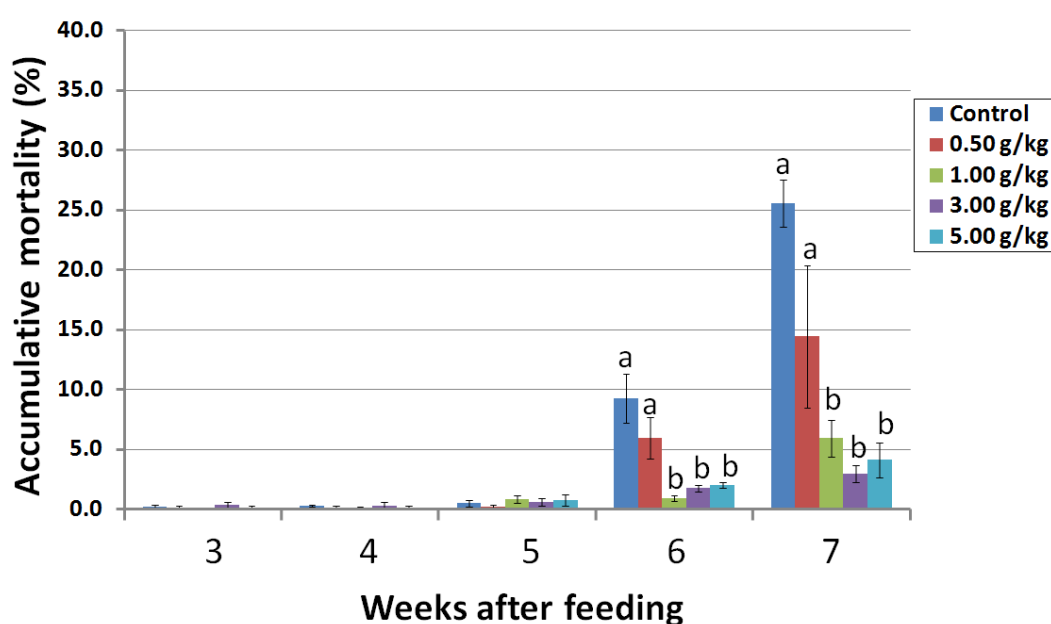


นอกจากนี้ยังพบข้อมูลที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งคือ ในช่วงสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังจากให้อาหารทดลอง ปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เริ่มแสดงอาการป่วยของโรคที่คล้ายกับโรคที่มีการระบาดก่อนหน้านี้ โดยลำตัว ครีบจะขาวเป็นปื้น ตกเลือดตามผิวหนัง เหงือกอักเสบและมีเนื้อเยื่อตายเป็นหย่อม 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  $6.67\pm3.35$ ,  $2.43\pm2.52$ ,  $3.41\pm2.26\%$  ตามลำดับ ขณะที่ปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น  $26.14\pm3.38$  และ  $14.05\pm6.45\%$  ตามลำดับ (ภาพที่ 23)

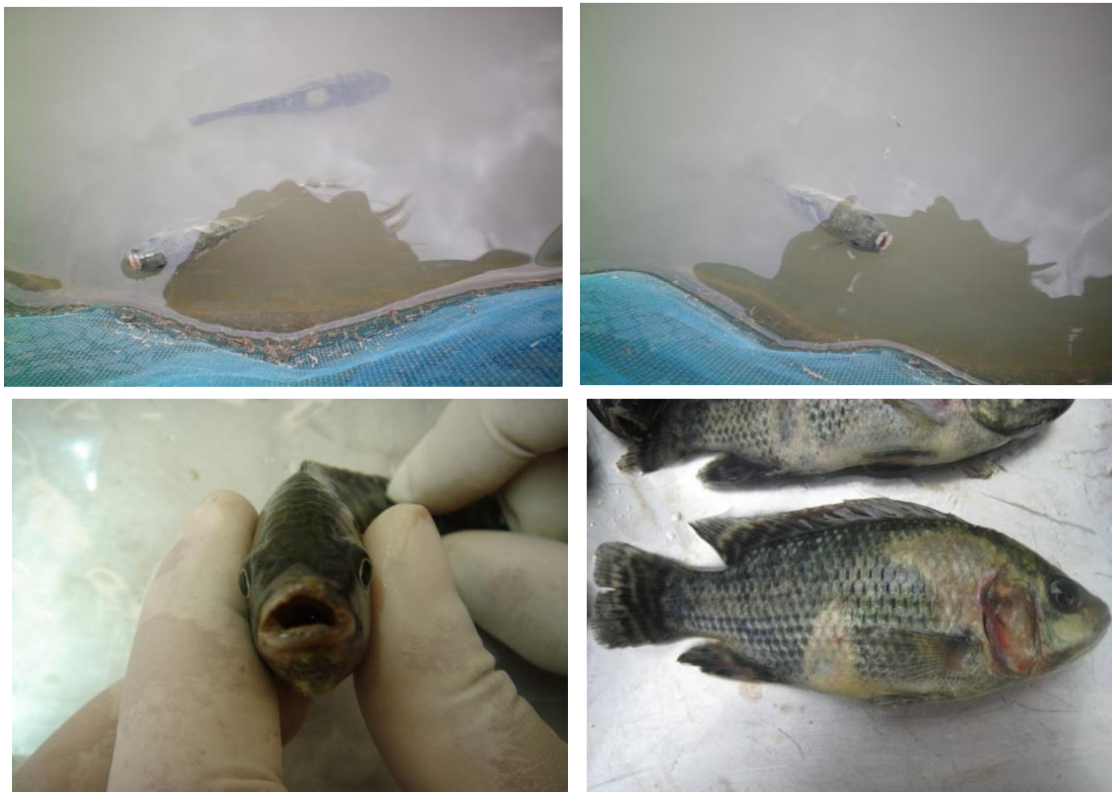
อย่างไรก็ตามจากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเกษตรกรได้ทำการให้ Antibiotics เพื่อใช้ในการรักษาโรคระบาดที่เกิดขึ้น เนื่องจากปลาส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่กำลังจะจับขาย การศึกษาเบื้องต้นของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในการป้องกันโรคจึงต้องยุติลง



**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  $50.74 \pm 3.31$  กรัม ในการเลี้ยงสำหรับทุก ๆ กลุ่ม และภายหลังการทำการสุ่มชั่งวัดน้ำหนักและความยาวของปลาจำนวนอย่างน้อย 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  $712.7 \pm 46.3$ ,  $769.1 \pm 54.0$ ,  $726.6 \pm 40.5$  และ  $725 \pm 16.7$  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  $24.7 \pm 0.6$ ,  $24.0 \pm 0.5$ ,  $23.7 \pm 0.3$  และ  $24.5 \pm 2.0$  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 ซ้ำยังกินอาหารน้อยลงมาก และคงตัวไปถึงสิ้นสุดการทดลอง ในวันที่ 110 ซึ่งปลาในแต่ละกลุ่มมีอัตราการบริโภคอาหารเฉลี่ยประมาณ  $617.31 \pm 5.37$ ,  $619.03 \pm 2.14$ ,  $618.19 \pm 1.77$  และ  $621 \pm 4.95$  กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใดทุกช่วงการทดลอง ( $P > 0.05$ ) (ภาพที่ 27)

#### 5.6.2.1.4 อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน

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

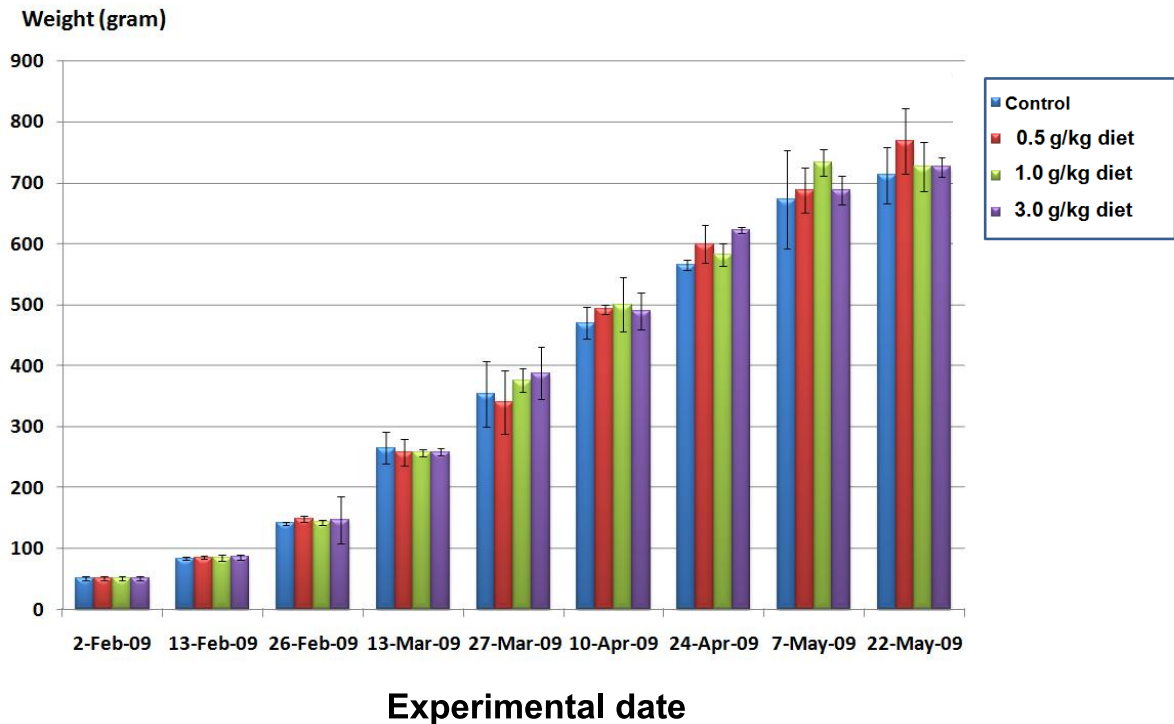
กลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอัตรา 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนัก น้อยกว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) แต่ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ( $P>0.05$ ) ขณะที่ช่วงเวลาอื่น ๆ ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันของอัตราการเพิ่มน้ำหนักต่อวันของปลาทดลองแต่อย่างใด (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  $134.5\pm0.7$ ,  $169.3\pm16.6$ ,  $155.8\pm13.5$  และ  $153.2\pm13.5$  เซนติเมตร ตามลำดับ ในวันที่ 54 ปลาในกลุ่มตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความยาวลำไส้เป็น  $121.5\pm27.6$ ,  $190.3\pm3.9$ ,  $185.5\pm17.1$  และ  $183.2\pm17.1$  เซนติเมตรตามลำดับ และในวันที่ 68 ปลาในกลุ่มตั้งแต่กลุ่มควบคุมจนถึงกลุ่ม T3 มีความยาวลำไส้เป็น  $139.5\pm17.7$ ,  $205.3\pm30.8$ ,  $160.5\pm19.8$  และ  $189.7\pm19.8$  เซนติเมตรตามลำดับ นอกจากนี้ในช่วงดังกล่าวก็ไม่พบว่าปลาที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารทุกกลุ่มจะความแตกต่างของความยาวลำไส้แต่อย่างใด ( $P>0.05$ ) อย่างไรก็ตามในวันที่ 82, 95 และ 110 ของการเลี้ยง ความยาวของลำไส้ปลาในแต่ละกลุ่มมีแนวโน้มคงที่ และไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองแต่อย่างใด ( $P>0.05$ ) (ภาพที่ 29)

