

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. พันธุ์ปลานิลแดงแปลงเพศ

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ ขนาดความยาว 1 นิ้ว จากหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

2. สารเคมี

2.1 วัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารทดลอง (ตารางที่ 2)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.2.1 สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่างเลือดปลา

1. Clove oil

2. EDTA

2.2.2 สารเคมีสำหรับหาปริมาณฮีโมโกลบิน

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์คาร์บอเนต

2. โปแตสเซียมไซยาไนด์

3. โปแตสเซียมเพอร์คไซยาไนด์

4. น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับนับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

1. โซเดียมคลอไรด์

2. เด็กซ์โทรส

3. โปแตสเซียมคลอไรด์

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์คาร์บอเนต

5. ฟอร์มาลิน (Formalin : 40 %)

6. น้ำกลั่น

7. เมทิลไวโอเลต

8. ไพโรนิน บี

2.2.4 สารเคมีสำหรับวัดระดับแอนติบอดีไตเตอร์

1. น้ำเกลือ 0.85 %
2. ฟอร์มาลิน 0.1 %

2.3 สารเคมีสำหรับทดสอบการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในระบบภายนอกสิ่งมีชีวิต (*in vitro*)

2.3.1 โซเดียมคลอไรด์

2.3.2 น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.3 peptone water

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.1 อาหารเหลว (nutrient broth)

2.4.2 Tryptic Soy Broth (TSB)

2.4.3 Thiosulphate Citrate Bile Salt (TCBS)

2.4.4 Rimler shott agar

3. อาหารสำหรับปลานิลแดงแปลงเพศ

เตรียมอาหารของปลานิลแดงแปลงเพศโดยดัดแปลงสูตรอาหารจาก Tudkaew และคณะ (2008)

4. จุลินทรีย์

4.1 *Bacillus* spp. (เชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี)

4.2 *Pseudomonas* spp. (เชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี)

4.3 *Vibrio* spp. (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่)

4.4 *Streptococcus iniae* (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย

1.1 จานเพาะเชื้อ (plate)

1.2 ลูปเขี่ยเชื้อ

1.3 ชุดผ้าตัด

1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

- 1.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงปลาเพื่อทดลอง
 - 2.1 บ่อซีเมนต์สำหรับอนุบาลลูกปลา
 - 2.2 ตู้ทดลองใช้ตู้กระจกขนาด 100 × 50 × 47 เซนติเมตร
 - 2.3 อุปกรณ์ให้อากาศประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง และหัวทราย
3. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ห่อองค์ประกอบเลือดปลา
 - 3.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริต
 1. เครื่องฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (haematocrit centrifuge)
 2. หลอดคาปิลลารี (capillary tube)
 3. ดินน้ำมัน
 - 3.2 อุปกรณ์นับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว
 1. ไดลูทติ้งปิเปต (RBC diluting pipette)
 2. สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)
 3. กล้องจุลทรรศน์
 - 3.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ห่อองค์ประกอบเลือดและระดับแอนติบอดี
 1. microtitre plate
 2. กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยา
 3. ไมโครปิเปต

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมพรีไบโอติก

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 3 กลุ่มคือ เชื้อ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมสารพรีไบโอติก 3 ชนิด คือ อินนูลิน กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ ซอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เติมเชื้อแต่ละชนิดลงในอาหารเหลวที่เติมพรีไบโอติกแต่ละชนิด โดยให้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ทดสอบมีค่าประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร บ่มอาหารเหลว nutrient broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างมาเจือจางในระดับที่เหมาะสม เพื่อทดสอบการเจริญโดยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง Tryptic soy agar นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลองเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมพรีไบโอติก โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) แบ่ง

การทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ อาหารเหลวชุดที่มีการเติมพรีไบโอติก 3 ชนิด คือ อินนูลิน กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ ซอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ และอาหารเหลวชุดที่ไม่มีการเติมพรีไบโอติก โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองทำการทดสอบการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ 3 ชนิด คือ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955)

ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นของลำไส้ปลานิล โดยทดสอบการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp. ในอาหารเหลวที่ไม่เติม และเติมสารพรีไบโอติก 3 ชนิด ที่ต้องการทดสอบ เปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลอง ขณะที่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อโรค โดยทดสอบการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในอาหารเหลวที่ไม่เติม และเติมสารพรีไบโอติก 3 ชนิด การทดลองครั้งนี้ใช้เพื่อนำไปเปรียบเทียบผลในลักษณะเดียวกันซึ่งทดสอบในปลานิลแดงแปลงเพศ

2. การทดสอบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันของปลานิลแดงแปลงเพศต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. iniae* เมื่อปลานิลแดงแปลงเพศได้รับอาหารเสริมพรีไบโอติก

เพื่อทดสอบการเจริญและการยับยั้งแบคทีเรียในลำไส้ปลา ความสามารถในการต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. iniae* โดยใช้สูตรอาหารพื้นฐานที่ไม่มีการเสริมพรีไบโอติกเป็นชุดควบคุม (control) และชุดอาหารที่มีการเสริมพรีไบโอติกแต่ละชนิดที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ การทดลองชุดที่ 1 เป็นปลาที่ไม่มีการฉีดเชื้อ *S. iniae* ส่วนชุดการทดลองที่ 2 เป็นปลาที่มีการฉีดเชื้อ *S. iniae* โดยแต่ละชุดการทดลองจะให้อาหารสูตร 1-4 สูตรละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955) โดยเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศด้วยอาหารแต่ละสูตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์

อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุม (ไม่เติมพรีไบโอติก)

อาหารสูตรที่ 2 อาหารเติมอินนูลิน

อาหารสูตรที่ 3 อาหารเติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์

อาหารสูตรที่ 4 อาหารเติมซอยบินโอลิโกแซคคาไรด์

2.1 การเตรียมสูตรอาหารสำหรับปลานิลแดง

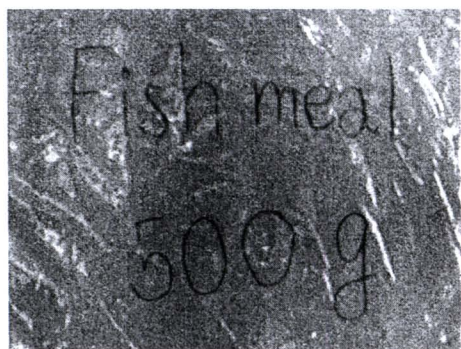
วัตถุดิบที่เป็นส่วนผสมของอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศ ได้แก่ ปลาป่นเกรดกุ้ง กากถั่วเหลือง รำข้าว และมันบด ต้องผ่านการร่อนเพื่อให้ได้ส่วนที่มีความละเอียดแล้วจึง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี(ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ก่อนตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1995) เพื่อนำค่าที่ได้มาสร้างสูตรอาหารเพื่อจะทำอาหารปลาในขั้นตอนต่อไป วัตถุดิบแต่ละชนิดที่ใช้ดัง ภาพที่ 3-12 และตารางที่ 2

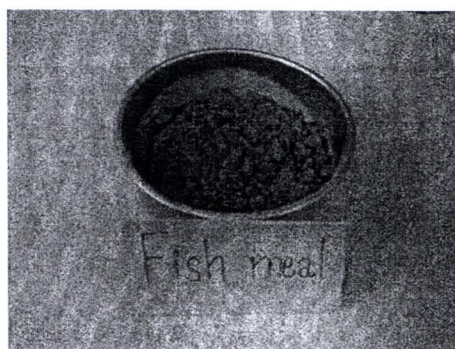
สูตรอาหารในตารางที่ 2 เป็นสูตรอาหารพื้นฐาน (basal diet) และสูตรเสริมด้วย พรีไบโอติกอีก 3 สูตร ซึ่งอาหารสูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุมไม่มีการเสริมพรีไบโอติก อาหารสูตรที่ 2 มีการเสริมอินูลิน 5% ลงในสูตรอาหารพื้นฐาน อาหารสูตรที่ 3 มีการเสริมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5% ลงในสูตรอาหารพื้นฐาน และอาหารสูตรที่ 4 มีการเสริมชอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ 5% ลงในสูตรอาหารพื้นฐาน ผสมสูตรอาหารแต่ละสูตรโดยใช้เครื่องเตรียมอาหารทดลอง ประกอบด้วย ชุดผสมอาหารแบบมี ใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร โดยอาหารแต่ละสูตรเติมน้ำลงไป 35% ก่อนนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแวนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารที่อบแห้งแล้วบรรจุลงถุงพลาสติก นำไปเก็บรักษาไว้ใน ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (ความชื้น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1995) ก่อนนำไปใช้ทดลองเลี้ยงปลา

