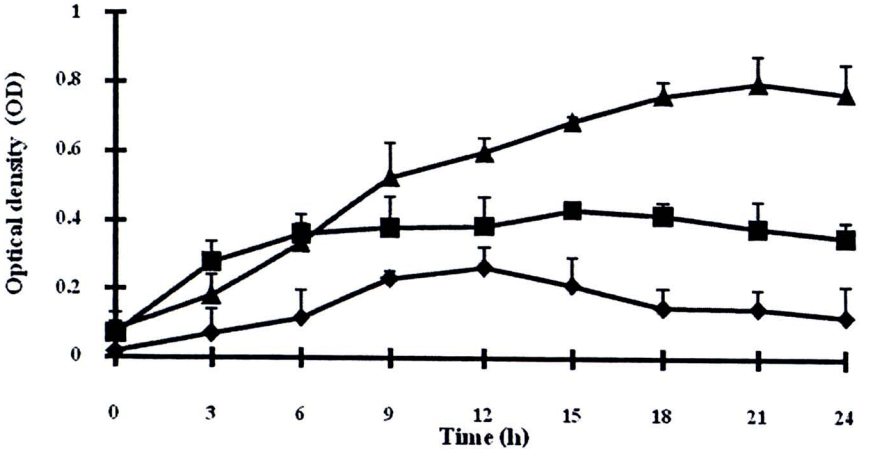
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. และการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp. เมื่อใช้สารพรีไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอน

1.1 การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรีย 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อใช้พรีไบโอติก 3 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน คือ *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. โดยวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีทางอ้อม คือ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer วัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 562 นาโนเมตร เชื้อ *Vibrio* spp. ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตร และเชื้อ *Bacillus* spp. วัดที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 660 นาโนเมตร โดยที่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะแปรผันตรงกับค่าความขุ่น (optical density, OD) ที่อ่านค่าได้ในช่วง log phase ของเชื้อแต่ละกลุ่ม กล่าวคือเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* spp. อยู่ในชั่วโมงที่ 18 เชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. และเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. อยู่ในชั่วโมงที่ 12 การเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าลง คงที่ และลดลงในเวลาต่อมา ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* (▲), *Pseudomonas putrefaciens* (◆) และ *Vibrio parahaemolyticus* (■) ที่ช่วงเวลาต่างๆเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

จากภาพที่ 13 พบว่า ค่าการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกัน คือ เชื้อ *Pseudomonas* spp. มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ log phase ในช่วงเวลา 6-9 ชั่วโมงหลังการบ่ม และการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่หรือ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 12 นั่นคือ อัตราการเพิ่มจำนวนเท่ากับอัตราตาย และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 15 พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* spp. เริ่มเข้าสู่ระยะ death phase นั่นคือ มีอัตราตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน จากกราฟจึงแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่เหมาะสมก่อนจะนำไปทดลองควรอยู่ที่ประมาณ 12 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อกำลังอยู่ในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงสุด เชื้อ *Vibrio* spp. พบว่าที่ระยะเวลา 3-9 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. มีการเจริญเติบโตสูงสุดเข้าสู่ระยะอัตราการเพิ่มที่คงที่หรือ log phase แต่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 15 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 18 เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) นั่นคือ อัตราการเพิ่มจำนวนเท่ากับอัตราตาย และเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 18 ไปแล้วพบว่าเชื้อ *Vibrio* spp. เริ่มเข้าสู่ระยะ death phase นั่นคือ มีอัตราตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน จากกราฟจึงแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เหมาะสมก่อนจะนำไปทดลองควรอยู่ที่ประมาณ 18 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อกำลังอยู่ในช่วงที่เพิ่มจำนวน เชื้อ *Bacillus* spp. พบว่าที่ระยะเวลา 3-18 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ค่อยๆ มีการเจริญเติบโตคือ มีอัตราการเพิ่มที่คงที่ (log phase) แต่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 18 ไปแล้วพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. เริ่มเข้าสู่ระยะ death phase นั่นคือ มีอัตราตายสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน จากกราฟจึงแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เหมาะสมก่อนจะนำไปทดลองควรอยู่ที่ประมาณ 18 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อกำลังอยู่ในช่วงที่เพิ่มจำนวน

จากการวัดค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด คือ *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. สรุปได้ว่าเชื้อ *Pseudomonas* spp. มีช่วงการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 12 ส่วนเชื้อ *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. มีช่วงการเจริญเติบโตที่ดีอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นเมื่อทราบช่วง log phase ของเชื้อที่จะทดสอบแล้ว ก็บ่มเชื้อดังกล่าวตามระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำเชื้อไปทดสอบการเจริญหรือยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมพรีไบโอติก (*in vitro*)

1.2 การเตรียมความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมเชื้อเริ่มต้นให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml โดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงและการ Spread plate เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด จนได้ระยะ log phase โดยจากการทดลองวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่า เชื้อ *Pseudomonas* spp. มีช่วงการเจริญเติบโตระยะ log phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 18 และเชื้อ *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. มีช่วงการเจริญเติบโตระยะ log phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งผลการวัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมและผลการนับโคโลนีของเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี spread plate แสดงดังตารางที่ 3

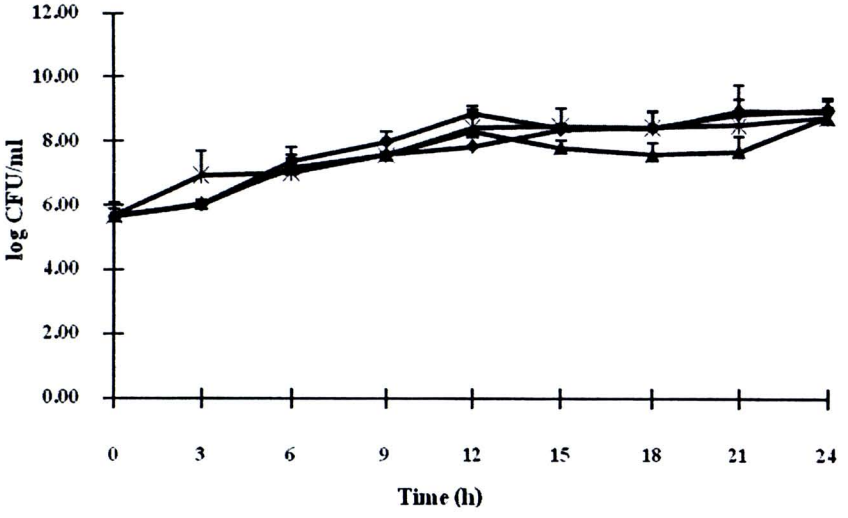
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) และจำนวนโคโลนี (CFU/ml) ของเชื้อ *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. เมื่ออยู่ระยะ log phase ที่ระดับความเจือจางต่างๆ