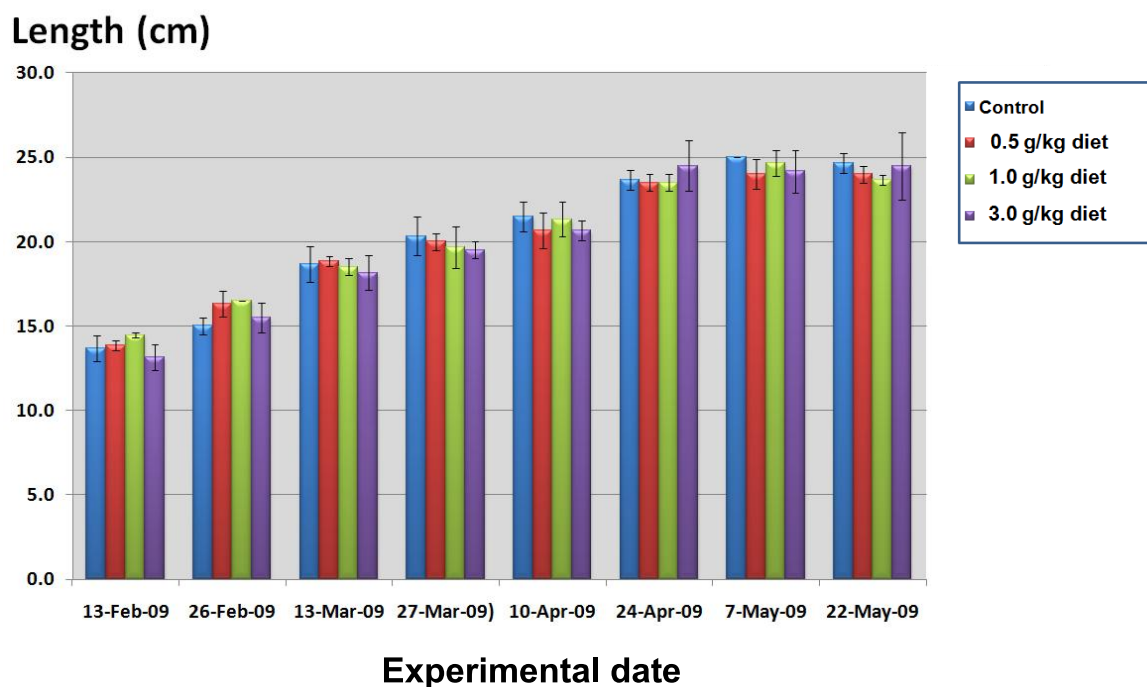
#### 5.6.2.1.6 ปริมาณแบคทีเรียที่พบในลำไส้

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  $9.20\pm0.10$ ,  $9.41\pm0.45$ ,  $8.71\pm0.37$ ,  $8.79\pm0.59$  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

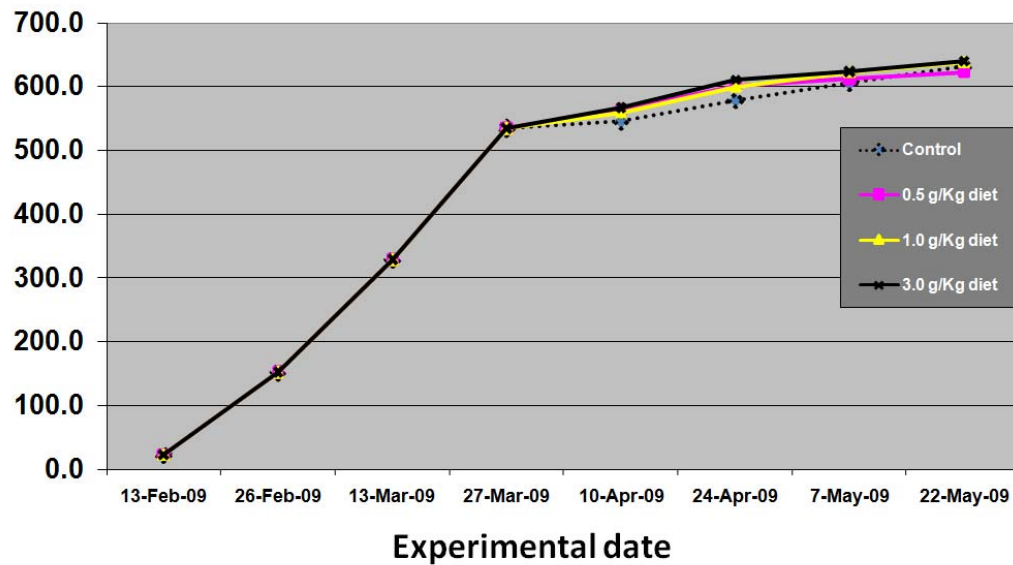
หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 26 ความยาวมาตรฐานของปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

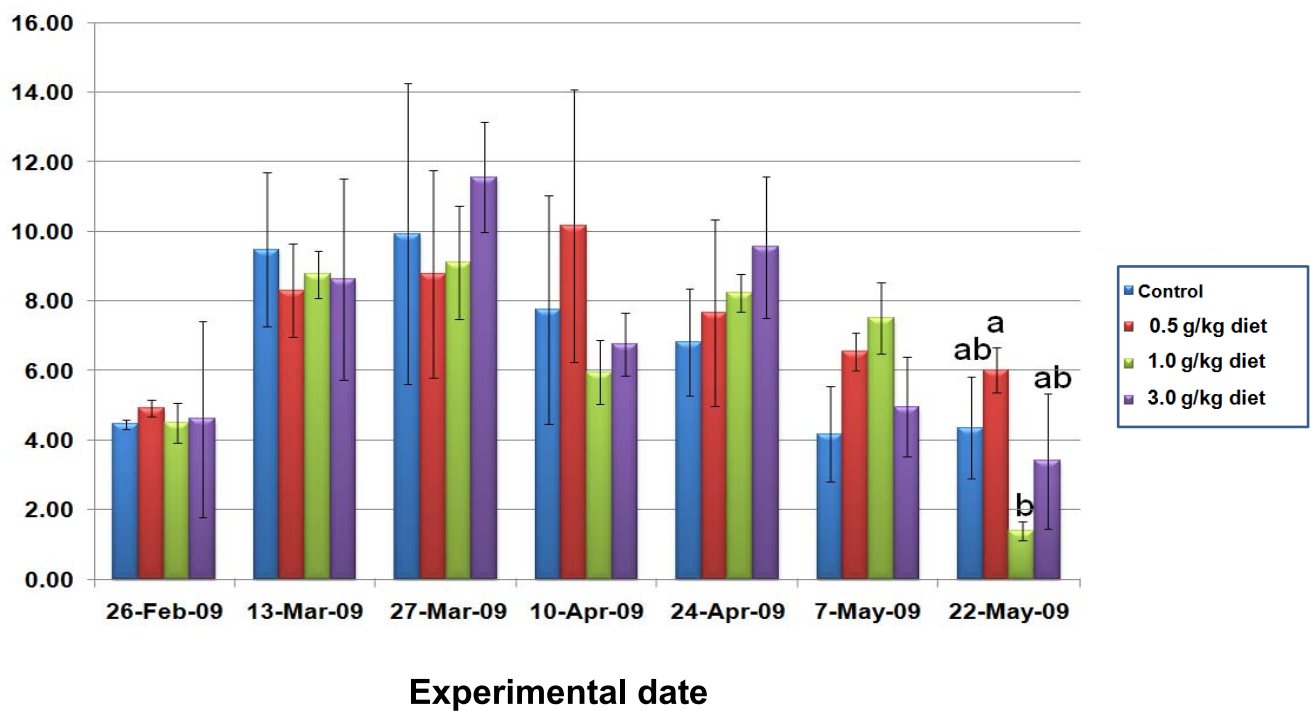
หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P < 0.05$ )

### Feed consumption (Kg)



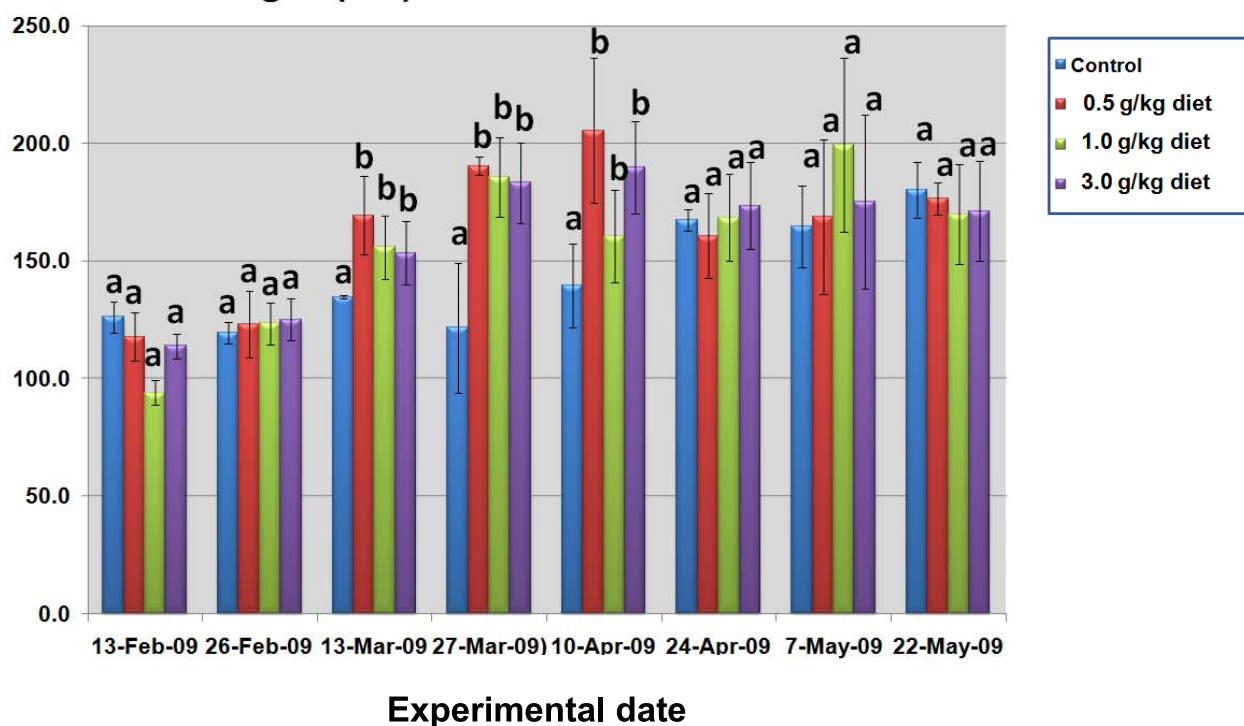
ภาพที่ 27 ปริมาณอาหารที่ให้เฉลี่ยในแต่ละกลุ่มตลอดการทดลอง

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P < 0.05$ )



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

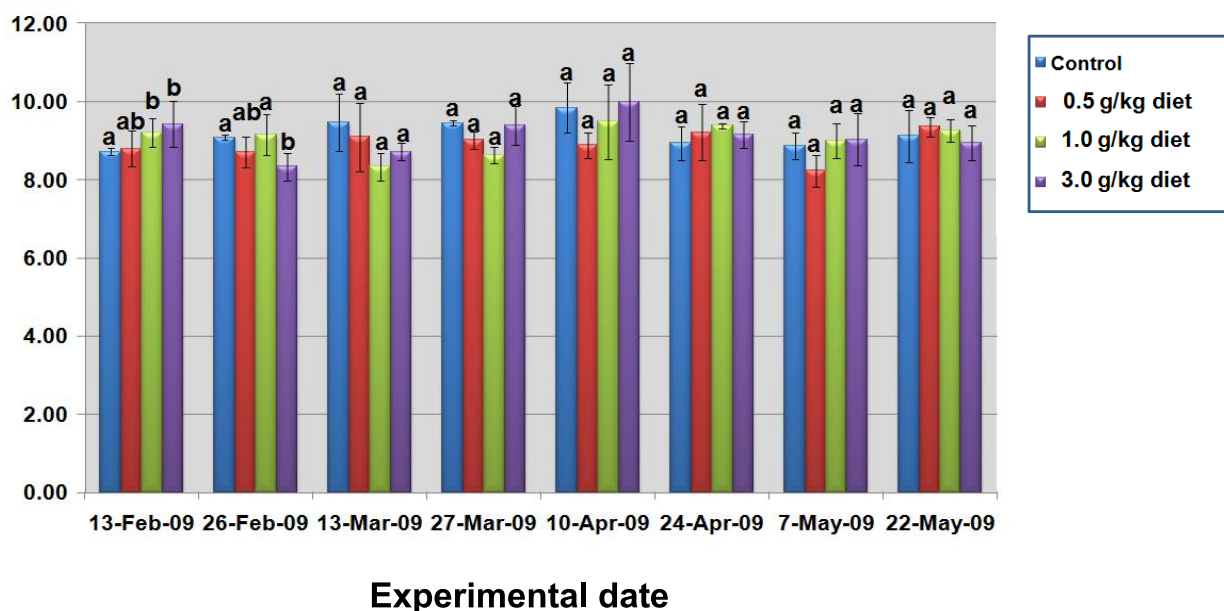
## Intestinal Length (cm)