2.2 การเตรียมปลาทดลอง

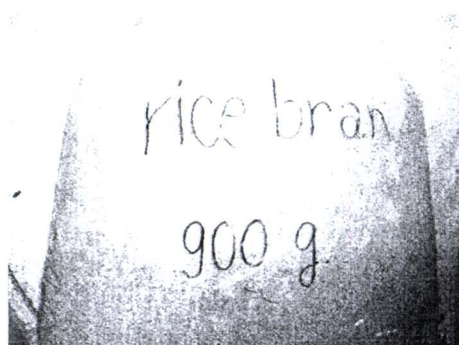
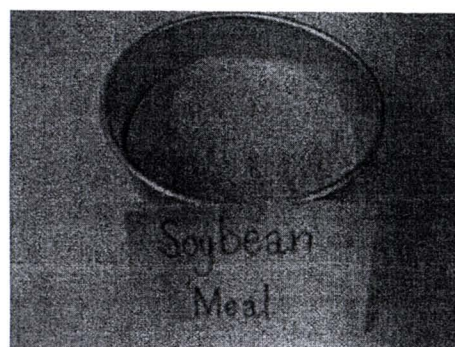
นำปลานิลแดงแปลงเพศขนาดความยาว 1 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 5 กรัม มาอนุบาลในบ่อ ซีเมนต์โดยให้อากาศตลอดเวลา โดยให้อาหารลูกปลาดุกขนาดเล็กยี่ห้อไฮ-เกรดเบอร์ 9961 (เช้า-เย็น) และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ปรับสภาพเพื่อให้ปลาเกิดความคุ้นเคยประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงฝึกให้ ลูกปลานิลแดงแปลงเพศกินอาหารสูตรควบคุมจนลูกปลานิลแดงแปลงเพศมีน้ำหนักประมาณ 3 กรัมจึง ทำการคัดขนาดปลาไปทดลองในตู้กระจกที่มีน้ำเตรียมไว้แล้ว โดยใส่ปลาที่คัดเลือกได้ใส่ลงไปในตู้กระจก ตู้อยู่ 20 ตัว แต่ละตู้ทดลองจะให้อากาศตลอดเวลา ควบคุมคุณภาพน้ำ โดยผ่านการปรับสภาพให้ เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลาตลอดการทดลอง โดยเริ่มให้อาหารแต่ละสูตรที่เตรียมไว้กับปลาแต่ละตู้วัน ละ 2 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วันก่อนเริ่มทำการทดลองจริง



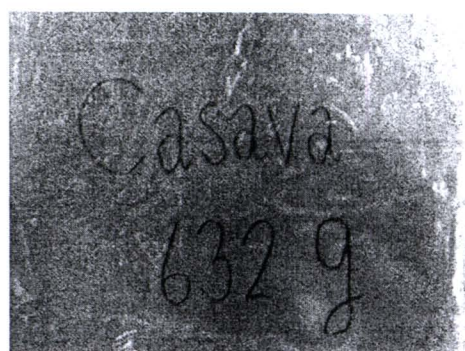
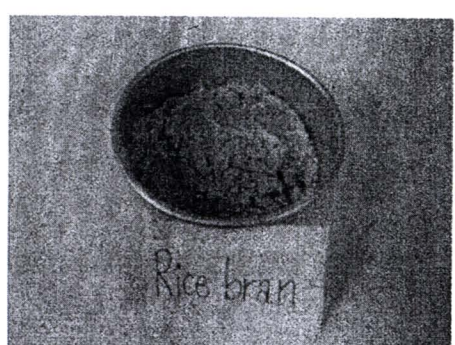
ภาพที่ 3 ปลาป่นเกรดกึ่ง (fish meal)



