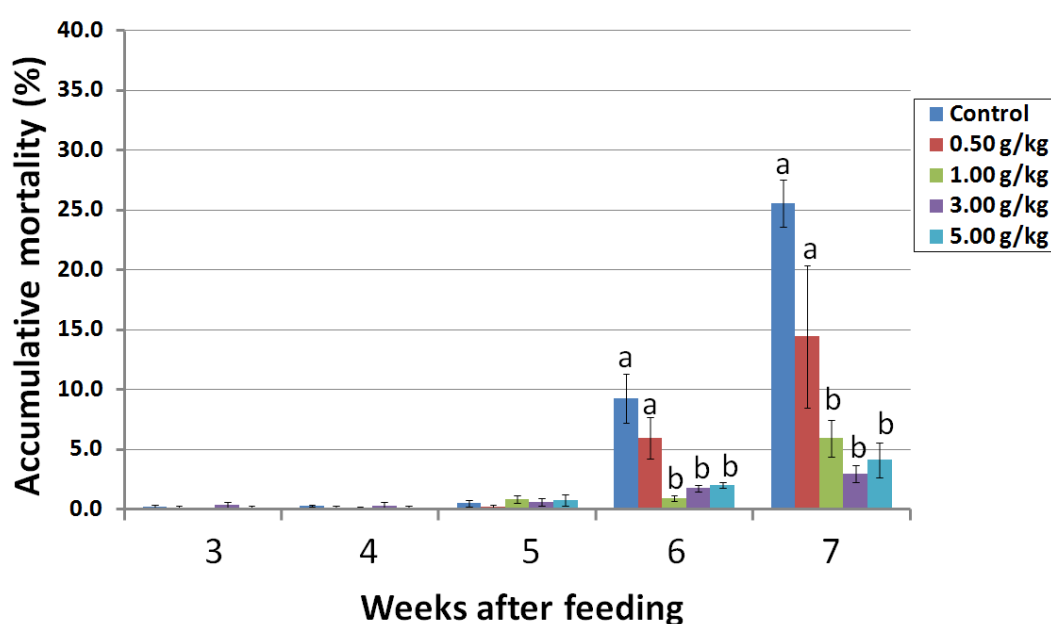
ในช่วงแรกนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้น (Preliminary test) ในพื้นที่จริง เพื่อเป็นเตรียมความพร้อมของทีมงานและเกษตรกรโดย ได้วางแผนให้อาหารปลาทดลอง ซึ่งเกษตรกรเลี้ยงอยู่แล้ว ซึ่งมีอายุประมาณ 2 เดือนครึ่ง โดยอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2551 ซึ่งพบว่ากำลังมีการระบาดของโรคอย่างหนักแต่ในพื้นที่ทำการทดลองยังไม่พบการระบาด เกษตรกรสนใจให้ทีมวิจัยใช้ปลาที่กำลังเลี้ยงอยู่จำนวน 12 กระชัง กระชังละ 620 ตัว ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในการต้านทานโรคที่กำลังเกิดขึ้นจึงวางแผนการทดลองโดยการผสมแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหาร 4 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ร่วมกับกลุ่มควบคุมอีก 1 ชุดการทดลอง โดยในแต่ละกลุ่มจะทำ 3 ซ้ำ ระหว่างนี้จะทำการเก็บข้อมูล น้ำหนัก ความยาว ความยาวลำไส้ คุณภาพน้ำทุก ๆ สัปดาห์ อัตราการตาย ผลการทดลองให้ผลเป็นที่น่าสนใจใน 2 ประการคือ ความยาวลำไส้ของปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความยาวแตกต่างกันกับกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่สัปดาห์ที่ 4 และ 5 ภายหลังการได้รับแบคทีเรียในอาหาร (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ความยาวลำไส้ของปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ อักษรที่แตกต่างกันระหว่างแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

นอกจากนี้ยังพบข้อมูลที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งคือ ในช่วงสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังจากให้อาหารทดลอง ปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เริ่มแสดงอาการป่วยของโรคที่คล้ายกับโรคที่มีการระบาดก่อนหน้านี้ โดยลำตัว ครีบจะขาวเป็นปื้น ตกเลือดตามผิวหนัง เหงือกอักเสบและมีเนื้อเยื่อตายเป็นหย่อม ๆ ขณะที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 1.0-5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเริ่มมีอัตราการตายเช่นกันแต่มีค่าเฉลี่ยของการตายต่ำกว่ากลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ในสัปดาห์ที่ 7 ยังพบว่าปลาในทุก ๆ กลุ่มมีอัตราการตายสูงขึ้น แต่ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 1.0, 3.0 และ 5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังมีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ($P<0.05$) โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น 6.67 ± 3.35 , 2.43 ± 2.52 , $3.41\pm2.26\%$ ตามลำดับ ขณะที่ปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 26.14 ± 3.38 และ $14.05\pm6.45\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 23)

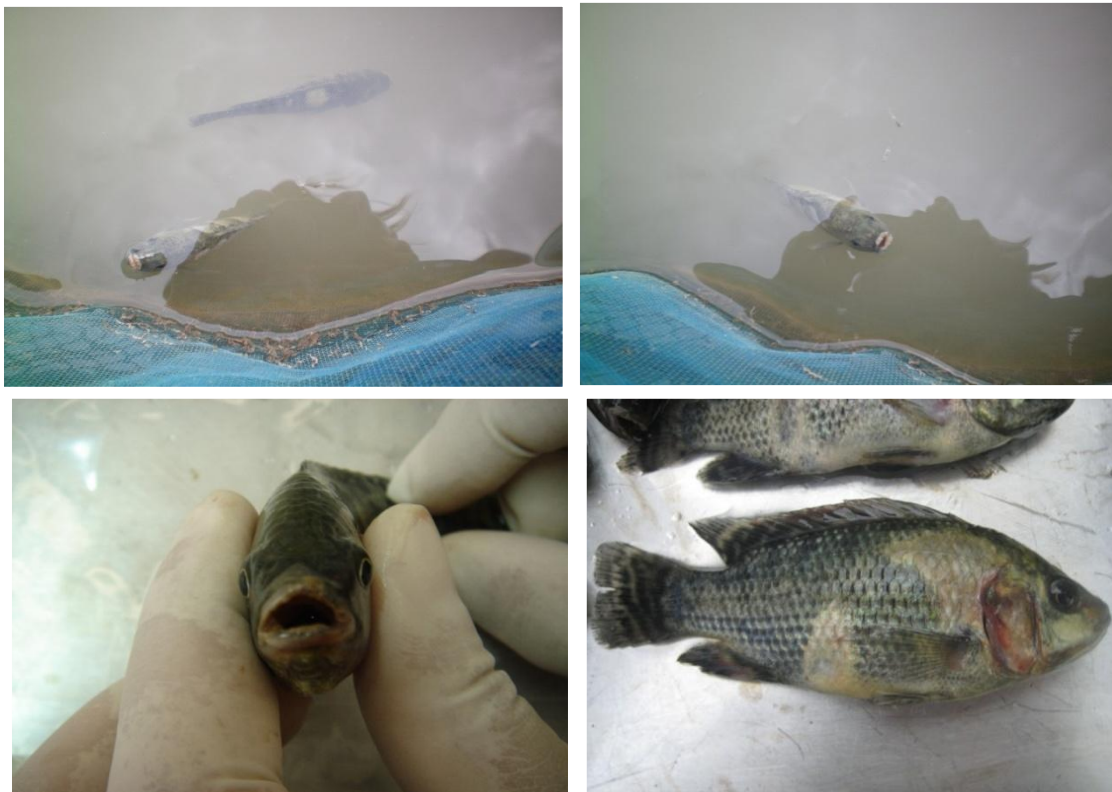
อย่างไรก็ตามจากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเกษตรกรได้ทำการให้ Antibiotics เพื่อใช้ในการรักษาโรคระบาดที่เกิดขึ้น เนื่องจากปลาส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่กำลังจะจับขาย การศึกษาเบื้องต้นของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในการป้องกันโรคจึงต้องยุติลง



ภาพที่ 23 อัตราการตายสะสมของปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน อักษรที่แตกต่างกันระหว่างแท่งกราฟในแต่ละช่วงเวลาแสดงว่ามีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

5.6.2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในสภาพจริง

การศึกษาในส่วนนี้ได้เริ่มการทดลองในช่วงต้นเดือนมกราคม 2552 เกษตรกรได้เตรียมลูกปลาทดลองขนาดประมาณ 50 กรัม ใน 12 กระชัง ๗ ละ 620 ตัว อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังจากที่เกษตรกรปล่อยลูกปลาเพื่อปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยง ลูกปลาในทุกกระชังเริ่มแสดงความผิดปกติของโรค เช่น มีแผลเปื่อยตามลำตัว ปากและครีบเปื่อย และทยอยตายเป็นจำนวนมากประมาณ 30-40% (ภาพที่ 24) ผู้วิจัยและเกษตรกรผู้ร่วมโครงการจึงตัดสินใจหยุดเลี้ยงและทำการพักและเตรียมกระชังใหม่เพื่อเตรียมอนุบาลลูกปลาใหม่อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ลูกปลาชุดใหม่ที่มีขนาดและขนาดใกล้เคียงกับการเตรียมการเลี้ยงในครั้งแรก อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังจากการปล่อยลูกปลาเพียง 2 วัน ลูกปลาทดลองที่นำมาอนุบาลเพื่อปรับสภาพก็เริ่มแสดงอาการป่วยเหมือนกับการเตรียมกระชังในครั้งแรก แต่ความเสียหายจะหนักมากกว่า ซึ่งพบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวปลาของเกษตรกรผู้ร่วมโครงการเอง รวมทั้งปลาของเกษตรกรที่เลี้ยงในพื้นที่อื่นทั่วประเทศประสบปัญหาการตายในลักษณะเดียวกัน ผู้วิจัยจึงตัดสินใจพักและเตรียมกระชังใหม่ให้นานขึ้น แล้วจึงทำการอนุบาลลูกปลาใหม่อีกครั้งในวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2552 ปรับสภาพของลูกปลาประมาณ 2 สัปดาห์ จึงเริ่มให้อาหารทดลอง



ภาพที่ 24 ลักษณะของปลาทดลองที่แสดงความผิดปกติของโรคในระหว่างการเตรียมอนุบาลในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2

เมื่อทำการปรับสภาพปลาทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงแล้วเป็นเวลาประมาณ 10 วัน โดยระยะก่อนเริ่มการทดลองจะให้อาหารปกติ จากนั้นจึงเริ่มให้อาหารทดลองตามแผนการทดลองที่วางไว้ โดยกลุ่มแรกเป็นปลากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหาร และกลุ่มทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับ 0.5, 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (Control, T1, T2 และ T3 ตามลำดับ) โดยจะให้อาหารทดลองในมือเช้าของทุกวัน เท่านั้น หลังจากนั้นจึงเริ่มเก็บข้อมูลทั้งคุณภาพน้ำและปลาทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยทำการเก็บข้อมูลทั้งหมด 8 ครั้ง ที่อายุการเลี้ยงปลาต่าง ๆ ตั้งแต่วันที่ 13 กุมภาพันธ์ (อายุการเลี้ยง 12 วัน), 26 กุมภาพันธ์ (อายุการเลี้ยง 25 วัน), 13 มีนาคม (อายุการเลี้ยง 40 วัน), 27 มีนาคม (อายุการเลี้ยง 54 วัน), 10 เมษายน (อายุการเลี้ยง 68 วัน), 24 เมษายน (อายุการเลี้ยง 82 วัน), 7 พฤษภาคม (อายุการเลี้ยง 95 วัน) และ 22 พฤษภาคม (อายุการเลี้ยง 110 วัน) จนถึงในรอบปัจจุบันได้ทำการทดลองเสร็จสิ้นไปแล้วเมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม 2552 โดยใช้เวลาในการเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2552 จนถึงวันที่ 18 มิถุนายน 2552 ใช้เวลาทั้งสิ้น 137 วัน แต่การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก AQBS01 ผสมในอาหารได้สิ้นสุดลงเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2552 ซึ่งรวมระยะเวลาที่ปลาได้รับแบคทีเรียเท่ากับ 110 วัน ซึ่งเร็วกว่าแผนที่กำหนดไว้ประมาณ 10 วัน เนื่องจากเกษตรกรวางแผนจะขายผลผลิต แต่ในที่สุดก็ไม่สามารถขายได้เนื่องจากความไม่พร้อมของตลาด ทำให้ต้องยืดเวลาการเลี้ยงออกไปอีก นอกจากนี้ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวคุณภาพน้ำที่ไหลผ่านพื้นที่การเลี้ยงในแม่น้ำท่าจีนเริ่มต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า DO และความขุ่นของน้ำที่ลดต่ำลงมากติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้ปลาที่เลี้ยงไม่กินอาหารหรือกินบ้างเป็นบางครั้ง ซึ่งต้องทำให้ต้องยืดระยะเวลาในการขายผลผลิตออกไปถึง 24 วัน ซึ่งพบว่าได้ผลดังนี้

5.6.2.1 การเจริญเติบโต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินอัตราการเจริญเติบโตจาก น้ำหนัก ความยาว อัตราการกินอาหาร อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average Daily Gain: ADG) ของปลาในแต่ละช่วง และยังมีดัชนีประกอบอีก 3 ดัชนีคือ อัตราการกินอาหาร ความยาวของลำไส้และปริมาณแบคทีเรียที่พบในลำไส้ของปลา ซึ่งได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

5.6.2.1.1 น้ำหนักของปลา

ในส่วนของน้ำหนักปลา เมื่อเริ่มต้นทดลองได้ใช้ปลานิลขนาด 50.74 ± 3.31 กรัม ในการเลี้ยงสำหรับทุก ๆ กลุ่ม และภายหลังการทำการสุ่มชั่งน้ำหนักและความยาวของปลาจำนวนอย่างน้อย 20 ตัว ในช่วง เดือนแรก และเมื่ออายุการเลี้ยงของปลาเข้าสู่เดือนที่ 2 ก็จะมีการสุ่มเก็บข้อมูลอย่างน้อย กระทั่ง 10 ตัว ในปลาทดลองในทุก ๆ กลุ่ม พบว่าปลาที่เลี้ยงมีอัตราการเจริญเติบโต อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในช่วงสัปดาห์ที่ 4-6 และมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกัน แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ของการทดลอง ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารทุกกลุ่มมีน้ำหนักต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย แต่ก็ไม่พบว่ามีแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยพบว่าที่ประมาณ 54 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของปลาในทุกกลุ่มจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 340-390 กรัม และยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

จนถึงอายุประมาณ 95 วัน หลังจากนั้น ในวันที่ 110 ของการทดลองอัตราการเพิ่มของน้ำหนักปลาจะเริ่มคงที่โดยปลาตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 712.7 ± 46.3 , 769.1 ± 54.0 , 726.6 ± 40.5 และ 725 ± 16.7 กรัม ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ตลอดระยะเวลาของการทดลองในทุก ๆ ช่วง ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักปลาในแต่ละกลุ่มเลย ($P > 0.05$) (ภาพที่ 25)

5.6.2.1.2 ความยาวของปลา

ในส่วนค่าความยาวของปลาทดลองก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกับน้ำหนัก ซึ่งพบว่ามีค่าความยาวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงระหว่างวันที่ 12 จนถึง วันที่ 82 ซึ่งความยาวจะเริ่มคงที่ อยู่ระหว่าง 23-25 เซนติเมตร และเริ่มคงที่ต่อเนื่องไปถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยที่อายุ 110 วัน ปลาในแต่ละกลุ่มจะมีค่าความยาวเป็น 24.7 ± 0.6 , 24.0 ± 0.5 , 23.7 ± 0.3 และ 24.5 ± 2.0 ตามลำดับโดยปลาในกลุ่มควบคุมจะมีแนวโน้มของความยาวสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่พบความแตกต่างกันของค่าความยาวของปลาในแต่ละกลุ่มเช่นเดียวกันกับน้ำหนักตลอดช่วงการเลี้ยง ($P > 0.05$) (ภาพที่ 26)

5.6.2.1.3 ปริมาณการกินอาหาร

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณอาหารที่ปลากินในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า ในช่วงการเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 25 จนถึงวันที่ 54 (27 มีนาคม) ปลาในทุกกลุ่มทดลองมีอัตราการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเท่า ๆ กัน โดยเมื่อวันที่ 54 ปลาในแต่ละกลุ่มกินอาหารเท่ากันที่ 533.38 กิโลกรัม แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์แรกของเดือนเมษายน อัตราการกินอาหารจะเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิของอากาศและน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นและคงตัวในระดับ ประมาณ $31-32^{\circ}\text{C}$ ก่อปรกับน้ำเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีที่ขุ่นมากขึ้น ซึ่งหลังจากนั้น อัตราการกินอาหารของปลาในแต่ละกลุ่มก็เริ่มแตกต่างกัน แต่ก็ไม่มากนัก นอกจากนี้เมื่อเข้าสู่กลางเดือนปลาก็เริ่มทยอยตายเรื่อย ๆ ข่ายังกินอาหารน้อยลงมาก และคงตัวไปถึงสิ้นสุดการทดลอง ในวันที่ 110 ซึ่งปลาในแต่ละกลุ่มมีอัตราการบริโภคอาหารเฉลี่ยประมาณ 617.31 ± 5.37 , 619.03 ± 2.14 , 618.19 ± 1.77 และ 621 ± 4.95 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใดทุกช่วงการทดลอง ($P > 0.05$) (ภาพที่ 27)

5.6.2.1.4 อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน

จากการสังเกตค่าอัตราการเพิ่มน้ำหนักต่อวันของปลาทดลองในแต่ละกลุ่มพบว่า ตั้งแต่เริ่มต้นทดลองปลาในทุกกลุ่มมีแนวโน้มของการเพิ่มน้ำหนักต่อวันอย่างรวดเร็วในวันที่ 25 ถึง 40 โดยเพิ่มจาก 4.46 ± 0.14 , 4.92 ± 0.24 , 4.51 ± 0.57 และ 4.62 ± 2.82 เป็น 9.49 ± 2.22 , 8.30 ± 1.34 , 8.77 ± 0.68 และ 8.63 ± 2.89 กรัม/วัน ตามลำดับ และสูงสุดในวันที่ 54 ของการเลี้ยง โดยมีค่าเป็น 9.94 ± 4.31 , 8.78 ± 2.99 , 9.10 ± 1.63 และ 11.56 ± 1.58 กรัม/วัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในช่วงวันที่ 68 ของการเลี้ยง อัตราการเพิ่มของน้ำหนักก็มีแนวโน้มลดต่ำลงเรื่อย ๆ จนถึงที่สิ้นสุดการทดลองที่ 110 วัน และยังพบว่า ปลาใน

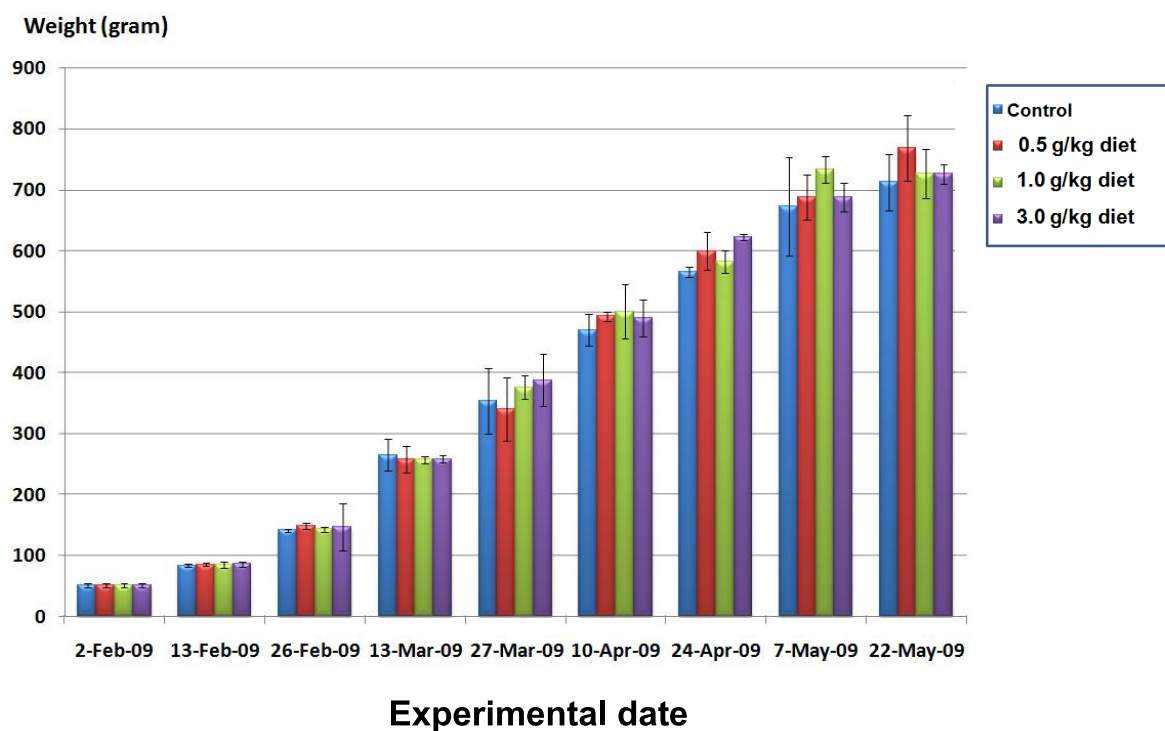
กลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอัตรา 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนัก น้อยกว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ($P>0.05$) ขณะที่ช่วงเวลาอื่น ๆ ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันของอัตราการเพิ่มน้ำหนักต่อวันของปลาทดลองแต่อย่างใด (ภาพที่ 28)

5.6.2.1.5 ความยาวลำไส้ของปลา

เมื่อพิจารณาถึงค่าความยาวลำไส้ของปลาทดลองในแต่ละกลุ่ม พบว่าความยาวลำไส้ของปลา มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ตามอายุและขนาดของปลา นอกจากนี้ยังพบข้อมูลที่น่าสนใจ เช่นเดียวกับที่พบในการทดลองเบื้องต้น โดยพบว่าในวันที่ 40, 54 และ 68 ของการเลี้ยง พบว่า ภายหลังการให้อาหารทดลอง ปลาทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ตั้งแต่ 0.5-3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และมีความยาวของลำไส้แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยพบว่าในวันที่ 40 ปลาในกลุ่มตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความยาวลำไส้เป็น 134.5 ± 0.7 , 169.3 ± 16.6 , 155.8 ± 13.5 และ 153.2 ± 13.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ในวันที่ 54 ปลาในกลุ่มตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความยาวลำไส้เป็น 121.5 ± 27.6 , 190.3 ± 3.9 , 185.5 ± 17.1 และ 183.2 ± 17.1 เซนติเมตรตามลำดับ และในวันที่ 68 ปลาในกลุ่มตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงกลุ่ม T3 มีความยาวลำไส้เป็น 139.5 ± 17.7 , 205.3 ± 30.8 , 160.5 ± 19.8 และ 189.7 ± 19.8 เซนติเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ในช่วงดังกล่าวก็ไม่พบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารทุกกลุ่มจะความแตกต่างของความยาวลำไส้แต่อย่างใด ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามในวันที่ 82, 95 และ 110 ของการเลี้ยง ความยาวของลำไส้ปลาในแต่ละกลุ่มมีแนวโน้มคงที่ และไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองแต่อย่างใด ($P>0.05$) (ภาพที่ 29)

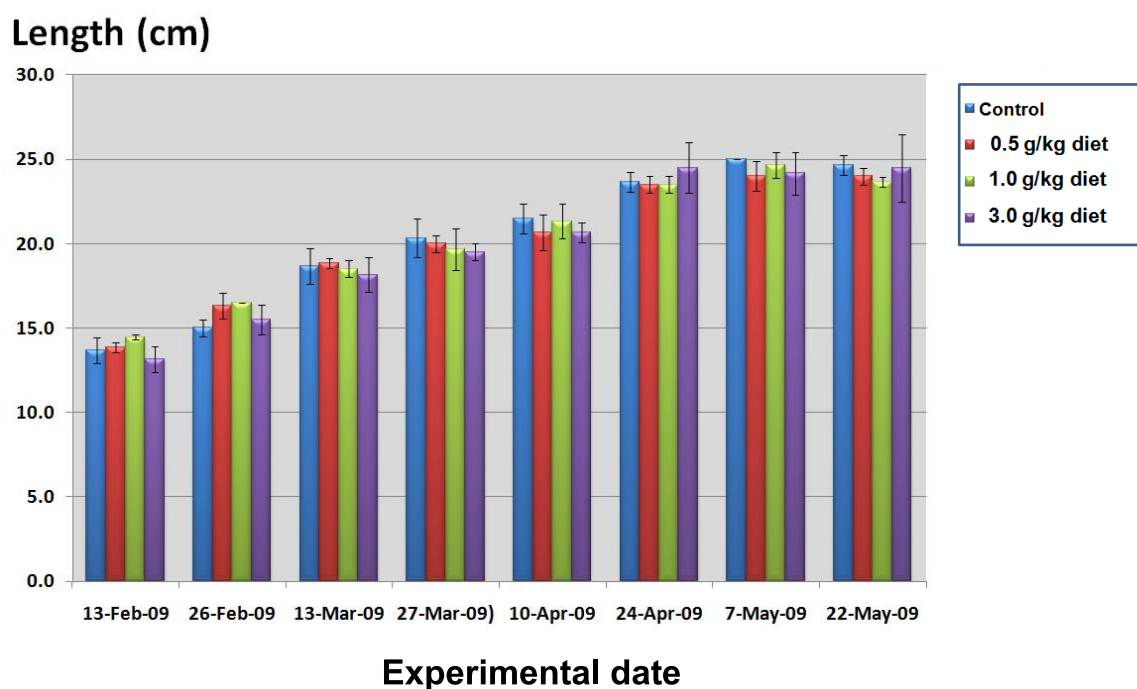
5.6.2.1.6 ปริมาณแบคทีเรียที่พบในลำไส้

นอกเหนือจากดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตอื่นแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังทำการตรวจประเมินจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ของปลาทดลอง โดยการนับจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมด โดยใช้วิธี Total plate count ซึ่งพบว่าภายหลังจากที่ให้อาหารทดลองไปแล้วในวันที่ 12 ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า Log ของแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ต่อกรัมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ($P<0.05$) โดยมีค่าเป็น 9.20 ± 0.10 , 9.41 ± 0.45 , 8.71 ± 0.37 , 8.79 ± 0.59 CFU/กรัม นอกจากนี้ระหว่างการทดลองในวันที่ 25 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ของปลาใน T3 มีแนวโน้มลดลงต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ก็ถือว่าไม่มากนัก นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากวันที่ 25 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้มีแนวโน้มคงที่ไปตลอดระยะเวลาของการทดลอง และไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของปริมาณแบคทีเรียระหว่างกลุ่มทดลองแต่อย่างใด (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 25 น้ำหนักของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