Pseudomonas spp.		*Vibrio* spp.		*Bacillus* spp.	
(OD_{562})	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)	(OD_{600})	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)	(OD_{660})	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)
2.0988	4.58×10^9	2.2135	5.31×10^9	2.1006	3.32×10^9
1.3991	2.23×10^9	1.2369	2.88×10^9	1.4667	1.67×10^9
0.7562	1.19×10^9	0.6783	1.29×10^9	0.8827	9.08×10^8
0.4211	8.67×10^8	0.3798	5.12×10^8	0.4935	4.90×10^8
0.2647	4.32×10^8	0.1439	2.79×10^8	0.2733	2.48×10^8
0.1186	2.67×10^8	0.0772	1.49×10^8	0.1025	1.78×10^8

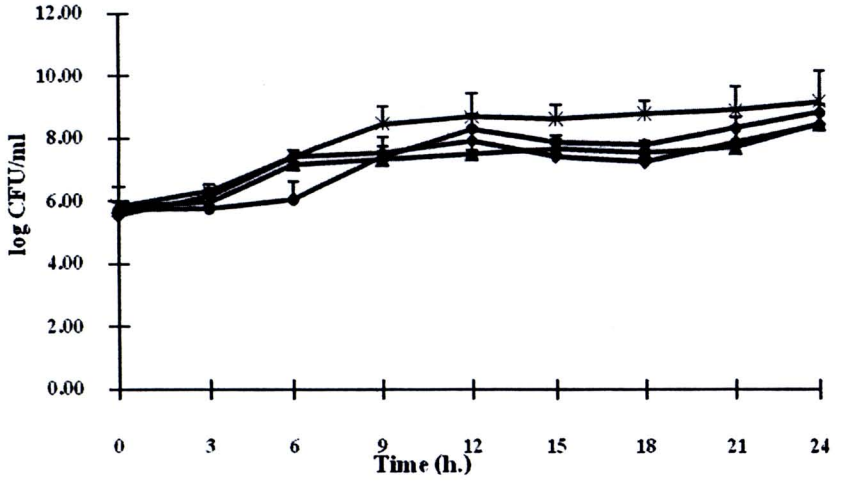
จากการทดลองที่ระดับการเจือจางของเชื้อเริ่มต้นเพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมพรีไบโอติก พบว่า ต้องเตรียมเชื้อ *Pseudomonas* spp. และเชื้อ *Bacillus* spp. เริ่มต้นที่จะนำมาใช้ทดสอบให้มีค่า OD ประมาณ 0.1 ส่วนเชื้อ *Vibrio* spp. ที่จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต้องเตรียมให้มีค่า OD ประมาณ 0.07

ผลของชนิดและความเข้มข้นพรีไบโอติกที่ทดสอบต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มดังกล่าว พบว่า ความเข้มข้นของพรีไบโอติกที่ระดับ 0%, 1% และ 3% ไม่ส่งผลต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทดสอบขณะที่พรีไบโอติกที่ระดับร้อยละ 5 มีผลต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และยังพบว่าชนิดของพรีไบโอติกที่มีผลดังกล่าวดีที่สุดคือ กาแลคโตโอลิ-

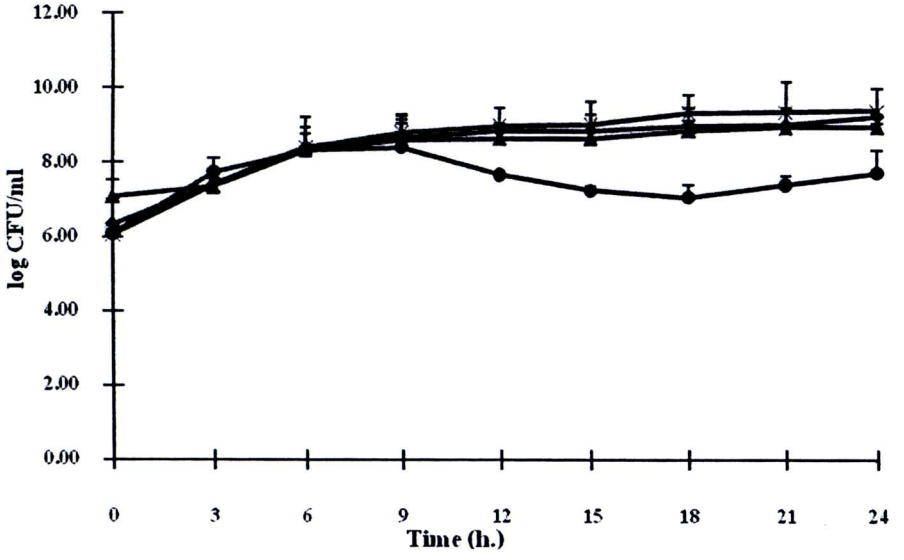
โกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ดังแสดงในภาพที่ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีความสามารถค่อนข้างดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในช่วง log phase และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในช่วง log phase ของ*Pseudomomonas putrefaciens* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค แต่พบว่า ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโต *Pseudomonas putrefacien* (ภาพที่ 15) และ *Vibribo parahaemolyticus* (ภาพที่ 16) ดังนั้นผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) จึงสรุปได้ว่า กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomomonas putrefaciens* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้



ภาพที่ 14 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (log CFU/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมพรีไบโอติก (◆), 5% อินนูลิน (▲), 5% กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (●) และ 5% ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (✳)



ภาพที่ 15 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Pseudomonas putrefaciens* (log CFU/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมพรีไบโอติก (◆), 5% อินนูลิน (▲), 5% กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (●) และ 5% ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (✳)



