

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการเก็บข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มเป้าหมายและการเก็บตัวอย่างตัวอย่างปลานิลกระชังที่แสดงลักษณะของโรคคอถัมนาริส

เก็บข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มเป้าหมายและการเก็บตัวอย่างตัวอย่างปลานิลกระชังที่แสดงลักษณะของโรคคอถัมนาริส 5 แห่ง ดังนี้

Site I: ฟาร์มปลากะชังแม่น้ำมูล บ้านบุงกาแซว ของนายเลอ ดายา บ้านเลขที่ 41 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี โดยเก็บตัวอย่างในเดือนเมษายน 2555 จำนวน 1 ครั้ง 20 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 876.75 ± 69.43 กรัม และเก็บตัวอย่างเดือนมิถุนายน 2555 จำนวน 1 ครั้ง 20 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 18.26 ± 3.47 กรัม รวมเป็น 40 ตัว (ตารางที่ 4.1) โดยเป็นปลาที่มีลักษณะรอยโรคคือตัวดำ เป็นแผลตะกอนสีเหลือง เกล็ดหลุด มีแผลตกเลือด บางตัวตาโปน บางตัวท้องบวม โดยปลาขนาดใหญ่เป็นปลาก่อนจับขายตายวันละ 10-20 ตัว ติดต่อกัน ปลาขนาดเล็กเป็นปลาที่ปล่อยใหม่ในช่วงเดือนแรก และตายวันละ 50-60 ตัวต่อบ่อ ติดต่อกันใน 1 สัปดาห์

Site II: ฟาร์มปลากะชังแม่น้ำมูล ของนายชาติรี ประดับเพชร บ้านเลขที่ 159 หมู่ 6 บ้านคูเคื่อ ตำบลแจระแม อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี โดยเก็บตัวอย่างในเดือนกรกฎาคม 2555 จำนวน 5 ตัว (ตารางที่ 4.1) น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 840 ± 58.26 กรัม โดยเป็นปลาห้ำทิมที่มีลักษณะรอยโรคคือ ตัวดำ ท้องบวม ตาโปน ตกเลือด โดยเป็นปลาขนาดใหญ่ก่อนจับขาย ตายวันละ 70-80 ตัวต่อบ่อติดต่อกันในเวลา 1 สัปดาห์ และเกษตรกรตัดสินใจขายปลากะชังทั้งหมดก่อนที่ปลาจะตายไปมากกว่านี้ อย่างไรก็ตามเกษตรกรยินดีทดลองใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิลกระชังในวงรอบของการเลี้ยงต่อไป

Site III: ฟาร์มปลานิลกระชังแม่น้ำมูล โดยเก็บตัวอย่างในเดือนเมษายน-มิถุนายน 2554 3 เดือนๆ ละ 1 ครั้งๆ ละ 10 ตัว รวมเป็น 30 ตัว (ตารางที่ 4.1) โดยเป็นปลากะชังที่เลี้ยงในแม่น้ำมูล น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 32.55 ± 7.48 กรัม, 50.81 ± 10.32 กรัม และ 95.13 ± 78 กรัม โดยนางวรัญญา แก้วมawangศ์ บ้านเลขที่ 54 หมู่ 8 บ้านท่าลาด ตำบลห้วยชะยุง อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี เป็นผู้ประสานงานในการเก็บตัวอย่าง กระชังปลาที่เลือกเก็บตัวอย่างเป็นกระชังที่มีปลาตาย โดยลักษณะที่แสดงคือ ตัวเหลืองหรือตัวดำ เหงือกกร่อน ครีบกร่อน หางกร่อน และตาย วันละ 30-40 ตัวต่อบ่อ ติดต่อกันประมาณ 2-3 สัปดาห์ จากนั้นก็เปลี่ยนไปตายในลักษณะ

เดียวกันนี้ในบ่อถัดไป อย่างไรก็ตามกลุ่มเกษตรกรยินดีทดลองใช้โพธิ์ใบโอดิกเพาะเลี้ยงปลานิล กระชัง

ตารางที่ 4.1 ลักษณะรอยโรค จำนวนและน้ำหนักเฉลี่ยของปลากระชังตัวอย่างจากฟาร์ม 5 แห่ง

Site	ลักษณะรอยโรค	จำนวนปลา (ตัว); น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)			รวม (ตัว)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
Site I	ตัวดำ เป็นแผลตะกอนสีเหลือง เกล็ดหลุด มีแผลตกเลือด บางตัวตาโปน บางตัวท้องบวม	20; 876.75±69.43	20; 18.26±3.47	ND	40
Site II	ตัวดำ ท้องบวม ตาโปน ตกเลือด	5; 840±58.26	ND	ND	5
Site III	ตัวเหลืองหรือตัวดำ เหงือกกร่อน ครีบกร่อน หางกร่อน	10; 32.55±7.48	10; 50.81±10.32	10; 95.13±78	30
Site IV	เกล็ดหลุดมีแผลตามลำตัว มีแผลตะกอนสีเหลือง เหงือกเปื่อย หางกร่อน	10; 225.25±13.45	10; 450.43±10.12	ND	20
Site V	ตัวดำ มีแผลสีเหลือง มีเมือกมาก ครีบกร่อน หางกร่อน เป็นแผลตะกอนสีเหลือง	20; 21.45±6.78	20; 22.32±7.58	ND	40
รวม					135

ND = Not detected

Site IV: ฟาร์มปลานิลกระชังแม่น้ำชี ของนางพานทอง ทุมคำ บ้านเลขที่ 136 หมู่ 9 บ้านท่าไห ตำบลท่าไห อำเภอเมืองใน จังหวัดอุบลราชธานี โดยเก็บตัวอย่างในเดือนเมษายน 2555 จำนวน 10 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 225.25±13.45 กรัม และเก็บตัวอย่างเดือนพฤษภาคม 2555

จำนวน 10 ตัว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 450.43 ± 10.12 กรัม (ตารางที่ 4.1) โดยเป็นปลาขนาด 2 เดือน ลักษณะที่แสดงคือ เกล็ดหลุดมีแผลตามลำตัว มีแผลตะกอนสีเหลือง เหงือกเปื่อย หางกร่อน

Site V: ฟาร์มปลากระชังลูกฟาร์มของ บริษัท เบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด ซึ่งใช้บริเวณ เขื่อนสิรินธร บ้านสุขสำราญ ตำบลนิคมลำโดมน้อย และตำบลช่องเม็ก อำเภอสิรินธร จังหวัด อุบลราชธานี โดยมี นสพ.พิศิษฐ์ สุภาพ สัตวแพทย์วิชาการประจำสำนักงานอุบลราชธานี 62/2-4 ถนนเลี่ยงเมือง ตำบลแจระแม อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เป็นผู้ประสานงาน โดยเก็บตัวอย่าง ในเดือนพฤษภาคม 2555 จำนวน 20 ตัว (เกษตรกรกลุ่มที่ 1) น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 21.45 ± 6.78 กรัม และในเดือนสิงหาคม 2555 จำนวน 20 ตัว (เกษตรกรกลุ่มที่ 2) ขนาดเฉลี่ย 22.32 ± 7.58 กรัม รวม ทั้งหมด 40 ตัว (ตารางที่ 4.1) โดยปลามีลักษณะตัวดำ มีเมือกมาก ครีบกร่อน หางกร่อน มีแผล ตะกอนสีเหลือง ทั้งสองกลุ่มเป็นปลาที่ปล่อยใหม่ในช่วงเดือนแรกและตายวันละ 40-50 ตัว ติดต่อกันใน 1 สัปดาห์ ซึ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารปลานิลเพื่อเป็นการรักษา อย่างไรก็ตาม บริษัท เบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด มีนโยบายให้เกษตรกรลดการใช้ยาปฏิชีวนะและได้ทำ หนังสือลงวันที่ 3 กันยายน 2555 จากสำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อขออนุญาตใช้ โพรไบโอติกในโครงการปลานิลกระชังเขื่อนสิรินธร มายังมหาวิทยาลัยอย่างเป็นทางการ

