การใช้จุลินทรีย์จีไบโอติกเสริมอาหารปลานิล ในกระชังแม่น้ำน่านและบ่อดิน เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน

ชาญวิทย์ สุวรรณ์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

การใช้จุลินทรีย์จีไบโอติกเสริมอาหารปลานิล ในกระชังแม่น้ำน่านและบ่อดิน เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน

ชาญวิทย์ สุวรรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การใช้จุลินทรีย์จีไบโอติกเสริมอาหารปลานิล ในกระชังแม่น้ำน่านและบ่อดิน เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน

ชาญวิทย์ สุวรรณ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ----------
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ----------
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกล พรมยะ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ----------
(อาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร ----------
(อาจารย์ ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว ----------
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การใช้จุลินทรีย์จีไบโอติกเสริมอาหารปลานิล ในกระชังแม่น้ำน่านและบ่อดิน เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน

ชื่อผู้เขียน นายชาญวิทย์ สุวรรณ์

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส

บทคัดย่อ

มีการทดลองใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus subtillis* ผสมอาหารเพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันในปลานิล อย่างไรก็ตามการทดลองในภาคสนามมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่หนึ่ง ทดสอบผลของการใช้จีไบโอติก (บริษัท กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด) ที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์โปรไบโอติกกลุ่ม *B. subtillis* ในการเลี้ยงปลานิลแดงในกระชัง ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก โดยสุ่มปล่อยปลานิลจำนวน 15,000 ตัว (น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 59.87±3.63 กรัม) ลงในกระชังขนาด 3×6×2 ม. ความหนาแน่น 32 ตัว/ลบ.ม. จำนวน 13 กระชัง โดยให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม) จำนวน 4 กระชังและ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ที่มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน ให้อาหารจนอิ่ม เลี้ยงนาน 157 วัน ผลการทดลองพบว่า อัตรารอดตายเท่ากับ 72.8±7.3, 73.31±4.01, 71.38±6.8, และ 72.96±7.78% ส่วนน้ำหนักปลาเฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 871±95, 844±77, 781±66 และ 933±58 กรัม ตามลำดับ ได้ผลผลิตรวมเท่ากับ 9,341.5 กิโลกรัม กำไรเฉลี่ยเดือนละ 12,114.65 บาท อย่างไรก็ตามอัตรารอดและการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) แต่น้ำหนักปลามีแนวโน้มสูงขึ้นกลุ่มที่ใช้จีไบโอติก จากผลการทดลองครั้งนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของผลของการใช้จีไบโอติกต่อการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในปลานิล เพื่อให้มีความเหมาะสมที่สุด และให้ผลตอบแทนสูงสุด ข้อเสียของการเลี้ยงปลาในกระชังในแหล่งน้ำธรรมชาติ คือ ไม่สามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของน้ำที่ไหลผ่านกระชังได้ ในบางครั้ง เมื่อเกิดปัญหาปลาตาย เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาและสารเคมีเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า สามารถลดความสูญเสียจากการตาย ทำให้ยากที่จะชักจูงใจให้เกษตรกรหันมาใช้จุลินทรีย์ทดแทนยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการเลี้ยงปลา

การทดลองที่ 2 ทดลองใช้จีไบโอติกเพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันในปลานิลในบ่อดิน จังหวัดเชียงใหม่ โดยสุ่มปล่อยปลานิล (น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 18.41 กรัม) จำนวน 40 ตัว/

กระชัง ลงในกระชังขนาด 3×3×1 ม. ความหนาแน่น 2.2 ตัว/ลบ.ม. จำนวน 12 กระชัง โดยให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม) จำนวน 3 กระชังและ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ให้อาหาร 3 % ของน้ำหนักตัว เลี้ยงนาน 60 วัน ผลการทดลองพบว่าปริมาณโปรไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูปมีผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสุดท้าย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (P>0.05) ปลาที่ได้รับโปรไบโอติกผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูป ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราแลกเนื้อดีที่สุด ส่วนอัตราการรอดตายพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนค่าพารามิเตอร์ด้านคุณภาพน้ำต่าง ๆ ระหว่างการเลี้ยงพบว่า อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นด่าง และค่าแอมโมเนียรวมระหว่างการเลี้ยง เป็นเวลา 60 วัน คุณภาพน้ำโดยเฉลี่ย อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ผลของโปรไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกัน ที่อายุปลา 20, 40 และ 60 วัน มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว และกิจกรรมไลโซไซม์พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่า nitro blue tetrazolium ที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. มีค่า NBT สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การยับยั้งเชื้อก่อโรคค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังได้รับการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (1 x 10^8 CFU/มล.) พบว่า ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ หลังได้รับการฉีดเชื้อในวันที่ 2, 10 และ 15 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ส่วนในวันที่ 5 ชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 5 มล./อาหาร 1 มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สรุปได้ว่า ควรใช้จีไบโอติกผสมอาหารที่ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันในปลานิล

คำสำคัญ : โปรไบโอติก, ปลานิล, การเจริญเติบโต, ภูมิคุ้มกัน

Title THE USE OF G-BIOTIC MICROORGANISM FOR TILAPIA ADDITIVE FEED IN CAGE AND POND CULTURE TO PROMOTE GROWTH PERFORMANCE AND IMMUNITY

Author Mr. Chanwit Suwan

Degree Master of Science in Fisheries Technology and Aquatic Resources

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Chanagun Chitmanat

ABSTRACT

The study on the application of microorganisms, *Bacillus subtilis* as a probiotic in aquaculture showed the positive effects on the fish growth performance and immunogenicity. However, the field experiments in tilapia farms were quite low. In this study, there were two experiments. Experiment 1, the use of G Biotics (Greentech Aquaculture CO.,LTD.) containing *B. subtilis* as additive feeds for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was conducted to examine its effects on weight gain, growth rate and survival rate of Tilapia. Nile Tilapia were cage cultured in Nan River, Phitsanulok. Randomly releasing of 15,000 (initial average weight of 59.87±3.63 grams) fish in 36 m^3 cages with the density of 32 fish/m^3; total 13 cages. The 1×10^7 CFU/g of *Bacillus subtilis* with the concentration of 0, 2, 5 and 10 ml/kg^{-1} were used to feed tilapia for 157 days. They were laid out in completely randomized design with 3 replications for treatment trial while 4 replications were applied for the control group. The results showed survival rates were 72.8±7.3, 73.31±4.01, 71.38±6.8, and 72.96±7.78%, respectively. The average weights of fish were 871±95, 844±77, 781±66, and 933±58 grams, respectively. The total biomass was 9,341.5 kilograms; Average profit was 12,114.65 baht per month. Although survival and growth were not statistically different, but the trend was better in fish received probiotic supplementary diet group. The results of this study should be further research in terms of the effect of G-biotic on immune responses in tilapia to determine the most appropriate amount

with the affordable cost of production. The disadvantage of fish cultured in cages in natural water sources is that they cannot control the water quality and quantity passing through cages which sometimes this leads to the death of fish. For this reason, farmers need to use antibiotics and chemicals to ensure that can reduce the mortality of fish. It is difficult to convince farmers to use microorganisms to replace antibiotics and chemicals in fish.

Experiment 2, the use of G biotic for Nile tilapia was conducted to examine its effects on the growth performances and immunity. 480 (initial average weight of 18.41 grams) tilapia were randomly distributed into (9 m^3) cages located in an earthen pond with the density of 4.4 fish/m^3; total 12 cages. The 1×10^7 CFU/g of *Bacillus subtilis* with the concentration of 0, 2, 5 and 10 ml/kg^{-1}. They were laid out in completely randomized design with 3 replications. Fish were fed experimental diets at a rate of 3% biomass per day for 60 days. The results showed probiotic supplementary diet group had significantly affected on weight gain final weight and the specific growth rate ($P> 0.05$). The concentration of 2 ml/kg^{-1} was the best treatment in increasing final weight, specific growth rate and feed conversion ratio ($P<0.05$). Survival rate was not significantly different ($P> 0.05$). Water quality parameters such as temperature, pH, dissolved oxygen, total alkalinity and total ammonia during feeding for 60 days were suitable for aquatic animal growth. The results of probiotics on immune system were evaluated after 20, 40 and 60 days of study period. Phagocytosis and Serum lysozyme activity enhanced significantly ($P<0.05$). NBT values after 60 day increased significantly in fish fed 2 ml/kg^{-1} when compared with other groups ($P < 0.05$). Lysozyme activity after *Streptococcus agalactiae* (1×10^8 CFU/ml) challenges were not statistically different ($P> 0.05$) at 2, 10 and 15 days post-challenge. Lysozyme activity in fish fed probiotic groups at 5 day post-challenge increased significantly in fish fed 5 ml/kg^{-1} when compared with control ($P<0.05$). It was recommended that this G-biotic with the concentration 2 ml/kg^{-1} can be used as an alternative method for growth performance and immunity improvement.

Keyword : Probiotics, Nile tilapia, Growth performance, Immunity

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ชนกันต์ จิตมนัส ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. จงกล พรมยะ กรรมการที่ปรึกษา ผู้ให้ความเมตตากรุณา ช่วยเหลือสนับสนุนและให้คำแนะนำกับปัญหาอุปสรรคต่าง ๆ สำหรับการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ทั้งสละเวลาอันมีค่าในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สุรชัย พิกุลแก้ว ผู้ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้อนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่ห้องปฏิบัติการ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม และ บจก. กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และญาติพี่น้องที่ให้การเลี้ยงดู ส่งเสริมการศึกษา ให้การสนับสนุนทั้งด้านการเรียนและการดำเนินชีวิต ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดี จนทำให้ผู้เขียนประสบความสำเร็จในการศึกษา

ชาญวิทย์ สุวรรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ซ

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฎ

สารบัญภาพผนวก ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

ชีววิทยาของปลานิล 3

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลานิล 3

การเลี้ยงปลานิลในบ่อดิน 4

การเลี้ยงปลานิลในกระชัง 5

การเลี้ยงปลาวัยอ่อนเป็นปลารุ่น และการเลี้ยงปลาวัยรุ่นเป็นปลาขนาดตลาด 6

การเลี้ยงปลาวัยรุ่นเป็นปลาขนาดตลาด 6

คุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลานิล 7

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา 8

ความสำคัญของโปรไบโอติกกับการเลี้ยงสัตว์น้ำ 13

กลไกการทำงานของโปรไบโอติก 13

แหล่งที่มาของโปรไบโอติก 15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 18
ขอบเขตของการวิจัย 18
ระเบียบวิธีวิจัย 18
การทดลองในกระชังปลา แม่น้ำน่าน 18
การทดลองในบ่อดิน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 22
การทดลองในกระชังปลา แม่น้ำน่าน 22
การทดลองในบ่อดิน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 25
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 37
สรุปผลการศึกษา 37
ข้อเสนอแนะ 37
บรรณานุกรม 38
ภาคผนวก 49
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน 50
ภาคผนวก ข ภาพการทดลองและเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน 55
ประวัติผู้วิจัย 60

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในความเข้มข้นที่ต่างกันเป็นเวลา 60 วัน.....28

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 60 วัน 30

ตารางที่ 3 ต้นทุนผันแปรของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นเวลา 60 วัน.....36

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 Respiratory burst โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase 12

ภาพที่ 2 กระบวนการฟาโกไซโตซิส 13

ภาพที่ 3 ผลผลิตของปลานิลที่ให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม, T1) จำนวน 4 กระชัง และ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 157 วัน.....23

ภาพที่ 4 อัตรารอดตายของปลานิลที่ให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม, T1) จำนวน 4 กระชัง และ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 157 วัน 24

ภาพที่ 5 จำนวนของปลานิลในกระชังทั้งหมดที่ตายต่อวันตลอดการเลี้ยง 157 วัน 24

ภาพที่ 6 น้ำหนักสุดท้ายของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน.....28

ภาพที่ 7 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน.....29

ภาพที่ 8 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน 29

ภาพที่ 9 อัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน.....30

ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน 32

ภาพที่ 11 กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน.....33

ภาพที่ 12 ค่า Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ที่ความเข้มข้น *Bacillus subtillis* 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน.....34

ภาพที่ 13 ค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังฉีดเชื้อของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ที่ความเข้มข้น *Bacillus subtillis* 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน.....35

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก 1 สถานที่ทำการทดลองวิจัยในกระชังปลา แม่น้ำน่าน เขตจังหวัดพิษณุโลก 56
ภาพผนวก 2 การสุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตระหว่างการทดลอง.....56
ภาพผนวก 3 สถานที่ทำการทดลองวิจัยในบ่อดิน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่.....57
ภาพผนวก 4 การสุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตระหว่างการทดลอง.....57
ภาพผนวก 5 การเก็บตัวอย่างเลือดปลานิล.....58
ภาพผนวก 6 ซีรั่มปลาที่ได้จากการตกตะกอนของเลือด.....58
ภาพผนวก 7 แสดงการแยกชั้นของเม็ดเลือด 59
ภาพผนวก 8 การวัดกิจกรรมไลโซไซม์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer.....59

บทที่ 1
บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลานิลของไทยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทำให้เกิดความมั่นคงทางอาหารและสร้างงานสร้างอาชีพ ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงปลานิลในปี พ.ศ. 2560 มีปริมาณ 185,902 ตัน ปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ของประเทศไทยในปี 2560 ปริมาณ 5,817.8 ตัน คิดเป็นมูลค่า 344.7 ล้านบาท (เกวลิน, 2560) การเพาะเลี้ยงปลานิลในไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจาก ตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หากมีการพัฒนาการเลี้ยงให้ได้มาตรฐานตามแต่ละประเทศต้องการ

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำที่นิยมเลี้ยงและบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเลี้ยงง่าย ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีฟาร์มเลี้ยงปลานิลทั้งหมด 221,320 ฟาร์ม โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวนฟาร์มเลี้ยงปลานิลมากที่สุด 126,260 ฟาร์ม (เกวลิน, 2556) อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ปัจจุบันปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและการขาดแคลนน้ำ จะเป็นการขับเคลื่อนให้เกษตรกรและผู้มีส่วนได้ส่วนเสียในการปรับตัว ลูกค้าจะมีความต้องการผลผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมทั้งผู้ผลิตต้องมีความรับผิดชอบต่อสิ่งแวดล้อมและสังคมด้วย การผลิตที่มีการใช้ยาและสารเคมีอาจจะไม่ใช่สิ่งที่ผู้บริโภคต้องการ

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่แสดงให้เห็นผลดีต่อการเจริญเติบโตและการสร้างภูมิคุ้มกันปลาจำนวนมาก (ชาญวิทย์ และชนกันต์, 2560) แต่ผลยืนยันทางวิชาการของการใช้ในฟาร์มปลานิลมีน้อย การใช้จุลินทรีย์ในปริมาณและเวลาที่ไม่เหมาะสมอาจจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตทำให้ไม่สามารถแข่งขันทางการค้าได้ อย่างไรก็ตาม เกษตรกรจำนวนมากยังคงยึดติดกับแนวปฏิบัติแบบเดิม ๆ การให้ความรู้ อบรมและจัดหาบ่อสาธิตสำหรับเกษตรกรจึงเป็นสิ่งจำเป็นงานวิจัยนี้ ต้องการสร้างทางเลือกให้กับเกษตรกร โดยการใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อลดการใช้ยาและสารเคมี ลดการใช้น้ำในการเปลี่ยนถ่าย ซึ่งเป็นการลดการใช้พลังงานไปด้วย ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ G Biotic ซึ่งมีจุลินทรีย์หลัก คือ *Bacillus subtilis* มีการใช้งานในฟาร์มกุ้งทะเลอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่นำมาใช้ในฟาร์มปลานิล ทางบริษัทฯ จึงต้องการนำผลิตภัณฑ์มาทดลองใช้เพิ่มเติมในฟาร์มปลานิล เพื่อให้ปลาแข็งแรง โตเร็วและทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศในเขตภาคเหนือ

โปรไบโอติก (Probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตใช้ผสมในอาหารแล้วส่งผลดีต่อสัตว์น้ำ มีรายงานผลการใช้จุลินทรีย์ในอาหารปลา ทำให้ปลานิลโตเร็วและมีความต้านทานโรคสูงขึ้น สัตว์น้ำ

ต้องสัมผัสกับจุลินทรีย์ในน้ำตลอดเวลา ซึ่งมีทั้งจุลินทรีย์ที่ดีและไม่ดี การรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หรือโปรไบโอติกให้แก่สัตว์น้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น จุลินทรีย์โปรโบโอติกจะแย่งพื้นที่ยึดเกาะบนตัวสัตว์น้ำ (Gismondo et al., 1999)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ประเมินผลของจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโต (น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราแลกเนื้อ ผลผลิตที่ได้)

2. ประเมินผลของจุลินทรีย์ต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (ไลโซไซม์ การจับกินสิ่งแปลกปลอม อัตรารอด ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค)

3. ประเมินผลทางอ้อมของการให้อาหารผสมจุลินทรีย์ต่อคุณสมบัติของน้ำ โดยหากจุลินทรีย์นี้ไปช่วยย่อยหรือดูดซึมสารอาหาร ของเสียที่ขับถ่ายจากตัวปลาจะน้อยลง และไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อน้ำในบ่อปลา ทำให้ไม่ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในปริมาณมาก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มูลค่าทางเศรษฐศาสตร์ที่ได้จากการทำวิจัยหรือแก้ปัญหานี้ (ในเชิงปริมาณ) สร้างรายได้ให้แก่ผู้ประกอบการเพิ่มขึ้น ลดความสูญเสียจากปลาตาย ปลาเป็นโรค ลดปัญหาการไม่มีน้ำเปลี่ยนถ่าย

2. องค์ความรู้ใหม่ ผลของการใช้จุลินทรีย์ในการเลี้ยงปลานิลที่ถูกต้องตามหลักวิชาการสามารถนำไปใช้ได้จริง คุ้มค่ากับการลงทุน

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* ลำดับอนุกรมวิธานของปลานิลถูกจัดอันดับอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Vertebrata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *Oreochromis niloticus*

ปลานิล มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถวลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล และมีลายพาดขวาง 9 ถึง 10 แถบ บริเวณครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง มีครีบหลังอันเดียวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15 ถึง 18 อันและครีบอ่อน 12 ถึง 14 อันครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 12 ถึง 14 อัน ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้มที่กระดูกแก้มมีสีเข้มอยู่ 1 จุด (กรมประมง, ม.ป.ป.-ก)