ภาพที่ 16 ปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (log CFU/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมพรีไบโอติก (◆), 5% อินนูลิน (▲), 5% กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (●) และ 5% ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (✳)

2. ความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันของปลานิลแดงแปลงเพศต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus iniae* เมื่อได้รับอาหารเสริมพรีไบโอติกชนิดต่างๆ

ทดสอบการเจริญและการยับยั้งแบคทีเรียในลำไส้ปลา ความสามารถในการต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus iniae* โดยใช้สูตรอาหารปลาพื้นฐานที่ไม่มีการเสริมพรีไบโอติกเป็นชุดควบคุม (control) และชุดการทดลองอาหารปลาเสริมพรีไบโอติกแต่ละชนิด (inulin หรือ GOS หรือ SOS) ที่ระดับความเข้มข้นพรีไบโอติกแต่ละชนิดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุดการทดลอง (ทรีตเมนต์ที่ฉีดเชื้อมี 4 ชุดการทดลอง คือ ให้อาหารปลาสูตร 1-4 และทรีตเมนต์ที่ไม่ฉีดเชื้อมี 4 ชุดการทดลอง คือ ให้อาหารสูตร 1-4) โดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955) โดยเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศด้วยอาหารแต่ละสูตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ กรณีทรีตเมนต์ที่ฉีดเชื้อ เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 6 ฉีดเชื้อ *S. iniae* เข้าไปทางช่องท้อง สังเกตพฤติกรรมและการตายของปลาต่อไปอีก 14 วัน

2.1 การเตรียมสูตรอาหาร

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารนำมาใช้เพื่อสร้างสูตรอาหารปลา 4 สูตร สูตรละประมาณ 15 กิโลกรัม ดังนี้

1. สูตรอาหารไม่เติมพรีไบโอติก (สูตรควบคุม)
2. สูตรอาหารเติมอินนูลิน 5 %
3. สูตรอาหารเติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5 %
4. สูตรอาหารเติมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ 5 %

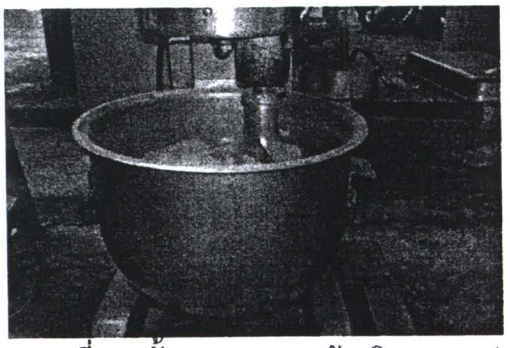
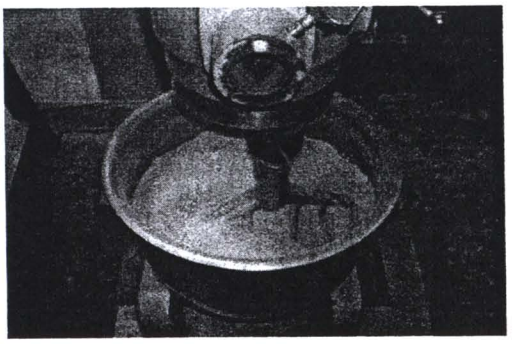
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบส่วนผสมอาหารปลา คือ ปลาป่นกากถั่วเหลือง และมันบด แสดงดังในตารางที่ 4

วิธีทดสอบอ้างอิงตาม AOAC (1995) โดยที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและพลังงานได้จากการคำนวณในการสร้างสูตรอาหารจะมีความจำเพาะกับปลาแต่ละชนิดเนื่องจากมีความต้องการโปรตีน ไขมัน และพลังงานที่แตกต่างกัน ปลานิลแดงแปลงเพศจัดเป็นปลาประเภทกินทั้งพืชและสัตว์ (omnivorous) ซึ่งมีความต้องการโปรตีน ไขมัน และ พลังงานประมาณ 30%, 7% และ 3300 kcal/kg ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้คำนวณเพื่อสร้างสูตรอาหารตามต้องการได้ วิธีการเตรียมอาหารปลาชนิดเม็ดแสดงดังภาพที่ 17-20

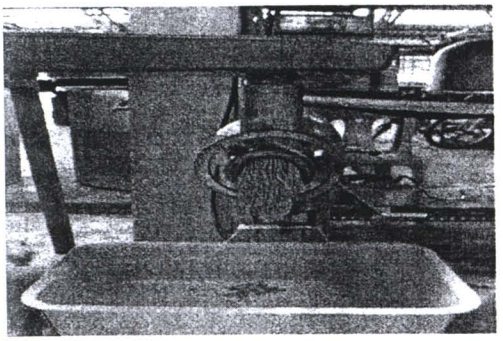
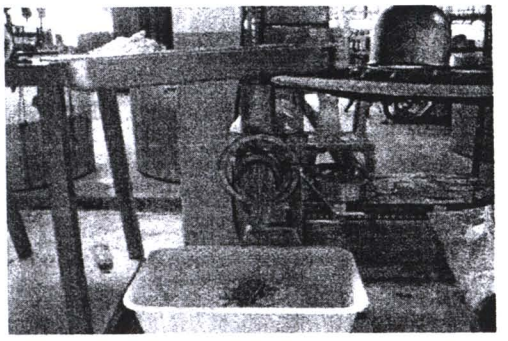
ตารางที่ 4 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารปลาชนิดเม็ด

วัตถุดิบ	องค์ประกอบ	ปริมาณ (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ปลาป่น	Protein	68.32±0.31
	Crude fat	11.41±0.05
	Moisture	7.33±0.04
	Ash	12.63±0.05
กากถั่วเหลือง	Protein	45.45±0.23
	Crude fat	1.97±0.03
	Moisture	9.79±0.03
	Ash	6.02±0.02
	Crude fiber	3.40±0.38
	Total carbohydrate	36.77
	Energy	346.61
มันบด	Protein	1.71±0.08
	Crude fat	0.11±0.02
	Moisture	11.76±0.05
	Ash	9.73±0.15
	Crude fiber	4.34±0.23
	Total carbohydrate	76.69
	Energy	314.59