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้เติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว สัตว์น้ำกลุ่มปลา น้ำจืดนั้นพบว่าปลาในกลุ่ม Tilapia เป็นกลุ่มที่นิยมเพาะเลี้ยงกันเป็นส่วนใหญ่ สิ่งสำคัญที่ทำให้ปลา ในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะปลานิลเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมคือ ปลานิลเป็นปลาที่ แข็งแรง ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี ขยายพันธุ์ได้ง่าย เติบโตเร็ว สามารถ เปลี่ยนสารอินทรีย์หรือวัสดุเหลือทิ้งทางชีวภาพให้เป็นโปรตีนคุณภาพสูงได้ดี เนื้อปลามีสีขาวและ รสชาติดี (Lai และ Yang, 2004) เฉพาะในจังหวัดอุบลราชธานีมีเกษตรกรที่เพาะเลี้ยงปลานิลกระชัง มากถึง 705 ราย จำนวน 7,269 กระชัง (สุพรม พวงอินทร์, 2555) แต่ปัญหาใหญ่ของการเพาะเลี้ยง ปลานิลกระชังที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผู้เลี้ยงปลา คือ โรคระบาดจากแบคทีเรียซึ่งทำให้ปลาตาย ในระหว่างเลี้ยงเป็นจำนวนมาก และการรักษาโรคนิยมใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะ ประกอบ กับมีรายงานว่าสามารถใช้สารปฏิชีวนะควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญของสัตว์ที่เลี้ยงเชิง พาณิชยได้ (Naviner และคณะ, 2006) จึงทำให้มีการใช้สารปฏิชีวนะเป็นเรื่องปกติ แต่การใช้สาร ปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานานส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรคได้ ที่สำคัญยังแสดงการก่อ โรคที่รุนแรงขึ้นกว่าเดิม (Moriarty, 1999) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาสิ่งทดแทนการใช้สาร ปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์เชิงพาณิชย์ (Song และคณะ, 2006)

4.2 ผลการคัดแยกเชื้อ *F. columnare* จากปลานิลกระชังที่มีอาการของโรคคอตัมมาริส

ผลการคัดแยกเชื้อ *F. columnare* จากปลานิลที่มีลักษณะของโรคคอตัมมาริส จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลกระชังแม่น้ำมูล และฟาร์มเลี้ยงปลานิลในกระชังแม่น้ำชี และฟาร์มปลากระชังลูกฟาร์มของบริษัทเบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด จำนวน 135 ตัว โดยสวอบเชื้อจากแผลที่ผิวหนังและเหงือกและนำมาคัดแยกให้บริสุทธิ์ บนอาหาร Cytophaga agar บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน พบว่า คัดแยกได้เชื้อ *Flavobacterium* ที่มีลักษณะต่างกัน 2 สายพันธุ์ คือ

กลุ่มสายพันธุ์ I โคโลนีสีเหลืองมีลักษณะแห้ง มีการฝังติดกับผิวหน้าอาหารวุ้น ขอบโคโลนีไม่เรียบ เป็นไรซอยด์ ลักษณะวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเซลล์รูปท่อนผอมยาว ติดสีแกรมลบ ขนาดของเซลล์ $0.4 \times 2-20 \mu\text{m}$



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ I ที่คัดแยกได้จากปลานิลตัวอย่างที่แสดงลักษณะของโรคคอตัมมาริสบนอาหาร Cytophaga agar (สีเหลืองมีลักษณะแห้ง มีการฝังติดกับผิวหน้า อาหารวุ้น ขอบโคโลนี ไม่เรียบ เป็นไรซอยด์)

กลุ่มสายพันธุ์ II โคโลนีสีเหลืองมีลักษณะมันวาว ผิวหน้าโคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีไม่เรียบ ลักษณะวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเซลล์รูปร่างท่อนผอมยาว ติดสีแกรมลบ ขนาดของเซลล์ $0.5 \times 2-7 \mu\text{m}$



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ II ที่คัดแยกได้จากปลาเน็ตตัวอย่างที่แสดงลักษณะของโรคคอแลมน์นาเรียสบนอาหาร Cytophaga agar (สีเหลืองมีลักษณะมันวาว ผิวหน้าโคโลนีนูนสูง มันเยิ้ม ขอบโคโลนีไม่เรียบ)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะเซลล์รูปท่อน ผอมยาว ดิจสีแกรมลบของตัวอย่างเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ I ที่คัดแยกได้จากปลาเน็ตกระซังที่แสดงลักษณะของโรคคอแลมน์นาเรียส

4.3 ผลการจัดจำแนกเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาเน็ตกระซังที่แสดงลักษณะของโรคคอแลมน์นาเรียส

จัดจำแนกเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ I และกลุ่มสายพันธุ์ II โดยทดสอบสมบัติทางชีวเคมี พบว่า

4.3.1 เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร MR-VP ทำปฏิกิริยากับ α -naphthol เข้มข้นร้อยละ 10 แล้วเติม KOH เข้มข้นร้อยละ 20 ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที พบว่าได้สีเหลืองแสดงว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่มไม่ผลิต acetoin (ตารางที่ 4.2)

4.3.2 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ด้วยวิธี stap ลงในอาหาร Hugh and Leifson's O-F บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า

ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและการหมัก (ตารางที่ 4.2)

4.3.3 เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide (H_2O_2) เข้มข้นร้อยละ 3 จำนวน 1 หยด บน slide จะมีฟองเกิดขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม มีการผลิตเอนไซม์ Catalase (ตารางที่ 4.2)

4.3.4 เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar มาฉีดลงบนกระดาษกรองที่หยดน้ำยา Kovac's oxidase reagent ตั้งทิ้งไว้ 10 วินาที บริเวณที่ขีดเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ผลิตเอนไซม์ oxidase (ตารางที่ 4.2)

4.3.5 เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร tryptone broth ทำปฏิกิริยากับ lead acetate 0.1 กรัม ตั้งทิ้งไว้ 10 วินาที เกิดฟองแก๊สขึ้นแสดงว่ามีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (ตารางที่ 4.2)

4.3.6 เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร peptone broth ทำปฏิกิริยากับ Kovac's reagent จำนวน 5 หยด ตั้งทิ้งไว้ 10 วินาที เกิดสีเหลืองบนผิวหน้าของอาหาร แสดงว่าไม่มีการสร้าง indole (ตารางที่ 4.2)