ปลานิลสามารถกินได้ทั้งสัตว์ และพืชรวมทั้งซากพืชที่เน่าเปื่อย รวมทั้ง สาหร่ายโรติเฟอร์ สัตว์หน้าดิน และแพลงค์ตอนสัตว์ เช่น ตัวอ่อนของแมลงน้ำ และไรน้ำ กินตั้งแต่ระดับผิวน้ำ ไปถึงพื้นท้องน้ำ นอกจากนี้สามารถฝึกให้ปลานิลกินอาหารเม็ดหรืออาหารผสม และเศษอาหารได้ง่าย (อุดม, 2549)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลานิล

ปลานิลเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เลี้ยงง่าย โตเร็ว รสชาติดี ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน อัตราการขยายตัวของผลผลิตปลานิลของไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยปริมาณเพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อปีร้อยละ 7 ซึ่งในปี พ.ศ. 2556 มีผลผลิตปลานิลจำนวน 197,925 ตัน (Noorit, 2014)

ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลานิลเพียงร้อยละ 5 ของผลผลิตปลานิลทั้งหมด ฉะนั้น การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจากตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กรมประมง, ม.ป.ป.-ก)

การเลี้ยงปลานิลในบ่อดิน

การเตรียมบ่อ เป็นขั้นตอนขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งของการเลี้ยงปลา ก่อนปล่อยพันธุ์ลูกปลาเกษตรกรต้องเตรียมความพร้อมของบ่อให้เรียบร้อย โดยการตากบ่อให้แห้งเพื่อปรับสภาพดินพื้นบ่อ ฆ่าเชื้อ กำจัดวัชพืชและพรรณไม้น้ำต่าง ๆ กำจัดศัตรูของปลา นำน้ำเข้าบ่อ สร้างอาหารธรรมชาติแล้วจึงปล่อยลูกปลา โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การตากบ่อ ควรมีการตากบ่อทุกครั้งหลังการจับปลาขาย เพื่อเป็นการปรับสภาพของดินพื้นบ่อที่อาจมีการสะสมของสิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำที่เลี้ยง ซึ่งหากสะสมเป็นปริมาณมากจะก่อให้เกิดก๊าซแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ การตากบ่อให้แห้งจะเป็นวิธีการกำจัดก๊าซแอมโมเนีย แนะนำให้มีการตากบ่อให้แห้งเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน หรือมากกว่าขึ้นกับสภาพบ่อ และช่วงเวลาที่ตากบ่อ

2. การใส่ปูนขาว มีวัตถุประสงค์เพื่อการฆ่าเชื้อต่าง ๆ ที่สะสมอยู่บริเวณพื้นบ่อและปรับสภาพของ ดินในบ่อ ปริมาณปูนที่ใส่แตกต่างกันไปตามสภาพพื้นที่ เช่นบริเวณที่เป็นดินกรดมีความต้องการปูนขาวมากกว่า หรือบ่อที่ผ่านการเลี้ยงปลามาเป็นเวลานานมี ความต้องการปูนขาวน้อยกว่าบ่อใหม่ อย่างไรก็ตามมีข้อแนะนำสำหรับการใส่ปูนขาวให้ใส่ในปริมาณ 100-150 กิโลกรัมต่อไร่ โดยโรยให้ทั่วพื้นก้นบ่อและขอบบ่อ

3. กำจัดวัชพืชและพรรณไม้น้ำต่าง ๆ เช่น กก หญ้า ผักตบชวา โดยนำมากองสุมไว้ เมื่อแห้งแล้วนำมาใช้เป็นปุ๋ยหมักในขณะที่ปล่อยปลาลงเลี้ยง ถ้าในบ่อมีเลนมากจำเป็นต้องสาดเลนขึ้นโดยนำไปเสริมคันดินที่ชำรุดหรือใช้เป็นปุ๋ยแก่พืช ผัก ผลไม้ บริเวณใกล้เคียง พร้อมทั้งตกแต่งเชิงลาดและคันบ่อให้แน่นด้วย หรือโดยการตากบ่อให้แห้ง แล้วดันดินก้นบ่อขึ้นไปเสริมคันบ่อให้แน่น

4. การกำจัดศัตรูปลา ศัตรูปลานิลได้แก่กลุ่มปลากินเนื้อ เช่น ช่อน ชะโด หมอ ดุก นอกจากนี้ก็มีสัตว์พวก กบ เขียด งู เป็นต้น ดังนั้นก่อนปล่อยปลานิลลงบ่อเลี้ยง จำเป็นต้องกำจัดศัตรูดังกล่าวเสียก่อน โดยวิธีระบายน้ำออกให้เหลือน้อยที่สุด ใช้โล่ติ๊นสดหรือแห้งประมาณ 1 กิโลกรัมต่อปริมาณน้ำในบ่อ 100 ลูกบาศก์เมตร ทุบหรือบดโล่ติ๊นให้ละเอียดนำลงแช่น้ำประมาณ 1-2 ปี๊บ ขย้ำโล่ติ๊นให้น้ำสีขาวออกมาหลาย ๆ ครั้งจนหมด นำไปสาดให้ทั่วบ่อ ปลาที่ค้างอยู่ที่พื้นบ่อจะลอยหัวขึ้นมาภายหลังสาดโล่ติ๊นประมาณ 30 นาที ใช้สวิงจับ ขึ้นมาบริโภคได้ ปลาที่เหลือตายพื้นบ่อจะลอยในวันรุ่งขึ้น ส่วนศัตรูจำพวก กบ เขียด งู จะหนีออกจากบ่อไป และก่อนปล่อยปลาลงเลี้ยงควรทิ้งระยะไว้ประมาณ 7 วันเพื่อให้ฤทธิ์ของโล่ติ๊นสลายตัวไปหมดเสียก่อน นอกจากใช้โล่ติ๊นในการกำจัดศัตรูปลาในบ่อแล้ว ยังอาจใช้ปูนขาวและกากชาในการกำจัดศัตรูปลาได้อีกด้วย ใช้กากชา 2 กิโลกรัมต่อน้ำ 20

ลิตร แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 วัน หลังจากนั้นก็นำเฉพาะน้ำที่ได้ไปสาดให้ ทั่วบ่อที่มีเนื้อที่ของบ่อประมาณ 2 ไร่

5. การลอกเลน มีความจำเป็นถ้าหากว่ามีการสะสมของเลนในพื้นบ่อปริมาณมาก และการตากบ่อเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงต้องมีการลอกเลน ซึ่งอาจมีการลอกเลนปีละครั้ง หรือทุก 2 ปี 3 ปี หรือ 5 ปี ขึ้นอยู่กับสภาพการสะสมของเลนพื้นบ่อ การลอกเลนทำได้โดยการตากบ่อให้แห้งแล้วใช้รถ แทรกเตอร์ดันเลนแห้งที่บริเวณผิวหน้าพื้นบ่อขึ้นไปตบแต่งคันบ่อให้แน่นหนา

6. การนำน้ำเข้าบ่อ ใช้อวนตาถี่สองชั้นหุ้มที่ปลายท่อน้ำเข้าบ่อ เพื่อกรองไข่และลูกปลาขนาดเล็กที่จะเข้ามาในบ่อ

การเลี้ยงปลานิลในกระชัง

การเลี้ยงปลาในกระชังเป็นรูปแบบการเลี้ยงปลาแบบพัฒนา (Intensive) หรือกึ่งพัฒนา (Semi-intensive) เน้นการให้อาหารเพื่อเร่งผลผลิต และการเจริญเติบโต จึงควรจะใช้อาหารที่มีคุณค่าทางโปรตีนค่อนข้างสูง และเหมาะสมกับความต้องการของปลาแต่ละขนาด ปัจจัยที่สำคัญควรนำมาประกอบการพิจารณาเกี่ยวกับการให้อาหารปลาในกระชัง ได้แก่

1. ระดับโปรตีนในอาหาร ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของปลานิลที่มีอายุต่างกันจะแตกต่างกันสำหรับลูกปลาวัยอ่อน (Juvenile) และลูกปลานิ้ว (Fingerling) จะต้องการอาหารที่มีระดับโปรตีนประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ แต่ในปลาใหญ่จะต้องการอาหารที่มีโปรตีนประมาณ 25–30 เปอร์เซ็นต์

2. เวลาในการให้อาหาร เนื่องจากปลานิลจะกินอาหารได้ดี เมื่อมีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำสูง จะเป็นช่วงเวลากลางวัน ดังนั้นจึงควรให้อาหารในช่วงเวลาดังกล่าว

3. ความถี่ในการให้อาหาร ปลานิลเป็นปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหารจริงจึงสามารถกินอาหารได้ทีละน้อย และมีการย่อยอาหารที่ค่อนข้างช้าการให้อาหารครั้งละมากๆ จะทำให้สูญเสียอาหาร และก่อให้เกิดสภาวะน้ำเสียได้ ดังนั้นเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารเม็ดสูงสุดจึงควรให้อาหารแต่น้อย แต่ให้บ่อยๆ โดยความถี่ที่เหมาะสม คือ ปริมาณ 4-5 ครั้งต่อวัน จะช่วยเร่งการเจริญเติบโต และทำให้ผลตอบแทนในเชิงเศรษฐศาสตร์สูงสุด

4. อัตราการให้อาหาร ปริมาณอาหารที่ให้ปลากินจะขึ้นอยู่กับขนาดของปลา และ อุณหภูมิ หากอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นจะทำให้อัตราการกินอาหารของปลาสูงขึ้นตามไปด้วย อุณหภูมิน้ำที่เหมาะสมประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ควรให้อาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักปลาสำหรับปลาขนาดเล็กในปลารุ่น อัตราการให้อาหารจะลดลงเหลือ ประมาณ 6-8 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับปลาใหญ่อัตราการให้อาหารจะเหลือเพียง ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์

5. การจัดการระหว่างการเลี้ยง ควรมีการตรวจสอบกระชังเพื่อซ่อมแซมส่วนที่ชำรุดทุก ๆ สัปดาห์ รวมทั้งสุ่มปลามาตรวจสอบน้ำหนักเพื่อปรับปริมาณอาหารที่ให้ได้อย่างเหมาะสม

6. การเก็บเกี่ยวผลผลิต การเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นข้อควรคำนึงอีกประการหนึ่งสำหรับการจัดการการเก็บเกี่ยวผลผลิต จากการเลี้ยงในกระชังควรคำนึงถึงขนาดของปลา และปริมาณที่ตลาดต้องการ (สถาบันวิจัย และพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2540)

การเลี้ยงปลาวัยอ่อนเป็นปลารุ่น และการเลี้ยงปลาวัยรุ่นเป็นปลาขนาดตลาด

การเลี้ยงปลาวัยอ่อนเป็นปลาวัยรุ่น การอนุบาลปลาวัยอ่อนถึงขนาด 50-100 กรัม นั้นเป็นการเลี้ยงเพื่อส่งต่อไปยังผู้เลี้ยงปลาขนาดตลาดซึ่งจะดำเนินการได้ทั้งในบ่อดินและกระชังในกระชังเกษตรกรควรคัดขนาดทุก 4-6 สัปดาห์ เพื่อคัดปลาที่แคระแกร็นออก การเลี้ยงเริ่มจากขนาดประมาณ 1 กรัม สามารถเลี้ยงในกระชังขนาดตา 1/2 นิ้ว ด้วยอัตราปล่อย 3,000 ตัว/ลูกบาศก์เมตร ใช้เวลาประมาณ 7-8 สัปดาห์ จะได้ปลาขนาดประมาณ 10 กรัม เพื่อนำไปคัดและเลี้ยงต่อให้ได้ปลาขนาด 25-30 กรัม ด้วยอัตราการปล่อย 2,500 ตัว/ลบ.ม. ประมาณ 5-6 สัปดาห์ ก็จะได้ปลาขนาดเฉลี่ย 25-30 กรัม ตามต้องการ (กรมประมง, 2557)

ในบ่อดิน บ่อดินที่ใช้ในการอนุบาลไม่ควรมีขนาดใหญ่นัก ขนาดบ่อที่เหมาะสมมีพื้นที่ 400-800 ตารางเมตร ระดับน้ำในบ่อลึกประมาณ 0.8-1.0 เมตร อัตราการปล่อยลูกปลาขนาด 2-3 เซนติเมตร ประมาณ 10,000 ตัวต่อพื้นที่ 400 ตารางเมตร ระยะเวลาในการอนุบาลลูกปลาประมาณ 1-2 เดือน จะได้ลูกปลาขนาด 7-10 เซนติเมตร (กรมประมง, ม.ป.ป.-ข)

การเลี้ยงปลาวัยรุ่นเป็นปลาขนาดตลาด

หลังจากอนุบาลลูกปลาได้ 12-14 สัปดาห์ ควรคัดขนาดเพื่อให้ได้ปลาที่จะไปเลี้ยงต่อมีขนาดสม่ำเสมอ กล่าวคือจะได้ปลารุ่นขนาดประมาณ 50-60 กรัม ก่อนนำไปเลี้ยงเป็นปลาขนาดตลาด (กรมประมง, 2557)

การเลี้ยงปลานิลในกระชังจะให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 1,500 กิโลกรัมต่อกระชัง (กระชังขนาด 4×6×2.5 เมตร และ 5×5×2.5 เมตร) โดยปล่อยปลาลงเลี้ยงความหนาแน่น 30 ตัว/ลูกบาศก์เมตร (ลูกปลาขนาด 30-50 กรัม) ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 4-5 เดือน ก็จะได้ขนาด 800-900 กรัม/ตัว เป็นขนาดที่ตลาดต้องการ (กรมประมง, 2557)

การเลี้ยงปลานิลในบ่อ ขนาดบ่อที่เลี้ยงอยู่ที่ 2-6 ไร่ ระดับน้ำลึกอยู่ที่ 100-180 เซนติเมตร ปล่อยปลาลงเลี้ยงความหนาแน่น 2,500-5,000 ตัวต่อไร่ ขนาดที่ปล่อย 1-50 กรัม ระยะเวลาการเลี้ยง 4-8 เดือน จับที่ขนาด 500-800 กรัม/ตัว ผลผลิตอยู่ที่ 1,200 กิโลกรัม/ไร่ (กรมประมง, ม.ป.ป.-ข)

คุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลานิล

คุณสมบัติของน้ำที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงปลา นับว่ามีความสำคัญเพราะเป็นปัจจัยในการดำรงชีวิตของปลา หากปลาได้อาศัยอยู่ในน้ำที่มีคุณสมบัติดีมีความเหมาะสมก็จะทำให้ปลาดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นปกติ การเจริญเติบโตดี มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรค และปรสิต ดังนั้นการเลี้ยงปลาให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงนั้น ควรคำนึงถึงการจัดการให้น้ำในบ่อมีคุณสมบัติที่ดี และมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปลาเป็นสำคัญสำหรับคุณสมบัติของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลามีดังนี้ (ศูนย์วิจัย และพัฒนาประมงน้ำจืดตาก, 2553)

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิของน้ำจะมีผลต่อกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกายของปลาเป็นอย่างมาก เช่น การกินอาหาร การย่อยอาหารของปลา การเคลื่อนไหว การหายใจ การสืบพันธุ์ และการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังมีผลต่อปฏิกิริยาย่อยสลายอินทรีย์สารของแบคทีเรียในน้ำด้วย ซึ่งทั้งหมดนี้จะมีผลโดยตรงต่อปริมาณ และคุณภาพของผลผลิตทั้งสิ้น ปลานิลสามารถทนต่อระดับอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง คือ ตั้งแต่ 21.1- 42.0 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิน้ำต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส ปลานิลจะอยู่ได้ไม่นาน และทำให้ตายได้ ปลานิลจะไม่กินอาหาร และไม่เจริญเติบโต เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และจะไม่วางไข่ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการวางไข่ อยู่ระหว่าง 26-29 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 19-28 องศาเซลเซียส (อุดม, 2549)

2. ความเป็นกรดด่าง (pH)

บ่อที่สร้างบริเวณดินเปรี้ยวมักจะทำให้น้ำในบ่อเป็นกรด ในบ่อเลี้ยงปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงของ pH ในรอบวันโดยแพลงค์ตอนพืช และพืชน้ำ ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสังเคราะห์แสงในตอนกลางวันทำให้ค่า pH สูงขึ้น ส่วนในเวลากลางคืนมีเฉพาะการหายใจ พืชคายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา จึงทำให้ค่า pH ลดลง น้ำที่เหมาะต่อการเลี้ยงปลาไม่ควรเปลี่ยนแปลงของ pH เกินกว่า 2 หน่วยในรอบวัน และน้ำที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.5-8.5 ก่อนพระอาทิตย์ขึ้นเป็นที่เหมาะแก่การเลี้ยงปลามากที่สุด ส่วนในช่วง pH 4-6 และ 9-11 ปลาจะเจริญเติบโตช้า และอ่อนแอ เพราะในน้ำที่เป็นด่างมากปลาจะตาย และถ้าเป็นกรดปลาจะไม่อยากกินอาหารอัตราการเจริญเติบโตลดลง และมีความต้านทานต่อโรคต่ำ อ่อนแอ และเป็นโรคง่าย แต่โดยทั่วไปปลานิลสามารถอาศัยอยู่ได้ในระดับ pH ตั้งแต่ 7.2-8.3 หรือในช่วงเช้า pH 7 และช่วงบ่าย pH 10 ก็สามารถอาศัยอยู่ได้

อย่างไรก็ตามการพิจารณาถึงผลของ pH ต่อปลานั้น นอกจากผลโดยตรงแล้วจะต้องพิจารณาถึงผลโดยอ้อมควบคู่กันไปด้วย เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำจะไปมีผลต่อความเป็นพิษของสารพิษชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น (อุดม, 2549)

3. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ มีความสำคัญมากที่สุดในการเลี้ยงปลา เนื่องจากปลาต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลามีค่าตั้งแต่ 3 ppm ขึ้นไป (วัดในตอนเช้ามืด) หากในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำเกินไป ปลาก็จะลอยหัวขึ้นมาใช้ออกซิเจนจากผิวน้ำ และอากาศ ซึ่งส่งผลให้ปลาเกิดอาการเครียดและการเจริญเติบโตลดลง

ปัญหาการขาดออกซิเจนมักจะเกิดในบ่อที่มีสารอินทรีย์สะสมอยู่ในปริมาณมากซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้อาจมาจากเศษเหลือของอาหาร ของเสียจากปลา ตะกอนสารอินทรีย์ที่ติดมากับน้ำและแพลงค์ตอนพืชที่ตายลง ซึ่งจุดวิกฤตในการเกิดปัญหาการขาดออกซิเจน มักจะเป็นในช่วงเช้ามืดที่ยังไม่มีการสังเคราะห์แสง (อุดม, 2549)