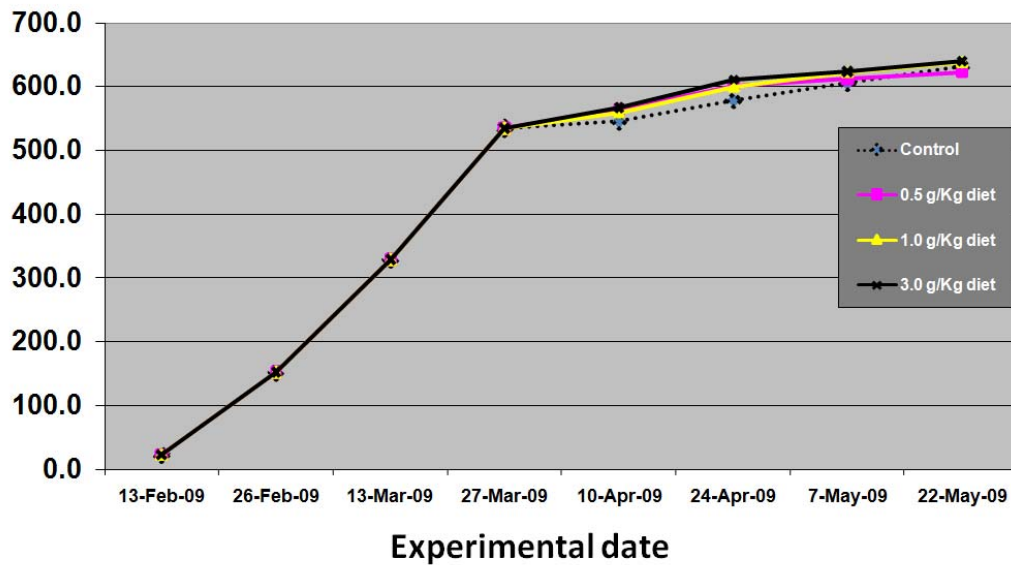
หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P < 0.05$)



ภาพที่ 26 ความยาวมาตรฐานของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

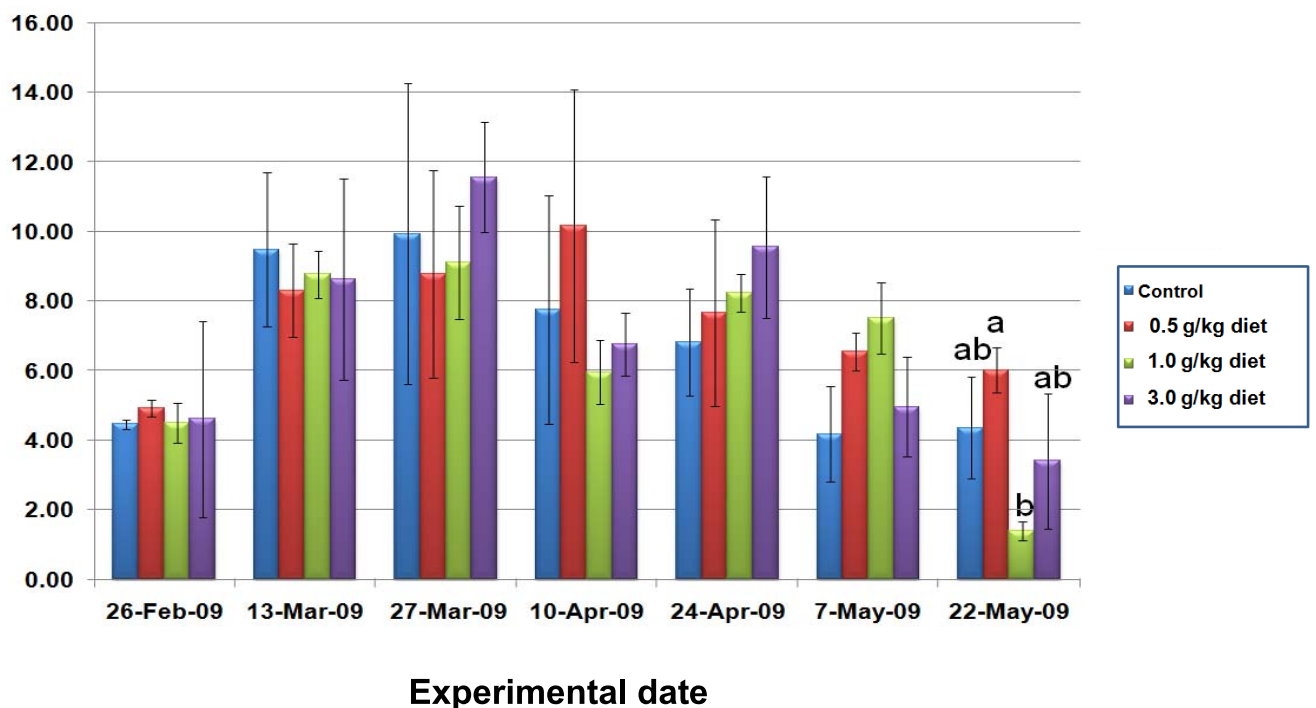
หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P < 0.05$)

Feed consumption (Kg)



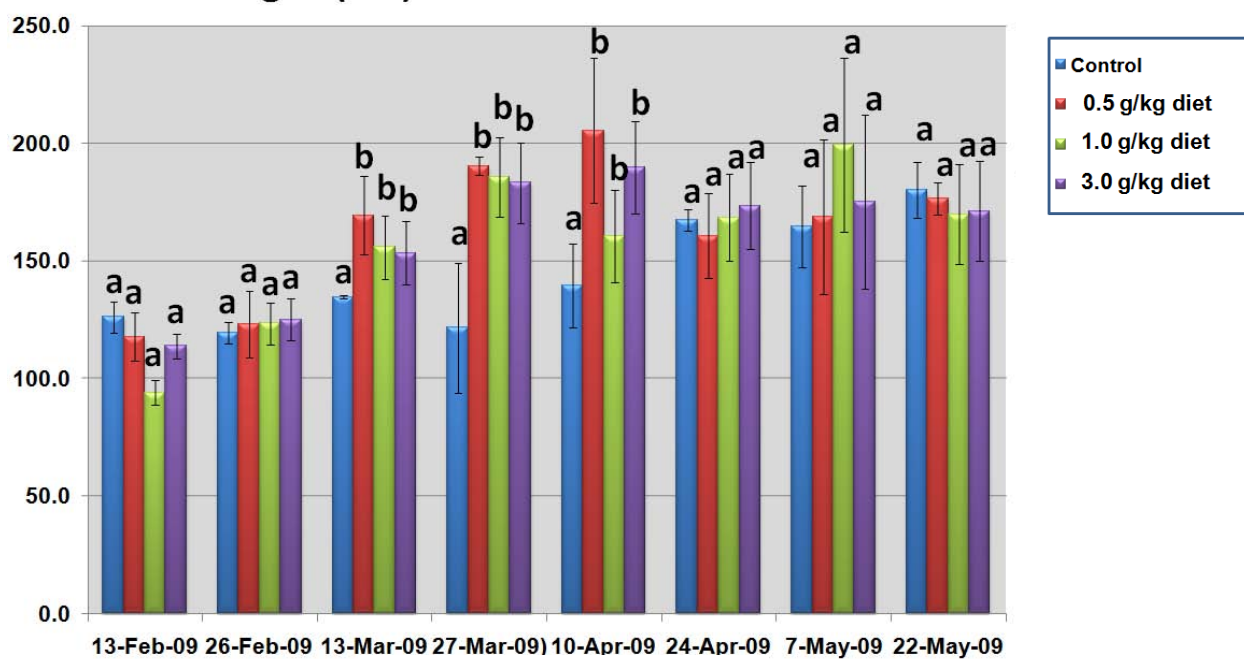
ภาพที่ 27 ปริมาณอาหารที่ให้เฉลี่ยในแต่ละกลุ่มตลอดการทดลอง

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P < 0.05$)



ภาพที่ 28 อัตราการเพิ่มของน้ำหนักต่อวันของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

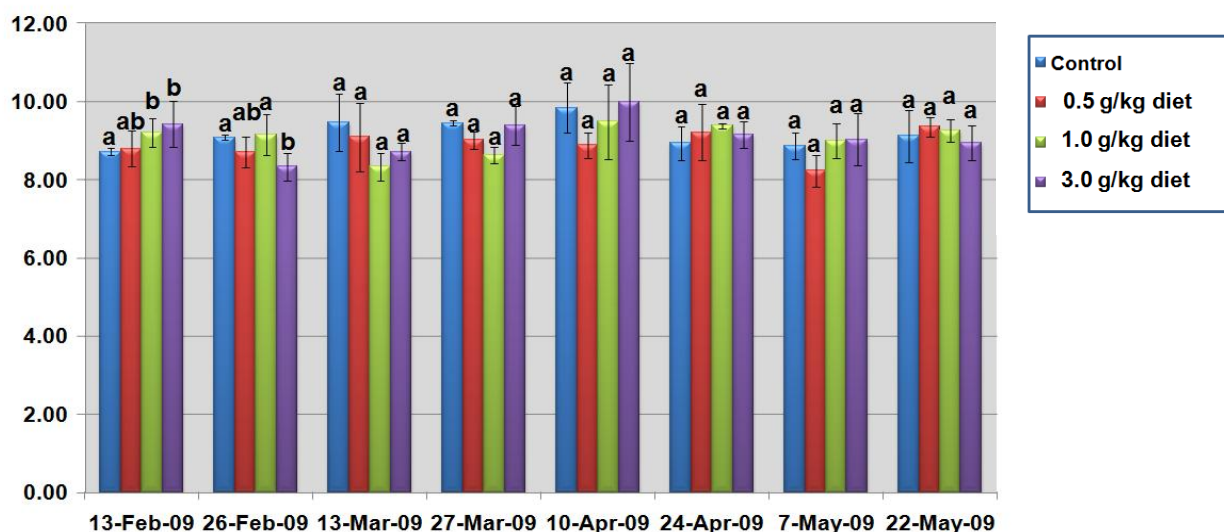
Intestinal Length (cm)



Experimental date

ภาพที่ 29 ความยาวของลำไส้ของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Log number of bacteria (CFU/g)

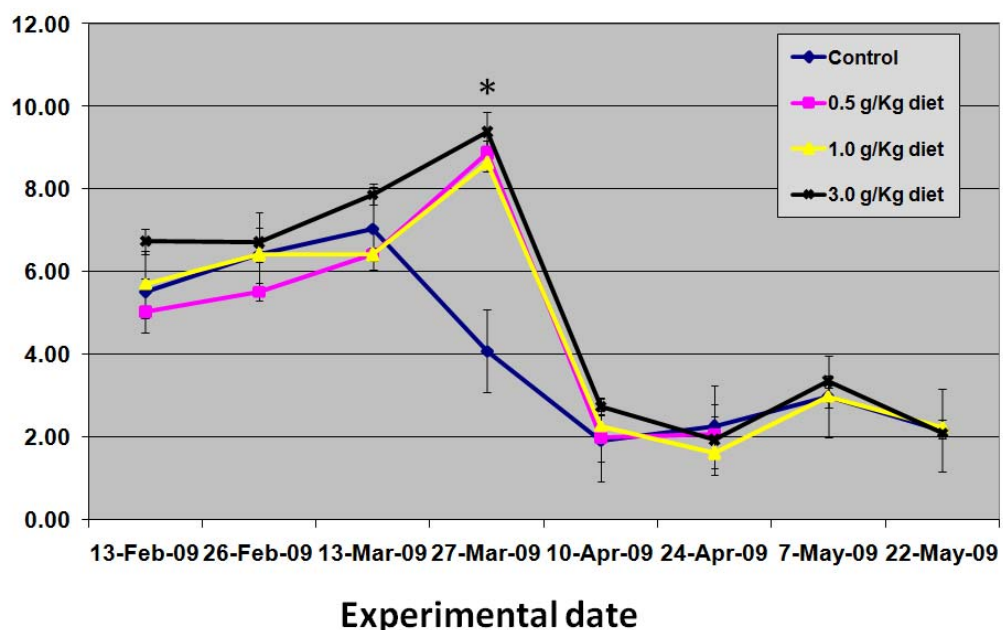


Experimental date

ภาพที่ 30 Log bacterial number ในลำไส้ของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

นอกจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการประเมินปริมาณแบคทีเรียในลำไส้โดยผ่านกระบวนการ Heat-shock และ Cold-shock พบว่าปลาทดลองในทุกกลุ่มจะมีแนวโน้มของปริมาณแบคทีเรียมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 12 ของการเลี้ยง ไปจนถึงวันที่ 54 พบว่าในช่วงตั้งแต่วันที่ 12 จนถึงวันที่ 40 ของการเลี้ยง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดลอง อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 54 ของการเลี้ยง กลุ่มของปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ T1-T3 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี Log จำนวนของแบคทีเรียเป็น 7.87 ± 0.29 , 7.63 ± 0.21 และ 7.38 ± 0.49 หน่วย ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมกลับมีค่าต่ำลงเหลือ 4.08 ± 0.15 เท่านั้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเข้าสู่วันที่ 68 ของการเลี้ยง ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ ที่ผ่านกระบวนการ Heat-shock และ Cold-shock จะลดต่ำลงเหลือใกล้เคียงกันมาก ในระดับ Log 2-3 และมีแนวโน้มคงที่เช่นนี้ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง และไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของจำนวนแบคทีเรียในช่วงนี้เลย แต่อย่างใด ($P < 0.05$) (ภาพที่ 31)

Log number of bacteria (CFU/g)



ภาพที่ 31 Log bacterial number ในลำไส้ ที่ผ่านการทำ Heat shock-Cold shock ของปลาทดลองภายหลังที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ เครื่องหมายดอกจัน (*) เหนือข้อมูลบนเส้นกราฟ วันที่ 27 มีนาคม แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

5.6.2.1.7 ผลผลิตและอัตราการตายของปลา

5.6.2.1.7.1 อัตราการตายของปลา

การศึกษาในส่วนนี้เกษตรกรผู้ร่วมโครงการจะทำการเก็บและบันทึกข้อมูลทุก ๆ วัน จนสิ้นสุดการทดลอง และจากการสังเกตจำนวนของปลาที่ตายพบว่า ในช่วงระหว่างการทดลองตั้งแต่ เริ่มต้นการทดลองจนถึงก่อนวันที่ 3 เมษายน ยังไม่พบว่าปลาที่เลี้ยงอยู่แสดงความผิดปกติหรืออาการป่วยที่รุนแรงให้เห็น โดยในช่วงแรกปลาในแต่ละกลุ่มจะมีอัตราการตายอยู่ในช่วง 4-5 ตัว/กลุ่มทดลองเท่านั้น ในส่วนนี้จึงเป็นหลักฐานที่สำคัญว่าการเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ ไม่ได้ส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือการตายเกิดขึ้นระหว่างการทดลองเช่นเดียวกับที่พบก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตามเมื่อเข้าสู่วันที่ 3 เมษายน (วันที่ 61 ของการเลี้ยง) ปลาในกลุ่มควบคุมจะเริ่มตายให้เห็นตามด้วยกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยไม่แสดงความผิดปกติภายนอกให้เห็น และอัตราการตายของปลา 2 กลุ่มนี้จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วงวันที่ 10 เมษายน จนถึงวันที่ 24 ของเดือนเดียวกัน จากระดับ $0.27 \pm 0.19\%$ (1.67 ตัว) ไปเป็น $16.99 \pm 3.28\%$ (105.34 ตัว) ในปลาในกลุ่มควบคุม และจากระดับ $1.24 \pm 2.0\%$ (7.69 ตัว) ไปเป็น $23.87 \pm 5.70\%$ (147.99 ตัว) ของปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ขณะที่ช่วงระยะเวลาดังกล่าวปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่มีการตายในอัตราที่น้อยมาก (ภาพที่ 32)

นอกจากนี้ยังพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แสดงอัตราการตายลดลงทันที หลังจากวันที่ 24 ของเดือนเมษายน และมีแนวโน้มคงที่ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง คือวันที่ 25 พฤษภาคม 2552 ต่อเนื่องไปถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิต ในวันที่ 18 มิถุนายน 2552 โดยมีอัตราการตายสะสมสุดท้ายของปลา ณ วันเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็น $27.31 \pm 4.43\%$ ขณะที่กลุ่มควบคุมยังคงมีแนวโน้มตายต่อเนื่องจนถึงวันที่ 3 มิถุนายน โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $21.72 \pm 3.54\%$ และอัตราการตายยังคงที่ไปเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 7 พฤษภาคม อัตราการตายก็เพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งจาก $20.91 \pm 2.59\%$ เป็น $29.57 \pm 5.87\%$ (ภาพที่ 32)

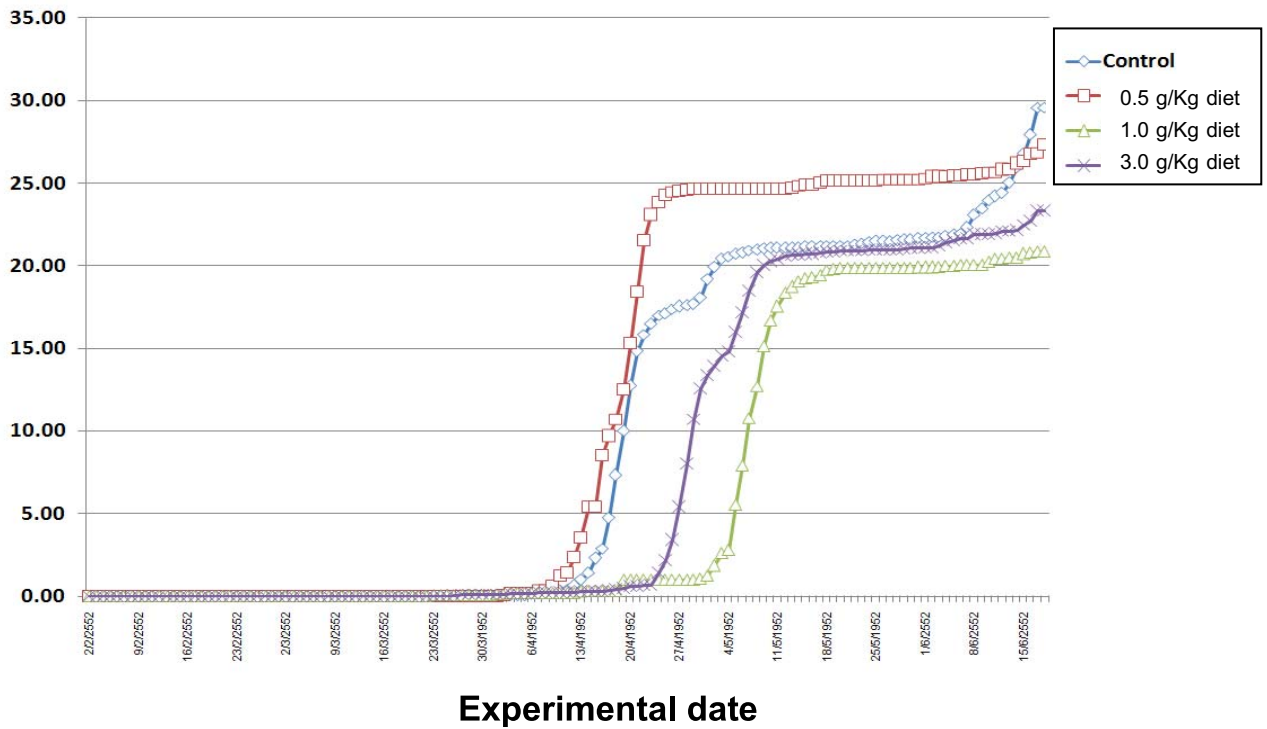
เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงเวลาดังกล่าวปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย ในอาหาร 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังไม่แสดงอัตราการตายเป็นจำนวนมากให้เห็นแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่ 18 เมษายน ประมาณ 2 สัปดาห์หลังจกพบการตายของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เริ่มแสดงอาการตายให้เห็นบ้างแต่ยังไม่รุนแรงมากนักในระดับ $0.97 \pm 1.26\%$ และ $0.48 \pm 0.16\%$ ตามลำดับ แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 22 เมษายน ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เริ่มมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นอย่างมากบ้าง จนถึงวันที่ 9 พฤษภาคม จาก

ระดับ $0.70 \pm 0.25\%$ ไปเป็น $20.05 \pm 5.92\%$ และมีแนวโน้มคงที่ไปเรื่อย ๆ และสูงขึ้นเล็กน้อยเป็น 23.33 ± 5.53 ในวันเก็บเกี่ยวผลผลิต (ภาพที่ 32)

ส่วนกลุ่มปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากวันที่ 18 เมษายน จนถึงวันที่ 30 เมษายน ซึ่งมีอัตราการตายสะสมเป็น $1.02 \pm 1.21\%$ อย่างไรก็ตามหลังจากวันที่ 30 ปลาในกลุ่มนี้กลับมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงวันที่ 16 พฤษภาคม โดยมีอัตราการตายเป็น 19.30 ± 2.19 แล้วหลังจากนั้นอัตราการตายจะเริ่มคงที่และสูงขึ้นเล็กน้อยในวันเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $20.86 \pm 1.97\%$ (ภาพที่ 32)

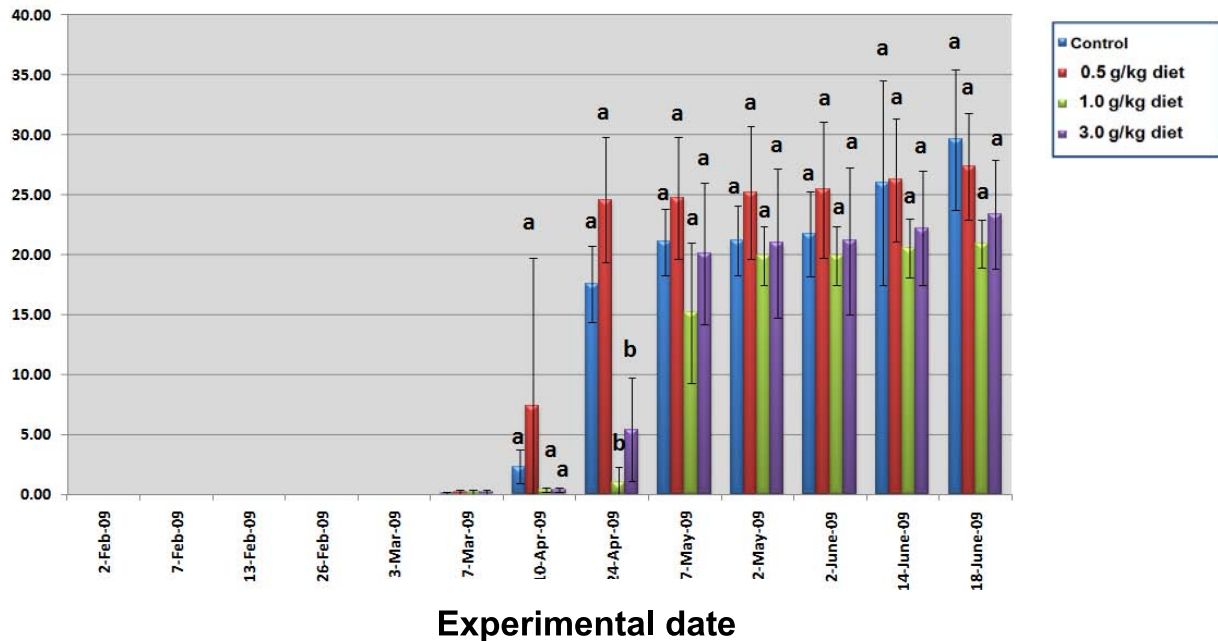
เมื่อนำค่าอัตราการตายสะสมของปลาในแต่ละกลุ่มและแต่ละช่วงของการเก็บข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่าจะพบความแตกต่างของอัตราการตายสะสมของปลาทดลองในวันที่ 82 ของการทดลอง (วันที่ 24 เมษายน) เท่านั้น โดยพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 33) ส่วนในวันที่ 68 ของการทดลอง (10 เมษายน) ถึงแม้ว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่าต่ำกว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อยู่มากพอสมควรแต่ก็ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด ($P > 0.05$) เนื่องจาก กลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าความแปรปรวนที่สูงมาก เนื่องจาก 1 ใน 3 กระชัง ในกลุ่มเดียวกัน มีอัตราการตายที่แตกต่างกับกระชังอื่นมาก (ภาพที่ 33)

Accumulative mortality (%)



ภาพที่ 32 อัตราการตายสะสมของปลาทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์หลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

Accumulative mortality (%)



ภาพที่ 33 อัตราการตายสะสมของปลาทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์หลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ ณ เวลาการเก็บข้อมูล อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5.6.2.1.7.2 ข้อมูลผลผลิต

5.6.2.1.7.2.1 อัตราการรอดตาย

จากผลการทดลองที่วันเก็บเกี่ยวผลผลิตพบว่าจำนวนปลาที่เหลือรอด ของปลาทดลองตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5-3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 436.67 ± 36.36 , 450.67 ± 27.47 , 490.67 ± 12.22 และ 475.33 ± 28.09 ตัว โดยคิดเป็นอัตราการรอดตายเท่ากับ 70.38, 72.69, 79.14 และ 76.67% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่าดังกล่าวไปทดสอบสถิติแล้วพบว่าค่าสังเกตดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2)

5.6.2.1.7.2.2 ผลผลิตปลาที่ได้

เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักปลาในแต่ละกลุ่มที่สิ้นสุดการทดลอง พบว่าน้ำหนักของปลาทดลองตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร T1-T3 มีค่าเท่ากับ 316.47 ± 11.02 , 320.93 ± 28.07 , 342.40 ± 9.26 และ 348.13 ± 20.75 กิโลกรัม ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการรอดตายและน้ำหนักปลาที่วัดได้ในวันจำหน่ายผลผลิต