4.3.7 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ด้วยวิธี streak ลงในอาหาร casein agar บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่ามีการย่อยเคซีน (ตารางที่ 4.2)

4.3.8 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ด้วยวิธี stab ลงในอาหาร Gelatine agar บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า อาหารในหลอดเหลวแสดงว่า มีการย่อยเจลาติน (ตารางที่ 4.2)

4.3.9 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารในอาหาร Cytophaga agar ด้วยวิธี stab ลงในอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หยด lugol's iodine ลงในอาหาร และอาหารเป็นสีน้ำเงินหมดแสดงว่าไม่ย่อยแป้ง (ตารางที่ 4.2)

4.3.10 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ลงในอาหาร Glucose broth บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า อาหารในหลอดไม่ขุ่น แสดงว่า ไม่มีการเจริญในอาหาร Glucose (ตารางที่ 4.2)

4.3.11 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ลงในอาหาร Mannitol broth บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า อาหารในหลอดไม่ขุ่น แสดงว่าไม่มีการเจริญในอาหาร Mannitol (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่มเทียบกับ *F. columnare* ของ Kubilay และคณะ (2008) และ *F. psychrophilum* ของ AFS-FHS Blue Book (2007)

Characteristics	เชื้อกลุ่ม สายพันธุ์ I	เชื้อกลุ่ม สายพันธุ์ II	<i>F. columnare</i> ดัดแปลงจาก (Kubilay และ คณะ, 2008)	<i>F. psychrophilum</i> ดัดแปลงจาก AFS-FHS Blue Book (2007)
Voges Proskauer reaction	ไม่ผลิต acetoin	ไม่ผลิต acetoin	ไม่ผลิต acetoin	ไม่ผลิต acetoin
Indol	ไม่ผลิต Indol	ไม่ผลิต Indol	ไม่ผลิต Indol	ไม่ผลิต Indol
Oxidation- Fermentation	ไม่เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันและ การหมัก	ไม่เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันและ การหมัก	ไม่เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันและ การหมัก	ไม่เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันและ การหมัก
Catalase	ผลิต Catalase	ผลิต Catalase	ผลิต Catalase	ผลิต Catalase
Oxidase	ผลิต Oxidase	ผลิต Oxidase	ผลิต Oxidase	ผลิต Oxidase
H ₂ S production	ผลิต H ₂ S	ผลิต H ₂ S	ผลิต H ₂ S	ผลิต H ₂ S
Casein	ย่อย Casein	ย่อย Casein	ย่อย Casein	ย่อย Casein
Gelatine	ย่อย Gelatine	ย่อย Gelatine	ย่อย Gelatine	ย่อย Gelatine
Starch	ไม่ย่อย Starch	ไม่ย่อย Starch	ไม่ย่อย Starch	ไม่ย่อย Starch
Glucose	ไม่ใช้ Glucose	ไม่ใช้ Glucose	ไม่ใช้ Glucose	ไม่ใช้ Glucose
Mannitol	ไม่ใช้ Mannitol	ไม่ใช้ Mannitol	ไม่ใช้ Mannitol	ไม่ใช้ Mannitol
Lactose	ไม่ใช้ Lactose	ไม่ใช้ Lactose	ไม่ใช้ Lactose	ไม่ใช้ Lactose

4.3.12 เมื่อถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar ลงในอาหาร Lactose broth บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า อาหารในหลอดไม่จับ แสดงว่า ไม่มีการเจริญในอาหาร Lactose (ตารางที่ 4.2)

จากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มไม่ผลิตอะซิโตอินและอิน โดล ไม่เกิดปฏิกิริยาการหมัก ผลิตเอนไซม์อะลาเลสและออกซิเดส ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ย่อยเคซีนและเจลาติน ไม่ย่อยแป้ง ไม่ใช้น้ำตาลกลูโคส แมนนิทอลและแลคโตส ซึ่งเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ I มีสมบัติตรงกับ *F. columnare* ของ Kubilay และคณะ (2008) และเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ II มีสมบัติตรงกับ *F. psychrophilum* ของ AFS-FHS Blue Book (2007) (ตารางที่ 4.2)

4.4 ผลการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ I ที่คัดแยกได้

นำเชื้อที่คัดแยกได้จากปลานิลกระชังที่แสดงลักษณะของโรคคอถ่มนาริส มาทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะ 6 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อ *F. columnare* ของ Kubilay และคณะ (2008) พบว่า เชื้อที่คัดแยกได้ไวต่อ Streptomycin (25 µg), Kanamycin (30 µg), และ Cotrimoxazole (10 µg) โดยวัฏจักรมีบริเวณใสได้ 8, 5 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3, ภาพที่ 4.4) เชื้อที่คัดแยกได้ไม่ไวต่อ Oxalicilin (10 µg), Penicillin (10 µg) และ Colistin (10 µg) เนื่องจากไม่สร้างรัศมีบริเวณใสรอบแผ่นสารปฏิชีวนะดังกล่าว (ตารางที่ 4.3, ภาพที่ 4.4)

จากผลการทดสอบสมบัติของเชื้อที่คัดแยกได้ทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และความไวต่อสารปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีสมบัติตรงกับ *F. columnare* จึงกำหนดรหัสเชื้อที่คัดแยกได้เป็น *F. columnare* UBRU1 เพาะเลี้ยงในอาหาร Cytophaga agar stant บ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน ปิดทับด้วย Mineral oil ที่ปลอดเชื้อเก็บรักษาไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะใช้งานจึงกระตุ้นเชื้อให้เจริญในอาหาร Cytophaga agar

ตารางที่ 4.3 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้เทียบกับ *F. columnare* ของ Kubilay และคณะ (2008)

Antibiotic	การสร้างบริเวณใส ของเชื้อที่คัดแยกได้ (mm)	การสร้างบริเวณใส <i>F. columnare</i> (Kubilay และคณะ, 2008) (mm)
Streptomycin (25 µg)	8	8
Oxalicilin (10 µg)	0	0
Kanamycin (30 µg)	5	5
Penicillin (10 µg)	0	0
Cotrimoxazole (25 µg)	10	10
Colistin (10 µg)	0	0



ภาพที่ 4.4 ความไวต่อสารปฏิชีวนะ Streptomycin, Oxalicilin, Penicillin, Kanamycin, Cotrimoxazole และ Colistin ของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ I ที่คัดแยกได้จากปลานิลกระชังที่แสดงลักษณะของโรคคออัมมาริส

ด้วยแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลที่สนใจศึกษาครั้งนี้คือ *A. hydrophila* และ *F. columnare* แต่หน่วยงานเก็บรักษาจุลินทรีย์ คือ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว)

ยังไม่มีเชื้อ *F. columnare* จึงต้องคัดแยกเชื้อเอง ซึ่งทำการคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างปลาที่มีอาการป่วยของโรคคอตมนาริสครั้งนี้ พบว่า ได้เชื้อที่มีโคโลนีสีเหลืองจับติดผิวหน้าวุ้นอาหาร ขอบไม่เรียบเป็นไรซอยด์ แกรมลบ รูปท่อนพอมยาว ไม่สร้างอะซีไดอินและอินโดล ไม่เกิดปฏิกิริยาการหมัก ผลิตเอนไซม์คัตตาเลสและออกซิเดส ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ข่อยเคซินและเจลาติน ไม่ย่อยแป้ง ไม่ใช้น้ำตาลกลูโคส แมนนิทอลและแลคโตส ผลการทดสอบที่ได้ตรงกับ การทดสอบ *F. columnare* ของ Kubilay และคณะ (2008) ที่คัดแยกเชื้อจากลูกปลาเทราสายรุ้ง