4. ความเป็นด่าง (Alkalinity)

ความเป็นด่างหมายถึง ความเข้มข้นของสารประกอบพวกด่างที่มีอยู่ในน้ำ โดยมีปฏิกิริยาสมดุลกับแคลเซียมคาร์บอเนต ระดับค่าความเป็นด่าง และความกระด้างที่เหมาะสมกับการเลี้ยงปลาอยู่ระหว่าง 20-300 ppm ถ้าหากต่ำกว่านี้สามารถทำให้เพิ่มขึ้นโดยการใช้ปูนขาวโดยทั่วไปบ่อเลี้ยงปลาที่มีน้ำเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ควรมีค่าความเป็นด่าง สูงกว่า 100 ppm (อุดม, 2549)

5 แอมโมเนีย (NH_3)

ปริมาณแอมโมเนีย (Ammonia) ในบ่อปลาได้มาจากการถ่ายของเสียจากตัวปลาและจากการย่อยสลายอินทรียวัตถุโดยแบคทีเรีย ความเป็นกรดเป็นด่าง และอุณหภูมิของน้ำ จะเป็นตัวควบคุมอัตราการแตกตัวของแอมโมเนีย คือ ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างสูงจะทำให้แอมโมเนียแบบที่ไม่แตกตัวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นอันตรายต่อปลา ถ้าอุณหภูมิของน้ำเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแอมโมเนียทั้งหมดอาจสูงถึง 3.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้โดยไม่เป็นพิษต่อปลา ในน้ำที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7 แต่ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างสูงถึง 9 แอมโมเนียทั้งหมดต้องไม่เกิน 0.054 มิลลิกรัมต่อลิตร มิฉะนั้นแล้วปลาอาจเป็นอันตราย เนื่องจากพิษของแอมโมเนีย (มั่นสิน และไพพรรณ, 2536)

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ปลาจัดเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดแรกที่มีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ ประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Innate immune system) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune system) องค์ประกอบของทั้งสองระบบ สามารถแบ่งออกได้เป็นภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity หรือ CMI) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำหรือสารที่อยู่ในเลือด (Humoral-mediated immunity หรือ HMI) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเกิดได้อย่างรวดเร็ว แต่คงอยู่เพียงชั่วระยะเวลาสั้น ๆ ไม่มีความจำเพาะกับสิ่งแปลกปลอมและไม่มีการจดจำ (No memory) ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอาศัยการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์

ได้แก่ T และ B cells ถึงแม้การทำงานของลิมโฟไซต์จะใช้ระยะเวลานานในการกระตุ้นและตอบสนอง แต่มีความจำเพาะและสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ ทำให้การตอบสนองในครั้งถัดมา มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าครั้งแรก

อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลา

ลักษณะสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันในปลาที่แตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ ปลาไม่มีต่อมน้ำเหลือง (Lymph node) ไม่มีไขกระดูก (Bone marrow) ไม่มีการสร้าง Germinal centers ในอวัยวะน้ำเหลืองและไม่มีกระบวนการ Isotype switching ทำให้ IgM เป็นแอนติบอดีหลักในการควบคุมเชื้อโรคในปลา (Alvarez, 2008; Workenhe et al., 2010)

อวัยวะที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ ไตส่วนหน้า (Anterior kidney) ม้าม (Spleen) และต่อมไทมัส (Thymus) (Workenhe et al., 2010) ไตส่วนหน้าทำหน้าที่คล้ายกับไขกระดูกในสัตว์ชั้นสูง คือ เป็นอวัยวะที่รองรับการพัฒนาของ B lymphocytes คอยดักจับแอนติเจนในเลือด และเป็นแหล่งสร้างแอนติบอดี ม้ามเป็นแหล่งสร้างเม็ดเลือดในลูกปลาและทำหน้าที่ดักจับแอนติเจนในเลือด ส่วนต่อมไทมัสเป็นอวัยวะที่รองรับการพัฒนาของ T lymphocytes นอกจากอวัยวะที่กล่าวแล้ว ตับ (Liver) ของปลา ยังทำหน้าที่ผลิตสารน้ำที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โปรตีนเฉียบพลัน (Acute phase proteins) ซีรั่มโปรตีนและส่วนประกอบต่าง ๆ ของระบบคอมพลีเม้นท์ (Complement proteins) (Huttenhuis et al., 2006) อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอีกกลุ่ม คือ ภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหาร (Gut associated lymphoid tissue; GALT) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์ ได้แก่ Lymphocytes macrophages และ Granulocytes (Rombout et al., 2011)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาสามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน

1. ผิวหนังและเยื่อบุต่าง ๆ ซึ่งเป็นด่านแรกที่สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม บริเวณผิวหนังของปลามีการสร้างเมือก (Mucus) ซึ่งประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียหรือปรสิต ได้แก่ อิมมูโนกลอบูลิน สารเปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides) และไลโซไซม์ (Lysozyme) (Ellis, 2001) สารกลุ่มนี้จะสร้างออกมามากขึ้นเมื่อปลามีการติดเชื้อ โดยจะสังเกตได้จากสีของลำตัวปลามีสีขาวขุ่น และเมื่อเอามือลูบตามผิวหนังหรือเกล็ดจะพบลื่นกว่าปกติ

2. สารน้ำต่าง ๆ (Innate humoral immune response) ได้แก่ ระบบคอมพลีเม้นท์ ซึ่งทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคด้วยการทำให้เกิดรูบนผิวเซลล์เป้าหมาย โปรตีน Lectins ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ Opsonization และ Agglutination โปรตีนกลุ่ม C-reactive proteins และ serum amyloid P ซึ่งช่วยในกระบวนการรับรู้การติดเชื้อ สารเปปไทด์ต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และสารไซโตไคน์กลุ่ม interferon ที่ทำหน้าที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส (Ellis, 2001; Magnadottir, 2006; Alvarez, 2008)

3. เซลล์ (Innate cellular immune response) แบ่งเป็นเซลล์กลุ่มที่ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic cells) ได้แก่ Macrophages และ Neutrophils การทำลายสิ่งแปลกปลอมอาศัยสารในกลุ่ม Reactive oxygen species และการทำงานของเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ย่อยทำลายเซลล์เชื้อโรค เซลล์อีกชนิดที่พบในปลา คือ กลุ่ม Non-specific cytotoxic cells ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับ Natural killer cells คือทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง (Esteban et al., 2008) นอกจากเซลล์ที่กล่าวไปแล้ว ปลายังมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ได้แก่ Eosinophil, Dendritic cells และ Thromobocytes

ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลาประกอบด้วย

1. สารน้ำ ได้แก่ อิมมูโนกลอบูลิน หรือแอนติบอดี แอนติบอดีทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อในซีรั่มและบริเวณเยื่อบุต่าง ๆ อิมมูโนกลอบูลิน ในปลาสร้างมาจาก B cells และ Plasma cells จากรายงานในปัจจุบันพบว่าปลามีแอนติบอดี 3 ประเภท คือ IgM, IgD และ IgT โดย IgM เป็นแอนติบอดี้ที่มีบทบาทสำคัญในเลือด IgD พบบนผิว ของ B cells ส่วน IgT ทำหน้าที่คล้ายกับ IgA ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุ (Fillatreau et al., 2013)

2. เซลล์ลิมโฟไซต์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดสำคัญคือ B และ T cells โดย T cells แบ่งออกเป็น $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells (Laing and Hansen, 2011) หน้าที่ของ T cells ทั้ง 2 กลุ่มคล้ายกับในสัตว์ชั้นสูง คือ $CD4^+$ T cells ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น และ $CD8^+$ T cells คอยตรวจและทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Somamoto et al., 2009) การตอบสนองของ T cells อาศัยการนำเสนอแอนติเจนบนโมเลกุลเรียก Major histocompatability complex (MHC) ทั้ง class I และ II โดยที่ dendritic cells เป็นเซลล์สำคัญในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells (Lugo et al., 2010) นอกจากเซลล์และสารชนิดต่าง ๆ แล้วการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในปลา ยังถูกควบคุมผ่านไซโตไคน์หลายชนิด เช่น interleukine- 1β (IL-1β) tumor necrosis factor-α(TNF-α), IL-2, IL-6, IL-18, และ type I and type II interferon

ไลโซไซม์

ไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม Hydrolase มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ β-1, 4 ไกลโคซิดิกระหว่าง N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ซึ่งโพลิเมอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้ผนังเซลล์เกิดรอยแยกได้ ไลโซไซม์จึงเป็นเอนไซม์ที่ในการป้องกันเชื้อโรค ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำจัดแบคทีเรียที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยสามารถทำลายมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกทำให้เซลล์เกิดรอยแยก ส่วนผนังเซลล์ชั้นนอกสุดของแบคทีเรียแกรมลบเป็นพวกลิโพโปรตีน แต่ถ้ามีแอนติบอดีกับ

คอมพลีเมนต์เข้าช่วยทำลายชั้นลิโพโปรตีนก่อน ไลโซไซม์ผลิตมาจากเซลล์ที่ทำหน้าที่จับสิ่งแปลกปลอม แล้วปล่อยมาในกระแสเลือดซึ่งจะอยู่ในส่วนของน้ำเลือด (Delmo et al., 1997)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไลโซไซม์จะย่อยสลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ในปลาจะสามารถย่อยสลายผนังเซลล์แบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Jolles andJolles, 1975) เม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte, Macrophages และ Polymorphonuclear granulocyte ในปลาสามารถสังเคราะห์และหลั่งไลโซไซม์ออกมาได้ ที่เนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของ Hematopoietic portion จะพบเอนไซม์ชนิดนี้ค่อนข้างมากเพราะว่าที่บริเวณดังกล่าวมีเม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนมาก (Murray and Fletcher, 1976) กิจกรรมของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของร่างกายหรือตัวปลา ความเครียด เพศ ฤดูกาล อุณหภูมิ และความสมบูรณ์ทางเพศ (Alexander, 1985)

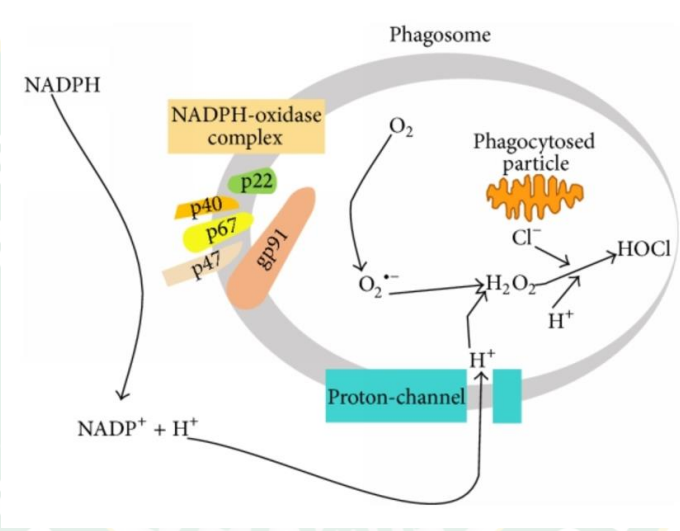
กระบวนการฟาโกโซโตซิส

การทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยผ่านทางกระบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) เป็นการจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมของ Phagocytic cell ซึ่ง Phagocytic cell จะแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ 1. เม็ดเลือดขาวพวกโมโนไซท์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นแมคโครฟาจ (Macrophage) ได้ โดยจะพบโมโนไซท์ในระบบเลือด ส่วนแมคโครฟาจจะพบทั่วไปในเนื้อเยื่อของต่อมน้ำเหลือง 2. Polymorphonuclear granulocyte ประกอบด้วยเม็ดเลือดขาวพวกนิวโทรฟิล อีโอสิโนฟิล และเบโซฟิล (ยิ่งมณี, ม.ป.ป.)

กระบวนการฟาโกไซโตซิส คือ การกลืนกินทำลายสิ่งแปลกปลอมและการกำจัดเศษเซลล์ที่ตายแล้ว โดยถูกกระตุ้นการทำงานได้จากสารหรือชิ้นส่วนของแบคทีเรีย C5a (ซึ่งเกิดจากกระบวนการตรึงคอมพลีเมนต์) และสารคัดหลั่งจากเซลล์ (Cytokine) บางชนิด (โสมทัต, 2538) ขั้นตอนแรกเริ่มด้วยการเคลื่อนที่จับเชื้อโรคเข้ากับผิวเซลล์ฟาโกไซต์ ซึ่งต้องการอนุภาคประจุบวก เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+} การเข้าจับกันนี้จะดีขึ้นถ้ามีออพโซนิน (Opsonin) เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดฟาโกไซโตซิส เช่น โมเลกุลของแอนติบอดี และโปรตีน C3 ที่ได้จากกระบวนการคอมพลีเมนต์ หลังจากนั้นเซลล์ฟาโกไซต์จะยื่นเท้าเทียม (Pseudopod) ออกไปล้อมรอบเชื้อโรค เยื่อหุ้มเซลล์ของฟาโกไซต์จะมาเชื่อมกัน ทำให้เชื้อโรคหลุดเข้ามาในเซลล์กลายเป็นฟาโกโซม (Phagosome) ต่อมา Lysosome หรือ Granule ของฟาโกไซต์จะเคลื่อนมารวมกับฟาโกโซมกลายเป็น Phagolysosome แล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเชื้อโรค หลังจากนั้นจะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกนอกเซลล์ การย่อยเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมด้วยกลไก 2 แบบ คือ แบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน

1. กลไกใช้ออกซิเจน (Oxidative mechanism) เมื่อเกิดการบุกรุกของแบคทีเรียทำให้ Phagocytic cell เพิ่มปริมาณการใช้ออกซิเจนอย่างมาก เรียกว่า Respiratory burst หรือ Oxidative burst โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase และออกซิเจน จะถูกเปลี่ยนไปเป็น

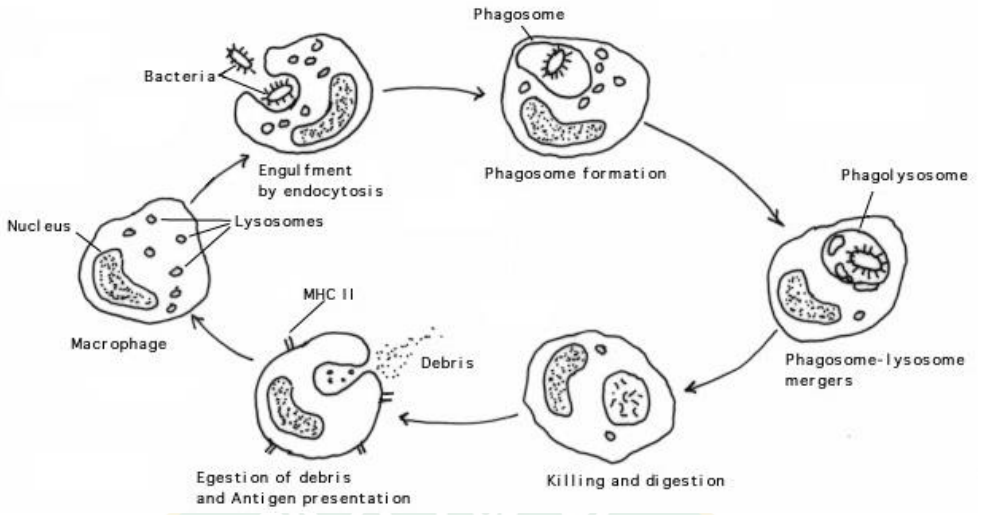
ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน Superoxide anion (O_{-2}) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) สามารถให้ออกซิเจนและไฮโดรเจนอิสระได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าแบคทีเรีย อีกทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูล มีการปล่อยเอนไซม์ Myeloperoxidase ออกมาเพื่อไปกระตุ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับซุปเปอร์ออกไซด์ให้เปลี่ยนรูปไปเป็น Chloramines และ Singlet oxygen นอกจากนี้การทำงานร่วมกันระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับซูปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และเฮไลด์ไอออน (Halide ion) ก่อให้เกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วยธาตุแฮโลเจน (ธาตุอโลหะจำพวกฟลูออรีนคลอรีน ไอโอดีน โบรมีน) ซึ่งมีศักยภาพในการฆ่าทำลายทั้งแบคทีเรียและไวรัส (Verlhac et al., 1996)



ภาพที่ 1 Respiratory burst โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase

ที่มา : Riechelmann (2004)

2. กลไกไม่ใช้ออกซิเจน เป็นวิธีการย่อยทำลายเซลล์สิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยสารที่มีอยู่ในแกรนูลของเซลล์ฟาโกไซต์ในการทำลายจุลชีพ เช่น Cationic protein มีฤทธิ์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีความสามารถในการซึมผ่านได้เพิ่มขึ้น (Permeability) Lactoferrin จะแย่งจับธาตุเหล็กซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีพของแบคทีเรียเชื้อรา และ Lysozyme มีฤทธิ์ย่อย Mucopeptide ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (ยิ่งมณี, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 2 กระบวนการฟาโกไซโตซิส

ที่มา : Todar (2006)

ความสำคัญของโปรไบโอติกกับการเลี้ยงสัตว์น้ำ

โปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมจะให้ผลดีต่อสุขภาพ ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและป้องกันปลาจากเชื้อโรค มีความปลอดภัยต่อปลาและผู้บริโภคปลา ไม่เป็นเชื้อก่อโรค โปรไบโอติกที่มีศักยภาพในการนำใช้มาผสมอาหารปลา ได้แก่ *Bacillus* sp., *Lactobacillus brevis, L. collinoides, L. coryniformis, L. Farciminis, Psychrobacter namhaensis* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งสามารถแยกได้จากทางเดินอาหารปลานิล น้ำและดินในบ่อเลี้ยงปลา (Duca et al., 2015)

กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

ความสามารถในการรวมกลุ่มและยึดเกาะ

โปรไบโอติกให้ผลเหมือนสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดอื่น คือ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เพิ่มการเจริญเติบโต ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Merrifield et al., 2010) แต่โปรไบโอติกเป็นสิ่งมีชีวิต หากมีการคงอยู่หรือเพิ่มจำนวนในตัวปลา อาจจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานดีกว่าสารกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะแก่งแย่งพื้นที่ยึดเกาะกับเชื้อที่ก่อโรคและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Newaj et al., 2014) การพบ *B. amyloliquefaciens* ในทางเดินอาหารของปลานิลแสดงให้เห็นถึงการรวมกลุ่มของแบคทีเรียซึ่งมีความจำเป็นในการทำงาน (Ridh a and Azad, 2012) จุลินทรีย์โปรไบโอติกมีชีวิตในทางเดินอาหารปลานิลนานถึง 48 ชั่วโมง หลังปลากินเข้าไป (Shelby et al., 2006) ปลานิลที่ได้อาหารผสม *B. subtilis* C-3102 จะมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่

ทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น มีการทำงานของไซโตไคน์เพิ่มขึ้น (IL-1b, TGF-b และ TNF-a) แต่มีการลดลงของฮีทช็อคโปรตีน (HSP70) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการม้วนพับโปรตีน ไม่ให้โปรตีนเสียสภาพเมื่อโดนความร้อน ช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อร่างกายอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (He et al., 2013)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น

การใช้โปรไบโอติกมีส่วนช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก *B. subtilis, S. cerevisiae* และ *A. oryzae* จะมีเม็ดเลือดแดงที่แข็งแรงสมบูรณ์ ระดับเม็ดเลือดขาวที่สูงขึ้นและมีการทำงานของ Respiratory burst activity ดีขึ้น (Iwashita et al., 2015) ความหนาแน่นของปลาที่เลี้ยงมักเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเครียดและอาจจะทำให้ปลาโตช้าลง การให้โปรไบโอติกเหมาะสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำในความหนาแน่นที่สูง พบว่า ปลานิลที่ให้อาหารผสม *B. subtilis* ที่เลี้ยงในความหนาแน่นที่สูง (ปลา 62.50 ตัวต่อตารางเมตร ปลาขนาดเฉลี่ยตัวละ 32 กรัม) มีปริมาณไลโซไซม์ต่ำลง (Telli et al., 2014) ทั้ง *B. pumilus* และ *P. fluorescens* ช่วยปรับการตอบสนองของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลานิล (Eissa and Abou-ElGheit, 2014)

ความสามารถในการคุ้มกันโรค

โปรไบโอติกจาก *Bacillus* sp. ช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. และ *Pseudomonas* spp. ในทางเดินอาหารปลานิล (Duca et al., 2013) ในขณะที่เชื้อ B. *pumilus* และ *P. fluorescens* ช่วยทำให้ปลามีสุขภาพดีและมีความสามารถในการต้านทานโรคที่ดีขึ้น (Eissa and Abou, 2014) ปลาที่ได้รับอาหารผสม *B. subtilis* จะมีความสามารถในการต้านทานแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* สูงขึ้น ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารผสม *L. brevis* ช่วยป้องกันแบคทีเรีย *Aromonas hydrophila* (Liu et al., 2013) ปลานิลที่ได้รับอาหารมี *L. acidophilus* ผสมอยู่สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน IL-1β และ transferrin เมื่อทดสอบความต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* (Villamil et al., 2014) พบว่าอัตรารอดชีวิตของปลานิลหลังจากได้รับเหนี่ยวนำให้เกิดโรคกับเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. iniae* ในปลากลุ่มที่ได้กินอาหารผสม *B. subtilis, S. cerevisiae* และ *A. oryzae* เพิ่มมากขึ้น (Iwashita et al., 2015) พบว่าจุลินทรีย์ *L. plantarum* JCM 1149 ลดความรุนแรงของการติดเชื้อ *A. hydrophila* NJ-1 ในลำไส้ปลานิลลูกผสม (Ren et al., 2013) โปรไบโอติกจากเชื้อ *B. pumilus* ช่วยควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* (Aly et al., 2008) อาหารที่เสริมยีสต์ลดการตายของปลา (Abdel et al., 2008)

การเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มอัตรารอด

ปลานิลที่ได้อาหารผสมจุลินทรีย์โปรไบโอติก 3 ชนิดมีกินอาหารดีขึ้น ทำให้การดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตดีและอัตราแลกเนื้อต่ำลง (Newaj et al., 2014) Eissa and Abou (2014) รายงานว่า การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โปรเตสและไลเปสในลำไส้ปลานิลที่กินอาหารเสริม *B. subtilis* และ *L. rhamnosus* ดีขึ้น ซึ่งอาจจะมีส่วนทำให้ปลาโตได้ดีขึ้น โปรไบโอติกจากเชื้อ *Enterococcus faecium* ช่วยเพิ่มน้ำหนักปลานิล (Wang et al., 2008) ส่วนโปรไบโอติกจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* นอกจากเพิ่มการเจริญเติบโตแล้วยังทำให้อัตราแลกเนื้อลดลง (Ridha and Azad, 2012) โปรไบโอติก *B. pumilus* ทำให้อัตราเจริญเติบโตปลานิลดีขึ้น (Aly et al., 2008) ปลานิลที่ได้รับอาหารผสม *L. acidophilus* มีอัตรารอดที่สูงขึ้นเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* (Villamil et al., 2014) อัตรารอดของปลาสูงขึ้นหลังจากให้อาหารผสม *B. subtilis* หรือ *L. acidophilus* นาน 1 ถึง 2 เดือน (Aly et al., 2008) ยีสต์ *S. cerevisiae* ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นมากกว่าการใช้โปรไบโอติก *S. faecium* ผสมกับ *L. acidophilus* (Meurer et al., 2006)

แหล่งที่มาของโปรไบโอติก

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกถูกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น *Lactobacili, Lactococci, Leuconostoc, Enterococci, Carnobacteria, Shewanelli, Bacilli, Aeromonas, Vibrio, Enterobacter, Pseudomonas, Clostridium* และ *Saccharomyces* (Nayak, 2010) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะพบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารของสัตว์ (Newaj et al., 2014) มีการแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากลำไส้ปลานิล น้ำและดินในบ่อเลี้ยงปลา (Apun et al., 2009) หรือแม้แต่จากอวัยวะสืบพันธุ์ El-Rhman et al. (2009) มีรายงานการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens, Aeromonas* และ *Vibrio* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำบางชนิด แต่หากแยกจากปลานิลที่อาศัยในแหล่งน้ำกร่อย สามารถนำมาเป็นโปรไบโอติกสำหรับปลานิลที่เลี้ยงในน้ำจืดได้ (Eissa and Abou, 2014) จุลินทรีย์หลายชนิดถูกผลิตและจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ (Ng et al., 2014)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิลาวัณย์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของการเสริมคิว.พี.โปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของปลานิล โดยใช้คิว.พี.โปรไบโอติกผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลาที่ได้รับคิว.พี.โปรไบโอติกผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูป

ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุด คือ 86.52±6.217 กรัม ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลพบว่า ปลาที่ได้รับคิว.พี.โปรไบโอติกผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีที่สุด คือ 2.01±0.116 กรัมต่อวัน ส่วนค่าเฉลี่ยความอุดมสมบูรณ์ และค่าเฉลี่ยอัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับคิว.พี.โปรไบโอติกผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่าง 3 ระดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

Apun et al. (2009) ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* sp. และแบคทีเรียกลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการรอดตายของปลานิล *Oreochromis niloticus* ภายใต้สภาวะความหนาแน่นสูงและอุณหภูมิ โดยโปรไบโอติกที่ใช้ถูกแยกจากปลานิลและจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ใช้เวลาการทดลองทั้งหมด 134 วัน เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปโดยผสมโปรไบโอติกในอาหารและใส่แบคทีเรียลงในน้ำ สรุปผลการทดลองได้ว่า ไม่ว่าจะเป็นอย่างใดอย่างหนึ่งหรือผสมรวมกัน ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลานิล

Telli et al. (2014) ได้ทดลองเป็นเวลา 84 วัน โดยใช้อาหารที่ผสมโปรไบโอติก *B. subtilis* เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลานิล *Oreochromis niloticus* ระดับ Lysozyme ในกลุ่มควบคุม พบต่ำกว่าในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก การเสริมอาหารด้วยโปรไบโอติก *B. subtilis* ความเข้มข้น 5 X 10^6 CFU/กรัม ผสมในอาหาร จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

Aly et al. (2008) ทดลองการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* และ *Lactobacillus acidophilus* เพื่อช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และการตอบสนองต่อการติดเชื้อในปลานิล พบว่าการเสริม *Bacillus subtilis* และ *Lactobacillus acidophilus* ทำให้ปลามีอัตรารอดและการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* จากการทดสอบ Nitroblue tetrazolium (NBT) neutrophil adherence และ Lysozyme activity พบว่ากลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากเลี้ยง 1 และ 2 เดือนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้โปรไบโอติก

Iwashita et al. (2015) ศึกษาผลของการให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae* และ *Saccharomyces cerevisiae* ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และความทนทานต่อโรคของปลานิล ในการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ โดยกลุ่มแรกให้อาหารปกติ กลุ่มที่สองให้อาหารผสม *B. subtilis* 1.5 x 10^9 CFU/กรัม *S. cerevisiae* 10^9 CFU/กรัม และ *A. oryzae* 2 × 10^9 CFU/กรัม และกลุ่มที่สามให้ *B. subtilis* 3.0 × 10^9 CFU/กรัม, *S. cerevisiae* 2.0 × 10^9 CFU/กรัม และ *A. oryzae* 4.0 × 10^9 CFU/กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นตรวจวัดค่า Respiratory burst activity เซลล์เม็ดเลือดขาว และค่าทางโลหิตวิทยา ที่สัปดาห์ที่ 4, 5

และ 6 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis, A. oryzae* และ *S. cerevisiae* ทำให้ปลานิลมีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นและมีความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม

Ridha and Azad (2012) ศึกษาการให้อาหารที่ผสมแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Lactobacillus* sp เลี้ยงเป็นเวลา 99 วัน และให้อาหารปกติต่ออีก 61 วัน ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อ ระบบภูมิคุ้มกัน และค่าทางโลหิตวิทยา พบว่าชุดที่ให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติก มีการเจริญเติบโตและ อัตราการแลกเนื้อที่ดีกว่าชุดควบคุมที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากที่ปลาได้รับอาหารปกติเป็นเวลา 61 วันแล้ว ปลาชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *Bacillus amyloliquefaciens* มีการเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อที่ดีที่สุด ในชุดการทดลองที่เสริมโปรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าชุดควบคุม แต่ค่าทางโลหิตวิทยาไม่แตกต่างกัน อีกทั้งยังพบว่าแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* จะยังคงอยู่ในทางเดินอาหารปลานิลแม้ว่าจะหยุดการให้อาหารผสมแบคทีเรียดังกล่าว แต่โปรไบโอติก *Lactobacillus* spp. จากโยเกิร์ตจะไม่คงอยู่ในทางเดินอาหาร

Standen et al. (2015) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติกหลายชนิดร่วมกัน เพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโตและปรับสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ปลานิล ใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกชื่อ AquaStar® Growout หลังจากทำการทดลองหกสัปดาห์พบว่าในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กก. มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น พบการแสดงออกของยีนต์ caspase-3 PCNA และ HSP70 TLR2, pro-inflammatory cytokines TNFa, IL-1b, anti-inflammatory cytokines TGFb, และ IL-10 สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Shelby et al. (2006) ได้ทดลองในปลานิลรุ่น ด้วยการเสริมอาหารด้วยผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก พบว่าโปรไบโอติกสามารถคงอยู่และมีชีวิตในลำไส้ปลานิลนานถึง 48 ชั่วโมงหลังการให้อาหารผสมโปรไบโอติก

He et al. (2013) รายงานว่า การใช้โปรไบโอติกช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ การกระตุ้นการทำงานของการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ซึ่งอาจจะดูจากการทำงานของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หรือการเกิดปฏิกิริยา Respiratory burst activity และการทำงานของไลโซไซม์ การทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) การทำงานของคอมพลีเมนต์ (Complement activity) การให้อาหารผสม *B. subtilis* C-3102 แก่ปลานิลลูกผสมทำให้การทำงานของไซโตไคน์ในลำไส้เพิ่มสูงขึ้น (IL-1b, TGF- β และ TNF- α)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัย

โปรไบโอติกที่นำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งทะเล ด้วยการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Bacteriocin) ช่วยให้ลูกกุ้งขาวัยอ่อน มีอัตรารอดสูงถึง 90% ทนต่อความเครียดที่เกิดจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงได้ดี เมื่อนำไปผสมในอาหารให้กิน สามารถตรวจพบได้ในทางเดินอาหาร ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอด และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการใช้อย่างกว้างขวางในการเลี้ยงกุ้งทะเล

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการใช้ในการเลี้ยงปลานิลมากนัก เนื่องจากเกษตรกรกังวลเรื่องต้นทุนที่สูงขึ้น และเกรงว่า จะไม่คุ้มค่าในการลงทุน งานวิจัยนี้ต้องการค้นหาปริมาณและความถี่ของการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกซึ่งมีจุลินทรีย์หลัก คือ *Bacillus subtilis* งานวิจัยนี้จะทำการทดลองจริงในกระชังและบ่อปลานิลของเกษตรกร โดยจัดทำเป็นกลุ่มการเรียนรู้การเลี้ยงปลานิลไปพร้อมกันด้วย ภายใต้การดูแลใกล้ชิดของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลา นักวิชาการ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ส่งเสริมของบริษัทกรีนเทค จะเก็บข้อมูลตั้งแต่การเตรียมบ่อ จนถึงการจับจำหน่าย มีการสุ่มปลาและน้ำเพื่อตรวจสอบเป็นระยะ ๆ รวมทั้งตรวจวัดผลผลิตและวิเคราะห์ผลตลอดการดำเนินงาน

ระเบียบวิธีวิจัย

การทดลองในกระชังปลา แม่น้ำน่าน

อาหารทดลอง

งานทดลองนี้จะศึกษาในกระชังเลี้ยงปลาของเกษตรกรในแม่น้ำน่าน เขตจังหวัดพิษณุโลก กระชังขนาด 3×6×2 ตารางเมตร ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลานิลที่เกษตรกรนิยมใช้ ผสมกับจีไบโอติก ที่ปริมาณความเข้มข้น 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ผึ่งลมให้แห้งสนิท ก่อนเก็บไว้ในที่ร่มจนกว่าจะนำไปใช้ เตรียมอาหารใหม่ทุก 1 วัน ให้อาหารจนอิ่ม แบ่งเป็น 4 เวลา สามารถปรับเปลี่ยนวิธีการได้ตามสภาพแวดล้อม

การให้อาหาร

ปล่อยปลานิลแดงขนาดเฉลี่ยเริ่มต้น 59.87±3.63 กรัม ความหนาแน่น 32 ตัว/ลบ.ม. จำนวน 13 กระชัง โดยให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม) จำนวน 4 กระชังและ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ที่มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน ให้อาหารจนอิ่ม เลี้ยงนาน 157 สุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์และปรับปริมาณอาหาร ตรวจวัดคุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 157 วัน บันทึกน้ำหนักปลาทั้งหมด อัตรารอด อัตราแลกเนื้อ

การวิเคราะห์ต้นทุน

การวิเคราะห์ต้นทุนโดยวิธีทางเศรษฐศาสตร์ ดังนี้ ต้นทุนผันแปร = ค่าพันธุ์ปลา+ค่าอาหารปลา+ค่าโปรไบโอติก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักผลผลิต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ค่าภูมิคุ้มกันและค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังจากที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียของแต่ละกระชัง เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยโปรแกรม SPSS รุ่น Ver. 15.0 วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยโปรแกรม SPSS รุ่น 15.0

การวิเคราะห์ต้นทุนวิเคราะห์ข้อมูลตามหลักสถิติ โดยใช้ สถิติพรรณนา (Descriptive statistic) ได้แก่ ร้อยละ และ ค่าเฉลี่ย

ระยะเวลาในการวิจัยและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา ระยะเวลา 6 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2560 – เดือน ตุลาคม 2561

สถานที่ดำเนินงาน กระชังปลาแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก

การทดลองในบ่อดิน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

อาหารทดลอง

งานทดลองนี้จะศึกษาในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ โดยกางกระชังขนาด 3×3×1 ตารางเมตร ทดลองในบ่อ ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลานิลที่เกษตรกรนิยมใช้ ผสมกับจีไบโอติก ที่ปริมาณความเข้มข้น 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ผึ่งลมให้แห้งสนิท ก่อนเก็บไว้ในที่ร่มจนกว่าจะนำไปใช้ เตรียมอาหารใหม่ทุก 2 วัน ในอัตราการให้อาหาร 3% biomass ของน้ำหนักปลารวม 2 เวลา เช้าและเย็น ตรวจสอบการมีชีวิตของโปรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การให้อาหาร

ปล่อยปลานิลขนาดเริ่มต้นตัวละ 18.41 ±1.02 กรัม/ตัว ความหนาแน่น 4.4 ตัว/ตร.ม. ให้อาหารที่ไม่ผสมโบรไบโอติก จำนวน 3 กระชัง และกระชังที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกในระดับที่ต่างกัน จำนวน 9 กระชัง สุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์และปรับปริมาณอาหาร ตรวจวัดคุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์

หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน สุ่มวัดน้ำหนักปลา บันทึกน้ำหนักปลาทั้งหมด อัตรารอด อัตราแลกเนื้อ

การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ตรวจวัดคุณภาพน้ำทุก 7 วัน โดยวัดอุณหภูมิ (Temperature) ความเป็นกรดด่าง (pH) และออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved oxygen; DO) ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำ YSI 550A YSI ความเป็นด่าง (Alkalinity) และวัดค่าแอมโมเนียรวม (Total ammonia) ด้วยชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ (Water test kit)

การตรวจสอบภูมิคุ้มกัน

สุ่มเก็บเลือดปลาทุก 20 วัน เพื่อตรวจวัดไลโซไซม์ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Parry et al. (1965) โดยใช้ซีรั่มปลาจำนวน 25 µL ใส่ลงในสารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) 175 ไมโครลิตร (0.3 มก./ลิตร ใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 5.8) วัดการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น OD_{540nm} ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง Micro-plate reader

ตรวจวัดการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis activity) ด้วยวิธีการของ Yoshida and Kitao (1991) โดยการใช้เม็ดเลือดขาว 200 ไมโครลิตร (2×10^6 เซลล์/มล.) หยดลงบนกระจกปิดสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดด้วย RPMI 1640 จากนั้นเติมเม็ด Latex beads (Sigma) 2×10^7 beads/มล. จำนวน 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จึงล้างออก แล้วตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล ย้อมสีด้วย Diff-Quick staining dye (Sigma) 10 วินาที ล้างออกด้วย