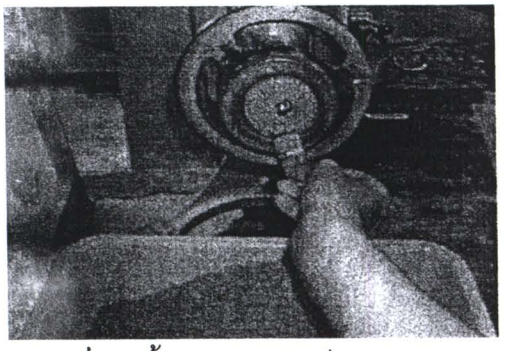
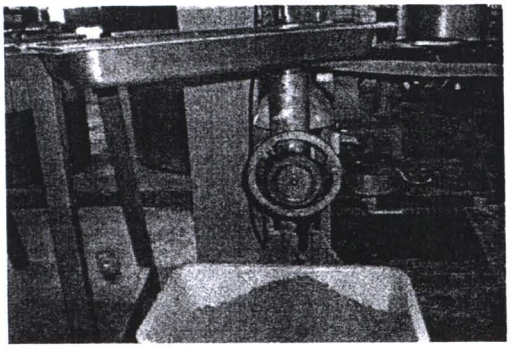
หมายเหตุ มีหน่วยเป็นร้อยละ ยกเว้น energy มีหน่วยเป็น kcal

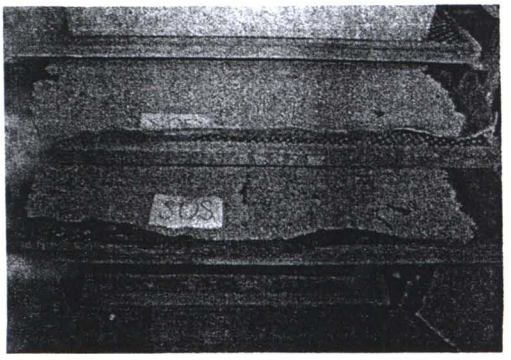
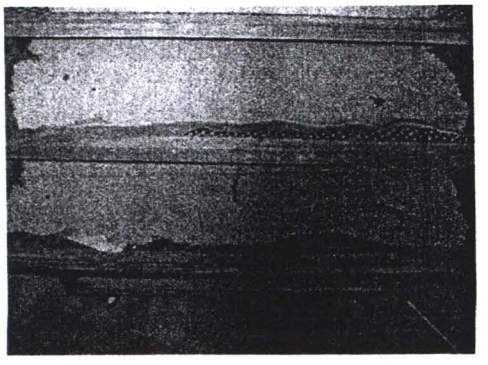
ภาพที่ 17 ขั้นตอนการผสมวัตถุดิบอาหารปลา

ภาพที่ 18 ขั้นตอนการอัดเม็ดอาหารปลา

ภาพที่ 19 ขั้นตอนการตัดเม็ดอาหารปลา

ภาพที่ 20 ขั้นตอนการอบเม็ดอาหารปลาในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

หลังการอบอาหารเม็ดจนแห้งแล้ว จึงนำมาบรรจุอาหารแต่ละสูตรในถุงเย็นที่ปิดสนิทและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างอาหารเม็ดแต่ละสูตรเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีก่อนนำไปใช้เลี้ยงปลาทดลอง ซึ่งมีผลวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 5

จากการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยอ้างอิงตามวิธี AOAC (1995) ซึ่งปริมาณคาร์โบไฮเดรตและพลังงานได้จากการคำนวณผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารเม็ดแต่ละสูตร พบว่า อาหารแต่ละสูตรมีค่าพลังงาน โปรตีน และไขมัน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากค่าคำนวณสร้างสูตรอาหาร ดังนั้นสูตรอาหารเม็ดทั้ง 4 สูตร มีองค์ประกอบหลักเป็นไปตามที่ต้องการ จึงสามารถนำไปใช้เพื่อเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศได้

2.2 ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลแดงแปลงเพศ

วัดอัตราการเจริญเติบโตทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weigh gain) ของปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมผสมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผลการเจริญเติบโตของปลานิลแดงแปลงเพศดังแสดงในตารางที่ 6

2.3 องค์ประกอบทางโภชนาการของปลานิลแดงแปลงเพศ

องค์ประกอบทางโภชนาการของปลานิลแดงแปลงเพศทั้งตัวก่อนทดลองและหลังจากได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 7 ประกอบด้วยค่าทางโภชนาการ คือ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ซึ่งค่าโปรตีน ไขมัน และเถ้า รายงานผลแบบร้อยละต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

ปลานิลแดงแปลงเพศทั้งตัวก่อนเริ่มต้นทดลองมีความชื้น 77.66±0.38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลาได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าความชื้นมีค่าอยู่ระหว่าง 76.60±0.13 เปอร์เซ็นต์ถึง 77.87±0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารเสริมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์และอาหารเสริมซอยบีนโอลิโก-แซคคาไรด์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม แต่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมอินนูลินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม

ปลานิลแดงแปลงเพศก่อนเริ่มต้นการทดลองมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 61.61±0.03 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลาได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในตัวปลามีค่าเพิ่มสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 62.85±0.16 เปอร์เซ็นต์ ถึง 63.37±0.09 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ 63.37±0.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับทุกชุดการทดลอง ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารเสริมอินนูลินและกาแลคโตโอลิโกแซค-คาไรด์มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันและมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่นๆ คือ 62.85±0.16 และ 62.85±0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารชนิดเม็ดสูตรต่างๆ สำหรับใช้เลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศ

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	ปริมาณ (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
สูตรควบคุม	Protein	33.25±0.31
	Crude fat	7.13±0.04
	Moisture	11.12±0.14
	Ash	11.57±0.12
	Crude fiber	3.95±0.09
	Total carbohydrate	36.93
	Energy	344.89
สูตรเสริม Inulin 5%	Protein	33.68± 0.07
	Crude fat	7.20±0.04
	Moisture	9.26±0.17
	Ash	11.17±0.09
	Crude fiber	3.45±0.08
	Total carbohydrate	38.69
	Energy	354.28
สูตรเสริม GOS 5%	Protein	33.78±0.28
	Crude fat	7.02±0.01
	Moisture	10.63±0.16
	Ash	10.05±0.09
	Crude fiber	3.07±0.01
	Total carbohydrate	38.52
	Energy	352.38
สูตรเสริม SOS 5%	Protein	34.04±0.08
	Crude fat	7.17±0.04
	Moisture	9.11±0.13
	Ash	11.22±0.06
	Crude fiber	3.48±0.21
	Total carbohydrate	38.46
	Energy	354.53

