

ประสิทธิภาพของซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโต การยับยั้งโรคติดเชื้อ
และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในปลานิลวัยอ่อน



ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2565

ประสิทธิภาพของซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโต การยับยั้งโรคติดเชื้อ
และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในปลานิลวัยอ่อน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ประสิทธิภาพของซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโต การยับยั้งโรคติดเชื้อ
และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในปลานิลวัยอ่อน

ณัฐธิดา กามเมือง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	ประสิทธิภาพของซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโต การยับยั้งโรคติดเชื้อ และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในปลานิลวัยอ่อน
ชื่อผู้เขียน	นางสาวณัฐธิดา กามเมือง
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์

บทคัดย่อ

ผลของซินไบโอติกในการเสริมประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ความต้านทานเชื้อก่อโรค กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร ในการเพาะเลี้ยงปลานิลวัยอ่อน และทำการคัดเลือกโพรไบโอติกในปลานิลวัยอ่อน ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และผลของโพรไบโอติก พรีไบโอติก และซินไบโอติกในการอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน ผลการคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ *Bacillus subtilis* (CR10-5) ผลการศึกษาคุณสมบัติในการใช้เป็นพรีไบโอติกและสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำจากน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp) และแบบสกัดสารออกฤทธิ์ (CSSe) หลังการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® รวมถึงการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกจากการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก รวมทั้งการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าเมื่อทำการหมักเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมากที่สุด ในช่วงเวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมง (0.202 g/ml) สามารถกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติก *B. subtilis* ในอาหารที่เติม CSSp การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Agar well diffusion พบว่าสาร metabolite ที่ได้จากโพรไบโอติก ในอาหาร CSSp: L Ultra conc มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* สูงที่สุด แต่อย่างน้อยกว่ายาปฏิชีวนะ Amoxicillin (10 ug) ($p < 0.05$)

การศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริมพรีไบโอติก (เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*B. subtilis*) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 การทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อน (0.67 ± 0.16 g/ตัว) ในตู้ วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3 แบ่งออกเป็น 10 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยศึกษาผลของพรีไบโอติก (เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 2.5% และ 5% (CSS0%, CSS2.5% และ CSS5% ตามลำดับ) และโพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0, 5×10^7 และ 1×10^8 CFU/g (Pro0, ProA

และ ProB ตามลำดับ) และชุด Positive control (FOS 1% + *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g) ทำการทดลองผสมอาหารให้ปลากินเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และการทดลองชุดที่ 2 การอนุบาลปลานิลวัยอ่อน (0.40 ± 0.05 g/ตัว) ในกระชัง วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3×2 แบ่งออกเป็น 8 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยศึกษาผลของพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง: CSSp ที่ระดับความเข้มข้น 0.25% (CSSp 0.25%) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultar conc : CSS ที่ระดับความเข้มข้น 5% (CSS5%) และผสมพรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ที่ระดับความเข้มข้น 1% (FOS1%) และโพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0 และ 5×10^7 CFU/g (Pro0 และ ProA ตามลำดับ) ทำการทดลองโดยผสมอาหารให้ปลากินเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน โดยพบว่า ปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม CSS 5% + ProA มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ส่งผลให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลวัยอ่อน ค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม และปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อน รวมถึงกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่อัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อทดสอบการต้านทานต่อโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบอัตราการรอดตายสูงในชุดการทดลอง CSS 5% + ProA โดยมีผลการทดลองที่ดีกว่าชุดการทดลองที่เสริมพรีไบโอติก หรือซินไบโอติกเพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ : ปลานิลวัยอ่อน, เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ, ซินไบโอติก, การเจริญเติบโต, ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ, เอนไซม์ย่อยอาหาร

Title	EFFICIENCY OF SYNBIOTIC, ON GROWTH PERFORMANCE, DISEASE RESISTANCE, AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN FRY NILE TILPIA
Author	Miss Nattikan Ngammueg
Degree	Master of Science in Fisheries Technology and Aquatic Resources
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Udomluk Sompong

ABSTRACT

The efficiency of synbiotic, on growth performance, disease resistance, immunological response and digestive enzyme activity in fry Nile tilapia cultivation were analyzed. The selection of probiotic microorganisms in fry Nile tilapia, prebiotic properties from coffee silver skin and effect of probiotic, prebiotic and synbiotic to fry Nile tilapia cultivations were studied. Probiotic, *Bacillus subtilis* (CR10-5), was selected. The study of prebiotic and active antimicrobial pathogen substances properties in aquatic animals from oligosaccharides obtained from coffee silver skin powder (CSSp) and extraction (CSSe) after fermented by cellulase enzymes Cellusoft® was carried out. The growth of probiotic and inhibition of pathogenic microorganisms by prebiotic were examined. Maximum total sugar of enzyme fermented coffee silver skin was found highest after 24-hour fermentation; CSSp: L Ultra conc was 0.202 g/ml. The probiotic *B. subtilis* provided optimal growth in the CSSp: L Ultra conc supplemented diet and inhibited the growth of pathogenic microorganisms ($p < 0.05$). The efficacy of silver skin coffee in growth inhibition to fish pathogens by Agar well diffusion method showed that probiotic *B. subtilis* cultured in CSSp: L Ultra conc was shown to inhibit fish pathogen *A. hydrophila* and *S. agalactiae* but less than the antibiotic Amoxicillin (10 ug) ($p < 0.05$).

The fry Nile tilapia cultivation supplemented with prebiotic (CSS) and probiotic (*B. subtilis*) diets were divided into 2 experiments, 1st experiment, rearing fry Nile tilapia (0.67 ± 0.16 g/fish) in the aquariums (laboratory scale), the 3x3 factorial

experimental design were divided into 10 experiments with 3 replicates, (Coffee silver skin: CSS) at concentrations 0%, 2.5% and 5% (CSS0%, CSS2.5% and CSS5%, respectively), probiotic (*B. subtilis*) at 0, 5×10^7 and 1×10^8 CFU/g (Pro0, ProA and ProB, respectively) and positive control (FOS 1% + *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g) was done. This experiment was 4 week period. The 2nd experiment, fry Nile tilapia (0.40 ± 0.05 g/fish) was reared in cages. The 3x2 factorial experimental design were divided into 8 experiments with 3 replicates, (coffee silver skin: CSSp at a concentration of 0.25% (CSSp 0.25%). The coffee silver skin powder was fermented with L Ultrar conc enzyme: CSS at 5% concentration (CSS5%) and fructooligosaccharides (FOS) at concentrations of 1% (FOS1%) and probiotic (*B. subtilis*) at levels 0 and 5×10^7 CFU/g (Pro0 and ProA, respectively) were reared in cages for 8 weeks. Fry Nile tilapia fed with 5% coffee silver skin and *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) affected growth promoting (increased weight gain), Average daily growth (ADG), specific growth rate, feed efficiency ratio, lysozyme activity, bacterial inhibition efficacy blood cells in serum (Nitro Blue Tetrazolium: NBT), Superoxide Dismutase (SOD) activity and digestive enzymes activity of fry Nile tilapia were increased significantly difference ($p < 0.05$). Survival rate (%) was not statistically differences ($p > 0.05$). Pathogen resistance against *A. hydrophila* and *S. agalactiae* was performed fish fed with CSS 5% + ProA had highest survival rate. Therefore, supplemented synbiotic diets affected to all parameters higher than supplemented with prebiotic or probiotic diets alone.

Keywords : Nile tilapia, Coffee silver skin, Synbiotic, Growth performance, Non-specific immunity, Digestive enzymes

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ขอกราบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน กรรมการที่ปรึกษา ผู้ให้ความเมตตา กรุณา ที่ให้คำแนะนำในการดำเนินการวิจัย แก้ไขปัญหา และอุปสรรคต่าง ๆ รวมทั้งเป็นผู้ถ่ายทอดองค์ความรู้ แนวทางในการปฏิบัติ การดำเนินงานวิจัย และสนับสนุนด้านงบประมาณ เครื่องมืออุปกรณ์ สำหรับการทําวิจัย ในการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชาติชาย โชนงนุช อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุก ๆ ท่านที่ได้ให้วิชาความรู้คำแนะนำในการเรียน การทําวิจัยและการดำเนินงานวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ บุคลากร พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ นักศึกษาทุก ๆ คน ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย และในการทําวิทยานิพนธ์ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์บางอย่างในการทําวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ถ่ายทอดองค์ความรู้ เพื่อใช้ในการทําวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งบุคลากรทุกท่านในคณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ ที่เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ “ทุนศิษย์ก้นกุฏิ” ประจำปีการศึกษา 2562 และสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตรมหาลัยแม่โจ้ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2563 ผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทฮิลล์คอฟจำกัด สำหรับอนุเคราะห์เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ใช้ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยสนับสนุน ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหา และอุปสรรคต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา ด้วยคุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้เขียนมอบให้กับผู้มีพระคุณดังที่กล่าวมาข้างต้นและผู้ที่ไม่ได้กล่าวถึง ณ ที่นี้ด้วย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญตารางผนวก.....	ฒ
สารบัญภาพผนวก.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 การตรวจทวนเอกสาร.....	4
ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	4
โรค และการป้องกันโรค.....	6
จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic).....	12
พรีไบโอติก (Prebiotic).....	23
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟอะราบิก้า (<i>Coffea arabica</i> silver skin).....	30
ซินไบโอติก (Synbiotic).....	34
เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase enzyme).....	38
กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร.....	40

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา.....	44
คุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลานิล	44
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย.....	47
วัสดุ และอุปกรณ์.....	47
วิธีการวิจัย.....	51
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	66
ผลการศึกษาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก และแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล	66
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ	70
ผลการศึกษาการเป็นพรไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ	71
ผลการศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริม พรไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโปรไบโอติก (<i>B. subtilis</i>).....	78
การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของการเสริมชีนโปรไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	78
การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการเสริมชีนโปรไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองการอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในกระชัง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	92
บทที่ 5 วิจัยผลการวิจัย	110
บรรณานุกรม.....	122
ภาคผนวก.....	143
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์.....	144
ภาคผนวก ข ภาพผนวก.....	147
ภาคผนวก ค สันฐานวิทยาของแบคทีเรีย.....	151
ประวัติผู้วิจัย.....	161

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก	20
ตารางที่ 2 ตัวอย่างของโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ	20
ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ	32
ตารางที่ 4 ตัวอย่างของชินไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ	36
ตารางที่ 5 อวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ (*) และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหาร (**)...	41
ตารางที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกจากปลานิล น้ำ และ ตะกอนดินในจังหวัดเชียงใหม่ ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้.....	66
ตารางที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกจากปลานิล น้ำ และ ตะกอนดินในจังหวัดเชียงรายที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้	67
ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยวิธีการ Agar well diffusion (วัดความกว้าง Clear zone, cm)	69
ตารางที่ 9 คุณค่าทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (%) (mean ± SD).....	70
ตารางที่ 10 ปริมาณสารฟีนอลิก (mg GAE/g) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) และปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (mean ± SD)	71
ตารางที่ 11 คุณภาพน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดลองในตู้ทดลองอนุบาลลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหาร สูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean±SE)	80
ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงใน ตู้ทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean ± SE).....	83
ตารางที่ 13 ภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมชินไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลา การเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean ± SE)	85
ตารางที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหาร สูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean ± SE)	87

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงค่า *P*-Value (ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) ขึ้นอยู่กับพรีไบโอติก และโพรไบโอติก ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมซินไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์..... 91

ตารางที่ 16 คุณภาพน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดลองในบ่อทดลองอนุบาลลูกปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในกระชังทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean±SE)..... 94

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในกระชังที่ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (Mean ± SE). 98

ตารางที่ 18 ภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (Mean±SE)..... 102

ตารางที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (Mean ± SE) 104

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงค่า *P*-Value (ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) ขึ้นอยู่กับพรีไบโอติก และโพรไบโอติก ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมซินไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 8 สัปดาห์..... 108

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>)	4
ภาพที่ 2 แบคทีเรีย <i>Aeromonas hydrophila</i>	9
ภาพที่ 3 ปลานิลเป็นแผลเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> sp.	9
ภาพที่ 4 แบคทีเรีย <i>Streptococcus</i> sp.	10
ภาพที่ 5 ปลานิลมีตาโปนขุนขาว เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus</i> sp.	10
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลแลคโตส	25
ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลแลคตูโลส	25
ภาพที่ 8 โครงสร้างของพรีไบโอติกประเภทโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ	27
ภาพที่ 9 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee Silver Skin)	30
ภาพที่ 10 ส่วนประกอบของเมล็ดกาแฟ	30
ภาพที่ 11 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (CSS)(A) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟบด (CSSp)(B) สารสกัดจาก เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (CSSw)(C)	54
ภาพที่ 12 ลูกปลานิลวัยอ่อน ขนาด 0.4-0.6 g/ตัว	58
ภาพที่ 13 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc	58
ภาพที่ 14 เชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB	58
ภาพที่ 15 ตู้ทดลองอนุบาลเลี้ยงลูกปลานิลวัยอ่อน	59
ภาพที่ 16 บ่อทดลอง และกระชังทดลอง	64
ภาพที่ 17 เครื่องไมโครนาโนบับเบิล รุ่น ECO-KMV120-9HAQR00	64
ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา	68
ภาพที่ 19 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ <i>A. hydrophila</i> (A) และ <i>S. agalactiae</i> (B) โดยวิธีการ Agar well diffusion	69

ภาพที่ 20	ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ CR10-5 หลังการทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง (Blood agar hemolysis).....	70
ภาพที่ 21	ชนิดน้ำตาลในผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin powder: CSSp) (A) และ สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin extract: CSSe) (B) หลังหมักด้วย เอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc.....	72
ภาพที่ 22	ชนิดน้ำตาลในผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin powder: CSSp) (A) และ สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin extract: CSSe) (B) หลังหมักด้วย เอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® CR conc	73
ภาพที่ 23	ปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติก (<i>B. subtilis</i>) และจุลินทรีย์ก่อโรค (<i>A. hydrophila</i> และ <i>S. agalactiae</i>) (Log 10 CFU/ml) ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	74
ภาพที่ 24	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i> ในอาหารแต่ละชุด การทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	75
ภาพที่ 25	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i> ในอาหารแต่ละชุด การทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	75
ภาพที่ 26	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>A. hydrophila</i> ในอาหารแต่ละ ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	76
ภาพที่ 27	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>A. hydrophila</i> ในอาหารแต่ละ ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	76
ภาพที่ 28	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>S. agalactiae</i> ในอาหารแต่ ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	77
ภาพที่ 29	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ <i>S. agalactiae</i> ในอาหารแต่ละ ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	77
ภาพที่ 30	ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>Aeromonas hydrophila</i> (%) ของ ปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลา 14 วัน.....	89
ภาพที่ 31	ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค <i>Streptococcus agalactiae</i> (%) ของ ปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลา 14 วัน.....	90

- ภาพที่ 32 ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* (%) (Mean±SD) ของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ภายหลังจากติดเชื้อ ระยะเวลา 14 วัน..... 106
- ภาพที่ 33 ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus agalactiae* (%) (Mean±SD) ของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ภายหลังจากฉีดเชื้อ ระยะเวลา 14 วัน..... 107



สารบัญตารางผนวก

หน้า

ตารางผนวกที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากฟาร์มต่าง ๆ	152
---	-----



สารบัญภาพผนวก

	หน้า
ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method.....	148
ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานที่มีน้ำตาลทั้งหมดเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน	148
ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน	149
ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Bacillus subtilis</i>	149
ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Aeromonas hydrophila</i>	150
ภาพผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Streptococcus agalactiae</i>	150



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหารสัตว์น้ำมีการขยายตัวมากขึ้นทั้งสัตว์น้ำทะเลและน้ำจืด โดยปลาน้ำจืดจากการเพาะเลี้ยงที่ส่งออกมากที่สุด ได้แก่ ปลานิล (Nile tilapia หรือ *Oreochromis niloticus*) ซึ่งมีแนวโน้มในการส่งออกสูงขึ้นทุกปี ในปี พ.ศ. 2564 มีปริมาณผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสูงถึง 210,419 ตัน เพิ่มขึ้น 2.2% จากปี 2563 (เกวลิน, 2564) และจากฐานข้อมูลด้านประมงในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าผลผลิตจากการเลี้ยงปลานิล ในจังหวัดเชียงใหม่สูงถึง 445,746 kg/ปี (กรมประมงเชียงใหม่, 2561) การเพาะเลี้ยงปลานิลให้ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ ต้องได้รับการเอาใจใส่และมีการปฏิบัติด้านต่าง ๆ แต่อุปสรรคที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงปลานิล คือ เกษตรกรเลี้ยงปลาหนาแน่น จึงส่งผลให้ปลามีความเสี่ยงในการเกิดโรคติดเชื้อ (Iwama *et al.*, 1997) ขาดการจัดการที่ดีและสภาวะแวดล้อมที่แย่งมีความแปรปรวนสูง การจัดการสุขภาพปลานิลจึงเป็นวิธีการที่ใช้เพื่อวางแผนการป้องกันไม่ให้ปลาเกิดโรค

ในปัจจุบันได้มีการป้องกันและการรักษาโรคในปลานิลโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิด แต่ไม่สามารถหยุดยั้งการตายของปลาได้โดยปลา ยังแสดงการตายต่อเนื่องจนเกษตรกรส่วนใหญ่ประสบภาวะขาดทุนอย่างหนักซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาปริมาณสูงอาจทำให้มียาตกค้างในปลานิล และในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งอาจทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ การหาวิธีต่าง ๆ ที่จะป้องกันโรคที่เกิดขึ้นทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic) เสริมลงไปผสมในอาหารเม็ดสำเร็จรูป ซึ่งจะช่วยในกระบวนการย่อยและการต้านทานของเชื้อโรคเมื่อเข้าสู่ร่างกาย โดยสร้างกรดที่ทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ อีกทั้งยังช่วยปรับสมดุลในลำไส้ให้ต่อสู้กับเชื้อโรคได้อีกด้วย (Gatesoupe, 1999) นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษต่อสัตว์น้ำ และปลอดภัยจากการเหลือสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ จึงมีแนวโน้มว่าโพรไบโอติกจะเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำที่ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต (Gomez-Gil *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีการนำโพรไบโอติก (Prebiotic) มาใช้ในสัตว์น้ำ เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้โพรไบโอติก ร่วมกับโพรไบโอติก เรียกว่า “ซินไบโอติก” ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่งผลให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทำงานได้ดียิ่งขึ้นทั้งยังช่วยในเรื่องของภูมิคุ้มกัน และทำให้ต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้มากขึ้น ประสิทธิภาพดังกล่าวส่งผลให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น (Abid *et al.*, 2013)

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin) เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ ประกอบด้วยเยื่อใยที่ละลายน้ำได้ สารประกอบฟีนอล โพลีฟีนอลและเมลานอยดิน (Borrelli *et al.*, 2004) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) และยับยั้งเชื้อก่อโรค (Jiménez-Zamora *et al.*, 2015) พร๊ไบโอติกเป็นสารอาหารที่ไม่ถูกดูดซึมหรือย่อยสลายได้ในระบบทางเดินอาหาร แต่จะถูกย่อยได้โดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ภายในลำไส้หรือจุลินทรีย์พร๊ไบโอติก ซึ่งพร๊ไบโอติกจะช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์พร๊ไบโอติก (ชยาภรณ์, 2560) จึงทำให้มีการศึกษาการนำเยื่อหุ้มของเมล็ดกาแฟ ในการนำไปใช้เป็นพร๊ไบโอติกโดยกระบวนการบ่มด้วย เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์คือน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับ เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ น้ำตาลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมได้ เช่น อุตสาหกรรมพลังงาน อุตสาหกรรมอาหารคนและสัตว์ เป็นต้น (ชยาภรณ์, 2560)

จากประสิทธิภาพของซินไบโอติกดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพซินไบโอติก และทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์พร๊ไบโอติกเฉพาะถิ่น และอาหารเสริมพร๊ไบโอติกที่ช่วยเสริมการทำงานของพร๊ไบโอติก เพื่อใช้ผสมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลานิลวัยอ่อน เพื่อให้ส่งเสริมการเจริญเติบโต รวมทั้งสามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในปลานิลวัยอ่อนและลดการใช้ยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของจุลินทรีย์พร๊ไบโอติก เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตของปลานิลวัยอ่อน
2. เพื่อศึกษาผลของพร๊ไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพร๊ไบโอติก และปลานิลวัยอ่อน
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของซินไบโอติกในการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในปลานิล
4. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมซินไบโอติก
5. เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลวัยอ่อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ทั้งด้านผลผลิตและต้นทุนการผลิตปลานิลของเกษตรกร
2. ช่วยเสริมระดับภูมิคุ้มกัน ลดอัตราการติดเชื้อก่อโรคในปลานิล และลดการใช้จ่ายยาปฏิชีวนะ
3. ได้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพซินไบโอติกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลวัยอ่อน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาวิจัยเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกเฉพาะถิ่นที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาผลของพรีไบโอติกจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของโพรไบโอติก และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae*
3. ศึกษาประสิทธิภาพของซินไบโอติกการส่งเสริมการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน เอนไซม์ย่อยอาหาร และการยับยั้งโรคติดเชื้อในปลานิลวัยอ่อน

บทที่ 2

การตรวจทวนเอกสาร

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง ในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (ภาพที่ 1) เป็นปลาที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และได้รับความนิยมในการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวาง เพราะสามารถขยายพันธุ์ได้เองในบ่อเลี้ยง ให้อูกดเลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตเร็ว ปัจจุบันมีความต้องการบริโภคปลานิลทั้งตลาดในท้องถิ่น ในเมือง หรือแม้กระทั่งตลาดในต่างประเทศ ได้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเป็นลำดับ ดังนั้นเพื่อให้เกษตรกรได้ปลานิลสายพันธุ์ดีมาเลี้ยง กรมประมงจึงได้ดำเนินการปรับปรุงสายพันธุ์ปลานิลในด้านต่าง ๆ เช่น การเจริญเติบโต ปริมาณความตักของไข่ ผลผลิต และความต้านทานโรค เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อผู้เลี้ยงปลานิลจะได้มีความมั่นใจในการเลี้ยงปลานิล เพื่อเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค (อุตม, 2549)



ภาพที่ 1 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

1. การดำรงชีวิตของปลานิล

ตามธรรมชาติแล้วปลานิลชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) ตามแม่น้ำ ลำคลอง บึง ทะเลสาบ ที่เป็นแหล่งน้ำจืด แต่สามารถนำไปเลี้ยงในบริเวณที่เป็นน้ำกร่อยได้เนื่องจากมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่กว้างมาก คือตั้งแต่ 11-42 °C แต่ในอุณหภูมิต่ำ 10 °C พบว่า ปลานิลปรับตัว และเจริญเติบโตได้ไม่ดี ทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน ส่วนความทนทานของปลานิลต่อความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ โดยเจริญเติบโตได้ดีในช่วงระดับ pH 6.5-8.5 นอกจากนี้

ปลานิลยังมีความทนทานต่อความเค็มของน้ำ กล่าวคือ ปลานิลสามารถอยู่ได้ปกติในน้ำที่มีความเค็มสูงสุด 20 ppm ซึ่งปลานิลนับเป็นปลาที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงในบ่อได้เป็นอย่างดี

2. การเพาะเลี้ยงปลานิล

การเลี้ยงปลาในกระชังเป็นรูปแบบการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูง ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในเชิงเศรษฐศาสตร์ และการใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำทั่วไป อีกทั้งยังช่วยให้ผู้ที่ไม่มีที่ดินทำกินสามารถหันมาเลี้ยงปลาได้ หากปล่อยปลาในอัตราที่เหมาะสม จะทำให้ปลา มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น สามารถช่วยลดระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลงได้ นอกจากนี้ยังสะดวกในการดูแลจัดการการเคลื่อนย้าย รวมทั้งการเก็บเกี่ยวผลผลิต และมีการลงทุนต่ำกว่ารูปแบบการเลี้ยงอื่น ๆ ในขณะที่ผลตอบแทนต่อพื้นที่สูง อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงปลานิลในกระชัง อาจจะมีข้อเสียอยู่บ้าง เช่น ปัญหาโรคพยาธิที่มากับน้ำ ซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ นอกจากนี้ยังอาจก่อให้เกิดปัญหาเรื่องสภาพแวดล้อม หากไม่มีการคำนึงถึงปริมาณ และที่ตั้งของกระชัง ตลอดจนความเหมาะสมของลำน้ำ (นิตยสารการเกษตร, 2550)

3. การให้อาหาร และการจัดการระหว่างการเลี้ยง

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

3.1 ระดับโปรตีนในอาหาร ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของปลานิลที่มีอายุต่างกันจะแตกต่างกัน สำหรับลูกปลาวัยอ่อน (Juvenile) และลูกปลานิ้ว (Fingerling) จะต้องการอาหารที่มีระดับโปรตีนประมาณ 30-40 % แต่ในปลาใหญ่จะต้องการอาหารที่มีโปรตีนประมาณ 25-30 %

3.2 เวลาในการให้อาหาร เนื่องจากปลานิลจะกินอาหารได้ดี เมื่อมีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำสูง จะเป็นช่วงเวลากลางวันดังนั้น ส่วนใหญ่จึงควรให้อาหารในช่วงเวลาดังกล่าว

3.3 ความถี่ในการให้อาหาร ปลานิลเป็นปลาที่ไม่มีกระเพาะอาหาร จึงสามารถกินอาหารได้ทีละน้อย และมีการย่อยอาหารที่ค่อนข้างช้า การให้อาหารครั้งละมากๆ จะทำให้สูญเสียอาหาร และก่อให้เกิดสภาวะน้ำเสียได้ ดังนั้น เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารเม็ดสูงสุดจึงควรให้อาหารแต่น้อย แต่ให้บ่อยๆ โดยความถี่ที่เหมาะสม คือ ปริมาณ 4-5 ครั้ง/วัน จะช่วยเร่งการเจริญเติบโต และทำให้ผลตอบแทนในเชิงเศรษฐศาสตร์สูงสุด

3.4 อัตราการให้อาหาร ปริมาณอาหารที่ให้ปลากินจะขึ้นอยู่กับขนาดของปลา และอุณหภูมิ หากอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น จะทำให้อัตราการกินอาหารของปลาสูงขึ้นตามไปด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25-30 °C ควรให้อาหาร 20 % ของน้ำหนักปลา สำหรับปลาขนาดเล็กในปลารุ่น อัตราการให้อาหารจะลดลงเหลือ ประมาณ 6-8 % และสำหรับปลาใหญ่ อัตราการให้อาหารจะเหลือเพียง ประมาณ 3-4 %

3.5 การจัดการระหว่างการเลี้ยง ควรมีการตรวจสอบกระชังเพื่อซ่อมแซมส่วนที่ชำรุดทุก ๆ สัปดาห์ รวมทั้งสูบลมมาตรวจสอบน้ำหนักเพื่อปรับปริมาณอาหารที่ให้ได้อย่างเหมาะสม

3.6 การเก็บเกี่ยวผลผลิต การเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นข้อควรคำนึงอีกประการหนึ่งสำหรับการจัดการ การเก็บเกี่ยวผลผลิตจากการเลี้ยงในกระชังควรคำนึงถึงขนาดของปลา และปริมาณที่ตลาดต้องการ (สถาบันวิจัย และพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, 2540)

โรค และการป้องกันโรค

ในปัจจุบันปัญหาที่สร้างความเสียหายให้แก่ผู้เลี้ยงปลาอยู่เสมอ คือ ปัญหาปลาเป็นโรค โรคที่เกิดกับปลาจากไวรัส แบคทีเรีย สัตว์เซลล์เดียว และพวกหนอนที่อันตรายต่อปลาโดยตรง โดยเข้าทำลายอวัยวะของปลา เช่น ไต ตับ และยังทำลายอวัยวะภายนอก เช่น เหงือก และลำตัวของปลา ซึ่งจะทำให้เกิดโรค และตายในเวลาต่อมา นอกจากนี้โรคปลายังเกิดขึ้นเนื่องจากสภาพแวดล้อม และอาหารได้อีกทางหนึ่งด้วย ในการเกิดโรคของปลาในแต่ละครั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จะสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรไม่มากนัก ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการที่ผู้เลี้ยงจะรู้ว่าปลาเป็นโรคก็ต่อเมื่อปลาตายลอยขึ้นมาให้เห็น เมื่อปล่อยให้ปลาเป็นโรคแล้ว การรักษาต้องใช้เวลา และในระยะที่ทำการรักษาอยู่นั้น ย่อมมีการสูญเสียปลาไปด้วยวิธีที่ดีที่สุด คือ การกำจัดต้นเหตุต่าง ๆ ที่ทำให้ปลาเป็นโรค ดังนั้น การแก้ไขหาวิธีการที่จะไม่ทำให้ปลาเกิดโรคดีกว่า ที่จะปล่อยให้ปลาเกิดโรคแล้วทำการรักษา เพราะการนอกจากจะไม่ค่อยได้ผลแล้วยังทำให้ต้องสูญเสียปลาที่เลี้ยง และเงินทุนอีกมาก (อุดม, 2549) โรคปลาสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ โรคติดเชื้อ (Infectious diseases) และโรคไม่ติดเชื้อ (Noninfectious diseases) โรคติดเชื้อมีสาเหตุมาจากเชื้อโรคซึ่งส่วนใหญ่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมหรือติดมากับปลาซึ่งเป็นพาหะของโรค โรคเหล่านี้สามารถติดต่อกันได้ (Contagious diseases) และต้องการการจัดการเพื่อที่จะควบคุมการระบาดของโรค ในทางตรงกันข้ามโรคไม่ติดเชื้อซึ่งเกิดจากสภาวะแวดล้อมอันไม่เหมาะสมการขาดสารอาหาร ความบกพร่องทางพันธุกรรมเป็นโรคที่ไม่ติดต่อและไม่สามารถใช้ยาในการรักษาได้ (ชนกันต์ และคณะ, 2556)

1. สาเหตุของการเกิดโรค

สาเหตุที่ทำให้ปลาเป็นโรคนั้นมีอยู่หลายประการ ได้แก่

1.1 น้ำ เป็นสาเหตุให้ปลาเกิดโรค คือ น้ำเสียเช่น น้ำมีกลิ่นเหม็น มีออกซิเจนน้อยไม่พอกับความต้องการของปลา หรือน้ำมีคาร์บอนไดออกไซด์มากเกินไป สาเหตุที่ทำให้น้ำเสียอาจมาจากการปล่อยปลาลงเลี้ยงในบ่อหนาแน่นเกินไป ให้อาหารมากเกินไปจนอาหารที่เหลือนั้นบูดเน่า หรืออาจจะเกิดจากของเสีย หรืออาจจะเกิดจากของเสียที่ปลาถ่ายออกมาแล้วสะสมกันอยู่มาก ๆ เนื่องจากไม่มีการถ่ายเทน้ำในบ่อจนเกิดการเน่าเสีย ในกรณีที่น้ำเสียมาก ๆ จนทำให้ออกซิเจนในน้ำไม่มีเลย จะทำให้ปลาตายได้ หากช่วยเหลือนไม่ทัน นอกจากนี้ น้ำที่มีความเป็นกรด หรือเป็นด่างมากเกินไปมีส่วนทำให้ลูกปลาทายได้ทันที หรือทำให้ลูกปลาเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ หรือการเจริญเติบโตของปลาไม่เป็นไปตามปกติ

1.2 ความบอบช้ำ อาจเกิดจากบาดแผลที่เกิดขึ้นในระหว่างการจับ หรือการขนย้าย ซึ่งจะทำให้ปลาอ่อนแอรับเอาเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้ง่าย โดยเฉพาะลูกปลาที่ต้องขนย้ายในระยะทางไกล ๆ โดยใช้ถุงพลาสติก หรือถัง ไม่ควรใส่ปลาจนหนาแน่นเกินไป เพราะปลาอาจบอบช้ำมากร่างกายอ่อนเพลีย และมีโอกาสตายได้ในเวลาต่อมา ดังนั้น ในขณะที่ลำเลียงควรใส่เกลือในปริมาณ 0.1-0.2 % หรือใส่ยาเกลือเข้มข้น 1-3 ppm อาจช่วยลดอัตราการตายได้ และที่สำคัญ ก่อนปล่อยปลาลงเลี้ยงในบ่อควรระวังว่าอุณหภูมิในถุง กับน้ำในบ่อไม่ควรแตกต่างกันมากนัก

1.3 ความหนาแน่นของปลา การปล่อยหนาแน่นนั้นอาจไม่มีปัญหาในระยะที่ปลายังมีขนาดเล็กอยู่ แต่เมื่อปลาเริ่มขนาดใหญ่ขึ้นความหนาแน่นของปลาก็เพิ่มขึ้น ทำให้ออกซิเจนไม่พอกับความต้องการของปลา น้ำเสียได้ง่ายทั้งนี้เพราะปลาทุกตัวต้องใช้ ออกซิเจนในการหายใจ และขณะเดียวกันก็ต้องถ่ายของเสียเช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และมูลปลาที่ออกมาด้วย ซึ่งเมื่อมีปลามากของเสียที่ถ่ายออกมาก็มากเช่นเดียวกัน เมื่อสภาพไม่ดีแล้ว ปลาจะไม่ค่อยกินอาหาร การเจริญเติบโตไม่ดี และยังทำให้ปลาไม่ค่อยแข็งแรง เกิดโรคได้ง่าย ฉะนั้น ควรปล่อยปลาลงเลี้ยงในอัตราที่เหมาะสมที่สุด (มันสิน และไพพรรณ, 2536)

1.4 โรคที่เกิดจากปรสิต ปรสิตเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ เนื่องจากปรสิตส่วนมากสามารถเข้าสู่ปลาได้โดยตรง หรืออาจแฝงตัวมากับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่ปลากินเป็นอาหารได้ ดังนั้น การกำจัด และการป้องกันปรสิตเหล่านั้น ไม่ให้เข้ามาสู่ตัวปลา ปรสิตที่พบในปลา มีตั้งแต่สัตว์เซลล์เดียวขนาดเล็ก หนอนพยาธิ ไปจนถึงปรสิตเปลือกแข็งที่มีขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งในแต่ละกลุ่ม จะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของปลาแตกต่างกันไป ปรสิตบางชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับปลาเจ้าบ้านมาก พบได้ในปลาเพียงไม่กี่ชนิด ในขณะที่ปรสิตบางชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับเจ้าบ้านน้อยมาก สามารถพบได้ในปลาหลายชนิด ทำให้การกระจายของปรสิตมีความแตกต่างกันไป และส่งผลต่อการเกิดโรคในปลาแตกต่างกันด้วยการศึกษาเกี่ยวกับปรสิต

ที่พบในปลาชนิด และก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะเป็นปรสิตที่พบเกาะอยู่ภายนอก ส่วนปรสิตภายในพบ น้อย และไม่ค่อยมีผลกระทบต่อสุขภาพของปลาชนิด ตัวปรสิตที่เกิดกับปลาเมื่อหลายชนิด ซึ่งจะเกาะ ติดตามตัวปลา พบได้ทั้งภายนอก และภายใน บางชนิดก็ทำให้ปลาตายโดยตรง บางชนิดทำให้ปลา มี บาดแผล เจ็บปวดระคายเคือง อ่อนแอ เสียการทรงตัว และมีบางชนิดถ้าเกิดขึ้นมาก ๆ จะทำให้ปลา ไม่เจริญเติบโต และทำให้เกิดปัญหาต่อการเลี้ยงปลานิลได้

1.5 โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่ มักประสบปัญหาการตาย ของปลาที่รุนแรงในปลาขนาดใหญ่อายุตั้งแต่ 3-4 เดือน หรือขนาดตั้งแต่ 200-800 g ซึ่งการตายของ ปลา มักจะเกิดในช่วงหน้าร้อนไปจนถึงต้นฤดูฝน นับตั้งแต่เดือนมีนาคมจนถึงเดือนกรกฎาคมของทุกปี ลักษณะการติดเชื้อทางแบคทีเรียจะคล้าย ๆ กัน จะมีการตกเลือด มีแผลตามลำตัวครีบกร่อน กกหุบวม มีน้ำในช่องท้องไม่กินอาหาร (ชนกันต์ และคณะ, 2556) ที่พบบ่อยมี 2 ชนิดคือ

1.5.1 โรคเกิดจากเชื้อแอโรโมนัส (*Aeromonas hydrophila*) เป็นแบคทีเรียแกรม ลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นตรงขนาด ความยาวโดยทั่วไปประมาณ 1.0-1.5 μm (ภาพที่ 2) ก่อให้เกิดโรค ที่มีก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากในการเลี้ยงปลาดุก ปลานิล กบและปลาน้ำจืดอื่น ๆ และ มักพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยง โดยให้อาหารสดหรือการเลี้ยงแบบผสมผสาน ซึ่งเชื้อตัวนี้จะอาศัยอยู่ในแหล่ง น้ำอยู่แล้วโดยเฉพาะแหล่งที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง ความเครียด ไม่ว่าจะเป็นการขนส่ง การเคลื่อนย้าย ปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารที่ไม่ดี การมีปรสิตเกาะเยาะ โดยโรคที่เกิดจาก เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. ก่อให้เกิดโรค Bacteria hemorrhagic septicemia หรือ Motile *Aeromonas* septicemia โรคเกล็ดตั้งพอง โรคตกเลือด โรคท้องบวม โรคที่เกิดจากเชื้อนี้พบได้ใน ปลาน้ำจืดทั่วโลก เชื้อนี้จะแพร่กระจายอยู่ในน้ำจืดทั่วไป และพบมากในน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มักเป็นการติดเชื้อแบบแทรกซ้อน (Secondary infection) อาการอาจมี ความแตกต่างกันไปตามชนิดปลา อาการโดยทั่วไปคือ ปลาจะไม่กินอาหาร เฉื่อย สูญเสียการทรงตัว ครีบหลุดกร่อน เกิดบาดแผล และบางครั้งพบเชื้อราพวก *Saprolegnia* sp. เกาะที่บาดแผล ปลาที่ติด โรคอาจมีการสะสมของเหลวจนท้องบวม น้ำ บางครั้งจะเห็นเกล็ดปลาตั้งพองขึ้น ตาโปน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

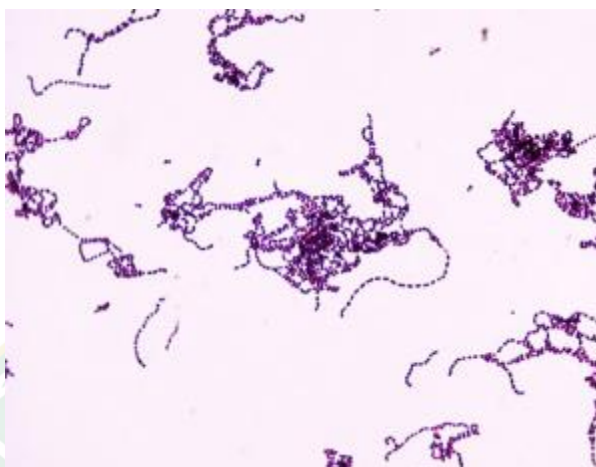


ภาพที่ 3 ปลานิลเป็นแผลเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp.

ที่มา: ชนกันต์ และคณะ (2556)

1.5.2 โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* sp.) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ติดสีแกรมบวกอยู่เป็นคู่ (ภาพ 4) ปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีตาขุ่นขาว ว่ายน้ำช้า ๆ ลอยนิ่งรอบ ๆ ซ่องซั๊บถ่ายจะบวมแดง โดยส่วนใหญ่ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้ จะมีผลต่อตา ปลาจะเกิดการตาโปน หรือตกลีบบริเวณตา มักพบระบาดในฤดูหนาว (ภาพที่ 5) Pereira *et al.* (2010) รายงานว่า อัตราการตายจากโรคนี้นับสูงเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงกว่า 26 °C โรคติดเชื้อนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคที่อาศัยอยู่ในบ่อหรือกระชังเดียวกันเชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด คือ เพนนิซิลิน (Penicillin) อิริโทรมัยซิน (Erythromycin) แอมพิซิลิน (Ampicillin) และออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) และต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ ซัลฟาเมธอซอล/ไตรเมโพรอิม (Sulfamethoxazole/trimethopri) นาลิดิซิก แอซิด (Nalidixic acid) และ ออกโซลิโนลิกแอซิด (Oxolinic acid) (นเรศ และคณะ, 2552) มีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่พยายามพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ (Eldar *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2004; Klesius *et al.*, 2000;

Pridgeon and Klesius, 2011) ซึ่งผลที่ได้ยังไม่ชัดเจน บางวัคซีนจะป้องกันโรคได้จำเพาะ *Streptococcus iniae* แต่ไม่ป้องกันโรคติดเชื้อจาก *Streptococcus agalactiae* (Evans et al., 2004)



ภาพที่ 4 แบคทีเรีย *Streptococcus* sp.



ภาพที่ 5 ปลานิลมีตาโปนขุนขาว เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp.