หน่วยทดลอง	จำนวนปลา เหลือรอด [ตัว (%)]	จำนวนปลา เหลือรอดเฉลี่ย [ตัว (%)]	น้ำหนักเฉลี่ย ต่อกลุ่ม ¹ (กิโลกรัม)	น้ำหนัก เฉลี่ย/ตัว (กิโลกรัม)	ค่าเฉลี่ย ² (กิโลกรัม)	อาหารที่ใช้ เฉลี่ย (กิโลกรัม)	FCR เฉลี่ย	จำนวนเงิน ที่ขายได้ ^a (บาท)	รายได้เฉลี่ย (บาท/กระชัง) ³
Control 1	453 (73.1)	436.67±36.36 (70.38)	316.47±11.02	0.697	0.727±0.04	611.22	1.93	15469.8	15,502.44
Control 2	462 (74.5)			0.710			±	16057.6	±
Control 3	395 (63.7)			0.774			0.12	14979.9	539.59
T11	465 (75.0)	450.67±27.47 (72.69)	320.93±28.07	0.738	0.711±0.02	612.47	1.91	16812.0	15,721.24
T12	468 (75.5)			0.706			±	16175.2	±
T13	419 (67.6)			0.691			0.09	14176.5	1,375.11
T21	504 (81.3)	490.67±12.22 (79.14)	342.40±9.26	0.699	0.698±0.00	617.25	1.80	17252.9	16,772.81
T22	488 (78.7)			0.699			±	16714.0	±
T23	480 (77.4)			0.695			0.17	16351.5	453.54
T31	502 (81.0)	475.33±28.09 (76.67)	348.13±20.75	0.740	0.733±0.02	619.71	1.78	18203.2	17,053.66
T32	478 (77.1)			0.713			±	16684.6	±
T33	446 (71.9)			0.745			0.14	16273.1	1,016.57
รวมทั้งหมด	5,560 (74.7)			0.717				195,150.3	

หมายเหตุ: ^{1, 2, 3} ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง (P>0.05)

^a ข่ายปลาได้เฉลี่ยกิโลกรัมละ 48.986 บาท

T11-T13, T21-T22 และ T31-T33 คือ หน่วยทดลองของปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบบเคทีเรียในอัตรา 0.5, 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ

5.6.2.1.7.2.3 อัตราการแลกเนื้อ (FCR)

และเมื่อพิจารณาถึง ค่า FCR ของปลาในแต่ละกลุ่มที่สิ้นสุดการทดลอง พบว่าค่า FCR ของปลาทดลอง ตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 0.5-3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 1.93 ± 0.12 , 1.91 ± 0.09 , 1.80 ± 0.17 และ 1.78 ± 0.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

5.6.2.1.7.2.4 รายได้

ในส่วนของรายได้ที่ยังไม่หักค่าใช้จ่ายจากการขายปลา พบว่าเงินที่เกิดจากการขายปลาได้จากน้ำหนักปลารวมทั้งหมด 3,983.8 กิโลกรัม จากปลาทุกกลุ่มสามารถขายได้เป็นเงินทั้งสิ้น 195,150.3 บาท โดยขายในราคาประกันกิโลกรัมละ 48.986 บาท โดยจำนวนเงินเฉลี่ยที่ขายได้จากปลาในแต่ละกลุ่มตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร T1-T3 มีค่าเท่ากับ $15,502.44 \pm 539.59$, $15,721.24 \pm 1,375.11$, $16,772.81 \pm 453.54$ และ $17,053.66 \pm 1,016.57$ บาทตามลำดับ อย่างไรก็ตามก็ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด ($P > 0.05$)

(ตารางที่ 2)

5.6.2.8 ข้อมูลคุณภาพน้ำ

ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับตัวปลาแล้ว ผู้วิจัยยังได้วางแผนเก็บข้อมูลของคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยง เพื่อใช้ในการเป็นข้อมูลในการจัดการและหาความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำกับการเกิดโรค ในน้ำของแต่ละกระชัง โดยทำการเก็บและวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งสิ้น 9 พารามิเตอร์ ซึ่งได้แก่

- ออกซิเจนละลาย
- ความเป็นด่าง
- ความเป็นกรด-ด่าง
- แอมโมเนีย
- ไนไตรท์
- ค่าความโปร่งแสง
- ค่าความนำไฟฟ้า
- อุณหภูมิ
- ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ

5.6.2.8.1 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำในกระชังในแหล่งเลี้ยงมีความคงที่เคลื่อนตัวเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบ ๆ อยู่ในช่วงตั้งแต่ 6.9-7.3 ตั้งแต่เริ่มการทดลองไปจนถึงวันที่ 68 ของการเลี้ยง และในวันที่ 82 ของการเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำขยับสูงขึ้นอยู่ในช่วง 7.4 และกลับต่ำลงเรื่อย ๆ ในวันที่ 95 และ 110 ของการเลี้ยง โดยเฉพาะในวันที่ 110 ระดับความเป็นกรด-ด่าง ถือว่ามีค่าต่ำที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเมื่อวัดในกระชังทดลอง อยู่ที่ 6.84 ± 0.01 , 6.81 ± 0.02 , 6.86 ± 0.02 และ 6.85 ± 0.02 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วยังถือว่าความเป็นกรด-ด่างในพื้นที่การเลี้ยงยังอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไป และยังไม่พบว่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยงไม่พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้ในแต่ละกลุ่ม มีความแตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลองเช่นกัน ($P > 0.05$) (ภาพที่ 34)

5.6.2.8.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

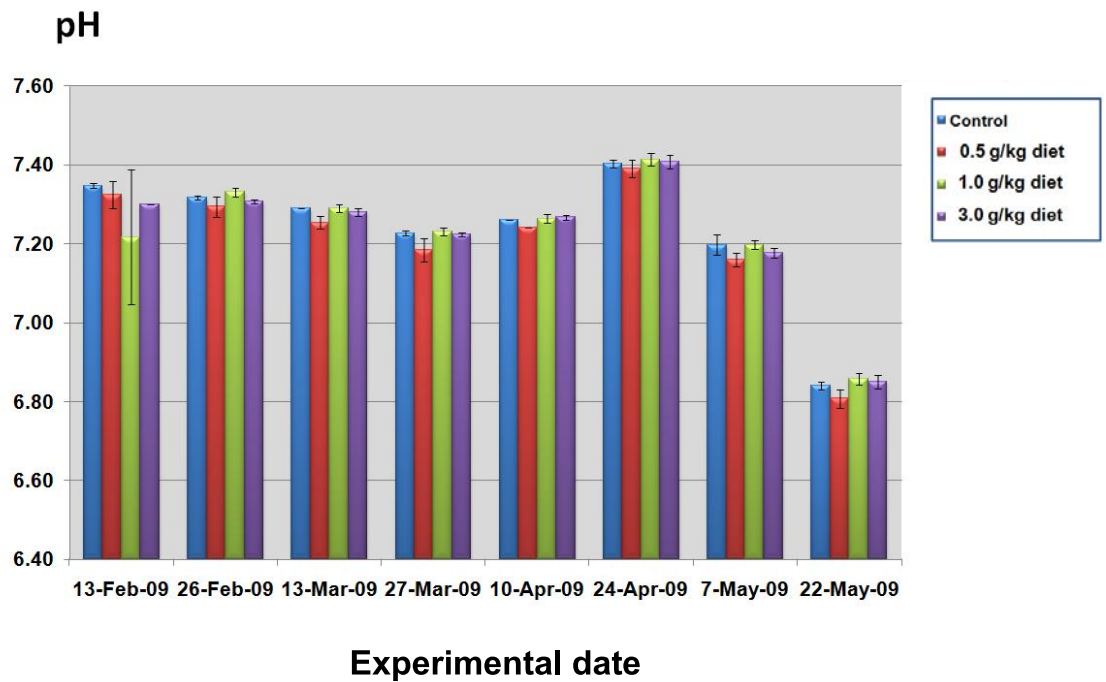
จากการตรวจวัดระดับปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำก็พบว่าในช่วง วันที่ 11-25 ของการเลี้ยงซึ่งเป็นระยะแรก ๆ ของการทดลองปริมาณของออกซิเจนละลายในน้ำบริเวณกระชังทดลองมีค่าค่อนข้างต่ำ ในช่วง 4.1-4.5 มิลลิกรัม/ลิตร เหมือนกันในทุกกลุ่มทดลอง ที่เป็นเช่นนี้เพราะน้ำในบริเวณแหล่งเลี้ยง จะไหลเคลื่อนตัวช้า ๆ แต่ระดับดังกล่าวก็ไม่ได้ส่งผลต่อปลามากนัก เนื่องจากจะสามารถสังเกตเห็นการกินอาหารของปลาที่เป็นปกติอยู่และอัตราการบริโภคออกซิเจนของปลายังมีน้อยเนื่องจากปลายังมีขนาดเล็ก และระดับดังกล่าวก็ยังอยู่เหนือเกณฑ์ที่ปลาต้องการเล็กน้อย แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 40, 54 และ 68 ของการทดลอง ค่าปริมาณออกซิเจนละลายของในบริเวณทดลองจะเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วง 5.8-6.2 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากน้ำในแม่น้ำท่าจีนเริ่มมีการไหลเวียนดีขึ้น โดยสามารถสังเกตจากสีและการไหลของน้ำที่ไม่ขุ่นนัก ซึ่งปริมาณออกซิเจนละลายในระดับดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมมากต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยทั่วไป ทำให้ในช่วงนี้เป็นช่วงที่ปลากินอาหารและมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วและดีมาก อย่างไรก็ตามเมื่อเข้าสู่วันที่ 82 ของการเลี้ยง ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำกลับเริ่มลดต่ำลงอยู่ในช่วงประมาณ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร และลดต่ำลงเรื่อย ๆ ในวันที่ 95 และ 110 ของการเลี้ยง โดยเฉพาะวันที่ 110 ปริมาณออกซิเจนละลายของน้ำในพื้นที่การเลี้ยงจะลดลงต่ำสุดเหลือเพียง ประมาณ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เท่านั้น ซึ่งระดับดังกล่าวถือว่าอยู่ในระดับวิกฤติที่ต่ำกว่า 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้ปลาทดลองหยุดกินอาหารทันที โดยปริมาณออกซิเจนในน้ำยังมีแนวโน้มคงที่ในระดับประมาณ 0.8-1.2 อยู่เป็นเวลานานจนถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิต ทำให้ปลาทดลองทุกกลุ่มไม่กินอาหารเลยหรือกินน้อยมากในช่วงดังกล่าว แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่า ไม่พบการลอยหัวของปลาแต่อย่างใดแต่ปลาจะมีการปรับตัวอยู่หนึ่ง ๆ ในน้ำและไม่มีการตอบสนองต่อการให้อาหารน้อยมาก ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตอย่างมากโดยพบว่าน้ำหนักของปลาเริ่มคงที่หรือลดลงในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยง และจากทดสอบทางสถิติไม่พบว่ามีค่าปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำของแต่ละกระชังมีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกช่วงของการทดลอง ($P > 0.05$) (ภาพที่ 35)

5.6.2.8.3 ค่าความนำไฟฟ้า ความโปร่งใสและปริมาณแอมโมเนียในน้ำ

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ค่าความนำไฟฟ้าในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง ซึ่งพบว่าค่าความนำไฟฟ้าของแหล่งน้ำดังกล่าวมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากวันที่ 11, 25 และ 40 ของการทดลอง จากระดับประมาณ 194 $\mu\text{S}/\text{cm}$ – 208 $\mu\text{S}/\text{cm}$ และคงที่ในวันที่ 54 ของการทดลอง อย่างไรก็ตามในวันที่ 68, 82 และ 95 ความนำไฟฟ้าของน้ำในแหล่งเลี้ยงจะขยับสูงขึ้นกว่าก่อนหน้าและคงที่จนถึง วันที่ 95 ของการเลี้ยง โดยจะมีค่าความนำไฟฟ้าอยู่ประมาณ 210 $\mu\text{S}/\text{cm}$ นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 110 ของการเลี้ยง ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำก็ลดลงอีกครั้งอยู่ในระดับ 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ซึ่งตลอดระยะเวลาของการทดลองไม่พบค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในแหล่งเลี้ยงจะอยู่ในช่วงอันตรายต่อสัตว์น้ำและไม่พบว่ามีน้ำในแต่ละกลุ่มการทดลองจะมีค่าความนำไฟฟ้าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงของการเก็บข้อมูล ($P>0.05$) (ภาพที่ 36)

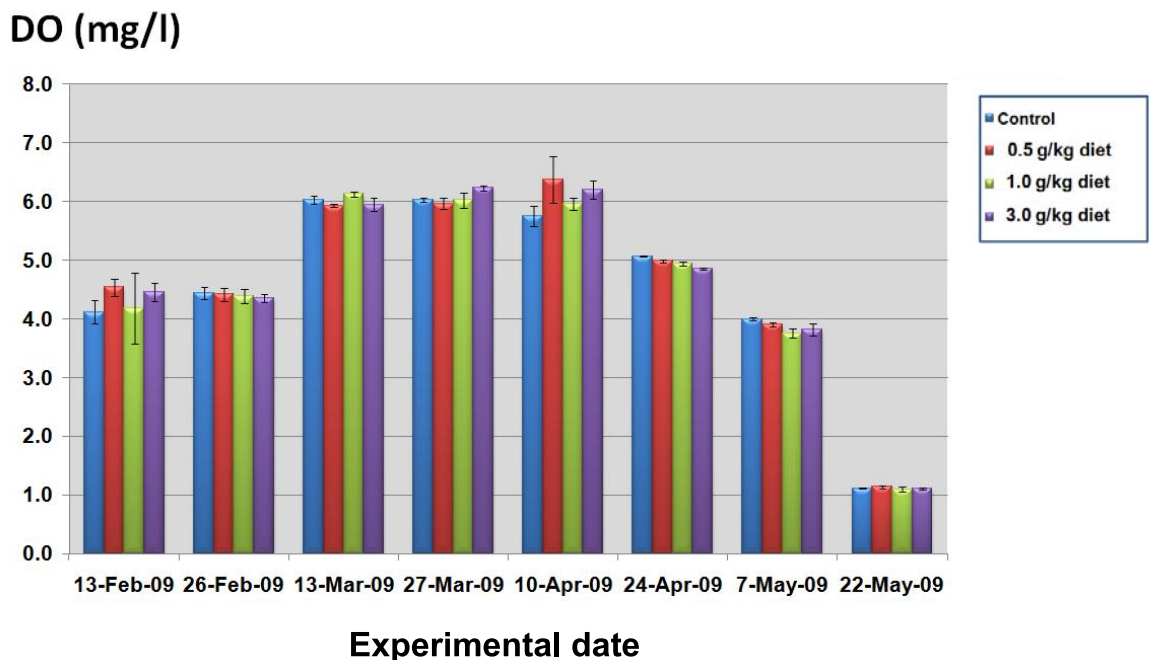
เมื่อพิจารณาถึงค่าความโปร่งใสของน้ำ ซึ่งจะมีความสอดคล้องกับคุณภาพน้ำตัวอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด โดยจะพบว่าในช่วงแรก ๆ ของการทดลอง น้ำในพื้นที่ดังกล่าวจะมีค่าความโปร่งใสค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าใกล้เคียงกันที่ประมาณ 40-45 เซนติเมตร เนื่องจากในช่วงดังกล่าวไม่มีมวลน้ำไหลผ่าน ทำให้น้ำในบริเวณดังกล่าวมีสีขุ่น อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่ 25 และ 40 ของการเลี้ยง ความโปร่งใสของน้ำจะมีค่าสูงขึ้นอยู่ในช่วงประมาณ 49-50 เซนติเมตรและคงตัวต่อไปจนถึงวันที่ 40 หลังจากนั้น ความโปร่งใสของน้ำจะมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ โดยเฉพาะในวันที่ 110 ของการเลี้ยง ค่าความโปร่งใสของน้ำที่วัดได้มีค่าลดลงต่ำมากเหลือเพียง ประมาณ 15 เซนติเมตรเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการปล่อยน้ำจากคลองระบายน้ำซึ่งรับน้ำจากพื้นที่การเพาะปลูกของเกษตรกรลงในแม่น้ำท่าจีน จนเป็นผลให้น้ำมีสีแดงถึงขาวขุ่นมาก และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของน้ำที่ได้จากกลุ่มทดลองก็ไม่พบว่ามีค่าความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด (ภาพที่ 37)

นอกจากพารามิเตอร์ของน้ำทางด้านเคมีและกายภาพอื่นแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมีที่สำคัญหลายชนิด เช่น ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำ ซึ่งพบว่าในช่วงแรกของการทดลองที่ วันที่ 11 ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 0.16-0.22 มิลลิกรัม $\text{NH}_3\text{-N}/\text{ลิตร}$ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามในวันที่ 11 และ 25 ของการเลี้ยง ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ และสูงขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 54 โดยพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันอยู่ที่ 0.12-0.14 มิลลิกรัม $\text{NH}_3\text{-N}/\text{ลิตร}$ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณแอมโมเนียของน้ำมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 68 ของการเลี้ยงและเริ่มคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันที่ 110 ของการเลี้ยงปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่เก็บได้จากในแต่ละกลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.17 ± 0.02 , 0.15 ± 0.02 , 0.20 ± 0.03 และ 0.19 ± 0.01 มิลลิกรัม $\text{NH}_3\text{-N}/\text{ลิตร}$ ตามลำดับ ซึ่งตลอดระยะเวลาการทดลองความเข้มข้นของแอมโมเนียที่วัดได้ถือว่ามีความต่ำมากและปลอดภัยต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไป และไม่พบความแตกต่างกันของปริมาณแอมโมเนียจากน้ำในพื้นที่ทดลองทางสถิติในทุกช่วงของการทดลอง (ภาพที่ 38)



ภาพที่ 34 ความเป็นกรด-ด่างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

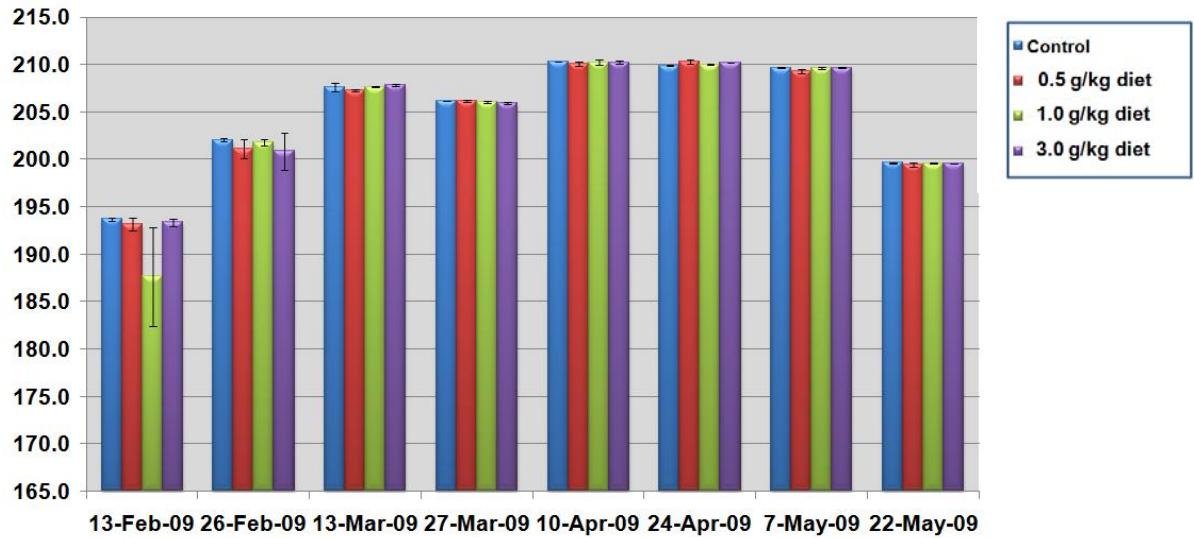
หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P>0.05$)



ภาพที่ 35 ปริมาณออกซิเจนละลายของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P>0.05$)

Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)



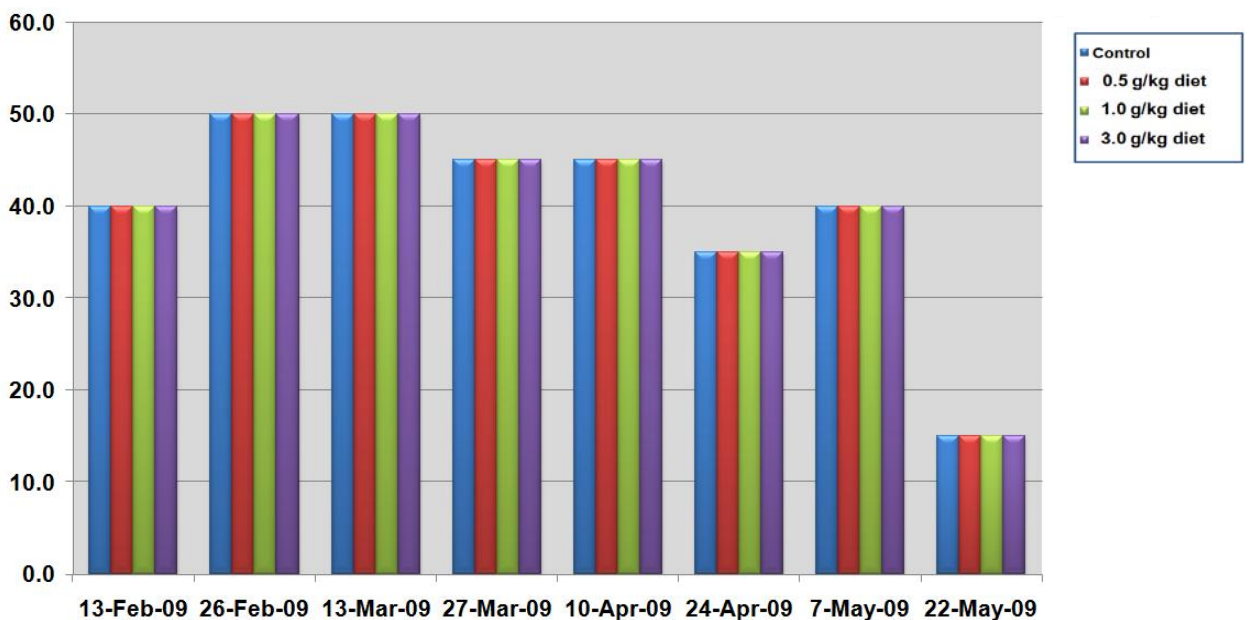
Experimental date

ภาพที่ 36 ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

Bacillus สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P>0.05$)

Transparency (cm)



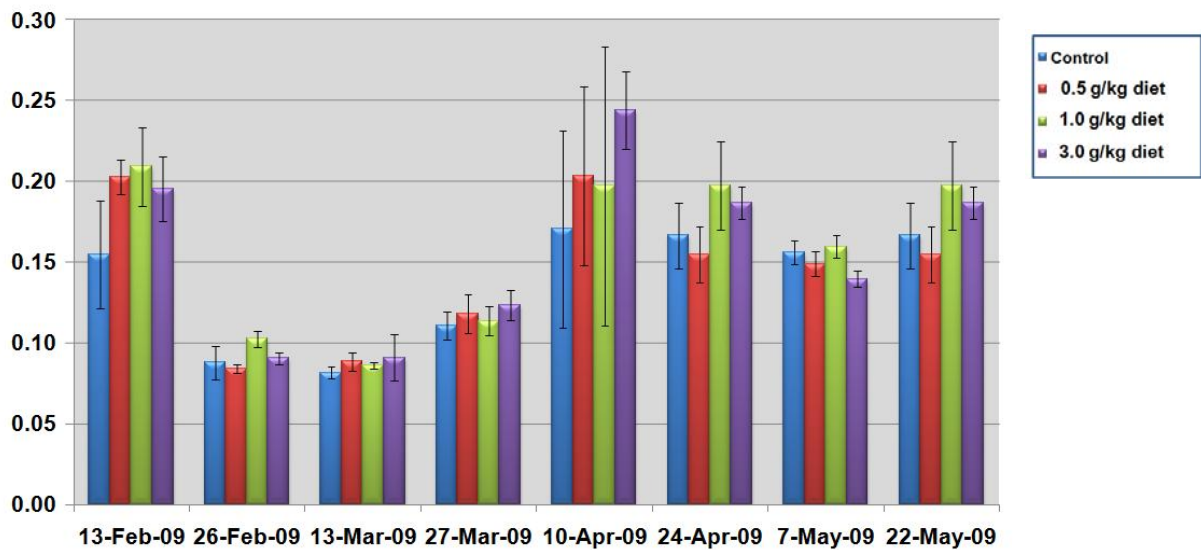
Experimental date

ภาพที่ 37 ค่าความโปร่งแสงของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

Bacillus สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P>0.05$)

NH₃-N (mg/l)



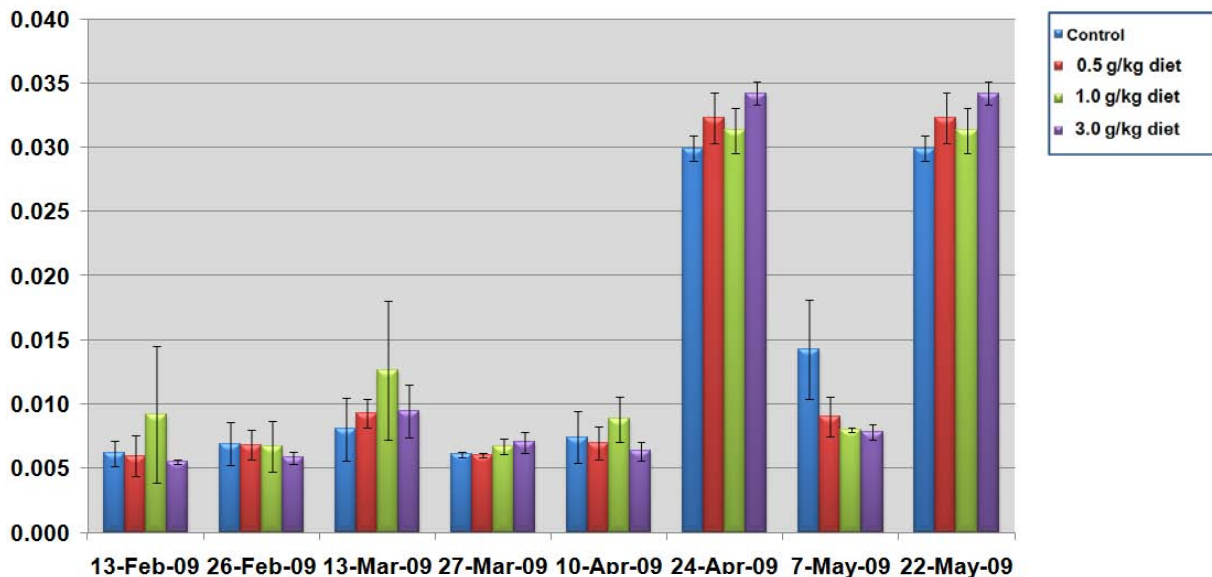
Experimental date

ภาพที่ 38 ปริมาณแอมโมเนียของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

Bacillus สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P>0.05$)

NO₂-N (mg/l)



Experimental date

ภาพที่ 39 ปริมาณไนไตรท์ของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

Bacillus สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P>0.05$)