ตารางที่ 6 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain)

Tt	Diet	Feed conversion rate (FCR)	Specific growth rate (SGR) %/วัน	% Weight gain
1	basal diet	0.88±0.06[a]	4.57±0.17[a]	582.75±46.67[a]
2	basal diet+Inulin	0.96±0.11[ab]	4.76±0.26[ab]	643.36±79.29[ab]
3	basal diet+GOS	1.08±0.04[b]	5.01±0.14[b]	720.45±47.48[b]
4	basal diet+SOS	0.99±0.13[ab]	4.72±0.25[a]	629.75±76.12[a]

หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 6 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)

ปลานิลแดงแปลงเพศก่อนเริ่มต้นการทดลองมีไขมันเป็นองค์ประกอบ 16.31±0.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลาได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าไขมันที่เป็นองค์ประกอบในตัวปลาลดลงทุกชุดการทดลอง ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 9.92±0.12 เปอร์เซ็นต์ ถึง 15.03±0.13 เปอร์เซ็นต์ และทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมอินนูลินมีปริมาณไขมันสูงที่สุด คือ 15.03±0.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์มีไขมันเป็นองค์ประกอบน้อยที่สุด คือ 9.92±0.12 เปอร์เซ็นต์

ปลานิลแดงแปลงเพศก่อนเริ่มต้นการทดลองมีเถ้าเป็นองค์ประกอบ 17.44±0.16เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลาได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเถ้าเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 17.90±0.14 เปอร์เซ็นต์ ถึง 18.76±0.08 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณเถ้าสูงที่สุด คือ 18.76±0.08 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเถ้าของปลาที่ได้รับอาหารเสริมอินนูลินมีปริมาณน้อยที่สุด คือ 17.90±0.14 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับสูตรอาหารผสมพรีไบโอติกแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 นาน 6 สัปดาห์

Tt	Diet	Nutritional composition (%)			
		Moisture	Protein	Fat	Ash
Initial fish	-	77.66±0.38	61.61±0.03	16.31±0.21	17.44±0.16
1	Basal diet	76.70±0.18^{a}	62.98±0.14^{a}	13.44±0.23^{c}	18.03±0.07^{a}
2	Basal diet+5% INU[1]	76.60±0.13^{a}	62.85±0.16^{a}	15.03±0.13^{d}	17.90±0.14^{a}
3	Basal diet +5% GOS[2]	77.66±0.36^{b}	62.85±0.15^{a}	10.56±0.24^{b}	18.76±0.08^{c}
4	Basal diet +5% SOS[3]	77.87±0.25^{b}	63.37±0.09^{b}	9.92±0.12^{a}	18.42±0.11^{b}

หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p> 0.05)

เมื่อบันทึกผลการเจริญเติบโตของปลาแล้วจึงเก็บตัวอย่างเลือดของปลาเพื่อนำไปศึกษาผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยวิเคราะห์ค่า ฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และโปรตีนในพลาสมา โดยแบ่งปลาเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ไม่มีการฉีดเชื้อ *Streptococcus iniae* จำนวน 12 ตู้ (แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ)

กลุ่มที่ 2 มีการฉีดเชื้อ *Streptococcus iniae* ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{8} และเก็บผลการทดลองตลอดระยะเวลา 14 วัน จำนวน 12 ตู้ (แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ)

โดยสุ่มปลาจากแต่ละตู้มาตู้ละ 4 ตัว ดูดเลือดบริเวณโคนหางแล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของเลือดแสดงผลดังตารางที่ 8 และ 9

จากผลการทดลององค์ประกอบของเลือดปลานิลในกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae* พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารสูตรที่แตกต่างกันมีค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% ฮีมาโตคริต) และปริมาณเม็ดเลือดแดงไม่แตกต่างกัน แต่ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมผสมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงที่สุดต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และค่าพลาสมาโปรตีนของปลาที่ได้รับสูตรอาหารผสมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าสูงที่สุดต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 8 องค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ไม่มีการฉีดเชื้อ *Streptococcus iniae*

Tt	Diet	% ฮีมาโตคริต	เม็ดเลือดแดง 10^6(cell/mm^3)	เม็ดเลือดขาว 10^4(cell/mm^3)	พลาสมา โปรตีน (g/dl)
1	basal diet	34.60±3.83^a	3.17±0.47^a	12.70±3.6^{ab}	2.87±0.27^a
2	basal diet+Inulin	35.25±3.45^a	3.31±0.37^a	10.92±0.98^a	3.89±1.55^b
3	basal diet+GOS	35.16±2.79^a	3.52±0.12^a	18.16±2.49^c	4.51±0.47^{bc}
4	basal diet+SOS	35.03±8.32^a	3.23±0.59^a	13.45±0.96^b	5.24±0.34^c

หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 9 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (p> 0.05)

องค์ประกอบของเลือดปลานิลในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae* พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารสูตรที่แตกต่างกันมีปริมาณเม็ดเลือดแดงไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% ฮีมาโตคริต) ปริมาณเม็ดเลือดขาว และพลาสมาโปรตีนมีความแตกต่างกันคือ ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารสูตรผสมกับอินนูลินมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่างจากอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารสูตรผสมกับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) กับชุดควบคุมและปริมาณพลาสมาโปรตีนของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรผสมกับซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณพลาสมาสูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 10

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างขององค์ประกอบเลือดปลาก่อนและหลังที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae* พบว่าเมื่อปลาได้รับเชื้อ ทำให้มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลง ส่วนปริมาณเม็ดเลือดขาวและพลาสมาโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae*