### Experimental date

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

## Log number of bacteria (CFU/g)

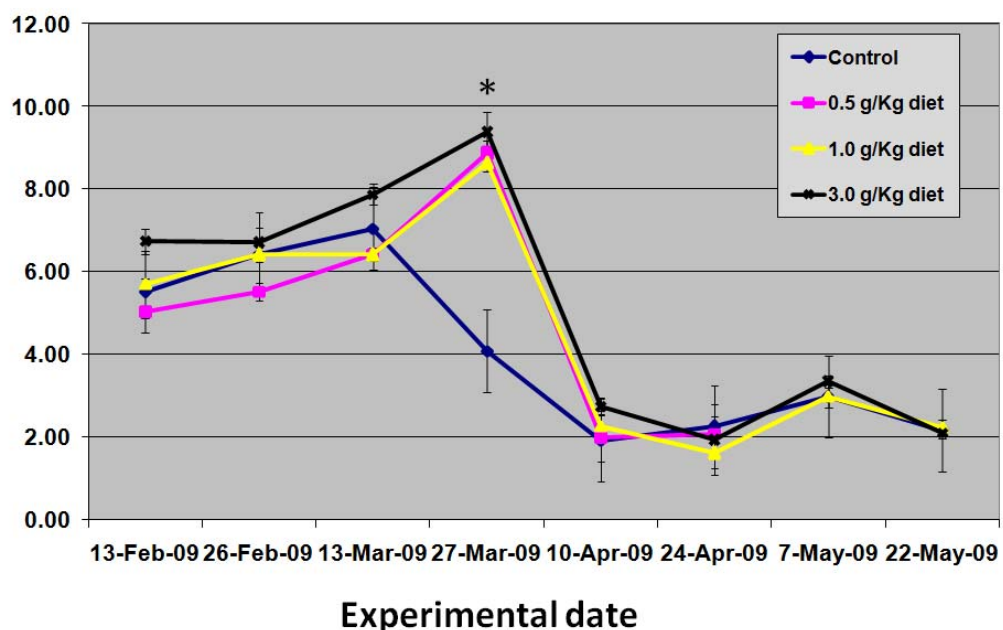


### Experimental date

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  $7.87 \pm 0.29$ ,  $7.63 \pm 0.21$  และ  $7.38 \pm 0.49$  หน่วย ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมกลับมีค่าต่ำลงเหลือ  $4.08 \pm 0.15$  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 ของปลาทดลองภายหลังการที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ เครื่องหมายดอกจัน (\*) เหนือข้อมูลบนเส้นกราฟ วันที่ 27 มีนาคม แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ )

### 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) ในปลากลุ่มควบคุม 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)

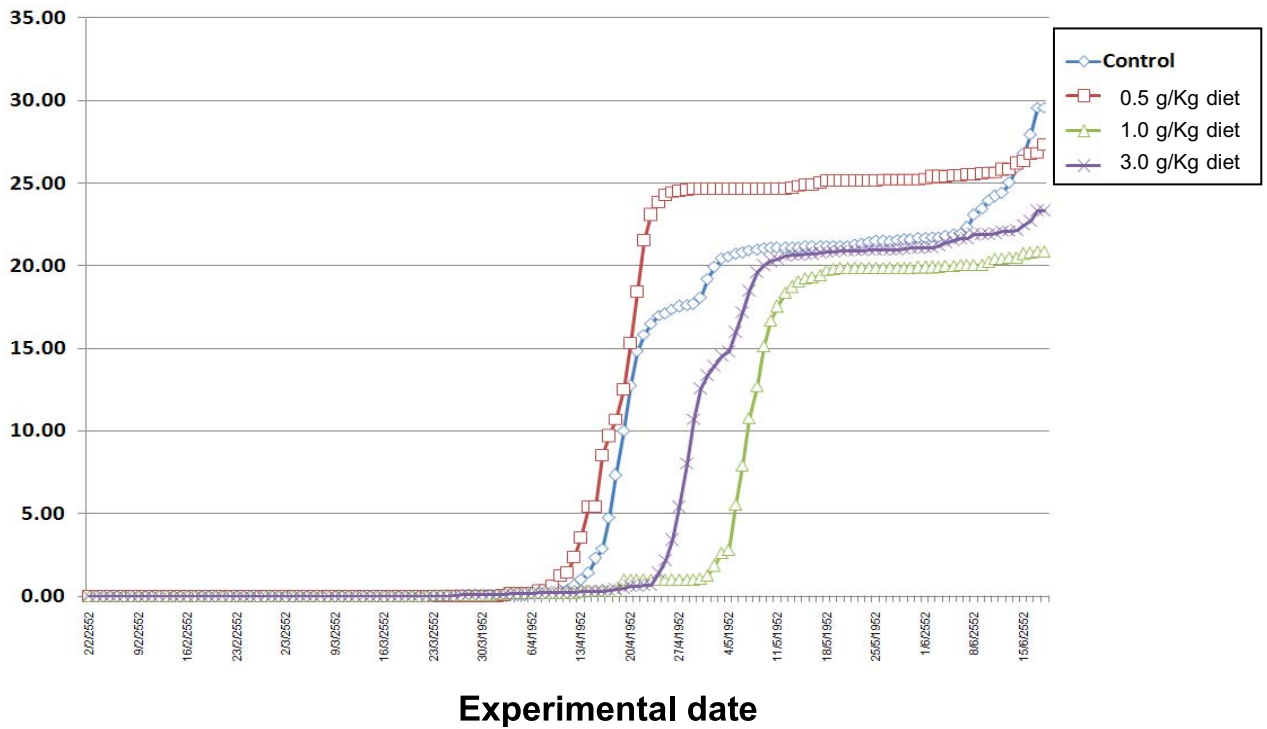
เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงเวลาดังกล่าวปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย ในอาหาร 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังไม่แสดงอัตราการตายเป็นจำนวนมากให้เห็นแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่ 18 เมษายน ประมาณ 2 สัปดาห์หลังจกพบการตายของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย 0.5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหาร 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  $23.33 \pm 5.53$  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  $19.30 \pm 2.19$  แล้วหลังจากนั้นอัตราการตายจะเริ่มคงที่และสูงขึ้นเล็กน้อยในวันเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยมีอัตราการตายสะสมเป็น  $20.86 \pm 1.97\%$  (ภาพที่ 32)

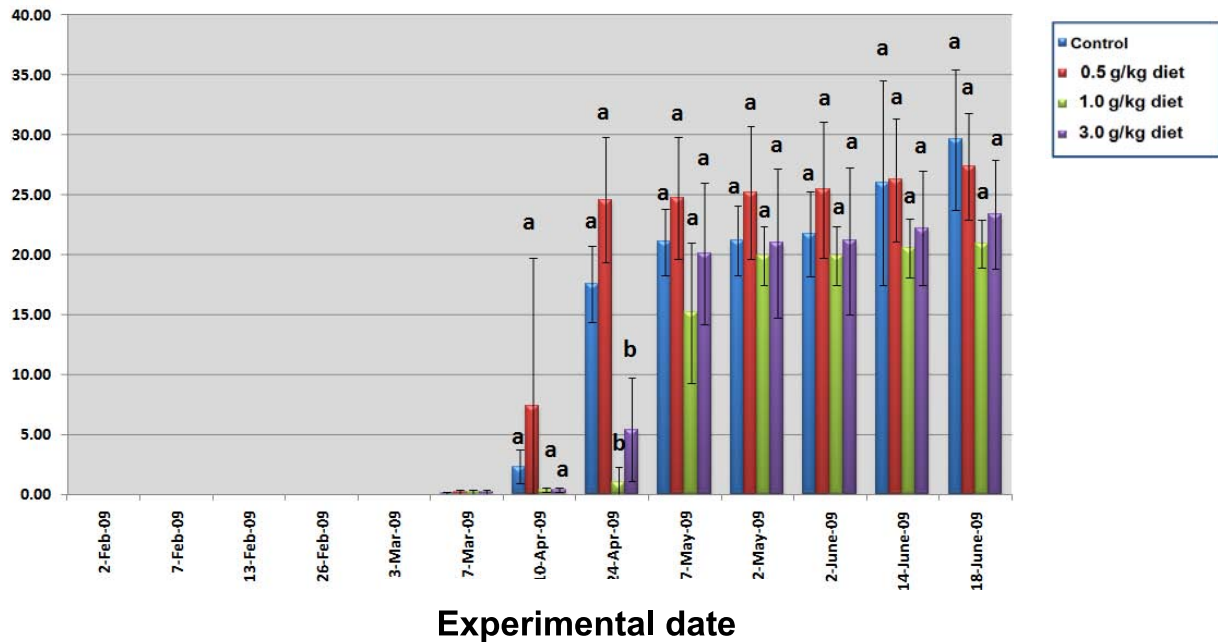
เมื่อนำค่าอัตราการตายสะสมของปลาในแต่ละกลุ่มและแต่ละช่วงของการเก็บข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่าจะพบความแตกต่างของอัตราการตายสะสมของปลาทดลองในวันที่ 82 ของการทดลอง (วันที่ 24 เมษายน) เท่านั้น โดยพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียในอาหารในอัตรา 1.0 และ 3.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 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  $436.67 \pm 36.36$ ,  $450.67 \pm 27.47$ ,  $490.67 \pm 12.22$  และ  $475.33 \pm 28.09$  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  $316.47 \pm 11.02$ ,  $320.93 \pm 28.07$ ,  $342.40 \pm 9.26$  และ  $348.13 \pm 20.75$  กิโลกรัม ตามลำดับ แต่ก็ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการรอดตายและน้ำหนักปลาที่วัดได้ในวันจำหน่ายผลผลิต

| หน่วยทดลอง | จำนวนปลา<br>เหลือรอด<br>[ตัว (%)] | จำนวนปลา<br>เหลือรอดเฉลี่ย<br>[ตัว (%)] | น้ำหนักเฉลี่ย<br>ต่อกลุ่ม <sup>1</sup><br>(กิโลกรัม) | น้ำหนัก<br>เฉลี่ย/ตัว<br>(กิโลกรัม) | ค่าเฉลี่ย <sup>2</sup><br>(กิโลกรัม) | อาหารที่ใช้<br>เฉลี่ย<br>(กิโลกรัม) | FCR<br>เฉลี่ย | จำนวนเงิน<br>ที่ขายได้<br>(บาท) <sup>a</sup> | รายได้เฉลี่ย<br>(บาท/กระชัง) <sup>3</sup> |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Control 1  | 453 (73.1)                        | 436.67±36.36<br>(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<br>(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<br>(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<br>(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<br>(74.7)                   |                                         |                                                      | 0.717                               |                                      |                                     |               | 195,150.3                                    |                                           |

หมายเหตุ: <sup>1, 2, 3</sup> ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง (P>0.05)

<sup>a</sup> 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  $1.93 \pm 0.12$ ,  $1.91 \pm 0.09$ ,  $1.80 \pm 0.17$  และ  $1.78 \pm 0.14$  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  $6.84 \pm 0.01$ ,  $6.81 \pm 0.02$ ,  $6.86 \pm 0.02$  และ  $6.85 \pm 0.02$  ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วยังถือว่าความเป็นกรด-ด่างในพื้นที่การเลี้ยงยังอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไป และยังไม่พบว่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยงไม่พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้ในแต่ละกลุ่ม มีความแตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลองเช่นกัน ( $P > 0.05$ ) (ภาพที่ 34)