5.6.2.8.4 ปริมาณไนไตรท์ในน้ำ

นอกจากปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการตรวจวัดระดับไนไตรท์ในน้ำในพื้นที่การเลี้ยงด้วย โดยพบว่าความเข้มข้นของไนไตรท์ตลอดการทดลองจะมีค่าอยู่ในช่วงต่ำมาก ในทุกกลุ่มทดลอง โดยเมื่อเริ่มต้นทดลอง ปริมาณไนไตรท์ของน้ำมีค่าอยู่ในระดับประมาณ 0.006-0.009 มิลลิกรัม $\text{NO}_2\text{-N}$ /ลิตร และยังมีค่าต่ำคงที่ไปจนถึง วันที่ 68 ของการเลี้ยง ซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.006-0.007 มิลลิกรัม $\text{NO}_2\text{-N}$ /ลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามปริมาณไนไตรท์ก็ขยับเพิ่มสูงขึ้นหลายเท่าและสูงสุดในวันที่ 82 และ 110 ของการเลี้ยงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.030-0.035 แต่ระดับความเข้มข้นของไนไตรท์ดังกล่าวถือว่าต่ำมากและเป็นพิษต่อสัตว์น้ำโดยทั่วไป (ภาพที่ 39)

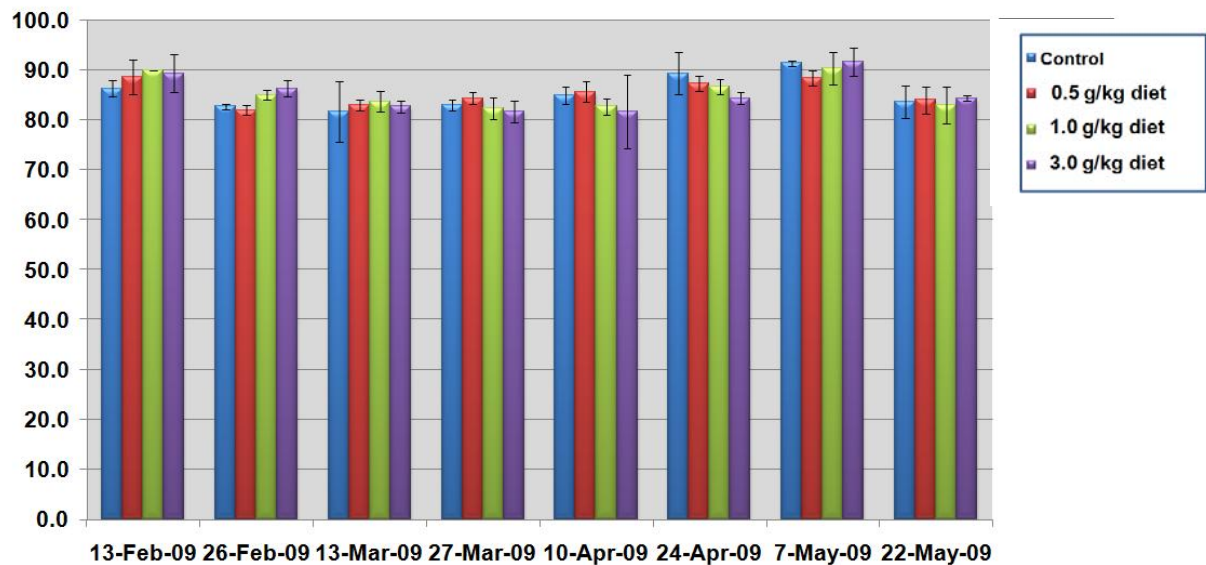
5.6.2.8.5 ค่าความเป็นด่าง

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นด่างของน้ำ พบว่าในวันที่ 11 ของการเลี้ยงปริมาณความเป็นด่างของน้ำในแหล่งเลี้ยงมีค่าอยู่ในช่วง 85-90 มิลลิกรัม/ลิตร as CaCO_3 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 4-8 ปริมาณความเป็นด่างจะมีค่าลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 54 ของการเลี้ยง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 81-83 มิลลิกรัม/ลิตร as CaCO_3 ซึ่งตลอดระยะเวลาของการทดลองค่าความเป็นด่างของน้ำในพื้นที่การเลี้ยงถือว่าการเคลื่อนไหวในช่วงแคบ ๆ ในระดับ 80-90 มิลลิกรัม/ลิตร as CaCO_3 ซึ่งถือว่ามีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยทั่วไป และยังไม่พบค่าความเป็นด่างที่วัดได้ในแต่ละกลุ่มในแต่ละช่วงของการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 40)

5.6.2.8.6 ค่าความกระด้างของน้ำ

ในส่วนของระดับความกระด้างของน้ำในพื้นที่เลี้ยง จะพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับปริมาณความเป็นด่างโดยมีค่าคงที่ตั้งแต่วันที่ 11 จนถึงวันที่ 95 ของการเลี้ยง และมีค่าใกล้เคียงกันมากในทุกกลุ่มทดลอง โดยพบว่ามีค่าอยู่ระหว่างประมาณ 74-77 มิลลิกรัม/ลิตร as CaCO_3 (ภาพที่ 41) ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าที่มีความเหมาะสมกับการเจริญของสัตว์น้ำโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในวันที่ 110 ของการเลี้ยง ค่าความกระด้างของน้ำในแหล่งเลี้ยงมีค่าลดลงอย่างมาก โดยน้ำในแต่ละกลุ่มที่วัดได้มีค่าความกระด้างอยู่ที่ 60.67 ± 1.53 , 60.33 ± 0.58 , 61.33 ± 0.58 และ 63.67 ± 2.08 ทั้งนี้จะเป็นผลมาจากมวลน้ำใหม่ที่มีความขุ่นสูงและมีความกระด้างที่ต่ำกว่า ไหลเวียนเข้ามาในพื้นที่แหล่งเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงเกณฑ์ความเหมาะสมแล้วพบว่าค่าความกระด้างดังกล่าวถือว่าอยู่ในระดับที่ไม่วิกฤติที่จะส่งผลต่อสัตว์น้ำได้ นอกจากนี้ก็ไม่พบเวลาที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ทำการตรวจวัดระดับ ค่าความกระด้างที่ได้จากน้ำในกลุ่มต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด (ภาพที่ 41)

Alkalinity (mg/l as CaCO₃)



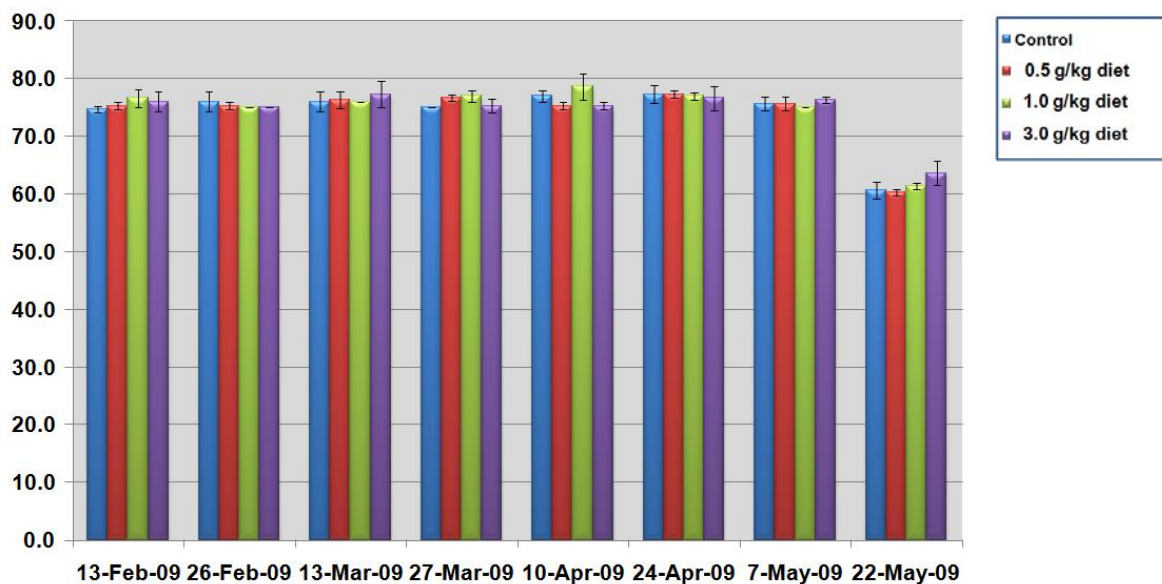
Experimental date

ภาพที่ 40 ค่าความเป็นด่างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

Bacillus สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P < 0.05$)

Hardness (mg/l as CaCO₃)



Experimental date

ภาพที่ 41 ค่าความกระด้างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

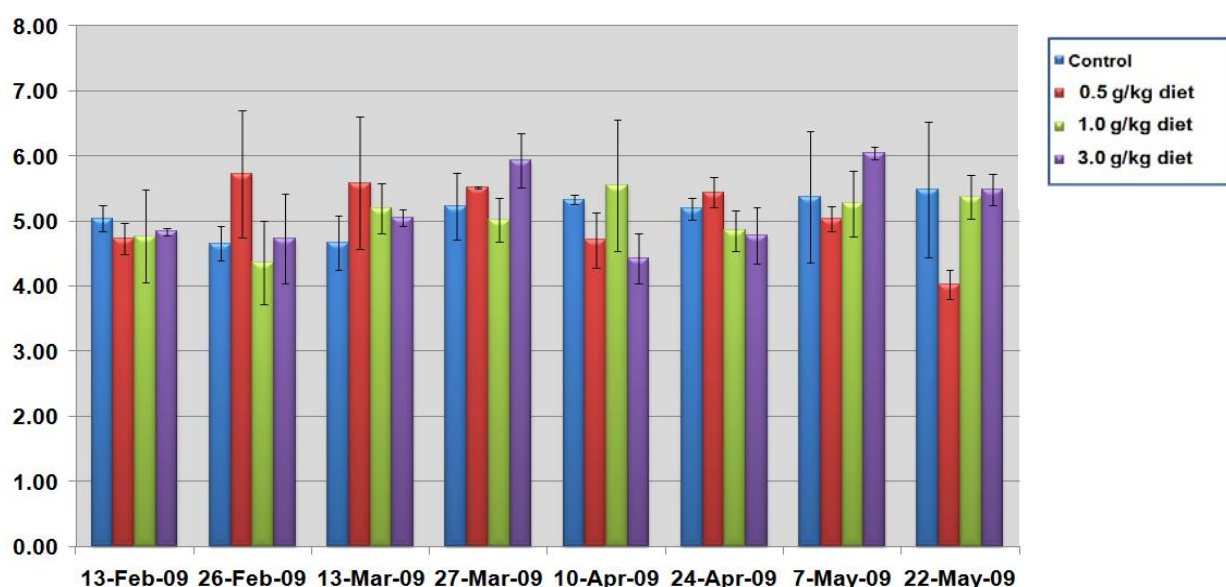
Bacillus สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P < 0.05$)

5.6.2.8.7 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ

นอกเหนือจากพารามิเตอร์ของน้ำทางเคมีและกายภาพแล้ว การวิจัยในครั้งนี้ยังได้ทำการตรวจสอบระดับความหนาแน่นของแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำในพื้นที่กระชังที่เลี้ยง โดยใช้เทคนิค Total bacterial count (TBC) ซึ่งเป็นดัชนีทางชีวภาพที่สำคัญอีกดัชนีนึง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าในแรกของการเลี้ยง ปริมาณของแบคทีเรียในน้ำทั้งหมดจะมีค่าอยู่ระหว่าง 4.6-5.0 Log bacterial number และพบว่ามีเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4-6 Log bacterial number ซึ่งก็ไม่พบว่าปริมาณของแบคทีเรียในทุกช่วงของการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด ($P>0.05$) (ภาพที่ 42)

Total Bacterial Count (Log CFU/ml)



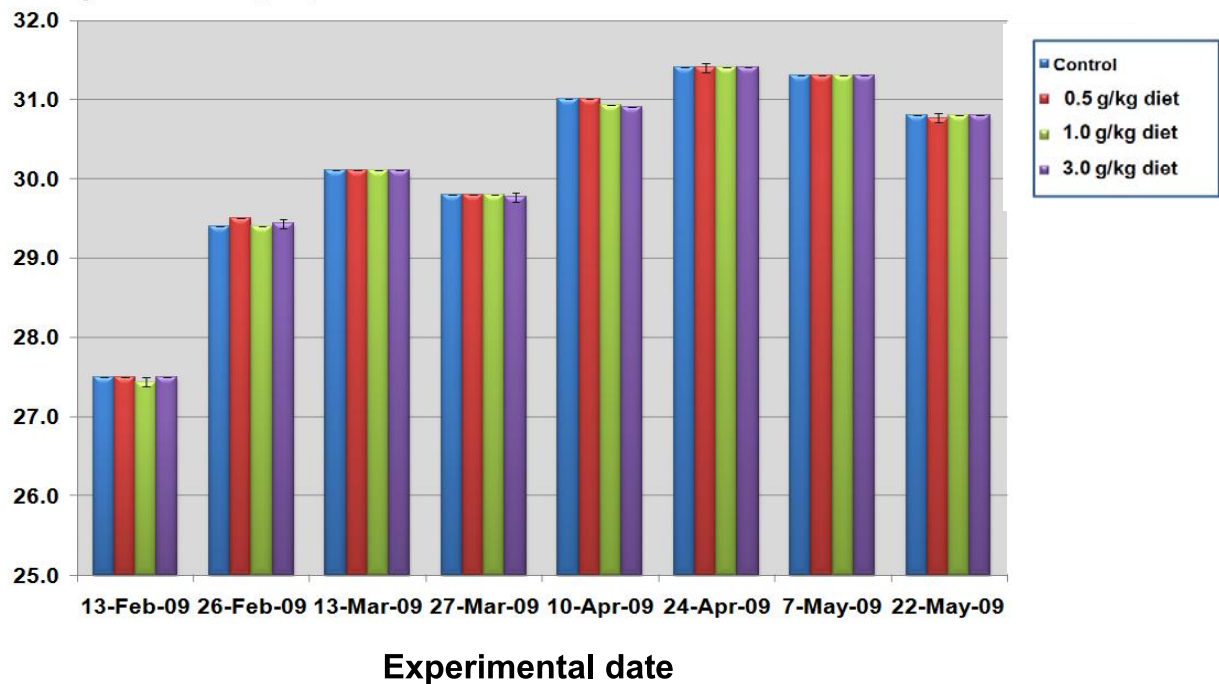
Experimental date

ภาพที่ 42 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับ

แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P<0.05$)

Temperature (°C)



ภาพที่ 43 อุณหภูมิของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับ

แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ($P < 0.05$)

5.6.2.8.8 อุณหภูมิของน้ำ

ในการวัดอุณหภูมิจะใช้เครื่องมืออัตโนมัติ DO meter (YSI) ที่สามารถวัดอุณหภูมิของน้ำได้ด้วย โดยพบว่าอุณหภูมิของน้ำเมื่อเริ่มต้นการทดลองที่ต้นเดือนกุมภาพันธ์จะอยู่ที่ระดับต่ำประมาณ 27.5 °C และเริ่มขยับสูงขึ้นในปลายเดือนเดียวกันโดยมีค่าอยู่ที่ประมาณ 29.4 °C และขยับสูงขึ้นอยู่ระหว่าง 29.7-30.2 °C ในเดือนมีนาคม ซึ่งในช่วงนี้ปลามีอัตราการกินอาหารและการเจริญเติบโตที่ดีมาก อย่างไรก็ตามเมื่อเข้าสู่เดือนเมษายน อุณหภูมิของน้ำเริ่มขยับสูงขึ้น เป็นประมาณ 31.4 °C ที่ต้นเดือนเมษายน ซึ่งส่งผลให้ปลาแสดงอาการผิดปกติออกมาหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกินอาหารที่ลดลงมากและซำร้ายยังเกิดอาการป่วยและทยอยตายเรื่อย ๆ และเพิ่มสูงขึ้นในช่วงนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิของน้ำจะมีค่าสูงสุดในปลายเดือนเมษายนต่อเนื่องไปถึงต้นเดือนพฤษภาคม และลดต่ำลงเหลือใกล้เคียงกับ 31 °C ที่สิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 43)

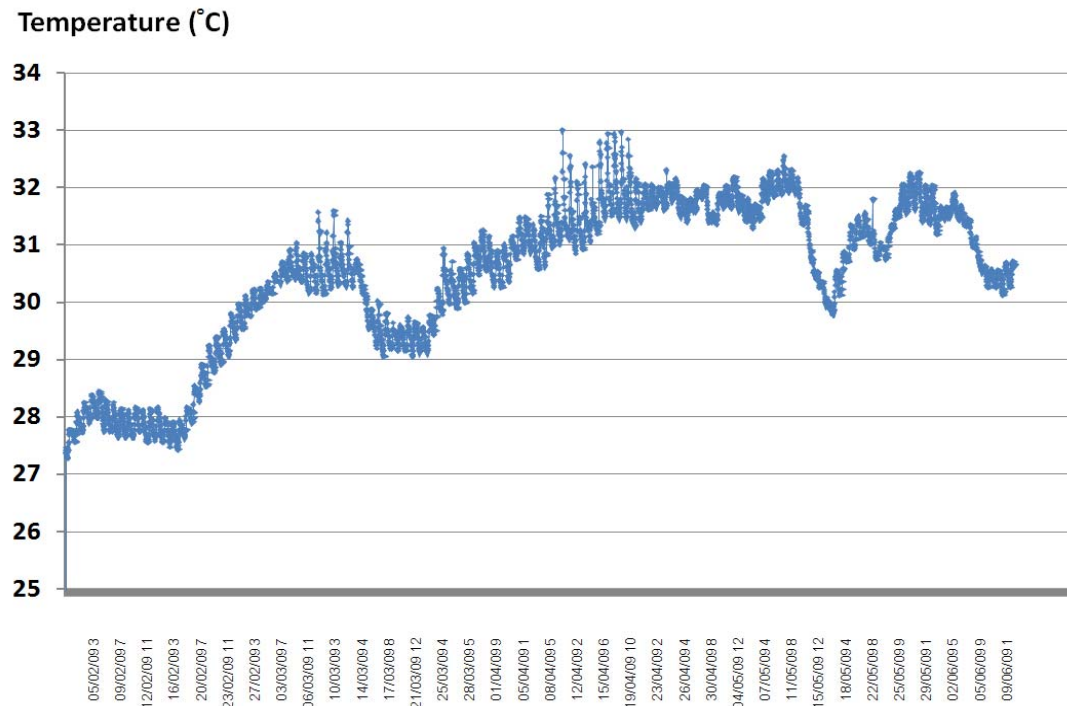
นอกจากการวัดอุณหภูมิตามปกติแล้ว ในการทดลองครั้งนี้ยังทำการวัดอุณหภูมิของน้ำและอากาศในบริเวณที่แขวนกระชัง โดยการติดตั้งอุปกรณ์ Data logger ซึ่งจะทำหน้าที่บันทึกการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งในน้ำและอากาศทุก ๆ 1 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาของการทดลอง (ภาพที่ 44) ซึ่งทำให้สามารถทราบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งของน้ำและอากาศอย่างละเอียด ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับการวัดโดยเครื่องมือ DO meter โดยเมื่อเริ่มต้นจนถึงตลอดการเลี้ยงพบว่าระหว่างการทดลองอุณหภูมิของน้ำในบริเวณกระชังมีค่าอยู่ระหว่าง $27.4-33.2^{\circ}\text{C}$ โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นช่วงเริ่มทำการทดลอง อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วงที่ระหว่าง $27.5-28.5^{\circ}\text{C}$ และเริ่มขยับสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในกลางเดือน จนถึงที่ระดับ $30.5-31.5^{\circ}\text{C}$ ในช่วงต้นเดือนมีนาคม และต่ำลงอีกครั้งในระดับ ประมาณ 29°C ในช่วงปลายเดือนมีนาคม หลังจากนั้นอุณหภูมิจะขยับสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเข้าสู่เดือนเมษายน ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิสูงสุด ประมาณ 33°C และคงที่ในระดับ 32°C จนถึงต้นเดือนพฤษภาคม อย่างไรก็ตามอุณหภูมิของน้ำจะเริ่มต่ำลงเรื่อย ๆ สู่ระดับ 30°C ในช่วงกลางเดือนพฤษภาคม หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ขยับสูงขึ้นอยู่ในช่วง $30.5-32^{\circ}\text{C}$ จนถึงกลางเดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นช่วงสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 45) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของอากาศในระหว่างการเลี้ยงแล้วพบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำมีช่วงกว้างของการเปลี่ยนแปลงต่ำกว่าอากาศมาก โดยมีค่าของอุณหภูมิของอากาศต่ำสุด 21.2°C และสูงสุด 43.6°C ในเดือนกุมภาพันธ์ในวันที่ 15 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างนี้สามารถสังเกตได้ตั้งแต่เริ่มทดลองไปจนถึงเดือนปลายเดือนเมษายน ในวันที่ 24 ซึ่งหลังจากนี้แล้ว การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของอากาศจะเริ่มแคบลงจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 46)

จากการศึกษาอย่างละเอียดสำหรับอุณหภูมิของน้ำโดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ Data logger ที่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างละเอียดในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่าสาเหตุหนึ่งที่น่าจะเป็นตัวโน้มนำให้เกิดการระบาดและการเกิดโรคในปลาในฤดูร้อนนั้นน่าจะมีสาเหตุโน้มนำมาจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิโดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิของน้ำที่เกินกว่า 31.5°C ซึ่งจากรายงานของ Ndong *et al.* (2007) ที่พบว่าการที่ปลาหมอเทศซึ่งเป็นชนิดที่ใกล้ชิดกับปลานิลนี้ อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 31°C จะมีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาโดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เช่น ความสามารถดักจับกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมในกระบวนการ Phagocytosis เช่น Phagocytic activity และ Phagocytic index มีค่าลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ และยังส่งผลต่อเนื่องให้ความสามารถในการยอมรับเชื้อโรคของปลาเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบความสอดคล้องกันของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและการเกิดโรคอย่างชัดเจน เช่น ก่อนที่ปลาจะแสดงอาการของการเกิดโรคในช่วงต้นเดือนของการเกิดโรค อุณหภูมิของน้ำเริ่มขยับสูงขึ้นกว่า 31°C อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายวันหลังจากนั้น ในวันที่ 8 เมษายน จะเป็นช่วงที่ปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม T1 เริ่มป่วยและตายมากขึ้นและตายอย่างมากต่อเนื่องจนถึงวันที่ 24 เมษายน สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำที่พบว่า เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงสุดในวันที่ 10 เมษายน โดยมีอุณหภูมิเป็น $33.01 \pm 0.84^{\circ}\text{C}$ และยังมีค่าของอุณหภูมิใกล้ 33.0°C ต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 19 เมษายน แต่ยังคงอยู่ในระดับที่สูงกว่า 31.0°C ต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 13 เดือนพฤษภาคม หลังจากนั้นอุณหภูมิ

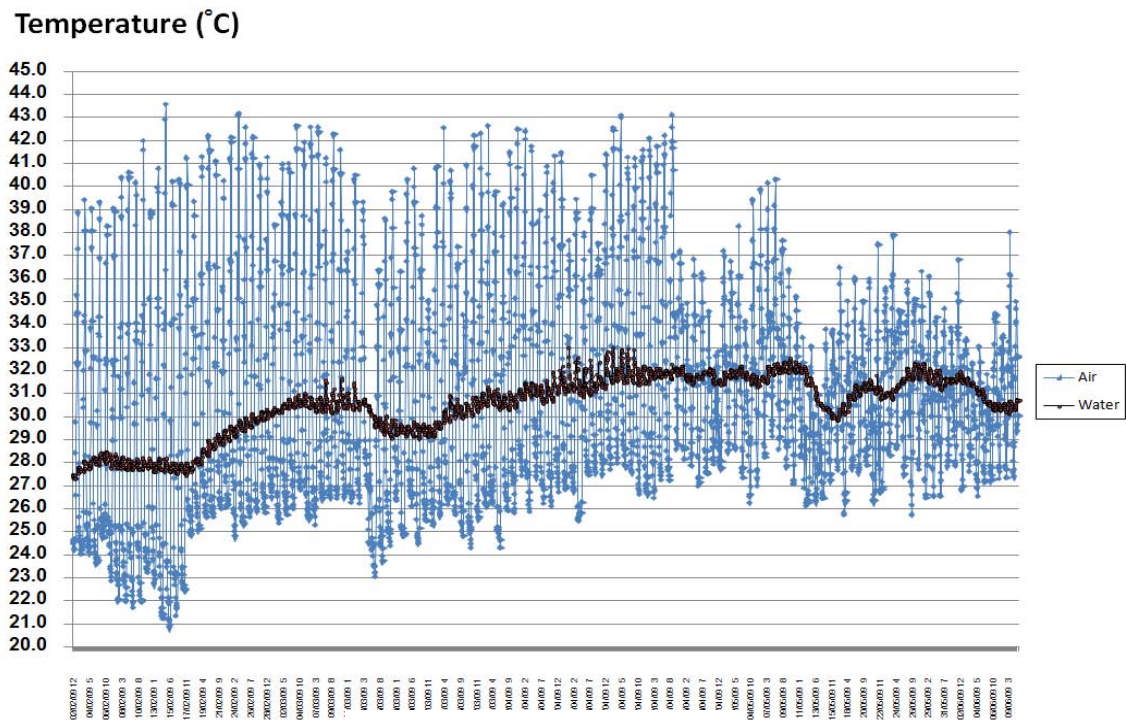
ของน้ำจะลดต่ำกว่า 30.0°C ในวันที่ 18 และเพิ่มขึ้นสูงกว่า 31.0°C อีกครั้ง ตั้งแต่วันที่ 5 เดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นช่วงเดียวกันกับปลาในกลุ่ม T2 และ T3 เริ่มตายเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 44 การติดตั้งเครื่องบันทึกอุณหภูมิ (Data logger) ในน้ำและอากาศบริเวณที่แขวนกระชังเลี้ยงปลาทดลอง



ภาพที่ 45 อุณหภูมิของน้ำในกระชังระหว่างการเลี้ยงปลานิลทดลอง



ภาพที่ 46 อุณหภูมิของน้ำในกระชังเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของอากาศระหว่างการเลี้ยงปลานิลทดลอง

5.6.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและทางอณูชีวโมเลกุล

5.6.3.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

จากการทดสอบการจำแนกแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรีย Probiotics ในการทดลองในส่วนนี้ โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาพบว่าแบคทีเรียที่ได้มีคุณสมบัติภายหลังจากการทดสอบดังตารางที่ 3 โดยพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AQBS01 มีรูปร่างเป็นแท่งยาวเดี่ยว ๆ ติดสีม่วงน้ำเงินของ Crystal violet จึงจัดเป็น Gram's positive bacteria คุณสมบัติทางชีวเคมี Oxidase test, Catalase test, Casein hydrolysis, Motility test, Voges-Proskauer (V.P.) test, Methyl red (M.R.) test, H₂S, Citrate utilization, Gelatin test และ Tween 80 ให้ผลเป็นบวก ขณะที่ O/F test, Starch, Indol production และ Nitrate test ให้ผลเป็นลบ