ที่มา: ชนกันต์ และคณะ (2556)

1. แนวทางการป้องกันปัญหาการเกิดโรค

เพื่อให้การป้องกันโรค เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ควรมีหลักในการปฏิบัติดังต่อไปนี้ (อุคม, 2549)

1.1 เน้นการจัดการในช่วงวิกฤติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงที่อากาศร้อน ฝนตกติดต่อกันหลายวัน อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงฉับพลัน น้ำหลาก หรือน้ำนิ่งเป็นเวลานาน โดยเฉพาะช่วงฤดูร้อนต่อฤดูฝน และช่วงปลายฝนต้นหนาว เกษตรกรสามารถป้องกันการระบาดของโรคโดยการเสริมวิตามินที่จำเป็น

เช่น วิตามินซี (3-5 g/kg) ร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะ (3-5 g/kg) ติดต่อกันเป็นเวลา 5-7 วัน จนกว่าสภาวะอากาศจะกลับเข้าสู่ปกติ

1.2 ลด หรืออย่าปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นสูง หรือหลีกเลี่ยงการเลี้ยงปลาในบางช่วงเวลา โดยเฉพาะการเลี้ยงในช่วงระยะเวลาวิกฤติ เนื่องจากปลาจะมีความเสี่ยงสูงมากต่อการเกิดโรค นอกจากนี้การปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นต่ำจะช่วยให้ การจัดการสภาพการเลี้ยงได้ง่ายขึ้น

1.3 ระวังการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ หากเป็นไปได้ควรติดตั้งเครื่องให้อากาศเพื่อเติมอากาศในน้ำอย่างต่อเนื่อง ให้เพียงพอต่อความต้องการของปลา โดยเฉพาะช่วงเวลากลางคืนจนถึงช่วงเช้าตรู่ และช่วงฟ้าปิดติดต่อกันหลายวัน

1.4 เพิ่มแหล่งของเกลือแร่ให้แก่ปลา โดยการเติมเกลือแกง เนื่องจากในช่วงระยะเวลาวิกฤติ ปลาส่วนใหญ่จะเกิดความเครียดได้ง่าย และอาจส่งผลให้ปลาสูญเสียระบบควบคุมสมดุลของน้ำ และเกลือแร่ การให้เกลือแกงจะเป็นการชดเชยเกลือที่สูญเสียไป ระหว่างเกิดความเครียด ทำให้ระบบต่าง ๆ ของร่างกายปลาสามารถทำงานต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง วิธีการเติม ควรใส่เกลือในถุงผ้าแขวนไว้เป็นจุด ๆ ให้เกลือละลายออกมาช้า ๆ ตามขอบบ่อ หรือกระชังให้ติดต่อกันจนสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงกลับเข้าสู่ภาวะปกติ

1.5 อย่าใช้ยา หรือสารเคมีมากเกินไป เนื่องจากจะเป็นการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงแล้ว การใช้ยาดังกล่าวยังมีผลทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา ทำให้เมื่อเกิดโรคแล้วอาจส่งผลให้การใช้ยา และสารเคมีดังกล่าวไม่สามารถใช้ในการควบคุมโรคได้

1.6 สาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค โดยการนำตัวอย่างปลาป่วยส่งให้หน่วยงานของรัฐที่รับผิดชอบเพื่อทำการตรวจวินิจฉัยให้ทันที่ โดยปลาที่จะนำส่งตรวจนั้นต้องอยู่ในสภาพที่มีชีวิตเท่านั้น จึงจะทำให้การตรวจวินิจฉัยสามารถทำได้ถูกต้อง และแม่นยำที่สุด

1.7 นำปลาที่เป็นโรคออกจากพื้นที่บ่อเลี้ยง หรือกระชัง โดยการนำไปฝัง เผาทำลายหรือใช้ความร้อนที่ใช้การประกอบอาหาร จะเป็นการลด หรือตัดวงจรของการแพร่ระบาดของเชื้อโรคได้ โดยเฉพาะการเลี้ยงปลาในบ่อดินขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าปลาเป็นโรคส่วนใหญ่ จะว่ายลอยบริเวณท้ายบ่อ (ประพันธ์ศักดิ์ และนนทวิทย์, 2555)

จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic)

ปลาที่มีคุณภาพดี ต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค การพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลของเกษตรกรเพื่อช่วยลดต้นทุนให้น้อยที่สุด การลดต้นทุนไม่ได้อยู่ที่การเลือกซื้อลูกปลานิลที่มีราคาถูก การลดอาหาร หรือการประหยัดค่าไฟฟ้า แต่เป็นการลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นในการเลี้ยงด้วยวิธีการต่าง ๆ แนวทางหนึ่ง ที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิตคือ การเลี้ยงในระบบโพรไบโอติกฟาร์มมิ่ง (เสนอ, 2547)

โพรไบโอติก เป็นเทคโนโลยีชีวภาพในการใช้จุลินทรีย์ หรือแบคทีเรียที่มาจากธรรมชาติ ไม่เป็นภัยต่อสิ่งแวดล้อม มาใช้ในการเลี้ยงปลานิล ทดแทนการใช้สารเคมี ด้วยหลักการการใช้จุลินทรีย์ที่ดีไปควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ในปลานิลควบคู่ไปกับการจัดการสภาพแวดล้อมภายในบ่อปลานิล ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นมิตรต่อปลานิล เพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน และป้องกันไม่ให้เกิดโรคที่เลี้ยงเกิดโรค แทนการรักษาด้วยยาหรือสารเคมีเมื่อปลานิลเกิดอาการแล้ว การเลี้ยงในระบบนี้ ยังมีความจำเป็นที่จะต้องป้องกันโรคที่อาจจะเข้ามาจากภายนอก สำหรับอาหารที่ใช้เลี้ยงจะผสมกับจุลินทรีย์ที่เหมาะสม เพื่อปรับสมดุลระบบทางเดินอาหาร เท่ากับเป็นการแย่งพื้นที่แบคทีเรียที่เป็นอันตรายในลำไส้ ช่วยให้การย่อยอาหารดีขึ้น ประสิทธิภาพในการใช้อาหารดีขึ้น ของเสียที่ขับถ่ายออกก็มีปริมาณน้อยลง ทำให้ได้ผลผลิตปลานิลที่มีสุขภาพแข็งแรง ขณะเดียวกัน ในระบบโพรไบโอติก ยังมีการนำแบคทีเรียที่เหมาะสมมาใช้ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเสีย และอินทรีย์สารภายในบ่อ ทำให้ปลานิลมีอาหารธรรมชาติเพิ่มขึ้น และช่วยให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำอยู่ในสภาพคงที่ ปลานิลจะไม่เครียด และสามารถเติบโตได้อย่างแข็งแรง ซึ่งผลการเลี้ยงด้วยระบบนี้ จะมีความเสียหายน้อยมาก (เสนอ, 2547)

โพรไบโอติก ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี ค.ศ. 1965 (Lilly and Stillwell, 1965) เพื่อกล่าวถึง สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ในปี ค.ศ. 1974 Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความว่าโพรไบโอติก คือสิ่งมีชีวิต และสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1989 Fuller (1989) อธิบายคำว่าโพรไบโอติกคือ อาหารเสริม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย และปี ค.ศ. 1992 Havenaar and Huis (1992) ได้ขยายคำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า จะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิด จนในที่สุดปี ค.ศ. 2007 FAO/WHO (2007) ได้ให้นิยามของโพรไบโอติกว่า โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมแล้วจะให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน

ที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิม ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากขบวนการระเหิดแห้ง (Freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมัก ซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้คน และสัตว์มีสุขภาพดีขึ้นด้วย และโพรไบโอติกไม่ได้จำกัดการใช้เฉพาะในระบบทางเดินอาหารเท่านั้น ยังอาจไปมีผลต่อระบบอื่น ๆ เช่น ทางเดินหายใจส่วนต้น หรือระบบประสาท และระบบสืบพันธุ์ (Bic Chemical Company Limited, 2012)

1. กลไกการทำงานของโพรไบโอติก

เมื่อเจ้าบ้านได้รับโพรไบโอติกเข้าไปแล้ว มันจะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโต หรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วน โดยเฉพาะการแทรกตัวอยู่ตามร่องวิลไล (Villi) ของลำไส้เล็ก มีการย่อยสลายกากอาหารแล้วสร้างกรดแลคติก กรดแลคติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การเกาะติดของจุลินทรีย์โพรไบโอติก จะแพร่กระจายทุกพื้นที่ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมิมีพื้นที่สำหรับการเกาะติด การรับจุลินทรีย์โพรไบโอติกเข้าไปเป็นสิ่งแปลกปลอม จะดึงดูดพวกแมคโครฟาจ (Macrophage) จึงเป็นการกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ซึ่งมีอยู่ตามธรรมชาติแล้ว ส่วนหนึ่งอยู่ในระบบทางเดินอาหาร จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการต้านการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ใหม่ เยื่อบุผนังลำไส้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า Competitive exclusion หรือ Colonization resistance เป็นกลไกการต่อต้านการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ โดยเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะถิ่น นอกจากจะขัดขวางการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยตรงแล้ว จุลินทรีย์เฉพาะถิ่นในทางเดินอาหารยังผลิตสารซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าไปใหม่ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulphide) กรดน้ำดีอิสระ เช่น Deoxycholic acid ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยป้องกันการยึดเกาะ (Colonization) ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคส่วนใหญ่ เกิดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ *Samonella* sp. ในผลิตภัณฑ์สัตว์ ทำให้สัตว์ได้รับเชื้อชนิดนี้เข้าไปมาก จึงเกิดแนวคิดที่จะนำโพรไบโอติกมายับยั้งเชื้อ *Samonella* sp. ในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังมีความสามารถในการผลิตสารซึ่งจำเป็นต่อเจ้าบ้าน เช่น กรดอะมิโน กรดแลคติก และวิตามิน เพื่อรักษาความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร จึงทำให้คนและสัตว์มีความสามารถในการต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร ซึ่งในการสร้างความสมดุลนี้เรียกว่า Bacterial antagonism หรือ Colonization resistance ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ (Eubiosis) โดยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้จะทำให้ระบบการย่อยอาหาร และการดูดซึมดีขึ้นตามปกติ ในการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร จะเกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมและอาหารที่กินเข้าไป การใช้สารปฏิชีวนะ และ

ความเครียด ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ จะมีผลทำให้เกิดแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform)

โดยมีกลไกการทำงานของโพรไบโอติกในการป้องกันระบบทางเดินอาหารจากเชื้อก่อโรค (Verna and Lucak, 2010) ได้แก่

1.1 ปรับภูมิคุ้มกันของระบบทางเดินอาหารโดยการเปลี่ยนแปลงไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory cytokine) และเกิด Downregulation ของ Proinflammatory cascades หรือเหนี่ยวนำกลไกการควบคุมความจำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อ (Strain-specific manner)

1.2 โพรไบโอติกสามารถแบ่งตัวได้รวดเร็ว จึงแทนที่เชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในผนังทางเดินอาหารได้

1.3 เปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของลำไส้ โดยกระบวนการหมัก (Fermentation) ทำให้ทางเดินอาหารมีความเป็นกรดมากขึ้น จึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้

1.4 เพิ่มกลไกตามธรรมชาติในการปกป้องเยื่อบุทางเดินอาหาร (Epithelial barrier function)

1.5 เหนี่ยวนำตัวรับ (Receptor) ชนิด μ -opioid และ Cannabinoid ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Intestinal epithelial cells)

1.6 ลดความไวในการกระตุ้นของอวัยวะภายใน (Visceral hypersensitivity) ลดการสื่อสาร แบบนำเข้าของไขสันหลัง (Spinal afferent traffic) และลดการตอบสนองต่อความเครียด (Stress response)

นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยมีกลไกการหลั่งสารหลายชนิดออกมาต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เจริญเติบโตภายในลำไส้ได้ (สุญาณี, 2549)

2. คุณสมบัติของโพรไบโอติก

การใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้นต้องคำนึงถึงปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่มากพอ หรือเหมาะสมในการให้แต่ละครั้ง และการให้ต้องให้อย่างต่อเนื่อง ด้วยความถี่ที่เหมาะสม ส่วนคุณสมบัติสำคัญที่นำมาใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรีย ที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้น Gatesoupe (1999) ได้รวบรวมไว้ดังนี้คือ

2.1 ควรเป็นแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถในการแข่งขัน การใช้สารอาหาร หรือผลิตสารเพื่อกำจัดหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

- 2.2 มีความสามารถในการเกาะยึดลำไส้ได้ หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง
- 2.3 ทำให้เจ้าบ้านแข็งแรงมีความต้านทานโรค โดยมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบการต้านทานโรค
- 2.4 มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้
- 2.5 ไม่เป็นเชื้อก่อโรค โดยมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่ามีประโยชน์ต่อร่างกาย
- 2.6 ทนต่อเกลือ น้ำดี และ pH ต่ำได้

3. บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร

การเติมโพรไบโอติกลงในอาหารสัตว์ จึงมีผลคล้ายกับการเติมยาปฏิชีวนะในแง่ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ และเนื่องจากโพรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่ได้จากธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง จึงมีแนวโน้มว่าโพรไบโอติกจะเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต (Bic Chemical Company Limited, 2012) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร มีทั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนและใช้ออกซิเจน ในการเจริญเติบโตทั้งนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนใหญ่ จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ใช้ออกซิเจนในการเติบโต และมีปริมาณน้อยกว่า 10^3 CFU/g ปริมาณสูงสุดของเชื้อจุลินทรีย์จะพบในลำไส้ใหญ่ โดยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้จะมีประมาณ 10^{14} CFU/g ซึ่งมากกว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในร่างกายถึง 10 เท่าเนื่องด้วยอาหารจะเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอย่างรวดเร็ว (4-6 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบกับเคลื่อนที่ผ่านลำไส้ใหญ่ จะใช้เวลาประมาณ 48-70 ชั่วโมง (ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเจ้าบ้าน ทำให้ในลำไส้ใหญ่มีปริมาณ และเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ประกอบกับสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลาง และลำไส้ใหญ่มีสภาวะการดูดซึมน้ำต่ำ จึงเป็นการช่วยส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนมากขึ้น เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ จะเป็นประเภทที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และได้พลังงานมาจากการหมัก ซึ่งสารที่ได้จากการหมักมาจากการย่อยคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็ก เมื่ออาหารเคลื่อนที่มาสู่ตอนปลายของลำไส้ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโนที่เหลือ จะกลายเป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่

4. บทบาทของโพรไบโอติกด้านการป้องกันโรคและภูมิคุ้มกัน

ในผนังลำไส้มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี หรือเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ภายใต้เซลล์เยื่อผนังลำไส้ยังมีเยื่อเนื้อเยื่อ เรียกว่า Gut associated lymphoid tissue (GALT) เป็นเซลล์ทำหน้าที่สอดแนม (Sensor) สามารถบอกได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี ไม่ผลิตสารต้านทานมากำจัด แต่ถ้าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ก็จะสร้าง Secretory IgA ออกมากำจัดเชื้อดี มี

การยึดเกาะกับเยื่อผนังลำไส้ มีการสร้างเมือกหุดยับยั้ง แอ่งพื้นที่ในการเกาะจับของเชื้อก่อโรค บริเวณผนังลำไส้ นอกจากนี้ยังมีกระบวนการผลิตสารของเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเยื่อผนังลำไส้ (Bacterial epithelial cross talk) มีผลดังนี้ (Dawood and Koshio, 2016)

4.1 กระตุ้นการสร้างเยื่อเมือกให้ชั้นเยื่อเมือกหนาขึ้น และมีคุณภาพเฉพาะสำหรับล่อให้เชื้อไวรัสโรต้า (Pseudo receptor) จับแทน ๆ ที่จะจับที่เซลล์เยื่อผนังลำไส้

4.2 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้เคลื่อนไหวยังตำแหน่งที่เชื้อโรครุกล้ำเข้ามาสู่เจ้าบ้าน

4.3 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้จับกินแบคทีเรีย

4.4 ทำให้เนื้อเยื่อที่อักเสบบรรเทาลง

4.5 ซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บให้ฟื้นตัว

โพรไบโอติก จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของสัตว์ กลไกการกระตุ้นในสัตว์เกิดภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของสัตว์ยังไม่แน่นอนนัก แต่เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าโพรไบโอติกช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของสัตว์ ทั้งในแง่เพิ่มความต้านทานโรคโดยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific defence mechanisms) ของเจ้าบ้าน และในแง่การกระตุ้นทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) โดยโพรไบโอติกจะไปกระตุ้นการทำงานของ แมคโครฟาร์จ และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกินเซลล์ที่แปลกปลอม และกระตุ้นการทำงานของ Immunocompetent cell เช่น ลิมโฟไซต์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ Cell-mediated immune โดยไม่มีการหลั่ง Antibodies รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของ Secretory immune system โดยการหลั่ง Antibodies เช่น IgA ออกมาจับเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอมไม่ให้เกาะกับเซลล์ผนังลำไส้เล็กได้ (Bic Chemical Company Limited, 2012)

5. กลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียโพรไบโอติก

เมื่อสัตว์นำกินแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเข้าไป แบคทีเรียนั้นจะแพร่พันธุ์ และก่อตัวที่ผิวทางเดินอาหาร เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งสัตว์เข้าไปภายหลังเจริญ และเกาะที่ผนังลำไส้ได้ยากขึ้น โพรไบโอติกกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจะสร้างกรดอินทรีย์ และกรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลให้ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งผลดังกล่าวไม่เหมาะสมกับการคงตัวหรือการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (Gilliland and Speck, 1977; Tramer, 1966) แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Lactobacilli* สร้างแลคเทส และอะไมเลส (Sen and Chakrabary, 1984) ทำให้ร่างกายได้รับเอนไซม์มากขึ้น เป็นผลทำให้การย่อยอาหารดีขึ้นโดยมีการทำงานเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกันและกันของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร และกระบวนการย่อยอาหาร

โพรไบโอติกสามารถผลิตสารต้านการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ สารต้านเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่โพรไบโอติกผลิตขึ้นมา ได้แก่ Bacteriocins, Bacteriocin-like substances และสารยับยั้งอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และกรดอินทรีย์บางชนิด ตัวอย่างเช่น

Bacteriocins ที่จุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* สร้างขึ้น ออกฤทธิ์ในการทำละลายเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ส่วนกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดไขมันที่ระเหยได้ เช่น กรดแลคติก อะซีติก โพรพิโอนิก และบิวทีริก นอกจากจะช่วยลด pH ของลำไส้ และไส้ติ่งลง ให้ไม่เหมาะสมสำหรับการขยายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ใหม่แล้ว กรดที่ยังไม่แตกตัว ยังมีผลในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้ดี

จุลินทรีย์เป็นโพรไบโอติกสามารถสร้างวิตามินบี หลายชนิดในทางเดินอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น เนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ กรดอะมิโน การสร้างสารโปรตีน และยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โดยการให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์แรกเกิดจำนวนมาก อาจช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และช่วยกำจัด หรือควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค อีกทั้งเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจง โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดทางเดินอาหาร

6. การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

การทดสอบส่วนใหญ่เป็นการทดสอบกับโพรไบโอติกที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก โดยทดสอบความสามารถต่าง ๆ ดังนี้ (อัจฉรา และคณะ, 2547)

5.1 ความสามารถในการทนกรด-ด่าง

กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารต่าง ๆ ในร่างกาย จะให้คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นแหล่งของ H^+ ที่สำคัญที่สุดของร่างกาย เพราะมีการสร้างออกมาตลอดเวลา นอกจากนี้ในภาวะที่มีการอดอาหาร จะมีการสลายไขมันมาก มีการสร้างคีโตนบอดีมากขึ้น ทำให้ร่างกายเป็นกรดมาก การควบคุมภาวะกรด-ด่างด้วยวิธีทางเคมี หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าระบบบัฟเฟอร์ จะป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของร่างกาย ไม่ให้เปลี่ยนแปลงรวดเร็วเกินไป ประกอบด้วยกรดอ่อน เป็นคู่ ๆ ซึ่งจะแตกตัว (ionized) ได้เกลือของกรด หรือต่างอย่างเดียวกัน ทำให้กรดแก่หรือต่างแก่เจือจางลง สภาวะที่แบคทีเรียที่มีประโยชน์สามารถเพิ่มจำนวนและทำงานได้ดีคือ ที่ระดับความเป็นกรดเล็กน้อยที่ pH 5.9 ถึง 6.9 ซึ่งสภาวะนี้ถือว่าเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร (หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์, 2556) แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* จะช่วยสร้างกรดแลคติก ทำให้สภาพในลำไส้ใหญ่กลายเป็นกรด จึงควบคุมแบคทีเรียก่อโรคไม่ให้เจริญเติบโตมากเกินไป ทำให้สุขภาพของลำไส้ใหญ่ดีขึ้น เมื่อแบคทีเรียกินน้ำตาลเชิงซ้อนจะเกิดกรดไขมันสายสั้น ๆ ที่สำคัญได้แก่ กรดอะซีติก กรดโพรปรีโอนิก และกรดบิวทีริกเมื่อเป็นดังนี้ สภาพภายในลำไส้ใหญ่ก็จะกลายเป็นกรด ทำให้แบคทีเรียก่อโรคเจริญเติบโตไม่ได้ในขณะเดียวกันสภาพความเป็นกรดของลำไส้ใหญ่จะทำให้การดูดซึมของเกลือแร่สำคัญบางตัวเพิ่มมากขึ้นได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และธาตุเหล็ก เป็นต้น ทำให้กระดูกแข็งแรงขึ้น และมีผลต่อการสร้างเม็ดเลือด (ไบโอฟู้ด, 2556)

การได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกเข้าไปเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่โดยตรง ในลำไส้ใหญ่มีการยึดเกาะของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Escherichia coli* และ *Clostridium* ในสภาวะที่ร่างกายมีสุขภาพดี สัดส่วนของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ต้องมีอย่างน้อย 15 % และแบคทีเรียก่อโรค ต้องมีไม่เกิน 85 % โดยทั่วไปแบคทีเรียในลำไส้จะมีการควบคุมจำนวนซึ่งกันและกันไม่ให้แบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งมีมากเกินไป จนเป็นอันตรายต่อร่างกาย แต่ทั้งนี้ทั้งนั้น การควบคุมของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่อขึ้นอยู่กับอาหาร โดยเฉพาะปัจจุบันนี้พบว่าแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ในร่างกายมีจำนวนลดลง เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไป ก็มีผลต่อการควบคุมจำนวนของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ หรือสภาวะที่เรียกกันว่า ดิสไบโอซิส (Dysbiosis) (ไปโอฟูด, 2556)

5.2 การเกิด Hemolysis

Hemolysis คือ การแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นผลมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดจากการเหนียวน้ำ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Blood agar (ใช้จำแนกกลุ่มแบคทีเรีย) วิธีการนี้นิยมใช้จำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* หรือ *Staphylococcus* แบคทีเรียเหล่านี้ จะทำการสร้างสาร Hemolysin ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยปฏิกิริยาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้

5.2.1 Alpha hemolysis (α -hemolysis) เมื่อเม็ดเลือดแดงแตกจะมีสีเขียวคล้ำที่เกิดจากฮีโมไลซิน ทำปฏิกิริยากับ Blood agar มีการสร้าง Enzyme สำหรับเปลี่ยน Fe^{2+} ใน Hemoglobin ให้เป็น Fe^{3+} α hemolysis คือ Hemolyse แบบไม่สมบูรณ์เม็ดเลือดแดงไม่เกิดการแตกเหมือน β -hemolysis

5.2.2 Beta hemolysis (β -hemolysis) เม็ดเลือดแดงแตก เรียกว่าสภาวะเม็ดเลือดแดงแตกแบบสมบูรณ์คือ Hemolysis ที่สมบูรณ์ เซลล์ของเม็ดเลือดแดงจะมี Clear zone (สีเหลือง) รอบ ๆ โคโลนี เอนไซม์และท็อกซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย Streptolysin ซึ่งเป็นสาเหตุของการสลายแบบสมบูรณ์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

5.2.3 Gamma hemolysis (γ -hemolysis) คือ การ Hemolysis ไม่สมบูรณ์ เม็ดเลือดแดงแบบสลายไม่หมดก็เลยไม่เกิด Clear zone (Media and Biochem, 2012)

6. การใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

การเสริมโพรไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำ จะเป็นการช่วยรักษาระดับความสมดุลของจำนวนแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ทำให้ตัวอ่อนของสัตว์น้ำมีอัตราการรอดตาย และผลผลิตจากสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น (Villamil *et al.*, 2003) ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. มาใช้เป็นโพรไบโอติกมากขึ้น เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีโครงสร้างของสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดี อีกทั้งสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเจริญเติบโต (Green *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 2000; Oggioni *et al.*, 2003; Van Rijn *et al.*, 1995)

6.1 กรดแลคติกที่จุลินทรีย์สร้างจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและสร้างสารพิษ เช่น *Clostridium perfringens* และ *Salmonella* sp. ช่วยป้องกันและลดอาการของโรคติดเชื้อ (Infection) ในทางเดินอาหาร

6.2 ช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) และไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในเลือด โดย *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอลและยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้

6.3 ช่วยการดูดซึมอาหารในลำไส้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดอาการท้องผูก ได้เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ *Bifidobacteria* ผลิตขึ้นจะกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และช่วยเพิ่มความชื้นของอุจจาระทำให้สามารถขับถ่ายได้ดีขึ้น

6.4 สามารถผลิตวิตามินบี 1 บี 2 บี 6 บี 12 กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) และ กรดโฟลิก (Folic acid) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะภูมิแพ้ เสริมสร้างการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันได้

7. ตัวอย่างของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัส *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) แกรมบวก (Gram positive) และพบเป็นประชากรกลุ่มใหญ่ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มอื่นและยีสต์บางสายพันธุ์ก็อาจมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และตัวอย่างของโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Other lactic acid bacteria	Non-lactic acid bacteria
<i>L. acidophilus</i> (LA-5)	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Spore of <i>Bacillus cereus</i> “yoyoi”
<i>L. crispatus</i> (<i>L. acidophilus</i> “Gilliland)	<i>B. animalis</i> (<i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> BB-12)	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S.
<i>L. johnsonii</i> (LA1)	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>boudlardii</i>)
<i>L. gasseri</i> (PA 16/8)	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle 1917
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i> (BB536)		
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i> (SP 07/3)		
<i>L. plantarum</i> (299 and 299v)			
<i>L. rhamnosus</i> (LGG)			
<i>L. reuteri</i>			

ที่มา: ดัดแปลงจาก Holzapfel *et al.* (2001); de Vrese and Schrezenmeir (2008)

หมายเหตุ: ชื่อในวงเล็บคือชื่อทางการค้าของโพรไบโอติก

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ

ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดสัตว์น้ำ	เอกสารอ้างอิง
<i>B. subtilis</i> and <i>B. circulans</i>	ปลาชุกเทศ (<i>Labeo rohita</i>)	Bairagi <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus</i> spp.	กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว	Nimrat <i>et al.</i> (2012)
<i>B. subtilis</i>	ปลานิล	Telli <i>et al.</i> (2014)
<i>B. cereus</i> NY5 and <i>A. faecalis</i> Y311	ปลานิล	Wang <i>et al.</i> (2020)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ปลานิล	Maas <i>et al.</i> (2021)
<i>Blastocystis hominis</i> (E3)	กุ้งขาวแวนนาไม	Zuo <i>et al.</i> (2019)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	ปลาเรนโบว์เทราต์	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001)
<i>L. rhamnosus</i> JCM1136	ปลาเรนโบว์เทราต์ และปลานิล	Irianto and Austin (2002) และ Xia <i>et al.</i> (2018)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดสัตว์น้ำ	เอกสารอ้างอิง
<i>Lactobacillus</i> spp.	กึ่งกุลาคำ และกึ่งขาวแวนนาไม	Phianphak et al. (1999) และ Zuo et al. (2019)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM5805	ปลานิล	Xia et al. (2018)
<i>L. lactis</i> L19 and <i>Escherichia faecalis</i>	ปลาช่อน (<i>Channa argus</i>)	Kong et al. (2020)
<i>L. plantarum</i>	ปลาการ์ตูน (<i>Amphiprion ocellaris</i>)	Paixão et al. (2020)
	ปลาดูเดียว (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Jang et al. (2019)

Yanbo and Zirong (2006) ศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (โปรตีเอส อะไมเลส และไลเปส) ของปลาแคร์พ (*Cyprinus carpio*) เสริมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและ *Bacillus* sp. ในอาหารปลาแคร์พ 3 สูตร หลังจากการทดลองให้อาหาร 60 วัน พบว่าอาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารเฉลี่ยของกลุ่มที่เสริมด้วยโพรไบโอติกทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม โพรไบโอติกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารได้สูง และส่งผลให้ค่า FCR ต่ำ นอกจากนี้ การใช้โพรไบโอติกที่แตกต่างกันสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน และส่วนผสมที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด

Abd El-Rhman et al. (2009) ได้คัด แยก สาย พันธุ์ *Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas* จากอวัยวะสืบพันธุ์และลำไส้ของปลานิล เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหาร ต่อประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลานิล โดยทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* พบโซนของการยับยั้ง (Inhibition zone) เท่ากับ 4 และ 9 เซนติเมตรตามลำดับ เสริมโพรไบโอติกลงในอาหาร โปรตีน 30% เป็นเวลา 90 วัน พบว่า อาหารเสริม *M. luteus* มีอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการรอดตายที่ดีที่สุด รวมทั้งความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* มากที่สุด สรุปได้ว่า *M. luteus* ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลา

Telli et al. (2014) ศึกษาผลของอาหารเสริมโพรไบโอติก *Bacillus subtilis* ต่อโลหิตวิทยา และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล ที่เพาะเลี้ยงในความหนาแน่นต่างกัน โดยใช้แบบจำลองแบบแฟคทอเรียล 2x2 ที่ความหนาแน่นสองความหนาแน่น 18.75 และ 62.50 ตัว/m² และอาหาร 2 สูตร (ควบคุมและผสมโพรไบโอติก 10⁶ CFU/g) ทดลองให้อาหาร 84 วัน พบว่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตระหว่างปลาที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นทั้ง 2 แบบ พบความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่องค์ประกอบของร่างกาย ระดับของคอร์ติซอล และระดับกลูโคส ระหว่างชุดควบคุมและชุดที่เสริมโพรไบโอติก ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

Standen *et al.* (2016) ศึกษาผลของการอาหารเสริมโพรไบโอติกเชิงพาณิชย์ AquaStar® ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยเสริมโพรไบโอติก AquaStar® ในอาหารปลานิลที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 29.02 ± 0.33 g แบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (CON), เสริมโพรไบโอติก 1.5 g/kg (PRO-1.5), เสริมโพรไบโอติก 3 g/kg (PRO-3), เสริมโพรไบโอติก มีชีวิต (PRO-PULSE) และเสริมโพรไบโอติกในระยะเริ่มต้นตามด้วยการควบคุม (PRO-INI) เพาะเลี้ยงปลานิลเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชุดการทดลอง PRO-3 มีน้ำหนักเพิ่มเพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Srisapome and Areechon (2017) ประยุกต์ใช้ *Bacillus pumilus* AQAHBS01 ที่แยกได้จากฟาร์มปลานิลในการเป็นโพรไบโอติก ทั้งทดสอบในห้องปฏิบัติการและในฟาร์ม การทดลองในห้องปฏิบัติการ ให้อาหารเสริม *B. pumilus* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^7 ถึง 1×10^9 CFU/kg ส่งผลการตอบสนองภูมิคุ้มกัน (กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม และ Superoxide anion) ของปลาเพิ่มขึ้น การต้านทานต่อโรค *Streptococcus agalactiae* มีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อนำไปใช้ทดสอบเลี้ยงในกระชัง โดยให้อาหารเสริม *B. pumilus* ที่ 1×10^8 และ 1×10^9 CFU/kg สามารถเพิ่มความต้านทานต่อโรค *S. agalactiae* ในขณะที่ปลาในกลุ่มควบคุมและปลาที่ได้รับอาหารเสริม *B. pumilus* ที่ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^7 CFU/kg พบอัตราการตายจากเชื้อ *S. agalactiae* สูง อย่างไรก็ตาม สำหรับการเพาะเลี้ยงในกระชัง มีความผันผวนของคุณภาพน้ำ ทำให้ปลามีความอ่อนไหวต่อปัญหาจากโรคติดเชื้อมากขึ้น

Jang *et al.* (2019) ศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหาร ต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร และความสามารถต้านทานการเกิดโรคในปลาลิ้นหมา (*Paralichthys olivaceus*) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (ไม่มีโพรไบโอติก) กลุ่มที่เสริม *Bacillus* sp. SJ-10 1×10^8 CFU/kg (ProB) และ *Lactobacillus plantarum* 1×10^8 CFU/kg (ProL) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ หลังการทดลองให้อาหาร พบว่า ในกลุ่มที่เสริม *Bacillus* sp. SJ-10 1×10^8 CFU/kg มีความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Chao1) และความหลากหลาย (Shannon) เท่ากับ 484.80 ± 88.75 และ 5.08 ± 0.17 OTUs พบแบคทีเรียในไฟลัม Proteobacteria, Actinobacteria และ Acidobacteria มากขึ้น กิจกรรมของทริปซินและไลเปสสูงขึ้นทั้งในกลุ่มที่เสริม *Bacillus* sp. SJ-10 1×10^8 CFU/kg และกลุ่ม *Lactobacillus plantarum* 1×10^8 CFU/kg และสามารถต้านทานเชื้อ *Streptococcus iniae* โดยพบว่ามียอัตราการรอดตายสูงเมื่อเสริมด้วยโพรไบโอติก

พรีไบโอติก (Prebiotic)

พรีไบโอติกเป็นสารประกอบพอลิโกลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน สามารถผ่านไปสู่บริเวณลำไส้ใหญ่ได้ในสภาพที่สมบูรณ์ มีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกในลำไส้และส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้าน (Gibson and Roberfroid, 1995) พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ จะพบได้ในพืชผักผลไม้หลายชนิด เช่น หัวหอม กล้วย กล้วยไฟซ์ ถั่วกระเทียม อาร์ติโชก (Artichoke) ชิโครี (Chicory) และหน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus) เป็นต้น และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อย Polysaccharides เช่น แป้ง (ธารารัตน์, 2542) พรีไบโอติกที่เป็นที่รู้จักและมีการใช้กันมานานก็คือ น้ำตาลสายสั้น (Oligosaccharides) ซึ่งมีกลูโคส (Glucose) กาแลคโตส (Galactose) และฟรุคโตส (Fructose) รวมทั้ง เอ็น-อาเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) เป็นองค์ประกอบ ด้วยโครงสร้างซึ่งซับซ้อนทำให้เอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กไม่สามารถย่อยสลายและดูดซึมได้ แต่สารพรีไบโอติกจะกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Gibson and Roberfroid, 1995) จากการศึกษาที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกย่อยสารกลุ่มนี้จะได้สารบางชนิดที่เป็นประโยชน์ซึ่งร่างกายนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น กรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid, SCFA) และผลจากการย่อยทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในลำไส้ลดลง ผลดังกล่าวยังช่วยลดและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Morisse *et al.*, 1993) ซึ่งในลำไส้ใหญ่มีแบคทีเรียอยู่ 2 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (Beneficial bacteria) เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* กลุ่มที่สองคือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic bacteria) เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella* และ *Clostridium* (เฉลิมขวัญ และมัลลิกา, 2548)

1. ประเภทของสารพรีไบโอติก

สารที่ถูกจัดจำแนกเป็นพรีไบโอติกได้นั้น จะต้องมียุทธลักษณะอย่างน้อย 3 ประการคือ สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก และสามารถเคลื่อนที่ไปจนถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง สารนั้นจะต้องจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ เช่น บีฟิโดแบคทีเรีย และผลจากการหมักสารนั้นควรทำให้เกิดการกระตุ้นที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นโทษได้ (Gibson *et al.*, 2004; Kolida *et al.*, 2002) โดยสามารถแบ่งประเภทของพรีไบโอติกได้ (เฉลิมขวัญ และมัลลิกา, 2548) ดังนี้

1.1 น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Alcohol sugar) จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโครงสร้างหรือดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (Degree of polymerization; DP) เพียง 1-2 ตัว ตัวอย่างสารในกลุ่ม

นี้เช่น มอลทิทอล (Maltitol) ซอร์บิทอล (Sorbitol) ไอโซมอลต์ (Isomalt) และไซลิตอล (Xylitol) เป็นต้น

1.2 แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (Resistant starch) เป็นแป้งหรือผลิตภัณฑ์แป้งที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) ซึ่งจะไม่ถูกดูดซับในลำไส้เล็กซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะและแหล่งที่มาได้ 3 ประเภทคือ แป้งที่มีลักษณะทางกายภาพขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (Physically inaccessible starch; RS1) เม็ดแป้งดิบที่ทนทานต่อการทำงานของเอนไซม์ (Rawstarch granules; RS2) และแป้งคืนตัว (Retrograded starch; RS3)

1.3 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Non-starch polysaccharides; NSP) เป็นสารที่ได้รับจากพืช เช่น เพคติน (Pectin) เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัวกัม (Guar gum) และไซแลน

1.4 อินนูลิน (Inulin) เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตให้กับพืช พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น ชิคอร์รี เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม และกล้วย เป็นต้น

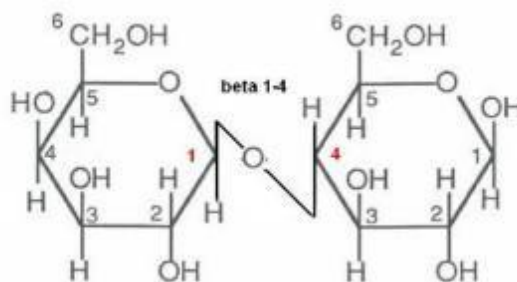
1.5 มิวซิน (Mucin) ถูกสร้างโดยกอบเล็ทเซลล์ (Goblet cells) ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในลำไส้

1.6 มิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (Mucopolysaccharides) ตัวอย่างเช่น คอนดรอยน ดินซัลเฟต (Chondroitin sulphate) และเฮพาริน (Heparin) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้

1.7 โปรตีนและเปปไทด์ (Protein and peptides) สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหาร สร้างโดยการหลั่งของตับอ่อนหรือสร้างโดยแบคทีเรีย แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรต

1.8 น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Sugar and oligosaccharides) สำหรับพรีไบโอติกในกลุ่มนี้จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น (Short-chain polysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ถึง 20 หน่วย ตัวอย่างเช่น แรฟฟิโนส (Raffinose) และสแตคีโอส (Stachyose) ซึ่งจัดเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ย่อยยาก (Non-digestible oligosaccharide; NDOs) (สุพจน์, 2552) นอกจากนี้ยังมี

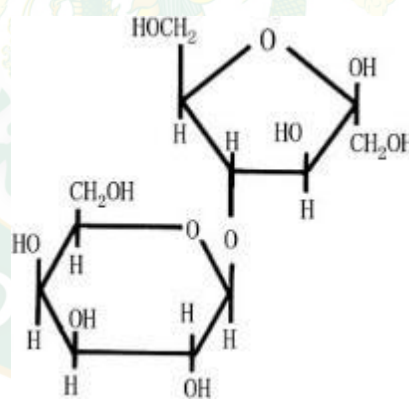
1.8.1 แลคโตส (Lactose) เป็นน้ำตาลตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides) ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาล กลูโคส (Glucose) และน้ำตาลกาแลคโทส (Galactose) (Swallow, 2003; เปี่ยมสุข, 2551; สุรเกียรติ, 2549) ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลแลคโตส

ที่มา: Edgar181 (2009)

1.8.2 แลคตูโลส (Lactulose) ผลิตจากน้ำตาลแลคโตส มีโครงสร้างอยู่ในรูป Gal β , 1-4 Fru แสดงดังภาพที่ 7 มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อย และไม่ละลายในอีเทอร์ซึ่งแลคตูโลสจะไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้เล็กแต่จะเกิดการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ และมีผลให้จำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้เพิ่มขึ้น (Terada *et al.*, 1992)



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลแลคตูโลส

ที่มา: Seki and Saito (2012)

1.8.3 ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเชิงซ้อน สังเคราะห์ได้จากน้ำตาลซูโครส (Sucrose) โดยใช้เอนไซม์ทรานสฟรุคโตซิลเลส (Transfructosylase) ซึ่งมีโครงสร้างของกลูโคส (Glucose) เชื่อมกับฟรุคโตส (Fructose) 2-4 หน่วย แสดงดังภาพ 8 มักพบในหัวชิคอรี่ (Chicory roots) (สุญาณี, 2549) นอกจากนี้ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์

ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ แต่จะถูกหมักย่อยโดยจุลินทรีย์บริเวณลำไส้ใหญ่ ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่ก่อให้เกิดโรคโดยการผลิตกรดไขมันสายโซ่สั้น ส่งผลให้ความเป็นกรดต่างในลำไส้ลดลง ทำให้เกิดความไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Ross, 1999)

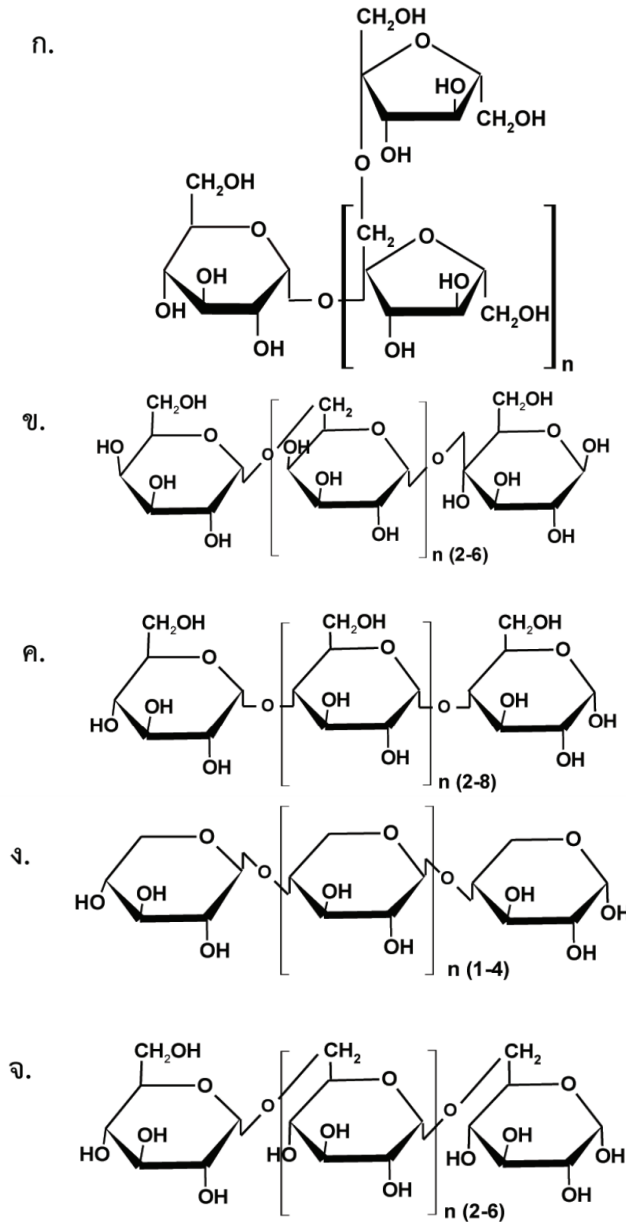
1.8.4 กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Galacto-oligosaccharide, GOS) ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบซึ่งโครงสร้าง แสดงดังภาพที่ 8 พบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากแลคโตส ได้เอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -Galactosidase) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ (Non-digestible oligosaccharide) จึงสามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยที่ถูกลดและดูดซึมจึงถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวเทน และมีก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีผลไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacili (Tzortzis *et al.*, 2005)

1.8.5 แมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Mannan oligosaccharide: MOS) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งซึ่งมีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ แสดงดังภาพที่ 8 ไม่ถูกย่อยทำลายได้โดยกรดหรือด่าง แต่จะถูกย่อยได้โดยเอนไซม์แมนนาเนสที่หลังจากแบคทีเรียหรือเชื้อราเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสเฟต Songsiriritthigul *et al.* (2010) ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มความแข็งแรงของกล้ามเนื้อในระบบทางเดินอาหาร ลดการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เพิ่มอัตราส่วนความสูงวิลโลตอความลึกของคริปและเพิ่มปริมาณของเซลล์ (Goblet) จึงช่วยหลังเมือกออกมาป้องกันลำไส้จากจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซึมดีขึ้น (Ferket *et al.*, 2002)

1.8.6 ไชโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Xylooligosaccharides; XOS) เป็นพรีไบโอติกเนื่องจากเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก แสดงดังภาพที่ 8 โดยไชโลโอลิโกแซ็กคาไรด์มีโครงสร้างที่แข็งแรงสามารถทนต่อสภาวะกรดและเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร (Aachary and Prapulla, 2011)

1.8.7 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomaltooligosaccharide) เป็น โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส แสดงดังภาพที่ 8 ประกอบด้วยน้ำตาลไอโซมอลโตส (Isomaltose) พาโนส (Panose) ไอโซมอลโตไตรออส (Isomaltotriose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์จัดให้เป็นสารพรีไบโอติก ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ (Kuriki *et al.*, 1993)

1.8.8 กลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Glucooligosaccharides) เป็นน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์
ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ในระหว่างการหมัก (Maina *et al.*, 2013)



ภาพที่ 8 โครงสร้างของพรีไบโอติกประเภทโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ

- ก. ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS)
- ข. กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (GOS)
- ค. มอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (MOS)
- ง. ไชโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (XOS)
- จ. ไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (IMO)

2. คุณสมบัติของพรีไบโอติก

การใช้พรีไบโอติกในสัตว์น้ำช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพรีไบโอติกต่อร่างกาย เนื่องจากพรีไบโอติกเป็นจุลินทรีย์เจ้าถิ่นที่อาศัยอยู่ในระบบการย่อยอาหาร โดยเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมสุขภาพดีแก่สิ่งมีชีวิต โดยพรีไบโอติกส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Lactobacillus* sp. และเชื้อ *Bifidobacteria* sp. มักพบได้ทั่วไปในระบบการย่อยอาหาร และสามารถหมักเกิดกรดแลคติกและกรดไขมันสายสั้น ๆ นอกจากนี้พรีไบโอติกบางชนิดสามารถผลิตสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial compounds) เช่น แบคเทอริโอซิน เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นโทษต่อร่างกาย เช่น *Clostridium* sp. (Thammarutwasik *et al.*, 2009) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายและสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นโทษต่อร่างกายได้ และยังช่วยในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ ภายในลำไส้และมีความคงทนต่อความเป็นกรดและน้ำดีในลำไส้เล็ก (Tokunaga *et al.*, 1993) นอกจากนี้อินนูลินและโอลิโกฟรุคโตสสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดี (Meyer and Stasse-Wolthuis, 2009)

3. ประโยชน์ของสารพรีไบโอติก

3.1 ช่วยกระตุ้นการเจริญของอินนูลินและโอลิโกฟรุคโตส โดยเฉพาะ *Bifidobacterium* ช่วยป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ และป้องกันอาการท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อ

3.2 กรดแลคติกที่จุลินทรีย์สร้างจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและสร้างสารพิษ เช่น *Clostridium perfringens* และ *Salmonella* sp. ช่วยป้องกันและลดอาการของโรคติดเชื้อ (Infection) ในทางเดินอาหาร

3.3 ช่วยลดระดับของคอเลสเตอรอล (Cholesterol) ฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) และไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในเลือด โดย *L. acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอลและยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้