#### 5.6.2.8.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

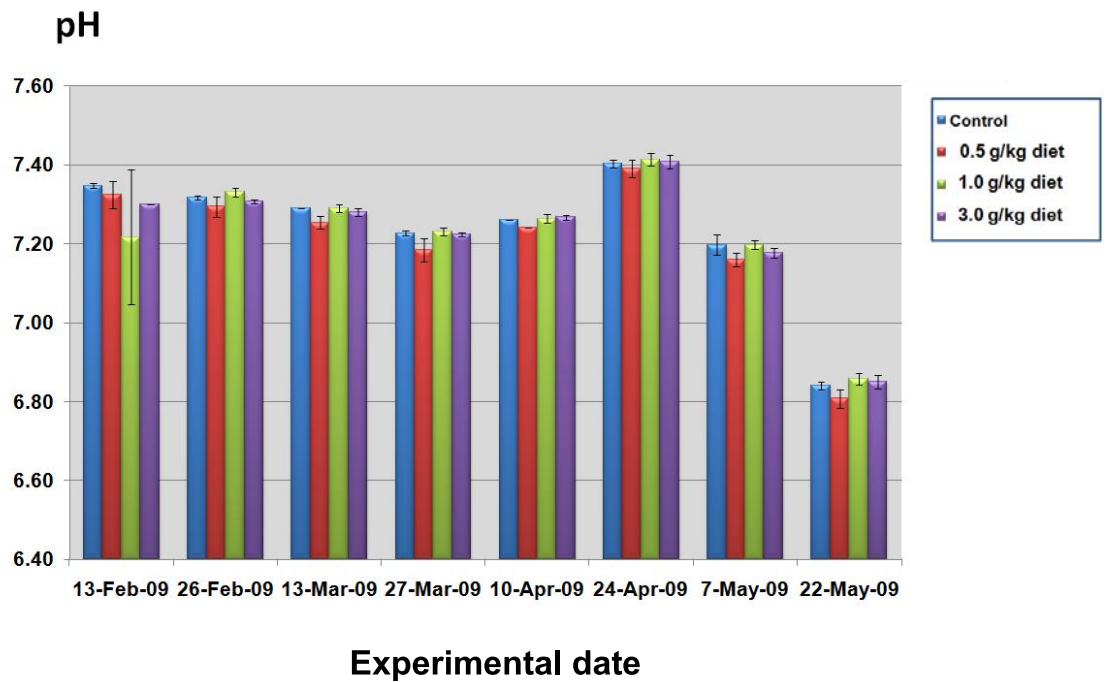
จากการตรวจวัดระดับปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำก็พบว่าในช่วง วันที่ 11-25 ของการเลี้ยงซึ่งเป็นระยะแรก ๆ ของการทดลองปริมาณของออกซิเจนละลายในน้ำบริเวณกระชังทดลองมีค่าค่อนข้างต่ำ ในช่วง 4.1-4.5 มิลลิกรัม/ลิตร เหมือนกันในทุกกลุ่มทดลอง ที่เป็นเช่นนี้เพราะน้ำในบริเวณแหล่งเลี้ยง จะไหลเคลื่อนตัวช้า ๆ แต่ระดับดังกล่าวก็ไม่ได้ส่งผลต่อปลามากนัก 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  $194 \mu\text{S/cm}$  –  $208 \mu\text{S/cm}$  และคงที่ในวันที่ 54 ของการทดลอง อย่างไรก็ตามในวันที่ 68, 82 และ 95 ความนำไฟฟ้าของน้ำในแหล่งเลี้ยงจะขยับสูงขึ้นกว่าก่อนหน้าและคงที่จนถึง วันที่ 95 ของการเลี้ยง โดยจะมีค่าความนำไฟฟ้าอยู่ประมาณ  $210 \mu\text{S/cm}$  นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 110 ของการเลี้ยง ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำก็ลดลงอีกครั้งอยู่ในระดับ  $200 \mu\text{S/cm}$  ซึ่งตลอดระยะเวลาของการทดลองไม่พบค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในแหล่งเลี้ยงจะอยู่ในช่วงอันตรายต่อสัตว์น้ำและไม่พบว่ามีน้ำในแต่ละกลุ่มการทดลองจะมีค่าความนำไฟฟ้าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงของการเก็บข้อมูล ( $P>0.05$ ) (ภาพที่ 36)

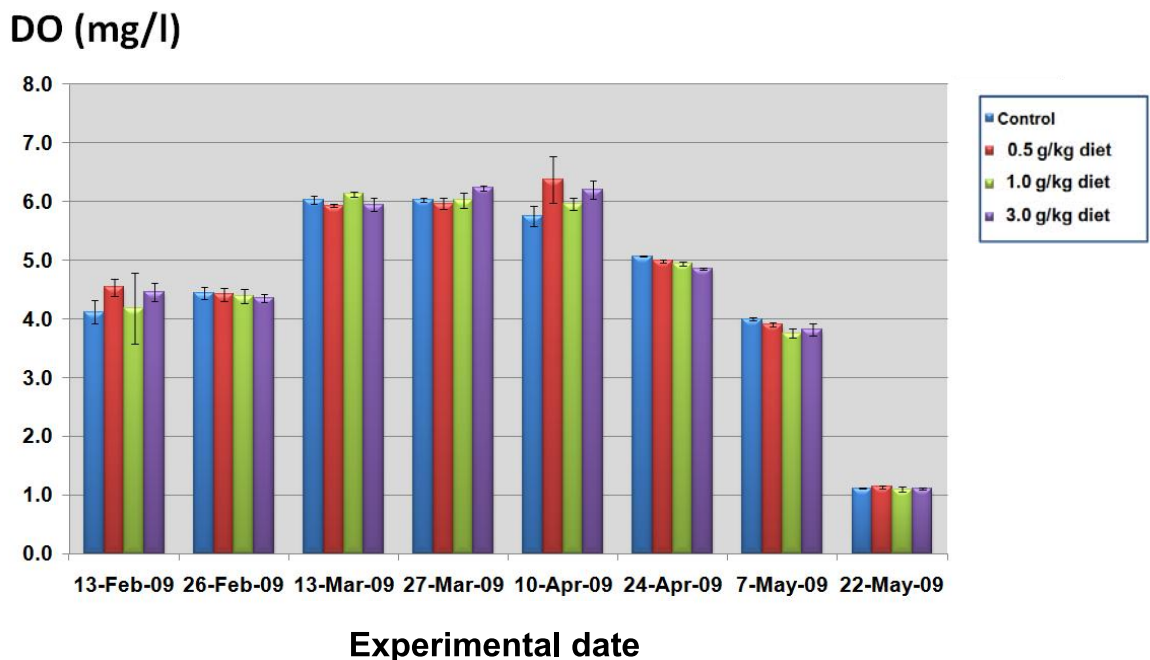
เมื่อพิจารณาถึงค่าความโปร่งใสของน้ำ ซึ่งจะมีความสอดคล้องกับคุณภาพน้ำตัวอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด โดยจะพบว่าในช่วงแรก ๆ ของการทดลอง น้ำในพื้นที่ดังกล่าวจะมีค่าความโปร่งใสค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าใกล้เคียงกันที่ประมาณ 40-45 เซนติเมตร เนื่องจากในช่วงดังกล่าวไม่มีมวลน้ำไหลผ่าน ทำให้น้ำในบริเวณดังกล่าวมีสีขุ่น อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่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

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



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

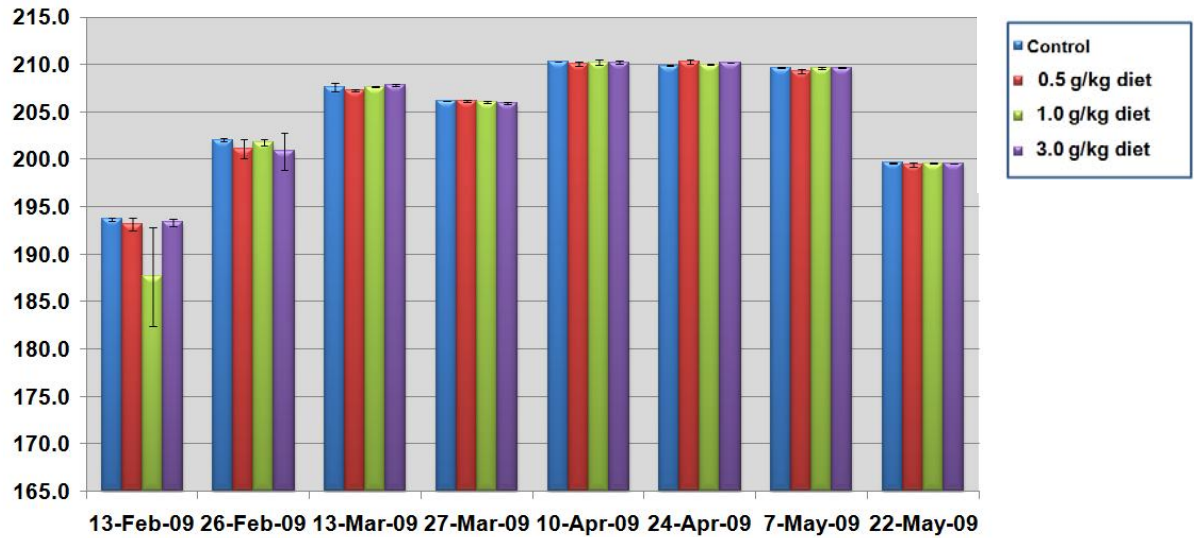
หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P>0.05$ )



**ภาพที่ 35** ปริมาณออกซิเจนละลายของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P>0.05$ )

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



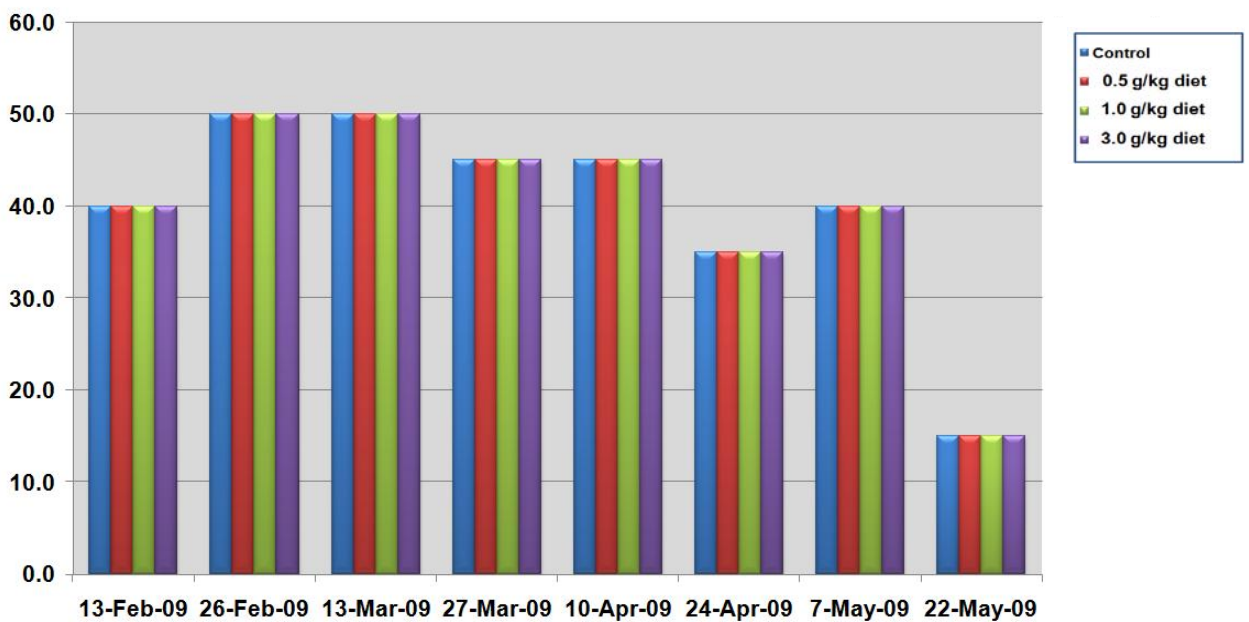
#### Experimental date

ภาพที่ 36 ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

*Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P>0.05$ )