นอกจากนี้การสร้างกรดจากน้ำตาล Mannitol, Glycerol, Galactose, Arabinose, Salicin และ Fructose ให้ผลเป็นบวก ส่วนน้ำตาล Glucose, Sorbitol, Inositol และ Xylose ให้ผลเป็นลบ ขณะที่น้ำตาล Sucrose, Maltose และ Lactose ให้ผลไม่แน่นอน และเมื่อทำการทดสอบ Arginine dihydrolase, Lysine decarboxylase และ Ornithine ให้ผลเป็น บวก ลบและบวก ตามลำดับ

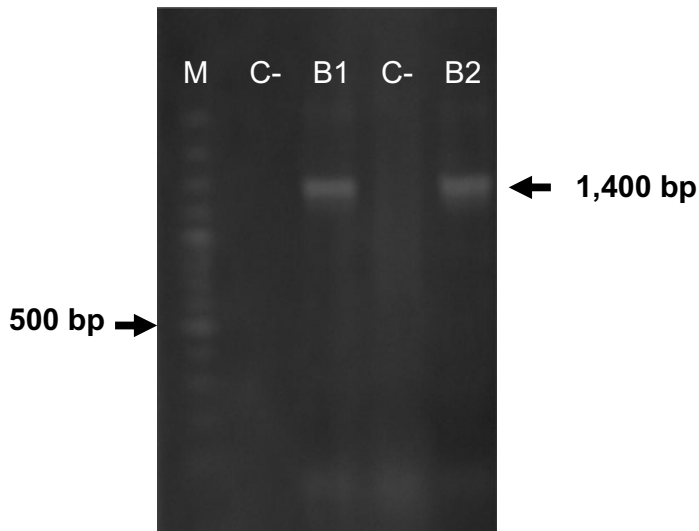
เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีเกลือแกงในระดับความเข้มข้นต่าง ตั้งแต่ 0-7% พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AQBS01 สามารถเจริญได้ในทุกความเข้มข้นของเกลือ ขณะที่การทดสอบความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิที่ 5 และ 45°C พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ ไม่สามารถเจริญอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 5°C นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Blood hemolysis) ได้อีกด้วย

เมื่อนำข้อมูลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น ไปใช้ในการจำแนกตามวิธีและการอธิบายลักษณะแบคทีเรียของ Sneath *et al.* (1986) ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ พบว่าคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ตรงกับคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*

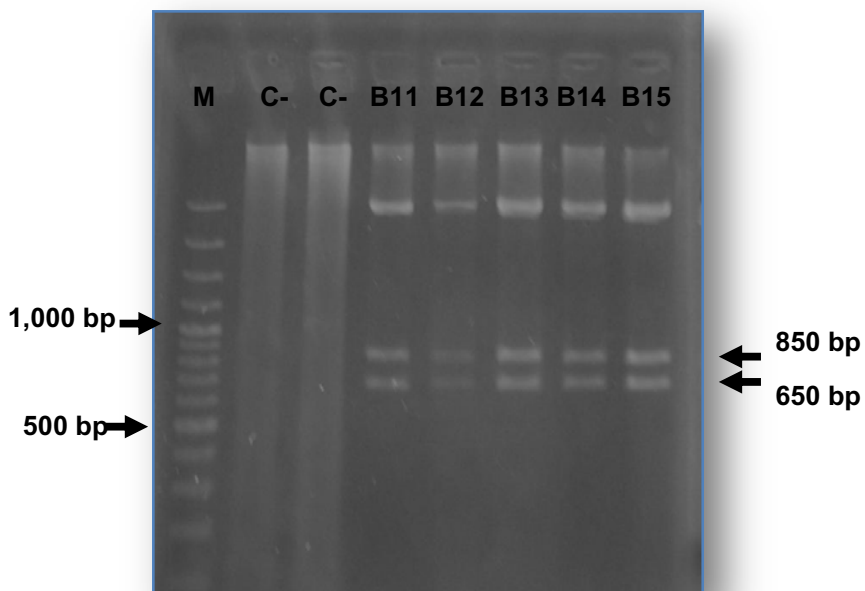
ตารางที่ 3 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus* sp.
สายพันธุ์ AQBS01 ที่ใช้เป็น Probiotic bacteria ในการทดลองครั้งนี้

คุณลักษณะที่ทำการทดสอบ		ผลการทดสอบที่ได้
Gram-stain		+ve
Shape		Bacilli
Arrangement		Single
Oxidase		+
Catalase		+
Casein hydrolysis		+
O/F test		-
Motility		+
Indol		-
Voges-Proskauer (V.P.) test		+
Methyl red (M.R.) test		+
H ₂ S		+
Citrate utilization		+
Starch		-
Gelatin		+
Acid from:	Glucose	-
	Sorbitol	-
	Sucrose	D
	Manitol	+
	Maltose	D
	Glycerol	+
	Inositol	-
	Galatose	+
	Lactose	D
	Arabinose	+
	Salicin	+
	Fructose	+
	Xylose	-
Tween 80		+
Nitrate		-
Arginine dihydrolase		+
Lysine decarboxylase		-
Ornithine		+
Growth on NaCl 0.0%		+
Growth on NaCl 3%		+
Growth on NaCl 5%		+
Growth on NaCl 6.5%		+
Growth on NaCl 7%		+
Growth at 5 °C		-
Growth at 45 °C		+
Blood hemolysis		+

หมายเหตุ: + คือการทดสอบให้ผลเป็นบวก D คือการทดสอบที่ให้ผลไม่แน่นอน
- คือการทดสอบให้ผลเป็นลบ



ภาพที่ 47 แถบ PCR Product ภายหลังการเพิ่มจำนวน DNA ที่สกัดได้จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 โดยใช้เทคนิค PCR โดยที่ M คือ 100 bp DNA Marker C- คือ Negative control, B1 และ B2 คือ PCR Product ที่ได้จากการใช้ Genomic DNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 เป็นแม่แบบ



ภาพที่ 48 Plasmid DNA ที่มีชิ้น Insert ของ PCR Product ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI โดยที่ M คือ 100 bp DNA Marker, C- คือ Negative control, B11-B15 คือ Plasmid ที่มีชิ้น Insert

```

190      200      210      220      230      240      250      260      270
ATGGCTCACC AAGGCGACGA TGCCTAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACAC TGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC

280      290      300      310      320      330      340      350      360
AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGACGAA AGTCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTTTC GGATCGTAAA GCTCTGTGT

370      380      390      400      410      420      430      440      450
TAGGGAAAGAA CAAGTGCAGAG AGTAACTGCT CGCACCTTGA CGGTACCTAA CCAGAAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA

460      470      480      490      500      510      520      530      540
ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGCTCGC AGGCGGTTTC TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC CCCGGCTCAA

550      560      570      580      590      600      610      620      630
CCGGGGAGGG TCATTGAAAA CTGGGAAACT TGAGTGCAGA AGAGGAGAGT GGAATTCCAC GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GAGATGTGGA

640      650      660      670      680      690      700      710      720
GGAACACCGA TGGCGAAAGG CGACTCTCTG GTCTGTAACT GACGCTGAGG AGCGAAAAGCG TGGGGAGCGA ACAGGATTAG ATACCTGGT

730      740      750      760      770      780      790      800      810
AGTCCACGCC GTAAACGATG AGTGCTAAGT GTTAGGGGGT TTCCGCCCCT TAGTGCTGCA GCTAACGCAT TAAGCACTCC GCCTGGGGAG

820      830      840      850      860      870      880      890      900
TACGGTCGCA AGACTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAAT TCGAAGCAAC GCGAAGAACC

910      920      930      940      950      960      970      980      990
TTACCAGGTC TTGACATCCT CTGACAACCC TAGAGATAGG GCTTTCCCTT CGGGGACAGA GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT

1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
CGTGTCTGTA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTGATC TTAGTTGCCA GCATTCAGTT GGGCACTCTA AGGTGACTGC

1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAATCA TCATGCCCCT TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GACAGAACAA

1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
AGGGCTGCAA GACCGCAAGG TTTAGCCAAT CCCATAAATC TGTTCTCAGT TCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGCTGGAAAT

1270     1280     1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350
CGCTAGTAAT CGCGGATCAG CATGCCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCCCT GTACACACCG CCCGTACAC CACGAGAGTT TGCAACACCC

1360     1370     1380     1390     1400     1410     1420     1430
GAAGTCGGTG AGGTAACTTT TATGGAGCCA GCCGCCGAAG GTGGGGCAGA TGATTGGGGT GAAGTCGTAA CAAGGTAAC

```

ภาพที่ 49 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA gene ที่ได้จากการทำ Sequencing ของ Plasmid ที่มีชิ้น Insert ของ PCR Product ที่ได้จากการใช้ Genomic DNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 เป็นแม่แบบ

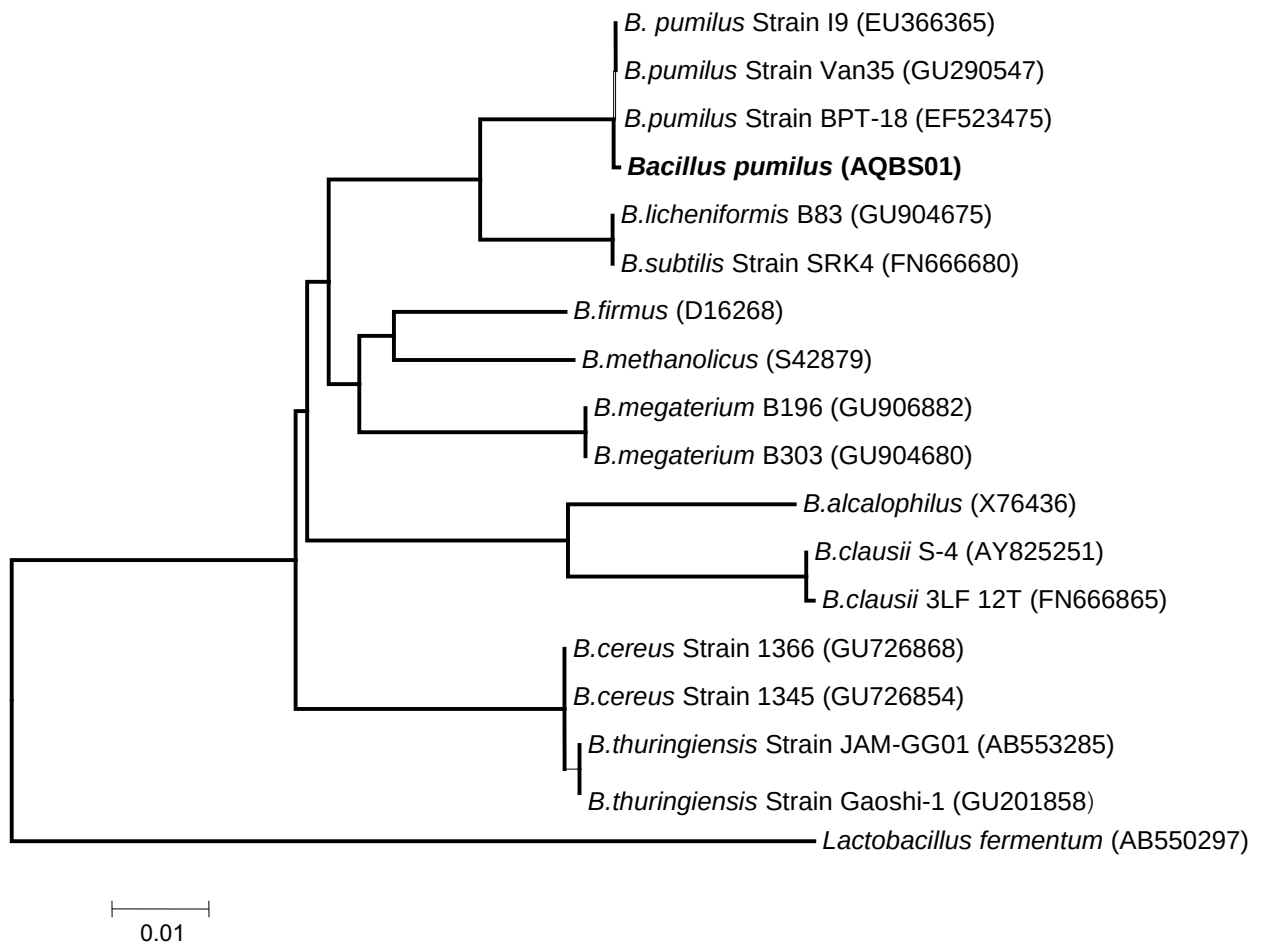
ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 โดยใช้ Specific primers ต่อยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* โดยใช้โปรแกรม BlastN

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU290547.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain Van35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%
FJ461466.1	<i>Bacillus</i> sp. SCSSS10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%
FJ032017.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain ES4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%
EF488975.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain BSH-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%
EF491624.1	<i>Bacillus pumilus</i> isolate ZB13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%
DQ275671.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain HBP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0.0	99%
EU600242.1	<i>Bacillus</i> sp. DF-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	99%	0.0	99%
AM396932.1	<i>Bacillus</i> sp. 39 partial 16S rRNA gene, isolate 39	2625	2625	99%	0.0	99%
FJ348011.1	<i>Bacillus</i> sp. GGC-P5A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	2623	99%	0.0	99%
EU624442.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain SS-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	2623	99%	0.0	99%

Identity (%)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Strains of <i>Bacillus</i> spp.																		
1. <i>Bacillus</i> AQS01		91.8	94.3	94.3	91.4	91.4	94.8	96.8	94.9	94.8	93.8	99.8	99.8	99.8	96.8	94.1	94.1	86.7
2. <i>B. alcalophilus</i> (X76436)	91.9		92.5	92.5	95.0	94.9	92.2	92.3	92.2	92.3	92.5	91.9	91.9	91.9	92.3	92.4	92.4	85.9
3. <i>B. cereus</i> Strain 1366 (GU726868)	94.3	92.7		100.0	92.1	92.2	93.9	94.2	94.7	94.7	93.8	94.4	94.4	94.4	94.2	99.8	99.8	87.2
4. <i>B. cereus</i> Strain 1345 (GU726854)	94.3	92.7	100.0		92.1	92.2	93.9	94.2	94.7	94.7	93.8	94.4	94.4	94.4	94.2	99.8	99.8	87.2
5. <i>B. clausii</i> S-4 (AY825251)	91.6	95.0	92.4	92.4		99.8	93.0	92.5	92.2	92.3	93.6	91.5	91.5	91.5	92.5	92.0	92.0	85.3
6. <i>B. clausii</i> 3LF12T(FN666865)	91.5	94.9	92.4	92.4	99.8		93.0	92.6	92.3	92.4	93.6	91.5	91.5	91.5	92.6	92.1	92.1	85.3
7. <i>B. firmus</i> (D16268)	94.9	92.4	94.0	94.0	93.3	93.2		94.7	95.8	95.9	96.0	94.9	94.9	94.9	94.7	93.7	93.7	87.4
8. <i>B. licheniformis</i> B83 (GU904675)	96.9	92.3	94.2	94.2	92.6	92.6	94.7		93.8	93.8	95.0	96.9	96.9	96.9	100.0	94.0	94.0	86.1
9. <i>B. megaterium</i> B196 (GU906882)	95.0	92.5	94.7	94.7	92.6	92.6	96.0	93.9		99.9	95.4	95.0	95.0	95.0	93.8	94.7	94.7	87.5
10. <i>B. megaterium</i> B303 (GU904680)	94.9	92.6	94.8	94.8	92.7	92.7	96.0	93.9	99.9		95.4	94.9	94.9	94.9	93.8	94.7	94.7	87.4
11. <i>B. methanolicus</i> (S42879)	94.0	92.7	93.9	93.9	93.9	93.8	96.1	95.1	95.6	95.6		93.9	93.9	93.9	95.0	93.7	93.7	86.6
12. <i>B. pumilus</i> Strain BPT-18(EF523475)	99.8	91.9	94.4	94.4	91.6	91.5	94.9	96.9	95.0	94.9	94.0		100.0	100.0	96.9	94.3	94.3	86.9
13. <i>B. pumilus</i> Strain I9 (EU366365)	99.8	91.9	94.4	94.4	91.6	91.5	94.9	96.9	95.0	94.9	94.0	100.0		100.0	96.9	94.3	94.3	86.9
14. <i>B. pumilus</i> Strain Van35 (GU290547)	99.8	91.9	94.4	94.4	91.6	91.5	94.9	96.9	95.0	94.9	94.0	100.0			96.9	94.3	94.3	86.9
15. <i>B. subtilis</i> Strain SRK4 (FN666680)	96.9	92.3	94.2	94.2	92.6	92.6	94.7	100.0	93.9	93.9	95.1	96.9	96.9	96.9		94.0	94.0	86.1
16. <i>B. thuringiensis</i> Strain JAM-GG01 (AB553285)	94.2	92.5	99.8	99.8	92.2	92.2	93.8	94.0	94.7	94.8	93.7	94.3	94.3	94.3	94.0		100.0	87.0
17. <i>B. thuringiensis</i> Strain Gaoshi-1 (GU201858)	94.2	92.5	99.8	99.8	92.2	92.2	93.8	94.0	94.7	94.8	93.7	94.3	94.3	94.3	94.0	100.0		87.0
18. <i>Lactobacillus fermentum</i> (AB550297)	86.8	86.2	87.2	87.2	85.6	85.5	87.4	86.5	87.5	87.5	86.7	86.9	86.9	86.9	86.5	87.1	87.1	
	Similarity (%)																	

5.6.3.2.2 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 และของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. อีก 10 ชนิด 17 Strains และใช้ยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* เป็น Control (out group) ไปทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยทำการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม Mega Version 4 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16s rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *B. pumilus* Strain I9, *B. pumilus* Strain Van35 และ *B. pumilus* Strain BPT-18 ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ ยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *B. licheniformis* B83 และ *B. subtilis* Strain SRK4 ซึ่งอยู่ในกลุ่มย่อยกับ แบคทีเรีย *B. firmus* และ *B. megaterium* ที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย *B. alcalophilus* และ *B. clausii* ซึ่งถูกจัดให้อยู่คนละกลุ่มใหญ่กับกลุ่มแบคทีเรีย *B. cereus* และ *B. thuringiensis* ตามลำดับ (ภาพที่ 50)



ภาพที่ 50 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 และ *Bacillus* spp. อีก 10 ชนิด 17 Strains *Bacillus* sp. โดยการสร้าง Phylogenetic tree

6. วิจัยรณัผลการทดลอง

6.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01

ผลจากการศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ที่นำมาใช้เป็นแบคทีเรีย Probiotics ในการศึกษารั้งนี้ทั้งโดยอาศัยเทคนิคทางจุลชีววิทยา ซึ่งได้แก่ การศึกษาสัณฐานวิทยา การศึกษาความสามารถในการทำปฏิกิริยาทางชีวเคมี และอนุชีวโมเลกุลโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA พบว่า การใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาจากการศึกษารั้งนี้ ทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. AQBS01 มีรูปร่างเป็นแท่งยาวเดี่ยว ๆ ติดสีม่วงน้ำเงินของ Crystal violet จึงจัดเป็น Gram's positive bacteria คุณสมบัติทางชีวเคมี Oxidase test, Catalase test, Casein hydrolysis, Motility test Voges-Proskauer (V.P.) test, Methyl red (M.R.) test, H₂S, Citrate utilization, Gelatin test และ Tween 80 ให้ผลเป็นบวก ขณะที่ O/F test, Starch, Indol production และ Nitrate test ให้ผลเป็นลบ นอกจากนี้การสร้างกรดจากน้ำตาล Manitol, Glycerol, Galatose, Arabinose, Salicin และ Fructose ให้ผลเป็นบวก ส่วนน้ำตาล Glucose, Sorbitol, Inositol และ Xylose ให้ผลเป็นลบ ขณะที่น้ำตาล Sucrose, Maltose และ Lactose ให้ผลไม่แน่นอน และเมื่อทำการทดสอบ Arginine dihydrolase, Lysine decarboxylase และ Ornithine ให้ผลเป็น บวก ลบและ บวก ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีเกลือแกงในระดับความเข้มข้นต่างตั้งแต่ 0-7% พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. AQBS01 สามารถเจริญได้ในทุกความเข้มข้นของเกลือ ขณะที่การทดสอบความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิที่ 5 และ 45°C พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ ไม่สามารถเจริญอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 5°C นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Blood hemolysis) ได้อีกด้วย ซึ่ง Sneath *et al.* (1986) ได้อธิบายว่าลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้ตรงกับคุณลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวก *B. pumilus* ซึ่งให้ผลคล้ายกับการศึกษาของ Bottone and Peluso (2003) ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ พบว่า นิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 มีทั้งความเหมือนและความคล้ายคลึงกับยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* อย่างชัดเจน สอดคล้องกันกับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ทำให้ทราบได้อย่างชัดเจนว่า ยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ยังถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *Bacillus pumilus* อย่างชัดเจน

ซึ่งผลการศึกษาข้างต้นนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ที่นำมาใช้เป็นแบคทีเรีย Probiotics ในการศึกษารั้งนี้เป็นแบคทีเรียชนิด *Bacillus pumilus* นั่นเอง ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ได้มีการรายงานอย่างกว้างขวางว่าเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการนำมาเป็น Probiotic bacteria ที่สามารถใช้ได้ทั้งในคนและสัตว์ เช่น การศึกษาของ Bottone and Peluso (2003) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของสารสกัดจาก แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* (MSH) พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค 2 ชนิดคือ *Mucor* และ *Aspergillus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์

และการขยายตัวของเส้นใยของเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ โดยทำให้ผนังเซลล์ (Cell wall) เกิดการแตกเป็นรอยร้าวเป็นหย่อม ๆ ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้นานถึง 8 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า *B. pumilus* นี้ สามารถยับยั้ง แบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์ได้อีกหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Ewinia herbicola*, *Klebsiella pneumonia* รวมทั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* อีกด้วย ในทางตรงกันข้าม แบคทีเรียในกลุ่ม β -haemolysin producing bacteria เช่น *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* รวมทั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes* และ *S. agalactiae* กลับพบว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Mucor* เลย เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Munimbazi and Bullerman (1998a) ที่พบว่า สาร Anti-fungal metabolites ที่สร้างจาก *B. pumilus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เส้นใย (Spore germination) ของเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* และยังสามารถยับยั้งการสร้างสาร Aflatoxin ของเชื้อโรค *Aspergillus parasiticus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Munimbazi and Bullerman (1998b) ได้รายงานว่า นอกจากนี้ สาร Metabolite ที่สร้างจาก *B. pumilus* ยังสามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Mucoraceae* และ *Aspergillus* อีกหลายชนิด เช่น *Aspergillus flavus*, *A. fumigates* และ *A. terreus* ได้อีกด้วย

6.2. ผลของการเสริมแบคทีเรีย Probiotics *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ต่อความปลอดภัย การเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของปลาในในห้องปฏิบัติการ

6.2.1 ความปลอดภัยและการเจริญเติบโต

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. เพื่อนำมาใช้เป็น Probiotic bacteria กันอย่างกว้างขวางทั้งในคนและสัตว์บก รวมทั้งสัตว์น้ำด้วย อย่างไรก็ตามประเด็นหนึ่งที่ต้องนำมาพิจารณาประกอบก่อนการนำไปประยุกต์ใช้คือ ความปลอดภัยของแบคทีเรีย เนื่องจากในปัจจุบันพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* หลายชนิด สามารถสร้างสารพิษและจัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค (Pathogenic bacteria) เช่น *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycoides* และ *B. weihenstephanensis* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. cereus* นั้น เป็นแบคทีเรียที่พบว่าสามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรง (Patel et al. 2009) โดยแบคทีเรียชนิดนี้ส่วนใหญ่ หลายสายพันธุ์ สามารถสร้าง Enterotoxin ที่มีพิษสูงได้ (Granum and Lund, 1997; Granum, 2002; From et al. 2005)

อย่างไรก็ตามในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในการศึกษาข้างต้นเป็นการสร้างความมั่นใจในเบื้องต้นว่า แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 เป็นแบคทีเรีย *B. pumilus* ซึ่งก็มีรายงานว่าหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อ Host ได้เช่นเดียวกัน เช่น Hoult and Tuxford (1991) ที่พบว่า *B. pumilus* สายพันธุ์ M11 และ M38 สามารถสร้างสารพิษบางชนิดที่ทำให้เซลล์ของสัตว์ทดลอง (*in vitro*) ตายได้ในระดับที่

แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาความปลอดภัยของการเสริม *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหารปลานิลในห้องปฏิบัติการ พบว่า จากการทดลอง ซ้ำถึง 3 ครั้ง [(การเลี้ยงปลาเพื่อทดสอบความต้านทานโรคเพื่อใช้ทดสอบความคุ้มโรคโดย 1) การแช่ 2) การฉีดและ 3) การป้อนเข้าทางช่องปาก]] ปลาที่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหารตั้งแต่ 0.5-5 g/อาหาร 1 กิโลกรัม นั้น ไม่มีผลทำให้ปลานิลทดลองขนาดประมาณ 50 กรัมเกิดการผิดปกติหรือป่วยตายได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าภายหลังที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแล้วเป็นเวลานานถึง 1 เดือน ผลจากการสังเกตอัตราการตายสะสมของปลาทดลองพบว่า ปลาทุกกลุ่มมีอัตราการรอดตายสูงกว่า 93% ภายหลังสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 1) โดยปลาบางส่วนที่ตายนั้นส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากการเกิดภาวะความเครียดในช่วงแรก ๆ ของการทดลอง โดยจากการสังเกต พบว่า ปลาบางตัวจะกัดและวิ่งไล่กันในตู้ทดลอง ทำให้เกิดการชำเล็ดและบาดแผลบอบช้ำตามลำตัว เป็นผลให้ปลาเฉื่อยชาไม่กินอาหาร แสดงความผิดปกติเรื้อรังและตายในที่สุด แต่เมื่อนำเอาตับ ม้ามหรือไต ของปลาที่ใกล้ตายเหล่านี้ไปเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อปรากฏว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้น นอกจากนี้เมื่อสังเกตพฤติกรรมและลักษณะความผิดปกติภายนอกและภายในของปลาทุกกลุ่ม ไม่พบความผิดปกติใด ๆ จากการสังเกตดังกล่าว และเมื่อนำเอาลำไส้ของปลาทดลองทุกกลุ่มไปตรวจจุลพยาธิ ก็ไม่พบความผิดปกติใด ๆ ในลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน ซึ่งให้ผลคล้ายกันกับรายงานของ Patel *et al.* (2009) ที่พบว่าการเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหารปลา Surfi tetra ในอัตรา 100 mg แบคทีเรีย/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 60 วัน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองผสมแบคทีเรียไม่ได้แสดงอาการหรือความผิดปกติออกมาให้เห็นแต่อย่างใด ทั้งในส่วนของการเจริญเติบโตโดยสังเกตจากน้ำหนักและความยาวก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) แต่มีปลาจำนวนน้อยบางส่วนที่ตายเนื่องจากสภาวะการเกิดความเครียดระหว่างการทดลองในตู้ทดลองเท่านั้น นอกจากนี้ผลจากการศึกษาเบื้องต้นดังกล่าวยังได้แสดงให้เห็นว่า การผสมแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 มีความปลอดภัยต่อปลานิลทดลองตลอดระยะเวลา 1 เดือน โดยไม่พบความผิดปกติภายนอกหรือการเกิดโรครุนแรงระหว่างการทดลองให้อาหาร นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *Bacillus pumilus* ยังสามารถแยกได้จากปลาหรือสิ่งมีชีวิตที่มีสุขภาพแข็งแรงหรือมีสภาพปกติโดยทั่วไปเช่น Ivanova *et al.* (1992) สามารถแยกแบคทีเรีย *B. pumilus* ได้จาก อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonads) ของปลานิลปกติ รวมทั้งสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลหลายชนิด เช่นเดียวกับ Ghosh *et al.* (2002) ที่สามารถแยกแบคทีเรีย *B. pumilus* จากปลาอีสกเทศ (*Labeo rohita*) ที่แข็งแรงได้เช่นเดียวกัน ซึ่งการศึกษาเหล่านี้น่าจะเป็นเครื่องยืนยันถึงความปลอดภัยของเชื้อ *B. pumilus* ได้เป็นอย่างดี