3.4 ช่วยการดูดซึมอาหารในลำไส้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดอาการท้องผูกได้เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์บีโอดีแบคทีเรียผลิตขึ้นจะกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และช่วยเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้สามารถขับถ่ายได้ดีขึ้น

3.5 สามารถผลิตวิตามินบี 1 บี 2 บี 6 บี 12 กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) และกรดโฟลิก (Folic acid) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะภูมิแพ้ เสริมสร้างการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันได้

4. กลไกการทำงานของพรีไบโอติก

4.1 เลือกระบวนการเจริญเติบโตและการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ โดยกลไกช่วยในการเลือกทำงาน 2 กลไก คือ

4.1.1 การแก่งแย่งเพื่อขจัดออก (Competitive exclusion, CE) ถูกย่อยได้โดยเอนไซม์จำเพาะ อาทิ เอนไซม์ β -fructosidase และ β -galactosidase เป็นต้น (สารโรซ, 2547)

4.1.2 จับเกาะกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถยึดเกาะกับเยื่อผนังลำไส้ได้ จึงถูกขจัดออกไป (Aniansson *et al.*, 1990)

4.2 กระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพรีไบโอติกทำปฏิกิริยากับ Protein receptors บนผนังเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันของเยื่อผนังลำไส้ ยังส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น (Chesson, 1993; Savage *et al.*, 1997)

4.3 เพิ่มจำนวนของเซลล์ Goblet ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเยื่อเมือก (Mucins) ของผนังลำไส้เล็กช่วยป้องกันลำไส้จากการติดเชื้อ (Savage *et al.*, 1997)

4.4 การยับยั้งมะเร็งโดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์และการต้านอนุมูลอิสระ (Chorvaticova *et al.*, 1999; Križková *et al.*, 2001)

5. ประโยชน์ของการใช้พรีไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำ

5.1 เป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นที่มีอยู่ในธรรมชาติ จึงไม่มีผลข้างเคียงเรื่องสารพิษตกค้างหรือก่อโรค (สารโรซ, 2547)

5.2 ทนทานต่ออุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตอาหาร และทนทานต่อความเป็นกรดในกระเพาะ จึงใช้ได้ง่ายไม่ต้องกังวลเรื่องการถูกทำลาย หรือจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดก่อนที่จะออกฤทธิ์ในตัวสัตว์ (สารโรซ, 2547)

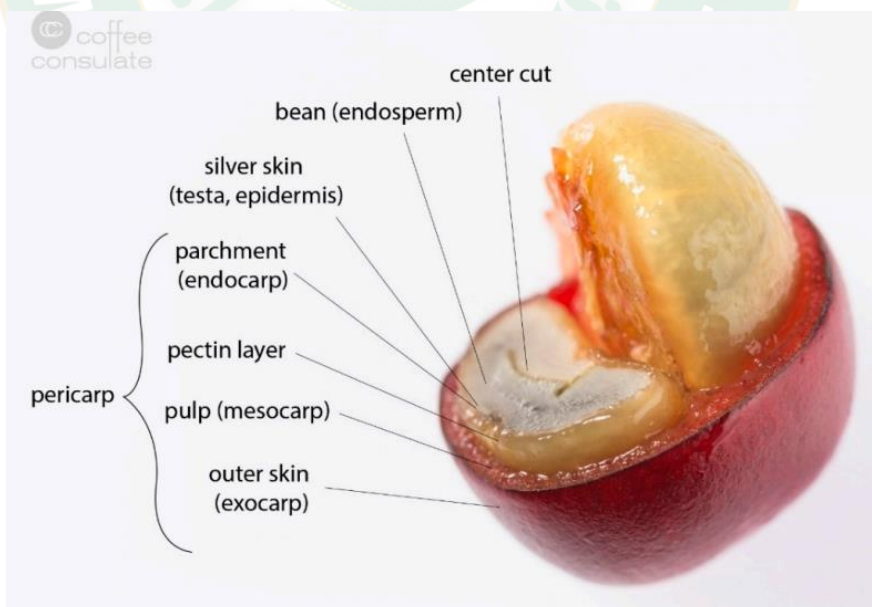
5.3 การใช้สารพรีไบโอติก ลดการย่อยโปรตีนในลำไส้ใหญ่ โดยไบโอดีแบคทีเรียและแลคโตบาซิลัส มีเอนไซม์สลายโปรตีนกลุ่ม Azoreductase, Nitroreductase, Nitrate reductase และ β -glucuronidase ต่ำ จึงสลายโปรตีนให้เกิดสารพิษกลุ่มแอมโมเนีย อินโดล (Indoles) และฟีนอล (Phenol) ลดลง ทำให้โอกาสที่สารพิษเหล่านี้จะก่อให้เกิดการหลุดลอกของเยื่อผนังลำไส้ใหญ่อันเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ลดลง (Swanson *et al.*, 2002) นอกจากนี้การเสริมพรีไบโอติกในสูตรอาหารสามารถช่วยลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียในมูลได้ (ศุภวันจักรี, 2545)

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟอะราบิก้า (*Coffea arabica* silver skin)

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ (ภาพที่ 9) ที่ห่อหุ้มในส่วนของเมล็ดกาแฟ (แสดงดังภาพที่ 10) เป็นผลพลอยได้จากการคั่วกาแฟ (Pourfarzad *et al.*, 2013)



ภาพที่ 9 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee Silver Skin)



ภาพที่ 10 ส่วนประกอบของเมล็ดกาแฟ

ที่มา: Klingel *et al.* (2020)

อนุกรมวิธานของกาแฟ (กาญจน์มณี และคณะ, 2547)

ชั้น (Class) Dicotyledoneae

ชั้นย่อย Sympetalea หรือ Metachlamydeae

อนุกรม (Order) Rubiales

วงศ์ (Family) Rubiaceae

สกุล (Genus) *Coffea*

ชนิด (Species) *Coffea arabica*

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟอุดมไปด้วยไฟเบอร์ โปรตีนและสารต้านอนุมูลอิสระ (Machado *et al.*, 2020) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยอาหารสูง ประมาณ 60% (โดยเฉพาะเส้นใยที่ละลายน้ำได้) ประกอบด้วยน้ำตาลเซลลูโลส 18% และเฮมิเซลลูโลส 13% (ได้แก่ ไฮโลส 4.7%, อะราบิโนส 2.0%, กาแลคโตส 3.8% และแมนโนส 2.6%) โปรตีนประมาณ 20% และสารต้านอนุมูลอิสระ (Bessada *et al.*, 2018; Borrelli *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2014; Jiménez-Zamora *et al.*, 2015; Narita and Inouye, 2012) ปริมาณไขมันอยู่ในระดับต่ำ (มักต่ำกว่า 3% ซึ่งประกอบด้วย ไตรกลีเซอรอลเป็น, กรดไขมันอิสระ, Esterified sterols, Free sterols และไดกลีเซอรอล) เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟกับผลพลอยได้จากกาแฟอื่น ๆ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างคงที่เนื่องจากมีความชื้นต่ำกว่า (5-7%) (Bessada *et al.*, 2018; Narita and Inouye, 2012) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งแร่ธาตุ 8% (ได้แก่ โพแทสเซียม 5% แมกนีเซียม 2% และแคลเซียม 0.5%) (Costa *et al.*, 2018) ปัจจุบันถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงและสำหรับใช้เป็นปุ๋ยในดิน อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยหลายงานรายงานว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถสกัดและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง และมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Jiménez-Zamora *et al.*, 2015) และสารประกอบทางชีวภาพที่สำคัญอื่น ๆ ที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ คือ กรดคลอโรจีนิก (1-6%) ระดับคาเฟอีนอยู่ในช่วง 0.8-1.4% ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ (Bessada *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2018; Napolitano *et al.*, 2007) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (Antioxidant activity) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ระหว่างกระบวนการคั่ว ได้แก่ เมลานอยดิน 17-23% กรดคลอโรจีนิกและผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวด้วยความร้อนของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟจะมีส่วนร่วมในการก่อตัวของเมลานอยดินพร้อมกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (กาแลคโตแมนแนนส และ อลาบิโนกาแลคแทน) และโปรตีน (Bessada *et al.*, 2018)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

Component	Coffee silver skin				
	A*	B*	C*	D*	E*
Protein (g/100 g)	18.6±0.6	18.6±0.3	15.4±0.2	18.8±0.3	17.3±1.8
Fat (g/100 g)	2.2±0.1	2.2±0.5	4.6±0.0	2.4±0.1	2.1±0.4
Moisture (g/100 g)	7.3±0.4	7.1±0.2	5.4±0.2	4.8±0.1	N.A.
Mineral (Ash) (g/100 g)	7.0±0.4	7.0±0.2	7.6±0.0	8.3±0.0	5.4±0.9
Carbohydrate (g/100 g)	62.1±1.6	65.1±1.2	66.9±0.4	N.A.	62.7±5.9
Total dietary fiber (g/100 g)	62.4±0.6	62.4±0.5	N.A.	56.4±0.7	61.6±5.2
Phenolic content (g GAE/100 g)	N.A.	N.A.	0.4±0.1	N.A.	N.A.
Antioxidant activity (µmol trolox/g)	19.2±0.0	N.A.	18.9±0.8	N.A.	N.A.
Caffeine (g/100 g)	N.A.	N.A.	1.0±0.1	1.25±0.3	N.A.
Chlorogenic acid (mg/100 g)	N.A.	N.A.	N.A.	246±0.2	N.A.
Total polyphenols (% dry matter)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	17.3±1.7

หมายเหตุ * อ้างอิงจาก Borrelli *et al.* (2004) (A), Pourfarzad *et al.* (2013) (B), Ateş and Elmaci (2018) (C), Costa *et al.* (2018) (D) and Jiménez-Zamora *et al.* (2015) (E).

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ กับแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเช่น *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* (Rodrigues *et al.*, 2015 อ้างใน Bessada *et al.*, 2018) ในการทดสอบประสิทธิภาพของพรีไบโอติก ยาด้านจุลชีพ สารต้านอนุมูลอิสระจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ และเน้นกิจกรรมด้านจุลชีพของเมลานอยดินสกัดจากกากกาแฟที่ใช้แล้ว ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเมลานอยดินในกาแฟมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือยับยั้งกิจกรรมแบคทีเรีย นอกจากนี้สารประกอบที่มีอยู่ตามธรรมชาติในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ เช่น กรดคลอโรจีนิก และคาเฟอีน สามารถทำงานร่วมกันเพื่อต่อต้านแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อการก่อตัวของคราบฟัน โดยรวมแล้วเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ อาจมีการประยุกต์ใช้ที่มีแนวโน้มในโรคติดเชื้อที่ผิวหนังหรือแม้กระทั่งเป็นสารกันบูดสำหรับสูตรเครื่องสำอางขั้นสุดท้าย (Jimenez-Zamora *et al.*, 2015 อ้างใน Bessada *et al.*, 2018)

เพอร์ตัน และคณะ (2559) ศึกษาการใช้พรีไบโอติก Fructooligosaccharide (FOS) เสริมในอาหารทดลองต่อประสิทธิภาพการเติบโต ความทนทานต่อความเครียดและความต้านทานเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในลูกปลานิลแดง ใช้อาหารทดลอง 4 สูตร ได้แก่ รำละเอียดผสมปลาป่นในอัตราส่วน 1 : 2 เป็นอาหารควบคุม ส่วนอาหารอีก 3 สูตร ได้แก่ อาหารที่เสริมด้วย FOS 0.1%, 0.3% และ 0.5% ของน้ำหนักอาหารอนุบาลลูกปลานิลแดง (0.45 ± 0.01 g) ในกระชังอัตราการ

ปล่อย 150 ตัวต่อตารางเมตร ให้อาหาร 5% ของน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราแลกเนื้อ (FCR) ความทนทานต่อความเครียดและความต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* ของลูกปลานิลแดงที่อนุบาลด้วยอาหารที่เสริม FOS 0.3% และ 0.5% ดีกว่าอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Tiengtam *et al.* (2015) ศึกษาผลของอินนูลินและแก่นตะวัน (JA) (*Helianthus tuberosus*) เป็นสารพรีไบโอติก ผสมอาหารลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) หลังเลี้ยงปลาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมอินนูลินมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม และปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม JA มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด ($p < 0.05$) อาหารเสริมอินนูลิน และ JA ช่วยเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดแดง หลังการตรวจสอบสารเคมีในเลือดจำนวน 14 ชนิด พบว่าอาหารเสริมอินนูลิน และ JA ช่วยทำให้ปริมาณกลูโคส อัลบูมิน โปรตีน แมกนีเซียม แคลเซียม และธาตุเหล็กเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) การเสริมอินนูลิน 5 g/kg ช่วยปรับปรุงการทำงานของไลโซไซม์ ในขณะที่การเสริม JA ในอาหาร ช่วยเพิ่มปริมาณอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด กิจกรรมของไลโซไซม์ การศึกษานี้บ่งชี้ว่าอินนูลิน 5 g/kg และการเสริม JA 10 g/kg มีผลดีต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของลูกปลานิล ดังนั้นทั้งอินนูลินและแก่นตะวันจึงมีศักยภาพที่ดีในการใช้เป็นพรีไบโอติกในอาหารปลา

Abu-Elala *et al.* (2018) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการเสริมพรีไบโอติกจากผนังเซลล์ยีสต์ในอาหารคุณค่าทางโภชนาการและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยเสริมอาหารด้วยผนังเซลล์ยีสต์ Immunowall® 0%, 0.1% และ 0.2% ทดลองเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าอัตราการเจริญเติบโต จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ปริมาณโปรตีนรวม และความเข้มข้นของโกลบูลินเพิ่มขึ้นในชุดที่เสริม Immunowall® ในขณะที่พารามิเตอร์ภูมิคุ้มกัน เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ Biomarkers (Catalase และ Glutathione-reductase) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง (เช่น กิจกรรม Phagocytic ดัชนี Phagocytic และกิจกรรม Lysozyme) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (เช่น TNF-a และ IL-1b) สูงขึ้นในชุดการทดลองที่เสริม Immunowall® 0.2% อีกทั้งยังช่วยลดอัตราการตายหลังจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ด้วย *Lactococcus graviae* และ *Aeromonas hydrophila* ดังนั้นการเสริม Immunowall® ในอาหารเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตปลาได้อย่างยั่งยืน

Jiménez-Zamora *et al.* (2015) ศึกษาการปรับปรุงผลิตภัณฑ์เศษเหลือจากกระบวนการผลิตกาแฟ ในการใช้เป็นพรีไบโอติกที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพและสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าผลของกากกาแฟ (CSG) และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (CS) สามารถเป็นพรีไบโอติกที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพและสารต้านอนุมูลอิสระในสัตว์น้ำ เช่นเดียวกับ Melanoidins (ส่วนประกอบของกากกาแฟที่เกิดในระหว่างกระบวนการคั่ว) นอกจากนี้ผลของกากกาแฟ และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ยังมีสารต้านอนุมูล

อิสระสูง ต่อมาในปี พ.ศ. 2559 กัลยาณี และคณะ ได้ศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และผลต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ สารสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถยับยั้งเชื้อ *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella choleraesuis* ได้โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อยู่ในช่วง 250-500 g/l นอกจากนี้เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในกลุ่ม *Lactobacillus spp.* และ *Bifidobacteria spp.*

Fatmawati and Lamid (2020) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกในการหมักเปลือกกาแฟ (*Coffea sp.*) ที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและเส้นใยเพื่อใช้เป็นอาหารปลา โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล ใช้โพรไบโอติก 0%, 1%, 3% และ 5% พบว่าการใช้โพรไบโอติกในการหมักเปลือกกาแฟ (*Coffea sp.*) โดยใช้โพรไบโอติก 5% หมัก 7 วัน ให้ผลดีที่สุด โดยมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 12.15% เป็น 13.93% และปริมาณเส้นใยลดลงจาก 34.27% เป็น 30.8% โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ($p < 0.05$)

ซินไบโอติก (Synbiotic)

ซินไบโอติก คือการรวมกันของพรีไบโอติกและโพรไบโอติก ซึ่งมีผลเสริมฤทธิ์กันโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคและเสริมสร้างการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตที่เป็นประโยชน์ (Plotnikoff and Dusek, 2018) ในขณะที่ Gibson and Roberfroid (1995) ได้นำเสนอแนวคิดของพรีไบโอติกขึ้นมาเป็นครั้งแรก ได้นำเสนอแนวคิดของอาหารสุขภาพอีกชนิดขึ้นมาด้วย ที่เป็นการนำทั้งโพรไบโอติกและพรีไบโอติกมาผสมกัน เรียกว่า “ซินไบโอติก” และได้ให้นิยามของซินไบโอติกไว้ว่า “ส่วนผสมของโพรไบโอติกและพรีไบโอติกที่ส่งผลดีต่อเจ้าบ้าน โดยการปรับปรุงอัตราการรอดและการปลูกถ่ายของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในทางเดินอาหาร โดยการคัดเลือกกระตุ้นการเจริญเติบโตและ/หรือโดยการกระตุ้นการเผาผลาญของแบคทีเรียส่งเสริมสุขภาพจำนวนหนึ่งหรือจำนวนจำกัด”

จะเห็นได้ว่า เป้าหมายของการใช้ประโยชน์จากซินไบโอติกนั้น ยังคงมุ่งเป้าไปที่การส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคผ่านการกระตุ้นให้เกิดสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ แต่รายละเอียดที่เพิ่มเติมขึ้นมาคือซินไบโอติกเป็นของผสม (Mixture) ระหว่างโพรไบโอติก และพรีไบโอติก อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ทุกชนิดที่มีส่วนประกอบทั้งสองนี้แล้วจะถูกรับรองว่าเป็นซินไบโอติกได้ โดยพรีไบโอติกที่เลือกมาใช้นั้น จะต้องมีความจำเพาะเจาะจง (Specific หรือ Selectively favor) กับโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่นำมาใช้เท่านั้น และแต่ละองค์ประกอบต้องมีในปริมาณที่เหมาะสม

1. คุณสมบัติของซินไบโอติก

การใช้ซินไบโอติกมีผลกระทบต่อเจ้าบ้านโดยการส่งเสริมการอยู่รอดและการดูดซึมของสารอาหารเสริมจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในทางเดินอาหาร โดยการกระตุ้นการเจริญเติบโต การเผาผลาญอาหารของแบคทีเรียรวมถึงส่งเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำ (de Vrese and Schrezenmeir, 2008)

2. ประโยชน์ของซินไบโอติกที่ใช้กับสัตว์น้ำ

2.1 เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปลา การเติบโตเจริญเติบโต และองค์ประกอบของร่างกาย (Geng *et al.*, 2011)

2.2 ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยอาหารของปลา การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารจะช่วยให้เจ้าบ้านย่อยสลายสารอาหารมากขึ้น เพิ่มการย่อยอาหาร ส่งเสริมอัตราการเพิ่มของน้ำหนัก และประสิทธิภาพการกิน (Cerezuela *et al.*, 2011)

2.3 ส่งผลต่อพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีของปลา

2.4 เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันปลา (Lindsay, 1986) ได้แก่ กิจกรรม Alternative complement pathway activity กิจกรรม Superoxide dismutase กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรม Respiratory burst

2.5 เพิ่มความต้านทานโรคในปลา (Cerezuela *et al.*, 2011)

2012

et al., 2011)

(5)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของซินไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ

ชนิดสัตว์น้ำ	ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดพรีไบโอติก	อ้างอิง
กุ้งขาวแวนนาไม (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Galactooligosaccharide (GOS) β -glucan β -glucan and MOS	Huynh <i>et al.</i> (2018) Wongsasak <i>et al.</i> (2015) Yao <i>et al.</i> (2021)
ปลาเทราท์ (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Galactooligosaccharide (GOS) Fructooligosaccharide (FOS)	Hoseinifar <i>et al.</i> (2015) Mehrabi <i>et al.</i> (2012)
ปลาไหลญี่ปุ่น (<i>Anguilla japonica</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> WB60	Mannanooligosaccharide (MOS)	Lee <i>et al.</i> (2018)
ปลาตาเดียว (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	<i>Bacillus</i> sp. SJ-10	β -glucanooligosaccharides	Hasan <i>et al.</i> (2018)
ปลาโตโต้บา (<i>Totoba macdonaldi</i>)	<i>Bacillus</i> spp. (Aquablend®)	Yeast-based (GroBiotic®-A)	González-Félix <i>et al.</i> (2018)
ปลาร้อยคตึง (<i>Sebastes schlegelii</i>)	<i>Pediococcus acidilactici</i> MA18/5M	Galactooligosaccharide	Rahimnejad <i>et al.</i> (2017)
ปลาลิ้นเสือ (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	<i>Bacillus clausii</i>	FOS, MOS	Ye <i>et al.</i> (2011)
ปลาอีสกเทพ (<i>Labeo rohita</i>)	<i>Bacillus circulans</i> PB7 <i>Bacillus subtilis</i>	Fructooligosaccharide (FOS) Galactooligosaccharides (GOS)	Singh <i>et al.</i> (2019) Devi <i>et al.</i> (2019)
ปลานวลจันทร์เทศ (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	<i>Bacillus subtilis</i>	Mannanooligosaccharide (MOS)	Kumar <i>et al.</i> (2018)
ปลาไน (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Fructooligosaccharide (FOS) β -glucan and MOS	Dehaghani <i>et al.</i> (2015) Mohammadian <i>et al.</i> (2019)
ปลาช่อน (<i>Channa striata</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	β -glucan, GOS, MOS	Munir <i>et al.</i> (2016)
ปลาหมอแดง (<i>Oreochromis</i> spp.)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	β -glucan, GOS, MOS	Munir <i>et al.</i> (2018)
ปลานิล	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Lactobacillus plantarum</i> CR115DBA® (<i>Bifidobacterium</i> sp.) <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Enterococcus faecium</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Jerusalem artichoke Xylooligosaccharide MOS and chitosan β -glucan	Sewaka <i>et al.</i> (2019) Van Doan <i>et al.</i> (2020) Cavalcante <i>et al.</i> (2020) Dawood <i>et al.</i> (2020)

Ai *et al.* (2011) ศึกษาผลของอาหารเสริมซินไบโอติก *Bacillus subtilis* และ FOS ต่อการเจริญ อัตราการรอด การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน และการต้านทานโรคในปลากวดเหลือง (Juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*) ทดลองโดยเติม *B. subtilis* 3 ระดับ (0.0, 0.42×10^7 และ 1.35×10^7 CFU/kg) และ FOS 3 ระดับ (0, 0.2 และ 0.4% ของน้ำหนักแห้ง) พบว่าชุดการทดลองที่เติม *B. subtilis 0.42×10^7 CFU/kg มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ อัตราการรอด และ Hepatosomatic index (HIS) สูงที่สุด และสรุปได้ว่าอาหารเสริมซินไบโอติกทำให้ปลามีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ กิจกรรมไลโซไซม์ และกิจกรรม SOD เพิ่มขึ้น ในขณะที่อัตราการตายลดน้อยลง*

Hassaan *et al.* (2014) ศึกษาผลของซินไบโอติกระหว่าง *Bacillus licheniformis* และ Yeast extract ต่อการเจริญเติบโต ลักษณะทางโลหิตวิทยาและดัชนีทางชีวเคมีของปลานิล โดยเติม *B. licheniformis* 4 ระดับ (0.0, 0.24×10^6 , 0.48×10^6 และ 0.96×10^6 CFU/g) และ Yeast extract 3 ระดับ (0, 0.5 และ 1% น้ำหนักแห้ง) ทดลองกับปลานิลขนาดประมาณ 5.99 ± 0.03 g เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เสริมซินไบโอติกช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพในการใช้อาหารของสัตว์ (FE) ดียิ่งขึ้น โดยชุดการทดลอง *B. licheniformis* 0.48×10^6 CFU/g และ Yeast extract 1% มีประสิทธิภาพในการใช้อาหารของสัตว์ที่ดีที่สุด ลักษณะทางโลหิตวิทยา ปริมาณโปรตีนรวม และอัลบูมินของปลานิลมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เอนไซม์ Aspartate aminotransferase และ Alanine aminotransferase มีค่าลดลง

Lee *et al.* (2018) ผลเสริมฤทธิ์ของการเสริมซินไบโอติกในอาหารด้วย *Bacillus subtilis* WB60 และ mannanoligosaccharide (MOS) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในปลาไหลญี่ปุ่น *Anguilla japonica* โดยเสริม *B. subtilis* (0.0, 0.5×10^7 และ 1.0×10^7 CFU/kg) และ MOS (0 และ 5 CFU/kg) และสูตรอาหารที่เติม Oxytetracycline (OTC) 5 g/kg เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการให้อาหาร อัตราการเจริญเติบโต เฉพาะ และอัตราส่วนประสิทธิภาพโปรตีนของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* 0.5×10^6 CFU/kg และเติม MOS 5 g (BS0.5M5) และปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* 1×10^6 CFU/kg และเติมไม่เติม MOS 5 g (BS1M5) สูงกว่าอาหารที่เลี้ยงด้วยชุดควบคุมที่ไม่เติมซินไบโอติก

Hasan *et al.* (2018) ศึกษาผลการเสริมฤทธิ์กันของโพรไบโอติก *Bacillus sp.* SJ-10 และพรีไบโอติก β -glucan oligosaccharides ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลาลิ้นหมามะกอก (*Paralichthys olivaceus*) หลังเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชุดการทดลองที่เสริมโพรไบโอติก พรีไบโอติก และซินไบโอติกทำให้ปลามีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (WG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการแลกเนื้อ (FCR) และอัตราส่วนประสิทธิภาพของโปรตีน (PER) พารามิเตอร์ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่

Respiratory burst, SOD และกิจกรรมไลโซไซม์ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากทดสอบความต้านทานการติดเชื้อ *S. iniae* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/ml พบว่า ชุดการทดลองที่เสริมซินไบโอติก มีอัตราการรอดตายสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Munir *et al.* (2018) ศึกษาผลของพรีไบโอติกและโพรไบโอติกในอาหาร ต่อการตอบสนองทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ของลูกปลาช่อน (*Channa striata*) เลี้ยงด้วยอาหารเสริมด้วยพรีไบโอติกเชิงพาณิชย์ 3 ชนิด (β -glucan 0.2%, GOS 1% และ MOS 0.5%) โพรไบโอติก 2 ชนิด (*Saccharomyces cerevisiae* 1% และ *Lactobacillus acidophilus* 0.1%) หลังให้อาหารทดลอง พบว่า การเสริมพรีไบโอติกและโพรไบโอติกในอาหารทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว เพอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงต่อปริมาณเลือดทั้งหมด ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ระดับโปรตีนในซีรัม และกิจกรรมของไลโซไซม์ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ 2×10^6 CFU/ml พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโพรไบโอติก *L. acidophilus* มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Devi *et al.* (2019) ศึกษาผลของการเสริมด้วยซินไบโอติก *Bacillus subtilis* และ GOS ต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ สารต้านอนุมูลอิสระ ความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) พบว่า อัตราการเจริญเติบโตและการย่อยอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการตายต่ำมากหรือไม่มีเลยในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมซินไบโอติก กิจกรรม Phagocytic ในซีรัม กิจกรรมไลโซไซม์ และกิจกรรม SOD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบอัตราการตายในกลุ่มที่ติดเชื้อ และเลี้ยงด้วยอาหารเสริมซินไบโอติก

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase enzyme)

เซลลูเลส (Cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส พืช หอยบางชนิด ได้แก่ *Helix pomatia* (West *et al.*, 1968) และจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ ฟังไจ และแอคติโนไมซีต สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์นี้ในทางอุตสาหกรรม เพื่อใช้ผลิตสารที่เป็นประโยชน์ดังกล่าวข้างต้น และศึกษาในจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากการย่อยสลายเซลลูโลสอาศัยการทำงานขอเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ จะมีข้อได้เปรียบมากกว่า การใช้วิธีการทางเคมี นั่นคือจุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์เพื่อไฮโดรไลซ์เป็นกลูโคสในปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง และไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายเซลลูโลส ส่วนทางเคมีนั้น นอกจากจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการแล้วน้ำตาลบางส่วนที่เกิดขึ้นสูญเสียไปกับการทำปฏิกิริยาโดยกรด

1. ชนิดและลำดับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาช่วยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เป็นกลุ่มของเอนไซม์ (Multiple enzymes) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ (จารุวรรณ, 2538)

1.1 Endo- β -1,4-glucan glucohydrolase หรือ Endo- β -1,4-glucanase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปแบบที่เป็นระเบียบ (Crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของ Cellooligomer ที่ตำแหน่งพันธะ β -1,4 แบบสุ่มทำให้ได้ Oligomer และเซลโลไบโอส

1.2 Exo- β -1,4-glucan cellobiohydrolase หรือ Exo- β -1,4 cellobiohydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ Endo- β -1,4-glucanase ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยย่อยจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส

1.3 β -glucosidase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของ Cellobiose และ Cellooligosaccharide ให้กลูโคส

1.4 Exo- β -1,4-glucan glucohydrolase หรือ Exo- β -1,4-glucosidase เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่แยกหน่วยกลูโคสออกจากปลายด้าน Non-reducing ของเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสโดยตรงโดยไม่เกิดเซลโลไบโอส กลไกการย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสได้น้ำตาลกลูโคส

2. ชนิดและตำแหน่งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ 3 ชนิด

2.1 Endoglucanase (C_x) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ และยังย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (Reducing end) ของสายโซ่เซลลูโลส

2.2 Exoglucanase (C) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส

2.3 β -glucosidase (C_b) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส

โดยพบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ต้องทำงานร่วมกัน จึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง

3. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น สามารถอธิบายได้ดังนี้ คือ β -glucosidase (C_b) จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคส ซึ่งจะมีผลยับยั้งต่อเนื่อง ทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Endoglucanase (C_x) และ Exoglucanase (C_c) ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและหยุดปฏิกิริยาในที่สุด (ฉัตรชัย และศุภกานต์, 2548)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร

เอนไซม์ย่อยอาหารสามารถสร้างจากอวัยวะในท่อทางเดินอาหาร (Digestive tract) ได้แก่ ปาก (Mouth) หลอดอาหาร (Esophagus) กระเพาะอาหาร (Stomach) และลำไส้เล็ก (Small intestine) หรืออวัยวะช่วยย่อยอาหาร (Accessory organ) ได้แก่ ตับอ่อน (Pancreas) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) หรือไพโลริกซีคา (Pyloric caeca) โดยปลาแต่ละกลุ่มจะมีการปรับตัวด้านโครงสร้างของระบบย่อยอาหารให้สอดคล้องกับพฤติกรรมการกินอาหาร (Vuthiphandchai, 1993) นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยอาหารมีบทบาทสำคัญต่อการเติบโตและการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางโภชนาการ การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และพฤติกรรมการกินอาหาร (การุณ และอุทัยวรรณ, 2555)

1. การสร้างเอนไซม์ย่อยอาหาร

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate digesting enzymes) ที่ศึกษากันมากในสัตว์น้ำ คือ อะไมเลส การสร้างเอนไซม์ดังกล่าวในปลากินพืช และปลากินพืชและเนื้อ (Omnivorous fish) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์ในผนังกระเพาะอาหาร ผนังลำไส้ ตับอ่อน ตับ และเฮพาโตแพนแครีเอส (Hepatopancreas) หรือไพโลริกซีคา (Pyloric caeca) ขณะที่ปลากินเนื้อมักสร้างจากตับอ่อนและส่งมายังลำไส้ อย่างไรก็ตาม อะไมเลสในปลากินเนื้ออาจพบในกระเพาะอาหาร เนื่องจากการปนเปื้อนของอาหารจากการหดตัวของลำไส้เล็ก (Natalia *et al.*, 2004) หรือได้รับจากอาหารที่ปลากินเข้าไป (Munilla-Morán and Saborido-Rey, 1996)

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยไขมัน (Lipid digesting enzymes) ชนิดหลัก คือ ไลเปส การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในกระเพาะอาหารมีค่าต่ำกว่าในลำไส้ เนื่องจากกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดสูง จึงมีหน้าที่เพียงผสมไขมันเพื่อส่งเข้าลำไส้เท่านั้น หลังจากนั้นไลเปสจากตับอ่อน (Pancreatic lipase) และจากลำไส้ (Intestinal lipase) จะย่อยต่อ ทำให้โมเลกุลของไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์

(Triglycerid) แตกตัวเป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ซึ่งจะถูกลดซึมไปใช้ต่อไป

เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzymes) มีการสร้างมาจากหลายอวัยวะ เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ตับอ่อน ตับและตับอ่อน หรือไพโลริกซีกา โดยอะซิดิกโปรตีเอสมีกสร้างจากกระเพาะอาหาร และทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง เช่น เปปซิน (Pepsin) (Lazo *et al.*, 2007; Natalia *et al.*, 2004) ขณะที่อัลคาไลน์โปรตีเอส เช่น ทริปซิน และไคโมทริปซิน พบว่าสร้างมาจากตับอ่อนหรือไพโลริกซีกา และจะทำงานในลำไส้เล็กซึ่งมีสภาวะเป็นเบส รายละเอียดเกี่ยวกับอวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหารแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อวัยวะย่อยอาหารที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ (*) และอวัยวะที่เกิดการย่อยอาหาร (**)

Organ	Digestive Enzyme
Stomach*, **	Pepsin
Pancreas* (Small Intestine)**	Amylase, Carboxypeptidase, Chymotrypsin, Lecithinase, Lipase, Polynucleotidase, Trypsin,
Small Intestine*, **	Aminopeptidase, Dipeptidase, Maltase, Sucrase

2. เอนไซม์ย่อยอาหาร

เอนไซม์ย่อยอาหารที่ย่อยสารชีวโมเลกุลหลักซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและการเติบโตของสัตว์น้ำ ที่นิยมศึกษา ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส ไลเปส โปรตีเอส ทริปซิน และไคโมทริปซิน

2.1 แอลฟาอะไมเลส (α -Amylase)

เอนไซม์ที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกลูโคสและมอลโตส โดยย่อยแบ่งที่ตำแหน่ง α -1,4 Glycosidic Bond ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของอะไมเลสจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต (Areekijserree *et al.*, 2006; Supannapong *et al.*, 2008; Thongprajukaew *et al.*, 2010) (แอลฟาอะไมเลสทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน กิจกรรมของอะไมเลสในปลาหลายชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุ (Lazo *et al.*, 2007; Thongprajukaew *et al.*, 2010) และกิจกรรมของเอนไซม์มีความแปรผันเนื่องจากพฤติกรรมการกินอาหาร และเพศ

2.2 ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ที่ช่วยย่อยไขมันโดยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมัน โมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลให้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน หรือ

กลีเซอรอลไลเปส ทำงานร่วมกับน้ำดี (Bile salt) ซึ่งทำให้ไขมันแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ก่อนที่จะเกิดการย่อยทางเคมี (Chemical digestion) ไลเปสทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงด่าง กิจกรรมของไลเปสในปลากินเนื้อมีความสูงกว่าปลากินพืชและสัตว์และปลากินพืช เนื่องจากอาหารธรรมชาติ ส่วนใหญ่ของปลากินเนื้อจะมีไขมันในปริมาณมาก (Thongprajukaew *et al.*, 2010) รวมทั้งปลาอาจได้รับเอนไซม์จากอาหารที่กินเข้าไป (Kolkovski, 2001) การศึกษาระดับการแสดงออกของไลเปสในปลาวัยอ่อน พบว่ามีความสัมพันธ์กับการสลายไขมันเพื่อใช้ในการเปลี่ยนแปลงเมตาโมर्फอซิส (Metamorphosis) ขณะที่ในปลาวัยเจริญพันธุ์ ความแตกต่างของรูปแบบไลเปสในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีอิทธิพลมาจากเพศ (Thongprajukaew *et al.*, 2010)

2.3 โปรติเอส (Proteases)

กลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีน เพื่อนำกรดอะมิโนมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม โปรติเอสมีการแสดงออกได้หลายรูปแบบ เนื่องจากประกอบด้วยหลายไอโซฟอร์มซึ่งทำงานได้ดีในสภาวะที่มี pH และอุณหภูมิต่างกัน (Supannapong *et al.*, 2008; Natalia *et al.*, 2004; Thongprajukaew *et al.*, 2010) โปรติเอสมีบทบาทสำคัญในปลากินเนื้อและปลากินพืชและเนื้อ สำหรับในปลากินพืชการกระตุ้นการแสดงออกของอะไมเลส พบว่าสามารถช่วยส่งเสริมการแสดงออกของโปรติเอสได้ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) โปรติเอสแต่ละชนิดมีความจำเพาะในการตัดสายพอลิเพปไทด์ในตำแหน่งต่างกัน การแสดงออกของโปรติเอสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ (Areekijserree *et al.*, 2006) และมีอิทธิพลของเพศเข้ามาเกี่ยวข้อง (Thongprajukaew *et al.*, 2010)

กิจกรรมของโปรติเอสในปลาวัยอ่อนมีความสำคัญต่อการกินอาหารในช่วงแรก การสลายไขมัน และการย่อยอาหารของกระเพาะ การศึกษาพัฒนาการของโปรติเอสในปลากัด พบว่าอะซิดิกโปรติเอสมีบทบาทหลักในการย่อยโปรตีนเมื่อปลาอยู่ในวัยอ่อนขณะที่อัลคาไลโปรติเอสมีบทบาทหลักเมื่อปลาเริ่มอายุมากขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของทริปซินและไคโมทริปซิน (Thongprajukaew *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม การใช้โปรติเอสเพื่อประเมินการเติบโตในสัตว์น้ำ มักได้ผลที่มีการตอบสนองต่ำ เนื่องจากมีรูปแบบการแสดงออกที่ทับซ้อนกันของทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งมีบทบาทต่อการควบคุมการเติบโตในทิศทางที่ตรงกันข้าม (Chan *et al.*, 2008; Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006)

2.4 ทริปซิน (Trypsin)

เอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (Trypsinogen) ไคโมทริปซิโนเจน (Chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส (Procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (Proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้

(Active enzyme) ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) และอีลาสเตส (Elastase) ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษากิจกรรมของทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Supannapong *et al.*, 2008)

กิจกรรมของทริปซินมีการศึกษากันมาก เนื่องจากบทบาทของทริปซินมีความสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำ แต่ละช่วงวัย ดังต่อไปนี้

2.4.1 พัฒนาการก่อนระยะฟักตัว (Prehatching stage) ทริปซินมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างไข่แดง (Yolk formation) สลายไข่แดง (Yolk degradation) การสร้างเอ็มบริโอ (Embryogenesis) และการฟักตัวของลูกปลา กิจกรรมของทริปซินมีความสำคัญต่อการสลายโปรตีนเพื่อแบ่งตัวสร้างเซลล์และอวัยวะใหม่ ทำให้การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในเซลล์ไข่มีค่าสูงกว่าในเซลล์ร่างกาย

2.4.2 พัฒนาการหลังระยะฟักตัว (Posthatching stage) ถึงวัยอ่อน (Larval stage) การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินในสัตว์น้ำวัยอ่อนมีอิทธิพลมาจากอุณหภูมิการฟักไข่และอุณหภูมิน้ำ ปริมาณโปรตีนในอาหาร (Wang *et al.*, 2020) และการอดอาหาร การศึกษากิจกรรมของทริปซินในสัตว์น้ำวัยอ่อนมีความสำคัญมาก เนื่องจากสัตว์น้ำในระยะนี้ปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้น้อยรวมทั้งระบบทางเดินอาหารยังทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพทำให้สัตว์น้ำมีการตายสูง ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในสัตว์น้ำวัยอ่อนจึงอาจแก้ปัญหาจุดวิกฤติของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ การศึกษาในปลาวัยอ่อนพบว่ากิจกรรมของทริปซินมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากถูกฟักออกจากไข่ และมีค่าลดลงเมื่อสัตว์น้ำมีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึม และหลังจากนั้นกิจกรรมจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ (Thongprajukaew *et al.*, 2010)

2.4.3 พัฒนาการของสัตว์น้ำ วัยเจริญพันธุ์ กิจกรรมของทริปซินมีความผันแปรกับอุณหภูมิ (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) อายุและเพศ (Thongprajukaew *et al.*, 2010) หรือสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศที่ต่างกัน การแสดงออกของทริปซินในสัตว์น้ำมีอิทธิพลมาจากปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ คุณภาพของอาหาร แสง การแสดงออกของยีนและการได้รับฮอร์โมน และระบบภูมิคุ้มกัน (Andrés *et al.*, 2010)

2.5 ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin)

เอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นของทริปซิน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7–10 (Natalia *et al.*, 2004; Rungruangsak-Torrissen and Fosleidengen, 2007; Thongprajukaew *et al.*, 2010) ไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อชนิดของสารตั้งต้น และสามารถตัดพันธะเอไมน์ และเอสเทอร์ได้เช่นเดียวกับทริปซินโดยตัดพันธะเปปไทด์หลังกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นวงแหวน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ทริปโทเฟน ไทโรซีน และกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น เมทไธโอนีน สารยับยั้งการทำงานของไคโมทริปซิน คือ Tosyl phenyl alanine chloromethyl ketone (TPCK) และ

Chymostatin การศึกษากิจกรรมของโคโมทริบซินมักทำควบคู่กับทริบซินตั้งแต่ก่อนระยะพักตัวถึงวัยเจริญพันธุ์ การศึกษาในสัตว์น้ำ พบว่าการแสดงออกโคโมทริบซินมีผลต่อการเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับทริบซิน โดยกิจกรรมของโคโมทริบซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตเติบโตช้าหรือถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ (Chan *et al.*, 2008; Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006)

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ระบบภูมิคุ้มกันปลามีลักษณะไม่ซับซ้อนเหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น มนุษย์ กระต่ายหรือหนู (Swain and Nayak, 2009) อวัยวะของปลาที่ทำหน้าที่สร้างภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ต่อมไทมัส ไตส่วนหน้าและม้าม (Mulero *et al.*, 2007; Press and Evensen, 1999) โดยอวัยวะเหล่านี้จะเริ่มพัฒนาหลังไข่ได้รับการปฏิสนธิ (Petrie-Hanson and Ainsworth, 2001) แต่ลำดับการพัฒนาการจะแตกต่างกันระหว่างปลาน้ำจืด น้ำกร่อยและปลาทะเล

ระบบภูมิคุ้มกันของปลามีทั้งแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ โดยแต่ละระบบประกอบด้วยระบบการทำงานโดยเซลล์และสารน้ำ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะหรือภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดมีความสำคัญมากในการป้องกันการติดเชื้อของปลา กลไกของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ ได้แก่ ผิวหนัง เซลล์เนื้อเยื่อบริเวณผิว เหงือก ชั้นของเมือก เซลล์ที่มีลักษณะพิเศษ เช่น แมคโครฟาจ (Macrophage) แกรนูโลไซต์ (Granulocyte) และเซลล์พิฆาตตามธรรมชาติ (Natural killer cell) (Aoki *et al.*, 2008) นอกจากนี้ ยังมีสารน้ำชนิดต่าง ๆ เช่น ไลโซไซม์ (Lysozyme) สารที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาจับกลุ่มหรือแอกกลูตินิน (Agglutinin) สารที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitin) เอนไซม์ในการย่อยสลายแบคทีเรีย (Antibacterial lytic enzymes) ทรานส์เฟอริน (Transferrin) คอมพลีเมนต์ (Complement) และอินเตอร์เฟอรอน (Interferon) (Ewart *et al.*, 2001)

คุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลานิล

คุณสมบัติของน้ำที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงปลา นับว่ามีความสำคัญเพราะเป็นปัจจัยในการดำรงชีวิตของปลา หากปลาได้อาศัยอยู่ในน้ำที่มีคุณสมบัติมีความเหมาะสม ก็จะทำให้ปลาดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นปกติ การเจริญเติบโตดี มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากโรค และปรสิต ดังนั้น การเลี้ยงปลาให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงนั้น ควรคำนึงถึงการจัดการให้น้ำในบ่อมีคุณสมบัติที่ดี และมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปลาเป็นสำคัญ สำหรับคุณสมบัติของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิลดังนี้ (นฤมล, 2550)

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน ที่มีอยู่ในน้ำในบ่อเลี้ยงปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง เนื่องจากแพลงก์ตอนพืช และพืชน้ำมีการสังเคราะห์แสง ทำให้มีผลต่อการเลี้ยงปลาโดยตรง คือทำให้ปลาไม่เติบโต และตายได้ ช่วงความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลอยู่ในช่วง 6.5 - 8.3

2. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)