4.5 ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างไส้ปลานิล อาหาร ดินและแบคทีเรียบำบัดน้ำ

4.5.1 ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างไส้ปลาซึ่งเป็นปลานิลที่เก็บตัวอย่างจาก Site I, II, III, IV และ V ที่แสดงอาการของโรคคอตมนาริสรวมจำนวน 135 ตัว พบว่าสามารถคัดแยกได้เชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างไส้ปลาที่มีลักษณะต่างกัน จำนวน 34 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4)

4.5.2 ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่ใช้คัดแยก *Bacillus* spp. มี 11 ตัวอย่างดังนี้

- ขนม โมจิ ขนมลูกเต้า ขนมเปี้ยะ ขนมปังไส้ถั่ว เต้าเจี้ยวตราเด็กสมบูรณ์ กะปิตราเรือใบ กะปิชลบุรี ถั่วเหลือง จากห้างสรรพสินค้าบางสวน เซฟแลนด์ สาขาชยางกูร ถนนชยางกูร ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- ขนมหะรีป๊อป จากตลาดสดสิทธิธรรม ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- ปลาร้า จากบ้านเลขที่ 78/1 หมู่ 1 บ้านโพนเมือง ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัดอุบลราชธานี

- ถั่วแผ่น จากชุมชนราชธานีอโศก ตำบลค้ำน้ำแซบ อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

พบว่าสามารถคัดแยกได้เชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะต่างกันจากตัวอย่างอาหารได้ 38 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 จำนวนไอโซเลตของ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกจากตัวอย่าง ใส่ปลานิล อาหาร ดินและ
 แบคทีเรียบำบัดน้ำ และรหัสไอโซเลตที่บ่งชี้การเจริญต่อเชื้อ *A. hydrophila*
 เปรียบเทียบกับ *B. brevis* UBRU4 และ *B. licheniformis* TISTR 004

ตัวอย่าง	<i>Bacillus</i> spp. (isolate)	การเจริญแบบปฏิกิริยากับ <i>A. hydrophila</i>	
		Isolate No.	รัศมีบริเวณใส (mm)
ใส่ปลานิล	34	UBRU5	5.0±0.3
		UBRU6	1.0±0.3
		UBRU20	5.1±0.2
		UBRU21	5.0±0.1
		UBRU22	5.3±0.1
		UBRU24	5.0±0.1
อาหาร	38	UBRU7	3.0±0.2
		UBRU8	3.0±0.2
		UBRU9	3.0±0.2
		UBRU10	4.5±0.0
		UBRU11	3.0±0.2
		UBRU12	2.5±0.2
		UBRU23	4.8±0.2
ดิน	39	UBRU13	6.0±0.2
		UBRU14	3.5±0.2
		UBRU15	3.5±0.2
แบคทีเรีย บำบัดน้ำ	7	UBRU16	1.5±0.5
		UBRU17	3.0±0.2
		UBRU18	3.0±0.2
		UBRU19	2.0±0.2
<i>Bacillus brevis</i>		UBRU4	2.0±0.2
<i>Bacillus licheniformis</i>		TISTR 004	1.0±0.2

4.5.3 ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่ใช้คัดแยก *Bacillus* spp. มี 12 แหล่งดังนี้

(1) ดินสวน

- บ้านเลขที่ 78/1 บ้านโพนเมือง ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัด
อุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 75 ถนนเจริญราษฎร์ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัด
อุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 15/4 ถนนชยางกูร ตำบลขามใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 19 ถนนนิคมสายกลาง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- สวนอาหาร ท กุ้งเผา ถนนชยางกูร ตำบลขามใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัด
อุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 138 หมู่ 9 บ้านเวียงเหนือ ตำบลเวียงเหนือ อำเภอกันทรลักษ์
จังหวัดศรีสะเกษ

(2) ดินโคลน

- อ่างเก็บน้ำห้วยม่วง ถนนชลประทาน-ท่าบ่อ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง
จังหวัดอุบลราชธานี

- สระซิงเกอร์ หลังอาคาร 5 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏ
อุบลราชธานี เลขที่ 2 ถนนราชธานี ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- สระน้ำบริเวณศูนย์ศิลปวัฒนธรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เลขที่ 2
ถนนราชธานี ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- ห้วยพอก หมู่ 1 ห้วยมะแซว หมู่ 13 และห้วยวังโดน หมู่ 15 บ้านโพนเมือง
ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัดอุบลราชธานี

พบว่าสามารถคัดแยกได้เชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะต่างกันจากตัวอย่างดิน ได้ 39
ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4)

4.5.4 ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างแบคทีเรียบำบัดน้ำ

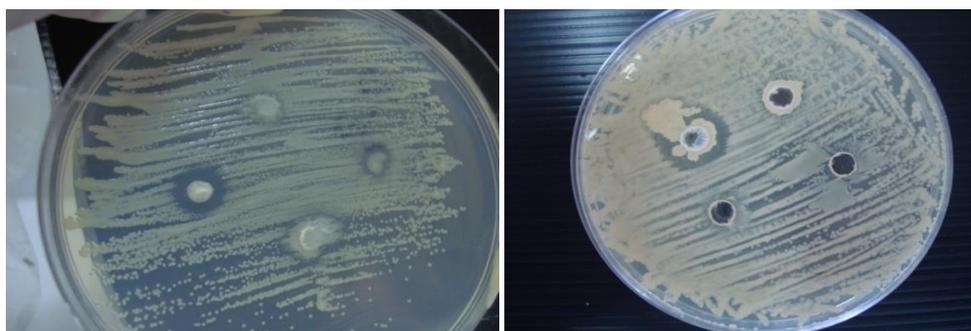
แบคทีเรียบำบัดน้ำที่นำมาใช้คัดแยก *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียบรรจุกระป๋องที่มีชื่อทางการค้าว่า Aquariuma ซึ่งเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย 18 สายพันธุ์จากบริษัท Aquariuma ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า สามารถคัดแยกได้เชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างแบคทีเรียบำบัดน้ำที่มีลักษณะต่างกันได้ 7 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4)

ผลการคัดแยก *Bacillus* spp. จากตัวอย่างใส่ปลาเนื้ล อาหาร ดินและแบคทีเรียบำบัดน้ำ พบว่าได้เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดจำนวน 118 ไอโซเลต ได้จากใส่ปลาเนื้ลจำนวน 34 ไอโซเลต ได้จากอาหารจำนวน 38 ไอโซเลต ได้จากดินจำนวน 39 ไอโซเลต และได้จากแบคทีเรียบำบัดน้ำจำนวน 7 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4)

4.5.5 ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila*

ทดสอบการใช้ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธี Spot on lawn และ Agar well diffusion พบว่า ตัวอย่าง *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* โดยการสร้างรัศมีบริเวณใสต่อต้านการเจริญได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลตดังนี้