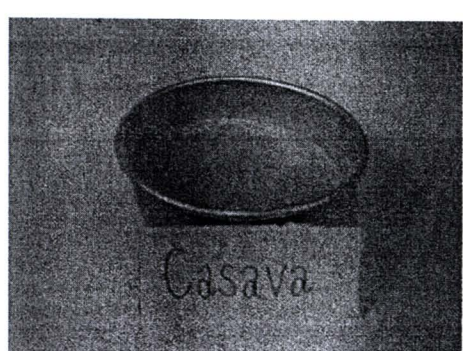
ภาพที่ 4 กากถั่วเหลือง (soybean meal)

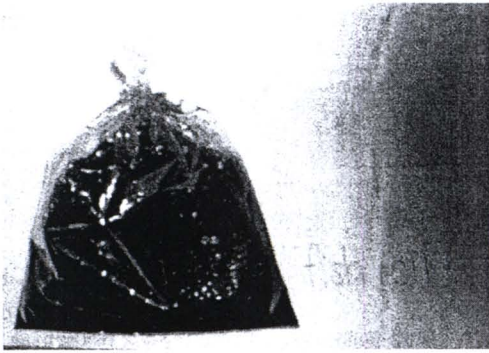


ภาพที่ 5 รำข้าว (rice bran)

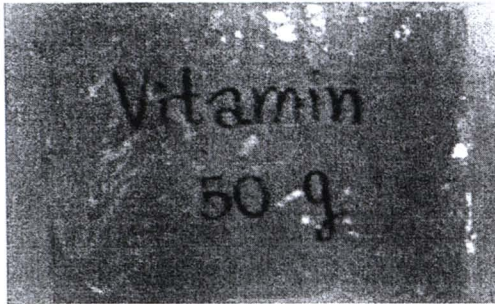


ภาพที่ 6 มันสำปะหลังบด (cassava)

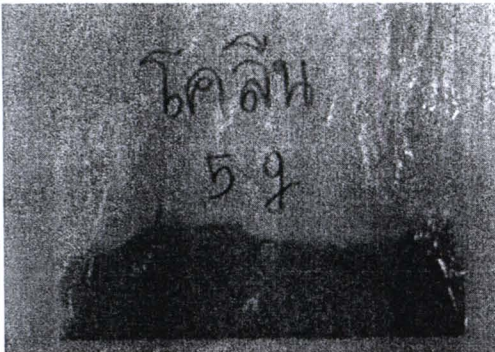
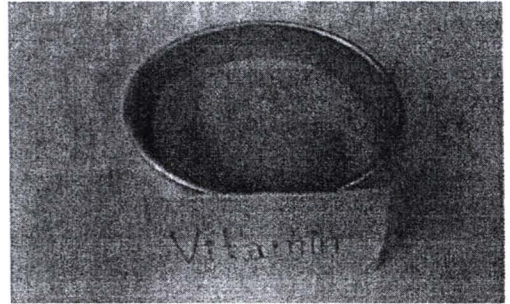




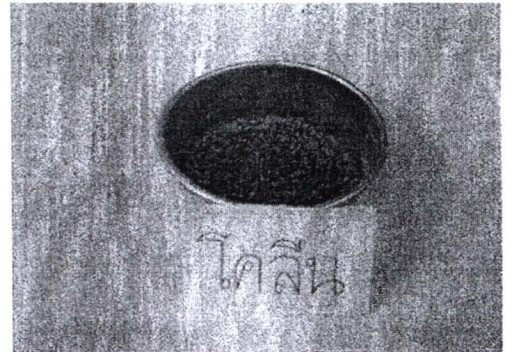
ภาพที่ 7 น้ำมันปลา (fish oil)