ออกซิเจนละลายในน้ำจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจ และออกซิเจนยังช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในน้ำ ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความเค็ม การสังเคราะห์แสง การหายใจ ถ้าสัตว์น้ำ พืชน้ำ และพรรณไม้น้ำมีปริมาณหนาแน่นมาก ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ความสามารถในการละลายของออกซิเจนในน้ำลดลง ในหนึ่งวันปริมาณออกซิเจนในบ่อปลามีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ในกลางวันพืชน้ำและแพลงก์ตอนพืชมีการสังเคราะห์แสง จึงทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ส่วนเวลากลางคืนออกซิเจนในน้ำจะถูกใช้ในกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิตในน้ำเป็นส่วนใหญ่ จึงมีผลทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงในเวลากลางคืน

3. อุณหภูมิ (Temperature)

ปลานิลเป็นสัตว์เลือดเย็น ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิในร่างกายให้คงที่ได้ เมื่อน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกะทันหัน จะทำให้ปลาช็อคตายได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิลจะอยู่ในช่วง 25-32 °C

4. ความกระด้างของน้ำ (Hardness)

เกิดจากปริมาณของเกลือแคลเซียม และแมกนีเซียมที่ละลายอยู่ในน้ำทั้งหมดซึ่งปริมาณเกลือเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ น้ำในบ่อปลานิลควรมีความกระด้างอยู่ที่ 15-300 mg/l ถ้าในบ่อเลี้ยงปลามีค่าความกระด้างต่ำกว่า 5 mg/l จะทำให้ปลาเจริญเติบโตช้า เจริญ และตายได้

5. ความเป็นด่าง (Alkalinity)

ความเป็นด่างของน้ำประกอบด้วย คาร์บอเนต ไบคาร์บอเนต และไฮดรอกไซด์ เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งไม่มีพิษต่อปลา แต่เป็นตัวช่วยควบคุมไม่ให้น้ำมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง อย่างรวดเร็ว ค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลานิลมีค่าอยู่ระหว่าง 25-500 mg/l

6. ความเค็ม (Salinity)

ความเค็มของน้ำมีผลต่อระบบควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกายของปลา การเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำอย่างกะทันหันทำให้ปลาตายได้ ปลานิลเป็นปลาที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความเค็ม 0-25 ppt

7. สารประกอบไนโตรเจน (แอมโมเนีย และไนไตรท์)

สารประกอบที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ แหล่งของสารประกอบไนไตรท์ในน้ำส่วนใหญ่มาจากสารอินทรีย์ ซึ่งเกิดจากขบวนการเน่าสลายของเศษอาหารที่เหลือ แผลงก์ตอนที่ตาย เศษซากพืชซากสัตว์ สารอินทรีย์อื่นๆ โดยจุลินทรีย์และปล่อยแอมโมเนีย ไนไตรท์ สู่ในบ่อเลี้ยงซึ่งความเป็นพิษของแอมโมเนีย ปริมาณแอมโมเนียรวมในบ่อปลานิลไม่ควรเกิน 0.5 mg/l และไนไตรท์ไม่ควรเกิน 0.1 mg/l

8. ฟอสฟอรัส (Phosphorus)

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช หากมีปริมาณมากเกินไป ส่งผลให้พืชน้ำและแพลงก์ตอนเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้ออกซิเจนในน้ำในเวลากลางวัน แต่ลดลงมากในเวลากลางคืน ส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดภาวะขาดออกซิเจนได้ ดังนั้นในบ่อปลานิลไม่ควรมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูงกว่า 0.6 mg/l

9. ความโปร่งแสง (Transparency)

ความโปร่งแสงของบ่อปลา สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงได้ น้ำที่มีความอุดมสมบูรณ์จะมีความโปร่งแสงน้อย ในบ่อปลานิลควรอยู่ในช่วง 30-60 cm

10. ความขุ่น (Turbidity)

เกิดจากตะกอนแพลงก์ตอน โคลนตม ฝุ่นละออง และสารอินทรีย์ต่างๆในบ่อปลา ทำให้แสงส่องผ่านลงไปใต้น้ำได้น้อย ทำให้พืชน้ำสังเคราะห์แสงได้น้อย และยังเข้าไปอุดตันที่ซี่เหงือกของปลา ขัดขวางการแลกเปลี่ยนออกซิเจนที่เหงือกปลา การวัดค่าความขุ่นค่อนข้างยุ่งยากแก่ผู้ปฏิบัติงานในฟาร์ม จึงหันมาใช้ค่าความโปร่งแสงแทน ทำการวัดโดยใช้แผ่นเซคซี เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 cm หย่อนลงไปใบบ่อจนถึงความลึกที่มองไม่เห็นแผ่น โดยความขุ่นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลานิลควรอยู่ในช่วง 30-60 cm

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการแยกเชื้อจุลินทรีย์โปรโตติก
 - 1.1 ปรานิลว้ยอ่อน
 - 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 1.2.1 MRS (Lactobacilli MRS Broth) ยี่ห้อ Himedia®
 - 1.2.2 TSA (Tryptic Soy Agar) ยี่ห้อ Himedia®
 - 1.2.3 TSB (Tryptic Soy Broth) ยี่ห้อ Himedia®
 - 1.3 หัวงเชื้อรูปวงกลม (Loop)
 - 1.4 หลอดทดลอง
 - 1.5 หลอดไมโครเซนตริฟูกพลาสติก (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml ยี่ห้อ Eppendorf
 - 1.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
 - 1.7 Cork borer ขนาด 0.5 ซม.
 - 1.8 น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
 - 1.9 น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
 - 1.10 ขวดเก็บตัวอย่างดินและน้ำ
 - 1.11 ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Nichiryo
 - 1.12 ทิป ยี่ห้อ Nichiryo
 - 1.13 เครื่องมือผ่าตัด
 - 1.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 1.15 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท WTB binder รุ่น 78532 Tuttlingen/Germany
 - 1.16 เครื่องชั่งดิจิตอล ความละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius รุ่น AC2115
 - 1.17 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Becthai รุ่น Hirayama
 - 1.18 เครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน (Hot plate)
 - 1.19 ตู้เขี่ยเชื้อ Lamina (Holten) รุ่น HVR 2448

2. เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการหมักเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

- 2.1 เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟจากบริษัทฮิลล์คอฟฟ์
- 2.2 เอนไซม์เซลลูเลส
 - 2.2.1 Cellusoft® L Ultra conc บริษัท โนวัวไซม์ (ประเทศไทย) จำกัด
 - 2.2.2 Cellusoft® CR conc บริษัท โนวัวไซม์ (ประเทศไทย) จำกัด
- 2.3 ยาปฏิชีวนะ Ampicillin (AMP)
- 2.4 ขวดรูปخمพู่
- 2.5 สำลี
- 2.6 เครื่อง Shakers Incubator (ยี่ห้อ JEIO TECH รุ่น BS-06)
- 2.7 เครื่องแช่แข็ง หรือ Freezer

3. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และทดสอบความเป็นพรีไบโอติกจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

- 3.1 วิเคราะห์หาสารฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin Ciocalteu's assay ดัดแปลงจาก Noridayu *et al.* (2011)
- 3.2 วิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric acid method ดัดแปลงจาก (Miller, 1959)
- 3.3 วิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid method ดัดแปลงจาก Apiraksakorn *et al.* (2008)
- 3.4 วิเคราะห์หาน้ำตาลกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ โดยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง
- 3.5 ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค
 - 3.5.1 เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก ได้แก่ *Bacillus subtilis* (อุตมลักษณะ และจีรพร, 2556)
 - 3.5.2 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* จากห้องแลปปฏิบัติการโรคปลา คณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 - 3.5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium (K_2HPO_4 0.3 g + KH_2PO_4 0.1 g + Yeast extract 1.0 g + Peptone 1.0 g + $MgSO_4$ 0.2 g + $(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml ปรับ pH 7.00)
 - 3.5.4 ตู้ป่มเชื้อ (Incubator) บริษัท WTB binder รุ่น 78532 Tuttlingen/ Germany
 - 3.5.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.5.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Chuphotic รุ่น PLUTO-Plus

4. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนในตู้กระจก

- 4.1 ลูกพันธุ์ปลานิลขนาด 0.5-0.7 g/ตัว
- 4.2 ตู้ปลาขนาด 25 x 50 x 30 m³
- 4.3 ป้อน้ำ Sonic AP 2500
- 4.4 ป้อน้ำเติมอากาศ ยี่ห้อ
- 4.5 หัวทราย
- 4.6 สายออกซิเจน
- 4.7 สายยางดูดน้ำ
- 4.8 ตะกร้าขนาด 20 x 28 x 8 cm³
- 4.9 ไยแก้วกรองน้ำ
- 4.10 ไปโอบอล
- 4.11 กะละมัง
- 4.12 สวิง
- 4.13 ปลั๊กไฟ
- 4.14 อาหารกบสำเร็จรูป โปรตีน 45%
- 4.15 อาหารปลานิลสำเร็จรูป โปรตีน 25%

5 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงปลานิลในกระชัง

- 5.1 บ่อดินขนาด 30x10 m ลึก 1.8 m
- 5.2 กระชังขนาด 1x1 m
- 5.3 ลูกปลานิลขนาด 0.5-0.7 g/ตัว
- 5.4 เชือก
- 5.5 ปูนขาว
- 5.6 ไดโว่สูบน้ำ
- 5.7 อาหารกบสำเร็จรูป โปรตีน 45%
- 5.8 อาหารลูกปลานิลสำเร็จรูป โปรตีน 25%

5.9 เครื่อง Nano-microbubble (MNB generator) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทางศูนย์ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการประยุกต์ใช้ไฟฟ้าแรงสูงพลาสมาและไมโครนาโนบับเบิล เพื่อการเกษตร

และประมงชั้นสูง เป็นรุ่น ECO-KMV120-9HAQR00 ขนาด 400 W อัตราการไหลของน้ำ 100 L/นาที่ ความดัน 0.06 MPa

5.10 กระชอนตักปลา

6. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ ตามวิธีการมาตรฐานของ (APHA, 1998)

6.1 อุณหภูมิ น้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำกระแสไฟฟ้า (Conductivity) และค่าออกซิเจนละลาย (Dissolved oxygen) ด้วยเครื่อง Multifunction meter CX-461

6.2 ค่าความโปร่งแสง (Transparency) ด้วยแผ่นเซคซี

6.3 ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solid) ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) และค่าความกระด้าง (Hardness) วิเคราะห์หาค่าโดยการไตเตรท

6.4 แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen: $\text{NH}_3\text{-N}$) โดยวิธี Phenate method

6.5 ไนไตรท์-ไนโตรเจน (Nitrite nitrogen: $\text{NO}_2^-\text{-N}$) โดยวิธีการเทียบสี (Colorimetric method)

6.6 ไนเตรท-ไนโตรเจน (Nitrate nitrogen: $\text{NO}_3^-\text{-N}$) โดยวิธีไฮดราซีน

6.7 ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (Phosphate phosphorus: $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) โดยวิธี Stannous Chloride

6.8 ฟอสฟอรัสรวม (Total phosphorus) โดยวิธี เปอร์ซัลเฟต (Persulphate method)

6.9 และคลอโรฟิลล์-เอ (Chlorophyll-a)

7. การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันปลา

7.1 กิจกรรมไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ตามวิธีการของ Sarder *et al.* (2001)

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ตามวิธีการของ Srisapoom and Areechon (2017) ดัดแปลงจากวิธีการของ Kamilya *et al.* (2006)

7.3 การวิเคราะห์ Superoxide Dismutase (SOD) Activity โดยใช้เครื่อง Multiple microplate reader ที่ความยาวคลื่น 560 nm ดัดแปลงจากวิธีการของ Oberley and Spitz (1984)

8. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเนื้อปลานิล ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (1990)

- 8.1 วิเคราะห์โปรตีนโดย Micro-Kjeldahl
- 8.2 วิเคราะห์ไขมันโดยวิธี Dichloromethane extraction ตาม Soxhlet method
- 8.3 วิเคราะห์เยื่อใย โดยวิธี Fritted glass crucible
- 8.4 วิเคราะห์เถ้า โดยการเผาใน Muffle furnace 550 °C 12 ชั่วโมง
- 8.5 วิเคราะห์ความชื้น โดยการอบแห้งในตู้อบ 105 °C 24 ชั่วโมง

9. การวิเคราะห์เอนไซม์ย่อยอาหาร

- 9.1 เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ตามวิธีการของ Rungruangsak – Torrissen *et al.* (2006)
- 9.2 เอนไซม์โปรติเนส ตามวิธีการของ Areekijseeree *et al.* (2004)
- 9.3 เอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีการของ Areekijseeree *et al.* (2004)

วิธีการวิจัย

การวางแผนการทดลอง

ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกเฉพาะถิ่น และศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพของซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโต การยับยั้งโรคติดเชื้อ และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ในปลานิลวัยอ่อน ดังนี้

1. การคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกส์

ทำการเก็บตัวอย่างปลานิล เพื่อศึกษาเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ พร้อมตัวอย่างน้ำ และตะกอนดินพื้นท้องน้ำ เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์บางชนิดที่มีศักยภาพที่จะเป็นเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ โดยขั้นตอนต่าง ๆ มีดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างเชื้อจากตัวอย่างดิน น้ำโคลน จากบริเวณกระชังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อน รวมทั้งในลำไส้ของปลานิล นำมาทำ Dilution plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (ที่เติม Bromocresol green 0.004 % เป็นอินดิเคเตอร์ โดยวิธีการ Spread plate) และ Trypticase soy agar (TSA) โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะต่าง ๆ นำไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น โดยใช้การตรวจสอบการติดสีแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.2 การคัดเลือกเชื้อที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคปลานิลวัยอ่อนนำเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่มีลักษณะโคโลนีต่าง ๆ กันมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคปลา 2 ชนิด

เช่น *Areromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ด้วยวิธี Agar well diffusion (Perez *et al.*, 1990) และ Agar disk diffusion (Hudzicki, 2009) เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หรือไม่ โดยดูจากโซนใส (Clean zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อที่แยกได้

1.3 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Blood agar hemolysis) ทดสอบการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยแบคทีเรียก่อโรคบางกลุ่มที่สามารถสร้างสารฮีโมไลซิน ซึ่งสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดฮีโมไลซิสได้ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก บนอาหาร Blood agar plate ที่เติมเลือดแกะ 5 % ตรวจสอบการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง เชื้อโพรไบโอติกที่เลือกจะต้องไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกตัว (Non hemolysis) (Media and Biochem, 2012)

1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*In vivo* test) ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลก่อนนำมาใช้ในการทดลอง เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจริง ทำการเลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.1 ในอาหาร TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้น 3×10^6 CFU/ml แล้วนำมาฉีดเข้าลำตัวปลานิลที่เตรียมไว้ บริเวณช่องท้อง อัตราการปล่อย 10 ตัว/ตู้ และให้อาหารลูกปลานิลขนาดเล็ก วันละ 2 ครั้ง สังเกตลักษณะอาการของปลานิลหลังจากการฉีดเชื้อ (Zion *et al.*, 2000)

1.5 การศึกษาจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อโพรไบโอติกที่แยกได้ โดยการหาลำดับเบส ดีเอ็นเอ (16S rDNA gene)

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

วิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารอาหารในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (1990) ได้แก่

- 2.1 วิเคราะห์โปรตีนโดย Micro-Kjeldahl
- 2.2 วิเคราะห์ไขมันโดยวิธี Dichloromethane extraction ตาม Soxhlet method
- 2.3 วิเคราะห์เยื่อใย โดยวิธี Fritted glass crucible
- 2.4 วิเคราะห์เถ้า โดยการเผาใน Muffle furnace 550 °C 12 ชั่วโมง
- 2.5 วิเคราะห์ความชื้น โดยการอบแห้งในตู้อบ 105 °C 24 ชั่วโมง

3. การศึกษาการเป็นพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

3.1 การเตรียมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

3.1.1 ใช้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ผ่านการอบแห้งกะเทาะเปลือกแล้วจาก บริษัทฮิลล์คอฟ จำกัด (ภาพที่ 11A) ไปบดให้ละเอียด (ภาพที่ 11B) ใส่ภาชนะปิดสนิทเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 นำเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่บดมาผสมน้ำในอัตราส่วนระหว่างเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟต่อน้ำ (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) 1:20 (W/V) สกัดโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Model: WNB14 SC) เวลาในการสกัด 90 นาที และอุณหภูมิ 90 °C ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 20 ml ด้วยน้ำกลั่น (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ตามวิธีการของนฤมล และคณะ (2561) (ภาพที่ 11C)

3.1.3 ผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟในน้ำกลั่น (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) อัตราส่วน 1:20 (W/V) เพื่อนำไปหมักด้วยเอนไซม์ต่อไป

3.2 การหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ด้วยเอนไซม์ Cellulsoft® L Ultra conc และ Cellulsoft® CR conc ตัดแปลงจาก Apiraksakorn *et al.* (2008)

นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟจากข้อ 3.1.2 และ 3.1.3 เติมเอนไซม์ Cellulsoft® L Ultra conc และ Cellulsoft® CR conc ในอัตราส่วน 1:100 (V/V) และเติมยาปฏิชีวนะ Ampicillin (AMP) ความเข้มข้น ปริมาตร 1 µl เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Incubator shakers ความเร็วรอบ 50 rpm ทำการเก็บตัวอย่าง ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวม วิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ และทดสอบสมบัติความเป็นสารพรีไบโอติกของโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเยื่อหุ้มกาแฟ



ภาพที่ 11 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (CSS)(A) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟบด (CSSp)(B)
สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (CSSw)(C)

3.3 วิเคราะห์หาสารฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin Ciocalteu's assay โดยดัดแปลงจาก Noridayu *et al.* (2011)

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม Dilution ตัวอย่าง (อัตราการเจือจาง 100 เท่า หรือ 10^{-2}) โดยนำตัวอย่างส่วนใสมา 0.1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ลงไป 2 ml นำไป vortex ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดด้วยกระดาษฟอยด์หรือถุงฟอยด์ จากนั้นเติมสารละลาย Folin Ciocalteu phenol reagent ลงไป 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณค่าปริมาตรสารประกอบฟีนอลรวมทั้งหมด

เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) (ภาพผนวกที่ 1) รายงานผลเป็น mg/g Gallic acid equivalent, GAE

3.4 การวิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์

3.4.1 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่พบในสารสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยวิธี ฟีนอลซัลฟูริกแอซิด (Phenol-sulfuric acid method) (ดัดแปลงจาก DuBois *et al.* (1956) หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยเทคนิค Phenol-sulfuric โดยนำตัวอย่างสารสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟปริมาตร 0.5 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำละลาย Phenol ปริมาตร 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำละลาย Sulfuric acid ปริมาตร 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 490 nm แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีน้ำตาลทั้งหมดเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 2)

3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid method (DNS method) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959) หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS โดยนำตัวอย่างสารสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟปริมาตร 0.5 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำละลาย DNS ปริมาตร 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน นำสารผสมที่ได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 540 nm แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 3)

3.4.3 วิเคราะห์ชนิดน้ำตาล โดยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) (ดัดแปลงจาก Apiraksakorn *et al.*, 2008) นำสารตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพขั้นต้นและผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์ Cellulsoft® L Ultra และ Cellulsoft® CR conc พร้อมกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose), น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose), น้ำตาลซูโครส (Sucrose), น้ำตาลคีสโตส (Kestose), น้ำตาลนิสโตส (Nystose) และน้ำตาลฟรุคโตฟูราโนซิลนิสโตส (Fructofuranosyl-nystose) ปริมาตร 0.25 µl หยดลงบนแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจล 60 แล้วเป่าให้แห้ง จากนั้นนำแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจล 60 ที่ได้จุ่มในแท่งที่มีตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเอธานอล:เมทานอล:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 5:3:2 โดยปริมาตร เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่เกือบสุดแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจล 60 นำแผ่นที่ได้ทำให้แห้งโดยใช้ไคร์เป่าลม จากนั้นนำไปเคลือบ 5% กรดซัลฟูริกในเมทานอล จนสารละลายกระจายทั่วแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจล 60 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที จนเห็นแถบของตัวอย่างชัดเจน เปรียบเทียบผลตัวอย่างกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

3.5 ทดสอบสมบัติความเป็นสารפריไบโอติกของโอลิโกแซกคาไรด์จากเยื่อหุ้มกาแฟ (ดัดแปลงจาก Titapoka *et al.* (2008))

3.5.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*B. subtilis*) และเชื้อก่อโรค ได้แก่ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ในอาหาร TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก และทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* โดยการเพาะเลี้ยงที่ปริมาณเซลล์ 10^8 CFU/ml ในอาหารทดสอบ 5 สูตร ได้แก่ (P1) Basal medium (pH 7), (P2) Basal medium (pH 7) + FOS 1 g, (P3) Basal medium (pH 7) + ผงบุก 1 g, (P4) Basal medium (pH 7) + CSS(w) Cellulsoft® L Ultra 1 g ของน้ำตาลและ (P5) Basal medium (pH 7) + CSS(p) Cellulsoft® L Ultra 1 g ของน้ำตาล ปริมาตรอาหารทั้งหมด 100 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการให้อากาศ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวิซ์ (ภาพผนวกที่ 4, 5 และ 6)

4. ศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริมפריไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*B. subtilis*)

ศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริมפריไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*B. subtilis*) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ความต้านทานเชื้อก่อโรค รวมถึงศึกษาการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร และคุณภาพน้ำของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของการเสริมอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการเสริมอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในกระชัง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.1 การศึกษาผลของอาหารการเสริมอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.1.1 วางแผนการทดลอง แบบแฟกทอเรียล 3x3 โดยศึกษาผลของการเสริมפריไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: Coffee silver skin (CSS)) ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 2.5% และ 5% (CSS0%, CSS2.5% และ CSS5% ของน้ำตาลตามลำดับ) และโพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่

ปริมาณเซลล์ 0 , 5×10^7 และ 1×10^8 CFU/g (Pro0, ProA และ ProB ตามลำดับ) และสูตรอาหาร Positive control (FOS 1% + *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g) 1 สูตร ทำการทดลองผสมอาหารให้ปลา กินเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทดลองอนุบาลในตู้ทดลอง ขนาด $30 \times 65 \times 40$ cm จำนวน 30 ตู้ โดย แบ่งสูตรอาหารทดลองออกเป็น 9 สูตร และสูตรอาหาร Positive control 1 สูตร สูตรละ 3 ซ้ำได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 CSS 0% + Pro0 (Control): อาหารเม็ดสำเร็จรูป

สูตรอาหารที่ 2 ProA: อาหารผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

สูตรอาหารที่ 3 ProB: อาหารผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

สูตรอาหารที่ 4 CSS 2.5%: อาหารผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ของน้ำตาล

สูตรอาหารที่ 5 CSS 2.5% + ProA: อาหารผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ของน้ำตาล + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

สูตรอาหารที่ 6 CSS 2.5% + ProB: อาหารผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ของน้ำตาล + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

สูตรอาหารที่ 7 CSS 5%: อาหารผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ของน้ำตาล

สูตรอาหารที่ 8 CSS 5% + ProA: อาหารผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ของ น้ำตาล + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

สูตรอาหารที่ 9 CSS 5% + ProB: อาหารผสมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ของ น้ำตาล + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

สูตรอาหารที่ 10 FOS 1% + ProB: อาหารผสมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 % + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

4.1.2 สัตว์ทดลอง ในการดำเนินการวิจัย ใช้ลูกปลานิลวัยอ่อน น้ำหนักประมาณ 0.4-0.6 g/ตัว (ภาพที่ 12) ซื้จากรงชัยฟาร์ม อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยนำลูกปลามาพัก ให้ปรับตัวในกระชัง ก่อนทำการสูมนับและชั่งน้ำหนักลูกปลาเริ่มต้นเพื่อปล่อยลงเลี้ยงในตู้ทดลอง ให้อาหารด้วยอาหารสำเร็จรูปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับสภาพ ก่อนเริ่มให้อาหารที่ทำการทดลอง



ภาพที่ 12 ลูกปลานิลวัยอ่อน ขนาด 0.4-0.6 g/ตัว

4.1.1 อาหารทดลอง การให้อาหารทดลอง และหน่วยทดลอง

การเตรียมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ที่ผ่านการอบแห้งกะเทาะเปลือกแล้ว นำไปบดให้ละเอียด ใส่ภาชนะปิดสนิทเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟไปปรับสภาพขั้นต้น และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc โดยการนำเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่นำไปบดให้ละเอียด มาเติมน้ำ อัตราส่วน 1 : 20 จากนั้นเติม เอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc และยาปฏิชีวนะ Ampicillin (AMP) บ่มไว้ในเครื่อง Incubator shakers ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้ -20 °C (ภาพที่ 13)

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*B. subtilis*) ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอาหาร TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน แล้วเติม 0.85% NaCl ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 และ 1×10^8 CFU/g (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc



ภาพที่ 14 เชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป โปรตีน 50% โดยให้อาหาร 10 % ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 3 ครั้ง (09.00, 12.00, 15.00 น.) ปรับปริมาณอาหารที่ให้ ทุก ๆ 7 วัน ปล่อยลูกปลานิลลงในตู้ปลาจำนวน 30 ตัว/ตู้ เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 200 ตัว/m² ตรวจสอบการเติบโตทุก 14 วัน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 50-75% ของน้ำในตู้ทุกวัน ให้ออกซิเจนตลอดเวลา โดยใช้หัวทรายต่อกับปั๊มลม และติดตั้งเครื่องปั๊มน้ำ 1 เครื่อง/ตู้ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ตู้ทดลองอนุบาลเลี้ยงลูกปลานิลวัยอ่อน

4.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในตู้ทดลอง เมื่อเริ่มต้นและระหว่างการเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วันจนเสร็จสิ้นการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าออกซิเจนละลาย (Dissolved oxygen) ด้วยเครื่อง Multifunction meter CX-461 แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen: NH₃-N) โดยวิธี Phenate method (Park *et al.*, 2009) ไนไตรท์-ไนโตรเจน (Nitrite nitrogen: NO₂⁻-N) โดยวิธีการเทียบสี (Colorimetric method) (Shinn, 1941) ไนเตรท-ไนโตรเจน (Nitrate nitrogen: NO₃⁻-N) โดยวิธีไฮดราซีน (Downes, 1978) และฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (Phosphate phosphorus: PO₄³⁻-P) โดยวิธี Stannous chloride

4.1.3 การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต น้ำและชั่งน้ำหนักปลาในแต่ละกระชั่งทุก 14 วันตลอดการทดลองในแต่ละการทดลอง นำข้อมูลที่ได้ไปปรับปริมาณการให้อาหาร และคำนวณหาประสิทธิภาพและการเจริญเติบโต นำข้อมูลที่ได้ไปปรับปริมาณการให้อาหาร และคำนวณการหาค่าต่าง ๆ ดังนี้ (Abdel-Tawwab *et al.*, 2008; USAID, 2011)

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain: WG) (g/ตัว)

$$WG \text{ (g/ตัว)} = \text{น้ำหนักปลาสุดท้าย (g)} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (g)}$$

อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily growth: ADG) (g/วัน)

$$\text{ADG (g/วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักปลาสุดท้าย (g)} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (g)}}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate: SGR) (%/วัน)

$$\text{SGR (%/วัน)} = \frac{100 \times (\ln \text{น้ำหนักปลาสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น})}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$$

อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio: FCR) (หน่วย)

$$\text{FCR} = \frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน (g)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (g)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency ratio: FE) (หน่วย)

$$\text{FE} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (g/ตัว)}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (g/ตัว)}}$$

อัตราการรอด (Survival) (%)

$$\text{Survival (%)} = \frac{(\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}) \times 100}{(\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}$$

4.1.3 การศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิล หลังจากทดลองให้อาหารทดลอง สูตรต่าง ๆ ในการอนุบาลปลานิลวัยอ่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดปลา และตัวอย่างตัว จำนวน 3 ตัว/ตู้ ดังนี้

1) กิจกรรม Lysozyme (Lysozyme Activity) (Sarder *et al.*, 2001)

เก็บปลา 3 ตัว/ตู้ เก็บเลือดปลาประมาณ 0.3-0.5 ml ในหลอด ไมโครเซนติพิวก์ 1.5 ml ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 25 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำ ตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดซีรัมส่วนที่มีสีเหลืองใสด้านบน ใส่หลอดไมโครเซนติพิวก์ 1.5 ml หลอดใหม่ (เก็บที่ -20 °C) จากนั้นปิเปตซีรัม 25 µl ผสมกับเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (3 mg/ml) 100 µl ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 0.05 M (pH 6.8) และวัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียที่ลดลงทุก ๆ 1 นาที ภายใน 10 นาที ด้วยเครื่อง micro plate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm (1 หน่วยของกิจกรรมไลโซไซม์ คือค่าความขุ่นของ สารละลายที่ลดลง 0.001 / นาที)

2) การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ตามวิธีการของ Srisapoom and Areechon (2017)

เก็บเลือด 0.35 ml ใส่ในหลอด Heparin (หลอดป้องกันการแข็งตัวของเลือด) จากนั้นนำไปสกัดเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวตามวิธีการของ Srisapoom and Areechon (2017) จากนั้น ปิเปตเซลล์เม็ดเลือดขาว 175 µl ลงใน 96-well microtiter เติม Nitroblue tetrazolium NBT 25 µl

บ่มที่ 25° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายทิ้งทั้งหมด แล้วทำการล้างเซลล์ด้วย methanol 100% 125 µl โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยเมทานอล 70% สองครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเติม 2N KOH 125 µl และ DMSO 150 µl นำไปวัดด้วยเครื่อง micro plate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 655 nm

3) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Superoxide Dismutase (SOD) Activity โดยใช้เครื่อง Multiple microplate reader ที่ความยาวคลื่น 560 µl (Oberley and Spitz, 1984)

โดยการใช้เนื้อเยื่อจากตับ ม้าม และไตมาบดด้วย homogenized ในสารละลาย PBS 0.01 M (pH 7.0) จากนั้นปิเปต supernatant ของตัวอย่าง ลงใน 96-well microtiter เติมสารละลาย mixed substrate 170 µl และ Xanthine oxidase 25 µl นำไปวัดด้วยเครื่อง micro plate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm

4.1.4 การวิเคราะห์ความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ดัดแปลงจากวิธีการของ ณัฐฐา (2555) หลังจากให้อาหารทดลองสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำปลานิลวัยอ่อนมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค โดยการฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ที่ปริมาณเซลล์ 10^6 CFU/ml โดยแบ่งเชื้อละจำนวน 10 ชุดการทดลอง ใช้ลูกปลาจำนวน 15 ตัว/ชุดการทดลอง ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 ml ทำบันทึกการตายของปลาทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน นำผลการทดลองที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตาย และบันทึกลักษณะอาการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับลูกปลานิลทดลอง

4.1.5 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร หลังจากอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมซินไบโอติกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างทางเดินอาหารของปลานิลวัยอ่อน (ลำไส้และกระเพาะ) 0.5 g ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ (เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C) จากนั้นเติม 50 mM Tris-HCl buffer pH 8 (ซึ่งมี 200 mM NaCl ผสมอยู่) เพื่อสกัดเอนไซม์ ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) โดยใช้ Homogenizer หรือ Blender (ให้แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อเอนไซม์จะไม่ถูกทำลาย) นำไปปั่นที่ 15,000 รอบ ที่ 4 °C เป็นเวลา 30-60 นาที แยกส่วนใส (Supernatant) ใส่หลอดใหม่ (โดยให้แบ่งเก็บ ที่ -80 °C เป็น Portion เล็ก ๆ สำหรับแยกนำมาใช้ในแต่ละครั้ง)

1) ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน ตามวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) ดูดตัวอย่างเอนไซม์ใส่ลงใน Cuvette 50 ไมโครลิตร แล้วนำ Cuvette ไปใส่ในช่องของ Spectrophotometer ที่ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการไว้แล้ว จากนั้นดูด Pre-heated specific substrate ที่อุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ 1000 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ 410 nm (A_{410}) โดยวัด Initial reaction ภายใน 10 วินาที

วิธีคำนวณ $\mu\text{mol } p\text{-Nitroaniline}$ ที่เกิดขึ้น/ชั่วโมง/mg Protein

2) ศึกษากิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส ตามวิธีการของ Areekijsee *et al.* (2004) ดูดสารละลาย 5% Azocasein (ซึ่งละลายใน 0.1 M NaOH) 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติพิวค์ จากนั้นเติม 0.2 M buffer ที่ pH 7 200 μl แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เติมตัวอย่างเอนไซม์ 125 μl แล้วนำไป Vortex จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 10% TCA แล้วนำไป Vortex เพื่อหยุดปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใส 1.2 ml ผสมกับ 1 M NaOH จำนวน 1.4 ml จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm (A_{440})

วิธีคำนวณ $(OD_{440} \times (1000/125) \times \text{dilution} \times (60/15)) / (\text{mg Protein/ml})$

3) ศึกษากิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีการของ Areekijsee *et al.* (2004) ดูดน้ำแป้ง 5% จำนวน 25 μl ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 0.2 M buffer pH 7 จำนวน 62.5 μl แล้วนำไป Vortex จากนั้นเติมตัวอย่างเอนไซม์ 125 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมสาร 1% DNS (ละลายใน 2 M NaOH และ 6% Sodium potassium tartrate) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 2.5 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm แล้วหาค่าปริมาณ Reducing sugar โดยเปรียบเทียบกับ Maltose standard curve

วิธีคำนวณ $((OD_{540}/\text{Slope}) \times (1000/125) \times \text{dilution} \times 3 \text{ ml} \times (60/15)) / (\text{mg Protein/ml})$

4.2 การศึกษาผลของการเสริมทดลองสูตรต่าง ๆ โดยการทดลองการอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในกระชัง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.2.1 วางแผนการทดลอง แบบแฟกทอเรียล 3x2 โดยศึกษาผลของพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (Coffee silver skin powder: CSSp) ที่ระดับความเข้มข้น 0.25% (CSSp 0.25%) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultrar conc ที่ระดับความเข้มข้น 5% (CSS 5%) และผสมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ที่ระดับความเข้มข้น 1% (FOS1%) และโพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0 และ 5×10^7 CFU/g (Pro0 และ ProA ตามลำดับ) ทำการทดลองโดยผสมอาหารให้ปลากินเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อนุบาลในกระชังขนาด 1x1 m จำนวน 24 กระชัง แบ่งสูตรอาหารทดลองออกเป็น 8 สูตร สูตรละ 3 ซ้ำ ได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 CSS 0% + Pro0 (Control): อาหารเม็ดสำเร็จรูป

สูตรอาหารที่ 2 ProA : อาหารผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

สูตรอาหารที่ 3 CSSp 0.25% : อาหารผสมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง 0.25% ของน้ำตาล

สูตรอาหารที่ 4 CSSp 0.25% + ProA : อาหารผสมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง 0.25% ของน้ำตาล + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

สูตรอาหารที่ 5 CSS 5% : อาหารผสมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5%

สูตรอาหารที่ 6 CSS 5% + ProA : อาหารผสมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ของน้ำตาล + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

สูตรอาหารที่ 7 FOS 1%: อาหารผสมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 %

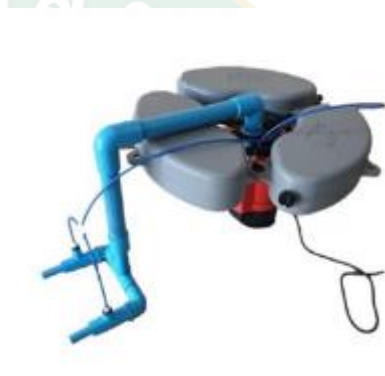
สูตรอาหารที่ 8 FOS 1% + ProA : ชุดอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 % + จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

4.2.2 สัตว์ทดลอง ในการดำเนินการวิจัย ใช้ลูกปลานิลวัยอ่อน น้ำหนักประมาณ 0.40 ± 0.05 g/ตัว ซื้อมาจากบริษัท ฟาร์มเชียงใหม่พัฒนาสัตว์น้ำ จำกัด โดยนำลูกปลามาพักให้ปรับตัวในกระชัง ก่อนทำการสูมน้ำและชั่งน้ำหนักลูกปลาเริ่มต้นเพื่อปล่อยลงเลี้ยงในกระชังที่ทำการทดลอง ให้อาหารด้วยอาหารสำเร็จรูปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับสภาพ ก่อนเริ่มให้อาหารที่ทำการทดลอง

4.2.3 อาหารทดลอง การให้อาหารทดลอง และหน่วยทดลอง ขั้นตอนการเตรียมอาหารทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 สัปดาห์ แรกให้อาหารเม็ดอาหารสำเร็จรูปโปรตีน 50% โดยให้อาหาร 10 % ของน้ำหนักตัว/วัน หลังครบ 4 สัปดาห์ เปลี่ยนให้โปรตีน 25% และอัตราการให้ 5% ของน้ำหนักตัว/วัน ปรับปริมาณอาหารที่ให้ ทุก ๆ 7 วัน ปล่อยลูกปลานิลลงในกระชังขนาด 1×1 m จำนวน 24 กระชัง ในบ่อดินขนาด 10×30 m (ภาพที่ 16) จำนวน 140 ตัว/กระชัง ตรวจวัดการเติบโตทุก 14 วัน และทำการติดตั้งเครื่องไมโครนาโนบับเบิล (MNB generator) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทางศูนย์ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการประยุกต์ใช้ไฟฟ้าแรงสูงพลาสมาและไมโครนาโนบับเบิล (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 16 ป่อดทดลอง และกระชังทดลอง



ภาพที่ 17 เครื่องไมโครนาโนบับเบิล รุ่น ECO-KMV120-9HAQR00

4.2.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในป่อดิน เมื่อเริ่มต้นและทุก ๆ 7 วันจนเสร็จสิ้นการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำกระแสไฟฟ้า ค่าออกซิเจนละลาย ค่าความโปร่งแสง ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ค่าความเป็นต่าง ค่าความกระด้าง ไนโตรเจน ไนเตรท-ไนโตรเจน ฟอสเฟต ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสรวม และคลอโรฟิลล์ เอ

4.2.5 การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต น้ำและชั่งน้ำหนักปลา ในแต่ละกระชังทุก 14 วันตลอดการทดลองในแต่ละการทดลอง นำข้อมูลที่ได้ไปปรับปริมาณการให้อาหาร และคำนวณหาประสิทธิภาพและการเจริญเติบโต ๆ นำข้อมูลที่ได้ไปปรับปริมาณการให้อาหาร และคำนวณการหาค่าต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

4.2.6 การศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิล หลังจากทดลองให้อาหารเสริมซินไบโอติกในการอนุบาลปลานิลวัยอ่อน ทำการเก็บเลือดปลา และตัวอย่างตับ จำนวน 2 ตัว/กระชัง

โดยเก็บ 2 ครั้ง ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

4.2.7 การวิเคราะห์ความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* คัดแปลงจากวิธีการของ ณีภุชญา (2555) หลังจากให้อาหารเสริมสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำปลานิลวัยอ่อนมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค โดยการฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^6 CFU/ml โดยแบ่งเชื้อละจำนวน 8 ชุดการทดลอง ใช้ลูกปลา จำนวน 15 ตัว ต่อชุดการทดลอง ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 ml ทำบันทึกการตายของปลา ทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน นำผลการทดลองที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตาย และบันทึกลักษณะอาการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับลูกปลานิลทดลอง

4.2.8 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร หลังจากอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมซินไบโอติก เก็บตัวอย่างทางเดินอาหารของปลานิลวัยอ่อน (ลำไส้ และกระเพาะ) โดยเก็บ 2 ครั้ง ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ ขั้นตอนการวิเคราะห์ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละทรีตเมนต์ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนต์ โดยวิธีการของ Duncan's Test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

บทที่ 4 ผลการวิจัย

ผลการศึกษาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์โพรไปโอติก และแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ปลานิล พบว่า ลักษณะโคโลนีส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกัน โดยพบโคโลนีที่มีสีเหลือง และสีขาว รูปร่างกลม มันวาว พื้นผิวเรียบ และขอบเรียบ เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์แตกต่างกัน เช่น แท่งสั้น แท่งยาว และกลม การจัดเรียงตัวของเซลล์จุลินทรีย์ที่ต่อกัน 2-3 cell แบบกลุ่มก้อน และแบบเดี่ยว ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 7 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 6

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 7 ไอโซเลท และเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียจากงานวิจัยของ อุดมลักษณ์ และจิราพร ในปี 2556 จำนวน 3 ไอโซเลท (ตารางที่ 7) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (ภาพที่ 18) จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยมีวิธีการ Agar well diffusion พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* มีจำนวนทั้งสิ้น 9 ไอโซเลท ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มีจำนวนทั้งสิ้น 3 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์โพรไปโอติกที่คัดแยกจากปลานิล น้ำ และตะกอนดินในจังหวัดเชียงใหม่ ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

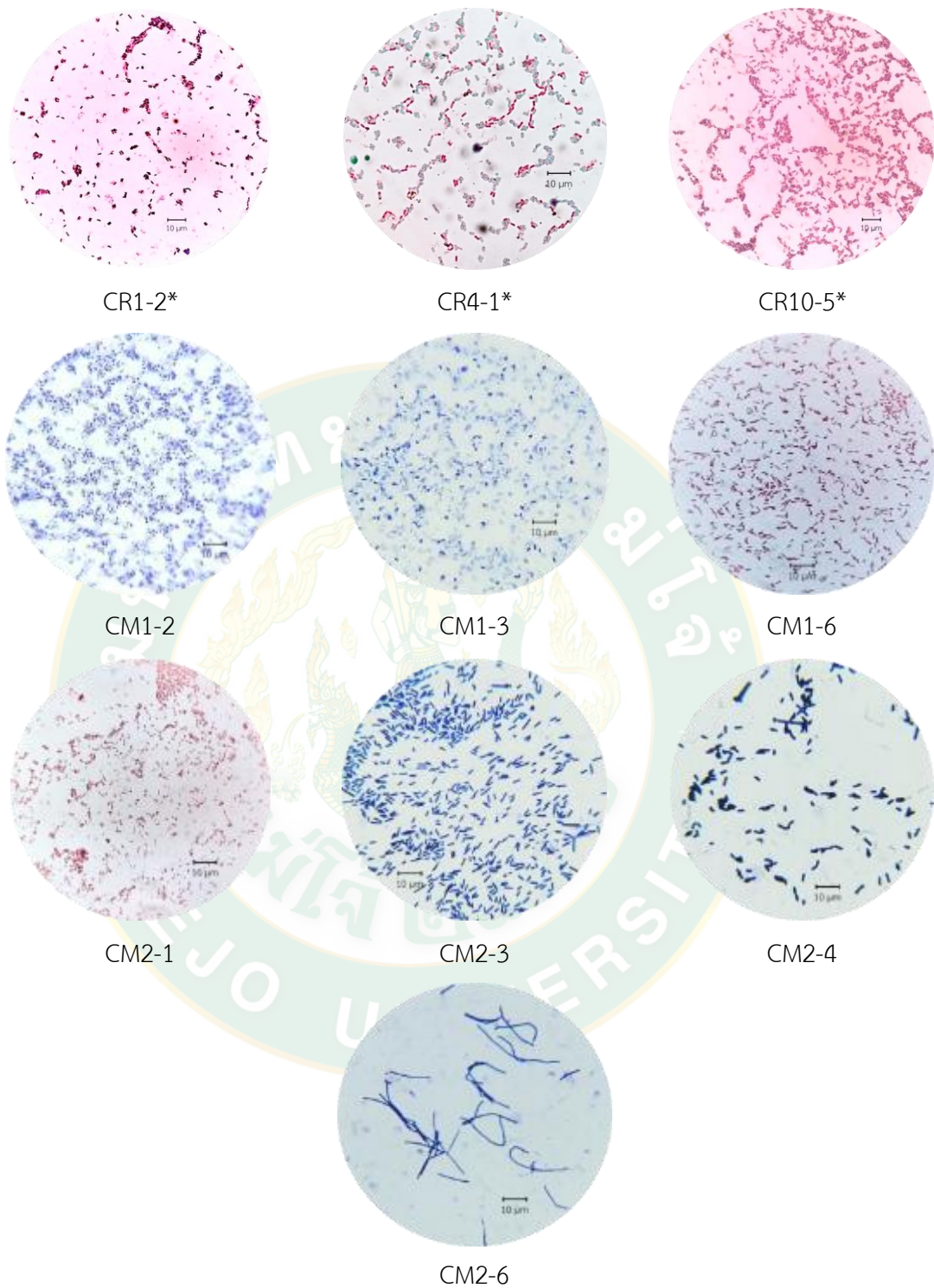
ลำดับที่	สถานที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ที่มา
1	คณะเทคโนโลยีการประมง	CM1-2	สีขาวขุ่น กลม ผิวหน้ามันวาว ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1-2 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นกลุ่ม สร้างสปอร์	ลำไส้
2	และทรัพยากรทางน้ำ	CM1-3	สีขาว กลม ผิวหน้าเยิ้มมันวาว ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์	ลำไส้