### Transparency (cm)



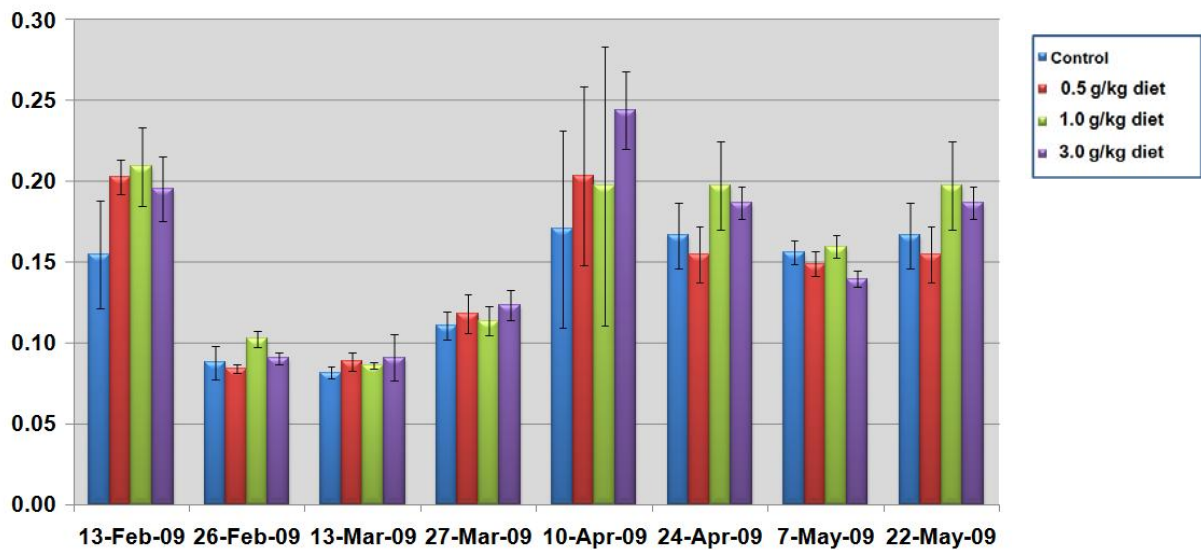
#### Experimental date

ภาพที่ 37 ค่าความโปร่งแสงของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

*Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P>0.05$ )

### NH<sub>3</sub>-N (mg/l)



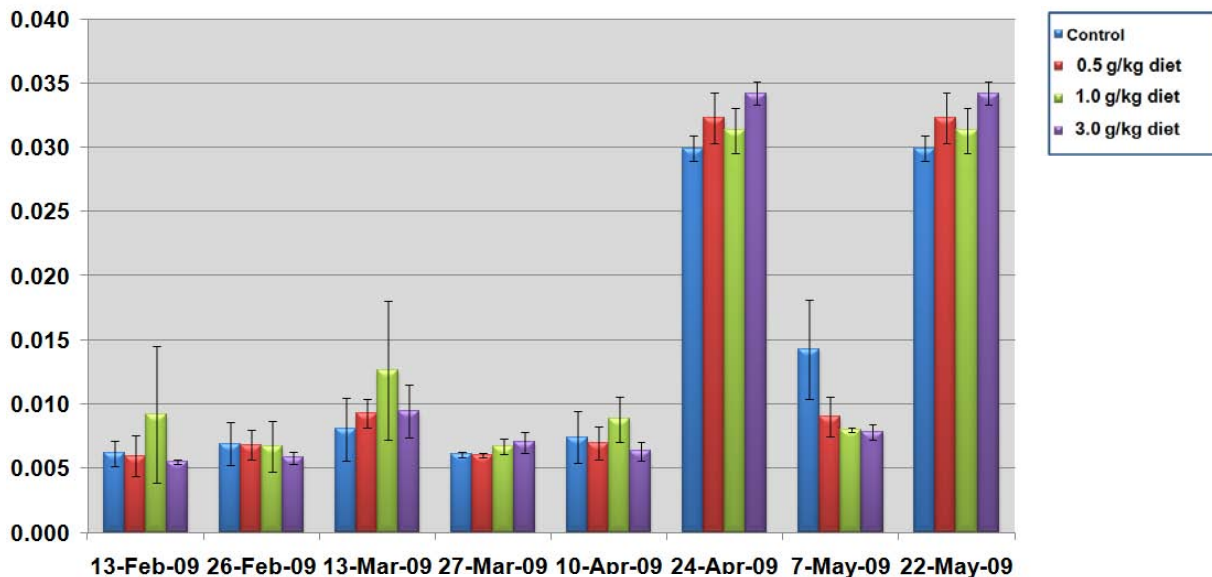
#### Experimental date

ภาพที่ 38 ปริมาณแอมโมเนียของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

*Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P>0.05$ )

### NO<sub>2</sub>-N (mg/l)



#### Experimental date

ภาพที่ 39 ปริมาณไนไตรท์ของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

*Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P>0.05$ )

#### 5.6.2.8.4 ปริมาณไนโตรเจนในน้ำ

นอกจากปริมาณแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการตรวจวัดระดับไนโตรเจนในน้ำในพื้นที่การเลี้ยงด้วย โดยพบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ลดลงการทดลองจะมีค่าอยู่ในช่วงต่ำมาก ในทุกกลุ่มทดลอง โดยเมื่อเริ่มต้นทดลอง ปริมาณไนโตรเจนของน้ำมีค่าอยู่ในระดับประมาณ 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 อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนที่ขยับเพิ่มสูงขึ้นหลายเท่าและสูงสุดในวันที่ 82 และ 110 ของการเลี้ยงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.030-0.035 แต่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนดังกล่าวถือว่าต่ำมากและเป็นพิษต่อสัตว์น้ำโดยทั่วไป (ภาพที่ 39)

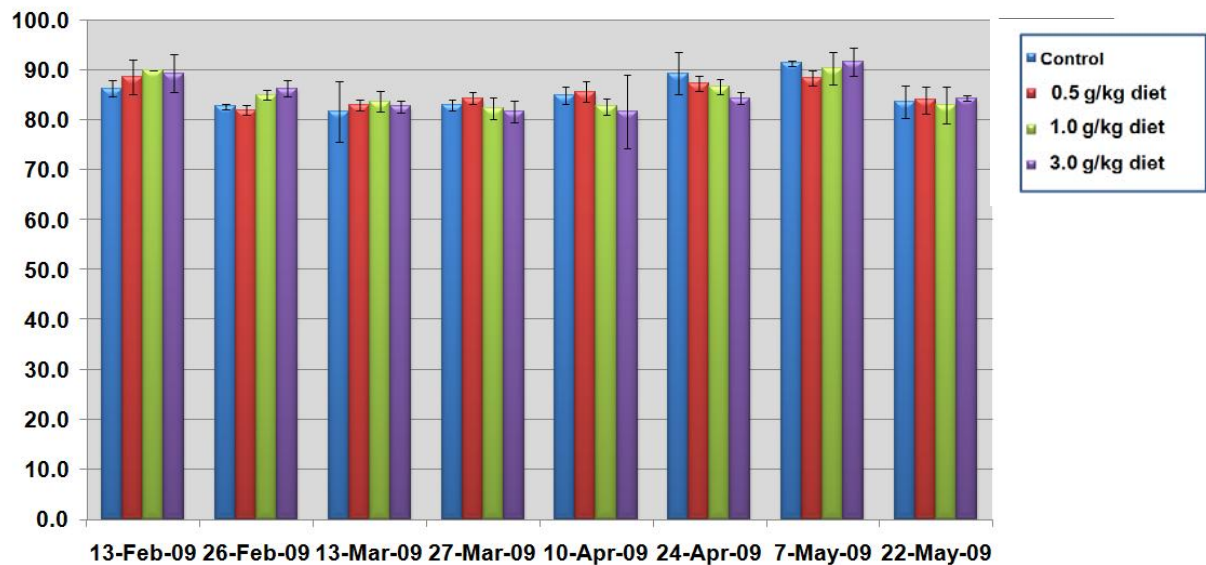
#### 5.6.2.8.5 ค่าความเป็นด่าง

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นด่างของน้ำ พบว่าในวันที่ 11 ของการเลี้ยงปริมาณค่าความเป็นด่างของน้ำในแหล่งเลี้ยงมีค่าอยู่ในช่วง 85-90 มิลลิกรัม/ลิตร as  $\text{CaCO}_3$  ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 4-8 ปริมาณค่าความเป็นด่างจะมีค่าลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 54 ของการเลี้ยง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 81-83 มิลลิกรัม/ลิตร as  $\text{CaCO}_3$  ซึ่งตลอดระยะเวลาของการทดลองค่าความเป็นด่างของน้ำในพื้นที่การเลี้ยงถือว่าการเคลื่อนไหวในช่วงแคบ ๆ ในระดับ 80-90 มิลลิกรัม/ลิตร as  $\text{CaCO}_3$  ซึ่งถือว่ามีค่าเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยทั่วไป และยังไม่พบค่าความเป็นด่างที่วัดได้ในแต่ละกลุ่มในแต่ละช่วงของการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) (ภาพที่ 40)

#### 5.6.2.8.6 ค่าความกระด้างของน้ำ

ในส่วนของระดับความกระด้างของน้ำในพื้นที่เลี้ยง จะพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับปริมาณค่าความเป็นด่างโดยมีค่าคงที่ตั้งแต่วันที่ 11 จนถึงวันที่ 95 ของการเลี้ยง และมีค่าใกล้เคียงกันมากในทุกกลุ่มทดลอง โดยพบว่ามีค่าอยู่ระหว่างประมาณ 74-77 มิลลิกรัม/ลิตร as  $\text{CaCO}_3$  (ภาพที่ 41) ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าที่มีความเหมาะสมกับการเจริญของสัตว์น้ำโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในวันที่ 110 ของการเลี้ยง ค่าความกระด้างของน้ำในแหล่งเลี้ยงมีค่าลดลงอย่างมาก โดยน้ำในแต่ละกลุ่มที่วัดได้มีค่าความกระด้างอยู่ที่  $60.67 \pm 1.53$ ,  $60.33 \pm 0.58$ ,  $61.33 \pm 0.58$  และ  $63.67 \pm 2.08$  ทั้งนี้จะเป็นผลมาจากมวลน้ำใหม่ที่มีความขุ่นสูงและมีความกระด้างที่ต่ำกว่า ไหลเวียนเข้ามาในพื้นที่แหล่งเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงเกณฑ์ความเหมาะสมแล้วพบว่าค่าความกระด้างดังกล่าวถือว่าอยู่ในระดับที่ไม่วิกฤติที่จะส่งผลต่อสัตว์น้ำได้ นอกจากนี้ก็ไม่พบเวลาที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ทำการตรวจวัดระดับ ค่าความกระด้างที่ได้จากน้ำในกลุ่มต่าง ๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด (ภาพที่ 41)

### Alkalinity (mg/l as CaCO<sub>3</sub>)



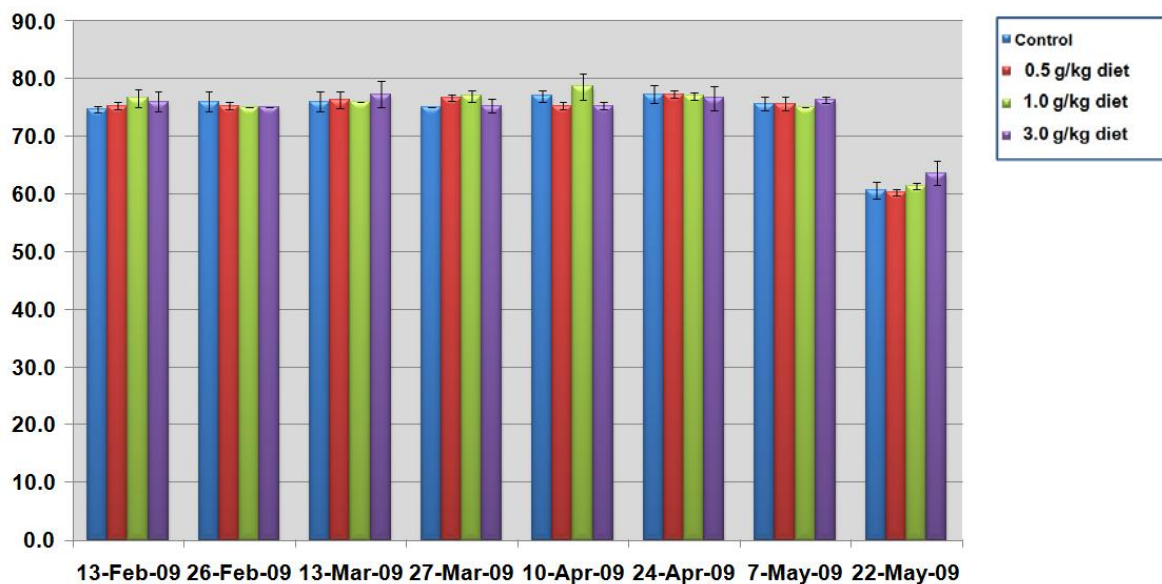
#### Experimental date

ภาพที่ 40 ค่าความเป็นด่างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

*Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ; ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงการทดลอง ( $P < 0.05$ )