Tt	Diet	% ฮีมาโตคริต	เม็ดเลือดแดง 10^6(cell/mm^3)	เม็ดเลือดขาว 10^4(cell/mm^3)	พลาสมา โปรตีน (g/dl)
1	basal diet	22.55±3.11^a	1.62±0.26^a	12.85±1.47^a	3.09±0.63^a
2	basal diet+Inulin	26.56±4.25^b	1.66±0.31^a	15.6±3.88^{ab}	3.57±0.28^b
3	basal diet+GOS	25.78±3.98^{ab}	1.73±0.35^a	20.3±2.75^b	4.50±0.30^c
4	basal diet+SOS	23.48±4.35^{ab}	1.71±0.29^a	16.5±2.34^{ab}	5.78±0.32^d

หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 12 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (p> 0.05)

ตารางที่ 10 ความแตกต่างขององค์ประกอบเลือดปลานิลแดงแปลงเพศก่อนและหลังได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae*

Tt	การรับเชื้อ *S. iniae*	% ฮีมาโตคริต	เม็ดเลือดแดง 10^6(cell/mm^3)	เม็ดเลือดขาว 10^4(cell/mm^3)	พลาสมา โปรตีน (g/dl)
1	ก่อน	34.60±3.83	3.17±0.47	12.7±3.6	2.87±0.27
	หลัง	22.55±3.11	1.62±0.26	12.85±1.47	3.09±0.63
2	ก่อน	35.25±3.45	3.31±0.37	10.92±0.98	3.89±1.55
	หลัง	26.56±4.25	1.66±0.31	15.6±3.88	3.57±0.28
3	ก่อน	35.16±2.79	3.52±0.12	18.16±2.49	4.51±0.47
	หลัง	25.78±3.98	1.73±0.35	20.3±2.75	4.50±0.30
4	ก่อน	35.03±8.32	3.23±0.59	13.45±0.96	5.24±0.34
	หลัง	23.48±4.35	1.71±0.29	16.5±2.34	5.78±0.32

ปลากลุ่มที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae* ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10^8 CFU/ml โดยฉีดเข้าช่องท้องตัวละ 0.1 ml มีการบันทึกอัตราการตายตลอดระยะเวลา 14 วัน โดยงดให้อาหารตลอดระยะเวลา 14 วัน หลังจากได้รับเชื้อ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมผสมกับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามปลาที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกันก็ไม่ได้มีอัตราการรอดตายที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 11

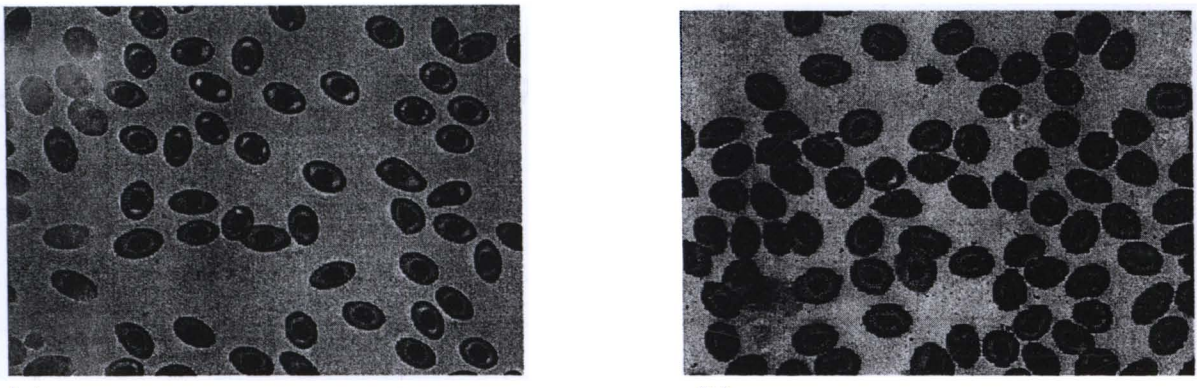
ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดตาย (% survival) และเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (% RPS)

Tt	Diet	% Survival	% RPS
1	basal diet	48.89±7.69[a]	0.00
2	basal diet+Inulin	60.00±13.33[a]	21.74
3	basal diet+GOS	62.22±3.85[a]	26.09
4	basal diet+SOS	51.11±13.88[a]	4.36

หมายเหตุ เป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p > 0.05$)

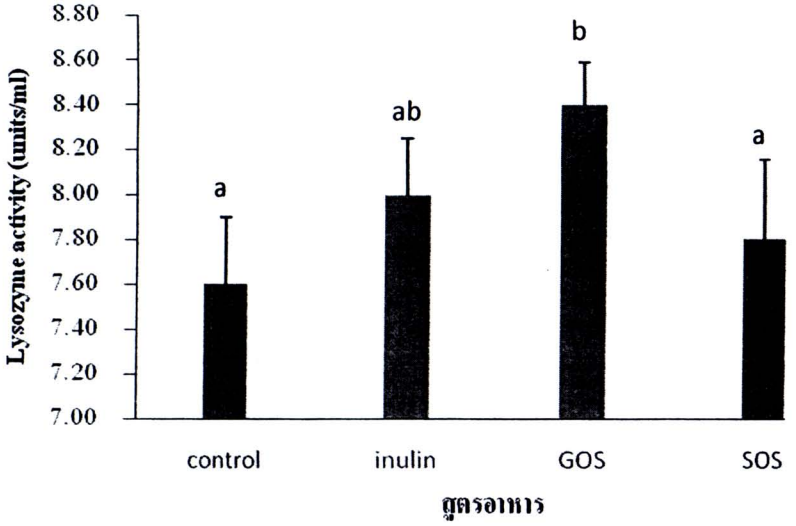
ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Streptococcus iniae* ที่ฉีดเข้าตัวปลามีผลทำให้เม็ดเลือดแดงของปลามีรูปร่างเปลี่ยนไปและทำให้เม็ดเลือดแดงของปลาแตก ดังแสดงในภาพที่ 21



(a) (b)

ภาพที่ 21 ลักษณะเม็ดเลือดแดงของปลานิลแดงแปลงเพศก่อน (a) และหลัง (b) ได้รับเชื้อ *Streptoccoccus iniae*