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	สถานที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ที่มา
3		CM1-6	สีขาวขุ่น กลม ผิวเรียบ ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 2-4 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์	ลำไส้
4		CM2-1	สีขาวใส กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันวาว	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์	ดิน
5		CM2-3	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 2-4 μm หนา 1 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์	ดิน
6		CM2-4	สีเหลืองขุ่น กลม ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 2-4 μm หนา 1 μm อยู่เป็นกลุ่ม สร้างสปอร์	ดิน
7		CM2-6	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 3-4 μm หนา 1 μm ต่อกันเป็นสายยาว สร้างสปอร์	ดิน

ตารางที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์โพรไปโอติกที่คัดแยกจากปลานิล น้ำ และตะกอนดินในจังหวัดเชียงรายที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

ลำดับที่	สถานที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ที่มา
1	ลลิตาฟาร์ม	CR1-2	สีขาวขุ่น กลม มันวาว ผิวเรียบ ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ยาว 1.5-3 μm หนา 1 μm อยู่เปเซลล์เดี่ยว	ลำไส้
2	ศักดิ์ฟาร์ม	CR4-1	สีขาว กลม มันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1-2.5 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์	ลำไส้
3	นัยสิทธิ์ฟาร์ม	CR10-5	สีขาวใส กลม ขอบเรียบ ผิวหยาบ ไม่มันวาว	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1.5-2.5 μm หนา 1 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์	ลำไส้

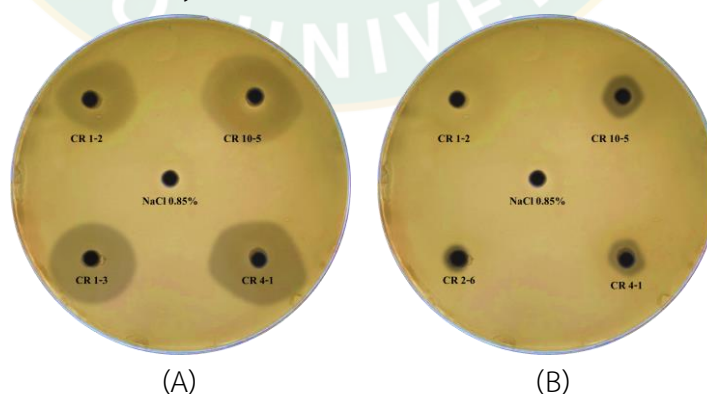


ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา

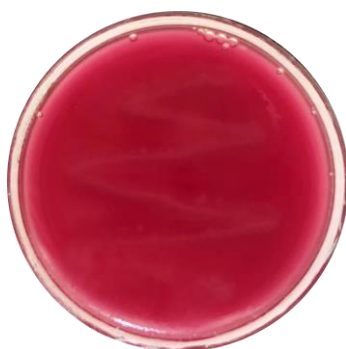
ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยวิธีการ Agar well diffusion (วัดความกว้าง Clear zone, cm)

	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
CR1-2*	0.90	
CR4-1*	2.10	0.90
CR10-5*	2.50	1.00
CM1-2	2.40	-
CM1-3	2.30	-
CM1-6	1.50	-
CM2-1	0.70	-
CM2-3	0.90	-
CM2-4	0.70	-
CM2-6	-	0.70

หลังจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยวิธีการ Agar well diffusion พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ CR10-5 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ดีที่สุดในเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่น ๆ โดยดูจากโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงดังภาพที่ 19 และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ CR10-5 มาทดสอบปฏิกิริยาการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemolysis) พบว่าเกิดปฏิกิริยาการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ γ -hemolysis โดยเกิดการ Hemolysis ไม่สมบูรณ์ ซึ่งไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้ (Non hemolysis) แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 19 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* (A) และ *S. agalactiae* (B) โดยวิธีการ Agar well diffusion



ภาพที่ 20 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ CR10-5 หลังการทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง
(Blood agar hemolysis)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

ผลการศึกษารวบรวมองค์ประกอบทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ พบว่า ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ประกอบด้วยโปรตีน 19.40 % ไขมัน 1.80 % ความชื้น 6.80 % เถ้า 7.30 % คาร์โบไฮเดรต 64.80 % และเยื่อใย 27.00 % (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 คุณค่าทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (%) (mean \pm SD)

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin)	
โปรตีน (Protein)	19.40 \pm 2.10
ไขมัน (Fats)	1.80 \pm 0.10
ความชื้น (Moisture)	6.80 \pm 1.10
เถ้า (Minerals (Ashes))	7.30 \pm 0.20
คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)	64.80 \pm 0.70
เยื่อใย (Fiber)	27.00 \pm 0.00

ผลการศึกษาการเป็นพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟก่อนการหมัก (Coffee silver skin before extraction; CSSb) มีสารฟีนอลิกเท่ากับ 169.3 ± 1.0 mg GAE/g ซึ่งมีค่าสูงสุด พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟหลังการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบสกัดน้ำที่หมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc (CSSe: L Ultra conc) เท่ากับ 0.202 ± 0.006 และ 0.025 ± 0.001 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงสุดพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟก่อนการหมัก แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณสารฟีนอลิก (mg GAE/g) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (mean \pm SD)

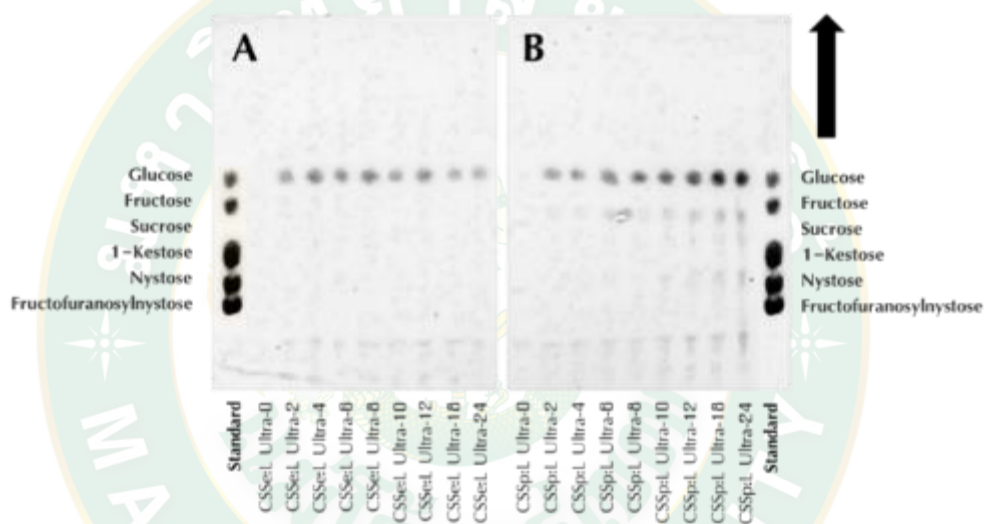
	สารฟีนอลิก (mg GAE/g)	น้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
CSSb	169.3 ± 0.15 ^d	0.028 ± 0.005 ^a	0.004 ± 0.001 ^a
CSSp: L Ultra conc	14.73 ± 0.10 ^b	0.202 ± 0.006 ^d	0.025 ± 0.001 ^d
CSSe: L Ultra conc	18.61 ± 0.10 ^c	0.065 ± 0.001 ^c	0.017 ± 0.001 ^c
CSSp: CR conc	10.57 ± 0.11 ^a	0.056 ± 0.001 ^b	0.009 ± 0.001 ^b
CSSe: CR conc	18.61 ± 0.12 ^c	0.053 ± 0.003 ^b	0.017 ± 0.001 ^c
p-value	0.00	0.00	0.00

* CSSb: Coffee silver skin before extraction, CSSp: Coffee silver skin powder and CSSe: Coffee silver skin extract

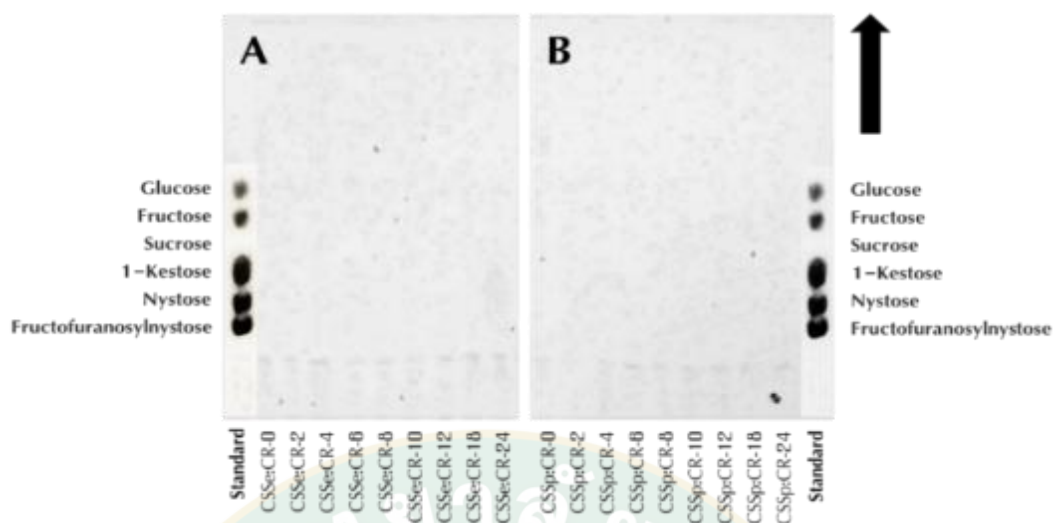
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm SD ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เทคนิค TLC ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดจากการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc และ Cellusoft® CR conc โดยเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐานพบว่า CSSe: L Ultra conc พบน้ำตาลในกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียง

กับน้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลกลุ่มโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ระยะเวลา 2 ถึง 24 ชั่วโมง โดยพบน้ำตาลในกลุ่มนี้มีจำนวนลดลงสังเกตจากแถบสีที่ขึ้นบนแผ่น TLC แสดงดังภาพที่ 21A ใน CSSp: L Ultra conc พบน้ำตาลในกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลกลุ่มโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ระยะเวลา 2 ถึง 24 ชั่วโมง โดยพบปริมาณที่เพิ่มขึ้น และที่ระยะเวลา 8 ถึง 24 ชั่วโมง พบในกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose), น้ำตาลซูโครส (Sucrose) และน้ำตาลนิสโตส (Nystose) ซึ่งพบจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก แสดงดังภาพที่ 21B ในขณะที่ชุดการทดลอง CSSe: CR conc และ CSSp: CR conc พบเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลขนาดใหญ่ และพบในปริมาณน้อยสังเกตจากแถบสีที่ขึ้นบนแผ่น TLC แสดงดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ชนิดน้ำตาลในผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin powder: CSSp) (A) และ สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin extract: CSSe) (B) หลังหมักด้วย เอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc

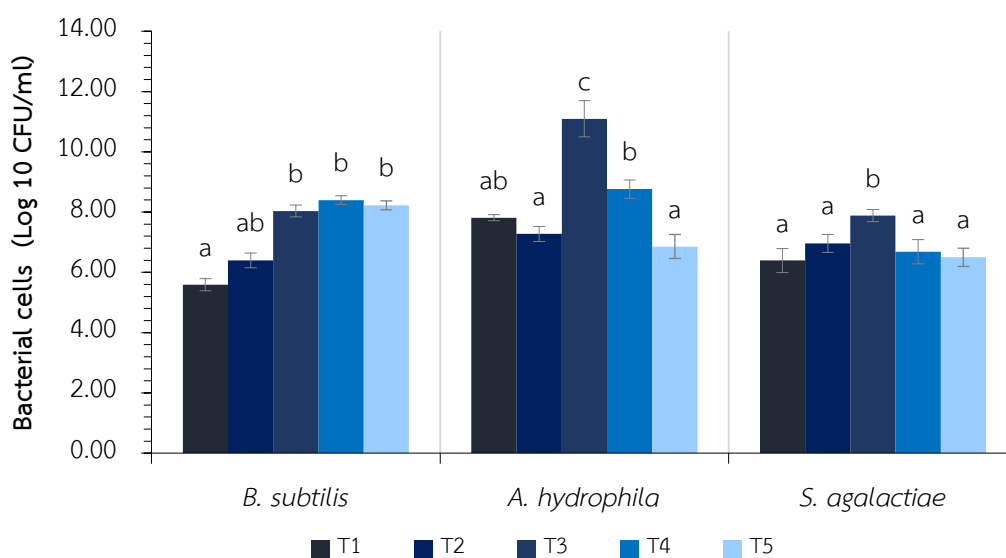


ภาพที่ 22 ชนิดน้ำตาลในผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin powder: CSSp) (A) และ สารสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin extract: CSSe) (B) หลังหมักด้วย เอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® CR conc

จากการทดสอบจุลินทรีย์โพรไบโอติกโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium และเติมแหล่งคาร์บอน 1% ที่แตกต่างกันได้แก่ FOS, ผงบุก (Glucomanan), เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบสารสกัดน้ำ (CSSe: L Ultra conc) และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp: L Ultra conc) ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) จากนั้นนำจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/ml และเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/ml เลี้ยงในอาหารทั้ง 5 สูตร หลังเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอาหาร CSSe: L Ultra conc, CSSp: L Ultra conc, MOS 1% และ FOS 1% มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.50×10^8 , 1.67×10^8 , 1.09×10^8 และ 2.50×10^6 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณเซลล์สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารควบคุมซึ่งพบเพียง 3.90×10^5 CFU/ml (ภาพที่ 23) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีปริมาณลดลงทั้ง 5 ชุดการทดลองเมื่อเทียบกับเริ่มต้นมีปริมาณ 1 g เมื่อเลี้ยง 24 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในชุดการทดลอง FOS 1%, Glucomanan 1%, CSSe: L Ultra conc และ CSSp: L Ultra conc เท่ากับ 0.311, 0.071, 0.071 และ 0.007 g/ml ตามลำดับในขณะที่สูตรอาหารชุดควบคุมมีปริมาณเริ่มต้นเพียง 0.011 เนื่องจากชุดควบคุมไม่มีการเติมน้ำตาลในอาหารปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารทดลองเริ่มต้นของชุดการทดลอง FOS 1%, MOS 1%, CSSe และ CSSp เท่ากับ 0.003, 0.023, 0.011 และ 0.018 g/ml ตามลำดับ เมื่อเลี้ยง 24 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเท่ากับ 0.000, 0.002, 0.004 และ 0.018

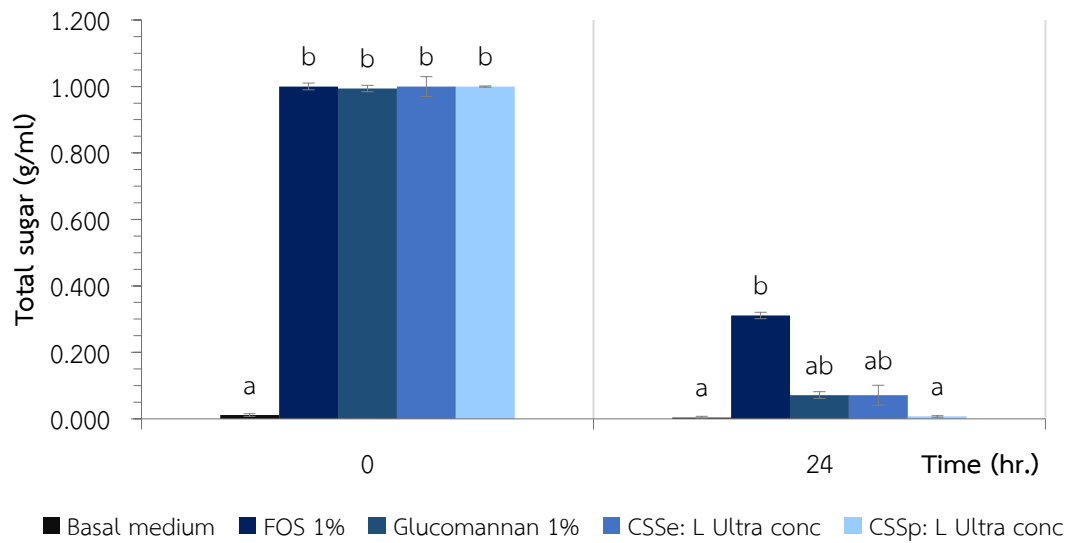
g/ml ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเริ่มต้นเพียง 0.003 g/ml ลดลงเหลือ 0.002 g/ml (ภาพที่ 24)

การเจริญของเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ในอาหารที่ผสม CSSp: L Ultra conc มีปริมาณเชื้อน้อยที่สุดโดยพบเพียง 7.19×10^6 และ 3.16×10^6 CFU/ml ตามลำดับ โดยพบปริมาณเชื้อน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารอื่นๆ (ภาพที่ 23) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบว่าในอาหารที่ผสม CSSp: L Ultra conc มีค่าเท่ากับ 0.218 และ 0.202 g/ml ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เลี้ยงจุลินทรีย์ก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบว่าในอาหาร CSSp: L Ultra conc มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.001 และ 0.009 g/ml ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 24)



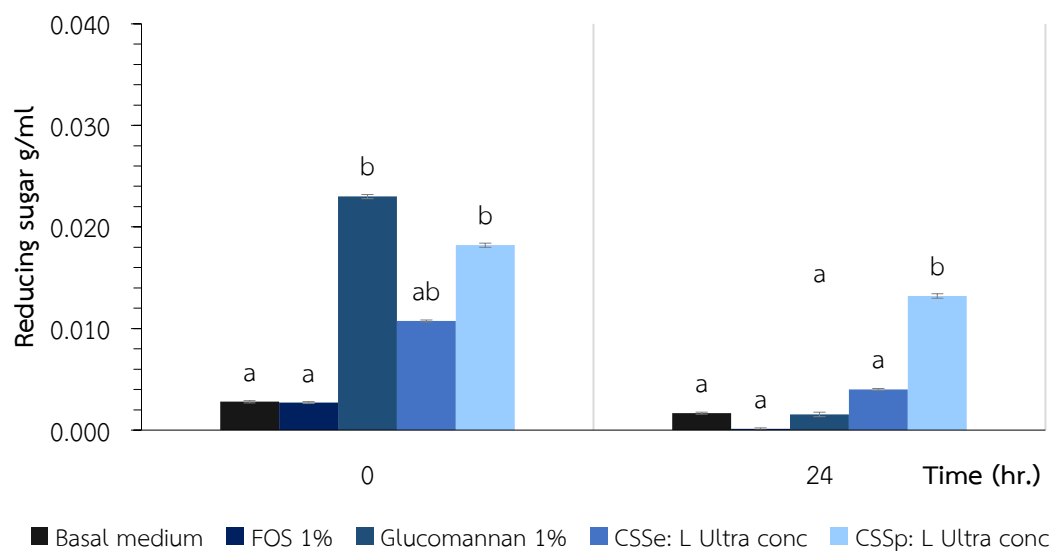
ภาพที่ 23 ปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติก (*B. subtilis*) และจุลินทรีย์ก่อโรค (*A. hydrophila* และ *S. agalactiae*) (Log 10 CFU/ml) ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



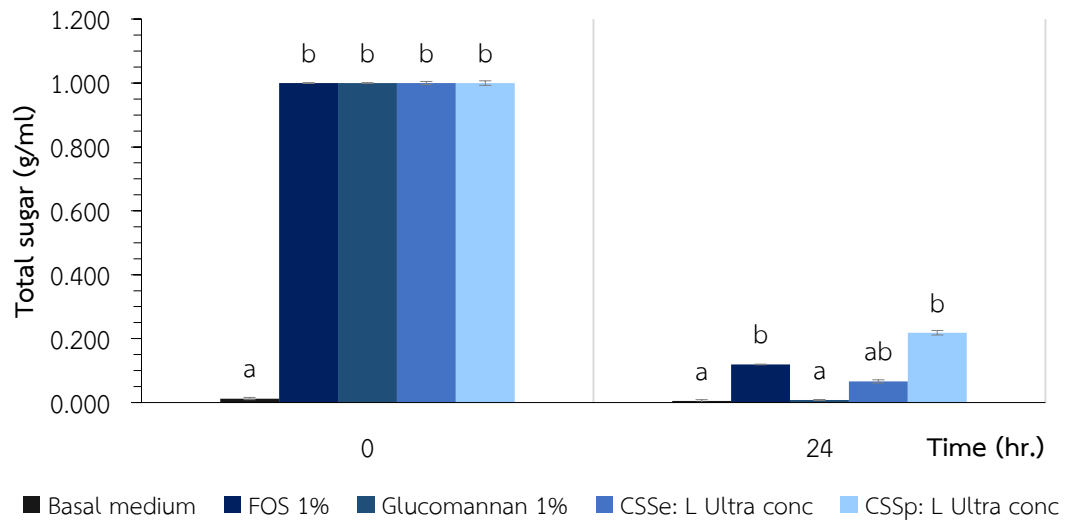
ภาพที่ 24 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอาหารแต่ละชุด การทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



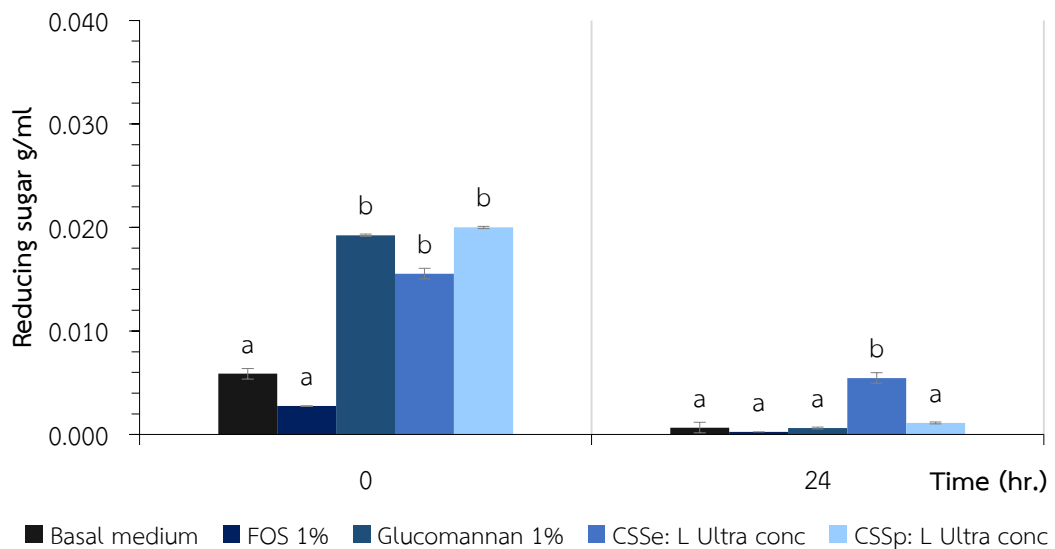
ภาพที่ 25 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอาหารแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



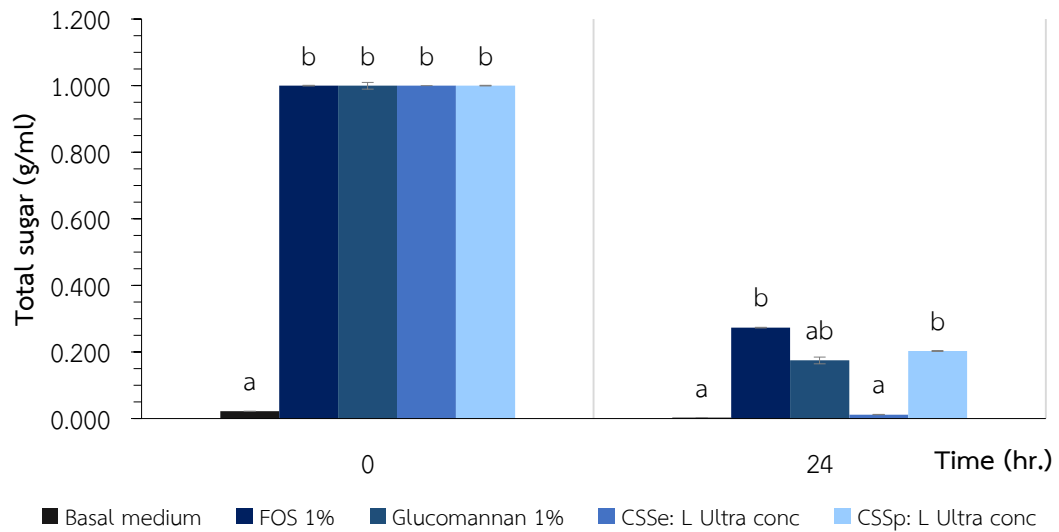
ภาพที่ 26 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *A. hydrophila* ในอาหารแต่ละชนิดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



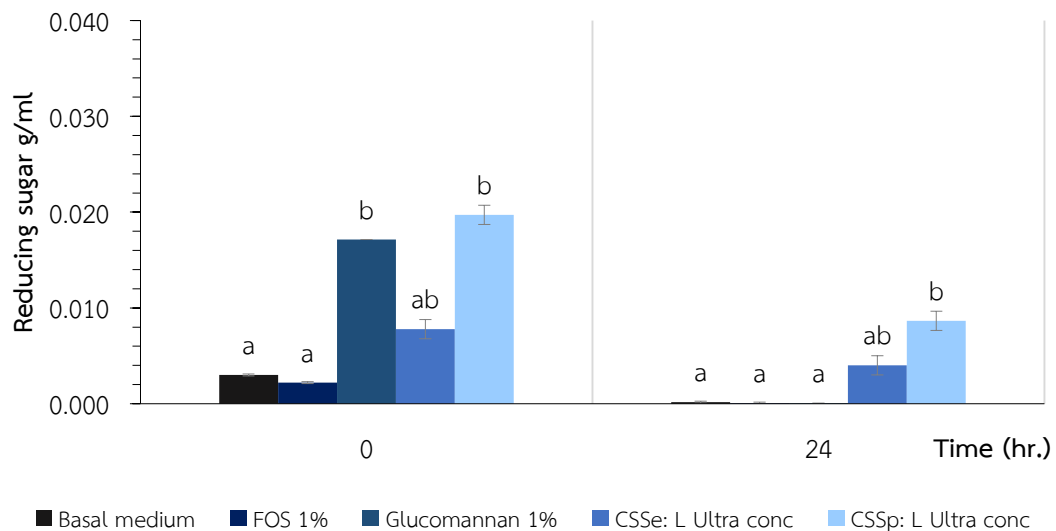
ภาพที่ 27 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *A. hydrophila* ในอาหารแต่ละชนิดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 28 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *S. agalactiae* ในอาหารแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 29 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/ml) หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *S. agalactiae* ในอาหารแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริม
พรีไบโอติก (เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*B. subtilis*)

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของการเสริมชีโนไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลอง
อนุบาลปลานิลวัยอ่อนในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3 โดยศึกษาผลของพรีไบโอติก (เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 2.5% และ 5% (CSS0%, CSS2.5% และ CSS5% ตามลำดับ) และ โพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0, 5×10^7 และ 1×10^8 CFU/g (Pro0, ProA และ ProB ตามลำดับ) และชุด Positive control (FOS 1% + *Bacillus subtilis* 1×10^8 CFU/g) 1 ชุด การทดลอง ทำการทดลองผสมอาหารให้ปลาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทดลองอนุบาลในตู้ทดลอง ขนาด 30x65x40 เซนติเมตร จำนวน 30 ตู้ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 9 ชุด และชุด Positive control 1 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (Control) : อาหารเม็ดสำเร็จรูป

ชุดการทดลองที่ 2 ProA : อาหารเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 3 ProB : อาหารเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 4 CSS 2.5% : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5%

ชุดการทดลองที่ 5 CSS 2.5% + ProA : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ผสม จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 6 CSS 2.5% + ProB : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ผสม จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 7 CSS 5% : อาหารผสมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5%

ชุดการทดลองที่ 8 CSS 5% + ProA : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสมจุลินทรีย์ โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 9 CSS 5% + ProB : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสมจุลินทรีย์ โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 10 Positive control : อาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 % ผสม จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^8 CFU/g

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ

คุณภาพน้ำระหว่างการทดลองในตู้ทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติก (เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 2.5% และ 5% (CSS 0%, CSS 2.5% และ CSS 5% ตามลำดับ) และโพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0, 5×10^7 และ 1×10^8 CFU/g (Pro0, ProA และ ProB ตามลำดับ) และชุด Positive control (FOS 1% + *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g) 1 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แสดงผลดังตารางที่ 11

1. อุณหภูมิน้ำ (Water temperature) ($^{\circ}\text{C}$)

จากผลค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำในระหว่างการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5 %) มีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำอยู่ที่ 28.17 ± 0.20 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งมีค่าสูงสุดในขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดมีค่าอยู่ที่ 27.69 ± 0.21 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)



ตารางที่ 11 คุณภาพน้ำเฉลี่ยระหว่างการทดลองในตู้ทดลองอนุบาลลูกปลาชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลากการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean±SE)

Treatment	ค่า	CSS 0%			CSS 2.5 %			CSS 5%			FOS 1% + ProB
		Pro0	ProA	ProB	Pro0	ProA	ProB	Pro0	ProA	ProB	
Water temp. (°C)	23-32	28.01±0.25 ^a	27.92±0.22 ^a	27.91±0.18 ^a	28.17±0.20 ^a	27.89±0.17 ^a	27.81±0.24 ^a	27.69±0.21 ^a	27.71±0.23 ^a	27.79±0.21 ^a	27.73±0.23 ^a
pH	5-9	6.44±0.42 ^a	6.49±0.42 ^a	6.54±0.41 ^a	6.54±0.44 ^a	6.41±0.43 ^a	6.42±0.41 ^a	6.40±0.42 ^a	6.41±0.42 ^a	6.44±0.41 ^a	6.45±0.41 ^a
DO (mg/L)	>3	5.42±0.33 ^a	5.48±0.33 ^a	5.58±0.36 ^a	5.55±0.36 ^a	5.33±0.40 ^a	5.36±0.42 ^a	5.09±0.51 ^a	5.74±0.27 ^a	5.65±0.29 ^a	5.62±0.31 ^a
NH ₃ -N (mg/L)	<0.5	0.10±0.04 ^a	0.06±0.01 ^a	0.06±0.25 ^a	0.05±0.01 ^a	0.06±0.07 ^a	0.07±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	<0.1	0.35±0.13 ^a	0.31±0.12 ^a	0.30±0.11 ^a	0.27±0.10 ^a	0.32±0.10 ^a	0.32±0.11 ^a	0.25±0.08 ^a	0.31±0.10 ^a	0.31±0.11 ^a	0.32±0.11 ^a
PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)	<0.6	0.15±0.04 ^a	0.13±0.04 ^a	0.13±0.03 ^a	0.41±0.31 ^a	0.13±0.03 ^a	0.13±0.04 ^a	0.11±0.03 ^a	0.12±0.0 ^{3a}	0.12±0.03 ^a	0.13±0.03 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)

จากผลค่าเฉลี่ยความเป็นกรด - ด่าง ในระหว่างการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5 %) มีค่าเฉลี่ยความเป็นกรด - ด่าง อยู่ที่ 6.54 ± 0.44 ซึ่งมีค่าสูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) มีค่าเฉลี่ยความเป็นกรด - ด่าง ต่ำสุด โดยค่าอยู่ที่ 6.40 ± 0.42 ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

3. ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO)

จากผลค่าเฉลี่ยออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ในระหว่างการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าเฉลี่ยออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อยู่ที่ 5.74 ± 0.27 mg/l ซึ่งมีค่าสูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) มีค่าเฉลี่ยออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่าต่ำสุด อยู่ที่ 5.09 ± 0.51 mg/l ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

4. แอมโมเนีย ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen: $\text{NH}_3\text{-N}$)

จากผลค่าเฉลี่ยแอมโมเนีย ไนโตรเจน ในระหว่างการทดลอง พบว่าชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยแอมโมเนีย ไนโตรเจน อยู่ที่ 0.10 ± 0.04 mg/l ซึ่งมีค่าสูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5%) มีค่าเฉลี่ยแอมโมเนีย ไนโตรเจน มีค่าต่ำสุด อยู่ที่ 0.05 ± 0.01 mg/l ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

5. ไนไตรท์ ไนโตรเจน (Nitrite nitrogen: $\text{NO}_2\text{-N}$)

จากผลค่าเฉลี่ยไนไตรท์ ไนโตรเจน ในระหว่างการทดลอง พบว่าชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยไนไตรท์ ไนโตรเจน อยู่ที่ 0.35 ± 0.13 mg/l ซึ่งมีค่าสูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) มีค่าเฉลี่ยไนไตรท์ ไนโตรเจน มีค่าต่ำสุด อยู่ที่ 0.25 ± 0.08 mg/l ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

6. ฟอสเฟต ฟอสฟอรัส (Phosphate phosphorus: $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)

จากผลค่าเฉลี่ยฟอสเฟต ฟอสฟอรัส ในระหว่างการทดลอง พบว่าเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5%) มีค่าเฉลี่ยฟอสเฟต ฟอสฟอรัส อยู่ที่ 0.41 ± 0.31 mg/l ซึ่งมีค่าสูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 5%) มีค่าเฉลี่ยฟอสเฟต ฟอสฟอรัส มีค่าต่ำสุด อยู่ที่ 0.11 ± 0.03 mg/l ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลวัยอ่อน

นับจำนวนและชั่งน้ำหนักปลานิลวัยอ่อน ตรวจวัดการเจริญเติบโตเริ่มต้น และหลังการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง 4 สัปดาห์ ในแต่ละชุดการทดลอง โดยนำข้อมูลมาคำนวณค่าต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 12

1. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain; WG)

จากการศึกษาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 13.89 ± 0.87 และ 13.71 ± 0.20 g/ตัว ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily growth; ADG)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.50 ± 0.03 และ 0.49 ± 0.01 g/day ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 4.84 ± 0.08 และ 4.82 ± 0.01 %/day ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio; หน่วย)

จากการศึกษาอัตราการแลกเนื้อของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5%) อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.51 ± 0.02 , 0.50 ± 0.03 และ 0.51 ± 0.01 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.54 ± 0.01 ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean ± SE)

Treatment	CSS 0%			CSS 2.5 %			CSS 5%			FOS 1% + Prob
	Pro0	ProA	Prob	Pro0	ProA	Prob	Pro0	ProA	Prob	
WI (g/fish)	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.01 ^a	0.64±0.00 ^a	0.64±0.00 ^a
FW (g/fish)	12.74±0.14 ^a	13.72±0.50 ^{abc}	13.65±0.34 ^{abc}	14.30±0.40 ^{bc}	13.57±0.18 ^{abc}	13.44±0.33 ^{abc}	13.03±0.09 ^{ab}	14.53±0.86 ^c	14.35±0.20 ^{bc}	14.26±0.48 ^{ab}
WG (g/fish)	12.09±0.14 ^a	13.09±0.50 ^{abc}	13.01±0.35 ^{abc}	13.66±0.41 ^{bc}	12.93±0.18 ^{abc}	12.80±0.32 ^{abc}	12.39±0.10 ^{ab}	13.89±0.87 ^c	13.71±0.20 ^{bc}	13.62±0.48 ^{ab}
ADG (g/feed/day)	0.43±0.00 ^a	0.47±0.02 ^{ab}	0.46±0.01 ^{ab}	0.49±0.01 ^b	0.46±0.01 ^{ab}	0.45±0.01 ^{ab}	0.44±0.00 ^a	0.50±0.03 ^b	0.49±0.01 ^{ab}	0.49±0.02 ^{ab}
SGR (%/day)	4.63±0.02 ^a	4.76±0.06 ^{ab}	4.75±0.03 ^{ab}	4.82±0.04 ^b	4.74±0.01 ^{ab}	4.72±0.04 ^{ab}	4.66±0.01 ^a	4.84±0.08 ^b	4.82±0.01 ^b	4.81±0.06 ^b
FCR	0.58±0.01 ^c	0.54±0.03 ^{abc}	0.54±0.01 ^{abc}	0.51±0.02 ^a	0.54±0.1 ^{abc}	0.55±0.01 ^{bc}	0.57±0.00 ^c	0.51±0.03 ^a	0.51±0.01 ^a	0.52±0.02 ^{ab}
FE	1.73±0.02 ^a	1.87±0.07 ^{abc}	1.86±0.05 ^{abc}	1.95±0.06 ^c	1.85±0.03 ^{abc}	1.83±0.05 ^{abc}	1.77±0.01 ^{ab}	1.98±0.12 ^c	1.96±0.03 ^c	1.94±0.06 ^{bc}
SR (%)	96.67±0.00 ^a	97.78±2.22 ^a	94.44±1.11 ^a	90.00±5.77 ^a	92.22±4.84 ^a	92.22±4.84 ^a	96.67±1.92 ^a	98.89±6.76 ^a	90.00±5.77 ^a	92.22±7.78 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency ratio; หน่วย)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5%) อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 1.95 ± 0.6 , 1.98 ± 0.12 และ 1.96 ± 0.02 ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6. อัตราการรอดตาย (Survival rate: %)

จากการศึกษาอัตราการรอดตายของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมทุกสูตร มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยอยู่ในช่วง 90.00 - 98.89% ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งจำนวนปลาที่ตาย เกิดจากการบอบช้ำจากการชั่งน้ำหนัก สังเกตได้จากปลาตายหลังจากชั่งน้ำหนัก 1 วัน แสดงดังตารางที่ 12

การศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิลวัยอ่อน

ศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิลวัยอ่อนในแต่ละชุดการทดลอง หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากปลาข้างละ 3 ตัว/ชุดการทดลอง คัดเลือดจากบริเวณโคนครีบหางปลา (Caudal vein) ตัวละประมาณ 0.5 ml มาทดสอบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ แสดงผลดังตารางที่ 13

1. กิจกรรมไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

จากผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในซีรัม พบว่า พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% (CSS 2.5%) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 29.52 ± 1.99 และ 29.79 ± 0.63 Unit/ml serum ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดลอง Positive control (ชุดการทดลองที่เสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g) (FOS 1% + ProB)

ตารางที่ 13 ภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลาไนล้วยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมซีลีเนียมไอโอดีนในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลาดูการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean ± SE)

Treatment	CSS 0%		CSS 2.5 %		CSS 5%		FOS 1%				
	Pro0	ProA	ProB	Pro0	ProA	ProB	Pro0	ProA	ProB	ProB	+ ProB
Lysozyme (Unit/ml serum)	22.33±1.43 ^a	24.49±0.76 ^{ab}	25.98±0.83 ^{abc}	29.52±1.99 ^c	28.11±2.59 ^{bc}	25.64±2.32 ^{abc}	23.54±0.77 ^{ab}	29.79±0.63 ^c	24.54±1.07 ^{ab}	28.51±0.94 ^{bc}	
NBT (Unit/ml)	0.08±0.00 ^a	0.08±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a	0.09±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a
SOD (Unit/g)	65.44±3.78 ^a	68.56±2.23 ^a	86.44±0.48 ^b	99.11±1.79 ^{cd}	80.33±0.58 ^b	93.89±0.11 ^c	95.78±1.89 ^c	105.00±1.84 ^e	97.11±1.68 ^c	107.44±3.87 ^e	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



2. การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT)

จากผลการวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในเลือด พบว่า ค่า NBT ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.09 ± 0.00 Unit/ml แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

3. การวิเคราะห์ Superoxide Dismutase (SOD) Activity

จากการศึกษาปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อน พบว่า ปริมาณเอนไซม์ปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (FOS1% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 105.00 ± 1.84 และ 107.44 ± 3.87 Unit/g ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร

หลังจากอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติก (เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 2.5% และ 5% (CSS0%, CSS2.5% และ CSS5% ตามลำดับ) และโปรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0, 5×10^7 และ 1×10^8 CFU/g (Pro0, ProA และ ProB ตามลำดับ) และชุด Positive control (FOS 1% + *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g) 1 ชุดการทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างทางเดินอาหารของปลานิลวัยอ่อน (ลำไส้ และกระเพาะ) มาวิเคราะห์หาเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน เอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลส แสดงผลดังตารางที่ 14

1. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (FOS 1% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 13.43 ± 0.00 และ 11.62 ± 0.05 mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในกระเพาะของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS 5% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 8.87 ± 0.00 และ 8.82 ± 0.00 mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และภาวะแพ้อาหารของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในตู้ทดลอง
ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean ± SE)

Treatment	CSS 0%			CSS 2.5 %			CSS 5%			FOS 1%
	Pro0	ProA	ProB	Pro0	ProA	ProB	Pro0	ProA	ProB	+ ProB
Intestine (mg protein / ml)										
Trypsin	2.61±0.00 ^a	4.70±0.00 ^a	5.75±0.01 ^a	5.06±0.01 ^a	8.66±0.01 ^b	9.12±0.02 ^b	9.06±0.03 ^b	13.43±0.00 ^c	10.45±0.45 ^b	11.62±0.05 ^c
Chymotrypsin	11.21±0.15 ^a	14.29±0.00 ^b	14.44±0.03 ^b	12.81±0.00 ^a	13.75±0.02 ^a	14.84±0.00 ^b	16.65±0.03 ^c	23.95±0.02 ^d	16.65±0.03 ^c	20.00±0.00 ^d
Protease	75.25±0.05 ^a	129.15±0.02 ^{bc}	111.69±0.00 ^b	120.14±0.03 ^b	146.05±0.02 ^c	115.34±0.03 ^b	120.84±0.01 ^b	146.57±0.01 ^c	113.12±0.05 ^b	128.86±0.00 ^{bc}
Amylase	620.68±0.10 ^b	578.48±0.01 ^a	622.69±0.00 ^b	538.95±0.04 ^a	506.62±0.00 ^a	598.98±0.02 ^a	863.49±0.00 ^c	682.93±0.02 ^b	666.34±0.03 ^b	950.08±0.00 ^c
Stomach (mg protein / ml)										
Trypsin	2.60±0.00 ^a	4.66±0.00 ^a	5.06±0.00 ^a	4.57±0.00 ^a	7.52±0.00 ^b	7.70±0.00 ^b	7.52±0.00 ^b	8.87±0.00 ^c	8.82±0.00 ^c	8.19±0.03 ^{bc}
Chymotrypsin	9.57±0.02 ^a	11.15±0.00 ^a	11.71±0.00 ^{ab}	10.23±0.00 ^a	10.69±0.00 ^a	12.16±0.00 ^b	14.27±0.01 ^b	17.53±0.02 ^c	14.27±0.01 ^b	15.76±0.00 ^c
Protease	16.65±0.01 ^a	24.40±0.40 ^a	24.15±0.15 ^a	23.35±0.1 ^a	40.93±0.03 ^{bc}	30.71±0.01 ^b	24.05±0.05 ^a	63.69±0.01 ^c	17.28±0.01 ^a	26.86±0.02 ^b
Amylase	712.15±0.01 ^a	605.57±0.00 ^a	1073.77±0.00 ^c	698.73±0.01 ^{ab}	1025.61±0.00 ^c	812.44±0.01 ^b	814.81±0.00 ^b	434.25±0.01 ^a	950.61±0.00 ^{bc}	1098.25±0.00 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โคโมทริปซินในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (FOS 1% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 23.95 ± 0.02 และ 20.00 ± 0.00 mg Protein/ml ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โคโมทริปซินในกระเพาะของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (FOS 1% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 17.53 ± 0.02 และ 15.76 ± 0.00 mg Protein/ml ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