1) *Bacillus* spp. จากใส่ปลาเนื้ลจำนวน 6 ไอโซเลต กำหนดรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU5, *Bacillus* sp. UBRU6, *Bacillus* sp. UBRU20, *Bacillus* sp. UBRU21, *Bacillus* sp. UBRU22 และ *Bacillus* sp. UBRU24 ซึ่งวัดรัศมีบริเวณใสได้ 5.0 ± 0.3 , 1.0 ± 0.3 , 5.1 ± 0.2 , 5.0 ± 0.1 , 5.3 ± 0.2 และ 4.9 ± 0.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4, ภาพที่ 4.5)



A

B

ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างการสร้างส่วนใสของ *Bacillus* spp. ที่แสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* แบบ Spot on lawn (A) และ Agar well diffusion (B)

2) *Bacillus* spp. จากอาหารจำนวน 7 ไอโซเลต กำหนดรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU7, *Bacillus* sp. UBRU8, *Bacillus* sp. UBRU9, *Bacillus* sp. UBRU10, *Bacillus* sp. UBRU11, *Bacillus* sp. UBRU23 และ *Bacillus* sp. UBRU12 ซึ่งวัดรัศมีบริเวณใสได้ 3.0 ± 0.2 , 3.0 ± 0.2 , 3.0 ± 0.2 , 4.5 ± 0.0 , 3.0 ± 0.2 , 4.8 ± 0.2 และ 2.5 ± 0.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

3) *Bacillus* spp. จากดินจำนวน 3 ไอโซเลต กำหนดรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU13 (ภาพที่ 4.1), *Bacillus* sp. UBRU14 และ *Bacillus* sp. UBRU15 ซึ่งวัดรัศมีบริเวณใสได้ 6.0 ± 0.2 , 3.5 ± 0.2 และ 3.5 ± 0.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

4) *Bacillus* spp. จากแบคทีเรียบำบัดน้ำจำนวน 4 ไอโซเลต กำหนดรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU16, *Bacillus* sp. UBRU17, *Bacillus* sp. UBRU18 และ *Bacillus* sp. UBRU19 ซึ่งวัดรัศมีบริเวณใสได้ 1.5 ± 0.5 , 3.0 ± 0.2 , 3.0 ± 0.2 , และ 2.0 ± 0.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

สำหรับการใช้ *Bacillus* ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำนั้นในงานวิจัยของคุณัช สิริรัตนดิถกและมนัสนันท์ บุญแสน (2552) ได้คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. จากระบบทางเดินอาหารของปลาทองในการเป็นตัวกระทำทางชีวภาพเพื่อยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าได้เชื้อ 2 ไอโซเลตคือ A07 และ A12 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila*

จากการศึกษาครั้งนี้ที่ได้คัดเลือกบราซิลจากไส้ปลานิล อาหาร ดินและแบคทีเรียบำบัดน้ำเพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธี Spot on lawn พบว่ามีบราซิลที่คัดเลือกได้จำนวน 20 ไอโซเลต พร้อมด้วย *B. brevis* UBRU4 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้ มีงานวิจัยก่อนหน้าของ Khattab และคณะ (2009) ที่รายงานว่าเชื้อ *Micrococcus luteus* ที่คัดเลือกจากปลานิลที่มีสุขภาพดี สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ในระดับหลอดทดลองได้

4.5.6 ผลการใช้ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้เพื่อยับยั้งการเจริญของ *F. columnare*

ผลการใช้ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* (จาก 4.5.5) จำนวน 20 ไอโซเลต เพื่อยับยั้งการเจริญของ *F. columnare* UBRU1 โดยวิธี Spot on lawn พบว่าตัวอย่าง *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. columnare* UBRU1 โดยการสร้างบริเวณใสต่อต้านการเจริญได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต ดังนี้

1) *Bacillus* spp. จากตัวอย่างไส้ปลานิลจำนวน 4 ไอโซเลต ซึ่งมีรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU20, *Bacillus* sp. UBRU21, *Bacillus* sp. UBRU22 และ *Bacillus* sp. UBRU24 ซึ่งวัตรศมีบริเวณไส้ได้ 12.0 ± 0.2 , 14.0 ± 0.1 , 20 ± 0.0 และ 15.0 ± 0.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6)

2) *Bacillus* spp. จากตัวอย่างอาหารจำนวน 1 ไอโซเลต ซึ่งมีรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU23 ซึ่งวัตรศมีบริเวณไส้ได้ 4.8 ± 0.2 มิลลิเมตร

3) *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินจำนวน 1 ไอโซเลต ซึ่งมีรหัสเป็น *Bacillus* sp. UBRU13 ซึ่งวัตรศมีบริเวณไส้ได้ 4.8 ± 0.2 มิลลิเมตร



ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างการสร้างบริเวณไส้ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรค

F. columnare UBRU1

เมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกในเบื้องต้นทั้ง 20 ไอโซเลต พร้อมด้วย *B. brevis* UBRU4 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. columnare* UBRU1 พบว่ามี *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. columnare* UBRU1 ได้จำนวน 7 ไอโซเลต คือ *Bacillus* sp. UBRU13, *Bacillus* sp. UBRU20, *Bacillus* sp. UBRU21, *Bacillus* sp. UBRU22, *Bacillus* sp. UBRU23, *Bacillus* sp. UBRU24 และ *B. licheniformis* TISTR 004 โดยมิพบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นเชื้อที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* UBRU1 ได้สูงสุด และ *B. brevis* UBRU4 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. columnare* UBRU1 ไม่ได้

4.6 ผลการจัดจำแนกเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 ตามลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเปรียบเทียบกับ *B. licheniformis* TISTR 004

4.6.1 สมบัติของ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ตามลักษณะ ลักษณะพื้นฐานวิทยา

1) ลักษณะโคโลนี

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 บนอาหาร Tryptic soy agar ที่เสริมและไม่เสริมด้วย 6.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า บนอาหาร Tryptic soy agar ที่เสริมด้วย 6.5% NaCl ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 มีสีขาวครีม ผิวหน้าเป็นเมือกเยิ้ม โคโลนีนูนสูง และขอบโคโลนีเรียบ (ภาพที่ 4.7; A) และบนอาหาร Tryptic soy agar ลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้งสอง มีสีขาวครีม ผิวหน้าเป็นเมือกเยิ้มและขุ่น โคโลนีนูนสูงและขอบโคโลนีไม่เรียบ (ภาพที่ 4.7; B)



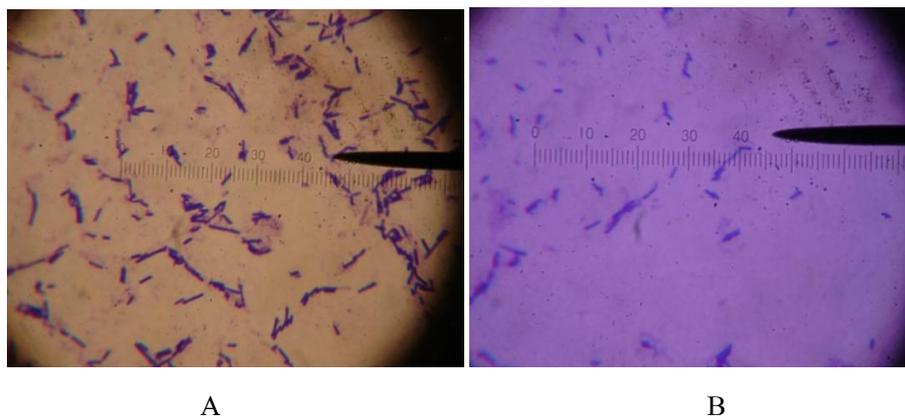
A

B

ภาพที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. UBRU22 (A) บน อาหาร Tryptic soy agar ที่เสริมด้วย 6.5% NaCl อายุ 24 ชั่วโมง และ *B. licheniformis* TISTR 004 (B) บน อาหาร Tryptic soy agar อายุ 24 ชั่วโมง