และเมื่อพิจารณาถึงการเจริญเติบโตเมื่อพิจารณาจากความยาวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาในแต่ละกลุ่มกลับพบว่า ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการไม่พบว่าปลาในชุดควบคุมและปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารทุกกลุ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย *B. pumilus* นี้ไม่ได้มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญของปลาได้หรือเป็นไปได้ว่า ช่วงระยะเวลาเพียง 30 วัน ของการทดลอง อาจจะสั้นเกินกว่าที่จะเห็นผลของแบคทีเรีย *B. pumilus* ต่อการเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในส่วนนี้ยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาความยาวของลำไส้ของปลาทดลองที่พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองเช่นกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางจุลพยาธิของลำไส้สามารถพบข้อแตกต่างที่สำคัญ และ

น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีความยาวของชั้น Mucosa ค่อนข้างสั้นกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ในส่วนการศึกษาผลของ *B. pumilus* ต่อการเจริญเติบโตของปลานิลนั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด แต่สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ นั้น สามารถพบได้โดยทั่วไป เช่น การศึกษาของ Zhou *et al.* (2009) ที่พบว่าการใช้แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* และ *Rhodopseudomonas palustris* โดยการสาดลงไปในน้ำที่ใช้เลี้ยงสามารถเสริมสุขภาพปลาได้เป็นอย่างดี และยังพบว่าการใช้แบคทีเรียในลักษณะดังกล่าวสามารถทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง Irianto *et al.* (2002a) ได้รายงานว่าการเกิดโรคที่เกิขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากการที่ Probiotics แบคทีเรียบางชนิดจะมีความสามารถกระตุ้นความอยากกินอาหาร การที่มีความสามารถในการสร้างสารที่มีความจำเป็นต่อร่างกายของ Host เช่น Vitamins บางชนิด หรือมีความสามารถในการลดความเป็นพิษของสารบางชนิด รวมไปถึงการย่อยสลายหรือทำลายสารที่ย่อยยากบางชนิดอีกด้วย

6.2.2 ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ผลจากการศึกษาการผสมแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลขนาดประมาณ 50 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน ในห้องปฏิบัติการ ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ปลาที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหาร จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แบบที่ไม่จำเพาะเจาะจงได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน โดยสังเกตจากกิจกรรมในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ซึ่งได้แก่ ค่า Phagocytic activity (PA) ที่พบว่าตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง ปลาที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหาร ทุกความเข้มข้น จะมีค่า PA สูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุก ๆ สัปดาห์ ขณะที่ค่า Phagocytic index (PI) นั้นจะพบความแตกต่างในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองเท่านั้น โดยยังพบอีกว่าเฉพาะปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย Probiotics ในอาหาร ตั้งแต่ 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเท่านั้น ที่มีค่า PI แตกต่างกับปลาในกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่า Phagocytic efficiency (PE) กลับพบว่า ปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารมีแนวโน้มของค่า PE สูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมในทุกสัปดาห์ โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย Probiotics ในอาหารในอัตรา 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งให้ผลเป็นไปในทางเดียวกันกับการวัดค่า Superoxide anion (O_2^-) ที่พบว่าเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรีย Probiotics ในอัตรา 1-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมที่มีการผลิต O_2^- สูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมในทุก ๆ สัปดาห์

ผลการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่า *Bacillus pumilus* AQBS01 นั้นสามารถกระตุ้นกิจกรรมการกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งให้ผลคล้ายกับการทดลองของ Abd El-Rhaman *et al.* (2009) ที่พบว่า การเสริมแบคทีเรีย Probiotics *Micrococcus luteus* ในอาหารให้ปลานิลทดลองกินเป็นเวลา 90 วัน สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดขาว ปริมาณ Haemoglobin, ค่า Haematocrit ให้มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมแบคทีเรีย

Micrococcus luteus ในอาหารยังทำให้ปลาชนิดทดลองมีความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophilla* ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอีกด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Taoka et al. (2006) ที่พบว่าการเสริมแบคทีเรีย Probiotics ในอาหารในรูปแบบเซลล์เป็นและเซลล์ตายสามารถยกระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะ Lysozyme activity, กลไกการเคลื่อนตัวของ Neutrophils และ Plasma bactericidal activity ได้ดีกว่าปลาในกลุ่มควบคุม และยังพบว่าการให้แบคทีเรีย Probiotics ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต มีแนวโน้มในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดทดลองได้ดีกว่า การให้โดยใช้เซลล์ตายผสมอาหาร รวมถึงการใส่ลงไปใต้น้ำอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้ปลาที่ได้รับ Probiotics ในอาหารดังกล่าวสามารถต้านทานโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในปลาชนิดอื่นหลายการทดลอง เช่น การใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* (Pirarat et al. 2006) การใช้แบคทีเรีย *Enterococcus faecium* (Wang et al. 2008) และการใช้แบคทีเรีย *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* และ *Rhodopseudomonas palustri* (Zhou et al. 2009) เหล่านี้ได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่าการใช้แบคทีเรีย Probiotics สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามก็มีบางรายงานว่า การใช้ Probiotics บางชนิดก็ไม่สามารถชักนำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดใดสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นได้ เช่น การศึกษาของ Shelby et al. (2006) ที่พบว่า การเสริมแบคทีเรีย Commercial probiotics ลงในอาหารไม่สามารถเพิ่มความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดใด ซึ่งให้คล้ายกับการทดลองของ Gunther and Montealegre (2004) ที่พบว่า การเสริม *Bacillus subtilis* ลงในอาหารไม่สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดใดมีการตอบสนองได้ดีขึ้น เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้ Probiotics ในปลาชนิดหรือปลาชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น ต้องคำนึงถึงชนิดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้วยเนื่องจาก Probiotics บางชนิดนั้นต้องการสภาวะหรือ Host ที่ค่อนข้างจำเพาะในการดำรงชีวิตหรือการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน

ในส่วนของการใช้ *B. pumilus* เป็น Probiotics ในปลาชนิดนั้นถือว่ายังมีจำกัดมากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มีเพียงรายงานก่อนหน้านี้เพียงรายงานเดียวเท่านั้น คือ การศึกษาของ Aly et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษาการใช้แบคทีเรียแบคทีเรียกว่า 80 isolates พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ซึ่งได้แก่ *B. pumilus*, *B. firmus* และ *Citrobacter freundii* ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปผสมอาหารให้ปลาลงกินเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำปลาทดลองไปทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับ *B. pumilus* ในอาหารในระดับต่ำ (10^7 Cells/g) มีอัตราการรอดตายประมาณ 80% สูงกว่าปลาควบคุมและปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus firmus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 7 และ 14 ของการได้รับอาหารตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total leukocyte count; TLC) ของปลาในแต่ละกลุ่มพบว่าช่วงระยะเวลาตั้งแต่อ่อนการให้อาหาร จนถึงสัปดาห์ที่ 2 ของการให้อาหารทดลอง พบว่าปลาในแต่ละกลุ่มมีค่า TLC ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 และ 4 ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารใน

อัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า TLC ต่ำกว่าปลาในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากการรายงานหลาย ๆ รายงานก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของ Irianto *et al.* (2002b) และ Irianto *et al.* (2003) ที่ได้ทำการศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Vibrio fluvialis*, *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila* และ *Carnobacterium* sp. ในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), และ Newaj-Fyzul *et al.* (2007) ที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) เช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่าภายหลังการให้แบคทีเรียเหล่านี้กับปลาทดลองแล้วจะมีผลทำให้ปลามีการผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) ออกมามากขึ้นและแตกต่างกับปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามก็มีการรายงานที่แตกต่างออกไปจากศึกษาเหล่านี้และให้ผลคล้ายกันกับการศึกษาในครั้งนี้คือ จากการรายงานของ Pieters *et al.* (2008) ที่ได้ทำการทดลองใช้แบคทีเรีย *Aeromonas sobria* และ *Brochothrix thermosphacta* ในปลา Rainbow trout และการศึกษาของ Salinas *et al.* (2006) ที่ทำการทดลองใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* และ *Bacillus subtilis* (Pdp11, 51M6) ในปลา *Sparus aurata* ที่พบว่า การให้แบคทีเรียดังกล่าวมีผลทำให้ปลาทดลอง การสร้าง Leukocytes ออกมามากในช่วงแรกและลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองมีความแตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากหลายส่วน โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมของการวิจัย เช่น ชนิดของเชื้อ ชนิดของปลา รูปแบบและปริมาณการให้ รวมถึงระยะเวลาการให้ด้วย อาจเป็นผลทำให้การทดลองมีผลที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามในการศึกษาในครั้งนี้จะพบว่า ปริมาณ TLC ลดลงเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับสูงคือ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เท่านั้น ซึ่งลดลงเฉพาะในช่วง 2 สัปดาห์สุดท้ายของการทดลองเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อให้แบคทีเรีย Probiotics ในอาหารอย่างต่อเนื่องอาจเป็นผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลามีการสร้าง TLC ออกมามากในช่วงแรกและเมื่อระบบภูมิคุ้มกันมีความคุ้นเคยต่อเชื้อที่ให้ดังกล่าวและการได้รับแบคทีเรีย Probiotics ไม่ได้ทำให้เกิดผลทางลบต่าง ๆ เช่นการเกิดโรค ระบบร่างกายของปลาจะมีการลดระดับการสร้าง TLC ในที่สุด (Pieters *et al.* 2008, Salinas *et al.* 2006)

6.2.3 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ระหว่างการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ทั้งหมด (Total bacterial count; TBC) และจำนวนแบคทีเรียที่ทนต่อการใช้เทคนิค Heat-cold shock เพื่อตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 อย่างคร่าว ๆ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้จะมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนเช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การได้รับอุณหภูมิสูง ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ในช่วงสัปดาห์แรกภายหลังจากการให้อาหารทดลองปริมาณ TBC ของปลาในแต่ละกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม กลับมีค่า TBC แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 และ 4 ปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 1 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า TBC สูงกว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กิโลกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ขณะที่การศึกษาแบคทีเรียที่ทนต่อการใช้เทคนิค Heat-cold shock เพื่อตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* อย่างคร่าว ๆ กลับพบว่า เมื่อเริ่มต้นการทดลองก่อนการให้แบคทีเรีย Probiotics ในอาหาร ระดับของแบคทีเรียที่นับได้ในแต่ละกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันมากและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งก็ไม่น่าพบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองแต่อย่างใด จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ในปลาปกติโดยทั่วไปแล้ว จะมีประชากรของแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่มีความหลากหลายอยู่แล้ว ซึ่งบางส่วนก็มีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อความร้อนและสร้างสปอร์ได้เช่นเดียวกับ *Bacillus pumilus* AQBS01 ที่ใช้เป็น probiotics ในการทดลองนี้เช่นกัน ทำให้เป็นการยากที่จะสรุปว่าภายหลังจากผสม *Bacillus pumilus* ในอาหารเลี้ยงปลาแล้วจะมี *Bacillus pumilus* อยู่ในสัดส่วนเท่าใดจากประชากรแบคทีเรียทั้งหมด อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Duc *et al.* (2004) พบว่า *Bacillus pumilus* เป็นแบคทีเรียที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมภายในลำไส้ได้เป็นอย่างดี และสามารถคงทนและยึดเกาะในลำไส้ของหนูทดลองได้นานอย่างน้อย 15 วัน ภายหลังจากการผสมอาหารให้หนูทดลองกินเป็นเวลา 18 วัน สำหรับในปลานั้นยังไม่มีรายงาน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อเนื่องในประเด็นนี้เพื่อที่จะสร้างความเชื่อมั่นว่า *Bacillus pumilus* สามารถดำรงชีวิตได้ในระบบทางเดินอาหารของปลาได้จริง อย่างไรก็ตามเมื่อกล่าวถึงความคงทนของแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อผสมลงในอาหารปลานิลพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้จะสามารถคงทนและมีชีวิตรอดในอาหารเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 และ 25°C นานถึง 5 สัปดาห์ โดยที่จำนวนของแบคทีเรียจะเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อยเท่านั้น Aly *et al.* (2008)

6.2.4 ผลของการเสริมแบคทีเรีย Probiotics *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของปลานิลในห้องปฏิบัติการ

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของการให้แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 0.5-5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ต่อการต้านทานโรค *S. agalactiae* โดยทดสอบใน 3 ลักษณะทั้งการแช่ ฉีด และให้ทางระบบทางเดินอาหารพบว่า การทดสอบโดยการแช่สามารถนำมาทำให้ปลาเกิดโรคได้น้อยที่สุด ซึ่งแตกต่างกับการทดสอบโดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องและการป้อนผ่านทางระบบทางเดินอาหารที่สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดโรคได้ดีกว่า ซึ่งพบว่าอัตราการตายของปลาจากการทดสอบทั้งสองวิธีจะมีค่าสูงสุดประมาณ 45-50% ซึ่งสอดคล้องกับ Suanyuk *et al.* (2008) ที่พบว่าการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* สามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลทดลองเกิดการตายได้ตั้งแต่ 40-60% และผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของการให้แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหารในอัตรา 0.5-5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ต่อการต้านทานโรค *S. agalactiae* ในปลานิลในห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบด้วยวิธีการฉีดและให้ผ่านระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มที่ดีที่สามารถต้านทานการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า *Bacillus pumilus* AQBS01 หรือ *Bacillus pumilus* สามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะ เชื้อ *S. agalactiae* รวมถึง เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งได้แก่ *Aeromonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่สำคัญในปลานิลในปัจจุบัน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียในกลุ่มของ เชื้อ *Bacillus* มีคุณสมบัติสำคัญในการต้านทานแบคทีเรีย (Antimicrobial properties) ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Yilmaz *et al.* 2006) อันเป็นผลมาจากความสามารถในการสร้างโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียในหลาย ๆ กลุ่มออกมานั่นเอง

นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* ส่วนใหญ่ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายหรือลดความรุนแรงของ Active oxygen molecules หรือสารที่เป็นอนุมูลอิสระ (Free radicals) ซึ่งได้แก่ H_2O_2 , O_2^- , OH^- และ 1O_2 เป็นต้น ที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึม ที่สามารถทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปได้ ซึ่งหากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารก็จะเป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้คุณสมบัติในการยึดเกาะกับเซลล์ของ Host ในระบบทางเดินอาหาร ก็เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของแบคทีเรียที่เป็น Probiotics ที่ดี ซึ่งจะส่งผลให้แบคทีเรียเหล่านี้สามารถยึดเกาะและสร้างกลุ่มประชากร (Colonization) เพื่อป้องกันกระบวนการกำจัดเซลล์ในระบบทางเดินอาหารในกระบวนการ Peristalsis ซึ่งจะส่งผลให้มีความสามารถในการแก่งแย่งเพื่อสร้างประชากรของแบคทีเรียในระบบนิเวศของทางเดินอาหารนั่นเอง (Alander *et al.* 1997, Freter, 1992) นอกจากนี้ความสามารถในการยึดเกาะดังกล่าวยังส่งผลให้เกิดการลดอัตราการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ โดยแบคทีเรีย Probiotics จะมีส่วนทำให้เกิดการลดการจับตัวของเชื้อโรคกับโปรตีนตัวรับ (Receptors) ของ Host อย่างจำเพาะเจาะจง (Specific blockage) บนผิวเซลล์ของเซลล์ Host อีกด้วย (Otero *et al.* 2004) นอกจากนี้ แบคทีเรียที่เป็น Probiotics บางชนิดจะมีความสามารถในการสร้างโปรตีนในกลุ่ม Protease ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการย่อยสลายโปรตีนและยังช่วยป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมโดยการตัดหรือย่อยสลายโปรตีนที่ใช้ในการจับกับเซลล์ของ Host (Receptor sites) บนเซลล์เยื่อผิวของระบบทางเดินอาหารอีกด้วย (Czerucka and Rampal, 2002; Patel *et al.* 2009)

ผลจากการรายงานที่ผ่านมาพบว่าการเสริมแบคทีเรีย Probiotics ลงในอาหารสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นผลมาจาก Probiotic bacteria จะทำหน้าที่ในการปรับสมดุลของแบคทีเรียและสามารถลดแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร และกระตุ้นการดูดซึมอาหารให้ดีขึ้นอีกด้วย (Fuller, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* บางชนิด ยังสามารถกระตุ้นความอยากกินอาหาร เสริมสร้างสารอาหารจำเป็นบางอย่างเช่น วิตามิน และยังช่วยลดความเป็นพิษของสารพิษบางชนิดอีกด้วย (Irianto and Austin, 2002b)

นอกจากการกระตุ้นการทำงานของ Phagocytes แล้ว ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงแล้ว ในปัจจุบันได้มีรายงานว่า *B. pumilus* ยังสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีการตอบสนองในหลาย ๆ ด้าน เช่น การกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญหลายหลายชนิดเพิ่มขึ้น

อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น Duc *et al.* (2004) ได้ทำการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการแล้วยังพบว่า *B. pumilus* ยังสามารถกระตุ้นให้ Macrophage cell line ของคนให้มีการสร้าง Interleukin-6, Tumor necrosis factors (TNF) รวมถึง Th1 Cytokine gamma interferon (INF gamma) ซึ่งจัดเป็น Proinflammatory cytokines ที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างมาก นอกจากนี้ในรายงานเดียวกันยังทำให้ทราบว่า *B. pumilus* นี้ ยังสามารถสร้าง Bacteriocin-like protein ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถกระตุ้นให้หนูทดลองมีค่า anti-spore immunoglobulin G titers ต่อเชื้อ *Bacillus* ชนิดอื่นได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ Bottone and Peluso (2003) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. pumilus* สายพันธุ์ (MSH) ในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในคนโดยพบว่า เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถยับยั้ง เชื้อราในกลุ่ม Mucoraceae และ เชื้อรา *Aspergillus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพนานถึง 8 วัน นอกจากนี้จากการศึกษาของ De-Souza *et al.* (1996) ที่พบว่า *B. pumilus* นี้ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม Phosphatase ที่สามารถทำให้เกิดกิจกรรม Phosphatase activity ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Ghosh *et al.* (2002) ยังพบว่า *B. pumilus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม Protease (Extracellular protease) ที่มีความสามารถในการยับยั้ง จุลชีพชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นเครื่องยืนยันว่าแบคทีเรีย *B. pumilus* น่าจะเป็นแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นแบคทีเรีย Probiotics ที่มีศักยภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ อีกชนิดหนึ่งในอนาคต ด้วยเหตุผลเหล่านี้จะสามารถเป็นส่วนที่ใช้ในการสนับสนุนว่าการเสริมแบคทีเรีย *B. pumilus* ในอาหารปลาทดลองในการศึกษาครั้งนี้ สามารถเพิ่มความต้านทานของปลาต่อเชื้อก่อโรคได้ ทำให้ปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1-5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

6.2.4 ผลของการเสริมแบคทีเรีย Probiotics *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ต่อความปลอดภัย การเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ของปลานิล ในสภาพการเลี้ยงจริง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในส่วนของการเลี้ยงปลาในสภาพการเลี้ยงจริง ทำให้ได้ผลและข้อสรุปของการศึกษาวิจัยในส่วนนี้หลายประการ ซึ่งได้แก่

6.2.4.1 ผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตที่ได้

ผลจากการผสมแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในอาหารแล้วนำไปให้ปลากินในสภาพการเลี้ยงจริง พบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร ในระดับ 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกันทุกวันเป็นเวลา 110 วัน ทำให้มีผลผลิตโดยคิดเป็นน้ำหนักเฉลี่ยต่อกลุ่ม อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและรายได้ (ยัง

ไม่หักค่าใช้จ่าย) ตีกว่าปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่ก็ไม่ได้มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด (ตารางที่ 2)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเพิ่มน้ำหนักต่อวันในช่วงแรกของการทดลองปลาทดลองในแต่ละกลุ่มจะมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักอยู่ในเกณฑ์ที่ดีมากไปจนถึงช่วงกลางของการทดลองแต่ภายหลังจากคุณภาพน้ำในแม่น้ำเริ่มลดต่ำลงและปลาเริ่มป่วย ปรากฏว่าอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวกลับปรับตัวลดลงอย่างมาก ทั้งนี้มีสาเหตุอันเนื่องมาจากปลาทดลองทุกกลุ่มไม่กินอาหาร ทำให้ช่วงท้ายของการทดลองอัตราการเพิ่มน้ำหนักของปลามีค่าลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด

และเมื่อพิจารณาถึงความยาวของลำไส้ของปลาในแต่ละกลุ่ม เป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังการให้อาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ลำไส้ของปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ทุกกลุ่มมีค่าความยาวแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองในห้องปฏิบัติการที่พบว่าการให้อาหารที่ผสมแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ต่อเนื่องกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์กลับไม่มีผลทำให้ความยาวลำไส้ของปลาที่ได้รับแบคทีเรียมีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การที่ปลานิลทดลองได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในระยะเวลาที่ยาวนานกว่า 4 สัปดาห์ จะมีผลทำให้ ความยาวลำไส้ ซึ่งโดยปกติจะมีมัดกล้ามเนื้อเรียบที่ทำงานภายนอกอำนาจจิตใจมีการขยายตัวออก ในสภาพการเลี้ยงจริง อย่างไรก็ตามเมื่อการทดลองดำเนินมาถึงช่วงกลางของการทดลอง ปรากฏว่าความยาวลำไส้ของปลาในทุกกลุ่มทดลองกลับมีค่าไม่แตกต่างกันจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

6.2.4.2 ความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำและสาเหตุโน้มนำที่ทำให้ปลาเกิดโรค

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นได้เป็นอย่างดีว่าปัจจัยแวดล้อมโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำนั้น น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่โน้มนำทำให้ปลาเกิดโรค ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วเห็นว่าคุณภาพน้ำที่มีผลต่อการโน้มนำทำให้ปลาเกิดโรค เช่น ปริมาณออกซิเจนในน้ำ ความขุ่นในของน้ำ หรือการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันของปัจจัยแวดล้อมอื่น ซึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เมื่อเพิ่มสูงขึ้นเกินระดับความเหมาะสมต่อการเจริญของปลาสามารถส่งผลต่อตัวปลาทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น ทำให้ปลากินอาหารลดน้อยลง ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อเนื้อเป็นลูกโซ่ในหลาย ๆ ด้าน จนอาจทำให้ปริมาณแบคทีเรีย Probiotics ที่ใส่ลงไปลดลงอย่างมาก ดังจะเห็นได้จากการลดลงของปริมาณแบคทีเรียที่ผ่านการทำ Heat-cold shock ที่ลดลงอย่างมากก่อนที่จะปลาจะแสดงอาการของการเกิดโรค รวมทั้งผลโดยตรงต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จะลดลงอย่างรวดเร็วในกรณีที่น้ำมีอุณหภูมิสูงเกินกว่าระดับ 31 °C เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าก่อนการเกิดโรคระบาด ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับโดยวิธี Heat-cold shock ในกลุ่มควบคุมเริ่มมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งหลังจากนั้นปลาในกลุ่มควบคุมก็เริ่มเกิดโรคและตายลงอย่างรวดเร็วในเวลาดังกล่าว อย่างไรก็ตามภายหลังจากการเกิด

โรคในปลากลุ่มควบคุมประมาณ 2 สัปดาห์ ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับโดยวิธี Heat-cold shock ของทุกกลุ่มกลับมีค่าต่ำลงเรื่อย ๆ และเคลื่อนไหวในระดับต่ำ ๆ จนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กลับมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังจากการที่น้ำในแม่น้ำมีคุณภาพน้ำโดยเฉพาะปริมาณ DO ลดลงเหลือเพียง 1-1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ส่งผลให้ปลาทดลองทุกกลุ่มหยุดกินอาหารหรือกินอาหารน้อยมากจนสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าผลของการอดอาหารและการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างรุนแรงอาจเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการตายจากการเกิดโรคของปลาตามมานั่นเอง

โดยในส่วนของอุณหภูมินั้น Ndong *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาในปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) พบว่าปลาที่ถูกนำไปอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 31°C หรือต่ำกว่า 19°C จะมีผลให้ปลามีอัตราการรอดตายต่ำกว่าปลาที่อยู่ในสภาวะปกติหรือแตกต่างจากปกติเล็กน้อยอย่างชัดเจน ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากสภาวะดังกล่าวจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาโดยตรง โดยจะมีผลทำให้ ปริมาณ Total leukocytes, กระบวนการ Respiratory burst, Phagocytic activity และ Phagocytic index ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดสอบความต้านทานโรค Streptococcosis ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. iniae* ของปลาในสภาพดังกล่าว พบว่าปลาที่อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 31°C โดยเฉพาะที่ 35°C ปลาจะยอมรับเชื้อ *S. iniae* ได้ดีมากและทำให้เกิดอัตราการตายสูงถึง 50-60% ซึ่งให้ผลคล้ายกับ Verma *et al.* (2007) ที่พบว่าปลาไน (*Cyprinus capio*) ที่ได้รับการปรับอุณหภูมิของน้ำจาก 26°C ไปเป็น 36°C จะมีผลทำให้ปลามีจำนวน Leukoctyes ในเลือดและค่า Respiratory burst activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ จากการรายงานของ Decostere *et al.* (1999) ได้พบว่าสภาพของน้ำที่มีอุณหภูมิที่สูง จะมีผลกระทบกระตุ้นทำให้เชื้อ *Flavobacterium columnarae* มีความสามารถในการยึดเกาะกับปลา Common carp โดยเฉพาะตำแหน่งของเหงือกและผิวหนัง ส่งผลทำให้ปลาเกิดโรคและมีอัตราการตายที่รุนแรงตามมาได้ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ก็พบว่าช่วงที่ปลานิลเกิดโรคระบาดรุนแรงในกระชังทดลองนั้น แบคทีเรียชนิดดังกล่าวก็เป็นชนิดที่สามารถแยกได้จากปลาป่วยมากที่สุด