PBS (pH 7.4) ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วสุ่มนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 300 เซลล์ คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอม

ทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (Respiratory burst) ทดสอบตามวิธีการของ Secombes (1990) โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว 175 ไมโครลิตร (6×10^6 เซลล์/มล.) ใน PBS เติมลงในถาดหลุม 96-well microtiter เติม nitro blue tetrazolium (NBT) 25 ไมโครลิตร (1 มก./มล.) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งสารละลายส่วนใสด้านบน ล้างด้วยเมธานอล 125 ไมโครลิตร เทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วล้างด้วยเมธานอล 70% หลุมละ 125 ไมโครลิตร จำนวนสองครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติม 2N KOH จำนวน 125 ไมโครลิตร และ DMSO 150 ไมโครลิตร จากนั้นไปวัด OD_{655nm}

การทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*

หลังจากเลี้ยงปลานาน 8 สัปดาห์ สุ่มปลานิลแต่ละกระชัง มาทดสอบการต้านทานเชื้อแบคทีเรียกระชังละ 3 ตัว โดยนำมาฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 CFU/มล. (LD_{50}) เข้าบริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 มล. วิเคราะห์ผลของโปรไบโอติกต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังได้รับการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 15 วัน

การวิเคราะห์ต้นทุน

การวิเคราะห์ต้นทุนโดยวิธีทางเศรษฐศาสตร์ ดังนี้ ต้นทุนผันแปร = ค่าพันธุ์ปลา+ค่าอาหารปลา+ค่าโปรไบโอติก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักผลผลิต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ค่าภูมิคุ้มกันและค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังจากที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียของแต่ละกระชัง เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยโปรแกรม SPSS รุ่น Ver. 15.0 วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยโปรแกรม SPSS รุ่น 15.0

การวิเคราะห์ต้นทุนวิเคราะห์ข้อมูลตามหลักสถิติ โดยใช้ สถิติพรรณนา (Descriptive statistic) ได้แก่ ร้อยละ และค่าเฉลี่ย

ระยะเวลาในการวิจัยและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา ระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2560 – เดือน กันยายน 2561

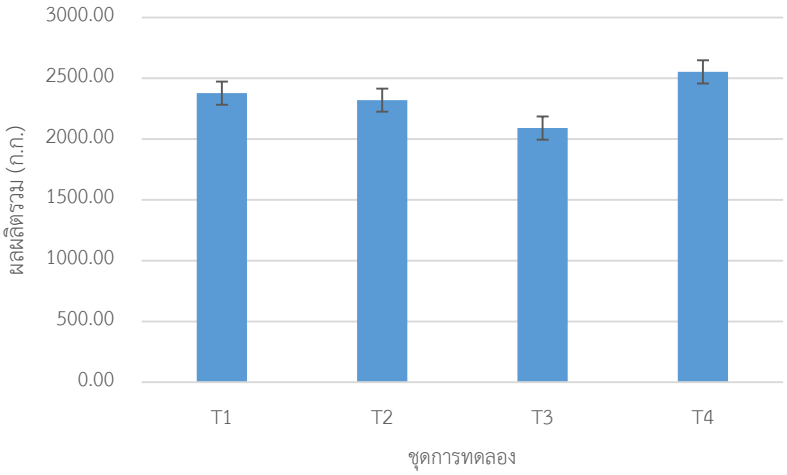
สถานที่ดำเนินงาน เช่าบ่อเลี้ยงภายในเขตอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองในกระชังปลา แม่น้ำน่าน

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และผลผลิตการเลี้ยง

การเจริญเติบโตของปลานิล โดยให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม) จำนวน 4 กระชัง และ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ที่มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน ให้อาหารจนอิ่ม เลี้ยงนาน 157 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และได้ผลผลิตสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตามภาพที่ 3 อาจเนื่องมาจาก ระยะเวลาการให้ และปริมาณของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารไม่เพียงพอที่จะเสริมการเจริญเติบโต ดังนั้นการเสริมจุลินทรีย์ในอาหารอาจจะต้องมั่นใจว่ามีการซึมเข้าในเนื้ออาหารและปลาได้รับจุลินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสม สอดคล้องกับการศึกษาของ เมธาวี และคณะ (2560) ที่ศึกษาพบว่า การเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ในอาหาร 10^9 CFU/กรัม โดยใช้โปรไบโอติกผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปอัตราส่วนแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($P>0.05$) และ คณาธิป และคณะ (2558) ที่ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ในอาหาร 10^6 CFU/กรัม พบว่าการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม คณาธิป และคณะ (2558) กล่าวว่า ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์สัตว์น้ำ สายพันธุ์โปรไบโอติก ปริมาณของโปรไบโอติก สายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในน้ำ ระยะเวลาการให้อาหาร ที่มาของสายพันธุ์โปรไบโอติก และคุณภาพน้ำ ปลานิลมีลำไส้ที่ยาว เมื่อได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของ *B. subtilis* เข้าไปแล้วแพร่กระจายไปตามลำไส้ อาจจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์มีน้อยเกินไปที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต (Telli et al., 2014)



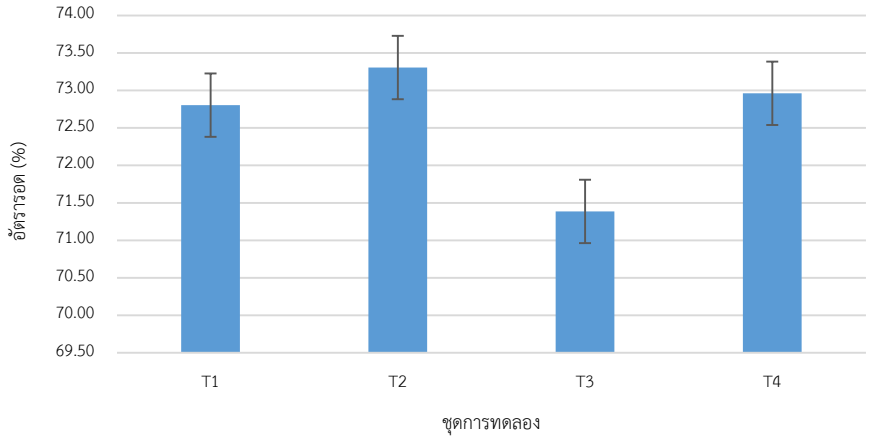
ภาพที่ 3 ผลผลิตของปลานิลที่ให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม, T1) จำนวน 4 กระชัง และ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 157 วัน

อัตราการรอดตาย

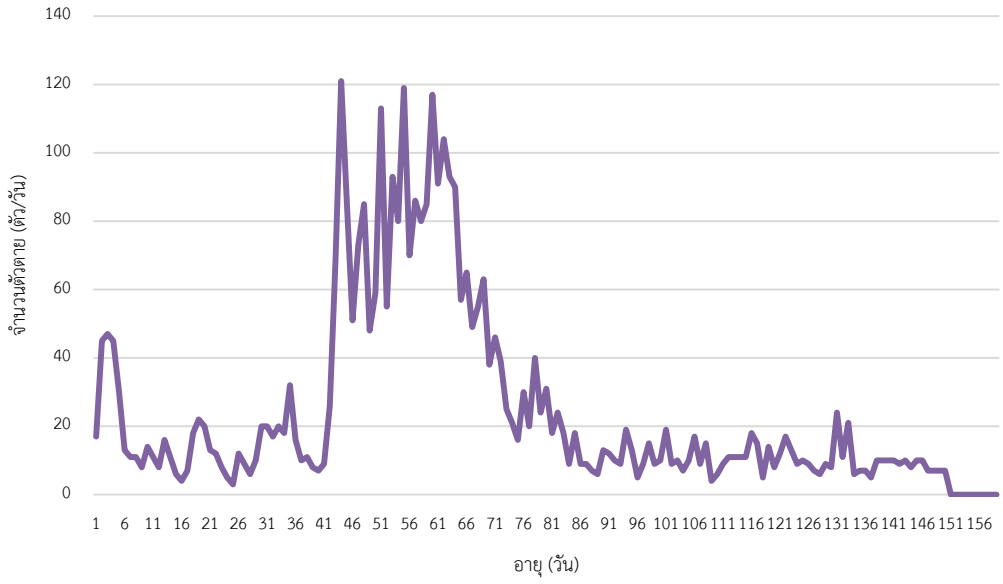
อัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน พบว่า ชุดการทดลองที่เสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. มีอัตราการรอดตายสูงสุด ตามภาพที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ วิลาวัณย์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาผลของการเสริม คิว.พี. โปรไบโอติก ในปลานิล ผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 0.5, 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลานิลที่ได้รับ คิว.พี. โปรไบโอติก ผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด และค่าเฉลี่ยอัตราการรอดตายสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

อย่างไรก็ตามอัตรารอดและการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีแนวโน้มสูงขึ้นกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติก จากผลการทดลองครั้งนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของผลของการใช้โปรไบโอติกต่อการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันในปลานิล เพื่อให้มีความเหมาะสมที่สุด และให้ผลตอบแทนสูงสุด ข้อเสียของการเลี้ยงปลาในกระชังในแหล่งน้ำธรรมชาติ คือ ไม่สามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของน้ำที่ไหลผ่านกระชังได้ ในบางครั้ง เมื่อเกิดปัญหาปลาตาย ดังแสดงในภาพที่ 5 เกษตรกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ปลาอายุ 43-73 วัน เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ยาและสารเคมีเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่า สามารถลดความสูญเสียจากการตาย รายงานของ Chitmanat et al. (2016) พบว่าฟาร์มส่วนใหญ่ (ร้อยละ 84) ประสบปัญหาเรื่องโรคปลานิล จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีจานวนมากในการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรค และ

ก่อให้เกิดสารตกค้างในเนื้อปลาและสิ่งแวดล้อม ทำให้ผู้บริโภคไม่ต้องการ การปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเกษตรกรจึงเป็นเรื่องที่ท้าทาย คงต้องมีการบริหารจัดการทั้งในระยะสั้น ระยะกลางและระยะยาว เพื่อให้เกษตรกรเห็นความสำคัญของการผลิตสัตว์น้ำที่ได้ตามมาตรฐาน ในขณะเดียวกันก็ยังคงมีกำไรอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 4 อัตรารอดตายของปลานิลที่ให้อาหารผสมจีไบโอติก 0 (ชุดควบคุม, T1) จำนวน 4 กระชัง และ 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 157 วัน



ภาพที่ 5 จำนวนของปลานิลในกระชังทั้งหมดที่ตายต่อวันตลอดการเลี้ยง 157 วัน

การทดลองในบ่อดิน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

ผลของการเสริมโปรไบโอติกในอาหารปลานิลต่อการเจริญเติบโตกระชังในบ่อดิน

น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ผลของการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูป ซึ่งมีจุลินทรีย์หลักคือ *Bacillus subtillis* ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน พบว่า การเสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ในอัตราการให้อาหาร 3% biomass ส่งผลให้การเจริญเติบโตดีขึ้น โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 สอดคล้องกับการศึกษาของ เมธาวี และคณะ (2560) ที่ศึกษาพบว่า การเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ในอาหาร 10^9 CFU/กรัม โดยใช้โปรไบโอติกผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปอัตราส่วนแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($P>0.05$) และ คณาธิป และคณะ (2558) ที่ศึกษาพบว่าการเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ในอาหาร 10^6 CFU/กรัม พบว่าการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม อาจเนื่องมาจากปริมาณโปรไบโอติกที่ผสมในอาหาร หรือวิธีการให้ไม่เหมาะสมที่จะเสริมการเจริญเติบโตจำเพาะของปลา

อย่างไรก็ตามน้ำหนักสุดท้ายของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Liu et al. (2012) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* E20 ในปลาเก๋า ขนาดเฉลี่ยเริ่มต้น 2.8 กรัม ผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 10^4, 10^6 และ 10^8 CFU/กรัม เลี้ยงที่ระยะเวลา 28 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณการใช้โปรไบโอติกที่มากขึ้น สูงกว่าชุดควบคุมอย่างแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) และ Aly et al. (2008) ที่ศึกษาพบว่า การเสริมโปรไบโอติก *Bacillus pumilus* ทำให้อัตราการเจริญเติบโตปลานิลดีขึ้น ในงานทดลองนี้ เลี้ยงระยะเวลา 4 สัปดาห์ ขนาดปลาเริ่มต้น 50±5 กรัม/ตัว พบว่าปลาในกลุ่มทดลอง 10^6 และ 10^{12} CFU/กรัม ค่าน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ สูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($P<0.05$)

นอกจากนี้ยังมีงานทดลองที่เสริมโปรไบโอติกหลายชนิด เช่น Lin et al. (2017) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติกหลายชนิด ประกอบด้วย *Lactobacillus casei* M15, *Lac. plantarum* D8, *Lac. pentosus* BD6, *Lac. fermentum* LW2, *Enterococcus faecium* 10-10, and *Bacillus subtilis* E20, and one yeast, *Saccharomyces cerevisiae* P13 เสริมในอาหารปลากระพงขาว พบว่าที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/อาหาร 1 กก. มีค่าการเติบโตดีที่สุด แต่การรายงานของของ Xia et al.

(2018) กลับกล่าวตรงข้ามกัน โดยลูกปลานิล ขนาดเฉลี่ยเริ่มต้น 0.2±0.05 กรัม ที่ได้เสริมโปรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 พบว่า การเสริม *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 เพียงชนิดเดียว ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/กรัม มีค่าการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งดีกว่ากลุ่มที่ผสม 2 ชนิด

อย่างไรก็ตามน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกมีแนวโน้มที่สูงขึ้น อาจเนื่องจาก โปรไบโอติกส่งเสริมให้ปลากินอาหารดีขึ้น ทำให้การดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตดี อัตราการแลกเนื้อต่ำลง และ การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โปรเตสและไลเปสในลำไส้ปลานิลที่กินอาหารเสริม *B. subtilis* และ *L. rhamnosus* ดีขึ้น ซึ่งอาจจะมีส่วนทำให้ปลาโตได้เร็วขึ้น (Eissa and Abou, 2014) ดังรายงานของ Apun et al. (2009) กล่าวว่า การใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. และแบคทีเรียกลุ่ม Lactic acid bacteria ไม่ว่าจะเป็นอย่างใดอย่างหนึ่งหรือผสมรวมกัน ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลานิล

อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตาย

อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน พบว่า การเสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($P>0.05$) แต่มีแนวโน้มดีขึ้นในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ วิลาวัณย์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาผลของการเสริม คิว.พี. โปรไบโอติก ในปลานิล ผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 0.5, 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลานิลที่ได้รับ คิว.พี. โปรไบโอติก ผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปความเข้มข้น 1% มีอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด และค่าเฉลี่ยอัตราการรอดตายสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) Ridha and Azad, (2012) ได้ทดสอบการเสริมโปรไบโอติกชนิด *B. amyloloquefaciens* พบว่า นอกจากจะเพิ่มการเจริญเติบโตแล้วยังทำให้อัตราแลกเนื้อลดลง ปลานิลที่ได้รับการผสม *L. acidophilus* มีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อทดสอบกับเชื้อ *A. hydrophila* (Villamil et al., 2014) และยังมีรายงานว่าการใช้โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* 6×10^6 CFU และ *Saccharomyces cerevisiae* 1.5×10^{10} CFU/มล. เสริมอาหารเลี้ยงปลานิลทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตดี มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในอาหารสูงขึ้น และลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร (Marzouk et al., 2008) ตามรายงานของ Newaj et al. (2014) กล่าวว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมจุลินทรีย์โปรไบโอติก มีการกินอาหารดีขึ้น ทำให้การดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตดี และอัตราแลกเนื้อต่ำลง

จากการทดลองพบว่า แม้อัตราการแลกเนื้อ ของปลานิลจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แนวโน้มดีขึ้นในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก โดยเฉพาะในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. ต่ำ

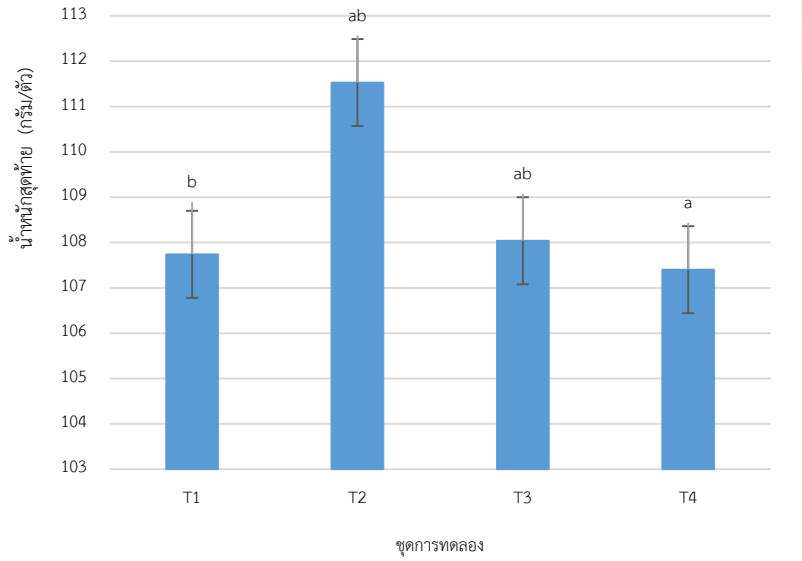
กว่าชุดการทดลองอื่น ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 อาจเนื่องจากโปรไบโอติกเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายในลำไส้ ทำให้เกิดสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Azarin et al., 2015) และมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ผนังทางเดินอาหารโดยเพิ่มการสร้างสารอาหาร เช่น วิตามิน เพิ่มอัตราการหมักกระตุ้นการสร้างและการหลั่งเอนไซม์ย่อยอาหาร และเพิ่มประสิทธิภาพการนำอาหารไปใช้ ทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น (Wang et al., 2008) ซึ่งประสิทธิภาพของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์สัตว์น้ำ สายพันธุ์โปรไบโอติก สายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในน้ำ ระยะเวลาการให้อาหาร วิธีการให้อาหาร ที่มาของสายพันธุ์โปรไบโอติก และคุณภาพน้ำ

ผลการศึกษาอัตรารอดตายของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกในอัตราส่วนที่ต่างกันพบว่า อัตราการรอดตายของปลานิลแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติกไม่มีผลต่ออัตรารอดของปลานิล (วิลาวัณย์ และคณะ, 2554) แต่แตกต่างกับการศึกษาของ Ullah et al. (2018) ที่ศึกษา พบว่า ลูกปลานิลที่ได้รับอาหารผสมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (Magic Plus) ชนิด *Bacillus subtilis* 1×10^6 CFU และ *Saccharomyces cerevisiae* 1×10^6 CFU/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากโปรไบโอติกจะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดผนังลำไส้เล็ก ทำให้มีการย่อยสลายสารอาหารและสร้างกรดแลกติกขึ้น ซึ่งกรดแลกติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะกระจายทั่วทางเดินอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่มีพื้นที่สำหรับการเกาะติด (Ige, 2013; อุดมลักษณ์, 2556) ซึ่งปลานิลมีลำไส้ยาวเมื่อได้รับ *B. subtillis* เข้าไปในร่างกาย *B. subtillis* จะขยายตัวไปตามลำไส้ (Telli et al., 2014) ซึ่งจากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า อัตราการรอดของปลานิลในแต่ละชุดการทดลองค่อนข้างสูง อาจเนื่องจากคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมและไม่เกิดโรคระหว่างการเลี้ยง การเสริมและไม่เสริมโปรไบโอติกจึงไม่มีผลต่ออัตราการรอดตายของปลานิลมากนัก

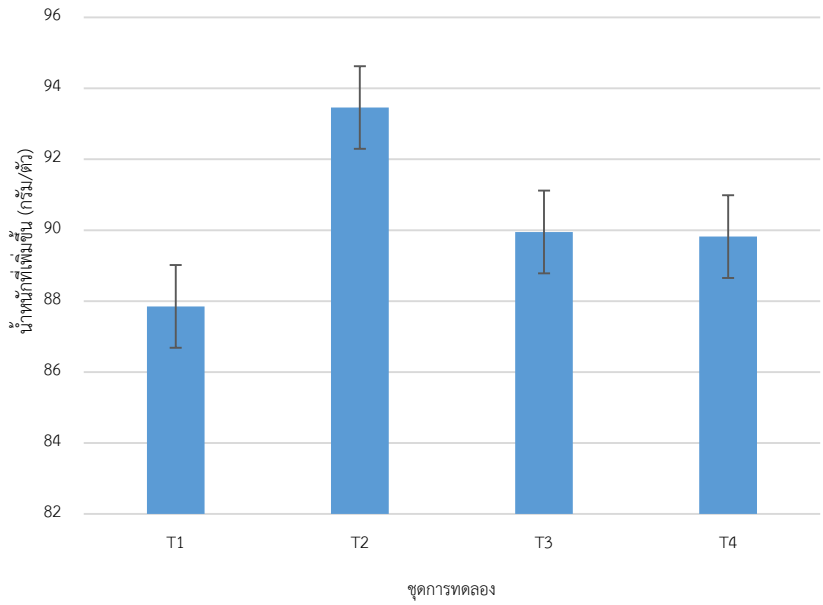
ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในความเข้มข้นที่ต่างกันเป็นเวลา 60 วัน

การเจริญเติบโต (กรัม/ตัว)	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 2 โปรไบโอติก 2 มล./ อาหาร 1 กก.	ชุดการทดลองที่ 3 โปรไบโอติก 5 มล./ อาหาร 1 กก.	ชุดการทดลองที่ 4 โปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก.
น้ำหนักเริ่มต้น	19.89±0.86	18.07±0.32	18.08±0.51	17.58±1.72
น้ำหนักสุดท้าย	107.74±2.95^{b}	111.53±0.98^{ab}	108.04±9.61^{ab}	107.40±1.77^{a}
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	87.85±2.32	93.46±1.25	89.95±9.94	89.82±1.88
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	1.46±0.04	1.56±0.02	1.50±0.17	1.50±0.03
อัตราการแลกเนื้อ	0.91±0.01	0.85±0.04	0.87±0.1	0.86±0.03
อัตราการรอดตาย	97.50±2.5	98.33±2.89	100	99.17±1.44

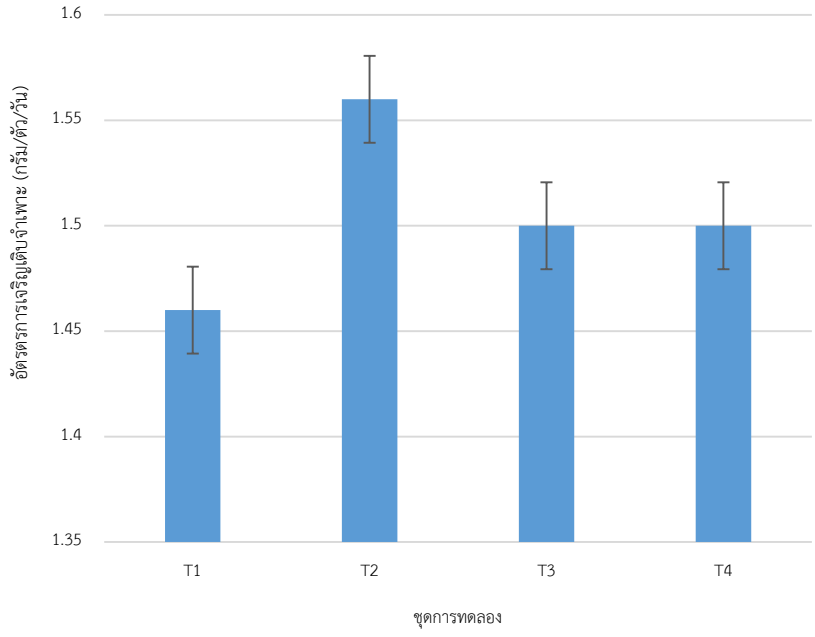
หมายเหตุ *a,b ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษกำกับในแถบเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way analysis of variance) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



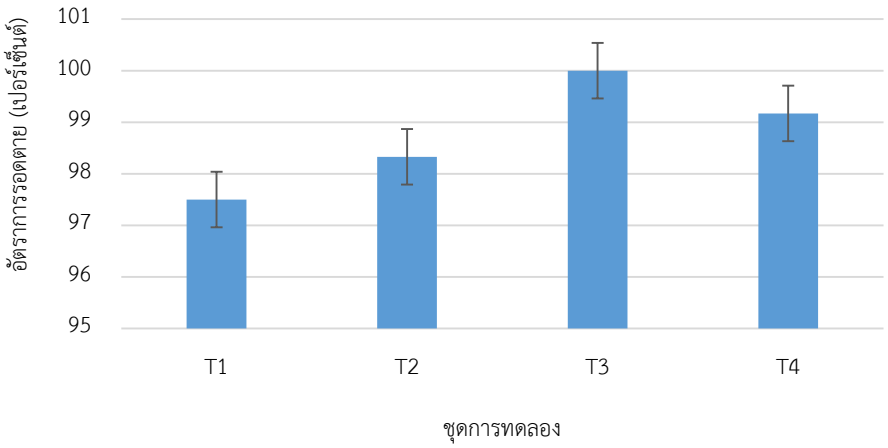
ภาพที่ 6 น้ำหนักสุดท้ายของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน



ภาพที่ 7 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน



ภาพที่ 8 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน



ภาพที่ 9 อัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลกระชังในบ่อดิน

การศึกษาคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. เป็นเวลา 60 วัน พบว่า อุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 26.53-30.67 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 7.41-7.51 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ระหว่าง 4.6-5.32 มิลลิกรัม/ลิตร ความเป็นด่างอยู่ระหว่าง 99.49-118.11 มิลลิกรัม/ลิตร และแอมโมเนียรวมอยู่ระหว่าง 0.07-0.25 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำค่าของคุณภาพน้ำที่ได้จากการทดลองนี้เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากรายงานของ (Boyd, 1982) คุณภาพน้ำโดยเฉลี่ย อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยทั่วไป

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 60 วัน

พารามิเตอร์	ค่าคุณภาพน้ำ
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28.6±2.07
ความเป็นกรด-ด่าง	7.46±0.05
ออกซิเจนละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	4.96±0.36
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม/ลิตร)	108.8±9.31
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัม/ลิตร)	0.16±0.09

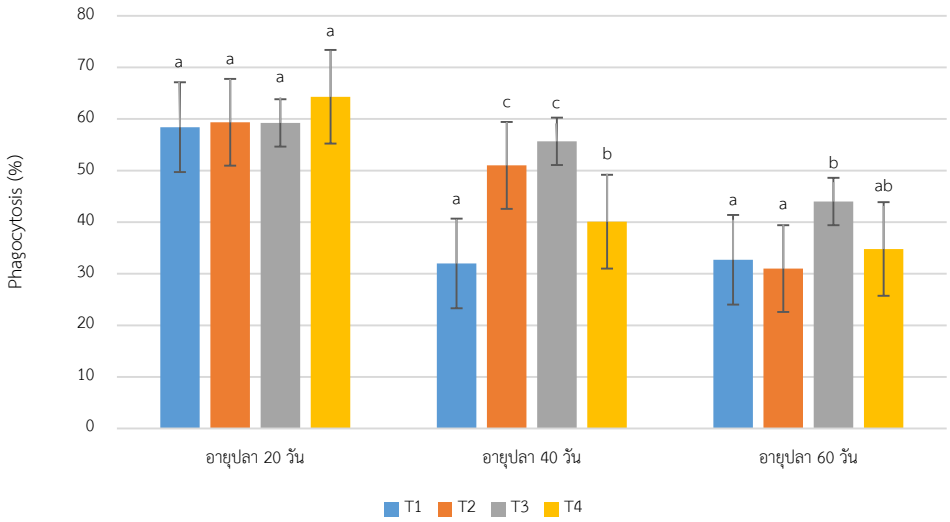
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของโปรไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล

ผลของโปรไบโอติกต่อค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว พบว่า ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3% ของน้ำหนักตัว ที่อายุปลา 20 วัน มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($P>0.05$) ที่ปลาอายุ 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 และ 5 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 5 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Telli et al. (2014) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในปลานิล ขนาดเฉลี่ยเริ่มต้น 32.63 กรัม ผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 5×10^6 CFU/กรัม เลี้ยงที่ระยะเวลา 84 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก มีค่า phagocytic activities สูงกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) และ Salinas et al. (2005) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในปลา Gilthead seabream ที่ความเข้มข้น 0.5×10^7 CFU/กรัม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ วัดค่า phagocytic activity ทุก 1 สัปดาห์ พบว่าค่า Phagocytic activity สูงขึ้น ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

อย่างไรก็ตามผลของโปรไบโอติกต่อค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก โดยค่าพารามิเตอร์เลือดของปลา ถือเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับการตรวจหาความผิดปกติ ที่เกี่ยวข้องกับการให้อาหาร ความเครียดจากสิ่งแวดล้อม จากโรค และการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน (Dawood et al., 2016) Phagocytic cells มีบทบาทที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน จัดเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะตัวในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Secombes, 1990; Telli et al., 2014) กล่าวว่าในปลาที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก มีค่า Phagocytic index เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง แสดงให้เห็นถึงการปรับตัวของปลาต่อความเครียดที่เกี่ยวข้องกับความหนาแน่นสูง ผลของการเสริมอาหารโปรไบโอติกในปลา ส่งผลให้มีการปรับเปลี่ยนของ Phagocytic activity ถือเป็นกุญแจสำคัญ ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา (Irianto and Austin, 2002) ชนกันต์ (2545) กล่าวไว้ว่า การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ เช่น ส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย กลูแคน วิตามินและสารสังเคราะห์ต่าง ๆ จะช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการเพิ่มการผลิตไลโซไซม์

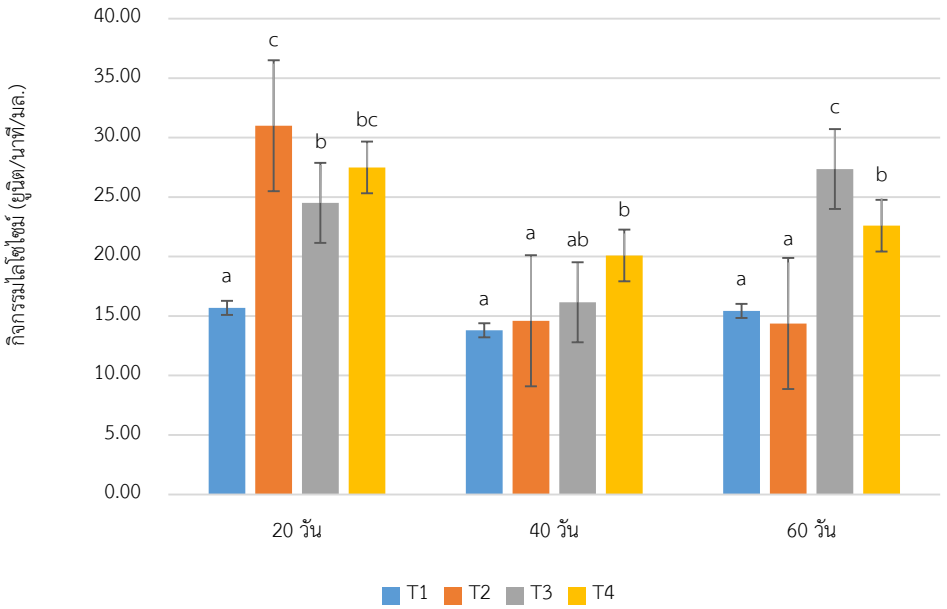


ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

ผลของโปรไบโอติกต่อกิจกรรมไลโซไซม์

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อกิจกรรมไลโซไซม์ในปลานิล พบว่า กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว ที่อายุปลา 20 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. กิจกรรมไลโซไซม์เฉลี่ยมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 0 และ 5 มล./อาหาร 1 กก. แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. ที่อายุปลา 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. กิจกรรมไลโซไซม์เฉลี่ยมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก 0 และ 2 มล./อาหาร 1 กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงดังภาพที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gobi et al. (2018) ที่ศึกษา พบว่า ปลาสวายที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ชนิด *Bacillus licheniformis* Dahb1 10^7 CFU/มิลิลิตร มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ที่เพิ่มขึ้น และ ในปลากระโห้ ที่ได้รับอาหารผสม *B. amyloliquefaciens* 10^8 และ 10^9 CFU/กรัม มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ที่เพิ่มขึ้น (Das et al., 2013) ปลาที่ได้รับอาหารผสม *B. subtilis* มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ ที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Newaj et al., 2014) Safari et al. (2016) ได้ทดลองเสริมโปรไบโอติก *Enterococcus casseliflavus* ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/กรัม และ 10^9 CFU/กรัม มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีอย่างมีนัยสำคัญ Magnadottir (2006) กล่าวว่า ไลโซไซม์

เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแตกสลาย (Lytic protein) มีความสำคัญ ที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก สามารถพบได้ใน เมือกปลา ซีรั่ม และเนื้อเยื่อ

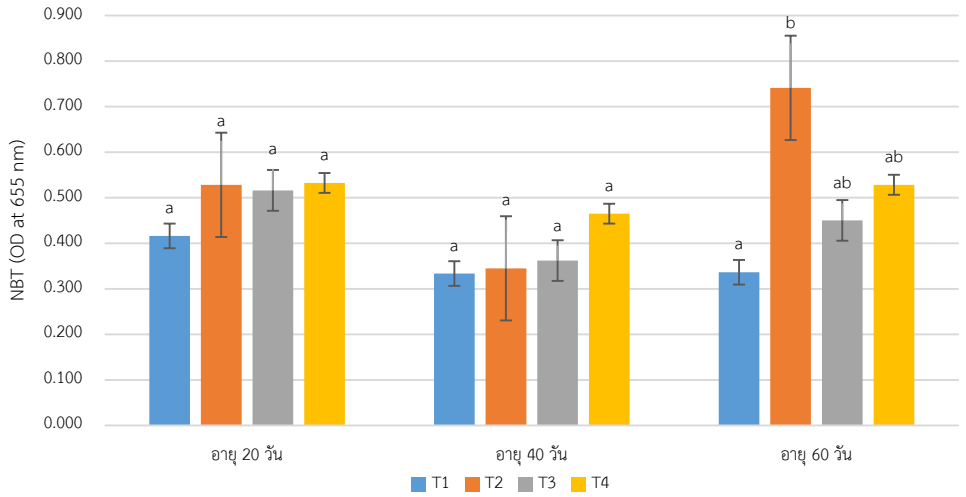


ภาพที่ 11 กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtillis* ที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

ผลของโปรไบโอติกต่อ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium)

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อโปรไบโอติกต่อ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ในปลานิล พบว่า ค่า NBT ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว ที่อายุปลา 20 และ 40 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ที่อายุปลา 60 วัน ในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. ผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงดังภาพที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Liu et al. (2017) ศึกษาการใช้โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* HAINUP40 ในการเลี้ยงปลานิล พบว่า respiratory burst ของ phagocytes ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ Zaineldin et al. (2018) ศึกษาการใช้โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ในการเลี้ยงปลาจานแดง ซึ่งพบว่าค่า NBT สูงขึ้นในกลุ่มที่ผสมโปรไบโอติก

จากการทดลองพบว่า Respiratory burst ของ Phagocytes ของปลานิลผลิตสารซุปเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นสูงกว่าชุดควบคุม :ซึ่งจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกับแบบไม่จำเพาะโดยความสามารถในการทำลายเชื้อโรคโดยขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่ดีขึ้น (Iwashita et al., 2015) Siwicki et al. (1994) กล่าวว่า การทดสอบ NBT reduction เพื่อตรวจหาการเกิดอนุมูลอิสระในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อประเมินความสามารถในการป้องกันกับเชื้อโรค ซึ่งเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือ

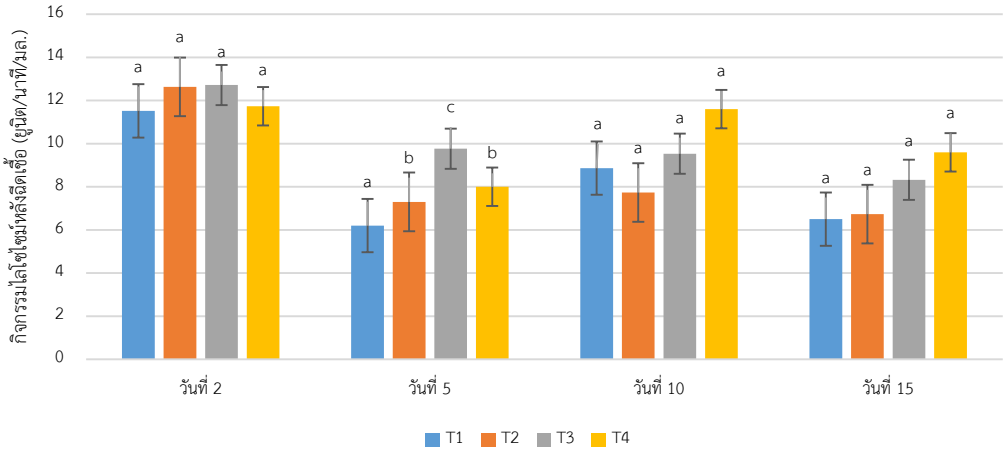


ภาพที่ 12 ค่า Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ที่ความเข้มข้น *Bacillus subtillis* 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังได้รับการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ให้ที่ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว พบว่า ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ หลังได้รับการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มีค่าลดลง ในวันที่ 2, 10 และ 15 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนในวันที่ 5 มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ลดลง แต่มีค่าสูงในกลุ่มการทดลองที่ผสมโปรไบโอติกความเข้มข้น 5 มล./อาหาร 1 กก. มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงดังภาพที่ 13 ซึ่งมีการรายงานว่า ค่ากิจกรรมไลโซไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้น เช่นในระหว่างการติดเชื้อ (Fletcher and White, 1986; Moyner, 1993) นอกจากนี้การเพิ่มของกิจกรรมไลโซไซม์ยังช่วยเพิ่มในส่วนของจำนวนเม็ดเลือด Monocytes และ Neutrophils (Fletcher

and White, 1986) ระบบภูมิคุ้มกันที่ติดตัวมาแต่กำเนิด จัดเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง มีความสำคัญในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในปลา ซึ่งประกอบด้วย Lysozyme และ phagocytic cells (Magnadottir, 2006) ไลโซไซม์เป็นเอ็นไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ด้วยการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลสีส (hydrolysis) ที่พันธะเบตา 1-4 ระหว่างกรดเอ็น-อะซิติลมูรามิก (N-actylmuramic acid, NAM) กับ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (N-acetyinglucosamine, NAG) (Salton and Ghuysen, 1959; Verlhac et al., 1996)



ภาพที่ 13 ค่ากิจกรรมไลโซไซม์หลังฉีดเชื้อของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก ที่ความเข้มข้น *Bacillus subtillis* 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. (T1, T2, T3 และ T4 ตามลำดับ) (จำนวน 3 กระชังแต่ละความเข้มข้น) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

ต้นทุนการเลี้ยง

ต้นทุนผันแปรการเลี้ยงปลานิล ที่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูป ซึ่งมีจุลินทรีย์หลักคือ *Bacillus subtillis* ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0, 2, 5 และ 10 มล./อาหาร 1 กก. ในอัตราการให้อาหาร 3% biomass ที่ความหนาแน่น 4 ตัว/ลูกบาศก์เมตร ซึ่งมีรายการต้นทุนดังต่อไปนี้ ค่าลูกพันธุ์ ราคา 4 บาท/ตัว ค่าอาหาร ราคา 32.25 บาท/กิโลกรัม ค่าโปรไบโอติก (จีไบโอติก) 0.6 บาท/มิลลิลิตร พบว่าในชุดทดลองที่เสริมโปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 กก. มีต้นทุนต่ำที่สุดที่ 60.84 บาท/กิโลกรัมปลา แสดงดังตารางที่ 3 เนื่องจากเป็นชุดทดลองที่มีอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ghazalah et al. (2010) ได้ศึกษาการเสริมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกหลายชนิดต่อประสิทธิภาพเชิงเศรษฐศาสตร์ เสริมอาหารในปลานิล น้ำหนักเริ่มต้นที่ 1.12 กรัม/ตัว และน้ำหนักสุดท้ายอยู่ที่ 21.1 กรัม/ตัว เลี้ยงระยะเวลา 120 วัน พบว่า ในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกที่

ปริมาณ 2 มล./อาหาร 1 กก. มีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุดอยู่ที่ 92.46 บาท/กิโลกรัม Welker and Lim (2011) กล่าวว่า ในการประเมินต้นทุน ความหนาแน่นมีอิทธิพลต่อต้นทุนการเลี้ยง (บาท/กิโลกรัมปลา) ซึ่งจะส่งผลต่อรายได้และกำไร

ตารางที่ 3 ต้นทุนผันแปรของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในความเข้มข้นที่ต่างกันเป็นเวลา 60 วัน

รายการต้นทุนผันแปร (บาท/กิโลกรัมปลา)	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 2 โปรไบโอติก 2 มล./อาหาร 1 ก.ก.	ชุดการทดลองที่ 3 โปรไบโอติก 5 มล./อาหาร 1 ก.ก.	ชุดการทดลองที่ 4 โปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 ก.ก.
ค่าลูกพันธุ์	38.08	36.47	37.02	37.56
ค่าอาหาร	24.99	23.94	24.37	24.33
โปรไบโอติก	0.00	0.43	1.08	2.16
ยา และสารเคมี	0.00	0.00	0.00	0.00
ต้นทุนผันแปรการผลิตรวม	63.07	60.84	62.48	64.05

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

การเสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. ในอัตราการให้อาหาร 3% biomass ส่งผลให้การเจริญเติบโต และอัตรารอด สูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น

ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลเพิ่มสูงขึ้น ในชุดการทดลองที่ผสมโปรไบโอติก แต่ค่าทางภูมิคุ้มกันมีการเพิ่มขึ้นและลดลงแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทดสอบ

ต้นทุนผันแปรในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้น 2 มล./อาหาร 1 กก. มีต้นทุนในต่ำที่สุด จึงเป็นความเข้มข้นที่คุ้มค่าที่สุดในการเลือกใช้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเสริมโปรไบโอติก ควรมีการศึกษาในระยะเวลาการเลี้ยงที่นานขึ้น ศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติกต่อปลาแต่ละช่วงอายุ และศึกษาผลของการเสริม *Bacillus subtilis* G-biotic ร่วมกับพรีไบโอติก เพื่อประสิทธิภาพการใช้ที่ดีที่สุด ข้อควรระวังก็คือ การใช้โปรไบโอติก หากมีการใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะอาจทำให้เชื้อตายได้

บรรณานุกรม

กรมประมง. 2557. **การเลี้ยงปลานิลในกระชัง**. ฝ่ายเผยแพร่ ส่วนเผยแพร่การประมง สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง.

กรมประมง. ม.ป.ป.-ก. **ปลานิลจิตรลดา**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/genetic/index.php/2013-11-15-01-35-24/85-2013-11-25-08-28-46/101-2014-02-06-01-52-39?showall=1&limitstart= (28 พฤศจิกายน 2560).

กรมประมง. ม.ป.ป.-ข. **องค์ความรู้ปราชญ์ปลานิล**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/freshwater/web3 (28 ตุลาคม 2560).

กรมประมง. 2560. **สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ปี 2560 และแนวโน้มปี 2561**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/pdf (15 ตุลาคม 2561).

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2556. **สถานการณ์ปลานิลและผลิตภัณฑ์สามเดือนแรกปี พ.ศ. 2556**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Doc/fishnews_164.pdf (12 ตุลาคม 2560).

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2560. **สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ปี 2560 และแนวโน้มปี 2561**. [Online]. Available https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/pdf (15 ตุลาคม 2561).

คณาธิป พรหมนวล, วิชุดา กล้าเวช และ สุภฎา คีรีรัฐนิคม. 2558. น. 1368-1375. การประยุกต์ใช้โปรไบโอติก เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต การใช้อาหาร และความต้านทานโรคในปลาทับทิม. ใน **การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53.** ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 3-6 กุมภาพันธ์ 2558.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. **วารสารสงขลานครินทร์**, 24(4), 739-745.

ชาญวิทย์ สุวรรณ์ และ ชนกันต์ จิตมนัส. 2560. การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงปลานิล. **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร**, 15(1), 15-24.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศน์ และ ไพพรรณ พรประเภท. 2536. การจัดการคุณภาพ และการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลา. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http//opac.phuket.psu.ac.th/BibDetail.aspx?bibno=182 (1 ตุลาคม 2560).

เมธาวี รอตมงคลดี, วัฒนะ ลีลาภัทร และ วิภาวี ไทเมืองพล. 2560. ผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลาหมอ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 19ฉบับพิเศษ (1), 82-.89

ยิ่งมณี ตะกูลพัว. ม.ป.ป. **ภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.technoinhome.com/front/ webboard/loadfile.php? (1 ตุลาคม 2560).

วิลาวัณย์ รุ่มรวย, สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล, สมฤดี ศิลาฤดี และ จารุณี เกษรพิกุล. 2554. ผลของคิว.พี.โปรไบโอติกส์ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล. **วารสารคณะสัตวศาสตร์คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร**, 2(3), 1-7.

ศูนย์วิจัย และพัฒนาประมงน้ำจืดตาก. 2553. **คุณสมบัติของน้าที่ใช้ในการเลี้ยงปลานิล**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: www.fisheries.go.th/iftak/web2index.php?option=com (1 ตุลาคม 2560).

สถาบันวิจัย และพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. 2540. **การเพาะเลี้ยงปลานิลเพศผู้ล้วน**. ปทุมธานี.

โสมทัต วงศ์สว่าง. 2538. **วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.

อุดม เรืองนพคุณ. 2549. **การเพาะพันธุ์ และเลี้ยงปลานิล**. กรุงเทพฯ: เกษตรสยามบุ๊คส์, 95.

อุดมลักษณ์ สมพงษ์. 2556. **รายงานผลการวิจัยผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรคติดเชื้อในปลานิล**. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

A. DelDuca, E.D. Cesar & C.P. Abreu. 2015. Bacterial community of pond's water, sediment and in the guts of tilapia (Oreochromis niloticus) juveniles characterized by fluorescent in situ hybridization technique. **Aquac. Res**, 46(3), 707-715.

A. DelDuca, E.D. Cesar, G.C. Diniz & C.P. Abreu. 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (Oreochromis,niloticus) using the fluorescent in situ hybridization technique. **Aquaculture**, 388(2013), 115-121.

A. Newaj-Fyzul, H.A. Al-Harbi & B. Austin. 2014. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, 431(1), 1-11.

A.E. Ellis. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol**, 25(8-9), 827-839.

A.R. Shelby, C. Lim, M. Yildirim-Aksoy & A.M. Delaney. 2006. Effects of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, Oreochromis niloticus. **J. Appl. Aquac**, 18(2), 23-34.

Abd. M.A. El-Rhman, A.Y. Khattab & M.A. 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(2), 175-180.

Alexander, J. B. 1985. Non-immunoglobulin humoral defense mechanisms in fish. In M.J. Manning and M.F. Tatner (Eds.). **Fish Immunology**, 133-140.

Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G. & Mohamed, M. F. 2008. Characterization of Some Bacteria Isolated from Oreochromis niloticus and their Potential Use as Probiotics. **Aquaculture**, 277(1), 1-6.

Apún-Molina, J. P., Santamaria- Miranda, A., Luna-Gonzalez, A., Martinez-Diaz, S. F. & Rojas-Contreras, M. 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia Oreochromis niloticus L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. **Aquaculture Research**, 40(8), 887-894.

Azarin, S. M., Yi, J., Gower, R. M., Aguado, B. A., Sullivan, M. E., Goodman, A. G., Jiang, E. J., Rao, S. S., Ren, Y., Tucker, S. L., Backman, V., Jeruss, J. S. & Shea, L. D. 2015. In vivo capture and label-free detection of early metastatic cells. **Nature Communications**, 6, 8094.

B. Magnadottir. 2006. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immun**, 20(2), 137-151.

B.T. Standen, D.L. Peggs, M.D. Rawling, A. Foey, S.J. Davies, G.A. Santos d & D.L. Merrifield. 2015. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, Oreochromis niloticus. **Fish. Shellfish Immuno**, 49(2016), 427-435.

B.Y. Wang, Q.Z. Tian, T.J. Yao & W. Li. 2008. Effect of probiotics, Enteroccus faecium, on tilapia (Oreochromis niloticus) growth performance and immune response. **Aquaculture**, 277(3-4), 203-207.

Boyd, C. E. 1982. **Water quality management for pond fish culture**. Elsevier Scientific Pub. Co.

Chitmanat, C., Lebel, P., Whangchai, N., Promya, J. & Lebel, L. 2016. Tilapia diseases and management in river-based cage aquaculture in northern Thailand. **Journal of Applied Aquaculture**, 28(1), 9-16.

CJ. Secombes. 1990. **Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing ability**. New Jersey: SOS.

Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S. & Kamilya, D. 2013. Effects of potential probiotic Bacillus amyloliquifaciens FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (Catla catla). **Fish & Shellfish Immunology**, 35(5), 1547-1553.

Dawood, M. A. O., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban, M. A. & Zaineldin, A. I. 2016. Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, Pagrus major growth, immune response and oxidative status. **Fish & Shellfish Immunology**, 57, 170-178.

Delmo, R. A., Ingebrigtsen, K. & Bogwald, J. 1997. Nonspecific defense mechanism in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Fish Disease**, 20(1), 241-273.

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

F. Meurer, C. Hayashi, M.M. Costa da, L.V. Mauerwek & A. Freccia. 2006. Saccharomyces cerevisiae as probiotic for Nile tilapia during the sexual reversion phase under a sanitary challenge. **Rev. Brasilian Zootechnol**, 35(2006), 1881-1886.

Fletcher, T. C. & White, A. 1986. Nephrotoxic and haematological effects of mercuric chloride in the plaice (Pleuronectes platessa L.). **Aquatic Toxicology**, 8(2), 77-84.

G. Lugo-Villarino, K.M. Balla, D.L. Stachura, K. Banuelos, M.B. Werneck & D. Traver. 2010. Identification of dendritic antigenpresenting cells in the zebrafish. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 107(36), 15850-15855.

Ghazalah, A. A., Ali, H. M., Gehad, E. A., Y.A.Hammouda & Abo-State, H. A. 2010. Effect of Probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) Fed Low Protein Diets. **Nature and Science**, 8(5), 46-53.

Gismondo, M. R., Drago, L. & Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12(4), 287-292.

Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J.-C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M. & Iswarya, A. 2018. Dietary supplementation of probiotic Bacillus licheniformis Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against Aeromonas hydrophila in tilapia Oreochromis mossambicus. **Fish & Shellfish Immunology**, 74, 501-508.

H.B. Huttenhuis, C.P. Grou, A.J. Taverne-Thiele, N. Taverne & J.H Rombout. 2006. Carp (Cyprinus carpio L.) innate immune factors are present before hatching. **Fish ShellfishImmun**, 20(4), 586-596.

Ige, B. A. 2013. Probiotics use in intensive fish farming. **African Journal of Microbiology Research**, 7(22), 2701 – 2711.

Irianto, A. & Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, 25(6), 333-342.

Iwashita, M. K. P., Nakandakare, I. B., Terhune, J. S., Wood, T. & Ranzani-Paiva, M. J. T. 2015. Dietary supplementation with Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae and Aspergillus oryzae enhance immunity and disease resistance against Aeromonas hydrophila and Streptococcus iniae infection in juvenile tilapia Oreochromis niloticus. **Fish & Shellfish Immunology**, 43(1), 60-66.

J.H. Rombout, L. Abelli, S. Picchietti, G. Scapigliati & V. Kiron. 2011. Teleost intestinal immunology. **Fish Shellfish Immun**, 31(5), 616-626.

Jolles, J. & Jolles, P. 1975. **The lysozyme from Asterias rubens**.

K-W. Ng, C-Y. Kim, N. Romano, B-C. Koh & Y-S. Yang. 2014. Effects of dietary probiotics on the growth and feeding efficiency of red hybrid Tilapia, Oreochromis sp., and subsequent resistance to Streptococcus agalactiae.
J. Appl. Aquac, 26(1), 22-31.

K. Noorit. 2014. **Tilapia status and its products in B.C 2556 and trend in year 2014**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Doc/fishnews_169.pdf (in Thai).
(1 ตุลาคม 2560)

K.J. Laing & J.D. Hansen. 2011. Fish T cells: recent advances through genomics. **Dev. Comp. Immunol**, 35(12), 1282-1295.

K.S. Nayak. 2010. Review: probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish Shellfish Immunol**, 29(1), 2-14.

L. Villamil, C. Reyes & A.M. Martínez-Silva. 2014. In vivo and in vitro assessment of Lactobacillus acidophilus as probiotic for tilapia (Oreochromis niloticus, Perciformes: Cichlidae) culture improvement. **Aquac. Res**, 45(7), 1116-1125.

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

Lin, H.-L., Shiu, Y.-L., Chiu, C.-S., Huang, S.-L. & Liu, C.-H. 2017. Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch), against Aeromonas hydrophila. **Fish & Shellfish Immunology**, 60, 474-482.

Liu, C.-H., Chiu, C.-H., Wang, S.-W. & Cheng, W. 2012. Dietary administration of the probiotic, Bacillus subtilis E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, Epinephelus coioides. **Fish & Shellfish Immunology**, 33(4), 699-706.

Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W. & Zhou, Y. 2017. Dietary administration of Bacillus subtilis

HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, Oreochromis niloticus. **Fish & Shellfish Immunology**, 60, 326-333.

M Abdel-Tawwab, M.A. Abdel-Rahman & Men. Ismael. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, Saccharomyces cerevisiae as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, 280(1-4), 185-189.

M Marzouk, M., Abu-Elala, N. & Moustafa, M. 2008. (pp, 1043-1058). Evaluation of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured oreochromis niloticus.In **8 th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008**.

M.A. Esteban, J. Meseguer, C. Tafalla & A. Cuesta. 2008. NK-like and oxidative burst activities are the main early cellular innate immune responses activated after virus inoculation in reservoir fish. **Fish Shellfish Immun**, 25(4), 433-438.

M.S. Aly, M.A. Abd-El-Rahman, G. John & F.M. Mohamed. 2008. Characterization of some bacteria isolated from Oreochromis niloticus and their potential use as probiotics. **Aquaculture**, 277(1), 1-6.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, 20(2), 137-151.

MØYNER, K. 1993. Changes in serum protein composition occur in Atlantic salmon, Salmo salar L., during Aeromonas salmonicida infection. **Journal of Fish Diseases**, 16(6), 601-604.

Murray, C. K. & Fletcher, T. C. 1976. The immu- nohistochemical localization of lysozyme in plaice {Pleuronectes platessa L.) tissues. **Fish. Biol**, 9, 329-334.