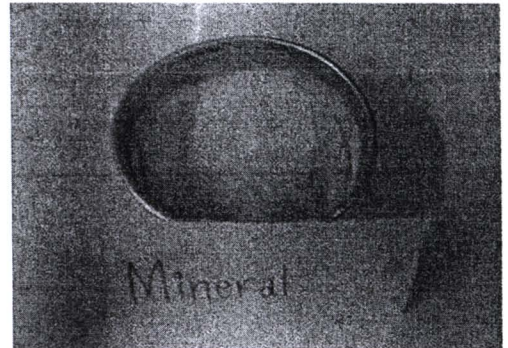
ภาพที่ 8 วิตามินผสม (vitamin)

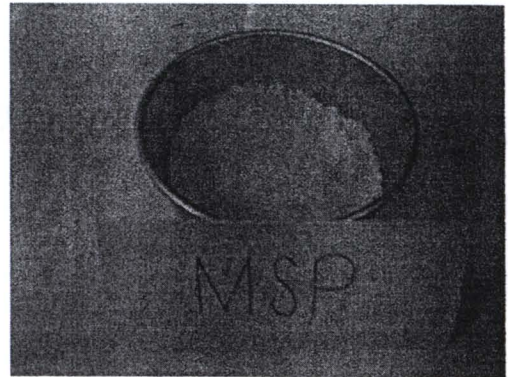
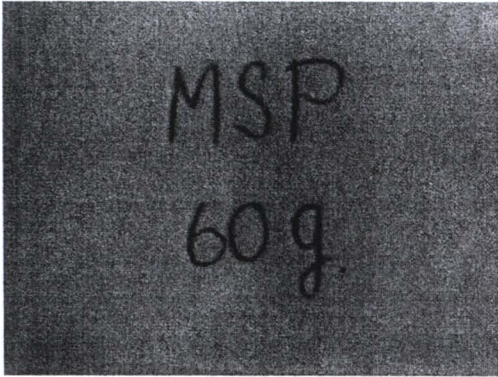


ภาพที่ 9 โคลีน (choline)

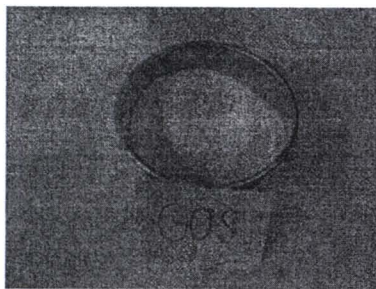
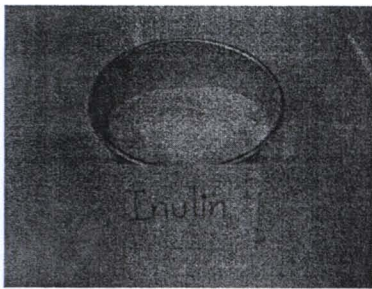


ภาพที่ 10 เกลือแร่ (mineral)





ภาพที่ 11 Mono-Sodium phosphate (MSP)



1)

2)

3)

ภาพที่ 12 프리ไบโอติก 3 ชนิด คือ 1) อินนูลิน (inulin) 2) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (GOS) และ 3) ซอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ (SOS)

1.2 ศึกษาผลของ프리ไบโอติกต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลานิลแดงแปลงเพศ

เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

1.2.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะภายนอกของปลา

ระหว่างการทดลองก่อนและหลังให้อาหารปลาทุกครั้ง ให้สังเกตลักษณะภายนอกของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆ 2 วัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 30% เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสม

1.2.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994)

ชั่งน้ำหนักปลาทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละตู้ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหารในวันที่ชั่งน้ำหนัก) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตอาการของปลา

ตลอดการทดลองพร้อมบันทึกผลไว้จนสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยของปลาแต่ละตัว อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการกินอาหาร

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของอาหารทดลองแต่ละสูตร 100 กรัม

วัตถุดิบ กรัม/อาหาร 100 กรัม	สูตรอาหาร			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
ปลาป่นเกรดกุ้ง	10	10	10	10
กากถั่วเหลือง	45	45	45	45
รำข้าว	18	18	18	18
มันบด	19.4	14.4	14.4	14.4
น้ำมันปลา	1.5	1.5	1.5	1.5
วิตามินผสม	1	1	1	1
Choline chloride	0.6	0.6	0.6	0.6
แร่ธาตุผสม	3	3	3	3
Mono-Sodium phosphate (MSP)	1.5	1.5	1.5	1.5
พรีไบโอติก	0	5	5	5