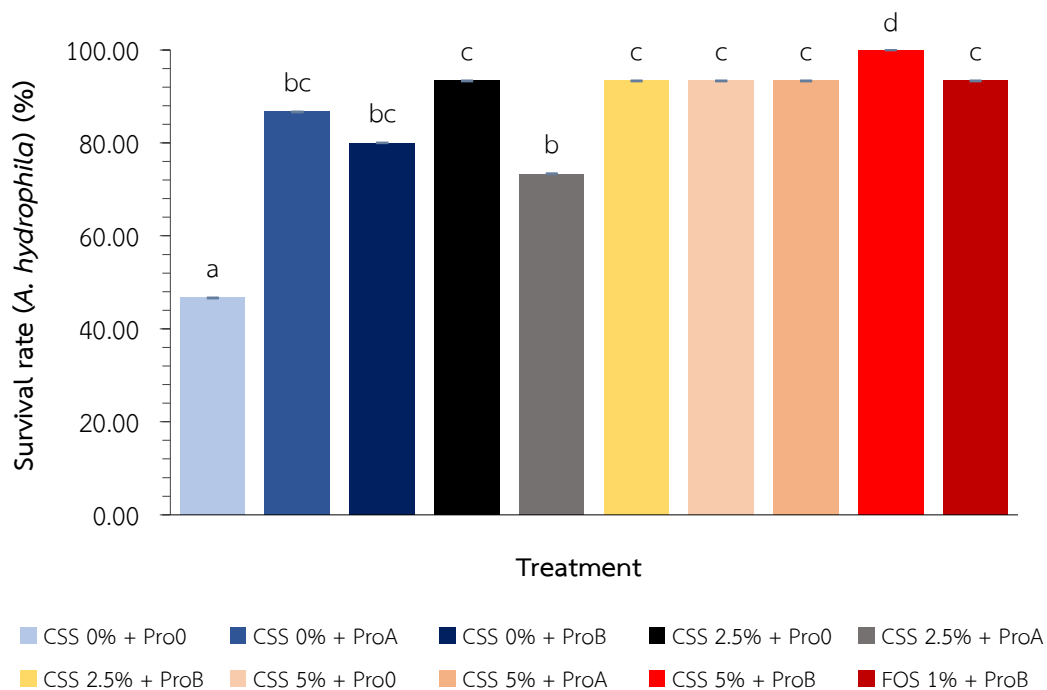
จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 2.5% + ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 146.05 ± 0.02 และ 146.56 ± 0.01 mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ในกระเพาะของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 63.69 ± 0.01 mg Protein/ml ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (FOS1% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 863.49 ± 0.00 และ 950.08 ± 0.00 mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในกระเพาะของปลานิลวัยอ่อน พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (ProB) อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (FOS1% + ProB) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ $1,073.77 \pm 0.00$, $1,025.61 \pm 0.00$ และ $1,098.25 \pm 0.00$ mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*

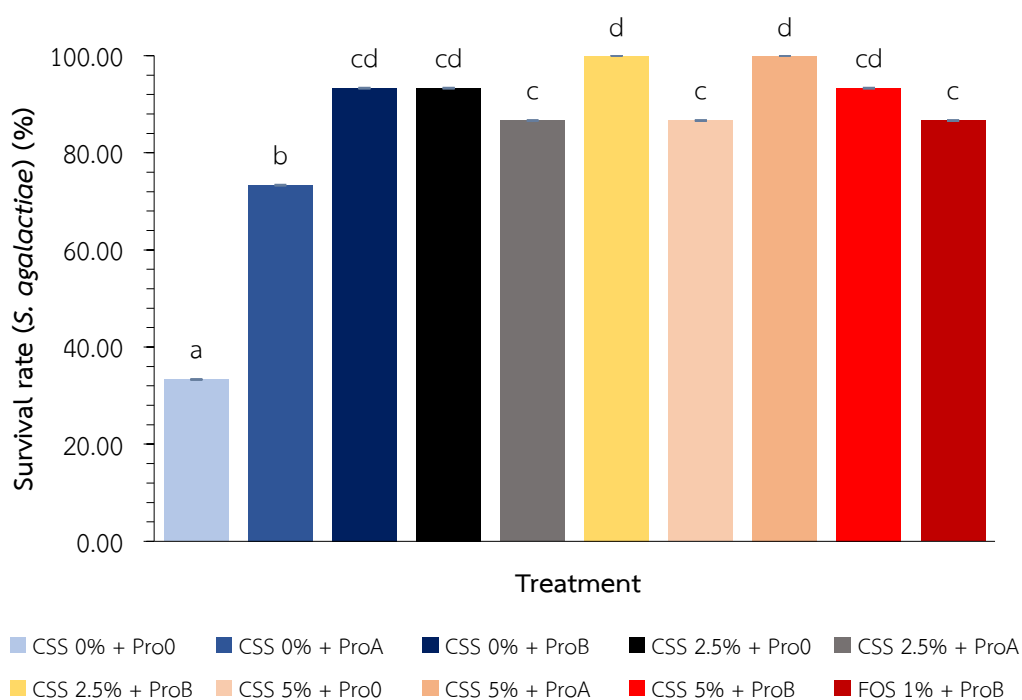
จากผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. Agalactiae* โดยให้อาหารทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำลูกปลานิลมาฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^6 CFU/ml จำนวน 10 ชุดการทดลอง การทดลองละ 15 ตัว ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 ml สังเกตและเก็บข้อมูลอัตราการรอดในระยะเวลา 14 วันหลังการฉีดเชื้อ พบว่า ความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลวัยอ่อนของชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS5% + ProB) มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100.00% พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่มีอัตราการรอดเพียง 46.66% แสดงดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* (%) ของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ในปลานิลวัยอ่อนของชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ผสม *B. subtilis* 1×10^8 CFU/g (CSS2.5% + ProB) และชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100.00% พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่มีอัตราการรอดเพียง 33.33% แสดงดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus agalactiae* (%) ของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในตู้ทดลอง ระยะเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงค่า *P*-Value (ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) ขึ้นอยู่กับพรีไบโอติก และโพรไบโอติก ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริม ซินไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์

	Prebiotic	Probiotic	Synbiotic
ด้านการเจริญเติบโต			
Weight gain (g/fish)	0.394	0.302	0.026*
ADG (g/day)	0.319	0.301	0.026*
FCR	0.337	0.257	0.020*
SGR (%)	0.378	0.190	0.015*
ด้านภูมิคุ้มกัน			
Lysozyme activity	0.026*	0.139	0.042*
NBT	0.071	0.723	0.166
SOD	<0.000**	0.001*	<0.000**
ด้านเอนไซม์ย่อยอาหาร			
Trypsin	<0.000**	<0.000**	<0.000**
Chymotrypsin	<0.000**	<0.000**	<0.000**
Protease	<0.000**	<0.000**	<0.000**
Amylase	<0.000**	<0.000**	<0.000**

หมายเหตุ * แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

จากการวิเคราะห์ Two-way ANOVA (ตารางที่ 15) แสดงให้เห็นว่า หลังการเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารเสริมพรีไบโอติก โพรไบโอติก และซินไบโอติกได้ 4 สัปดาห์ ในด้านการเจริญเติบโต พบว่า การเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว และโพรไบโอติกอย่างเดียว ไม่มีผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลา อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่เมื่อมีการนำพรีไบโอติก และโพรไบโอติกมาผสมกัน (ซินไบโอติก) พบว่ามีผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลา อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

การศึกษาในด้านภูมิคุ้มกันของปลานิลวัยอ่อน พบว่า การเสริมโพรไบโอติกอย่างเดียว ไม่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด และประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม แต่มีผลต่อค่าปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อน ในขณะที่ผลของการเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว ส่งผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด และค่าปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) และผลของการเสริมพรีไบโอติก และโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด และค่าปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD)

ในด้านกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร พบว่า ผลการเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว โพรไบโอติกอย่างเดียว และผลของการเสริมพรีไบโอติก ร่วมกับโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่าเอนไซม์ ทริปซิน เอนไซม์โคโมทริปซิน เอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์อะไมเลส

จากผลการวิเคราะห์ Two-way ANOVA สามารถอธิบายได้ว่า เสริมพรีไบโอติกร่วมกับ โพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่าการเจริญเติบโต ค่าภูมิคุ้มกัน และค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิลวัยอ่อน มากกว่าการเสริมพรีไบโอติก หรือโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการเสริมซินไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองการอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในกระชัง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

วางแผนการทดลอง แบบแฟกทอเรียล 3x2 โดยศึกษาผลของพรีไบโอติกจากเชื้อหุ้มเมล็ด กากแพะแบบผง: CSSp ที่ระดับความเข้มข้น 0.25% (CSSp 0.25%) (คัดเลือกมาจากการทดลองในงานวิจัยของปี 62) เชื้อหุ้มเมล็ดกากแพะหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultrar conc : CSS ที่ระดับความเข้มข้น 5% (CSS5%) (คัดเลือกมาจากการทดลองที่ 1) และผสมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ที่ระดับความเข้มข้น 1% (FOS1%) และโพรไบโอติก (*B. subtilis*) ที่ปริมาณเซลล์ 0 และ 5×10^7 CFU/g (Pro0 และ ProA ตามลำดับ) ทำการทดลองโดยผสมอาหารให้ปลากินเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อนุบาลในกระชังขนาด 1x1 m จำนวน 24 กระชัง โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (Control) : อาหารเม็ดสำเร็จรูป

ชุดการทดลองที่ 2 ProA : อาหารเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 3 CSSp 0.25% : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกากแพะแบบผง 0.25%

ชุดการทดลองที่ 4 CSSp 0.25% + ProA : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกากแพะแบบผง 0.25% ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 5 CSS 5% : อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกากแพะ 5%

ชุดการทดลองที่ 6 CSS 5% + ProA : อาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

ชุดการทดลองที่ 7 FOS 1%: อาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 %

ชุดการทดลองที่ 8 FOS 1% + ProA : อาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1 % ผสม จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 5×10^7 CFU/g

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ

คุณภาพน้ำเฉลี่ยในบ่อทดลอง ระหว่างการทดลองอนุบาลเลี้ยงปลานิลวัยอ่อน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยทำการเก็บค่าเริ่มต้นก่อนการอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อนและเก็บค่าคุณภาพน้ำในบ่อทดลอง เก็บทุก ๆ สัปดาห์ หลังการอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน ได้ผลดังตารางที่ 16

1. อุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิน้ำ (Air and Water temperature)

ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิอากาศในบ่อเลี้ยงปลานิลวัยอ่อน พบว่า ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิอากาศสูงสุดใน สัปดาห์เริ่มต้นเท่ากับ 32.50 ± 0.00 °C ในขณะที่ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิอากาศ หลังเลี้ยงด้วยอาหาร ทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 27.00 ± 0.00 °C ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำ พบว่า ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำสูงสุดในสัปดาห์เริ่มต้นเท่ากับ 31.53 ± 0.09 °C ในขณะที่ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 6 มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 26.20 ± 0.0 °C ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

2. ความโปร่งแสง (Transparency)

ค่าความโปร่งแสงของน้ำ พบว่า ความโปร่งแสงของน้ำมีค่าสูงสุด หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 มีค่าเท่ากับ 90.00 ± 0.00 cm ในขณะที่ความโปร่งแสงของน้ำต่ำสุดในสัปดาห์ แรก มีค่าเท่ากับ 30.00 ± 0.00 cm ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solid)

ค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด พบว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด น้ำสูงสุดในสัปดาห์แรก มีค่าเท่ากับ 32.83 ± 1.42 mg/l ในขณะที่หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองใน สัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ เท่ากับ 8.94 ± 0.96 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำสุด และพบความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 16 คุณภาพน้ำเฉลี่ยระหว่างการทำทดลองในบ่อทดลองอนุบาลลูกปลาชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทำทดลองที่เลี้ยงในกระชังทดลอง
 ระยะเวลากการเลี้ยง 4 สัปดาห์ (Mean±SE)

ค่า มาตรฐาน	Week								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Air temp. (°C)	31.53±0.00 ^d	28.70±0.00 ^c	27.23±0.00 ^b	27.10±0.00 ^b	27.33±0.00 ^b	28.20±0.00 ^c	26.20±0.00 ^a	26.50±0.00 ^a	26.40±0.00 ^a
Water temp. (°C)	23-32	31.53±0.09 ^d	28.07±0.00 ^c	27.23±0.03 ^b	27.10±0.00 ^b	27.33±0.08 ^b	28.20±0.00 ^c	26.20±0.00 ^a	26.50±0.00 ^a
Transparency (cm.)		30.00±0.00 ^a	45.00±0.00 ^a	50.00±0.00 ^a	50.00±0.00 ^{ab}	50.00±0.00 ^{ab}	60.00±0.00 ^a	70.00±0.00 ^{bc}	90.00±0.00 ^c
TSS (mg/l)		32.83±1.42 ^e	8.94±0.96 ^a	11.94±0.65 ^{ab}	26.28±1.24 ^d	17.22±0.34 ^c	16.56±1.75 ^c	14.11±1.26 ^{bc}	12.94±0.91 ^b
pH	5-9	7.17±0.04 ^a	7.12±0.01 ^a	7.12±0.01 ^a	7.16±0.01 ^a	7.48±0.01 ^c	7.17±0.00 ^a	7.23±0.00 ^b	7.35±0.00 ^{bc}
DO (mg/L)	>3	5.42±0.21 ^a	5.46±0.26 ^a	5.47±0.30 ^a	5.53±0.41 ^a	4.53±0.49 ^a	4.33±0.56 ^a	4.19±0.35 ^a	4.86±0.34 ^a
Alkalinity (mg/l)		87.56±3.16 ^c	96.11±0.22 ^{cd}	101.33±0.77 ^d	109.67±0.96 ^d	76.89±1.11 ^a	79.89±0.29 ^{ab}	82.44±0.99 ^{ab}	86.22±0.40 ^{bc}
Hardness (mg/l)		67.58±33.02 ^a	105.99±0.58 ^{bc}	111.44±1.07 ^{bcd}	91.65±1.82 ^{ab}	126.68±0.48 ^{bcd}	130.91±0.78 ^{cd}	147.70±1.90 ^d	127.57±1.25 ^{bcd}
NH ₃ -N (mg/l)	<0.5	0.02±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.03±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.03±0.00 ^b	0.02±0.00 ^{ab}	0.02±0.00 ^{ab}
NO ₂ ⁻ -N (mg/l)	<0.1	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.01±0.00 ^{ab}	0.05±0.00 ^c	0.02±0.00 ^b	0.01±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ab}
NO ₃ ⁻ -N (mg/l)		0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.00 ^b	0.02±0.00 ^b	0.02±0.00 ^b	0.05±0.00 ^c	0.01±0.00 ^a
Total Phosphorus (mg/l)		0.14±0.00 ^e	0.11±0.01 ^d	0.10±0.00 ^d	0.03±0.00 ^a	0.03±0.00 ^a	0.04±0.01 ^b	0.04±0.00 ^b	0.06±0.00 ^c
PO ₄ ³⁻ -P (mg/l)	<0.6	0.01±0.00 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.01±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ab}	0.02±0.00 ^b
Chlorophyll-a (µg/l)		14.02±1.07 ^c	9.21±0.69 ^{ab}	7.40±0.13 ^a	27.33±1.19 ^d	7.54±1.06 ^a	8.51±0.29 ^a	11.42±0.51 ^b	9.56±0.88 ^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)

จากผลค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่า ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างที่สูงสุด หลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองได้ 4 สัปดาห์เท่ากับ 7.48 ± 0.01 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 1 เท่ากับ 7.12 ± 0.01 มีค่าต่ำสุด ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen: DO)

ค่าเฉลี่ยออกซิเจนที่ละลายในน้ำ พบว่า ค่าเฉลี่ยสูงสุด หลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 5.53 ± 0.41 mg/l ที่ค่าเฉลี่ยออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำสุด หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 4.19 ± 0.35 mg/l ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. ความเป็นด่าง (Alkalinity)

ค่าความเป็นด่างของน้ำ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 109.67 ± 0.96 mg/l ในขณะที่ค่าความเป็นด่างของน้ำต่ำสุด หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 76.89 ± 1.11 mg/l ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. ความกระด้าง (Hardness)

ค่าความกระด้างของน้ำ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 147.70 ± 1.90 mg/l ในขณะที่ค่าความกระด้างของน้ำต่ำสุดในสัปดาห์เริ่มต้น เท่ากับ 67.58 ± 33.02 mg/l ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6. แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (Ammonia nitrogen: $\text{NH}_3\text{-N}$)

ค่าแอมโมเนีย-ไนโตรเจนของน้ำ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.03 ± 0.00 mg/l ในขณะที่สัปดาห์เริ่มต้นและหลังเลี้ยงปลา 1 สัปดาห์ เท่ากับ 0.01 ± 0.00 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำสุด และพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

7. ไนไตรท์ - ไนโตรเจน (Nitrite nitrogen: $\text{NO}_2\text{-N}$)

ค่าไนไตรท์ - ไนโตรเจนของน้ำ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.05 ± 0.00 mg/l ในขณะที่สัปดาห์เริ่มต้นและหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 1 สัปดาห์ เท่ากับ 0.00 ± 0.00 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำสุด และพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

8. ไนเตรท-ไนโตรเจน (Nitrate nitrogen: $\text{NO}_3\text{-N}$)

ค่าไนเตรท -ไนโตรเจนของน้ำ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 0.05 ± 0.00 mg/l ในขณะที่สัปดาห์เริ่มต้นและหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 8 สัปดาห์ เท่ากับ 0.01 ± 0.00 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำสุด และพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

9. ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (Phosphate phosphorus: $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)

ค่าฟอสเฟต-ฟอสฟอรัสของน้ำ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 0.02 ± 0.00 mg/l ในขณะที่สัปดาห์เริ่มต้นและหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 1 สัปดาห์ เท่ากับ 0.00 ± 0.00 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำสุด และพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

10. ฟอสฟอรัสรวม (Total phosphorus)

ค่าเฉลี่ยฟอสฟอรัสรวม พบว่า มีค่าสูงสุดในสัปดาห์เริ่มต้นเท่ากับ 0.14 ± 0.00 mg/l ในขณะที่หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 4 มีเท่ากับ 0.03 ± 0.00 mg/l ซึ่งมีค่าต่ำสุด ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

11. คลอโรฟิลล์-เอ (Chlorophyll-a)

ค่าเฉลี่ยคลอโรฟิลล์-เอ พบว่า มีค่าสูงสุดหลังเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 27.33 ± 1.19 $\mu\text{g/l}$ ในขณะที่หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 7.40 ± 0.13 $\mu\text{g/l}$ ซึ่งมีค่าต่ำสุด และพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลวัยอ่อน

นับจำนวนและชั่งน้ำหนักลูกปลานิลวัยอ่อน วัดการเจริญเติบโตทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง 8 สัปดาห์ ในแต่ละชุดการทดลอง โดยนำข้อมูลมาคำนวณค่าต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 17

1. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain; WG)

จากการศึกษาน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของลูกปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 6.99 ± 0.04 และ 6.68 ± 0.07 g/ตัว ตามลำดับ โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 27.75 ± 0.29 และ 27.72 ± 0.51 g/ตัว ตามลำดับ โดยน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นระหว่างหลังให้อาหาร 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นปลานิลวัยอ่อนหลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ สูงกว่าหลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily growth; ADG)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของลูกปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลองครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 0.25 ± 0.00 และ 0.25 ± 0.00 g/day ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลองครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.50 ± 0.01 g/day ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ระหว่างหลังให้อาหารทดลอง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของปลานิลวัยอ่อนหลังให้อาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สูงกว่าหลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในกระชังที่ระยะเวลาเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (Mean ± SE)

Treatment	week	Control	ProA	CSSp 0.25 %		CSS 5%		FOS 1%	
				ProO	ProA	ProO	ProA	ProO	ProA
IW (g/fish)		0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a	0.40±0.05 ^a
FW (g/fish)	4 th	6.67±0.25 ^{aA}	7.27±0.12 ^{aA}	7.14±0.41 ^{aA}	7.04±0.51 ^{aA}	7.32±0.29 ^{aA}	7.39±0.04 ^{aA}	7.06±0.41 ^{aA}	7.38±0.07 ^{aA}
	8 th	20.57±0.50 ^{ab}	25.79±0.67 ^{bb}	27.19±0.19 ^{cb}	27.19±0.12 ^{cb}	27.32±0.09 ^{cb}	28.15±0.29 ^{cb}	27.31±0.58 ^{cb}	28.12±0.51 ^{cb}
WG (g/fish)	4 th	6.27±0.25 ^{aA}	6.87±0.12 ^{aA}	6.74±0.41 ^{aA}	6.64±0.51 ^{aA}	6.92±0.29 ^{aA}	6.99±0.04 ^{aA}	6.66±0.41 ^{aA}	6.98±0.07 ^{aA}
	8 th	20.17±0.50 ^{ab}	25.39±0.67 ^{bb}	26.79±0.19 ^{cb}	26.79±0.12 ^{cb}	26.92±0.09 ^{cb}	27.75±0.29 ^{cb}	26.91±0.58 ^{cb}	27.72±0.51 ^{cb}
ADG (g/feed/day)	4 th	0.22±0.01 ^{aA}	0.25±0.00 ^{aA}	0.24±0.01 ^{aA}	0.24±0.02 ^a	0.25±0.01 ^{aA}	0.25±0.00 ^{aA}	0.24±0.01 ^{aA}	0.25±0.00 ^{aA}
	8 th	0.36±0.01 ^{ab}	0.45±0.01 ^{bb}	0.48±0.00 ^{cb}	0.48±0.02 ^{cb}	0.48±0.00 ^{cb}	0.50±0.01 ^{cb}	0.48±0.01 ^{cb}	0.50±0.01 ^{cb}
SGR (%/day)	4 th	4.36±0.06 ^{aA}	4.49±0.05 ^{aA}	4.47±0.09 ^{aA}	4.44±0.11 ^{aA}	4.51±0.06 ^{aA}	4.52±0.01 ^{aA}	4.45±0.09 ^{aA}	4.52±0.01 ^{aA}
	8 th	5.62±0.23 ^{ab}	5.77±0.38 ^{ab}	5.78±0.39 ^{ab}	5.77±0.38 ^{ab}	5.78±0.38 ^{ab}	5.80±0.41 ^{ab}	5.76±0.37 ^{ab}	5.78±0.38 ^{ab}
FCR	4 th	0.58±0.02 ^{aA}	0.52±0.01 ^{aA}	0.54±0.03 ^{aA}	0.55±0.04 ^{aA}	0.52±0.02 ^{aA}	0.51±0.00 ^{aA}	0.54±0.03 ^{aA}	0.52±0.00 ^{aA}
	8 th	0.94±0.02 ^{bb}	0.75±0.02 ^{bb}	0.71±0.05 ^{abb}	0.71±0.00 ^{abb}	0.71±0.00 ^{abb}	0.68±0.01 ^{ab}	0.71±0.02 ^{abb}	0.69±0.01 ^{ab}
FE	4 th	1.74±0.07 ^{aA}	1.91±0.03 ^{aA}	1.87±0.11 ^{aA}	1.85±0.14 ^{aA}	1.92±0.08 ^{aA}	1.94±0.01 ^{aA}	1.85±0.12 ^{aA}	1.94±0.02 ^{aA}
	8 th	1.06±0.03 ^{ab}	1.34±0.04 ^{bb}	1.41±0.01 ^{cb}	1.41±0.01 ^{cb}	1.42±0.00 ^{cb}	1.46±0.02 ^{cb}	1.42±0.03 ^{cb}	1.46±0.03 ^{cb}
SR (%)	4 th	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}
	8 th	92.86±7.14 ^{ab}	94.29±3.52 ^{bb}	96.67±3.33 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	97.14±2.86 ^{aA}	97.38±1.67 ^{aA}	100.00±0.00 ^{aA}	95.48±0.86 ^{aA}

หมายเหตุ (Mean±SE) ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (อักษรพิมพ์เล็ก: แตกต่างระหว่างชุดการทดลอง; อักษรพิมพ์ใหญ่: แตกต่างกันระหว่างระยะเวลา)

3. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลวัยอ่อนหลังให้อาหารทดลองครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 4.52 ± 0.01 %/วัน แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลองครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 5.80 ± 0.41 %/day ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะระหว่างหลังให้อาหารทดลอง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลวัยอ่อนหลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์สูงกว่า 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR)

จากการศึกษาอัตราการแลกเนื้อของปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลองครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าอัตราการแลกเนื้อดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.51 ± 0.00 แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลองครบ 8 สัปดาห์ พบว่า พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีที่ต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.68 ± 0.01 และ 0.69 ± 0.01 ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการแลกเนื้อระหว่างหลังให้อาหารทดลอง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการแลกเนื้อของปลานิลวัยอ่อนหลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ มีค่าดีกว่า 8 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency ratio; FE)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลอง ครบ 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.94 ± 0.01 และ 1.94 ± 0.02 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลองครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.46 ± 0.02 และ 1.46 ± 0.03 ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้อาหารระหว่างหลังให้อาหารทดลอง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลวัยอ่อนให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์สูงกว่า 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

6. อัตราการรอดตาย (Survival Rate)

จากการศึกษาอัตราการรอดตายของปลานิลหลังการให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลในแต่ละชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย 100 % ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่เมื่อให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดตายของปลานิลวัยอ่อน อยู่ในช่วง 90.00 ถึง 100.00% ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

การศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิล

ศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง (ไม่เก็บค่าเริ่มต้นของการทดลอง เนื่องจากปลานิลมีขนาดเล็ก ไม่สามารถเจาะเลือดได้ จึงใช้ชุดควบคุมเป็นตัวเปรียบเทียบแทน) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากปลาซ้ำละ 3 ตัวต่อชุดการทดลอง ดูดเลือดจากบริเวณโคนครีบทอง (Caudal vein) ตัวละประมาณ 0.5 ml มาทดสอบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 18

1. กิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme Activity)

ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือดหลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 21.47 ± 0.53 Unit/ml serum ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลองครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 46.78 ± 0.80 Unit/ml serum ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือดระหว่างหลังให้อาหารทดลอง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือดของปลานิลวัยอ่อนหลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์สูงกว่า 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT)

ผลการวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัมหลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 2.5% + ProA) อาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.09 ± 0.00 , 0.09 ± 0.01 และ 0.09 ± 0.00 Unit/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) อาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) อาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% (FOS 1%) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1%+ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.15 ± 0.01 Unit/ml พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัมระหว่างหลังให้อาหารทดลอง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ค่าประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัมของปลานิลวัยอ่อนให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์สูงกว่า 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. การวิเคราะห์ Superoxide Dismutase (SOD) Activity (Unit/g)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับของปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่าปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 153.11 ± 3.75 Unit/g ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับสูงที่สุด เท่ากับ 210.33 ± 12.10 Unit/g ซึ่งพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับระหว่างหลังเลี้ยง 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับของปลานิลวัยอ่อนหลังให้ทดลอง 8 สัปดาห์สูงกว่า 4 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 18 ภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลาโนลิวออนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (Mean±SE)

Treatment	Week	Control	ProA	CSSp 0.25%		CSS 5%		FOS 1%	
				ProO	ProA	ProO	ProA	ProO	ProA
Lysozyme (Unit/ml serum)	4 th	16.82±1.39 ^{aA}	20.68±1.53 ^{bA}	19.42±0.49 ^{bA}	19.98±0.65 ^{bA}	21.90±0.32 ^{bA}	21.47±0.53 ^{bA}	20.92±0.33 ^{bA}	21.1±0.23 ^{bA}
	8 th	30.90±1.24 ^{aB}	38.28±0.83 ^{aB}	41.53±2.14 ^{bA}	43.95±0.39 ^{bcdB}	44.25±1.02 ^{bcdB}	46.8±0.80 ^{dB}	41.87±0.62 ^{bCB}	45.26±0.12 ^{cd}
NBT (Unit/ml)	4 th	0.06±0.00 ^{aA}	0.08±0.00 ^{bCA}	0.07±0.00 ^{bA}	0.09±0.00 ^{CA}	0.08±0.00 ^{bCA}	0.09±0.01 ^{CA}	0.08±0.00 ^{bCA}	0.09±0.00 ^{CA}
	8 th	0.09±0.01 ^{aA}	0.13±0.00 ^{bB}	0.13±0.00 ^{bB}	0.14±0.00 ^{bCB}	0.15±0.01 ^{CB}	0.15±0.01 ^{CB}	0.15±0.01 ^{CB}	0.15±0.01 ^{CB}
SOD (Unit/g)	4 th	99.44±3.60 ^{aA}	125.00±0.69 ^{bA}	119.11±3.56 ^{bA}	135.78±7.04 ^{bCA}	142.56±8.57 ^{cdA}	153.11±3.75 ^{dA}	132.89±5.25 ^{bCA}	146.56±5.08 ^{cdA}
	8 th	102.67±6.00 ^{aA}	137.33±6.64 ^{abB}	133.89±5.02 ^{aB}	143.78±4.16 ^{abCB}	164.00±6.45 ^{CB}	210.33±12.10 ^{eB}	157.78±2.39 ^{bCB}	185.67±6.19 ^{dB}

หมายเหตุ (Mean±SE) ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

(อักษรพิมพ์เล็ก: แสดงระหว่างชุดการทดลอง; อักษรพิมพ์ใหญ่: แสดงต่างกันระหว่างระยะเวลา)

กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร

หลังจากเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างทางเดินอาหารของปลานิลวัยอ่อน (ลำไส้ และกระเพาะ) มาวิเคราะห์หาเอนไซม์ ทริปซิน ไคโมทริปซิน เอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลส ดังแสดงในตารางที่ 19

1. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแพ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 13.26 ± 0.02 และ 13.37 ± 0.01 mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 19)

หลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในลำไส้ และกระเพาะอาหาร ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแพ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าลดลง และมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 9.88 ± 0.02 และ 10.25 ± 0.01 mg Protein/ml ตามลำดับ ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในลำไส้ และกระเพาะของปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแพ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารมีเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าสูงที่สุด พบในลำไส้ เท่ากับ 24.84 ± 0.02 และ 24.47 ± 0.02 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่พบในกระเพาะอาหาร เท่ากับ 25.51 ± 0.01 และ 25.16 ± 0.02 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อน และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแพ 5% และ *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารมีเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1% + ProA) มีค่าลดลง และมีค่าสูงที่สุดพบในลำไส้ เท่ากับ 13.75 ± 0.01 และ 13.84 ± 0.01 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่พบในกระเพาะอาหาร เท่ากับ 16.06 ± 0.00 และ 15.32 ± 0.01 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 19 กิจกรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และการเพาะอาหารของปลาชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ (Mean ± SE)

Treatment	Week	Control	CSSp 0.25%			CSS 5%			FOS 1%		
			ProA	ProB	ProC	ProA	ProB	ProC	ProA	ProB	ProC
Intestine (mg protein / ml)											
Trypsin	4 th	4.54±0.01 ^{aA}	9.03±0.00 ^{bA}	4.85±0.00 ^{aA}	7.38±0.00 ^{abA}	8.37±0.01 ^{bA}	13.26±0.02 ^{cA}	7.55±0.02 ^{abA}	10.46±0.01 ^{bcA}		
	8 th	1.43±0.00 ^{aA}	7.08±0.00 ^{bA}	4.39±0.00 ^{aA}	6.19±0.01 ^{bA}	7.71±0.01 ^{bA}	9.88±0.02 ^{cA}	7.29±0.01 ^{bA}	9.42±0.01 ^{bcA}		
Chymotrypsin	4 th	9.16±0.02 ^{aA}	13.47±0.01 ^{bA}	11.93±0.00 ^{aA}	12.37±0.02 ^{abA}	16.68±0.01 ^{bA}	24.84±0.02 ^{cA}	15.68±0.01 ^{bA}	24.47±0.02 ^{cA}		
	8 th	9.62±0.02 ^{aA}	12.84±0.00 ^{bcA}	10.45±0.44 ^{aA}	10.84±0.02 ^{abA}	11.01±0.00 ^{bA}	13.75±0.01 ^{cA}	11.37±0.01 ^{bA}	13.84±0.01 ^{cA}		
Protease	4 th	74.53±0.03 ^{aA}	90.12±0.02 ^{bA}	85.68±0.08 ^{aA}	87.74±0.06 ^{abA}	113.38±0.01 ^{cA}	117.89±0.03 ^{cA}	90.66±0.01 ^{bA}	110.96±0.03 ^{bcA}		
	8 th	16.66±0.02 ^{abB}	39.38±0.02 ^{dB}	17.60±0.00 ^{abB}	29.44±0.00 ^{abB}	32.00±0.00 ^{abB}	43.52±0.00 ^{abB}	34.56±0.00 ^{abB}	36.48±0.00 ^{abB}		
Amylase	4 th	882.47±0.03 ^{aA}	1,004.59±0.04 ^{abA}	948.26±0.03 ^{aA}	924.85±0.04 ^{abA}	1,091.96±0.03 ^{bA}	1,275.37±0.01 ^{cA}	1,084.05±0.01 ^{bA}	1,111.95±0.02 ^{bcA}		
	8 th	404.26±0.02 ^{abB}	727.17±0.00 ^{bbB}	532.17±0.02 ^{aB}	716.13±0.02 ^{bbB}	760.36±0.03 ^{bbB}	1,087.96±0.02 ^{cbB}	727.16±0.01 ^{bbB}	812.39±0.00 ^{bbB}		
Stomach (mg protein / ml)											
Trypsin	4 th	4.33±0.00 ^{aA}	9.65±0.02 ^{bA}	7.39±0.00 ^{aA}	7.68±0.01 ^{abA}	9.65±0.02 ^{bA}	13.37±0.01 ^{cA}	9.47±0.01 ^{bA}	10.53±0.01 ^{bcA}		
	8 th	3.85±0.00 ^{aA}	8.35±0.02 ^{bA}	5.17±0.03 ^{abA}	7.26±0.01 ^{bA}	9.28±0.01 ^{bcA}	10.25±0.01 ^{cA}	9.28±0.01 ^{bcA}	9.92±0.02 ^{bcA}		
Chymotrypsin	4 th	11.84±0.01 ^{aA}	14.68±0.01 ^{bA}	13.12±0.00 ^{aA}	13.59±0.01 ^{abA}	17.97±0.02 ^{bA}	25.51±0.01 ^{cA}	16.61±0.00 ^{bA}	25.16±0.02 ^{cA}		
	8 th	10.47±0.01 ^{aA}	13.30±0.00 ^{bA}	11.19±0.00 ^{aA}	12.11±0.00 ^{abA}	12.47±0.01 ^{bA}	16.06±0.00 ^{cA}	12.96±0.02 ^{bA}	15.32±0.01 ^{cA}		
Protease	4 th	38.72±0.00 ^{aA}	60.16±0.00 ^{bA}	49.71±0.00 ^{aA}	56.11±0.00 ^{abA}	80.75±0.00 ^{cA}	82.13±0.00 ^{cA}	70.73±0.00 ^{abA}	81.46±0.14 ^{cA}		
	8 th	8.49±0.15 ^{abB}	17.47±0.13 ^{bbB}	11.58±0.26 ^{abB}	13.46±0.02 ^{bbB}	16.34±0.02 ^{bbB}	24.33±0.01 ^{cbB}	15.57±0.21 ^{bbB}	23.40±0.04 ^{cbB}		
Amylase	4 th	929.29±0.00 ^{aA}	1,198.56±0.04 ^{bA}	961.67±0.01 ^{aA}	1,120.15±0.06 ^{bA}	1,234.86±0.01 ^{bA}	1,415.39±0.01 ^{cA}	1,242.47±0.01 ^{bA}	1,392.73±0.02 ^{cA}		
	8 th	318.16±0.02 ^{abB}	668.77±0.02 ^{cbB}	405.02±0.01 ^{abbB}	424.77±0.00 ^{bbB}	542.44±0.03 ^{bbB}	668.77±0.03 ^{cbB}	536.88±0.01 ^{bbB}	556.62±0.00 ^{bbB}		

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SE ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 113.38 ± 0.01 และ 117.83 ± 0.03 mg Protein/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในกระเพาะอาหาร ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% (CSS 5%) อาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1%+ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 80.75 ± 0.00 , 82.13 ± 0.00 และ 81.46 ± 0.14 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 19)

หลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (ProA) และอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 39.38 ± 0.02 และ 43.52 ± 0.00 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1%+ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 24.33 ± 0.01 และ 23.40 ± 0.04 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 19)

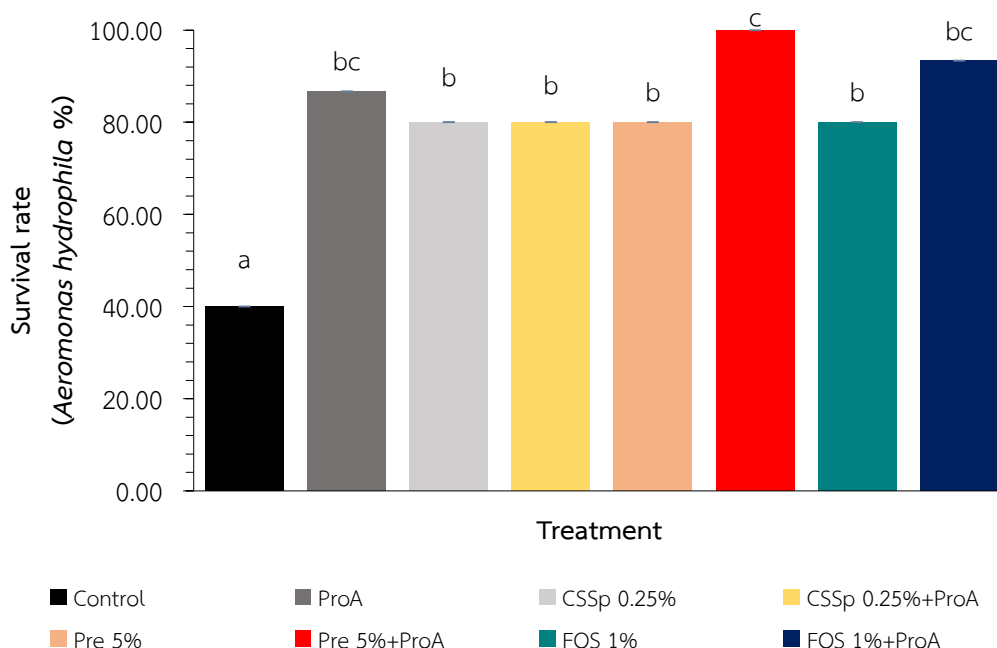
3. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน หลังให้อาหารทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในลำไส้ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $1,275.37 \pm 0.01$ mg Protein/ml ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในกระเพาะของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) และอาหารเสริมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (FOS 1%+ProA) มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ $1,415.39 \pm 0.01$ และ $1,392.73 \pm 0.02$ mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังให้อาหารทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าสูงสุด เท่ากับ $1,087.96 \pm 0.02$ และ 668.77 ± 0.03 mg Protein/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*

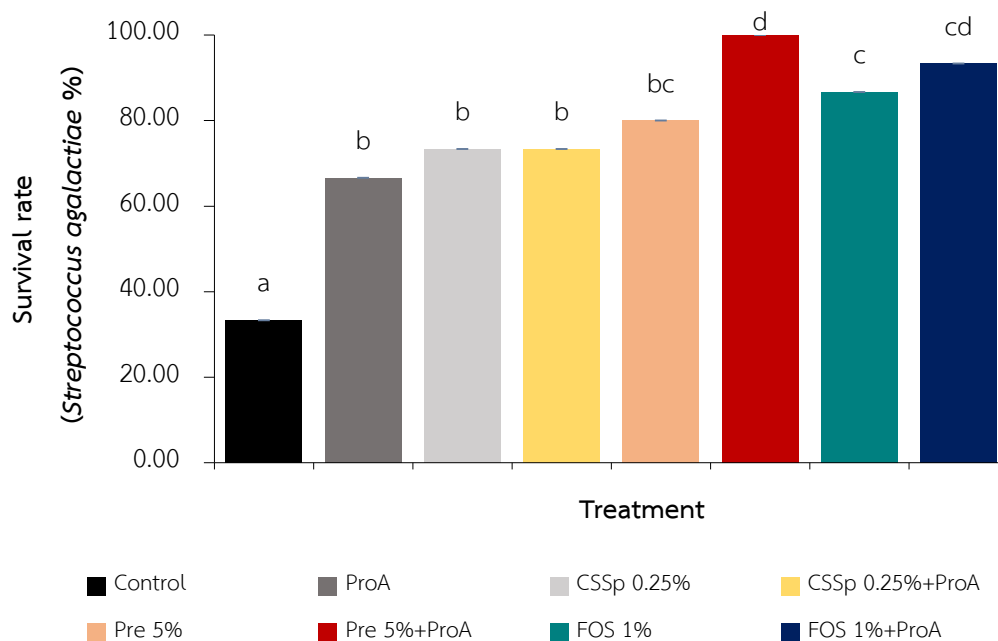
จากผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* โดยให้อาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนำปลานิลวัยอ่อนมาฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^6 CFU/ml จำนวน 8 ชุดการทดลอง การทดลองละ 15 ตัว ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 ml สังเกตและเก็บข้อมูลอัตราการรอดในระยะเวลา 14 วันหลังการฉีดเชื้อ พบว่า ความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% และ *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100.00% ในขณะที่ปลานิลวัยอ่อนในชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 40.00% พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 32



ภาพที่ 32 ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* (%) (Mean±SD) ของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ภายหลังจากการติดเชื้อ ระยะเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ในปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% และ *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100.00% ในขณะที่ปลานิลวัยอ่อนในชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 33.33% พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 33



ภาพที่ 33 ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus agalactiae* (%) (Mean±SD) ของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองที่เลี้ยงในกระชัง ภายหลังจากการฉีดเชื้อ ระยะเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงค่า *P*-Value (ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) ขึ้นอยู่กับพรีไบโอติก และโพรไบโอติก ของปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริม ซินไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในกระชัง ระยะเวลาการเลี้ยง 8 สัปดาห์

		Prebiotic	Probiotic	Synbiotic
ด้านการเจริญเติบโต				
Weight gain (g/fish)	1 st month	0.639	0.324	0.702
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000
ADG (g/day)	1 st month	0.829	0.273	0.361
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000
FCR	1 st month	0.296	0.138	0.044
	2 nd month	<0.000	0.008	0.007
SGR (%)	1 st month	0.694	0.211	0.318
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000
ด้านภูมิคุ้มกัน				
Lysozyme activity	1 st month	0.123	0.026	0.046
	2 nd month	0.103	<0.000	<0.000
NBT	1 st month	0.432	0.002	0.001
	2 nd month	0.022	<0.000	0.003
SOD	1 st month	0.527	<0.000	<0.000
	2 nd month	0.086	<0.000	<0.000
ด้านเอนไซม์ย่อยอาหาร				
Trypsin	1 st month	<0.000	<0.000	<0.000
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000
Chymotrypsin	1 st month	<0.000	<0.000	<0.000
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000
Protease	1 st month	<0.000	<0.000	<0.000
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000
Amylase	1 st month	<0.000	<0.000	<0.000
	2 nd month	<0.000	<0.000	<0.000

หมายเหตุ WG: น้ำหนักสุดท้าย; FCR: อัตราการแลกเนื้อ; ADG: อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน; SGR: ประสิทธิภาพการกินอาหาร; NBT: ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือดในซีรัม; SOD: Superoxide Dismutase

จากการวิเคราะห์ Two-way ANOVA แสดงให้เห็นว่า หลังการเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารเสริมพรีไบโอติก โพรไบโอติก และซินไบโอติกได้ 4 สัปดาห์ ในด้านการเจริญเติบโตพบว่า การเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว โพรไบโอติกอย่างเดียว ไม่มีผลต่อน้ำหนักของปลา อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แต่เมื่อมีการนำพรีไบโอติกมาใช้ร่วมกับโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) พบว่า มีผลต่ออัตราการแลกเนื้อ ในขณะที่เมื่อหลังการเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ พบว่า การเสริมพรีไบโอติก โพรไบโอติก และซินไบโอติก มีผลต่อน้ำหนักเฉลี่ยของปลา อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ แสดงดังตารางที่ 20

จากการศึกษาในด้านภูมิคุ้มกันของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ พบว่า การเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม และค่าปริมาณ Superoxide dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อน ในขณะที่ผลของการเสริมโพรไบโอติกอย่างเดียว และผลของการใช้พรีไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม และค่าปริมาณ Superoxide dismutase (SOD) ในตับ และเมื่อหลังการเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ พบว่าผลของการเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม แต่มีผลต่อค่าปริมาณ Superoxide dismutase (SOD) ในตับ ในขณะที่ผลของโพรไบโอติกอย่างเดียว และผลของการใช้พรีไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม และค่าปริมาณ Superoxide dismutase (SOD) แสดงดังตารางที่ 20