### Hardness (mg/l as CaCO<sub>3</sub>)



#### Experimental date

ภาพที่ 41 ค่าความกระด้างของน้ำในกระชังที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองภายหลังจากที่ได้รับแบคทีเรีย

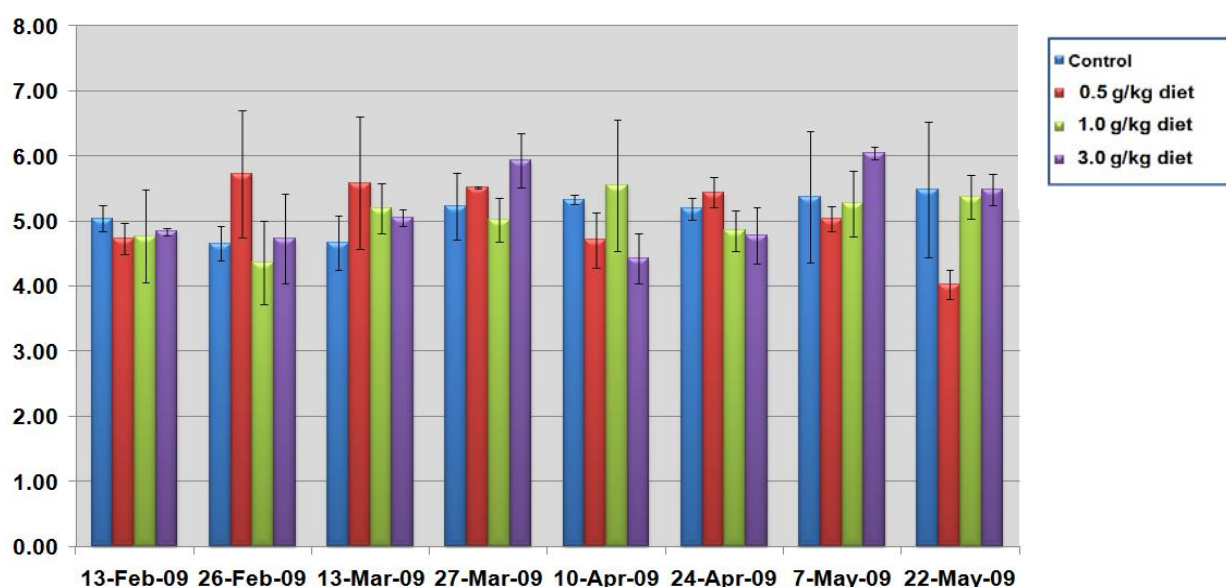
*Bacillus* สายพันธุ์ AQBS01 ในอาหารในระดับต่าง ๆ

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)



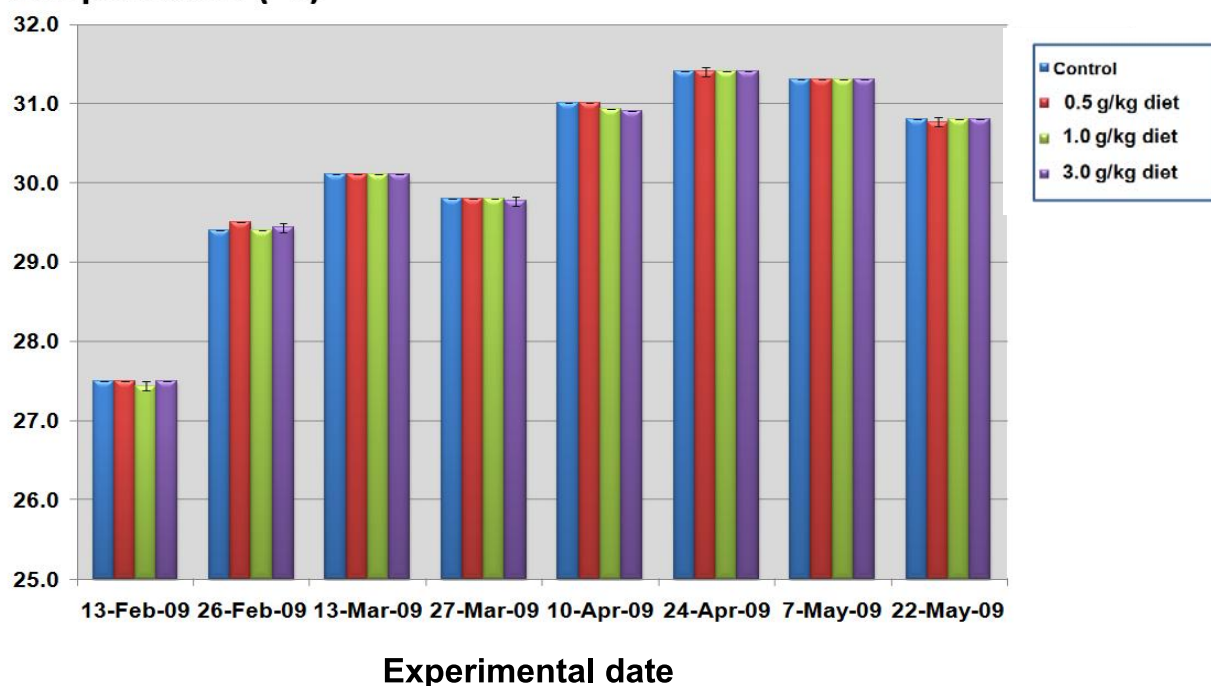
#### Experimental date

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)

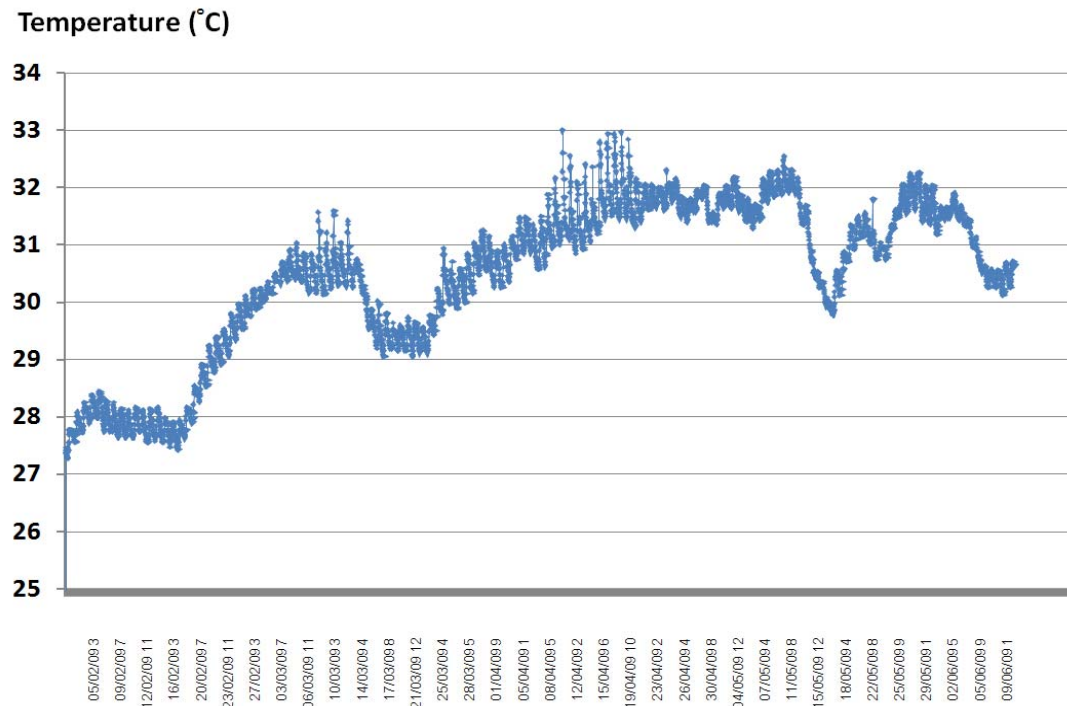
นอกจากการวัดอุณหภูมิตามปกติแล้ว ในการทดลองครั้งนี้ยังทำการวัดอุณหภูมิของน้ำและอากาศในบริเวณที่แขวนกระชัง โดยการติดตั้งอุปกรณ์ Data logger ซึ่งจะทำหน้าที่บันทึกการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งในน้ำและอากาศทุก ๆ 1 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาของการทดลอง (ภาพที่ 44) ซึ่งทำให้สามารถทราบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งของน้ำและอากาศอย่างละเอียด 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  $29^{\circ}\text{C}$  ในช่วงปลายเดือนมีนาคม หลังจากนั้นอุณหภูมิจะขยับสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเข้าสู่เดือนเมษายน ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิสูงสุด ประมาณ  $33^{\circ}\text{C}$  และคงที่ในระดับ  $32^{\circ}\text{C}$  จนถึงต้นเดือนพฤษภาคม อย่างไรก็ตามอุณหภูมิของน้ำจะเริ่มต่ำลงเรื่อย ๆ สู่ระดับ  $30^{\circ}\text{C}$  ในช่วงกลางเดือนพฤษภาคม หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ขยับสูงขึ้นอยู่ในช่วง  $30.5-32^{\circ}\text{C}$  จนถึงกลางเดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นช่วงสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 45) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของอากาศในระหว่างการเลี้ยงแล้วพบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำมีช่วงกว้างของการเปลี่ยนแปลงต่ำกว่าอากาศมาก โดยมีค่าของอุณหภูมิของอากาศต่ำสุด  $21.2^{\circ}\text{C}$  และสูงสุด  $43.6^{\circ}\text{C}$  ในเดือนกุมภาพันธ์ในวันที่ 15 และ 14 ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างนี้สามารถสังเกตได้ตั้งแต่เริ่มทดลองไปจนถึงเดือนปลายเดือนเมษายน ในวันที่ 24 ซึ่งหลังจากนี้แล้ว การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของอากาศจะเริ่มแคบลงจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 46)

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

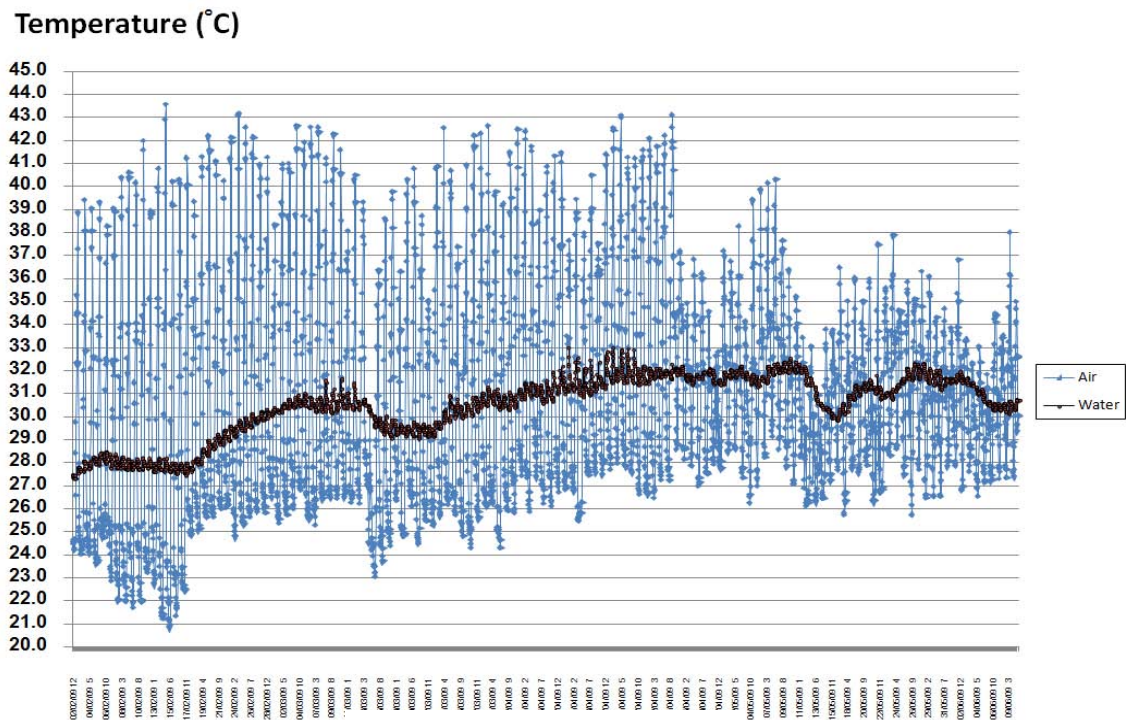
ของน้ำจะลดต่ำกว่า  $30.0^{\circ}\text{C}$  ในวันที่ 18 และเพิ่มขึ้นสูงกว่า  $31.0^{\circ}\text{C}$  อีกครั้ง ตั้งแต่วันที่ 5 เดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นช่วงเดียวกันกับปลาในกลุ่ม T2 และ T3 เริ่มตายเป็นจำนวนมาก