2) ขนาด รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์

ผลการศึกษขนาด รูปร่างและการเรียงตัวของ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 โดยการย้อมสีแกรม พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 มีลักษณะเป็นท่อน เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสาย ขนาดความกว้าง ≤ 1 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 2-3 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.8; A) มีเอนโดสปอร์รูปร่างเป็นท่อน ตำแหน่งเอนโดสปอร์อยู่กลางเซลล์



ภาพที่ 4.8 ขนาด รูปร่างและการเรียงตัวของ *Bacillus* sp. UBRU22 (A) และ *B. licheniformis* TISTR 004 (B)

4.6.2 สมบัติของ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ทางชีวเคมี

1) ตรวจสอบแกรมด้วย Potassium hydroxide (KOH) เข้มข้นร้อยละ 3

เมื่อนำ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมงมา Smear บน KOH เข้มข้นร้อยละ 3 ที่หยดบนแผ่นสไลด์ Smear ด้วยไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อประมาณ 3-5 นาที พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ที่ทดสอบไม่เป็นเมือกหรือหนืดและไม่ยึดติดไม้จิ้มฟัน แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ตารางที่ 4.5)

2) การเคลื่อนที่

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 18-24 ชั่วโมง ในอาหาร Motility test บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียกระจายออกไปจากแนวที่ Stab ไว้แสดงว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 สามารถเคลื่อนที่ได้ (ตารางที่ 4.5)

3) การสร้างเอนไซม์ catalase

เมื่อนำ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมง Smear ลงบนแผ่นสไลด์จากนั้นหยด H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบน *Bacillus* sp. UBRU22 พบว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 สร้างเอนไซม์ Catalase ได้ (ตารางที่ 4.5)

4) ทดสอบสมบัติในการย่อยแป้ง

เมื่อนำ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมงมา Streak ลงบนอาหาร Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 5 วัน หลังจากนั้นหยด lugol's iodine ลงบนอาหารพบว่า เกิดบริเวณใสขึ้นรอบๆ รอย Streak ในขณะที่บริเวณอื่นที่มีแบ้งเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ย่อยแบ้งได้ (ตารางที่ 4.5)

5) ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร Nitrate broth ที่มีหลอดดักแก๊สอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 7 และ 14 วัน ตรวจสอบโดยหยด Sulfanilic acid 15 หยด และ dimethyl-alpha-naphthylamine 15 หยด พบว่าอาหารที่เลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 ที่เวลา 2 วัน เกิดสีแดงปนตะกอนแสดงว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4.5)

6) การทดสอบ Voges-Proskauer (VP-test)

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทดสอบหา acetyl methyl carbinol หรือ acetoin โดยดูอาหารที่มี *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ปลอดเชื้อหยด alpha-naphthol ที่เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 5-6 หยด แล้วเขย่า เติม KOH เข้มข้นร้อยละ 20 ลงไป 5-6 หยด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 มีสีแดงเซอร์ริเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อผลิต acetoin ขึ้นในอาหาร (ตารางที่ 4.5)

7) การเจริญใน Sodium chloride (NaCl)

นำ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร Tryptone soya broth ที่มีระดับความเข้มข้นของ NaCl 6.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารมีความขุ่น แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญได้ (ตารางที่ 4.5)

8) การใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

นำ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหาร Simmon citrate agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 เปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ตารางที่ 4.5)

9) ความไวต่อสารปฏิชีวนะ

นำ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 อายุ 24-48 ชั่วโมง ขีดลากไข่และทับกัน 3 ชั้น บนอาหาร TSA นำแผ่นยาปฏิชีวนะ Penicillin (10 µg), Kanamycin (30 µg) และ Streptomycin (25 µg) วางทับบนผิวหน้าอาหาร ตรวจการสร้างบริเวณใส พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 ไวต่อสารปฏิชีวนะ Penicillin (10 µg), Kanamycin (30 µg) และ Streptomycin (25 µg) โดยสร้างรัศมีบริเวณใสรอบๆ แผ่นยา ซึ่งวัดรัศมีบริเวณใสได้ 2.96, 2.76 และ 2.36 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

4.6.3 ผลการจัดจำแนก *Bacillus* sp. UBRU22 ตามลักษณะพื้นฐานวิทยาและทางชีวเคมีในระดับ species

เมื่อนำ *Bacillus* sp. UBRU22 ที่คัดเลือกได้และ *B. licheniformis* TISTR 004 มาจัดจำแนกตามลักษณะพื้นฐานวิทยาและทางชีวเคมีในระดับ species ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่า ทั้ง *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 มีขนาดความกว้างของเซลล์ ≤ 1 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ สร้างเอนไซม์ catalase ผลิต acetoin รีดิวัซไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอน เจริญในอาหารที่มี 6.5% NaCl ได้ และย่อยแป้งได้ กล่าวได้ว่า *Bacillus* sp. UBRU22 มีสมบัติทางพื้นฐานวิทยาและชีวเคมีตรงกับ *B. licheniformis* TISTR 004

ผลการจัดจำแนก *Bacillus* sp. UBRU22 ที่พบว่า มีคุณสมบัติตรงกับ *Bacillus licheniformis* นั้นสอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ คือ Purivirojkul และ Areechon (2007) ที่ประยุกต์ใช้ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) พบว่า *Bacillus* W803 และ *Bacillus* W120 สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* AQAH ได้ จาก

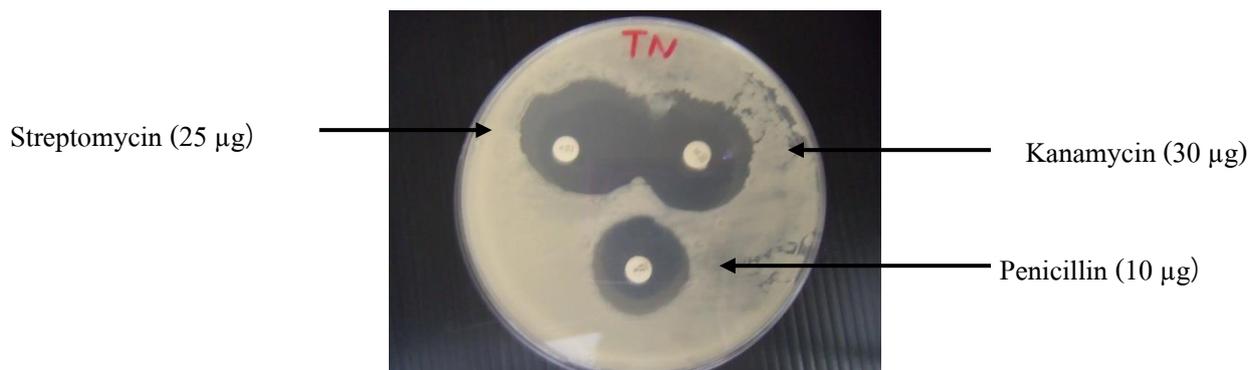
รายงานของภัทริศา โปฏุกและคณะ (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรีย *B. licheniformis* ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ABRCA1 ในปลานิล โดยวิธี Cross streak