นอกจากอุณหภูมิแล้ว ปัจจัยคุณภาพน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงและส่งผลต่อปลามากอย่างหนึ่งคือ ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) ที่พบว่ามีค่าลดลงในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยงและส่งผลให้ปลาทดลองทยอยป่วยและตายเป็นจำนวนมากเช่นกัน ซึ่ง Bowden (2008) ได้ให้ข้อสังเกตว่าปลาที่เลี้ยงในกระชัง โดยทั่วไปนั้นจะมีโอกาสที่จะได้รับผลกระทบจากการขาดออกซิเจนได้น้อยกว่าปลาที่เลี้ยงในบ่อ แต่ถ้าเกิดมีภาวะการถดถอยของน้ำที่มี DO ต่ำพัดผ่านเข้ามา จะทำให้การแก้ไขปัญหาทำได้ยากกว่าปลาที่เลี้ยงในบ่อและผลกระทบนั้นจะเกิดรุนแรงมากขึ้นขึ้นอยู่กับว่ามวลน้ำที่ผ่านเข้ามาจะมีคุณสมบัติอย่างไร เช่น มวลน้ำมีสารอินทรีย์มากและมีการไหลผ่านพื้นที่การเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ผลกระทบของปลาต่อการขาด DO ก็จะมีรุนแรงมากตามไปด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงรายงานที่ผ่านมาพบว่าการลดลงของ DO นั้น ได้ส่งผลกระทบโดยตรงทางลบต่อระบบภูมิคุ้มกันในหลาย ๆ ด้าน เช่น Walker *et al.* (2007) พบว่าปลา Channel catfish ที่ได้รับออกซิเจนในระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีผลทำให้ปลามีระดับของ Complement haemolytic activity ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Boleza *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองในปลา Mummichug (*Fundulus heteroclitus*) พบว่าเมื่อปลาอยู่ในสภาพที่ขาดออกซิเจน (Hypoxia) จะมีผลทำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในไตส่วนหน้า มี

ความสามารถในการสร้าง Reactive oxygen species และ ประสิทธิภาพในกระบวนการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Bactericidal activity) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ขณะที่ Ortuno *et al.* (2002) ก็พบว่า Leukocytes ที่แยกได้จากไตส่วนหน้าของปลาที่อยู่ในสภาพ Hypoxia จะมีกิจกรรม Respiratory burst ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน นอกจากนี้ Cecchini and Saroglia (2002) ยังพบว่าปลา Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ที่อยู่ในสภาพ Mild hypoxia จะมีระดับ Antibody ในกระแสเลือด น้อยกว่าปลาที่อยู่ในสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ

ด้วยสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำทั้ง อุณหภูมิและออกซิเจน ในสภาพการทดลองในการศึกษาครั้งนี้เป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นความสอดคล้องของการเกิดโรคระหว่างการทดลองได้เป็นอย่างดี และเมื่อพิจารณาแล้วการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะสามารถโน้มนำให้ปลาเกิดความเครียด (Stress) ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองทางสรีรวิทยาเพื่อพยายามปรับตัวให้รอดพ้นจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ซึ่งผลของการตอบสนองเบื้องต้น (Primary response) เรียกว่าการตอบสนองความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม (Environmental stress) นั้นเอง โดยจะเป็นผลมาจากการกระตุ้นการทำงานของระบบของอวัยวะและเนื้อเยื่อที่สำคัญ 2 ส่วนคือ Hypothalamic-pituitary-interrenal tissues และ Hypothalamic-chromaffin axes ส่งผลให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวกับความเครียดหลายชนิด ซึ่งได้แก่ Adrenocorticotrophic hormone, Cortisol, Catecholamine และการเพิ่มของกลูโคสในกระแสเลือด (Sapolsky *et al.* 2000; Grutter and Pankhurst, 2000) โดยผลของการหลั่งฮอร์โมนดังกล่าว จะมีผลทำให้เกิดผลกระทบในด้านลบดังที่กล่าวมาในข้างต้นทั้งสิ้น ซึ่งจะส่งผลต่อเนื่องให้ ปลายอมรับเชื้อโรคได้ง่ายและเกิดการตายอย่างรุนแรงตามมาในท้ายที่สุด

6.2.4.3. ผลต่อการต้านทานโรค Streptococcosis และอัตราการรอดตาย

เนื่องจากในช่วงปีที่ทำการทดลองพบว่าเกิดการโรคในปลานิลนั้นได้เปลี่ยนแปลงไปจากการระบาดในช่วงก่อนปี 2551 มาก ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่จากที่สังเกตจากสภาพการเลี้ยงจริงของเกษตรกรและการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าปลาที่เป็นโรคแสดงอาการของโรค Streptococcosis สามารถตรวจพบในความถี่ที่น้อยมาก โรคที่ทำให้เกิดการตายของปลานิลในปัจจุบัน สามารถตรวจพบแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Flavobacterium* spp. ซึ่งสามารถพบการเกิดโรคได้บ่อยครั้งที่สุด รองลงมาได้แก่ *Aeromonas* spp. และ *Streptococcus* spp. และ *Streptococcus agalactiae* ตามลำดับ ร่วมกับการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตภายนอกเช่น เห็บระฆัง (*Trichodina* spp.) และกลุ่มของพวก ปลิงใส (Monogene) ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาจึงไม่อาจชี้ชัดว่า การผสมแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 (*B. pumilus*) ในอาหารสามารถต้านทานการเกิดโรค Streptococcosis ได้ ในสภาพการเลี้ยงจริง อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าผลจากการเลี้ยงปลาในสภาพจริงจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทำให้ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกันทุกวันเป็นเวลา 110 วัน สามารถต้านทานการเกิดโรคที่ทำให้ปลานิลตายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร

ในระดับ 0.5 กิโลกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างชัดเจน แต่ก็ไม่สามารถต้านทานการเกิดโรคดังกล่าวได้เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยเฉพาะช่วงที่ปลามีขนาด 600-700 กรัม ซึ่งเป็นช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยง และถึงแม้ว่าที่สิ้นสุดการทดลองปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายที่สูงกว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในระดับ 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ทั้งนี้จากการพิจารณาตัวเลขแล้วพบว่าปลาในแต่ละกลุ่มมีความแปรปรวนของอัตราการตายที่ค่อนข้างสูง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ผลจากการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาโมเลกุลและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้พิสูจน์ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ที่แยกได้จากธรรมชาตินี้มีคุณลักษณะเหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* มากที่สุด จึงสามารถสันนิษฐานและลงความเห็นได้ว่า แบคทีเรียชนิดที่ใช้ทดลองในครั้งนี้เป็นแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*

2. จากการทดลองในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนแล้วว่า แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ที่แยกได้จากธรรมชาติครั้งนี้สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลานิลได้อย่างชัดเจนในห้องปฏิบัติการ โดยสังเกตจากระบวนการการกลืนกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ซึ่งถือเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกที่ปลาใช้ในการตอบสนองต่อเชื้อโรคภายหลังที่ได้ผ่านสิ่งกีดกันจากภายนอก (Physical barriers) เข้ามาในตัวปลาแล้ว รวมไปถึงปริมาณ O_2^- ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งถึงระดับการเกิด Respiratory burst ของ Phagocytes ที่ทำหน้าที่ในการกลืนกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งพบว่าการให้ *Bacillus pumilus* เป็น Probiotics ผสมในอาหารในอัตรา 1-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 1 เดือน สามารถเพิ่มอัตราการตอบสนองดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ทำให้ปลาทดลองเกิดความผิดปกติทั้งในส่วนของร่างกายและการเจริญเติบโต รวมถึงพฤติกรรมระหว่างการเลี้ยงด้วย ซึ่งการศึกษาดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับการอัตราการรอดตายของปลานิลทดลองภายหลังจากทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่พบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอาหารในอัตรา 1-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ

3. ผลการศึกษาการนำเอาแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ไปทดลองใช้กับสภาพการเลี้ยงจริงในกระชังในพื้นที่อำเภอบางนาบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ ๆ มีการระบาดของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* อย่างหนักอยู่ทุก ๆ ปี โดยใช้เวลาในการเลี้ยงทั้งสิ้น 110 วัน โดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2552 จนถึง วันที่ 18 มิถุนายน 2552 วัน และไม่มีการใช้ยาหรือสารเคมีใด ๆ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง พบว่าการให้แบคทีเรียดังกล่าวในอาหารอัตรา 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ต่อเนื่องกัน สามารถป้องกันโรคการเกิดโรคได้อย่างชัดเจนและมีอัตราการรอดตายแตกต่างกับปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียใน

อาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญ ใน ช่วงกลางเดือนเมษายน ที่มีการระบาดของโรคในปลาทดลองอย่างหนัก อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำในแม่น้ำอย่างต่อเนื่อง ปลาทดลองในทุกกลุ่มเริ่มกินอาหารลดลงและหยุดกินอาหารเป็นเวลานาน ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เริ่มแสดงอาการป่วยของโรคและทยอยตายเช่นเดียวกัน ในช่วงปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายต่ำสุดที่ประมาณ 20% ไกล่เคียงกับปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีอัตราการตายประมาณ 23% ขณะที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายใกล้เคียงกันที่ประมาณ 27% และ 30% ตามลำดับ

4. เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตแบคทีเรียพบว่า ต้นทุนทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 1 กรัม น้ำหนักเปียก คิดเป็นเงิน 2.96 บาท (ภาคผนวก) นอกจากนี้ในการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า ไม่มีการใช้ยาและสารเคมีใด ๆ ระหว่างการเลี้ยงเลย ทำให้สามารถลดต้นทุนในส่วนที่เกิดขึ้นจากการยาปฏิชีวนะและสารเคมีได้ 100%

5. จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นข้อมูลที่สำคัญของความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำและการเกิดโรคของปลานิลทดลอง เนื่องจากถึงแม้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* จะสามารถเพิ่มความต้านทานของแบคทีเรียก่อโรคได้ แต่เมื่อใดก็ตามที่คุณภาพน้ำในพื้นที่การเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงในทาง ที่เลวร้ายลง อย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง สาเหตุดังกล่าวจะส่งผลต่อปลาที่เลี้ยงอยู่ในหลายด้าน โดยเฉพาะการเพิ่มหรือลดลงของอุณหภูมิในรอบวันที่ สูงมากกว่าปกติ เช่น ที่ระดับสูงกว่า 32 °C จะส่งผลให้ปลามีการปรับตัวทางสรีรวิทยาและใช้พลังงานในการปรับตัวดังกล่าวอย่างมาก ซึ่งอาจส่งผลต่อเนื่องให้เกิดความเครียดตามมา ซึ่งส่งผลต่อเนื่องให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลาเกิดการตอบสนองที่ด้อยประสิทธิภาพลงไป นอกจากนี้การปรับตัวดังกล่าวอาจส่งผลต่อเนื่องถึงประชากรของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารทำให้สมดุลของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารเสียไป ซึ่งจะเป็นสาเหตุโน้มนำทำให้ปลาเกิดโรคได้ง่ายและก่อให้เกิดความเสียหายตามมาในที่สุด

นอกจากนี้ในพื้นที่การเลี้ยงทดลอง พื้นที่ลุ่มแม่น้ำท่าจีนในเขตพื้นที่อำเภอดำรงนางบวชนั้น เป็นพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการเพาะปลูกข้าวอยู่โดยรอบเป็นจำนวนมาก เมื่อถึงฤดูการเพาะหรือเก็บเกี่ยวเกษตรกรจะมีการระบายน้ำจากพื้นที่เพาะปลูกลงสู่ลำคลองสาขาของแม่น้ำท่าจีน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกรมชลประทานจะมีประตูปิดกั้นตลอดสาขาลดลงลำน้ำ แต่เมื่อใดก็ตามเมื่อถึงฤดูกาลเพาะหรือเก็บเกี่ยวน้ำทิ้งที่เกษตรกรปล่อยลงสู่ลำน้ำสาขาที่ถูกกักไว้นั้นจะถูกปล่อยลงสู่แม่น้ำโดยตรงและจะเกิดขึ้นในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคมของทุกปี ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าน้ำดังกล่าวเป็นมวลน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสาหร่ายในปริมาณสูงทำให้เกิดอัตราการย่อยสลายอย่างต่อเนื่อง ส่งผลต่อเนื่องให้ปริมาณ DO ในลำน้ำลดต่ำลงอย่างมาก ซึ่งจากการวัดปริมาณ DO ช่วงวิกฤตดังกล่าวพบว่ามีค่า DO ในระดับที่ต่ำเพียง 1.0-1.5 มิลลิกรัม/ลิตรเท่านั้น แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าปลาในกระชังทดลองทุกกลุ่มไม่มีการลอยหัวหรือลอยหุบอากาศที่ผิวน้ำ แต่จะมีการปรับตัวโดยลอยตัวอยู่หนึ่ง ๆ ในกระชังและไม่กินอาหารต่อเนื่องเป็นเวลานาน

ด้วยสาเหตุทั้งการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สูงขึ้นและการลดต่ำลงของออกซิเจนดังกล่าวจะเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ปลาเกิดสภาวะเครียด ยอมรับเชื้อโรคได้ง่าย อีกทั้งการที่ปลาไม่กินอาหารอาจส่งผลถึงสมดุลแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของปลา ทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ให้อยู่ในทางเดินอาหารของปลาได้ และจากการที่น้ำที่มีสารอินทรีย์ปนเปื้อนในปริมาณสูง ก่อปรกัับอุณหภูมิที่สูงขึ้น จะทำให้เชื้อแบคทีเรียในน้ำส่วนใหญ่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยดังกล่าวทั้งมวลข้างต้น จะเป็นสาเหตุ สำคัญให้ปลายอมรับเชื้อโรคและเกิดโรคที่รุนแรง ก่อให้เกิด การตาย และความเสียหายที่รุนแรงตามมาในที่สุด

6. อย่างไรก็ตามในการระบาดของโรคในปีที่ทำการทดลองนี้ ปรากฏว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคภายหลังจากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการและการตรวจในภาคสนาม กลับพบว่า เชื้อที่เป็นตรวจพบและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคและการตายของปลา กลับเป็นกลุ่มแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. ซึ่งสามารถแยกได้จากทั้งภายนอกตัวปลาและภายในตัวปลา ซึ่งเชื่อดังกล่าวมีกลไกในการทำลายผิว ผนังภายนอกตัวปลาทำให้เกิดแผลและรอยต่าง ตกเลือดตามลำตัวอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ได้เช่นเดียวกัน ขณะที่เชื้อ *Streptococcus* นั้น แถบจะไม่มีตรวจพบเลยระหว่างการทำการทดลอง ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการทดลองในพื้นที่เลี้ยงจริงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ที่ใช้เป็น แบคทีเรีย Probiotics ในครั้งนี้สามารถป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. และเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลาป่วยนี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในห้องปฏิบัติการ ปรากฏว่าเชื้อ *Bacillus pumilus* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรสดังกล่าวได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus pumilus* ในรูปสปอร์เพิ่มเติม เนื่องจากมีบางรายงานให้ข้อมูลปัจจุบันว่า การใช้แบคทีเรีย Probiotics ในรูปของสปอร์นั้นจะสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าและสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่า รวมทั้งการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบันซึ่งจะทำให้การประยุกต์ใช้ *Bacillus pumilus* มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

7. ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ทราบข้อเท็จจริงประการหนึ่งคือ การเกิดโรคในปลา นั้นนั้นจะมีรูปแบบของการระบาดในช่วงเวลาวิกฤติสำหรับสัตว์น้ำ นั่นคือ ในช่วงที่มีอากาศร้อนติดต่อกันเป็นเวลานาน และมีฝนตก พายุพัดติดต่อกัน หรือช่วงรอยต่อระหว่างฤดู เช่นร้อนและฝน หรือปลายฝนต้นหนาว ถือเป็นจุดเปราะบางของการเกิดโรคในสัตว์น้ำโดยทั่วไป ที่จะสามารถเห็น ยวนำให้ปลาอ่อนแอและเกิดโรคระบาดได้ง่าย และเกษตรกรจะเผชิญกับโรคใหม่ ๆ เสมอ ดังนั้นเกษตรกรที่เลี้ยงปลานิลควรตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวนี้ และควรวางแผนในการป้องกันอย่างเป็นระบบ เช่น การติดตั้งเครื่องให้อากาศ หรือการให้เกลือแกงในช่วงวิกฤติ รวมทั้งการเสริมวิตามินหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ก่อนการเกิดโรค หรือก่อนการเกิดภาวะวิกฤตดังกล่าว เนื่องจากมีข้อเท็จจริงสำคัญประการหนึ่งคือ เมื่อปลาเกิดโรคแล้วโอกาสที่จะรักษาทำได้ยากมาก เนื่องจากปลาที่ป่วยส่วนใหญ่จะไม่กินหรือตอบสนองต่อการให้อาหาร ซึ่งการเกิดโรคส่วนใหญ่เป็นการเกิดโรคที่ เกิดจาก

แบคทีเรียในร่างกาย (Systemic infection) ดังนั้นการรักษาที่ได้ผลจะต้องนำยาเข้าสู่ร่างกายตัวปลาเท่านั้น ซึ่งเกษตรกรจะพบเสมอว่า ภายหลังเห็นปลาป่วยแล้วการใช้ยาผสมอาหารหรือสารเคมีบางชนิด หลังจากนั้น 2-3 วัน ปลาจะตายมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้นอกจากจะไม่ได้ผลแล้วยังทำให้เกษตรกรเพิ่มต้นทุนในการผลิตและยังเสี่ยงต่อการขาดทุนอย่างมาก เนื่องจากยาปฏิชีวนะและสารเคมีโดยทั่วไปมีราคาสูงมาก

8. เอกสารอ้างอิง

นเรศ ชวนยุก. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล. วารสารสงขลา นครินทร์ วทท. 27 (ฉบับพิเศษ 1): 307-319.

นิลุบล ยูฮาสะ. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกันโรคที่เกิดกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารประกอบงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 27น.

มณจันทร์ เมฆชน และ กมลพร มาแสง. 2543. ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้ง แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง. น. 259-268. ในการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. จตุจักร, กรุงเทพฯ.

Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E and A.M.E., Shalaby. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 27: 175–180.

Al-Harbi, A. H. 1994. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. **Aquaculture** 128: 195-201.

Austin, B., L.F. Stuckey, P.A.W. Robertson, I. Effend, and D.R.W. Griffith. 1995. Probiotic strain of *Vibrio Anguillarum* and *Vibrio ordalii*. **J. Fish Dis.** 18: 93-96.

Alander, M., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Matilla-Sandholm, T. and A. Wright. 1997. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. **Letters in Applied Microbiol.** 24: 361-364.

- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., and M. F. Mohamed. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish. Shellfish. Immunol.** **25**:128-136.
- Boleza, K.A., Burnett, L.E., and K.G. Burnett. 2001. Hypercapnic hypoxia compromises bactericidal Activity of fish anterior kidney cells against opportunistic environmental pathogens. **Fish Shellfish Immunol.** **11**: 593-610.
- Bottone, E.J. and R.W. Peluso. 2003. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. **J. Med. Microbiol.** **52**: 69-74.
- Bowden, T.J. 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish Shellfish Immunol.** **25**: 373-383.
- Brochet, M., E. Couve, M. Zouine, T. Vallaey, C. Rusniok, M.-C. Lamy, C. Buchrieser et al. 2006. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. **Microb. Infect.** **8**: 1227-1243.
- Brunt, J., and B. Austin. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish. Dis.** **28**: 693-701.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., and B. Austin. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish. Dis.** **30**: 573-579.
- Cao, D., A. Kocabas, Z. Ju, A. Karsi, P. Li, A. Patterson and Z. Liu. 2001. Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head kidney. **Anim. Genet.** **32**: 169-188.

- Chang C-I. and Liu W-Y. 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strain, *Enterococcus faecium* SF 68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European ell, *Anguilla anguilla* L. **J. Fish Dis.** **25**: 311-315.
- Coloni, A., A. Diamant, K. H. Eldar A., and A. Zlotkin. 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. **Dis. Aqua. Org.** **49**: 165-170.
- Cecchini, S., and M. Saroglia. 2002. Antibody response in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to water temperature and oxygenation. **Aquaculture Res.** **33**: 607-613.
- Czerucka, D., and P. Rampal. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes Infect.** **4**: 733-739.
- Duc, L.H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Henriques, A.O. and S.M. Cutting. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Appl. Environ. Microbiol.** **7(4)**: 2161-2171.
- Decostere, A., Haesebrouck, F., Turnbull, J.F., and G. Charlier. 1999. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. **J. Fish Dis.** **22**: 1-11.
- De-Souza, M., Nair, S., David, J., D. Chandramohan. 1996. Crude oil degradation by phosphate-solubilizing bacteria. **J. Marine Biotechnol.** **4(2)**: 91-95.
- Eldar, A., and C. Ghittino. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*; similar, but different diseases. **Dis. Aqua. Org.** **36**: 227-231.
- Eldar, A., A. Horovitz, and H. Bercovier. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Vet. Immunol. Immunopathol.** **56**: 175-183.

- Evans, J. J., Klesius P.H., Gilbert P.M., Shoemaker C.A., Sarawi M.A.Al., Landsberg J., Duredez R. et al. 2002. Characterization of B-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **J. Fish Dis.** **25**: 505-513.
- Evans, J. J., P. H. Klesius, and C. A. Shoemaker. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine** **22**: 3769-3773.
- Evans, J. J., C. A. Shoemaker, and P. H. Klesius. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture** **189**: 197-210.
- Freter, M. 1992. Factors affecting the microecology of the gut. In R. Fuller (Ed.), **Probiotics**. The Scientific Basis Glasgow: Chapman & Hall., pp. 111–145.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazabal, V., and P.E. Granum. 2005. Toxin producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. **Applied Environ. Microbiol.** **71**: 1178–1183.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** **66**: 365-378.
- Fuller, R. 1992. **Probiotics**. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London.
- Gatesoupe F.J. 1991. *Bacillus* sp. Spore: A new tool against early bacterial infection in turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. pp. 409-411. In P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jasper and F. Ollevier(eds.) LARVI, 91, Fish and Crustacean Larviculture Symp.
- Ghosh, K., Sen, S.K., and A.K. Ray. 2002. Characterization of bacilli isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita* fingerlings and its significance in digestion. **J. Applied Aquaculture** **12(3)**: 33-42.

- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. T. F. Nielsen, 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** **65**: 969-973.
- Granum, P. E. 2002. *Bacillus cereus* and food poisoning. In R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. A. Logan, P. de Vos (Eds.), Applications and systematics of *Bacillus* and relatives, pp. 37-46.
- Granum, P. E., and T. Lund. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiol. Letters** **157**: 223–228.
- Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E. and S. M. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.** **65**: 4288-4291.
- Gutter, A.S., and N. W. Pankhurst. 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. **J. Fish. Biol.** **57**: 391-401.
- Gunther, J., and R.J. Montealegre. 2004. Effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on the growth and food utilization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under laboratory conditions. **Rev. Biol.Trop.** **52**: 937-943
- Havenaar, R., Josh.J.H. Veid. 1992. **Probiotics: A General View**. Pp. 155-170 In B.L.B. Wood (ed.). The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. Glasgow, U.K.
- Hoult B. and A. F. Tux. 1991. Toxin production by *Bacillus pumilus*. **J. Clin. Pathol.** **44**: 455-458
- Inglis, V., R. J. Roberts, and N. R. Bromage. 1993. **Bacterial Diseases of Fish**. Oxford: Blackwell Scientific.
- Irianto, A. and B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. **J. Fish Dis.** **25**: 633-642.

- Irianto, A., and B. Austin. 2002a. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish. Dis.** **25**: 333-342.
- Irianto A, and B. Austin. 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish. Dis.** **26**: 59-62.
- Ivanova, E., Mikhailov, V.V., and L.A. Andreev. 1992. Marine *Bacillus* and some approaches to their identification. **Microbiol.** **54(1)**: 27–33.
- Klein, J., and Horejsi V. 1997. **Immunology**. 2nd ed: Blackwell Science Inc.
- Klesius, P. H., C. A. Shoemaker, and J. J. Evans. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture** **188**: 237-246.
- Kozasa, M.. 1986. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiol. Aliments. Nutr.** **4**: 121-135.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa M.A., Guzmán-Méndez, B.E., W. Lo´pez-Madrid. 2003. Use of The bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture** **216**: 193-210.
- Lilly, D. M. and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science** **147**: 747-748.
- Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., Hirayama, K., 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. **Hydrobiologia** **358**: 285-290.

- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan, and T. Yano. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Aquaculture** **101**: 197-203.
- Miller, N. W., and L. W. Clem. 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. **J. Immunol.** **133**: 2356-2359.
- Moriarty, D. J. W., B. Withyachumnarnkul, P. Pratanpipat and C. Nitimethachoke. 1997. Managing microbial disease in aquaculture with probiotic bacteria: biotechnology for sustainable aquaculture. pp.40. *In* Abstracts of the 2nd Asia-Pacific marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. May 7-10, 1997. Phuket, Thailand.
- Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture** **164**: 351-358.
- Munimbazi, C. and L.B. Bullerman. 1998a. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. **J. Appl. Microbiol.** **84**: 959–968.
- Munimbazi, C. and L.B. Bullerman. 1998b. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. **Mycopathologia** **140**: 163–169.
- Nakanishi, T., I. Kiryu, and M. Ototake. 2002a. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine** **20**: 3764-3769.
- Nakanishi, T., U. Fischer, J. M. Dijkstra, S. Hasegawa, T. Somamoto, N. Okamoto and M. Ototake. 2002b. Cytotoxic T cell function in fish. **Dev. Comp. Immunol.** **26**: 131-139
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., and B. Austin. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **J. Appl. Microbiol.** **103**: 1699-1706.