¹ วิตามินผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Retinal (A) 1.20 มิลลิกรัม (4,000 IU); Cholecalciferol (D₃) 0.51 มิลลิกรัม (2,000 UI); Tocopherol (E) 50 มิลลิกรัม; Menadione sodium bisulfate 10 มิลลิกรัม; Thiamine (B₁) 10 มิลลิกรัม; Riboflavin (B₂) 20 มิลลิกรัม; Pyridoxine (B₆) 20 มิลลิกรัม; Cyanocobalamin 0.2 มิลลิกรัม; Calcium pantothenate 200 มิลลิกรัม; Niacin 150 มิลลิกรัม; Folic acid 5 มิลลิกรัม; Biotin 2 มิลลิกรัม และ Inositol 400 มิลลิกรัม

² แร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย MnSO₄.H₂O 25 มิลลิกรัม; ZnSO₄. 7H₂O 20 มิลลิกรัม; FeSO₄.7H₂O 30 มิลลิกรัม; KIO₃ 5 มิลลิกรัม; CuSO₄. 5H₂O 5 มิลลิกรัม; CoCl₂. 6H₂O 0.05 มิลลิกรัม และ Na₂SeO₃ 0.3 มิลลิกรัม

³ พรีไบโอติกของอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 4 คือ อินนูลิน กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และ ซอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ ตามลำดับ

1.2.2.1 การคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์ weight gain) โดยสมการ
 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{(\text{น้ำหนักปลาสุดท้าย} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}}$

1.2.2.2 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) โดย
 สมการ
 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%น้ำหนักตัว/วัน) = $\frac{(\ln \text{ น้ำหนักสุดท้าย} - \ln \text{ น้ำหนักปลาเริ่มต้น}) \times 100}{\text{เวลา (วัน)}}$

1.2.2.3 การคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate)
 คำนวณตามวิธีการของ Dupree and Sneed (1996) จากสมการ
 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$

1.2.2.4 อัตราการรอดชีวิตของปลา
 อัตราการรอดชีวิตของปลา (ร้อยละ) ในแต่ละชุดการทดลองตลอดระยะเวลา
 การเลี้ยง 8 สัปดาห์คำนวณได้จากสมการ
 อัตราการรอดชีวิตของปลา = $\frac{(\text{จำนวนปลาเริ่มต้น} - \text{จำนวนปลาที่ตาย}) \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}$

1.2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา
 สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในซาก
 ทันทิและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และ
 เถ้า ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1995) บันทึกองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น และเมื่อสิ้นสุดการ
 ทดลองในสัปดาห์ที่ 6 สุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ ตู้ละ 3 ตัว เพื่อวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน และ
 เถ้า ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1995) เช่นเดียวกับปลาก่อนทดลอง บันทึกองค์ประกอบทางเคมีของตัว
 ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

1.2.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือด
 นำตัวอย่างเลือดปลาแต่ละชุดการทดลองไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเม็ดเลือด
 ฮีมาโตคริตและปริมาณกิจกรรมของไลโซไซม์

2.3.4.1) การเก็บตัวอย่างเลือดจากตัวปลา มีหลากหลายวิธีแต่ในการทดลองนี้จะเจาะ
 จากเส้นเลือดส่วนหางซึ่งค่อนข้างสะดวกและไม่ค่อยมีการปนเปื้อนจาก exudates ต่างๆ ของเนื้อเยื่อ มี
 ขั้นตอนคือ ทำการสลบปลาด้วยยาสลบ Clove oil เมื่อปลาสลบแล้วก็วางลงบนถาดใช้ผ้าสะอาดเช็ดน้ำ
 และเมื่อครบบริเวณลำตัวออกให้สะอาด แล้วใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มเบอร์ 25 มาเคลื่อน
 ภายในด้วยสารละลาย EDTA 1% จากนั้นค่อย ๆ แทะเข็มเข้าไปบริเวณฐานครีบก้นให้ห่างจากรูก้น
 ประมาณ 1 นิ้ว แทะเข็มลงไปจนกระทบกับส่วนของกระดูกสันหลัง ซึ่งเส้นเลือดจะอยู่บริเวณนี้ โดยถ้า