นอกจากศึกษาองค์ประกอบของเลือดก็ยังศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของสารน้ำ คือ ไลโซไซม์ (lysozyme) แสดงผลดังภาพที่ 22 โดยปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารสูตรผสมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีค่ากิจกรรมของไลโซไซม์สูงที่สุดเป็น 8.4 unit/ml ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีค่ากิจกรรมของไลโซไซม์เป็น 7.6 unit/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 22 กิจกรรมของไลโซไซม์ของปลานิลแดงแปลงเพศหลังได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae*

นอกจากทดสอบระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะแล้วยังศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะด้วย คือ ระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์ โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรผสมกับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีระดับแอนติบอดี้ไตเตอร์สูงที่สุดเป็น 1:64 ในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ *S. iniae* ซึ่งมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ผลดังแสดงในตารางที่ 12

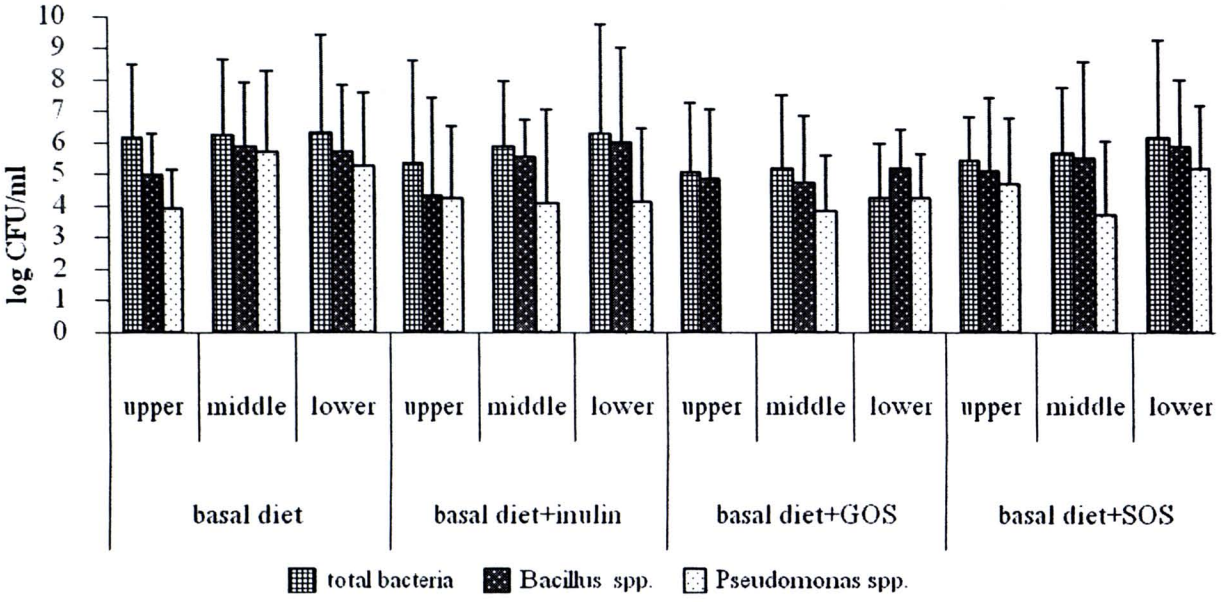
ตารางที่ 12 ค่าแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากที่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae* 14 วัน

Tt	Diet	ค่าแอนติบอดี้ ไตเตอร์
1	basal diet	1:16[a]
2	basal diet+Inulin	1:32[b]
3	basal diet+GOS	1:64[c]
4	basal diet+SOS	1:16[a]

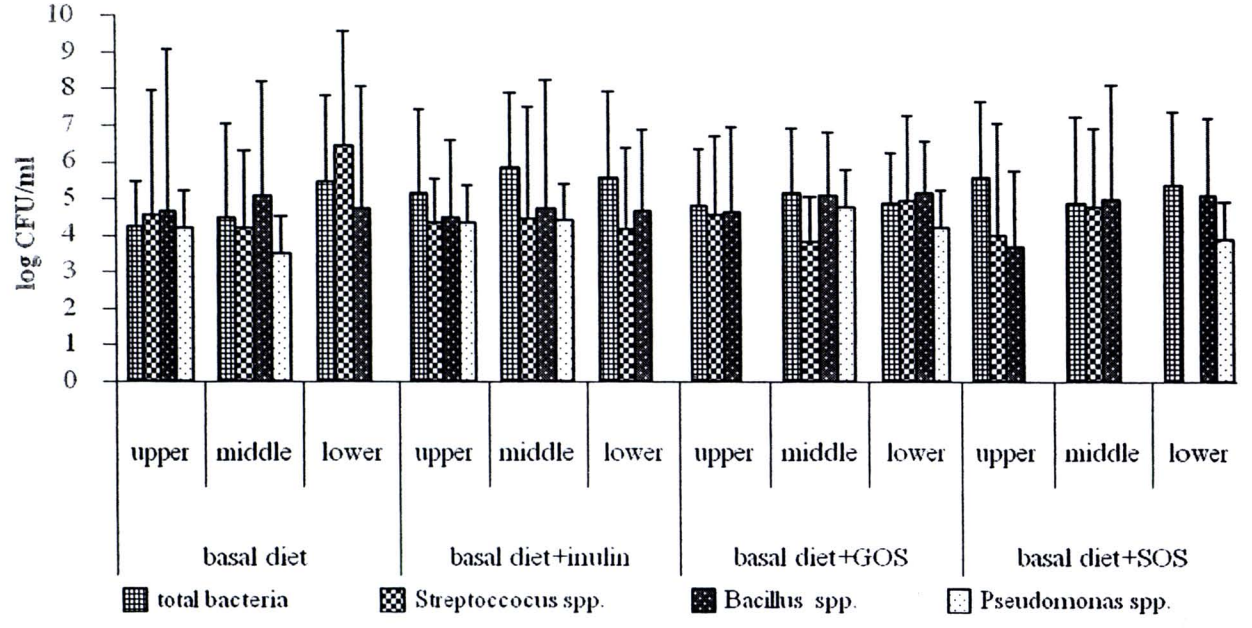
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p > 0.05$)