จากการศึกษาในด้านกิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร หลังเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ พบว่า ผลการเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว โพรไบโอติกอย่างเดียว และผลของการเสริมพรีไบโอติก และโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่าเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์โคโมทริปซิน เอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์อะไมเลส แสดงดังตารางที่ 20

จากผลการวิเคราะห์ Two-way ANOVA สามารถอธิบายได้ว่า เสริมพรีไบโอติก ร่วมกับโพรไบโอติก (ซินไบโอติก) มีผลต่อค่าการเจริญเติบโต ค่าภูมิคุ้มกัน และค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารของปลานิลวัยอ่อน มากกว่าการเสริมพรีไบโอติกเพียงอย่างเดียว หรือโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยโพรไบโอติก ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง ซึ่งในการศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาโพรไบโอติกเฉพาะถิ่นในปลาไนล ซึ่งเชื้อที่พบอาจมีความแตกต่างกับเชื้อโพรไบโอติกในพื้นที่อื่นๆ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพแตกต่างหรือใกล้เคียงกันกับโพรไบโอติกในปลาไนลจากพื้นที่อื่นๆ โดยประสิทธิภาพของเชื้อโพรไบโอติกจะขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ชนิดปลา ระบบการเลี้ยง และคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำนั้น ๆ (อุดมลักษณ์ และจิราพร, 2556)

ในการคัดเลือก และทดสอบสมบัติของเชื้อในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้น จะทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาไนล โดยมีวิธีการ Agar well diffusion และศึกษาไอโซเลทที่มีความปลอดภัยโดยไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Non hemolysis) จากผลการทดลองเชื้อจุลินทรีย์ CR10-5 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่น ๆ โดยดูจากโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ CR10-5 มาทดสอบปฏิบัติการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemolysis) พบว่าเกิดปฏิบัติการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ γ -hemolysis โดยเกิดการ Hemolysis ไม่สมบูรณ์ ซึ่งไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้ (Non hemolysis) เชื้อส่วนใหญ่ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจะเป็นกลุ่มเชื้อก่อโรค เช่น *Streptococcus* บางสายพันธุ์ ซึ่งนิลบล และคณะ (2545) ทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Streptococcus* ส่วนใหญ่พบว่า กลุ่มที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบ Beta และ Alpha - hemolysis เป็นสาเหตุการตายของปลาไนล มีรายงานของ ปวเรศวร์ และคณะ (2549) ทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 54 สายพันธุ์ พบว่า มีแบคทีเรียแลคติก 13 สายพันธุ์ ที่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ได้แก่ *L. plantarum* อีก 41 สายพันธุ์ ทำให้เม็ดแดงแตก และจากการศึกษาของ นิลบล และคณะ (2545) กล่าวว่าเชื้อสกุล *Streptococcus* นั้นเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรค *Streptococcosis* ระบาดมากในปลาไนล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. iniae*

จากนั้นจึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ CR10-5 (อุดมลักษณ์ และจิราพร, 2556) มาจำแนกจุลินทรีย์ โดยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16s rDNA ผลการทดลอง พบว่าแบคทีเรีย CR10-5 ที่ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทั้งนี้จากการวิเคราะห์หว่านเป็นเชื่อดังกล่าวนั้นมีหลักการ คือ อาศัยค่าร้อยละความเหมือนหรือ percent of identity ของลำดับ

นิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16s rDNA gene ระหว่างเชื้อโฮโฮเลตกับเชื้อที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI ผ่านการวิเคราะห์โดยโปรแกรม blast ซึ่งหากเปรียบเทียบแล้วพบว่ามีความเหมือนตั้งแต่ 97% ขึ้นไป ให้จำแนกว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้น (มารุตพงศ์ และวีระพงศ์, 2561)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

ผลการศึกษารายละเอียดองค์ประกอบทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟพบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าประกอบด้วยโปรตีน 19.40 ± 2.10 % ไขมัน 1.80 ± 0.10 % ความชื้น 6.80 ± 1.10 % เถ้า 7.30 ± 0.20 % และคาร์โบไฮเดรต 64.80 ± 0.70 % ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Ateş and Elmaci (2018); Borrelli *et al.* (2004); Costa *et al.* (2018); Jiménez-Zamora *et al.* (2015) และ Pourfarzad *et al.* (2013) ได้กล่าวว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟประกอบด้วยโปรตีนอยู่ในช่วง 15.40 - 18.80% ไขมันอยู่ในช่วง 2.10 - 4.60 % ความชื้นอยู่ในช่วง 4.80 - 7.60 % คาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วง 62.10 - 66.90 % และเส้นใยอาหารทั้งหมดอยู่ในช่วง 52.40 - 62.40 (ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยละลายน้ำ 7.10 - 8.80 % และเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ 49.10- 54.20 %)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) พบว่าหลังจากหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลมีค่าสูงขึ้นตามเวลาการหมักที่มากขึ้น ในขณะที่การหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® CR conc ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 10) จากการย่อยด้วยเอนไซม์ L Ultra conc พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโคส และนิสโตสเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการหมักมีคุณสมบัติที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ได้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่พบมากที่สุด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และกาแลคโตสในรูปของโมโนแซ็กคาไรด์ แลคโตส และมอลโทสในรูปของไดแซ็กคาไรด์ (Pratt and Cornely, 2021; Scully *et al.*, 2016) หากใช้เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในการหมัก เช่น เอนไซม์แมนนาเนส ผลผลิตน้ำตาลที่ได้ก็อาจจะมีชนิดที่แตกต่างกันออกไปดังงานวิจัยของชยาภรณ์ (2560) ทำการทดสอบการหมักกากกาแฟด้วยแมนนาเนสจาก *Bacillus sp.* GA2(1) พบว่าน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่พบในผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากกาแฟประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเพนตะโอส ซึ่งน้ำตาลฟรุคโตลิโกแซ็กคาไรด์และฟรุคโตฟูราโนไซด์ที่ได้จากการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Mussatto and Teixeira, 2010) มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติก สารต้านอนุมูลอิสระ (Borrelli *et al.*, 2004) และสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial) (Rufián-Henares and de la Cueva, 2009) ได้เป็นอย่างดี จากงานวิจัยของ Costa *et al.* (2018) พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถยับยั้งการสร้าง DPPH (DPPH* inhibition) และ Ferric-reducing antioxidant power และยังพบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (0.20 - 25

g/L) สามารถยับยั้งการเกิด Hemolysis อย่างไรก็ดีตามหากใช้สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟในปริมาณที่มากขึ้นไป (50 และ 100 g/L) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะหายไป นอกจากนี้ก็ยังพบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถป้องกันเซลล์จากการบาดเจ็บจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การศึกษาการเป็นพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

สมบัติในการเป็นสารพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ พบว่าชนิดและปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จากการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc มีค่ามากที่สุดในช่วงการทดลองเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp) ซึ่งในผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีสารประกอบ Melanoidins ถึง 17-23 % ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพทั้งหมด (Bioactive compounds) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Costa *et al.*, 2018; Iriondo-DeHond *et al.*, 2020; Iriondo-DeHond *et al.*, 2019; Oliveira and Franca, 2014) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีเส้นใยอาหาร (Dietary fiber) สูง (50 – 60 %) ประกอบด้วยเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ 15 % และเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ 85 % (Narita and Inouye, 2012) นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของลิกนินประมาณ 30 % รวมทั้งโพลีแซ็กคาไรด์ต่าง ๆ ได้แก่ กลูแคน 17.8 %, ไซแลน 4.7 %, อาราบิแนน 2 %, กาแลคแตน 3.8 % และแมนแนน 2.6 % Jiménez-Zamora *et al.* (2015) รายงานว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถเพิ่มปริมาณโพรไบโอติก เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อีกทั้งไม่เพิ่มปริมาณแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Bacteroides* spp. และ *Clostridium* spp. เช่นเดียวกับรายงานของ Borrelli *et al.* (2004) ที่พบการเพิ่มขึ้นของระดับโพรไบโอติก Bifidobacteria และการลดลงของเชื้อ *Clostridium* spp. ในขณะที่เชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญขึ้นได้อย่างจำกัด (ปริมาณไม่สูงเท่ากับ Bifidobacteria) ผลการทดสอบการเป็นสารพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ได้ มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าสารออกฤทธิ์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ (*B. subtilis*) โดยทำให้ *B. subtilis* เพิ่มปริมาณสูงขึ้น ในขณะที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรค (*A. hydrophila* และ *S. agalactiae*) ได้ดี

ผลการศึกษาการของส่งเสริมการเจริญจุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* น้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์จาก CSSe: L Ultra และ CSSp: L Ultra สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pan *et al.* (2009) ที่กล่าวว่า การเติมโอลิโกแซ็กคาไรด์ 4 ชนิด คือ ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ ส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* NIT202 และ *L. acidophilus* NIT200 ซึ่งพบว่าโอลิโกแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ชนิดนี้ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของจุลินทรีย์

ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดี แม้ว่าจากการทดลองแมนโนโอลิโกแซกคาไรด์จะส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่ากับฟรุกโตโอลิโกแซกคาไรด์หรือไซโลโอลิโกแซกคาไรด์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาล พบว่าแมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้มากกว่าอย่างเห็นได้ชัดในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ของ CSSp: L Ultra สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีน้ำตาลโอลิโกแซกคาไรด์ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jiménez-Zamora *et al.* (2015) ที่รายงานว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับสารละลายยาปฏิชีวนะออกซีเตตระไซคลิน 2.3 และ 0.9 mg/l ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Rufián-Henares and de la Cueva (2009) ที่กล่าวว่าสารเมลานอยดินที่เกิดจากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยสารเมลานอยดินจะไปดึงแมกนีเซียมออกจากผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค และไปจับกับเหล็กทำให้เซลล์ของเชื้อก่อโรคเสียสมดุลและตายในที่สุด จากงานวิจัยต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพิ่มมากขึ้นและแย่งการใช้สารอาหารของเชื้อก่อโรค รวมถึงการแย่งจับผนังลำไส้กับเชื้อก่อโรคเพื่อป้องกันและลดการอักเสบของลำไส้ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารให้สร้างชนิด T-cell และ B-cell และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ยังสร้างสารเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น (Borrelli *et al.*, 2004)

ผลการศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริมพรีไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*Bacillus subtilis*)

ศึกษาผลของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริมพรีไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*Bacillus subtilis*) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ความต้านทานเชื้อก่อโรค รวมถึงศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบของเนื้อปลากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร และคุณภาพน้ำของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ก่อนทดลอง ได้แก่

1. การศึกษาผลของการเสริมซินไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
2. การศึกษาผลของการเสริมซินไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในกระชัง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ

จากการวิเคราะห์น้ำในตู้ทดลองทุกสัปดาห์ ตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์ พบว่าค่าอุณหภูมิน้ำตลอดการทดลอง มีค่าระหว่าง 27.69 ± 0.5 ถึง 28.17 ± 0.25 °C มีค่าการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาขึ้นอยู่กับอุณหภูมิอากาศ ปลานิลสามารถทนต่อระดับอุณหภูมิได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 21.1 ถึง 42.0 °C แต่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 °C หรือสูงกว่า 42 °C ปลานิลไม่สามารถทนได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตมีค่าอยู่ระหว่าง 19-28 °C ระดับ pH อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีค่าอยู่ในช่วง 6.40 ± 0.42 ถึง 6.54 ± 0.44 ในน้ำที่เป็นต่างมากปลาจะตาย และถ้าเป็นกรดปลาจะไม่อยากกินอาหาร โดยทั่วไป ปลานิลสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่ระดับ pH ตั้งแต่ 7.2 ถึง 8.3 เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำจะมีผลต่อความเป็นพิษของสารพิษชนิดอื่น ๆ ด้วยเช่น แอมโมเนีย ไนโตรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา มีค่าระหว่าง 5.09 ± 0.51 ถึง 5.74 ± 0.26 mg/l ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลา มีค่าตั้งแต่ 3 mg/l ขึ้นไป (วัดในตอนเช้ามีด) หากในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำเกินไป ปลา ก็จะลอยหัวขึ้นมาใช้ออกซิเจนจากผิวน้ำ และอากาศ ซึ่งส่งผลให้ปลาเกิดอาการเครียด และการเจริญเติบโตลดลง ปริมาณค่าแอมโมเนีย ไนโตรเจน มีค่าระหว่าง 0.05 ± 0.01 ถึง 0.10 ± 0.04 mg/l ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ 0.10 ถึง 0.40 mg/l จะทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตช้า และที่ระดับความเข้มข้นที่ 2 ถึง 3 mg/l สัตว์น้ำมีอาการเครียด หายใจเร็ว อ่อนแอ เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย และเริ่มตาย วิธีการควบคุมปริมาณแอมโมเนียเพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำได้ โดยควบคุมปริมาณอาหารการให้อาหารไม่ให้เหลือ หรืออาจลดปริมาณอาหารที่ให้ลงครึ่งหนึ่ง ปริมาณค่าไนโตรท์ ไนโตรเจน มีค่าระหว่าง 0.25 ± 0.08 ถึง 0.35 ± 0.13 mg/l และปริมาณค่าฟอสเฟต ฟอสฟอรัส มีค่าระหว่าง 0.11 ± 0.03 ถึง 0.41 ± 0.31 mg/l หากในแหล่งน้ำมีปริมาณของฟอสเฟสในปริมาณมาก ส่งผลให้พืชน้ำมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ขาดออกซิเจนในเวลา กลางคืน หรือหากมีการตายและเน่าสลายของพืชน้ำในเวลาเดียวกันอย่างรวดเร็ว ทำให้แหล่งน้ำเกิดสภาพที่ขาดออกซิเจนอย่างรุนแรง (นฤมล, 2550) ดังนั้นในบ่อปลานิลไม่ควรจะมีปริมาณของฟอสฟอรัสสูงกว่า 0.6 mg/l จากผลวิเคราะห์คุณภาพน้ำดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลานิล (Kumar and Puri, 2012) เนื่องจากระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50% และมีการเติมออกซิเจนในน้ำตลอดเวลาจึงทำให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำสูง

จากการวิเคราะห์น้ำในบ่อทดลองทุกสัปดาห์ ตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่าค่าอุณหภูมิน้ำตลอดการทดลอง มีค่าระหว่าง 26.20 ± 0.00 ถึง 31.53 ± 0.09 °C มีค่าการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศ และฤดูกาลในแต่ละช่วง ระดับ pH อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 7.12 ± 0.01 ถึง 7.48 ± 0.01 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา มีระหว่าง 4.19 ± 0.35 ถึง 4.86 ± 0.34 mg/l เมื่อเปรียบเทียบกับ

ค่า DO ในตู้การทดลอง พบว่าค่า DO ในบ่อทดลองมีค่าต่ำกว่า เนื่องจากในบ่อดินมีสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่ใช้ออกซิเจนในน้ำร่วมด้วย เช่น หอย ปู และปลาชนิดอื่น ๆ ภายนอกกระชัง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเติมออกซิเจนในน้ำด้วยเครื่องไมโครนาโนบับเบิล รุ่น ECO-KMV120-9HAQR00 ตลอดเวลาจึงทำให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำสูง ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ ค่าแอมโมเนีย ไนโตรเจน มีค่าระหว่าง 0.01 ± 0.00 ถึง 0.03 ± 0.00 mg/l ปริมาณค่าไนไตรท์ ไนโตรเจน มีค่าระหว่าง 0.00 ± 0.00 ถึง 0.05 ± 0.00 mg/l และปริมาณค่าไนเตรท ไนโตรเจน ค่าระหว่าง 0.01 ± 0.00 ถึง 0.05 ± 0.00 mg/l แหล่งของสารประกอบไนไตรท์ในน้ำส่วนใหญ่ มาจากสารอินทรีย์ ซึ่งเกิดจากขบวนการเน่าสลายของเศษอาหารที่เหลือแพลงก์ตอนที่ตาย เศษซากพืชซากสัตว์ สารอินทรีย์อื่น ๆ โดยจุลินทรีย์และปล่อยแอมโมเนีย ไนไตรท์ สู่ในบ่อเลี้ยงซึ่งความเป็นพิษของแอมโมเนีย จะรบกวนทำให้สัตว์น้ำสูญเสียพลังงานในการกำจัดแอมโมเนียออกนอกร่างกายมากกว่าปกติ ส่วนไนไตรท์จะไปรบกวนการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของเม็ดเลือดทำให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจนได้ ถ้ามีปริมาณมากทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันโรคต่ำ และติดเชื้อได้ง่าย ปริมาณแอมโมเนียรวมในบ่อปลานิลไม่ควรเกิน 0.5 mg/l ไนไตรท์ไม่ควรเกิน 0.1 mg/l (Kumar and Puri, 2012)

วิธีการควบคุมปริมาณแอมโมเนียเพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำได้ โดยควบคุมปริมาณอาหารการให้อาหารไม่ให้เหลือ หรืออาจลดปริมาณอาหารที่ให้อาหารครั้งหนึ่ง ปริมาณค่าฟอสเฟต ฟอสฟอรัส มีค่าระหว่าง 0.01 ± 0.00 ถึง 0.02 ± 0.00 mg/l และปริมาณค่าฟอสฟอรัสรวม มีค่าระหว่าง 0.03 ± 0.00 ถึง 0.14 ± 0.00 mg/l จากผลวิเคราะห์คุณภาพน้ำดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการการเลี้ยงปลานิล

การศึกษาด้านการเจริญเติบโต

จากการวิเคราะห์ค่าด้านการเจริญเติบโตของปลานิลวัยอ่อน หลังการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมชินไบโอติก ในตู้ทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การทดลองที่เลี้ยงด้วยเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) ส่งผลให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลวัยอ่อนสูงกว่าอาหารผสมพรีไบโอติก หรือโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังส่งผลให้อัตราการแลกเนื้อต่ำ ในขณะที่เมื่อทดลองเลี้ยงในกระชัง พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS5% + ProA) มีผลทำให้ค่าอัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกปลานิลวัยอ่อนดีที่สุด พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ในค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของลูกปลานิลวัยอ่อน แต่เมื่อเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ พบว่า ผลที่ได้เหมือนกับการเลี้ยงในตู้ทดลอง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2018) พบว่า เมื่อให้อาหารเสริมด้วย

Bacillus subtilis 0.5×10^7 CFU/g และเติมแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (MOS) 5 g (BS0.5M5) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งผลให้น้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และงานวิจัยของ Hassaan *et al.* (2014) พบว่า เมื่อให้อาหารเสริมชินไบโอติก เป็นเวลา 60 วัน ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารได้ดียิ่งขึ้น ชุดการทดลองที่เติมเชื้อโปรไบโอติก 0.48×10^6 CFU/g และ 1% yeast extract มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด และงานวิจัยของ Dehaghani *et al.* (2015) พบว่า ผลของผลิตภัณฑ์ชินไบโอติก Biomin® IMBO โดยใช้ *Enterococcus faecium* และฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ 1.4 g/kg ทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน สามารถเพิ่ม น้ำหนักตัวเพิ่ม ความยาวตัวปลา อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการรอดตาย ($p > 0.05$) เปรียบเทียบกับการควบคุม

เมื่อวิเคราะห์ค่าการเจริญเติบโตแบบ Two-way ANOVA พบว่า การเสริมชินไบโอติก มีผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลา อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าการเสริมพรีไบโอติกเพียงอย่างเดียว หรือชินไบโอติกเพียงอย่างเดียว มีความคล้ายกับงานวิจัยของ Ye *et al.* (2011) พบว่าอัตราส่วนของโปรไบโอติกและพรีไบโอติกที่มีปริมาณแตกต่างกัน ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และองค์ประกอบต่าง ๆ ของปลาแตกต่างกันไป ด้วย แต่การใช้ชินไบโอติกให้ผลการทดลองดีกว่าชุดการทดลองที่อาหารผสมพรีไบโอติกหรือโปรไบโอติกเพียงอย่างเดียว

การศึกษาภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลานิลวัยอ่อน

จากการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันของปลานิลวัยอ่อน หลังการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมของพรีไบโอติก โปรไบโอติก และชินไบโอติก พบว่า การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS5% +ProA) ในตู้ทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ ในเลือด มีค่าเท่ากับ 29.79 ± 1.09 Unit/min สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในกระชัง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ในเลือดเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 21.47 ± 0.92 และ 46.78 ± 1.38 Unit/min ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าในสัปดาห์ที่ 8 ค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไลโซไซม์จะทำหน้าที่ต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และไลโซไซม์จัดเป็นองค์ประกอบหนึ่งของกลไกการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับระบบโมโนไซต์และแมคโครฟาจ (Monocyte – macrophage system) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า ไลโซไซม์สามารถเปลี่ยนแปลงเมทาบอลิซึมของกลูโคส ยับยั้งการสร้างกรดของเชื้อกลุ่ม *Streptococcus spp.*

การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS5% + ProA) ในตู้ทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของ เซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม มีค่าเท่ากับ 0.098 ± 0.003 Unit/g สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในกระชัง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ พบว่า ค่า NBT ในซีรัม เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 0.089 ± 0.012 และ 0.153 ± 0.010 Unit/g ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าใน สัปดาห์ที่ 8 ค่า NBT ในซีรัม เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ค่า NBT เป็นการ ทดสอบความสามารถของ Phagocyte cells โดยใช้หลักการที่ว่า เมื่อ Phagocyte มีกระบวนการ Phagocytosis จะเกิดปฏิกิริยา Respiratory burst คือมีการเพิ่มของ Metabolic activity และมีการสร้าง Hydrogen peroxide (H_2O_2) และ Superoxide free radical (O_2^-) ซึ่งเป็น Reducing agents ไป Reduce NBT dye ซึ่งเป็นสีชนิดหนึ่ง จากสีเหลือง ให้เป็น Farmazan ซึ่งมีสี น้ำเงิน

การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS5% + ProA) ในตู้ทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อน มีค่าเท่ากับ 105.00 ± 3.17 Unit/g สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ทดลองเลี้ยงในกระชัง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณ SOD ในตับ ของปลานิลวัยอ่อนเพิ่มขึ้น ค่าเท่ากับ 153.11 ± 6.50 และ 210.33 ± 20.95 Unit/g ตามลำดับ ซึ่ง จะเห็นได้ว่าในสัปดาห์ที่ 8 ปริมาณ SOD ในตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ปริมาณ SOD จัดเป็น Antioxidative enzyme ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดหรือต้าน อนุมูลอิสระ (Free radical) อันได้แก่ Superoxide anion (O_2^-) ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นจาก เมทาโบลิซึมของเซลล์ที่มีการใช้ออกซิเจน และจากกระบวนการ Respiratory burst ที่เกิดระหว่าง การกำจัดสิ่งแปลกปลอมแบบ Phagocytosis หรือ Encapsulation ของเซลล์เม็ดเลือด (Holmblad and Söderhäll, 1999) โดย Peroxinectin จะทำหน้าที่ส่งเสริมการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเอนไซม์ NADPH oxidase จะเปลี่ยนโมเลกุลของ Oxygen (O_2) เป็น Superoxide anion จากนั้นซูเปอร์ ออกไซด์ดิสมิวเทสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Superoxide anion เพื่อให้เปลี่ยนไปเป็น Hydrogen peroxide โดย Peroxinectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมกระบวนการ Phagocytosis จะเปลี่ยน Hydrogen peroxide ให้อยู่ในรูปของ Hypochlorous acid (HOCl) เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kumar *et al.* (2018) กล่าวว่า การเสริม *Bacillus subtilis* และ MOS ที่ ระดับความเข้มข้นสูง ส่งผลให้กิจกรรมของไลโซไซม์ ค่า NBT และค่าเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ชุดการทดลองอื่น ๆ เมื่อวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบ Two-way ANOVA พบว่า การเสริมซินไบโอติก มีผลต่อค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ในเลือด และค่า NBT ในซีรัม สูงกว่าการเสริมพรีไบโอติกอย่างเดียว

และโพรบิโอดีคอย่างเดี่ยว และงานวิจัยของ Ai *et al.* (2011) กล่าวว่า อาหารเสริมซินไบโอดีค ทำให้ปลาามีค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ และปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) เพิ่มขึ้น

กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหาร

จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมซินไบโอดีค เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีค่าเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน โปรติเอส และอะไมเลสในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดที่เสริมพรีไบโอดีค หรือโพรบิโอดีคเพียงอย่างเดียว และเมื่อทดลองเลี้ยงในกระชัง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ผลการวิเคราะห์เหมือนกับการทดลองในตู้ทดลอง ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ค่าของเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน โปรติเอส และอะไมเลสในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อนสูงขึ้นทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dehaghani *et al.* (2015) กล่าวว่า การเสริมซินไบโอดีค Biomin® IMBO ในอาหารปลาในวัยอ่อน มีผลทำให้เอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินเพิ่มขึ้นกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมซินไบโอดีค และงานวิจัยของ Mohammadian *et al.* (2019) กล่าวว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 1% β -glucan และ MOS ผสม *Lactobacillus casei* 5×10^7 CFU/kg เป็นเวลา 60 วัน ช่วยให้กิจกรรมของเอนไซม์ในลำไส้ของปลา ได้แก่ ALP เอนไซม์ไลเปส อะไมเลส ทริปซิน และโปรติเอส เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม งานวิจัยของ และงานวิจัยของ Ivanova *et al.* (1993) กล่าวว่า อะไมเลสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5-8.0 และช่วงอุณหภูมิ 40°C

เมื่อนำไปวิเคราะห์แบบ Two-way ANOVA พบว่า หลังเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ พบว่า ผลการเสริมพรีไบโอดีคอย่างเดี่ยว โพรบิโอดีคอย่างเดี่ยว และผลของการเสริมพรีไบโอดีค และโพรบิโอดีค (ซินไบโอดีค) มีผลต่อค่าเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ไคโมทริปซิน เอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์อะไมเลส

การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae*

จากการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^6 CFU/ml ในปลานิลวัยอ่อนหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมชินไบโอติก เป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยทดสอบ 14 วัน พบว่า การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100.00% ในขณะที่ปลานิลวัยอ่อนในชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 40.00% ทดลองเลี้ยงในกระชัง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ผลการวิเคราะห์เหมือนกับการทดลองในตู้ทดลอง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kumar *et al.* (2018) พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* และ MOS ที่ระดับความเข้มข้นสูง เป็นเวลา 60 วัน พบเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมต่ำกว่าชุดควบคุม หลังจากทดสอบด้วยการติดเชื้อ *A. hydrophila* และงานวิจัยของ Mohammadian *et al.* (2019) พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 1% β -glucan และ MOS ผสม *Lactobacillus casei* 5×10^7 CFU/kg เป็นเวลา 60 วัน ส่งผลให้ปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* มีอัตราการตายต่ำมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ

ส่วนการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* ที่ปริมาณเซลล์ 1×10^6 CFU/ml พบว่า การทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ผสม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100.00% ในขณะที่ปลานิลวัยอ่อนในชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 33.33% และเมื่อทดลองเลี้ยงในกระชัง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ผลการวิเคราะห์เหมือนกับการทดลองในตู้ทดลอง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hasan *et al.* (2018) พบว่า การเสริมชินไบโอติก (*Bacillus* sp. SJ-10 1×10^8 CFU/g และ β -glucan oligosaccharides 1%) มีผลทำให้อัตราการรอดตายของปลา Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) สูงกว่าชุดควบคุม หลังการติดเชื้อ *Streptococcus iniae* 1×10^8 CFU/ml

สรุปผลการวิจัย

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีฤทธิ์ในการเป็นพรีไบโอติก เมื่อผ่านการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc พบน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับน้ำตาลในกลุ่มฟรุคโตส (Fructose) ซูโครส (Sucrose) และน้ำตาลนิสโตส (Nystose) รวมถึงน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลในกระตุ้นการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก *Bacillus subtilis* จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* แสดงให้เห็นว่าสาร metabolite ที่ผลิตจากเชื้อโพรไบโอติกและเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงที่ผ่านการหมักด้วยเอนไซม์ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำได้ดีที่สุด และเมื่อลูกปลานิลได้รับที่อาหารเสริมโพรไบโอติก (*B. subtilis* 5×10^7 CFU/g) ร่วมกับพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% ร่วมกับพรีไบโอติกจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ส่งผลให้ลูกปลามีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 93.33 ± 6.67 และ 100.00 ± 0.00 % จึงสรุปได้ว่าการใช้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟเมื่อผ่านการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติก และมีแนวโน้มในการนำไปเสริมหรือทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำ

ศึกษาทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยการให้อาหารเสริมพรีไบโอติก (เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ: CSS) ร่วมกับโพรไบโอติก (*B. subtilis*) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ความต้านทานเชื้อก่อโรค รวมถึงศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบของเนื้อปลา กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร และคุณภาพน้ำของการทดลองอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ก่อนทดลอง ได้แก่

1. การศึกษาผลของการเสริมซินไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ในห้องปฏิบัติการ)
2. การศึกษาผลของการเสริมซินไบโอติกในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยการทดลองอนุบาลปลานิลวัยอ่อนในกระชัง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อยืนยันผลในการนำไปให้เกษตรกรใช้ (ในบ่อเพาะเลี้ยงปลา)

จากการศึกษาทั้ง 2 การทดลอง พบว่า ปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมการทดลองที่เลี้ยงด้วยเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% และ *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ส่งผลให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลวัยอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ เช่นกัน ในขณะที่อัตราการรอดตายในทุกชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ในด้านภูมิคุ้มกัน พบว่า ปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมการทดลองที่เลี้ยงด้วยเสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% และ

B. subtilis 5×10^7 CFU/g (CSS 5% + ProA) ทำให้ค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (NBT) ในซีรัม และปริมาณ Superoxide Dismutase (SOD) ในตับของปลานิลวัยอ่อน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ การต้านโรคต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบอัตราการรอดตายสูงในชุดการทดลอง CSS 5% + ProA กิจกรรมเอนไซม์ย่อยอาหารในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน โปรติเอส และอะไมเลสในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน ในชุดการทดลอง CSS 5% + ProA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากวิเคราะห์ค่าการเจริญเติบโตแบบ Two-way ANOVA พบว่า การเสริมซินไบโอติกมีผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลา อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีขึ้น และมีผลต่อค่ากิจกรรมของไลโซไซม์ในซีรัม และค่า NBT ในเลือด รวมถึงเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน โปรติเอส และอะไมเลสในลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลวัยอ่อน สูงกว่าการเสริมพรีไบโอติกเพียงอย่างเดียว หรือโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว



บรรณานุกรม

- กรมประมงเชียงใหม่. 2561. **ฐานข้อมูลด้านการประมงในจังหวัดเชียงใหม่**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.fisheries.go.th/fpochiangmai/web2/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=58 (1 มกราคม 2564).
- กาญจน์มณี ศรีวิศาลภพ, ณรงค์ชัย ปัญญานนทชัย และ ธนรัฐ สวัสดิชัย. 2547. **คุณรู้เรื่องกาแพติแค้ไหน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ดอกหญ้ากรู๊ป.
- การุณ ทองประจุกแก้ว และ อุทัยวรรณ โกวิทาทิ. 2555. เอนไซม์ย่อยอาหารกับการพัฒนาอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**, 22(2), 710-720.
- เกวลิน หนูฤทธิ์. 2564. **สถานการณ์การผลิตและการค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ในปี 2563 และแนวโน้มปี 2564**. กรุงเทพฯ: กลุ่มเศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง.
- จารุวรรณ มณีศรี. 2538. **การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลเนสและเซลลูเลสจากกากปาล์มและกากสลัดจ์โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ฉัตรชัย ไกรสรพงษ์ และ ศุภกานต์ วงศ์พานิช. 2548. **การผลิตเอทานอลจากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร**. กรุงเทพฯ: กรมการพลังงานทหาร ศูนย์การอุตสาหกรรมป้องกันประเทศ และพลังงานทหาร.
- เฉลิมขวัญ คำคำ และ มัลลิกา ชมนาวัง. 2548. **คุณรู้จัก Prebiotics แล้วหรือยัง ?** **อาหาร**, 35(2), 96-101.
- ชนกันต์ จิตมนัส, ภาสินันท์ สาระมาศ และ น้ำเพชร ประกอบศิลป์. 2556. **แบคทีเรียที่แยกจากปลานิลซึ่งเลี้ยงในระบบต่างกัน บริเวณหมู่บ้านแม่แก้ด จ.เชียงใหม่**. เชียงใหม่: ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ชยาภรณ์ วงศ์ศิริเดชชัย. 2560. **สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากกากกาแพติด้วยแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

- ณัฐา นิธิกุลวรงค์. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดสิรินธรวัลลีต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). **วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น**, 17(5), 715-724.
- เทพรัตน์ อังเศรฐพันธุ์, นิวุฒิ หวังชัย, กระจสินธุ์ หังสพฤกษ์, จอมสุดา ดวงวงษา และ ขวัญฤทัย ดวงใจสัก. 2559. ผลของการเสริมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ Fructooligosaccharide (FOS) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ความต้านทานความเครียดและความต้านทานเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ของลูกปลานิลแดง. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง**, 10(1), 11-22.
- ธารรัตน์ ศุภศิริ. 2542. Probiotic. **วิทยาศาสตร์แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ**, 53(4-6), 357-360.
- นเรศ ช้วนยุค, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร์ คงประดิษฐ์ และ กิจการ ศุภมาตย์. 2552. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agal actiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Microbiology**, 14(136), 180-183.
- นฤมล บุญมี, นักรบ นาคประสม, ชนวัฒน์ นิตศน์วิจิตร, พัฒนา เพ็องฟู, จริญญาพร สังข์ภิรมย์ และ กาญจนา นาคประสม. 2561. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติก ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 27(6), 1038-1053.
- นฤมล อัครเวศมณี. 2550. **การเลี้ยงปลาน้ำจืด: เอกสารประกอบการสอน**. สงขลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- นิตยสารการเกษตร. 2550. **การเลี้ยงปลานิลในกระชัง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.farmkaset.org/contents/?content=00225> (5 เมษายน 2564).
- นิลุบล กิจอันเจริญ, ชุติมา หาญจวนิช และ นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. **การพัฒนาวิธีการในการป้องกัน รักษาโรคที่เกิดกับปลาที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ**. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ไบโอฟู้ด. 2556. **โพลีแซคคาไรด์แปปไทด์**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.au-com.com/psp3.asp> (24 กรกฎาคม 2562).
- ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2555. การพัฒนาวัคซีนในการป้องกันเชื้อ *Flavobacterium columnare* และการตอบสนองยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ, ศศิวิมล ปิติพรชัย, พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล, บดินทร์ อธิพิงษ์ และ
สิริรัตน์ จงฤทธิพร. 2549. **การใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง
ก้ามกราม**. ชลบุรี: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี กรมประมง.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. **เอนไซม์ตัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มันสิน ตันกุลเวศน์ และ ไพพรรณ พรประภา. 2536. **การจัดการคุณภาพ และการบำบัดน้ำเสียใน
บ่อเลี้ยงปลา**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา
<http://opac.phuket.psu.ac.th/BibDetail.aspx?bibno=182> (5 เมษายน 2564).
- มารุตพงศ์ ปัญญา และ วีระพงศ ลulitanนท์. 2561. การจำแนกเชื้อและการตรวจหายีนก่อโรค
ด้วยวิธีอณูวิทยาในแบคทีเรียที่แยกได้จากอุจจาระของเด็กแรกเกิด. **วารสารวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 20(1), 135-142.
- ศุภวันจักรี พลมีศักดิ์. 2545. **ผลการใช้จุลินทรีย์ผสมและโอลิโกแซคคาไรด์จากพืช เจรูชาเลม อาร์
ติโซคในอาหารสุกรรุ่น-ขุนเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร**. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัย และพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. 2540. **การเพาะเลี้ยงปลานิลเพศผู้ล้วน**. ประถมธานี:
กรมประมง กระทรวงเกษตร และสหกรณ์.
- สาโรช คำเจริญ. 2547. **อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง**. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุญาณิ พงษ์ชนานิก. 2549. **โปรไบโอติกและโพรไบโอติก: อาหารสุขภาพ**. [ระบบออนไลน์].
แหล่งที่มา http://www.giffarinethailand.com/th/interesting_info.php?nid=59
(23 มิถุนายน 2562).
- สุพจน์ นวลละออง. 2552. **การสกัดสารโปรไบโอติกส์จากพืชเกษตร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุรเกียรติ อาชานานุภาพ. 2549. **ภาวะพร่องเอนไซม์ย่อยนม**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา
<http://www.doctor.or.th/article/detail/1539> (14 กันยายน 2564).
- เสนอ มีมงคลกุลดิลก. 2547. **กุ้งไทยไร้สารตกค้าง-โปรไบโอติกส์**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา
<http://www.nicaonline.com/webboard/index.php?topic=1638.0> (13 มีนาคม 2562).
- หนังสือพิมพ์โพสทูเดย์. 2556. **ทำไมลำไส้ต้องมีแบคทีเรีย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา
<http://www.dek-d.com/board/view/1411798/> (8 มิถุนายน 2562).

- อัจฉรา หนูเพชร, ดวงพร คันธโชติ และ วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. การคัดเลือก โปรีไบโอติกแบคทีเรียสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 26(5), 659-670.
- อุดม เรืองนพคุณ. 2549. **การเพาะพันธุ์ และเลี้ยงปลานิล**. กรุงเทพฯ: เกษตรสยามบุ๊คส์.
- อุดมลักษณ์ สมพงษ์ และ จีรพร เพกเกาะ. 2556. ผลของจุลินทรีย์โปรีไบโอติกส์เฉพาะถิ่นต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งโรคติดเชื้อ ในปลานิล (Nile tilapia: *Oreochromis niloticus*). ใน **โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การพัฒนาระบบการผลิตปลานิลเพื่อเข้าสู่มาตรฐานการส่งออก**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- Aachary, A. A. & Prapulla, S. G. 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 10(1), 2-16.
- Abd El-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. & Shalaby, A. M. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas species* as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, 27(2), 175-180.
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A. M. & Ismael, N. E. M. 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), 185-189.
- Abid, A., Davies, S. J., Waines, P., Emery, M., Castex, M., Gioacchini, G., Carnevali, O., Bickerdike, R., Romero, J. & Merrifield, D. L. 2013. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, 35(6), 1948-1956.
- Abu-Elala, N. M., Younis, N. A., AbuBakr, H. O., Ragaa, N. M., Borges, L. L. & Bonato, M. A. 2018. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 44(4), 333-341.
- Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W., Wang, J. & Zhang, W. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth

- performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture**, 317(1), 155-161.
- Andrés, M., Gisbert, E., Díaz-López, M., Moyano, F., Estevez, A. & Rotllant, G. 2010. Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 389(1), 75-84.
- Aniansson, G., Andersson, B., Lindstedt, R. & Svanborg, C. 1990. Anti-adhesive activity of human casein against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **Microbial Pathogenesis**, 8(5), 315-323.
- AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists Vol. II Sec.985.29**. 15th ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., Kondo, H. & Hirono, I. 2008. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. pp. 263–276. In K. T. Tsukamoto K, Takeuchi T, Beard Jr TD, Kaiser MJ (Ed.), **Fisheries for global welfare and environment, 5th World Fisheries Congress**. Japan: TerraPub.
- APHA. 1998. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Apiraksakorn, J., Nitisinprasert, S. & Levin, R. E. 2008. Grass degrading beta-1,3-1,4-D-glucanases from *Bacillus subtilis* GN156: purification and characterization of glucanase J1 and pJ2 possessing extremely acidic pl. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, 149(1), 53-66.
- Areekijserree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., Thongpan, A. & Rungruangsak-Torrissen, K. 2006. Development of digestive enzymes and in vitro digestibility of different species of phytoplankton for culture of early juveniles of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900. **Invertebrate Reproduction and Development**, 49(4), 255–262.
- Areekijserree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., Mingmuang, M., Pakkong, P. & Rungruangsak-Torrissen, K. 2004. Temperature and pH characteristics of

- amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. **Aquaculture**, 234(1-4), 575-587.
- Ateş, G. & Elmacı, Y. 2018. Coffee silverskin as fat replacer in cake formulations and its effect on physical, chemical and sensory attributes of cakes. **Food Science & Technology**, 90, 519-525.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S. K. & Ray, A. K. 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. **Aquaculture Research**, 35(5), 436-446.
- Bessada, S. M. F., Alves, R. C., Costa, A. S. G., Nunes, M. A. & Oliveira, B. P. P. 2018. *Coffea canephora* silverskin from different geographical origins: A comparative study. **Science of the Total Environment**, 645, 1021-1028.
- Bic Chemical Company Limited. 2012. **Animal Feed**. [Online]. Available <http://www.bicchemical.com> (5 October 2021).
- Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A. & Fogliano, V. 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 52(5), 1338-1343.
- Cerezuela, R., Meseguer, J. & Esteban, A. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. **Journal of Aquaculture Research and Development**, S1: 008, doi:10.4172/2155-9546.S4171-4008.
- Chan, C.-R., Lee, D.-N., Cheng, Y.-H., Jine, D., Hsieh, Y. & Weng, C. 2008. Feed Deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Studies**, 47(2), 207-214.
- Chesson, A. (1993). Mechanistic Models of Forage Cell Wall Degradation. In H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield & J. Ralph (Eds.), **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA.
- Chorvaticova, D., Machova, E., Sandula, J. & Kogan, G. 1999. Protective effect of the yeast glucomannan against cyclophosphamide-induced mutagenicity. **Mutation Research**. 444, 117-122.
- Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M. & Oliveira, M. B. P. P. 2014. Optimization of antioxidants extraction from coffee

- silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, 53, 350-357.
- Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Costa, E., Costa, C. S. G., Nunes, M. A., Almeida, A. A., Santos-Silva, A. & Oliveira, M. B. P. P. 2018. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. **Food Chemistry**, 267, 28-35.
- Dawood, M. A. O., Eweedah, N. M., Moustafa, E. M. & Shahin, M. G. 2020. Synbiotic effects of *Aspergillus oryzae* and β -Glucan on growth and oxidative and immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Probiotics Antimicrob Proteins**, 12(1), 172-183.
- Dawood, M. A. O. & Koshio, S. 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. **Aquaculture**, 454, 243-251.
- de Vrese, M. & Schrezenmeir, J. 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. pp. 1-66. In U. Stahl, U. E. B. Donalies & E. Nevoigt (Eds.), **Food Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dehaghani, P., Javaheri Baboli, M., Taghavi Moghadam, A., Ziaei-nejad, S. & Pourfarhadi, M. 2015. Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. **Czech Journal of Animal Science**, 60(5), 224-232.
- Devi, G., Harikrishnan, R., Paray, B. A., Al-Sadoon, M. K., Hoseinifar, S. H. & Balasundaram, C. 2019. Effect of symbiotic supplemented diet on innate-adaptive immune response, cytokine gene regulation and antioxidant property in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, 89, 687-700.
- Downes, M. T. 1978. An improved hydrazine reduction method for the automated determination of low nitrate levels in freshwater. **Water Research**, 12(9), 673-675.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28(3), 350-356.

- Edgar181. 2009. **Image of Lactose chemical structure**. [Online]. Available [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose\(lac\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose(lac).png) (19 November 2020).
- Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. & Bercovier, H. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. **Vaccine**, 13(9), 867-870.
- Evans, J. J., Klesius, P. H. & Shoemaker, C. A. 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, 22(27-28), 3769-3773.
- Ewart, K. V., Johnson, S. C. & Ross, N. W. 2001. Lectins of the innate immune system and their relevance to fish health. **ICES Journal of Marine Science**, 58(2), 380-385.
- FAO/WHO. 2007. **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Cordoba, Argentina: FAO/WHO.
- Fatmawati, N. & Lamid, M. 2020. Effect of probiotic duration and dose of coffee peel fermentation (*Coffea* sp.) on crude protein and crude fiber as an alternative fish feed ingredient. p. 012035. In **2nd International Conference on Fisheries and Marine Science**. 26 September 2019, Surabaya, Indonesia.
- Ferket, P. R., Parks, C. W. & Grimes, J. L. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. p. 22. In **Proc. Multi-State Poultry Feeding and Nutr. Conf.** May 14-16, Indianapolis, Indiana USA.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, 66(5), 365-378.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, 180(1), 147-165.
- Geng, X., Dong, X.-H., Tan, B.-P., Yang, Q.-H., Chi, S.-Y., Liu, H.-Y. & Liu, X.-Q. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish & Shellfish Immunology**, 31(3), 400-406.

- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, 17(2), 259-275.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, 125(6), 1401-1412.
- Gilliland, S. E. & Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures (1). **Journal of Food Protection**, 40(12), 820-823.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. & Turnbull, J. 2000. The use and selection of probiotic bacteria in the larval culture of aquatic organisms. **Aquaculture**, 191(1-3), 259-270.
- González-Félix, M. L., Gatlin, D. M., Urquidez-Bejarano, P., de la Reé-Rodríguez, C., Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., Casas-Reyes, A., Yamamoto, F. Y., Ochoa-Leyva, A. & Perez-Velazquez, M. 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. **Aquaculture**, 491, 239-251.
- Green, D. H., Wakeley, P. R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E. & Cutting, S. M. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied & Environmental Microbiology**, 65(9), 4288-4291.
- Hasan, M. T., Jang, W. J., Kim, H., Lee, B. J., Kim, K. W., Hur, S. W., Lim, S. G., Bai, S. C. & Kong, I. S. 2018. Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus β -glucooligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, 82, 544-553.
- Hassan, M. S., Soltan, M. A. & Ghonemy, M. M. R. 2014. Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 40(2), 199-208.

- Havenaar, R. & Huis in't Veld, J. H. J. (1992). Probiotics: A General View. In B. J. B. Wood (Ed.), **The Lactic Acid Bacteria Volume 1**. Boston, MA: Springer.
- Holmblad, T. & Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture**, 172(1-2), 111-123.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 73(2 Suppl), 365s-373s.
- Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M. A., Sharifian, M. & Esteban, M. 2015. Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. **Fish & Shellfish Immunology**, 45(1), 27-32.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. **American Society For Microbiology**, 15, 55-63.
- Huynh, T.-G., Cheng, A.-C., Chi, C.-C., Chiu, K.-H. & Liu, C.-H. 2018. A synbiotic improves the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Metabolomic analysis reveal compelling evidence. **Fish & shellfish immunology**, 79, 284-293.
- 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.
- Iriondo-DeHond, A., Iriondo-DeHond, M. & del Castillo, M. D. 2020. Applications of compounds from coffee processing by-products. **Biomolecules**, 10(9), 1009-1219.
- Iriondo-DeHond, A., Rios, M. B., Herrera, T., Rodriguez-Bertos, A., Nuñez, F., San Andres, M. I., Sanchez Fortun, S. & Del Castillo, M. D. 2019. Coffee Silverskin Extract: Nutritional Value, Safety and Effect on Key Biological Functions. **Nutrients**, 11(11), 2693.
- Ivanova, V. N., Dobрева, E. P. & Emanuilova, E. I. 1993. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Biotechnology**, 28(2-3), 277-289.
- Iwama, G. K., Pickering, A., Sumpter, J. & Schreck, C. B. 1997. **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge, UK.: Cambridge University Press.

- Jang, W. J., Lee, J. M., Hasan, M. T., Lee, B.-J., Lim, S. G. & Kong, I.-S. 2019. Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & shellfish immunology**, 92, 719-727.
- Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S. & Rufián-Henares, J. A. 2015. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. **Food Science and Technology**, 61(1), 12-18.
- Kamilya, D., Ghosh, D., Bandyopadhyay, S., Mal, B. & Maiti, T. 2006. In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. **Aquaculture**, 253(1-4), 130-139.
- Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. & Evans, J. J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, 188(3-4), 237-246.
- Klingel, T., Kremer, J. I., Gottstein, V., Rajcic de Rezende, T., Schwarz, S. & Lachenmeier, D. W. 2020. A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union. **Foods**, 9(5), 665.
- Kolida, S., Tuohy, K. & Gibson, G. R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, 87(S2), S193-S197.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, 200(1-2), 181-201.
- Kong, Y., Gao, C., Du, X., Zhao, J., Li, M., Shan, X. & Wang, G. 2020. Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*). **Fish & Shellfish Immunology**, 102, 412-421.
- Křižková, L. v., Ďuračková, Z., Šandula, J., Sasinková, V. & Krajčovič, J. 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans *in vitro*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 497(1-2), 213-222.

- Kumar, M. & Puri, A. 2012. A review of permissible limits of drinking water. **Indian journal of occupational and environmental medicine**, 16(1), 40-44.
- Kumar, P., Jain, K. & Sardar, P. 2018. Effects of dietary synbiotic on innate immunity, antioxidant activity and disease resistance of *Cirrhinus mrigala* juveniles. **Fish & shellfish immunology**, 80, 124-132.
- Kuriki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T. & Okada, S. 1993. A new way of producing isomalto-oligosaccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. **Applied and Environmental Microbiology**, 59(4), 953-959.
- Lazo, J., Mendoza, R., Holt, G., Aguilera, C. & Arnold, C. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, 265(1-4), 194-205.
- Lee, S., Katya, K., Hamidoghli, A., Hong, J., Kim, D.-J. & Bai, S. C. 2018. Synergistic effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* WB60 and mannanoligosaccharide (MOS) on growth performance, immunity and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Fish and Shellfish Immunology**, 83, 283-291.
- Lilly, D. M. & Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, 147(3659), 747-748.
- Lindsay, G. J. 1986. The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. **Aquaculture**, 51(3-4), 169-173.
- Maas, R. M., Verdegem, M. C., Debnath, S., Marchal, L. & Schrama, J. W. 2021. Effect of enzymes (phytase and xylanase), probiotics (*B. amyloliquefaciens*) and their combination on growth performance and nutrient utilisation in Nile tilapia. **Aquaculture**, 533, 736226.
- Machado, S., Costa, A. S., Pimentel, F., Oliveira, M. B. P. & Alves, R. C. 2020. A study on the protein fraction of coffee silver skin: protein/non-protein nitrogen and free and total amino acid profiles. **Food Chemistry**, 326, 126940.
- Maina, N. H., Juvonen, M., Domingues, R. M., Virkki, L., Jokela, J. & Tenkanen, M. 2013. Structural analysis of linear mixed-linkage glucooligosaccharides by tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, 136(3-4), 1496-1507.

- Media and Biochem. 2012. **Blood agar**. [Online]. Available www.medtechzone.com (14 September 2011).
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F. & Jafarpour, A. 2012. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition**, 96(3), 474-481.
- Meyer, D. & Stasse-Wolthuis, M. 2009. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. **European Journal of Clinical Nutrition**, 63(11), 1277-1289.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3), 426-428.
- Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M. r. & Mesbah, M. 2019. Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, 511, 634197.
- Morisse, J., Maurice, R., Boilletot, E. & Cotte, J. 1993. Assessment of the activity of a fructo-oligo-saccharide on different caecal parameters in rabbits experimentally infected with *E coli* 0.103. **Annales de zootechnie**, 42(1), 81-87.
- Mulero, I., García-Ayala, A., Meseguer, J. & Mulero, V. 2007. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. **Aquaculture**, 268(1), 244-250.
- Munilla-Morán, R. & Saborido-Rey, F. 1996. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 113(4), 827-834.
- Munir, M. B., Hashim, R., Abdul Manaf, M. S. & Nor, S. A. M. 2016. Dietary prebiotics and probiotics influence the growth performance, feed utilisation, and body Indices of snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Tropical life sciences research**, 27(2), 111-125.

- Munir, M. B., Hashim, R., Nor, S. A. M. & Marsh, T. L. 2018. Effect of dietary prebiotics and probiotics on snakehead (*Channa striata*) health: Haematology and disease resistance parameters against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, 75, 99-108.
- Mussatto, S. & Teixeira, J. 2010. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. **Biochemical Engineering Journal**, 53, 154–157.
- Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A. & Ritieni, A. 2007. Natural occurrence of ochratoxin a and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. **Journal Agricultural & Food Chemistry**, 55(25), 10499-10504.
- Narita, Y. & Inouye, K. 2012. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. **Food Chemistry**, 135(3), 943-949.
- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A. & Chong, A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). **Aquaculture**, 233(1), 305-320.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. & Setlow, P. 2000. Resistance of endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(3), 548-572.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. & Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. **Aquaculture**, 198(3), 229-236.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T. & Vuthiphandchai, V. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Veterinary Microbiology**, 159(3-4), 443-450.
- Noridayu, A. R., Hii, Y. F., Abas, F., Shaari, K. & Lajis, N. 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. **International Food Research Journal**, 18(3), 925-929.

- Oberley, L. W. & Spitz, D. R. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. **Methods in Enzymology**, 105, 457-464.
- Oggioni, M. R., Ciabattini, A., Cuppone, A. M. & Pozzi, G. 2003. *Bacillus* spores for vaccine delivery. **Vaccine**, 21, S96-S101.
- Oliveira, L. S. & Franca, A. S. 2014. An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. In **Coffee in Health and Disease Prevention**. London, UK: Elsevier Inc.
- Paixão, P. E. G., do Couto, M. V. S., da Costa Sousa, N., Abe, H. A., Reis, R. G. A., Dias, J. A. R., Meneses, J. O., Cunha, F. S., Santos, T. B. R., da Silva, I. C. A., Medeiros, E. d. S. & Fujimoto, R. Y. 2020. Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, 526, 735395.
- Pan, X., Wu, T., Zhang, L., Cai, L. & Song, Z. 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. **Letters in Applied Microbiology**, 48(3), 362-367.
- Park, G.-E., Oh, H.-N. & Ahn, S.-Y. 2009. Improvement of the ammonia analysis by the phenate method in water and wastewater. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 30(9), 2032-2038.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, 29, 4-8.
- Pereira, U. P., Mian, G. F., Oliveira, I. C., Benchetrit, L. C., Costa, G. M. & Figueiredo, H. C. 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, 140(1-2), 186-192.
- Perez, R., Ineichen, P., Seals, R., Michalsky, J. & Stewart, R. 1990. Modeling daylight availability and irradiance components from direct and global irradiance. **Solar Energy**, 44(5), 271-289.
- Petrie-Hanson, L. & Ainsworth, A. J. 2001. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 81(1), 113-127.

- Phianphak, W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S. & Menasveta, P. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for back tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Journal of Scientific Research**, 24(1), 41-58.
- Plotnikoff, G. A. & Dusek, J. 2018. Chapter 24 - Hypertension. pp. 230-241. In D. Rakel (Ed.), **Integrative Medicine (Fourth Edition)**. New York: Elsevier.
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H. & Sedaghat, N. 2013. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. **Food Science and Technology**, 50(2), 599-606.
- Pratt, C. W. & Cornely, K. 2021. **Essential biochemistry**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons.
- Press, C. M. & Evensen, Ø. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish & Shellfish Immunology**, 9(4), 309-318.
- Pridgeon, J. W. & Klesius, P. H. 2011. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccine**, 29(35), 5986-5993.
- Rahimnejad, S., Guardiola, F., Leclercq, E., Esteban, M., Castex, M., Sotoudeh, E. & Lee, S.-M. 2017. Effects of dietary supplementation with *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, galactooligosaccharide and their synbiotic on growth, innate immunity and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture**, 482, 36-44.
- Rodrigues, F., Pereira, C., Pimentel, F. B., Alves, R. C., Ferreira, M., Sarmiento, B., Amaral, M. H. & Oliveira, M. B. P. P. 2015. Are coffee silverskin extracts safe for tropical use? An *in vitro* and *in vivo* approach. **Industrial Crops and Products**, 63, 167-174.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis — An inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, 340(2), 115-126.
- Rufián-Henares, J. A. & de la Cueva, S. P. 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins—a study of their metal-chelating properties. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 57(2), 432-438.

- Rungruangsak-Torrissen, K. & Fosseidengen, J. A. N. 2007. Effect of artificial feeding on digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte of maturing Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Journal of Food Biochemistry**, 31(6), 726-747.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A. & Waagbø, R. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology & Biochemistry**, 32(1), 7-23.
- Sarder, M. R., Thompson, K. D., Penman, D. J. & McAndrew, B. J. 2001. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. **Developmental & Comparative Immunology**, 25(1), 37-46.
- Savage, T., Zakrzewska, E. & Andreassen, J. 1997. The effects of feeding mannanoligosaccharide supplemented diets to poultry on performance and the morphology of small intestine. **Poultry Science**, 76(1), 139.
- Scully, E. D., Gries, T., Sarath, G., Palmer, N. A., Baird, L., Serapiglia, M. J., Dien, B. S., Boateng, A. A., Ge, Z., Funnell-Harris, D. L., Twigg, P., Clemente, T. E. & Sattler, S. E. 2016. Overexpression of SbMyb60 impacts phenylpropanoid biosynthesis and alters secondary cell wall composition in *Sorghum bicolor*. **Plant Journal**, 85(3), 378-395.
- Seki, N. & Saito, H. 2012. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. **International Dairy Journal**, 22(2), 110–115.
- Sen, S. & Chakrabarty, L. S. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. **Journal of fermentation technology**, 62(5), 407-413.
- Sewaka, M., Trullas, C., Chotiko, A., Rodkhum, C., Chansue, N., Boonanuntanasarn, S. & Pirarat, N. 2019. Efficacy of synbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (*Oreochromis* spp.). **Fish Shellfish Immunol**, 86, 260-268.
- Shinn, M. B. 1941. Colorimetric method for determination of nitrate. **Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition**, 13(1), 33-35.

- Singh, S. K., Tiwari, V. K., Chadha, N. K., Munilkumar, S., Prakash, C. & Pawar, N. A. 2019. Effect of dietary synbiotic supplementation on growth, immune and physiological status of *Labeo rohita* juveniles exposed to low pH stress. **Fish & Shellfish Immunology**, 91, 358-368.
- Songsiriritthigul, C., Buranabanyat, B., Haltrich, D. & Yamabhai, M. 2010. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, 9(1), 20.
- Srisapoomee, P. & Areechon, N. 2017. Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. **Fish & Shellfish Immunology**, 67, 199-210.
- Standen, B. T., Peggs, D. L., Rawling, M. D., Foey, A., Davies, S. J., Santos, G. A. & Merrifield, D. L. 2016. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 49, 427-435.
- Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S. & Rungruangsak-Torrissen, K. 2008. Digestive enzymes and *in-vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*. **Aquaculture International**, 16(5), 437-453.
- Swain, P. & Nayak, S. K. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, 27(2), 89-99.
- Swallow, D. M. 2003. Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. **Annual Review of Genetics**, 37(1), 197-219.
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H. P., Dawson, K. A., Merchen, N. R. & Fahey, G. C., Jr. 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Journal Nutrition**, 132(5), 980-989.

- Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J., Dias Dde, 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.
- Terada, A., Hara, H., Kataoka, M. & Mitsuoka, T. 1992. Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal flora. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 5(1), 43-50.
- Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, T., Chantachum, S., Kijroongrojana, K., Itharat, A., Reanmongkol, W., Tewtrakul, S. & Ooraikul, B. 2009. Prebiotics - a review. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, 31(4), 401-408.
- Thongprajukaew, K., Kovitvadhii, U., Engkagul, A. & Rungruangsak-Torrissen, K. 2010. Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). **Kasetsart Journal (Natural Science)**, 44(3), 411-423.
- Tiengtam, N., Khempaka, S., Paengkoum, P. & Booanuntanasarn, S. 2015. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animal Feed Science and Technology**, 207, 120-129.
- Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D. & Nitisinprasert, S. 2008. Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(8), 1425-1433.
- Tokunaga, T., Nakada, Y., Tashiro, Y., Hirayama, M. & Hidaka, H. 1993. Effects of fructooligosaccharides intake on the intestinal microflora and defecation in healthy volunteers. **BIFIDUS-Flores, Fructus et Semina**, 6(2), 143-150.
- Tramer, J. 1966. Inhibitor Effect of *Lactobacillus acidophilus*. **Nature**, 211(5045), 204-205.
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gee, J. M. & Gibson, G. R. 2005. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers

- in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. **Journal Nutrition**, 135(7), 1726-1731.
- USAID. 2011. **Feed Conversion Ratio-Technical Bulletin# 07**. [Online]. Available www.CambodiaHARVEST.org/www.fintrac.com (26 January 2022).
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Tapingkae, W., Seel-Audom, M., Jaturasitha, S., Dawood, M. A. O., Wongmaneeprateep, S., Thu, T. T. N. & Esteban, M. 2020. Boosted growth performance, mucosal and serum immunity, and disease resistance Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings using corn-cob-derived xylooligosaccharide and *Lactobacillus plantarum* CR1T5. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, 12(2), 400-411.
- Van Rijn, P. C. J., Mollema, C. & Steenhuis-Broers, G. M. 1995. Comparative life history studies of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber. **Bulletin of Entomological Research**, 85(2), 285-297.
- Verna, E. C. & Lucak, S. 2010. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? **Therapeutic advances in gastroenterology**, 3(5), 307-319.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. & Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. **Aquaculture**, 219(1), 43-56.
- Vuthiphandchai, V. 1993. **Fish Feed**. Bangkok: O.S. Printing House Co., Ltd., (in Thai).
- Wang, M., Yi, M., Lu, M., Gao, F., Liu, Z., Huang, Q., Li, Q. & Zhu, D. 2020. Effects of probiotics *Bacillus cereus* NY5 and *Alcaligenes faecalis* Y311 used as water additives on the microbiota and immune enzyme activities in three mucosal tissues in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in outdoor tanks. **Aquaculture Reports**, 17, 100309.
- West, G. C., Peyton, L. J. & Irving, L. 1968. Analysis of Spring Migration of Lapland Longspurs to Alaska. **The Auk**, 85(4), 639-653.
- Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, M. s. & Boonanuntanasarn, S. 2015. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. **Aquaculture**, 436, 179-187.

- 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.
- Yanbo, W. & Zirong, X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Animal Feed Science and Technology**, 127(3), 283-292.
- Yao, W., Li, X., Zhang, C., Wang, J., Cai, Y. & Leng, X. 2021. Effects of dietary synbiotics supplementation methods on growth, intestinal health, non-specific immunity and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, 112, 46-55.
- Ye, J. D., Wang, K., Li, F. D. & Sun, Y. Z. 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture Nutrition**, 17(4), e902-e911.
- Zion, B., Shklyar, A. & Karplus, I. 2000. *In-vivo* fish sorting by computer vision. **Aquacultural Engineering**, 22(3), 165-179.
- Zuo, Z. H., Shang, B. J., Shao, Y. C., Li, W. Y. & Sun, J. S. 2019. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, 86, 160-168.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

การทดสอบการใช้เอนไซม์ Cellulase Cellusoft® L Ultra conc และ CR conc ในการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee Silver Skin) ที่ผ่านสกัดด้วยการต้ม (Coffee Silver Skin : CSS(w)) และไม่ผ่านการสกัด (Coffee Silver Skin :CSS(p)) (ดัดแปลงจาก Apiraksakorn et al., 2008)

1. การหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (Coffee Silver Skin: CSSp)
 - ชั่งผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 2.5 g/น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ml (อัตราส่วน 1:20) ใส่ลงไปใน flask จำนวน 2 ขวด เขย่าให้เข้ากัน
2. การหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ผ่านสกัดด้วยการต้ม (Coffee Silver Skin: CSSe)
 - ชั่งผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 25 g/น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 ml (อัตราส่วน 1:20) นำไปต้มนาน 127 นาที ที่อุณหภูมิ 90 °C จากนั้นเทสารสกัด ปริมาตร 50 ml ใส่ลงไปใน flask จำนวน 2 ขวด
3. ขั้นตอนการหมักด้วยเอนไซม์ Cellulase Cellusoft® L Ultra conc และ Cellulase CR conc
 - 3.1 เติมเอนไซม์ Cellulase Cellusoft® L Ultra conc ปริมาตร 0.5 ml/เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงและแบบที่ผ่านด้วยการสกัด ปริมาตร 50 ml อัตราส่วน 1:100 (CSSe: Ultra) (CSSp: Ultra)
 - 3.2 เติมเอนไซม์ Cellulase CR conc ปริมาตร 0.5 ml/เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงและแบบที่ผ่านด้วยการสกัด ปริมาตร 50 ml อัตราส่วน 1:100 (CSSe: CR) (CSSp: CR)
 - 3.3 เติม Ampicillin (AMP) ปริมาตร 0.05 ml ทั้ง 4 ขวด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
 - 3.4 นำขวดสารละลายไว้ในเครื่อง Incubator Shakers อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยเก็บตัวอย่าง ที่เวลา 0, 2,4,6,8,10,12,18 และ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 1 ml ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml นำตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมอาหารทดลอง

1. การเตรียมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ
 - 1.1 นำเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ผ่านการอบแห้งกะเทาะเปลือกแล้ว นำไปบดให้ละเอียด ใส่ภาชนะปิดสนิทเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง
 - 1.2 ชั่งเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5 กรัม ใส่ใน flask 250 ml เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 ml (อัตราส่วน 1 : 20) และเติมเอนไซม์ Cellusoft® Ultra conc ปริมาณ 4 ml เพื่อย่อยเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟให้มีน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ เขย่าให้เข้ากัน

- 1.3 บ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ โพรไบโอติกส์ *Bacillus subtilis* (ณัฐฐา, 2555)
 - 2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ซึ่งอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) 30 กรัม ลงในน้ำ 1 L ต้มให้ละลายแล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 ml ที่ปริมาณ 30 ml และใส่ในขวดดูแรน 500 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 P/in² ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เป็นการกำจัดเชื้อโดยใช้ความร้อนขึ้น และนำไปใส่ตู้ปลอดเชื้อ เป็นตู้ปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ โดยมีเครื่องกรองอากาศ ให้ปราศจากฝุ่น จุลินทรีย์ โดยอากาศจะถูกกรองผ่านตัวกรอง (filter membrane) ซึ่งทิศทางการเคลื่อนที่ของอากาศ อาจเป็นไปในแนวนอน หรือแนวตั้ง และโดยทั่วไปจะมีการฆ่าเชื้ออากาศ และพื้นผิวภายในด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet; UV) โดยทำการเปิดหลอดไฟ UV ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที ก่อนปฏิบัติงาน

2.2 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ โพรไบโอติกส์ *Bacillus subtilis*

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการปั่นล้างแบคทีเรียที่ได้ด้วย 0.85% NaCl (85 g / น้ำ 1 L) ปลอดเชื้อที่ความเร็ว 6,000 rpm รอบละ 10 นาที จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรีย ให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรีย OD ที่ 0.306 nm โดยการวัดค่าด้วยเครื่องดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 540 nm

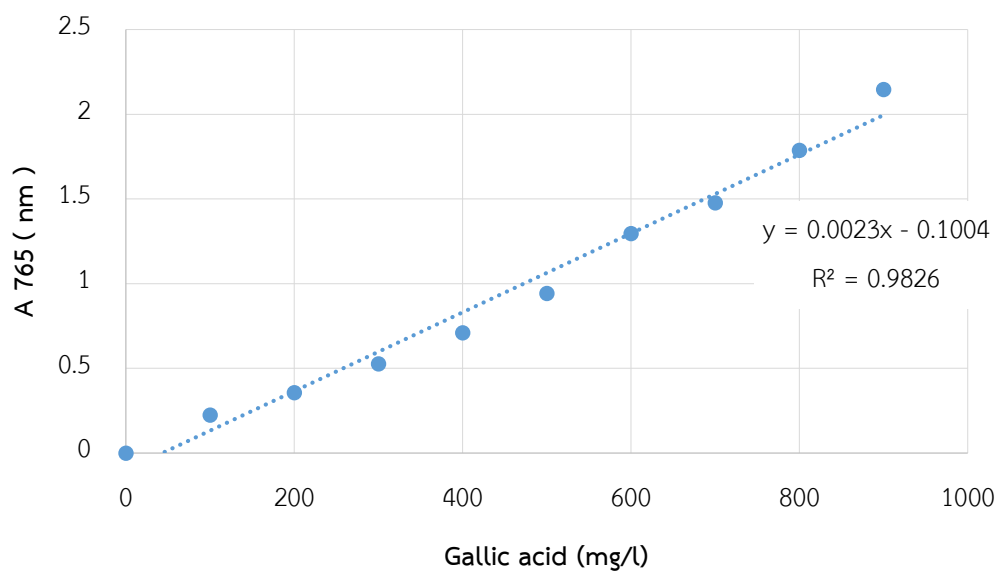
3. การเตรียมอาหารทดลอง

- 3.1. โพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ปริมาณเซลล์ 0.5×10^7 , 1×10^8 CFU/g ปริมาตร 10 ml ต่ออาหาร 100 g
- 3.2. โพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟหลักการหมักด้วยเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยพ่นลงในอาหาร อัตราส่วน 25 ml ต่ออาหาร 100 g
- 3.3. สำหรับอาหารชุดควบคุมจะไม่ผสมเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกและโพรไบโอติก และ ผึ่งอาหารให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 37 °C

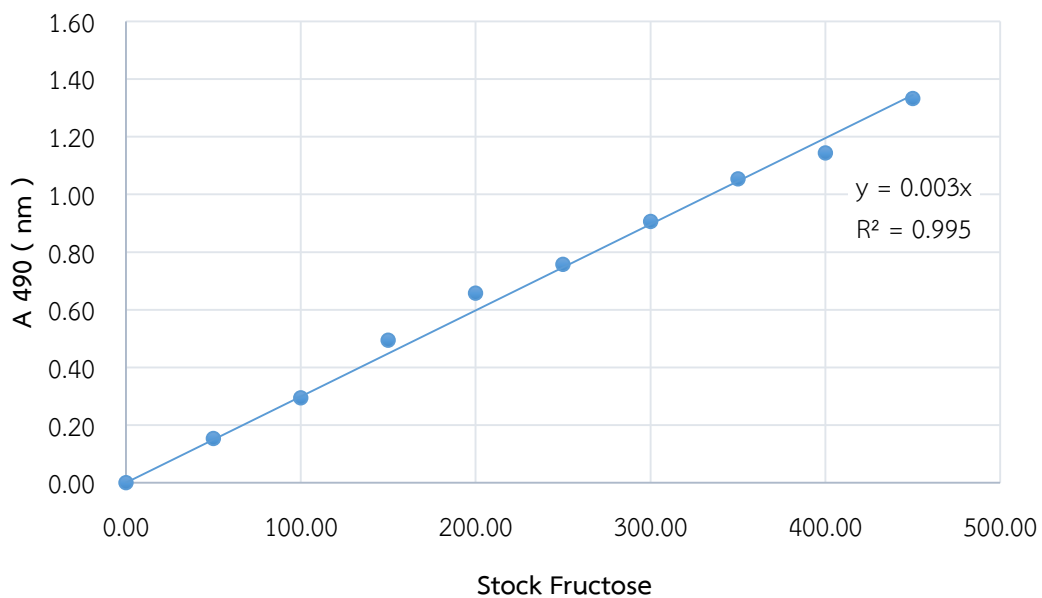


ภาคผนวก ข

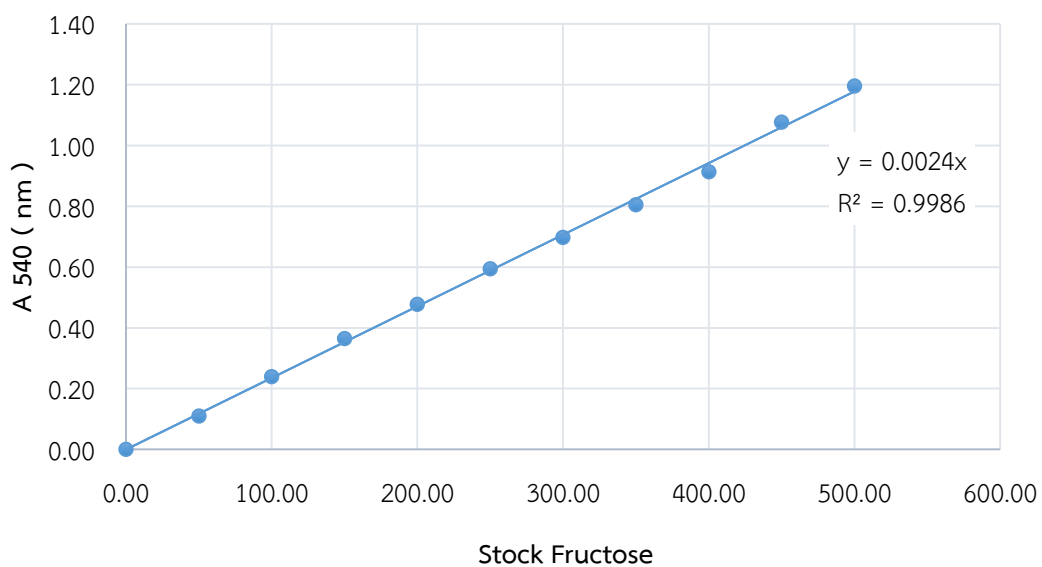
ภาพผนวก



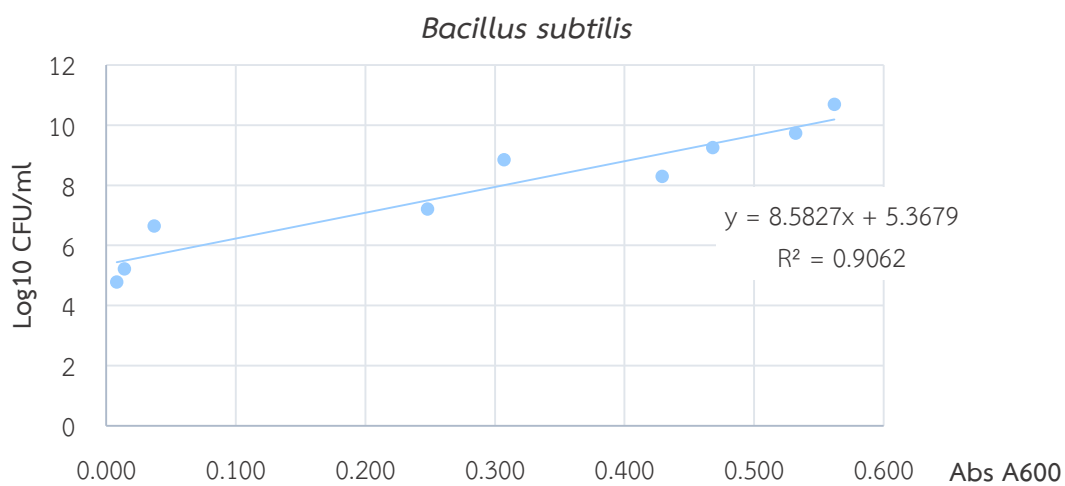
ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method



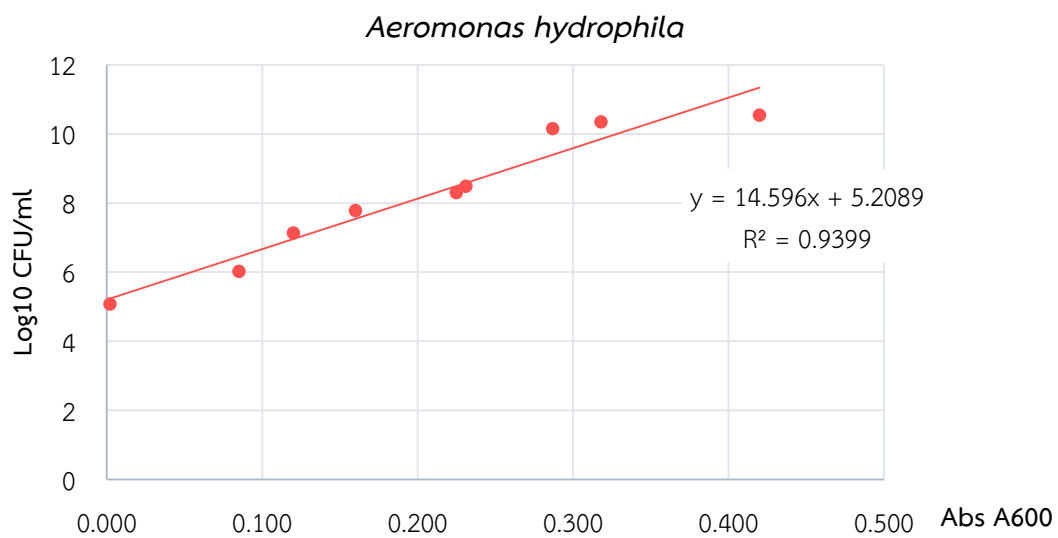
ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานที่มีน้ำตาลทั้งหมดเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน



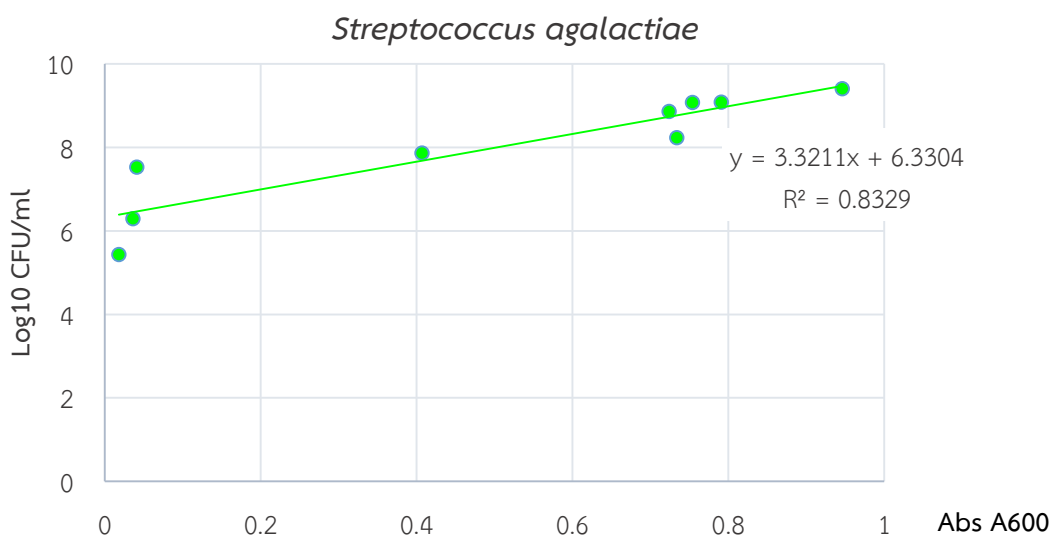
ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*



ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Aeromonas hydrophila*



ภาพผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus agalactiae*



ภาคผนวก ค

สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

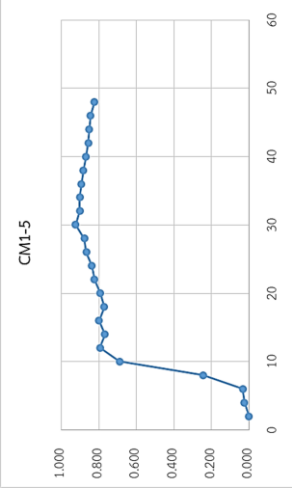
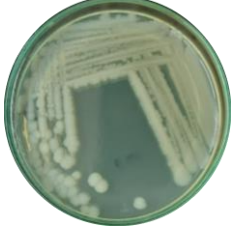
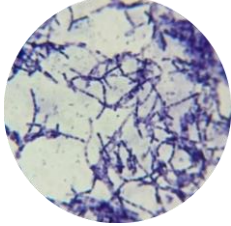
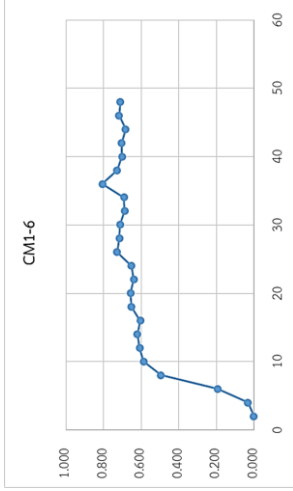

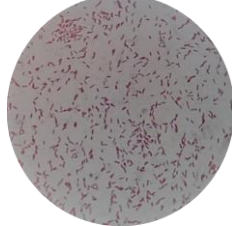
ตารางผนวกที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบบที่เรียงเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากฟาร์มต่าง ๆ

ตัวอย่าง* แหล่งที่มา**	การเจริญเติบโต	ลักษณะโคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM1-1 ลำไส้ปลา	<p>CM1-1</p>	<p>โคโลนีรูปร่างกลม ขนาด 1-3 มม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหนามันวาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1-2 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นกลุ่ม</p>	<p>สร้างสปอร์</p>
CM1-2 ลำไส้ปลา	<p>CM1-2</p>	<p>โคโลนีรูปร่าง ขนาด 1-3 มม ผิวหนามันวาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1-2 μm หนา 0.5 μm อยู่เป็นกลุ่ม</p>	<p>สร้างสปอร์</p>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง* แหล่งที่มา**	การเจริญเติบโต	ลักษณะโคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM1-3	ลำไต้ปลา	<p>CM1-3</p>	<p>สร้างสปอร์ (เยอะมาก)</p>
CM1-4	ลำไต้ปลา	<p>CM1-4</p>	<p>ไม่สร้างสปอร์</p>

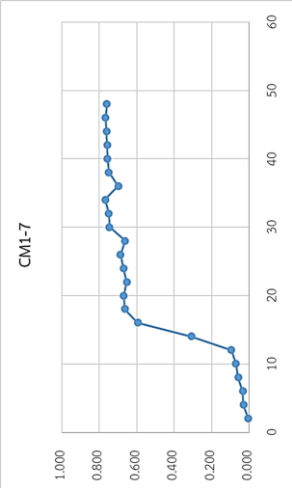
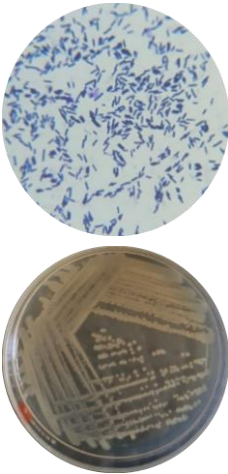
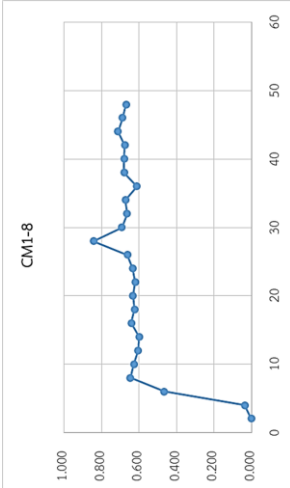
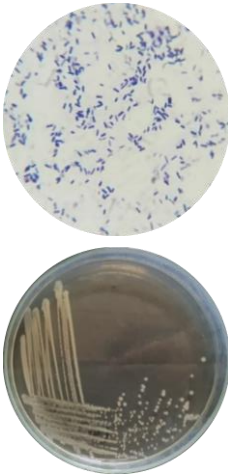
ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง แหล่งที่มา	การเจริญเติบโต	ลักษณะโคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain	
CM1-5 ลำไส้ปลา				สร้างสปอร์
CM1-6 ลำไส้ปลา				สร้างสปอร์

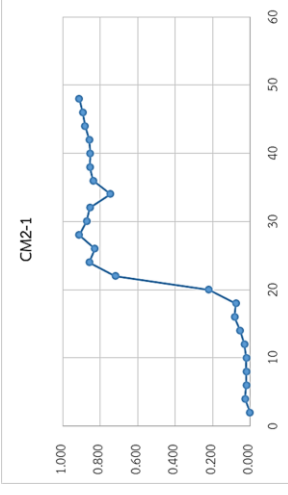
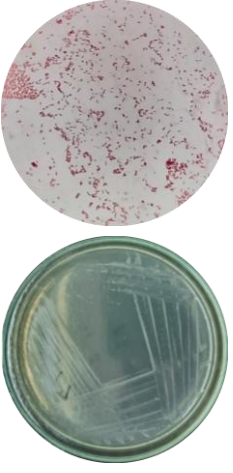
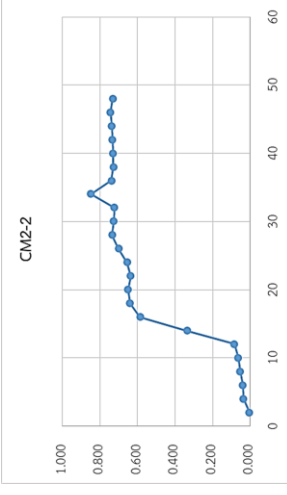
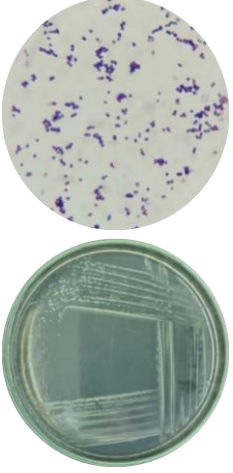
โคโลนีรูปร่างกลม ขอบหยัก สีขาวขุ่น ขนาด 2-6mm
ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 3-4µm
หนา 1µm ต่อกันเป็นสายยาว

โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลมผิวเรียบ ขนาด 0.5-1 mm
ขอบเรียบ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น
ความยาว 2-4 µm หนา 0.5 µm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง แหล่งที่มา	การเจริญเติบโต	ลักษณะโคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM1-7	ถ้าใส่ปลา		 <p data-bbox="783 584 938 1196">โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมผิวเรียบ ขนาด 1-2 มม ขอบเรียบ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 2-4µm หนา 1µm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว</p> <p data-bbox="703 353 735 510">ไม่สร้างสปอร์</p>
CM1-8	ถ้าใส่ปลา		 <p data-bbox="1187 584 1342 1196">โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขนาด 0.1-1 มม ขอบเรียบ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 2-3µm หนา 1µm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว</p> <p data-bbox="1139 367 1171 495">สร้างสปอร์</p>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	การเจริญเติบโต	โคโคไนท์, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM2-1	ดิน	 <p>CM2-1</p>		สร้างสปอร์
CM2-2	ดิน	 <p>CM2-2</p>		ไม่สร้างสปอร์

สีขาวใส รูปร่างกลม ขนาด 0.1-0.2 mm ขอบเรียบ
ผิวหน้ามันวาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว
1µm หนา 0.5µm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

สีขาวขุ่น รูปร่างกลม ขนาด 0.1-0.3 mm ขอบเรียบ
ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	การเจริญเติบโต	ลักษณะโคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM2-3	ดิน	<p>CM2-3</p>		สร้างสปอร์
CM2-4	ดิน	<p>CM2-4</p>		สร้างสปอร์

โคไลนีรูปร่างกลม ขนาด 1-3mm สีขาวขุ่น ขอบเรียบ
ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 2-4µm
หนา 1µm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

โคไลนีรูปร่างกลม ขนาด 1-2mm สีเหลืองขุ่น ขอบเรียบ
ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 2-4µm
หนา 1µm อยู่เป็นกลุ่ม

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	การเจริญเติบโต	ลักษณะโคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM2-5	ดิน			สร้างสปอร์
CM2-6	ดิน		<p>โคโลนีรูปร่างกลม ขนาด 1-2mm สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 3-4µm หนา 1µm ต่อกันเป็นสายยาว</p>	ไม่สร้างสปอร์
			<p>โคโลนีรูปร่างกลม ขนาด 1-2mm สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ความยาว 5-8µm หนา 0.5µm ต่อกันเป็นสายยาว</p>	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง* แหล่งที่มา**	การเจริญเติบโต	โคโลนี, การติดสีแกรม	Endospore stain
CM3-1	น้ำ		<p data-bbox="692 360 724 517">ไม่สร้างสปอร์</p>
CR1-2	ลำไส้		<p data-bbox="1123 360 1155 501">สร้างสปอร์</p> <p data-bbox="778 600 932 1178">โคโลนีสีขาวใส รูปร่างกลม ขนาด 0.1-0.2 mm ขอบเรียบ ผิวหน่มันวาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นเชลล์เดี่ยว</p> <p data-bbox="1182 600 1331 1178">สีขาวยุ่น กลม มันวาว ผิวเรียบ ขอบเรียบ แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ยาว 1.5-3 μm หนา 1 μm อยู่เป็นเชลล์เดี่ยว</p>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	การเจริญเติบโต	โคโคเน็, การติดสีแกรม	Endospore stain
CR4-1	ลำไ้			
			<p>สีขาว กลม มีนํวาวขอบเรียบ ผิวเรียบ แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1-2.5 μm หน้า 0.5 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว</p>	<p>สร้างสปอร์</p>
CR10-5	ลำไ้			
			<p>สีขาวใส กลม ขอบเรียบ ผิวหยาบ แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ความยาว 1.5-2.5 μm หน้า 1 μm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว</p>	<p>สร้างสปอร์</p>

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวณัฐธิดา กามเมือง
เกิดเมื่อ	4 สิงหาคม พ.ศ. 2539
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพร้าววิทยาคม จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2558 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพร้าววิทยาคม จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2562 ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