ปลายเข็มแทงถูกเส้นเลือด จะสังเกตเห็นเลือดพุ่งขึ้นมาตามเข็มค่อย ๆ ดูดเลือดให้ขึ้นมาช้า ๆ ในหลอด
นำเลือดที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

2.3.4.2) การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง (blood cell count)

การนับเม็ดเลือดในตัวปลาได้ดัดแปลงวิธีการนับเม็ดเลือดในคนและสัตว์บก
อื่นๆ มาใช้ ซึ่งจะใช้ RBC-diluting pipette ในการเจือจาง ไม่ว่าจะนับเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็
มีวิธีการเช่นเดียวกันคือ ใช้ RBC-diluting pipette ดูดเลือดที่เจาะใหม่ๆ ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกิดขีด 0.5 ให้
ปรับโดยใช้กระดาศหิซุค่อย ๆ ซบอย่างระมัดระวังแล้วเข็ดปลายปิเปตให้สะอาด จากนั้นใช้ปิเปตอันเดิม
ดูด diluting fluid (Yokoyama's fluid) จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปต
แล้วถอดสายยาง จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้ง 2 ข้างเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที
หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 3-4 หยด แล้วจึงหยดของเหลวหยดต่อไปลงในร่อง haemocytometer ที่มี
cover glass ปิดอยู่เรียบร้อยแล้ว วาง haemocytometer ลงบนพื้นโต๊ะ 2-3 นาที แล้วจึงนับจำนวน
เม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x-40x

2.3.4.3) Differential cell count

นำเลือดปลาที่เจาะได้ใหม่ๆ หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 หยด แล้วเกลี่ยเลือด
โดยใช้สไลด์หรือ cover glass อีกแผ่นวางเอียงเป็นมุม 40-45° แล้วลากตรงๆ หลังจากเกลี่ยเลือดแล้วก็
ทิ้งสไลด์ให้แห้ง (air dry) แล้วนำมาย้อมกับ Wright's stain หรือ Giemsa's stain ซึ่งวิธีการย้อม
Wright's stain มีขั้นตอนคือ นำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อแล้ว ซึ่งอาจจะ fix เลือดด้วย absolute methanol 3
นาที ในกรณีที่ต้องการเก็บไว้โดยที่ยังไม่ย้อมสี สไลด์ที่แห้งใหม่ๆ หรือสไลด์ที่ fix ไว้ นำมาหยด Wright's
stain ให้ท่วมบริเวณที่เกลี่ยเลือดไว้ ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาณเท่าๆ กับสีที่เติมลงไป
ครั้งแรก ทิ้งไว้ 6-9 นาทีล้างสีด้วยน้ำประปา แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
กำลังขยาย 40x-100x

2.3.4.4) การหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต

ค่าฮีมาโตคริตเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น
(packed cell volume) หลังจากนำไปปั่นในอัตราเร็วตามเวลาที่กำหนดเทียบกับปริมาตรเม็ดเลือด
ทั้งหมดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้จะใช้วิธี Microhematocrit ซึ่งเป็นที่นิยมสะดวก รวดเร็วและใช้
ตัวอย่างเลือดปริมาณน้อย โดยนำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต
(Microhematocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน
แล้วนำไปปั่นด้วยฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (hematocrit centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000-15,000 รอบต่อ
นาที นานประมาณ 5-10 นาที แล้วนำวัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด
นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตจากสูตร

$$\% \text{ Hematocrit} = (\text{packed cell volume (mm.)} / \text{total blood volume (mm.)}) \times 100$$

2.3.4.5) การวัดกิจกรรมของไลโซไซม์ (lysozyme activity)