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ของปลานิลแดงแปลงเพศ โดยการสุ่มปลาในแต่ละตู้มาตู้ละ 4 ตัว ผ่าท้องและแยกลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางและส่วนท้าย บดด้วยน้ำเกลือ 0.85% โดยเจือจางสัดส่วน 1 : 10 ตรวจนับเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate เก็บตัวอย่างลำไส้ปลาในกลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อก่อน ส่วนกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อ *S. iniae* จะเก็บผลการทดลองในวันที่ 14 หลังจากได้รับเชื้อ พบว่าลำไส้ส่วนท้ายของปลานิลแดงแปลงเพศกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *S. iniae* มีปริมาณ Total bacteria และ *Bacillus* spp. สูงที่สุด ขณะที่เชื้อ *Pseudomonas* spp. พบน้อยมากในลำไส้ส่วนกลางปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารสูตรเสริมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนปลาที่ได้รับเชื้อ *S. iniae* เป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณ Total bacteria ลดลง ยกเว้นลำไส้ตอนท้ายของปลาที่ได้รับอาหารเสริมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์และลำไส้ตอนต้นของปลาที่ได้รับอาหารเสริมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์เมื่อเทียบกับปลานิล แดงแปลงเพศกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ *S. iniae* ขณะที่เชื้อ *Pseudomonas* spp. พบน้อยมาก และตรวจพบปริมาณเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ยังคงเหลืออยู่บ้าง ยกเว้นลำไส้ตอนท้ายของปลาที่ได้รับอาหารเสริมซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ ไม่พบปริมาณเชื้อ *Streptococcus* spp. ดังภาพที่ 23 และ 24

ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลแดงแปลงเพศใน 3 กลุ่ม คือ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Streptococcus* spp. ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 13 และภาพที่ 25 โดยพบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* spp. มีปริมาณต่ำกว่าอีก 2 กลุ่ม ถึงแม้ว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ได้ฉีดเข้าสู่ตัวปลา ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อดังกล่าวจะแพร่เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะลำไส้ของปลาได้น้อยแต่จะพบปริมาณมากในอวัยวะเป้าหมายคือ สมอง ตับ และเลือด



ภาพที่ 23 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้ส่วนต่างๆ ปลานิลแดงแปลงเพศที่ไม่ได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae*



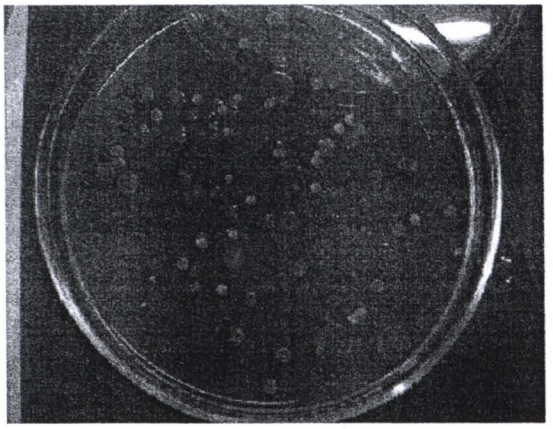
ภาพที่ 24 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้ส่วนต่างๆของปลานิลแดงแปลงเพศหลังได้รับเชื้อ *Streptococcus iniae* เป็นเวลา 14 วัน

หมายเหตุ การทดลองในปลานิลแดงแปลงเพศ ไม่มีการตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เนื่องจากเป็นการทดลองโดยใช้น้ำจืด

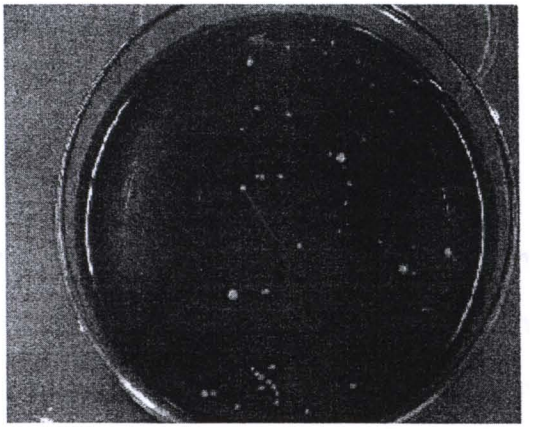
ตารางที่ 13 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลแดงแปลงเพศ

การทดสอบทางชีวเคมี	*Bacillus* spp.	*Pseudomonas* spp.	*Streptococcus* spp.
Gram's stain	+	-	+
Shape	แท่งยาว	แท่งโค้ง	กลมต่อเป็นสายยาว
Catalase	+	NT	-
Oxidase	NT	+	-
Motality	+	+	-
Haemolysis	NT	NT	β
OF Test	-	-	-

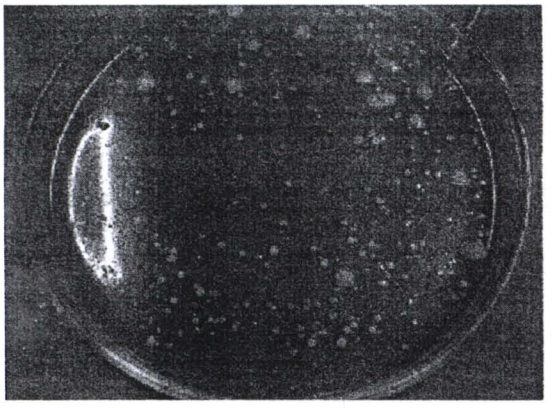
NT = Not test



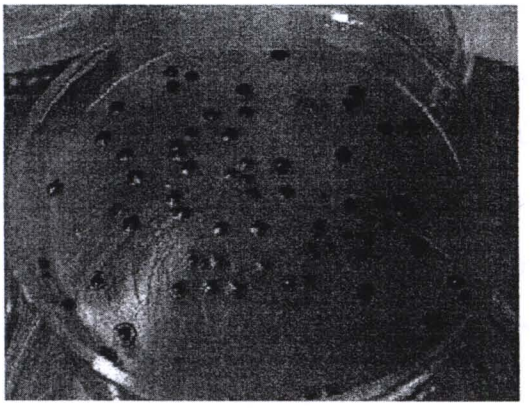
(a)



(b)



(c)



(d)

ภาพที่ 25 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ปลานิลแดงแปลงเพศ เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (a), Blood agar (b), MYP agar (c) และ RH media (d)