- Ndong, D., Chen, Y-Y., Lin, Y-H., Vaseeharan, B., and J-C. Chen. 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. **Fish Shellfish Immunol.** **22**: 686-694.
- Ortuno, J., Esteban, M.A., and J. Meseguer. 2002. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of sea bream (*Sparus aurata* L.). **Vet. Immunol. Immunopathol.** **84**: 17-27.
- Otero, M. C., Ocana, V. S., and E. N. M. Macias. 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. **Methods Mol. Biol.** **268**: 435-440.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 29:4-8.
- Patel, A. K., J. J. Ahire, S. P. Pawar, B. L. Chaudhari, and S. B. Chincholkar. 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. **Food Res. Inter.** **42**: 505–510.
- Perera, R. P., S. K. Johnson, M. D. Collins, and D. H. Lewis. 1994. *Streptococcus iniae* associated mortality of *Tilapia nilotica* x *T.aurea* hybrids. **J. Aqua. Anim. Health** **6**: 335-340.
- Perera, R. P., S. K. Johnson, and D. H. Lewis. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. **Aquaculture** **152**: 25-33.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., A.R. Lyndon. 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **J. Appl. Microbiol.** **105**: 723-732.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., and M. Endo. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vet. Immunol. Immunopathol.** **113**: 339-347.

- Plumb, J. A. 1999. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**: Iowa State University Press.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., and T. Watanabe. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish Shellfish Immunol.** **16(1)**: 25-39.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1998. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture** **167**: 301-313.
- Salinas, I., Diaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrillon, M., Morinigo, M.A., and M.A. Esteban. 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). **Vet. Immunol. Immunopathol.** **111**: 279-286.
- Salminen, S., Bouley, M.C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., and Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Brit. J. Nutr. Suppl.** **1**: 147-171.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., and A. U. Munck. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Rev.** **21**: 55-89.
- SEAFDEC. 1996. **Using bacteria to fight bacteria**. Aqua Farm news. SEAFDEC Aquaculture Department, Tigbanan, Iloilo, Philipines. July-October. 1996. 39 p.
- Shelby, R., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., M.A. Delaney. 2006. Effects of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Appl. Aquac.** **18**: 49–60.

- Shoemaker, C. A., J. J. Evans, and P. H. Klesius. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture** **188**: 229-235.
- Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and J.G. Holt. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Spanggaard, B., I. Huber, et al. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. **Environ. Microbiol.** **3**: 755-765
- Stoffregen, D. A., S. C. Backman, R. E. Perham, P. R. Bowser, and J. G. Babish. 1996. Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. **J. World Aqua. Soc.** **27**: 420-436.
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., and K. Supamattaya. 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-relationship to human isolates? **Aquaculture** **284**: 35-40
- Taoka, Y, Maeda, H., Jo J.Y., Kim, S.M., Park, S., Yoshikawa T. and T. Sakata. 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fisher. Sci.** **72**: 755-766.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and S. Kumar. 2007. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** **24(8)**: 1596-1599.
- Vaseeharan, B. and P. Ramasamy (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Let. Appl. Microbiol.** **36**: 83-87.
- Verma, A.K., Pal, A.K., Manush, S.M., Das, T., Dalvi. R.S., Chandrachoodan, P.P., Ravi P.M., and S.K. Apte. 2007. Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings. **Fish & Shellfish Immunol.** **22**: 547-555.

- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., and B. Novoa. 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clin. Diagn. Lab Immunol.** **9**: 1318-1923.
- Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T., and W.F Li. 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture** **277**: 203-207.
- Welker, T.L., McNulty, S.T., and P.H. Klesius. 2007. Effect of sublethal hypoxia on the immune response and susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to enteric septicemia. **J. World Aquaculture Soc.** **38**: 12-23.
- Whittington, R., C. Lim, and P. H. Klesius. 2005. Effect of dietary [beta]-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** **248**:217-225.
- Yilmaz, M., Soran, H., and Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. **Microbiol. Res.** **161(2)**: 127-131.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., and W. Li. 2009. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish. Physiol. Biochem.* DOI 10.1007/s10695-009-9320-z.

ภาคผนวก

การประเมินต้นทุนการผลิตเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AQBS01 ในปริมาตร 1 ลิตร โดยการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1. Nutrient Broth (500 กรัม ราคา 1980 บาท) จำนวน 8 กรัม	31.68 บาท
2. ค่าเสื่อมวัสดุปั่นแยกเชื้อ	0.38 บาท
3. ค่าเสื่อมตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า	0.49 บาท
4. ค่าไฟฟ้า	1.07 บาท
รวมทั้งสิ้น	33.62 บาท

ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ปริมาตร 1 ลิตร จะสามารถเลี้ยงให้ได้แบคทีเรียจากการปั่นแยกแล้วเฉลี่ย 11.35 ± 0.5 กรัม ดังนั้น แบคทีเรียน้ำหนักเปียก 1 กรัม มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 2.96 บาท

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา
และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

ชื่อโครงการ: การประยุกต์ใช้ *Bacillus* AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล

หัวหน้าโครงการ: ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา

วัตถุประสงค์ของโครงการ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความปลอดภัย และผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลภายหลังการได้รับการเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 ที่แยกได้จากธรรมชาติ ในอาหาร และศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิลโดยวิธีการผสมอาหารสภาพทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงจริงของเกษตรกรในกระชัง อีกทั้งยังทำการศึกษากำหนดชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. นี้ ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยา และทางอณูชีวโมเลกุล เพื่อที่จะนำเอาข้อมูลที่ได้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดขึ้นและสร้างความเสียหายให้กับธุรกิจการเลี้ยงปลานิลในปัจจุบัน

กิจกรรมตามแผน	กิจกรรมที่ดำเนินการและผล	หมายเหตุ
1. ศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ต่อปลานิล รวมถึงผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา	ดำเนินการได้ตามแผน 100% - ได้ทำการศึกษาความปลอดภัยและผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของการเสริมแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 ในปลานิลในห้องปฏิบัติการ - ผลของการศึกษาทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 ที่ใช้มีความปลอดภัยต่อปลาทดลองและสามารถกระตุ้นให้ปลาทดลองมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงอย่างมีประสิทธิภาพ	
2. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพห้องปฏิบัติการ	ดำเนินการได้ตามแผน 100% - ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพห้องปฏิบัติการ และพบว่าปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> AQBS01 สามารถทำให้ปลาทดลองมีความต้านทานต่อโรค Streptococcosis ที่มีสาเหตุมาจาก เชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> ได้อย่างน่าพอใจ เมื่อทดสอบด้วยการฉีดเข้าช่องท้องและทางเดินอาหาร	การทดสอบความต้านทานเชื้อโดยการแช่สามารถนำมาทำให้ปลาในชุดทดลองและกลุ่มควบคุมแสดงอาการป่วยได้เล็กน้อยเท่านั้นและไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายระหว่างชุดทดลอง
3. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 ในการป้องกันโรคในปลานิลในสภาพการเลี้ยงจริงในกระชัง	ดำเนินการได้ตามแผน 100% - ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพการเลี้ยงจริงของ	ได้ดำเนินการวิจัยลำช้าเนื่องจากปลาปลาทดลองขนาดเล็กหลังจากการปล่อย

	เกษตรกรในกระชัง ในเขตพื้นที่ อำเภอดงหลวง จังหวัดสุพรรณบุรีพบว่าปลาทดลองที่ได้รับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> AQBS01 ในอัตรา 1 และ 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถทำให้ปลาทดลองมีความต้านทานต่อโรคระบาดที่มีเกิดขึ้นในช่วงกลางเดือนเมษายน 2552 แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนถึง 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามผลจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมในหลายประการในแม่น้ำท่าจีน ทำให้ปลาทดลองในทุกกลุ่มแสดงอาการป่วยและตายเช่นเดียวกันในทุกชุดทดลอง - เมื่อสิ้นสุดการทดลองสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตปลาและสามารถนำเงินรายได้หลังจากหักค่าใช้จ่ายแล้วส่งสกว. เป็นเงินทั้งสิ้น 140,000 บาท	เลี้ยงแสดงอาการป่วยอย่างหนักในช่วงแรกๆ ของการเตรียมปลาเพื่อทำการทดลอง
4. <u>การวิจัยเพิ่มเติมจากแผน:</u> การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQBS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและทางอนุชีวโมเลกุล	ดำเนินการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AQBS01 โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและอนุชีวโมเลกุล จนทำให้ทราบว่าแบคทีเรียชนิดนี้คือ แบคทีเรีย <i>Bacillus pumilus</i>	ได้รับงบวิจัยเพิ่มเติมโดยขอจากเงินรายได้จากการเลี้ยงปลาเป็นเงิน 25,359 บาท

บทความเผยแพร่

การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกส์ *Bacillus AQBS01* ในการป้องกันโรคในปลานิล

โดย

ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ และ รศ.ดร. นนทวิทย์ อารีรักษ์

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 02-5792924

ในช่วง 3-4 ปีมานี้ เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลในประเทศไทยส่วนใหญ่ มักประสบปัญหาการตายของปลาที่รุนแรงในปลานิลขนาดใหญ่อายุตั้งแต่ 3-4 เดือน หรือขนาดตั้งแต่ 200-800 กรัม ซึ่งการตายของปลามักจะเกิดในช่วงหน้าร้อนไปจนถึงต้นฤดูฝน นับตั้งแต่เดือนมีนาคมจนถึงเดือนกรกฎาคมของทุกปี ลักษณะอาการของปลาที่เริ่มแสดงอาการผิดปกติจะกินอาหารน้อยลง เมื่อเวลาผ่านไป 3-4 วัน ปลาบางส่วนจะเริ่มว่ายน้ำเชื่องช้าที่ผิวน้ำ ลำตัวอาจมีสีคล้ำหรือมีบาดแผลตามผิวหนัง ครีบและเกล็ด บางตัวครีบหู ครีบอก ครีบหางกร่อนและตก เลือดบริเวณโคนครีบ ท้องบวมน้ำเล็กน้อย บางตัวแสดงอาการตาโปนหรือตาชุ่นออกมา (ภาพที่ 1) บางครั้งจะพบรวมกับการว่ายน้ำควงส่ว้นไร้ทิศทางที่บริเวณผิวน้ำ ในปลาที่เลี้ยงในบ่อดินปลาที่ป่วยส่วนใหญ่จะลอยและเริ่มทยอยแสดงอาการความผิดปกติดังกล่าวและทยอยตายโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณท้ายบ่อ อัตราการตายอาจสูงถึง 60-70% หรือปลาที่เลี้ยงในกระชังอัตราการตายอาจสูงถึง 85-90% ภายใน 5-7 วัน นับตั้งแต่ปลาแสดงอาการ เมื่อทำการผ่าตรวจดูความผิดปกติภายในช่องท้องพบว่า มีน้ำสีเหลืองทะลักออกมา ตับมีสีซีด เกิดการตกเลือดและอักเสบ ภูน้ำดีและม้ามบวมโตมาก

จากการตรวจวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการ โดยการแยกเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ได้โคโลนีของแบคทีเรียขนาดเล็ก สีขาวครีม ขอบเรียบจำนวนมาก เมื่อนำแบคทีเรียไปทำการย้อมสีแกรมแล้วพบว่า แบคทีเรียที่ได้มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก (Cocci) อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือต่อเป็นสายยาว ตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไป โดยเซลล์แบคทีเรียเหล่านี้ จะติดสีน้ำเงินของคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) แสดงถึงคุณสมบัติที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ในอาหารทดสอบ เมื่อเลี้ยงใน Blood agar แล้วเชื้อมีสีน้ำตาลสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ได้ เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วพบว่า มีคุณสมบัติตรงกับ เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* นอกจากนี้ภายหลังจากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะแล้วพบว่า เชื้อดังกล่าวมีความไวต่อยา Enrofloxacin, Oxytetracycline, Sulphamethoxazole/Trimethoprim และยาอีกหลายชนิด เกษตรกรส่วนใหญ่พยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิด แต่ไม่สามารถหยุดยั้งการตายของปลาได้ โดยปลายังแสดงการตายต่อเนื่องและรุนแรง จนเกษตรกรส่วนใหญ่ประสบภาวะขาดทุนอย่างหนัก

อย่างไรก็ตามในปี 2551 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน เหตุการณ์ปลาตายอย่างหนักได้เกิดขึ้นเช่นเดียวกับปีที่ผ่านมาในทุกพื้นที่การเลี้ยงทั้งภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลางและภาคอีสาน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การตายของปลานั้นจะแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* น้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาการตาโปนหรือตาชุ่น แต่กลับพบว่าปลาที่ป่วยส่วนใหญ่จะมีบาดแผลเป็นวงต่างตามผิวหนังลำตัว ท้องและโคนครีบหาง ครีบหู ครีบท้องและครีบหางกร่อน บางรายพบแผลหลุมลึกเข้าไปในชั้นกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2) เมื่อตรวจสอบปรสิตร่างภายนอกพบ เชื้อแบคทีเรียท่อนยาวอยู่เป็นกลุ่มใหญ่เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ซึ่งจากการตรวจ

วินิจฉัยแล้วพบว่าเป็นเชื้อ *Flavobacterium* spp. และยังพบเชื้อโรคในกลุ่มปลิงใส เห็บระฆัง หนอนสมอหรือบางครั้งมีการระบาดร่วมกับสัตว์ในกลุ่มเห็บปลา (Isopod) โดยเฉพาะบริเวณเหงือก ลำตัว ซึ่งสามารถพบอาการดังกล่าวได้อย่างกว้างขวางในทุกพื้นที่ของประเทศ รวมถึงพื้นที่การเลี้ยงของประเทศใกล้เคียง เช่น ประเทศลาวบริเวณแม่น้ำโขงและแม่น้ำงึม ซึ่งขณะนี้โรคดังกล่าวกำลังอยู่ระหว่างการตรวจสอบหาสาเหตุที่แน่ชัดในห้องปฏิบัติการ จากเหตุการณ์ดังกล่าวเกษตรกรเกือบทั้งหมดล้มเหลวในการใช้ยาและสารเคมีเพื่อการหยุดยั้งการระบาดและการตายของโรคอย่างสิ้นเชิง ส่วนใหญ่ต้องหยุดกิจกรรมเพื่อหาอาชีพอย่างอื่นแทนเนื่องจากไม่สามารถเลี้ยงปลาและแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ จนเป็นเหตุให้ขาดทุนอย่างหนักในปัจจุบัน

เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าวกลุ่มวิจัยของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้เริ่มทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติ ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในการต้านทานการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* และ *Flavobacterium* spp. ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงของเกษตรกรในสภาพจริงในกระชังในแม่น้ำท่าจีน เขตพื้นที่อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นเขตที่มีการระบาดของโรคในปลานิลทุกปี และมีคุณเฉลิมพล มะยมตัน เกษตรกรในพื้นที่เป็นผู้ร่วมโครงการ โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการทำการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ซึ่งผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า การเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่มีผลทำให้ปลาทดลองเกิดความผิดปกติแต่อย่างใดและยังพบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารตั้งแต่ 1-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะกระบวนการดักจับกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมสูงกว่าปลาในชุดควบคุมอย่างชัดเจน และสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ผลการศึกษาในสภาพการเลี้ยงจริงของเกษตรกรในการเลี้ยงแบบกระชัง ซึ่งไม่มีการใช้ยาและสารเคมีชนิดใด ๆ เลยระหว่างการเลี้ยงตลอดระยะเวลาประมาณ 4 เดือน โดยเป็นที่สนใจว่าภายหลังจากที่เลี้ยงปลาไปแล้วประมาณ 2 เดือน ครั้ง พบว่าการเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหาร 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมให้ปลาทดลองกินต่อเนื่องกันทุกวัน จะทำให้ปลาสามารถต้านทานการเกิดโรค ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงกลางเดือนเมษายน 2552 และได้สร้างความเสียหายอย่างหนักต่อการเลี้ยงปลานิลในทุกพื้นที่ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว ได้นานกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรียในอาหารและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ถึง 2 สัปดาห์ โดยพบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียจะเริ่มแสดงอาการผิดปกติและทยอยตายคราวละมาก ๆ ขณะที่ปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอัตรา 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่ได้แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามเมื่อสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนเริ่มผิดปกติ เช่น มีน้ำหลากและสีเปลี่ยนเป็นสีขุ่น อุณหภูมิของน้ำบางช่วงสูงขึ้นถึง 33 องศาเซลเซียส กอปรกับปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) ลดต่ำลงน้อยกว่า 2 ส่วนในล้านส่วน ทำให้ปลาทุกกลุ่มเริ่มปรับตัวและไม่กินอาหารเป็นเวลานาน ตามระยะเวลาของคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลง ส่งผลทำให้ปลาที่ได้รับแบคทีเรียเริ่มแสดงอาการผิดปกติและทยอยตายลักษณะเดียวกันอย่างต่อเนื่องเช่นกัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 110 ของการเลี้ยง พบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายสูงสุดเป็น 79 และ 77% ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารจะมีอัตราการรอดตายเป็น 70 และ 73% ตามลำดับ

ผลการศึกษาดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จะมีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลาไนได้อย่างน่าพอใจระดับหนึ่ง ทำให้สามารถลดการใช้ยาและสารเคมีระหว่างการเลี้ยงได้ 100% และมีความเป็นไปได้สูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในระบบการเลี้ยงของเกษตรกร อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ทำให้เราเข้าใจถึงธรรมชาติของการเลี้ยงสัตว์น้ำได้เป็นอย่างดี เนื่องจากถึงแม้ว่าแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษานี้จะให้ผลเป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาควรเข้าใจถึงสมดุลและความสัมพันธ์ของสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติให้ดี เนื่องจากการเลี้ยงปลามีปัจจัยที่แตกต่างไปจากการเลี้ยงสัตว์ชนิดอื่น เนื่องจากมีปัจจัยมากมายที่จะมีผลต่อความประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำต่าง ๆ ที่ สำคัญ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของมวลน้ำอย่างฉับพลัน ปริมาณออกซิเจนละลายและอุณหภูมิของน้ำเป็นต้น ดังนั้นการจัดการสุขภาพของปลาให้มีความแข็งแรงจึงเป็นวิธีที่จะป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำที่ดีที่สุด ซึ่งนอกเหนือจากการเสริมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ให้กับปลาแล้ว ควร เน้นการจัดการเป็นพิเศษในช่วงเวลาที่ถือเป็นจุดวิกฤติที่จะเป็นสาเหตุโน้มนำทำให้ปลาเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ช่วงที่อากาศร้อนติดต่อกันหรือฝนตกฟ้าครึ้มติดต่อกันหลายวัน อุณหภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงฉับพลัน น้ำหลากหรือน้ำนิ่งเป็นเวลานาน โดยเฉพาะช่วงฤดูร้อนต่อฤดูฝนและช่วงปลายฝนต้นหนาว โดยเกษตรกรสามารถป้องกันการการระบาดของโรคโดย

1. เสริมวิตามินที่จำเป็น เช่น วิตามิน ซี (3-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ติดต่อกันเป็นเวลา 5-7 วัน จนกว่าสภาวะอากาศจะกลับเข้าสู่ภาวะปกติ

2. ลดหรือย้ายปลอยปลาในอัตราที่หนาแน่นสูงหรือหลีกเลี่ยงการเลี้ยงปลาในบางช่วงเวลา โดยเฉพาะการเลี้ยงในช่วงระยะเวลาวิกฤติ เนื่องจากปลาจะมีความเสี่ยงสูงมากต่อการเกิดโรค นอกจากนี้การปลอยปลาในอัตราที่หนาแน่นต่ำจะช่วยให้การจัดการสภาพการเลี้ยงได้ง่ายขึ้น

3. ระงับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ โดยเฉพาะปริมาณออกซิเจนและอุณหภูมิของน้ำ หากเป็นไปได้ ควรติดตั้งเครื่องให้อากาศเพื่อเติมอากาศในน้ำอย่างต่อเนื่องให้เพียงพอต่อความต้องการของปลา โดยเฉพาะช่วงเวลากลางคืนจนถึงช่วงเช้ามืด และช่วงฟ้าปิดหรือฝนตกติดต่อกันกันหลายวัน

4. เพิ่มแหล่งของเกลือแร่ให้แก่ปลาโดยการเติมเกลือแกง เนื่องจากในช่วงระยะเวลาวิกฤติปลาส่วนใหญ่จะเกิดความเครียดได้ง่ายและอาจส่งผลให้ปลาสูญเสียระบบควบคุมสมดุลของน้ำและเกลือแร่ การให้เกลือแกงจะเป็นการชดเชยเกลือที่สูญเสียไประหว่างเกิดความเครียด ทำให้ระบบต่าง ๆ ของร่างกายปลาสามารถทำงานต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง วิธีการเติมควรใส่เกลือในถุงผ้าแขวนไว้เป็นจุด ๆ ให้เกลือละลายออกมาช้า ๆ ตามขอบบ่อในอัตรา 120-150 กิโลกรัมต่อไร่หรือ 3-5 กิโลกรัมต่อกระชัง ให้ติดต่อกันจนสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงกลับเข้าสู่ภาวะปกติ

5. อย่าใช้ยาหรือสารเคมีอย่างพล่าเพลือ เนื่องจากจะเป็นการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงโดยใช้เหตุแล้ว การใช้ยาดังกล่าวยังมีผลทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยาทำให้เมื่อเกิดโรคแล้วอาจส่งผลให้การใช้ยาและสารเคมีดังกล่าวไม่สามารถใช้ในการควบคุมโรคได้



ภาพที่ 1 การตายของปลาที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*



ภาพที่ 2 การตายของปลาที่มีสาเหตุมาจากเชื้อโรคที่กำลังระบาดอยู่ในปัจจุบัน

แบบสรุปโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG5120018

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้ *Bacillus* AQS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล

หัวหน้าโครงการ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา

โทรศัพท์ 02-579-2924 โทรสาร 02-561-3984

ความสำคัญ/ความเป็นมา

การเลี้ยงปลานิลของประเทศไทยถือเป็นกิจกรรมทางการประมงที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ซึ่งสร้างรายได้และก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย อย่างไรก็ตามในช่วง 5-7 ปี ที่ผ่านมานี้ ธุรกิจการเลี้ยงปลานิลของไทย ได้ประสบปัญหาการเกิดโรคระบาดที่รุนแรงที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและสร้างความเสียหายอย่างหนักและต่อเนื่องจนมาถึงปัจจุบัน เกษตรกรส่วนใหญ่พยายามแก้ไขปัญหาโดยการใช้อยาปฏิชีวนะและสารเคมีหลายชนิด ซึ่งพบว่านอกจากจะไม่ได้ผลแล้วยังได้ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำเอาแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* AQS01 ซึ่งแยกได้จากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิลและได้ทำการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงในพื้นที่จริงในกระชังของเกษตรกร โดยคณะวิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษาที่เกิดขึ้นจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากการเกิดโรคระบาดในปลานิลและลดต้นทุนจากการใช้ยาและสารเคมีของเกษตรกร รวมทั้งยังเป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศว่าผลผลิตปลานิลที่ผลิตในประเทศไทยปราศจากการใช้ยาและสารเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อันจะส่งผลให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลของไทยสามารถดำเนินต่อไปอย่างมั่นคงและยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQS01 ต่อปลานิล รวมถึงผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา
- 2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย AQS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพห้องปฏิบัติการ
- 3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQS01 ในการป้องกันโรคในปลานิล ในสภาพการเลี้ยงจริงในกระชัง
- 4) เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ สายพันธุ์ AQS01 ด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและทางอณูชีวโมเลกุล

ผลการวิจัย

เมื่อนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQS01 มาจำแนกด้วยเทคนิคทางจุลชีววิทยาและอณูชีวโมเลกุล พบว่าให้ผลตรงกับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* และเมื่อนำไปผสมอาหารให้ปลานิลทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการกินติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า เม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียชนิดนี้ใน

อาหารตั้งแต่ 0.5-5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความสามารถในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมในกระบวนการ Phagocytosis สูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำปลาเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคกับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* พบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *B. pumilus* ในอาหารในอัตรา 1.0-5.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เมื่อนำเอาแบคทีเรีย *B. pumilus* ไปทดลองกับปลาที่เลี้ยงในกระชังในสภาพการเลี้ยงจริง บริเวณแม่น้ำท่าจีน เขตอำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดสุพรรณบุรี โดยไม่มีการใช้ยาและสารเคมีใด ๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง ที่ 110 วัน พบว่าในช่วงเดือนเมษายน ของปี 2552 มีการระบาดของโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียอย่างหนักทำให้ปลาทดลองบางกลุ่มและปลาของเกษตรกรเกิดการตายและเสียหายอย่างหนัก อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจว่าในช่วงเวลาดังกล่าวปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *B. pumilus* ในอาหารในอัตรา 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถต้านทานการเกิดโรสดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าปลาในกลุ่มดังกล่าวไม่ได้แสดงความผิดปกติหรือมีอัตราการตายเกิดขึ้นเลยแต่อย่างใด เป็นเวลานานถึง 2 สัปดาห์อย่างไรก็ตามเมื่อคุณภาพน้ำในแม่น้ำท่าจีนเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน โดยเฉพาะอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ทำให้ปลาใน 2 กลุ่มนี้และกลุ่มอื่น ๆ ไม่กินอาหารและเริ่มป่วยและตายเป็นจำนวนมาก และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารใน 2 กลุ่มนี้ มีค่าอัตราการรอดตายผลผลิตและรายได้จากการจำหน่ายปลาสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างน่าพอใจ ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของค่าดังกล่าวก็ตาม

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

อยู่ระหว่างดำเนินการประสานงานเพื่อให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในกระชัง บริเวณพื้นที่เขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์ นำไปใช้

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และใช้ประโยชน์ด้านไหน

ยังไม่มีผลการดำเนินการ

การประชาสัมพันธ์

1. โรคที่เป็นสาเหตุของการตายที่รุนแรงของปลานิลในประเทศไทย

โดย ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา และ นนทวิทย์ อารีรักษ์ (เผยแพร่แล้วใน Website ของ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ www.rdi.ku.ac.th/kasetsartresearch52/05-animal/prapansak_Nile, 10

กุมภาพันธ์ 2553)

2. การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกส์ *Bacillus AQBS01* ในการป้องกันโรคในปลานิล

โดย ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา และ นนทวิทย์ อารีรักษ์ (อยู่ระหว่างการเผยแพร่)

3. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2554. การทดสอบประสิทธิภาพของ
แบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*).
ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. (อยู่ระหว่างการพิจารณา
ของผู้ทรงคุณวุฒิ)
4. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2554. การประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Bacillus*
pumilus ในการป้องกันโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในสภาพการเลี้ยงจริง. ใน การประชุม
วิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. (อยู่ระหว่างการพิจารณาของ
ผู้ทรงคุณวุฒิ)