Lysozyme มีหน้าที่ทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์ชั้น peptidoglycan การตรวจวัดจึงทำได้โดยการเจือจางพลาสมาที่ระดับต่างๆ แล้วเติมเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก แพลกปลอม (*Micrococcus luteus*) ที่ทราบปริมาณลงไป ตรวจสอบการแตกของเซลล์แบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรเทียบกับค่าที่ได้จาก standard lysozyme

2.3.4.6) การวัดระดับแอนติบอดี (Antibody titre)

ในการทดสอบจะใช้วิธี microtitration agglutination โดยเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของ microtitre plate หลังจากนั้นเติม 50 ไมโครลิตรของ ซีรัมของปลานิลแดงแปลงเพศลงในหลุมแรกของแต่ละแถวผสมให้เข้ากันดีกับ PBS แล้วทำการเจือจาง แบบ two fold dilution ในหลุมต่อ ๆ ไป ส่วนหลุมที่เป็น negative control จะเติม PBS แทนซีรัม แล้วเติมสารละลายของเชื้อ *Streptococcus iniae* ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไปทุกหลุม วาง microtitre plate ไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตการกระจายของ แบคทีเรียบริเวณกันหลุมที่ไม่มีแอนติบอดีจะสังเกตเห็นการตกตะกอนของแบคทีเรียคล้ายเม็ดกระดุม บริเวณกันหลุม ระดับของแอนติบอดีคำนวณได้จากค่าส่วนกลับของ dilution factor

1.2.5 ความสามารถในการต้านทานโรค

เตรียมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1×10^8 CFU/ml ฉีดปลาในชุดการทดลองเมื่อ สิ้นสุดสัปดาห์ที่ 6 โดยสุ่มตัวอย่างปลา 15 ตัว จากแต่ละตู้มาฉีดด้วยเชื้อ *S. iniae* เข้าทางช่องท้องปลา ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ตรวจผลโดยพิจารณาจากจำนวนปลาตายภายในระยะเวลา 14 วัน นำเปอร์เซ็นต์ การตายเฉลี่ยของปลาในแต่ละตู้ หลังจากทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. iniae* ไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

$$RPS (\%) = 1 - \frac{\text{อัตราการตายของปลากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรเสริมโปรไบโอติก}}{\text{อัตราการตายของปลากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม}} \times 100$$

อัตราการตายของปลากลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม

3. การทดสอบการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในลำไส้ปลานิลแดงแปลงเพศเมื่อเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศด้วยอาหารเสริม โปรไบโอติก

การหาปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาทำได้โดยนำปลาที่รอดชีวิต 4 ตัว ในแต่ละชุดการทดลองที่ ฉีดเชื้อและไม่ฉีดเชื้อมาทำให้ตายก่อนผ่าท้องด้วยมีดปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ก่อน ผ่าเซ็ดท้องปลาด้วยสารละลาย 1 % ไอโอดีน โดยวางตัวปลาบนน้ำแข็ง ทำความสะอาดลำไส้ด้วย PBS buffer (0.89 % NaCl, pH 7.4) ที่ปลอดเชื้อและเย็น ตัดส่วนลำไส้วางลงในจานเพาะเชื้อ (petridish) ที่

ปลอดเชื้อนำไปปั่น (Homogenized) ในสารละลาย 0.89 % NaCl ที่ปลอดเชื้อและเย็นโดยใช้อัตราส่วน สารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อลำไส้เป็น 10 : 1 (โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก) ของเหลวจากการปั่นใช้เป็น inoculum เพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 4 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ทั้งหมด (total bacteria) *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Streptococcus* spp. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐานสำหรับจุลินทรีย์ แต่ละกลุ่มคือ เชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. และ *Streptococcus* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ส่วนเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Certrimide agar การหาจุลินทรีย์ ในลำไส้ปลาทำได้โดยนำ inoculum มาเจือจางที่ระดับเหมาะสมก่อนนำไปลงในอาหารแข็งสูตร มาตรฐานสำหรับแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม โดยวิธี spread plate บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 -24 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบกับ inoculum จากปลาที่ได้รับ อาหารสูตรที่ไม่มีการเสริมพรีไบโอติก

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 13.0 วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955)