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

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H. & Austin, B. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, 431, 1-11.

P. Alvarez-Pellitero. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. 126(3-4), 171-198.

P. Ren, L. Xu, Y. Yang, S. He, W. Liu, E. Ringø & Z. Zhou. 2013. Lactobacillus planarum subsp. plantarum JCM 1149 vs. Aeromonas hydrophila NJ-1 in the anterior intestine and posterior intestine of hybrid tilapia Oreochromis niloticus X Oreochromis aureus : an ex vivo study. **Fish Shellfish Immunol**, 35(1), 146-153.

P.J. Apun-Molina, A. Santamaria-Miranda, A. Luna-Gonzalez, F.S. Martinez-Díaz & M. Rojas-Contreras. 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia Oreochromis niloticus L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. **Aquac. Res**, 40(8), 887-894.

P.K.M. Iwashita, B.I. Nakandakare, S.J. Terhune, T. Wood & T.J.M. Ranzani-Paiva. 2015. Dietary supplementation with Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae and Aspergillus oryzae enhance immunity and disease resistance against Aeromonas hydrophila and Streptococcus iniae infection in juvenile tilapia Oreochromis niloticus. **Fish Shellfish Immunol.**, 43(1), 60-66.

R.M. Parry, R.C. Chandau & R.M. Shahani. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. **Proc. Soc. exp. Biol. Med**, 119, 384-386.

Ridha, M. T. & Azad, I. S. 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia Oreochromis niloticus supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, 43(6), 843-852.

Riechelmann, H. 2004. **Cellular and molecular mechanisms in environmental and occupational inhalation toxicology**.

S. Fillatreau, A. Six, A., S Magadan, R. Castro, J.O. Sunyer & P. Boudinot. 2013. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. **Front. Immunol**, 4(2013), 28.

S. He, Y. Zhang, L. Xu, Y. Yang, T. Marubashi, Z. Zhou & B. Yao. 2013. Effects of dietary Bacillus subtilis C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia Oreochromis niloticus X Oreochromis aureus. **Aquaculture**, 412-413(1), 125-130.

S.G. Telli, T.J.M. Ranzani Paiva, M.C. Ishikawa & l. Tachibana. 2014. Dietary administration of Bacillus subtilis on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia Oreochromis niloticus raised at different stocking densities. Fish Shellfish Immunol. **Fish Shellfish Immunol.**, 39(2), 305-311.

S.T. Workenhe, M.L. Rise, M.J. Kibenge & F.S. Kibenge. 2010. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. **Mol. Immunol.**, 47(16), 2525-2536.

Safari, R., Adel, M., Lazado, C. C., Caipang, C. M. A. & Dadar, M. 2016. Host-derived probiotics Enterococcus casseliflavus improves resistance against Streptococcus iniae infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) via immunomodulation. **Fish & Shellfish Immunology**, 52, 198-205.

Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. Á. & Meseguer, J. 2005. Dietary administration of Lactobacillus delbrüeckii and Bacillus subtilis, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, 19(1), 67-77.

Salton, M. R. J. & Ghuysen, J. M. 1959. The structure of di- and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and streptomyces F1 enzyme and the β (1⟶4) N-acetylhexosaminidase activity of these enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 36(2), 552-554.

Secombes, C. J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. **Techniques in Fish Immunology**, NJ 07704-3303, 139-154.

Siwicki, A. K., Anderson, D. P. & Rumsey, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 41(1), 125-139.

T. Somamoto, N. Okamoto, T. Nakanishi, M. Ototake & M. Nakao. 2009. In vitro generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, Carassius auratus langsdorfii. **Virology**, 389(1-2), 26-33.

T.M. Ridha & S.I. Azad. 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia Oreochromis niloticus supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquac. Res**, 43(6), 843-852.

Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J. T., Dias, D. d. C., Sussel, F. R., Ishikawa, C. M. & Tachibana, L. 2014. Dietary administration of Bacillus subtilis on hematology

and non-specific immunity of Nile tilapia Oreochromis niloticus raised at different stocking densities. **Fish & Shellfish Immunology**, 39(2), 305-311.

Todar, K. G. & University of, W.-M. 2006. Todar's Online textbook of bacteriology.

Ullah, A., Zuberi, A., Ahmad, M., Bashir Shah, A., Younus, N., Ullah, S. & Khattak, M. N. K. 2018. Dietary administration of the commercially available probiotics enhanced the survival, growth, and innate immune responses in Mori (Cirrhinus mrigala) in a natural earthen polyculture system. **Fish & Shellfish Immunology**, 72, 266-272.

V. Verlhac, J. Gabaudan, A. Obach, W. Schüep & R. Hole. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). **Aquaculture**, 143(2), 123-133.

Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schüep, W. & Hole, R. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). **Aquaculture**, 143(2), 123-133.

Villamil, L., Reyes, C. & Martínez-Silva, M. A. 2014. In vivo and in vitro assessment of Lactobacillus acidophilus as probiotic for tilapia (Oreochromis niloticus, Perciformes:Cichlidae) culture improvement. **Aquaculture Research**, 45(7), 1116-1125.

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

Welker, T. & Lim, C. 2011. Use of probiotics in diets of Tilapia. **J Aquac Res Development**. S1: 104, 1-8.

Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H. & Yi, M. 2018. Effects of dietary Lactobacillus rhamnosus JCM1136 and Lactococcus lactis subsp. lactis JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, Oreochromis niloticus. **Fish & Shellfish Immunology**, 76, 368-379.

Yoshida, T. & Kitao, T. 1991. The Opsonic Effect of Specific Immune Serum on the Phagocytic and Chemiluminescent Response in Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss Phagocytes. **Fish Pathology**, 26(1), 29-33.

Zaineldin, A. I., Hegazi, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Bakr, A., El-Keredy, A. M. S., Dawood, M. A. O., Dossou, S., Wang, W. & Yukun, Z. 2018. Bacillus subtilis as probiotic candidate for red sea bream: Growth performance, oxidative status, and immune response traits. **Fish & Shellfish Immunology**, 79, 303-312.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน

1. การวิเคราะห์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

1.1 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในงานวิจัย

1.1.1 เลือดของปลานิลที่ทำการทดลอง

1.2 น้ำยา และสารต่างๆ ที่ต้องเตรียมเพื่อใช้ในการทดลอง

1.2.1 อาหารเลี้ยงเซลล์

ใช้ RPMI 1640 แบบน้ำ 900 มิลลิลิตร เติม pen/step solution 100x x 1 มิลลิลิตร

1.2.2 การเตรียม Latex beads

ใช้แทนสิ่งแปลกปลอมให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกิน โดยเติม Latex beads ลงในลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับให้มีความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.3 ขั้นตอนการทดลอง

1.3.1 นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากเลือดปลา ปรับให้มีความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับ Latex beads ที่มีความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อัตราส่วน 3:1 แล้วไปบ่มบน Coverslips ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.3.2 ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติด Coverslips ด้วย RPMI 1640 2 ครั้ง ทำการย้อมสีเซลล์ด้วยชุดน้ำยา Diff-Quick staining ล้าง Coverslip ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง คำนวณเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์โดยใช้สูตร

เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซต์ = จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกิน beads x 100/จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (200 เซลล์)

2. การวิเคราะห์กิจกรรมไลโซไซม์

การเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมไลโซไซม์

2.1 1 M Sodium phosphate buffer saline (PBS)

NaCl 8 g

KCl 200 mg

Na_2HPO_4 1.44 g

KH_2PO_4 240 mg

Distilled water เติมให้ครบ 100 ml

ถ้าต้องการปรับความเป็นกรดด่าง ให้ใช้ NaOH หรือ HCl 0.1 N

2.2 สารละลายแบคทีเรีย (Bacteria suspension) *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ในสารละลาย PBS 0.05 M pH 7.8)

2.3 การคำนวณค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ (หน่วยเป็น ยูนิต/นาที)

1 ยูนิต (หน่วย) ของกิจกรรมไลโซไซม์ คือ ค่าความขุ่นของสารละลายที่ลดลง 0.001 ภายใน 1 นาที

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u> เมื่อทราบค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงใน 1 นาที เท่ากับ 0.005 คำนวณเป็นยูนิต จะได้ดังนี้

ค่า OD ลดลง 0.001 ต่อ 1 นาที เท่ากับ 1 ยูนิต

ค่า OD ลดลง 0.005 ต่อ 1 นาที เท่ากับ 1 x 0.005 / 0.001 ยูนิต

ดังนั้นค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ เท่ากับ 5 ยูนิต/นาที

3. การวิเคราะห์ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium)

3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT

NBT (Sigma Aldrich)

Methanol 100%

Methanol 70%

2N KOH

DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

1.3.1 นำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากเลือดปลา ปรับให้มีความเข้มข้น 5 x 106 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.3.2 หยดเม็ดเลือดขาวและสาร NBT ลงใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่งโมง

1.3.3 ปิเปตส่วนใสออกด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Methanol 100% ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที

1.3.4 ปิเปต Methanol 100% ออกด้วยความระมัดระวัง จากนั้นเติม Methanol 70% ปริมาตร 125 ไมโครลิตร

1.3.5 ปิเปต Methanol 70% ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ออกด้วยความระมัดระวัง

1.3.6 เติม 2N KOH ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และ DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

1.3.7 ย้ายสารละลายทั้งหมด ลง 96-well plate ใหม่ด้วยความระมัดระวัง

1.3.8 วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 655 nm

4. การเตรียมเชื้อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค

4.1 การเตรียมเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

4.1.1 เตรียมเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ความเข้มข้น 10^8 CFU/fish โดยวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 610 nm

4.2 การฉีดเชื้อก่อโรค

4.2.1 ฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว บริเวณช่องท้องของปลา

4.3 การวิเคราะห์ผลหลังฉีดเชื้อก่อโรค

4.3.1 สังเกตอาการของโรคเป็นระยะเวลา 15 วัน

4.3.2 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ หลังได้รับการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในวันที่ 2, 5, 10 และ 15

ภาคผนวก ข

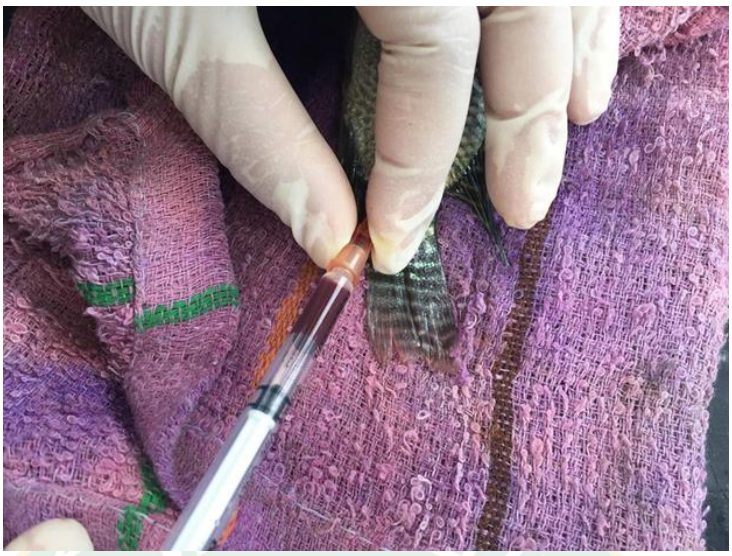
ภาพการทดลองและเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน

ภาพผนวก 1 สถานที่ทำการทดลองวิจัยในกระชังปลา แม่น้ำน่าน เขตจังหวัดพิษณุโลก

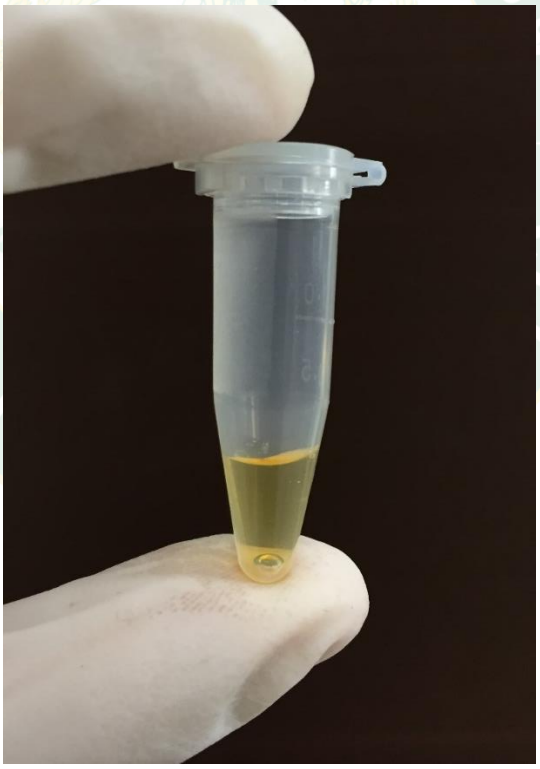
ภาพผนวก 2 การสุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตระหว่างการทดลอง

ภาพผนวก 3 สถานที่ทำการทดลองวิจัยในบ่อดิน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

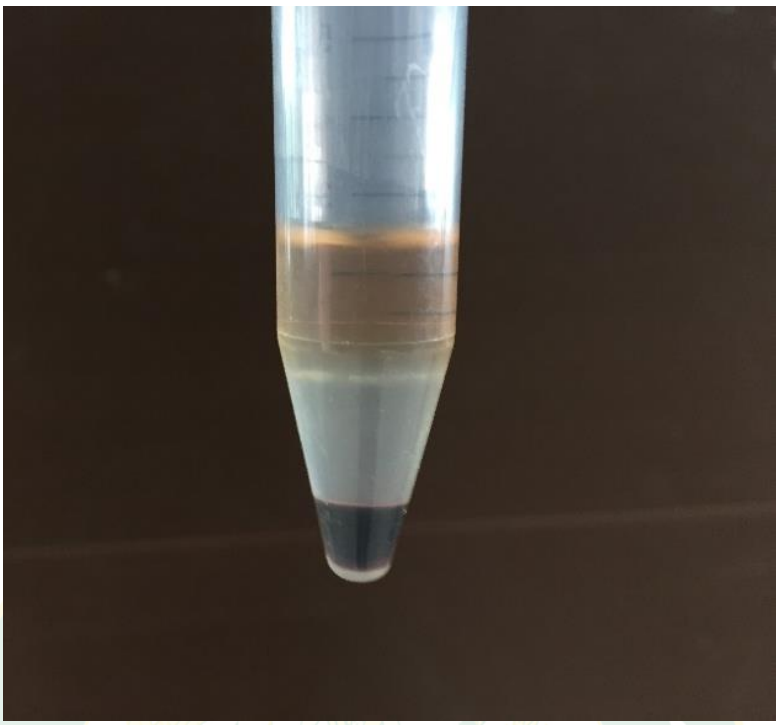
ภาพผนวก 4 การสุ่มปลาเพื่อวัดการเจริญเติบโตระหว่างการทดลอง



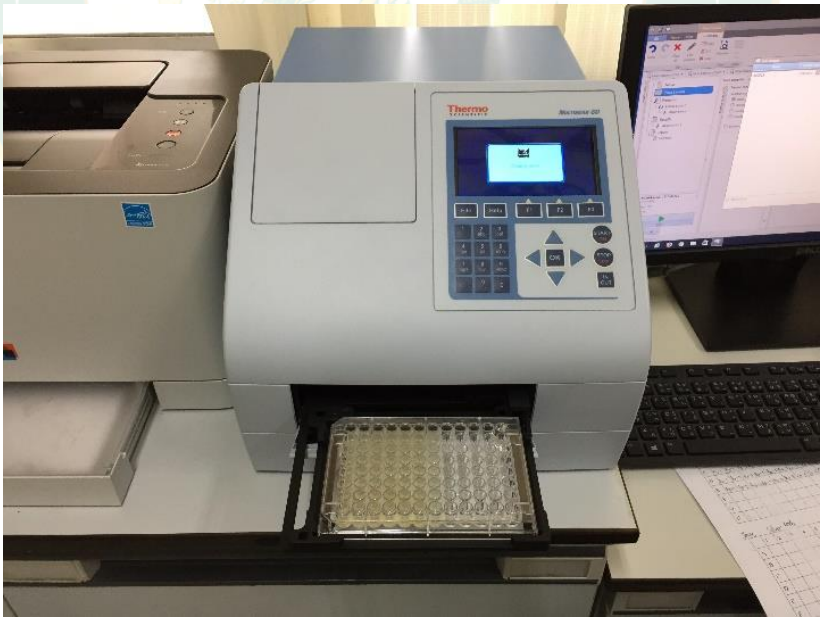
ภาพผนวก 5 การเก็บตัวอย่างเลือดปลานิล



ภาพผนวก 6 ซีรั่มปลาที่ได้จากการตกตะกอนของเลือด



ภาพผนวก 7 แสดงการแยกชั้นของเม็ดเลือด



ภาพผนวก 8 การวัดกิจกรรมไลโซไซม์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นายชาญวิทย์ สุวรรณ์

เกิดเมื่อ 14 มีนาคม 2534

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2552 ปริญญาตรี คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2546 มัธยมศึกษา โรงเรียนเทศบาล 6 นครเชียงราย จังหวัดเชียงราย เมษายน พ.ศ. 2553 ตำแหน่ง นักศึกษาฝึกงาน กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

ก.พ.-เม.ย. พ.ศ. 2554 ตำแหน่ง นักศึกษาฝึกงาน บริษัท ทีเอสเอ็ม ทักษิณมารีน จำกัด จังหวัดพังงา

พ.ย. พ.ศ. 2554-มี.ค. พ.ศ. 2555 ตำแหน่ง นักศึกษาฝึกงาน บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ประเทศฟิลิปปินส์

พ.ค. พ.ศ. 2556-ส.ค. พ.ศ. 2558 ตำแหน่ง พนักงานส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด (เขตเหนือล่าง) บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)

C. Suwan, & C. Chitmanat,. 2018. Probiotic Product Development for Tilapia Additive Feed to Promote Growth Performances. International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences. 1-4 May 2018. Hokkaido, Japan, 228-232.

ชาญวิทย์ สุวรรณ์ และชนกันต์ จิตมนัส. 2560. การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงปลานิล. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร, 15(1), 15-24

C. Suwan, R. Thainum & C. Chitmanat,. 2018. Effect of G-Biotic

(Bacillus subtilis and Yeast extract) on growth of tilapia in cage culture. National and International Fisheries Conference, 11 December 2019. Chiang Mai , Thailand.