**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, H<sub>2</sub>S, 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

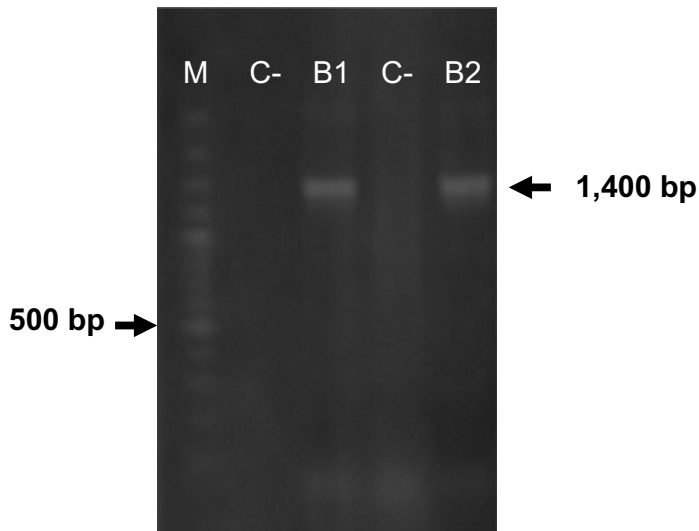
เมื่อนำข้อมูลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น ไปใช้ในการจำแนกตามวิธีและการอธิบายลักษณะแบคทีเรียของ Sneath *et al.* (1986) ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ พบว่าคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ตรงกับคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*

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

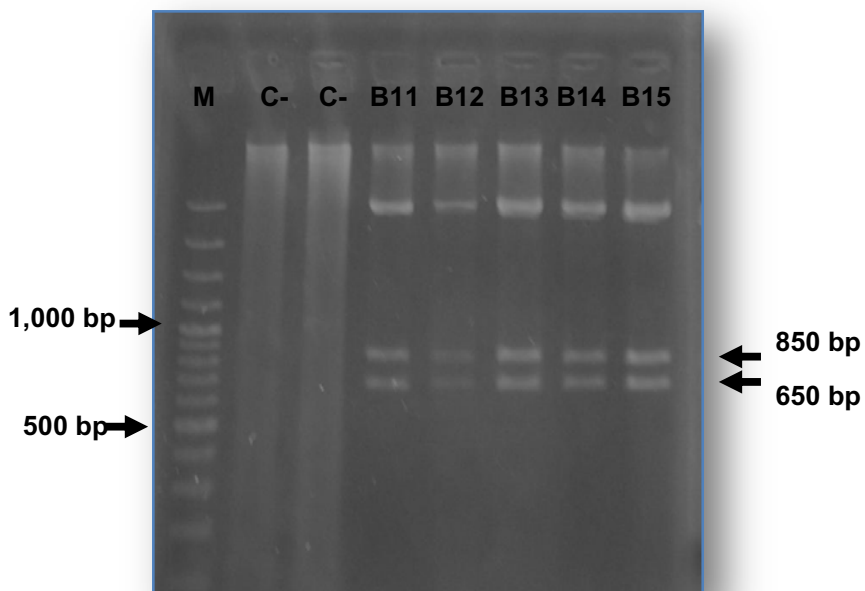
| คุณลักษณะที่ทำการทดสอบ      |           | ผลการทดสอบที่ได้ |
|-----------------------------|-----------|------------------|
| Gram-stain                  |           | +ve              |
| Shape                       |           | Bacilli          |
| Arrangement                 |           | Single           |
| Oxidase                     |           | +                |
| Catalase                    |           | +                |
| Casein hydrolysis           |           | +                |
| O/F test                    |           | -                |
| Motility                    |           | +                |
| Indol                       |           | -                |
| Voges-Proskauer (V.P.) test |           | +                |
| Methyl red (M.R.) test      |           | +                |
| H <sub>2</sub> 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 ACACCTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC

280      290      300      310      320      330      340      350      360
AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGACGAA AGTCTGACGG AGCAACGCCG CGTGAGTGAT GAAGGTTTTC 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 AGCGAAAAGC 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 CCGCACAAAG 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 TCATGCCCCC TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GACAGAACAA

1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
AGGGCTGCAA GACCGCAAGG TTTAGCCAAAT 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

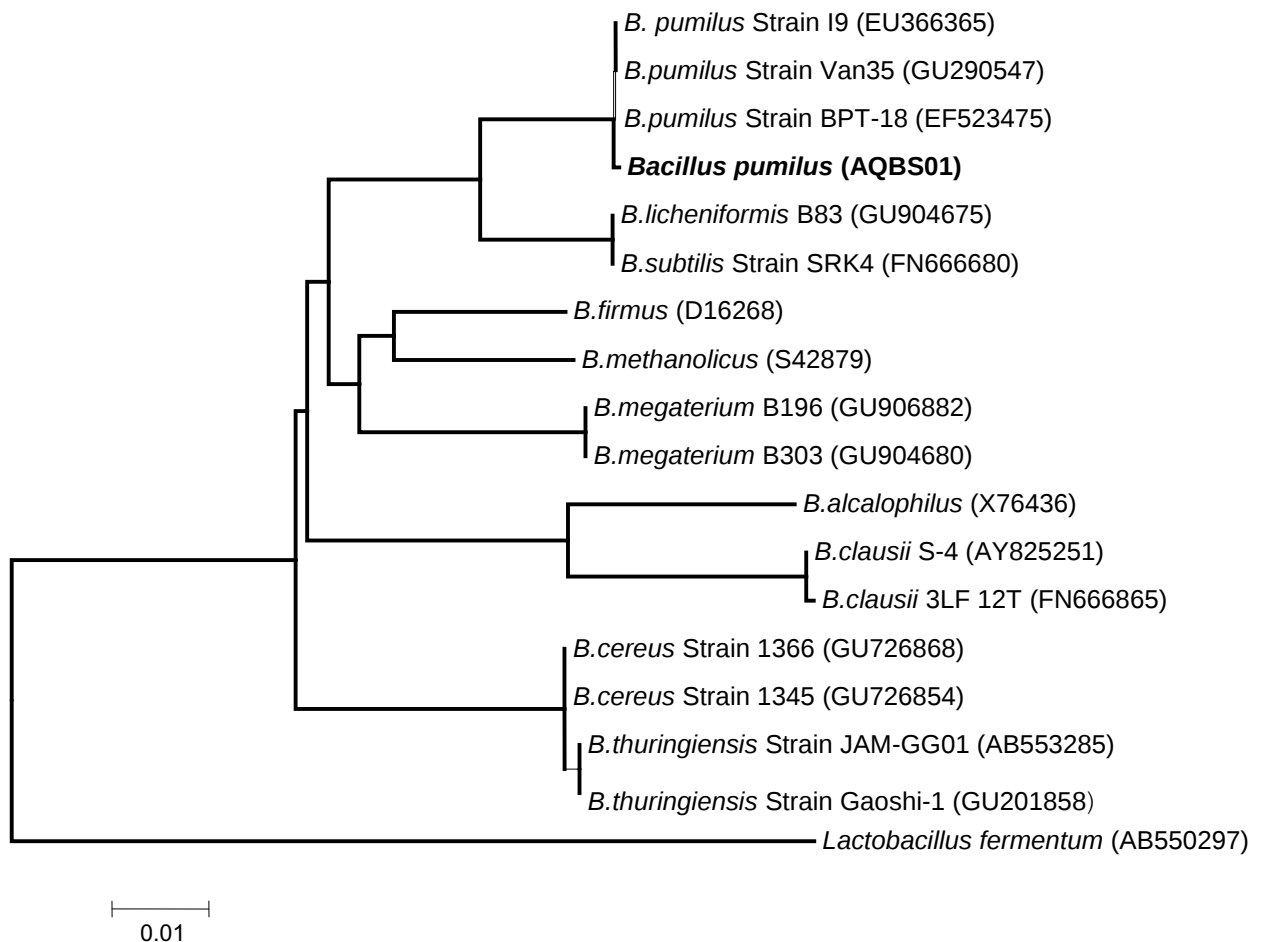
**ตารางที่ 4** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 โดยใช้ Specific primers ต่อยีน 16s rRNA gene ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* โดยใช้โปรแกรม BlastN

| Accession                  | Description                                                                   | <a href="#">Max<br/>score</a> | <a href="#">Total<br/>score</a> | <a href="#">Query<br/>coverage</a> | <a href="#">E<br/>value</a> | <a href="#">Max<br/>ident</a> |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <a href="#">GU290547.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain Van35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <a href="#">2627</a>          | 2627                            | 100%                               | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">FJ461466.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. SCSSS10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence          | <a href="#">2627</a>          | 2627                            | 100%                               | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">FJ032017.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain ES4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | <a href="#">2627</a>          | 2627                            | 100%                               | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">EF488975.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain BSH-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <a href="#">2627</a>          | 2627                            | 100%                               | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">EF491624.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> isolate ZB13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <a href="#">2627</a>          | 2627                            | 100%                               | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">DQ275671.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain HBP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | <a href="#">2627</a>          | 2627                            | 100%                               | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">EU600242.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. DF-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence             | <a href="#">2625</a>          | 2625                            | 99%                                | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">AM396932.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. 39 partial 16S rRNA gene, isolate 39                      | <a href="#">2625</a>          | 2625                            | 99%                                | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">FJ348011.1</a> | <i>Bacillus</i> sp. GGC-P5A2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence         | <a href="#">2623</a>          | 2623                            | 99%                                | 0.0                         | 99%                           |
| <a href="#">EU624442.1</a> | <i>Bacillus pumilus</i> strain SS-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <a href="#">2623</a>          | 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, H<sub>2</sub>S, 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  $\beta$ -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* ต่อการเจริญเติบโตของปลานั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด 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) นั้น จะพบความแตกต่างในสัปดาห์ที่ 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* ในอาหารยังทำให้ปลาทดลองมีความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophilla* ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอีกด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Taoka et al. (2006) ที่พบว่าการเสริมแบคทีเรีย Probiotics ในอาหารในรูปแบบเซลล์เป็นและเซลล์ตายสามารถยกระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะ Lysozyme activity, กลไกการเคลื่อนตัวของ Neutrophils และ Plasma bactericidal activity ได้ดีกว่าปลาในกลุ่มควบคุม และยังพบว่าการให้แบคทีเรีย Probiotics ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต มีแนวโน้มในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ดีกว่า การให้โดยใช้เซลล์ตายผสมอาหาร รวมถึงการใส่ลงไปในน้ำอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้ปลาที่ได้รับ Probiotics ในอาหารดังกล่าวสามารถต้านทานโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในปลานิลอีกหลายการทดลอง 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 อย่างไรก็ตามก็มีบางรายงานว่าการใช้ Probiotics บางชนิดก็ไม่สามารถชักนำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นได้ เช่น การศึกษาของ Shelby et al. (2006) ที่พบว่า การเสริมแบคทีเรีย Commercial probiotics ลงในอาหารไม่สามารถเพิ่มความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลได้ ซึ่งให้คล้ายกับการทดลองของ Gunther and Montealegre (2004) ที่พบว่า การเสริม *Bacillus subtilis* ลงไปในอาหารไม่สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลมีการตอบสนองได้ดีขึ้น เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้ Probiotics ในปลานิลหรือปลาชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น ต้องคำนึงถึงชนิดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียด้วยเนื่องจาก Probiotics บางชนิดนั้นต้องการสภาวะหรือ Host ที่ค่อนข้างจำเพาะในการดำรงชีวิตหรือการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน

ในส่วนของการใช้ *B. pumilus* เป็น Probiotics ในปลานิลนั้นถือว่ายังมีจำกัดมากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มีเพียงรายงานก่อนหน้านี้เพียงรายงานเดียวเท่านั้น คือ การศึกษาของ Aly et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษการใช้แบคทีเรียแบคทีเรียกว่า 80 isolates พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 3 ชนิดเท่านั้น ซึ่งได้แก่ *B. pumilus*, *B. firmus* และ *Citrobacter freundii* ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปผสมอาหารให้ปลานิลกินเป็นเวลา 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) ของปลาในแต่ละกลุ่มพบว่าช่วงระยะเวลาตั้งก่อนการให้อาหาร 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 การที่ปลานิกลทดลองได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในอาหารในระยะเวลาที่ยาวนานกว่า 4 สัปดาห์ จะมีผลทำให้ ความยาวลำไส้ ซึ่งโดยปกติจะมีมัดกล้ามเนื้อเรียบที่ทำงานภายนอกอำนาจจิตใจมีการขยายตัวออก ในสภาพการเลี้ยงจริง อย่างไรก็ตามเมื่อการทดลองดำเนินมาถึงช่วงกลางของการทดลอง ปรากฏว่าความยาวลำไส้ของปลาในทุกกลุ่มทดลองกลับมีค่าไม่แตกต่างกันจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

#### 6.2.4.2 ความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำและสาเหตุโน้มนำที่ทำให้ปลาเกิดโรค

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นได้เป็นอย่างดีว่าปัจจัยแวดล้อมโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำนั้น น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่โน้มนำทำให้ปลาเกิดโรค ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วเห็นว่าคุณภาพน้ำที่มีผลต่อการโน้มนำทำให้ปลาเกิดโรค เช่น ปริมาณออกซิเจนในน้ำ ความขุ่นใสของน้ำ 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 ของทุกกลุ่ม กลับมีค่าต่ำลงเรื่อย ๆ และเคลื่อนไหวในระดับต่ำ ๆ จนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใน ลำไส้กลับมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังจากการที่น้ำในแม่น้ำมีคุณภาพน้ำ โดยเฉพาะปริมาณ DO ลดลงเหลือเพียง 1-1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ส่งผลให้ปลาทดลองทุกกลุ่มหยุดกินอาหาร หรือกินอาหารน้อยมากจนสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าผลของการอดอาหารและการเปลี่ยนแปลง สภาพแวดล้อมอย่างรุนแรงอาจเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการตายจากการเกิดโรคของปลาตามมานั่นเอง

โดยในส่วนของอุณหภูมินั้น Ndong *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาในปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) พบว่าปลาที่ถูกนำไปอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 31°C หรือต่ำกว่า 19°C จะมีผล ให้ปลามีอัตราการรอดตายต่ำกว่าปลาที่อยู่ในสภาวะปกติหรือแตกต่างจากปกติเล็กน้อยอย่างชัดเจน ทั้งนี้เป็น ผลเนื่องมาจากสภาวะดังกล่าวจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาโดยตรง โดยจะมีผลทำให้ ปริมาณ Total leukocytes, กระบวนการ Respiratory burst, Phagocytic activity และ Phagocytic index ลดต่ำลงอย่างมี นัยสำคัญ และเมื่อทดสอบความต้านทานโรค Streptococcosis ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *S. iniae* ของปลาใน สภาพดังกล่าว พบว่าปลาที่อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 31°C โดยเฉพาะที่ 35°C ปลาจะยอมรับเชื้อ *S. iniae* ได้ดีมากและทำให้เกิดอัตราการตายสูงถึง 50-60% ซึ่งให้ผลคล้ายกับ Verma *et al.* (2007) ที่พบว่าปลา ไน (*Cyprinus capio*) ที่ได้รับการปรับอุณหภูมิของน้ำจาก 26°C ไปเป็น 36°C จะมีผลทำให้ปลามีจำนวน Leukoctyes ในเลือดและค่า Respiratory burst activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ จากการรายงานของ Decostere *et al.* (1999) ได้พบว่าสภาพของน้ำที่มีอุณหภูมิที่สูง จะมีผลกระทบต่อน้ำเชื้อ *Flavobacterium columnarae* มีความสามารถในการยึดเกาะกับปลา Common carp โดยเฉพาะตำแหน่งของเหงือกและผิวหนัง ส่งผลทำให้ปลาเกิดโรคและมีอัตราการตายที่รุนแรงตามมาได้ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ก็พบว่าช่วงที่ปลานิลเกิด โรคระบาดรุนแรงในกระชังทดลองนั้น แบคทีเรียชนิดดังกล่าวก็เป็นชนิดที่สามารถแยกได้จากปลาป่วยมากที่สุด

นอกจากอุณหภูมิแล้ว ปัจจัยคุณภาพน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงและส่งผลต่อปลามากอย่างหนึ่งคือ ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) ที่พบว่ามีค่าลดลงในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยงและส่งผลให้ปลาทดลองทยอย ป่วยและตายเป็นจำนวนมากเช่นกัน ซึ่ง Bowden (2008) ได้ให้ข้อสังเกตว่าปลาที่เลี้ยงในกระชัง โดยทั่วไปนั้น จะมีโอกาสที่จะได้รับผลกระทบจากการขาดออกซิเจนได้น้อยกว่าปลาที่เลี้ยงในบ่อ แต่ถ้าเกิดมีภาวการณ์ที่มวล น้ำที่มี DO ต่ำพัดผ่านเข้ามา จะทำให้การแก้ไขปัญหาทำได้ยากกว่าปลาที่เลี้ยงในบ่อและผลกระทบนั้นจะ เกิดรุนแรงมากขึ้นขึ้นอยู่กับว่ามวลน้ำที่ผ่านเข้ามาจะมีคุณสมบัติอย่างไร เช่น มวลน้ำมีสารอินทรีย์มากและมี การไหลผ่านพื้นที่การเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ผลกระทบของปลาต่อการขาด DO ก็จะรุนแรงมากตามไปด้วย ซึ่งเมื่อ พิจารณาถึงรายงานที่ผ่านมาก็พบว่า การลดลงของ DO นั้น ได้ส่งผลกระทบโดยตรงทางลบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในหลาย 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*) พบว่าเมื่อ ปลาอยู่ในสภาพที่ขาดออกซิเจน (Hypoxia) จำมีผลทำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในไตส่วนหน้า 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

เนื่องจากในช่วงปีที่ทำการทดลองพบว่าโรคในปลานิลนั้นได้เปลี่ยนแปลงไปจากการระบาดในช่วงก่อนปี 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 แต่ก็ไม่สามารถต้านทานการเกิดโรดดังกล่าวได้เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยเฉพาะช่วงที่ปลา มีขนาด 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* ไปทดลองใช้กับสภาพการเลี้ยงจริงในกระชังในพื้นที่อำเภอบางนางบวช 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 ก่อปรกักับอุณหภูมิที่สูงขึ้น จะทำให้เชื้อแบคทีเรียในน้ำส่วนใหญ่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยดังกล่าวทั้งหมดข้างต้น จะเป็นสาเหตุ สำคัญให้ปลายอมรับเชื้อโรคและเกิดโรคที่รุนแรง ก่อให้เกิด การตาย และความเสียหายที่รุนแรงตามมาในที่สุด

6. อย่างไรก็ตามในการระบาดของโรคในปีที่ทำการทดลองนี้ ปรากฏว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรครายหลังจากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการและการตรวจในภาคสนาม 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* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรครดังกล่าวได้เป็นอย่างดี 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 หรือก่อนการเกิดภาวะวิกฤติดังกล่าว 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 มาแสวง. 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**. 2<sup>nd</sup> 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 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific marine Biotechnology Conference and 3<sup>rd</sup> 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         |
| <b>รวมทั้งสิ้น</b>                                      | <b>33.62 บาท</b> |

ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ปริมาตร 1 ลิตร จะสามารถเลี้ยงให้ได้แบคทีเรียจากการปั่นแยกแล้วเฉลี่ย  $11.35 \pm 0.5$  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%<br>- ได้ทำการศึกษาความปลอดภัยและผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของการเสริมแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 ในปลานิลในห้องปฏิบัติการ<br>- ผลของการศึกษาทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ AQBS01 ที่ใช้มีความปลอดภัยต่อปลาทดลองและสามารถกระตุ้นให้ปลาทดลองมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงอย่างมีประสิทธิภาพ                            |                                                                                                                                                             |
| 2. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพห้องปฏิบัติการ        | ดำเนินการได้ตามแผน 100%<br>- 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%<br>- ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล โดยวิธีการผสมอาหารสภาพการเลี้ยงจริงของ                                                                                                                                                                                                                                       | ได้ดำเนินการวิจัยลำช้าเนื่องจากปลาปลาทดลองขนาดเล็กหลังจากการปล่อย                                                                                           |

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

### 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 บางตัวแสดงอาการตาโปนหรือตาขุ่นออกมา (ภาพที่ 1) บางครั้งจะพบรวมกับการว่ายน้ำควงสว่านไร้ทิศทางที่บริเวณผิวน้ำ 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 แล้วเชื้อมีลักษณะสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ได้ 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 โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาการตาโปนหรือตาขาวขุ่น 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 ที่สำคัญ 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. ลดหรือย้ายปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นสูงหรือหลีกเลี่ยงการเลี้ยงปลาในบางช่วงเวลา โดยเฉพาะการเลี้ยงในช่วงระยะเวลาวิกฤติ เนื่องจากปลาจะมีความเสี่ยงสูงมากต่อการเกิดโรค นอกจากนี้การปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นต่ำจะช่วยให้การจัดการสภาพการเลี้ยงได้ง่ายขึ้น

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* AQBS01 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* AQBS01 ซึ่งแยกได้จากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิลและได้ทำการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงในพื้นที่จริงในกระชังของเกษตรกร โดยคณะวิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษาที่เกิดขึ้นจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากการเกิดโรคระบาดในปลานิลและลดต้นทุนจากการใช้ยาและสารเคมีของเกษตรกร รวมทั้งยังเป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศว่าผลผลิตปลานิลที่ผลิตในประเทศไทยปราศจากการใช้ยาและสารเคมี เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อันจะส่งผลให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลของไทยสามารถดำเนินต่อไปอย่างมั่นคงและยั่งยืนต่อไปในอนาคต

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

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

### ผลการวิจัย

เมื่อนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ AQBS01 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 เขตอำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี โดยไม่มีการใช้ยาและสารเคมีใด ๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง ที่ 110 วัน พบว่าในช่วงเดือนเมษายน ของปี 2552 มีการระบาดของโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียอย่างหนักทำให้ปลาทดลองบางกลุ่มและปลาของเกษตรกรเกิดการตายและเสียหายอย่างหนัก อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าในช่วงเวลาดังกล่าวปลาในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรีย *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 ศิริชะภาภูมิ และ นนทวิทย์ อารีรักษ์ (เผยแพร่แล้วใน Website ของ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ [www.rdi.ku.ac.th/kasetsartresearch52/05- animal/prapansak\\_Nile](http://www.rdi.ku.ac.th/kasetsartresearch52/05- animal/prapansak_Nile), 10 กุมภาพันธ์ 2553)

2. การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกส์ *Bacillus AQBS01* ในการป้องกันโรคในปลานิล

โดย ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ และ นนทวิทย์ อารีรักษ์ (อยู่ระหว่างการเผยแพร่)

3. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2554. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* AQBS01 ในการป้องกันโรค Streptococcosis ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. (อยู่ระหว่างการพิจารณาของผู้ทรงคุณวุฒิ)
4. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ, มยุรี จัยวัฒน์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2554. การประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ในการป้องกันโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในสภาพการเลี้ยงจริง. ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง. (อยู่ระหว่างการพิจารณาของผู้ทรงคุณวุฒิ)