ตารางที่ 4.5 สมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004

สมบัติที่ทดสอบ	<i>B. licheniformis</i> TISTR 004	<i>Bacillus</i> sp. UBRU22
1. การตรวจแกรม	บวก	บวก
2. การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
3. การสร้างเอนไซม์ catalase	สร้าง catalase	สร้าง catalase
4. Voges-Proskauer (VP-test) (การผลิต acetoin)	ผลิต acetoin	ผลิต acetoin
5. การรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	รีดิวซ์	รีดิวซ์
6. การใช้ Citrate	ใช้	ใช้
7. การเจริญใน 6.5% NaCl	เจริญ	เจริญ
8. การย่อยแป้ง	ย่อยแป้ง	ย่อยแป้ง

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004

สารปฏิชีวนะ	<i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (Clear zone radius, cm)	<i>B. licheniformis</i> TISTR 004 (Clear zone radius, cm)
Kanamycin (30 µg)	2.96±0.28	2.95±0.27
Streptomycin (25 µg)	2.76±0.26	2.76±0.25
Penicillin (10 µg)	2.36±0.26	2.36±0.27



ภาพที่ 4.9 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* sp. UBRU22

method พบว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ *A. hydrophila* ABRCA1 ได้ แหล่งตัวอย่างที่คัดแยก *Bacillus* sp. UBRU22 คือจากไต้ปลานิลที่มีอาการของโรคจาก *A. hydrophila* และ *F. columnare* ซึ่งมีข้อดีคือ เป็นเชื้อที่พบในระบบทางเดินอาหารปลานิลอยู่ก่อนแล้ว และพบเชื้อนี้ในสภาวะที่ปลานิลติดเชื้อซึ่งอาจเป็นส่งบ่งชี้ว่า เชื้อนี้อาจเป็นเชื้อในธรรมชาติที่เป็นตัวช่วยส่งเสริมการรักษาปลานิลที่ติดเชื้อโรคร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการที่จะนำไปใช้ผสมในอาหารเพื่อป้องกันหรือรักษาโรครบาดกลุ่มนี้ในปลานิลจึงน่าจะเป็นผลเชิงบวกกับปลานิลมากกว่าการใช้เชื้อที่มาจากแหล่งอื่น

4.7 ผลการศึกษาการขยายเชื้อโดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารสังเคราะห์

4.7.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 บนอาหาร Tryptic soy broth

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 บนอาหาร Tryptic soy broth โดยปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 เจริญในอาหาร Tryptic soy broth จำนวนสูงสุดไปหาต่ำสุดที่อุณหภูมิ 37, 30, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งนับจำนวนเชื้อได้ $8.0 \pm 0.6 \times 10^6$, $7.3 \pm 0.3 \times 10^6$, $5.5 \pm 0.7 \times 10^6$ และ $3.8 \pm 1.0 \times 10^6$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ *Bacillus* sp. UBRU22 บนอาหาร Tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

อุณหภูมิ	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/mL)
25	$5.5 \pm 0.7 \times 10^6$
30	$7.3 \pm 0.3 \times 10^6$
37	$8.0 \pm 0.6 \times 10^6$
40	$3.8 \pm 1.0 \times 10^6$

4.7.2 ผลของ pH ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 บนอาหาร Tryptic soy broth

การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 บนอาหาร Tryptic soy broth โดยปรับ pH ของอาหารให้เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ถ่ายกล้าเชื้อลงและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่า pH ที่ส่งผลให้เชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 เจริญได้จากสูงสุดไปหาต่ำสุด คือ pH 6.0, 5.5, 7.0, 6.5 และ 7.5 ซึ่งนับจำนวนเชื้อได้ $1.14 \pm 0.1 \times 10^7$, $1.09 \pm 0.09 \times 10^7$, $8.3 \pm 0.9 \times 10^6$, $7.3 \pm 0.3 \times 10^6$ และ $4.5 \pm 0.9 \times 10^6$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ผลของ pH ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 บนอาหาร Tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

pH	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/mL)
5.5	$1.09 \pm 0.09 \times 10^7$
6.0	$1.14 \pm 0.1 \times 10^7$
6.5	$7.3 \pm 0.3 \times 10^6$
7.0	$8.3 \pm 0.9 \times 10^6$
7.5	$4.5 \pm 0.9 \times 10^6$

4.8 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารตัดแปลงแบบอาหารเหลว

4.8.1 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของนมถั่วเหลืองยูเอชที (ແລກຕາซອຍ) ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 โดยละลายนมถั่วเหลืองในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15, 20, 25 และ 100 ด้วยวิธีปลอดเชื้อถ่ายกล้ำเชื้อลงและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 เจริญในอาหารตัดแปลงจากนมถั่วเหลืองยูเอชที จำนวนสูงสุดไปหาค่าสุดท้ายที่ความเข้มข้นร้อยละ 100, 25, 20, 15, 10 และ 5 โดยนับจำนวนเชื้อได้ $2.3 \pm 0.1 \times 10^9$, $7.9 \pm 0.7 \times 10^7$, $2.4 \pm 0.2 \times 10^7$, $7.2 \pm 0.7 \times 10^6$, $6.0 \pm 0.6 \times 10^6$, $2.55 \pm 0.45 \times 10^6$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

4.8.2 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้อาหารปลาชนิดเม็ดแบบลอยน้ำเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 โดยละลายอาหารปลาชนิดเม็ดในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ด้วยวิธีปลอดเชื้อถ่ายกล้ำเชื้อลง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus* sp. UBRU22 เจริญในอาหารตัดแปลงจากอาหารปลาชนิดเม็ดแบบลอยน้ำ จำนวนสูงสุดไปหาค่าสุดท้ายที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 4, 3, 2 และ 1 โดยนับจำนวนเชื้อได้ $8.3 \pm 0.7 \times 10^7$, $5.1 \pm 0.3 \times 10^7$, $4.6 \pm 0.2 \times 10^7$, $5.2 \pm 1.2 \times 10^6$, $4.1 \pm 1.1 \times 10^6$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของนมถั่วเหลืองยูเอชทีต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

นมถั่วเหลืองยูเอชที (ร้อยละ)	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/mL)
5	$2.55 \pm 0.45 \times 10^6$
10	$6.0 \pm 0.6 \times 10^6$
15	$7.2 \pm 0.7 \times 10^6$
20	$2.4 \pm 0.2 \times 10^7$
25	$7.9 \pm 0.7 \times 10^7$
100	$2.3 \pm 0.1 \times 10^9$

ตารางที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นของสารละลายอาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำในน้ำกลั่น ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

อาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำ (ร้อยละ)	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/mL)
1	$4.1 \pm 1.1 \times 10^6$
2	$5.2 \pm 1.2 \times 10^6$
3	$4.6 \pm 0.2 \times 10^7$
4	$5.1 \pm 0.3 \times 10^7$
5	$8.3 \pm 0.7 \times 10^7$

ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหาร Tryptic soy broth คือ 6.5 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และจำนวนเซลล์สูงสุดในอาหารเหลวที่ดัดแปลงคือ ใช้นมถั่วเหลืองยูเอชที มีจำนวนเซลล์เป็น $2.3 \pm 0.1 \times 10^9$ CFU/mL ความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้อาหารปลาชนิดเม็ดแบบลอยน้ำเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเหลว คือ ร้อยละ 5 โดยมีจำนวนเซลล์ $8.3 \pm 0.7 \times 10^7$ CFU/mL อย่างไรก็ตามการใช้อาหารเหลวเพาะเลี้ยงเชื้อมีข้อเสียคือ เกิด Feedback inhibition จากของเสียและสารเคมี โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์เองผลิตขึ้น ทำให้อายุการเก็บรักษาในอาหารเหลวสั้นกว่าในอาหารแข็ง เช่นเดียวกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ของ เกศินี จันทพร โสภณและคณะ (2553) ที่พบว่า *B. brevis* UBRU4 เจริญและมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยนับจำนวนเซลล์ได้ $3.6 \pm 0.96 \times 10^{10}$ CFU/g ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และหลังจากนี้จำนวนเซลล์จะลดลงจนกระทั่งเหลืออยู่ที่ $3.45 \pm 1.99 \times 10^2$ CFU/g ที่เวลา 192 ชั่วโมง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากว่าสารคล้ายสารปฏิชีวนะที่ *B. brevis* UBRU4 ผลิตขึ้นนั้นมีผลไปยับยั้งการเจริญของตัวเชื้อเอง

4.9 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารดัดแปลงแบบอาหารแข็ง

4.9.1 ผลการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมของอาหารข้าวสุกดัดแปลงโดยใช้อาหารปลาชนิดเม็ดแบบลอยน้ำร้อยละ 5 ผสมกับข้าวเจ้าและหุงให้สุกจากนั้นปรับความชื้นของอาหารข้าวสุกดัดแปลง ให้มีความชื้นที่ระดับร้อยละ 60, 65, 70 และ 75 ด้วยวิธีปลอดเชื้อถ่ายกล้าเชื้อลงและบ่มที่

37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง พบว่า ความชื้นที่เหมาะสมของอาหารข้าวสุกตัดแปลงมีการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 จำนวนสูงสุดไปหาค่าสุดที่ร้อยละ 70, 75, 65 และ 60 โดยนับจำนวนเชื้อได้ $1.8 \pm 1.8 \times 10^{10}$, $8.1 \pm 0.6 \times 10^9$, $3.1 \pm 0.1 \times 10^9$, $1.79 \pm 0.25 \times 10^9$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 ผลของความชื้นของอาหารข้าวเจ้าสุกตัดแปลงแบบอาหารแข็ง ต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

ความชื้น (ร้อยละ)	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/mL)
60	$1.79 \pm 0.25 \times 10^9$
65	$3.1 \pm 0.1 \times 10^9$
70	$1.8 \pm 1.8 \times 10^{10}$
75	$8.1 \pm 0.6 \times 10^9$

4.9.2 ผลการศึกษาปริมาณเกลือของอาหารข้าวสุกตัดแปลงโดยเติมเกลือที่ระดับร้อยละ 1, 2, 3, และ 4 ด้วยวิธีปลอดเชื้อถ่ายยาล้าเชื้อลง และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเกลือที่เหมาะสมของอาหารข้าวสุกตัดแปลงมีการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 จำนวนสูงสุดไปหาค่าสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3, 2, 4 และ 1 โดยนับจำนวนเชื้อได้ $1.39 \pm 0.65 \times 10^{10}$, $1.21 \pm 0.5 \times 10^{10}$, $7.2 \pm 1.3 \times 10^9$, $3.9 \pm 1.2 \times 10^9$ CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 ผลของปริมาณเกลือในอาหารตัดแปลงข้าวสุกต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

ปริมาณเกลือในอาหารตัดแปลงข้าวสุก (ร้อยละ)	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/g)
1	$3.9 \pm 1.2 \times 10^9$
2	$1.21 \pm 0.5 \times 10^{10}$
3	$1.39 \pm 0.65 \times 10^{10}$
4	$7.2 \pm 1.3 \times 10^9$

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารตัดแปลงแบบอาหารแข็ง พบว่าการใช้อาหารข้าวสุกที่เติมอาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำร้อยละ 5 เกิดร้อยละ 3 ปริมาณความชื้นเป็นร้อยละ 70 มีจำนวนเซลล์สูงสุดเป็น $1.39 \pm 0.65 \times 10^{10}$ CFU/g เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตามจำนวนวันที่เพิ่มมากขึ้น โดยจากที่เวลา 14 ไปที่เวลา 30 วัน จำนวนเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วจาก $6.28 \pm 0.59 \times 10^8$ CFU/g เป็น $5.96 \pm 3.48 \times 10^4$ CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่การเก็บในสภาวะเร่งคือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 และ 30 วัน มีปริมาณเซลล์เป็น $7.0 \pm 4.12 \times 10^3$ และ $9.3 \pm 0.58 \times 10^1$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งแม้ว่าจะยังคงมีเชื้อที่รอดชีวิตแต่น้อยมาก หากนำไปกระตุ้นให้เกิดการขยายเชื้อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์คงต้องใช้เวลาในการกระตุ้นนานซึ่งอาจจะใช้ยับยั้งเชื้อโรคระบาดในปลาได้ไม่ทัน ดังนั้นควรเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยมีการเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ จากการศึกษาของ Toma และ Pokrotnieks (2006) พบว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะมีผลในการก่อให้เกิดประโยชน์ต่อ host นั้นจะต้องมีปริมาณเชื้ออย่างต่ำสุดเป็น 10^6 CFU/mL แต่ปริมาณเชื้อที่กำหนดว่าสามารถให้ผลด้านการบำบัดรักษานั้นควรมีปริมาณเชื้อไม่น้อยกว่า 10^8 CFU/mL หรือ 10^8 CFU/g แม้ว่าผลการทดลองจากงานวิจัยครั้งนี้จะแนะนำให้เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ ซึ่งอาจมีเชื้อรอดชีวิตอยู่เพียงระดับ 10^4 CFU/g แต่การนำไปใช้จะมีการกระตุ้นเพื่อขยายปริมาณและความเข้มข้นของเชื้อก่อนใช้ ซึ่งจะทำให้มีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นที่ระดับ 10^8 - 10^{10} CFU/g ได้ก่อนนำไปใช้จริงเพียงแต่อาจมีการเพิ่มเวลาในการกระตุ้นเชื้อให้นานขึ้นจาก 24 ชั่วโมงเป็น 36-48 ชั่วโมง

ดังนั้น วิธีการขยายเชื้อให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปใช้จริงในฟาร์มปลา คือ เพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารตัดแปลงข้าวสุกแล้วถ่ายเชื้อในอาหารตัดแปลงนมถั่วเหลืองยูเอชทีร้อยละ 25 หรือ สารละลายอาหารปลาร้อยละ 5 ที่มีเกลือร้อยละ 3 โดยให้อากาศให้มากพอเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผสมอาหารปลา 20 เท่า (ปริมาตร/น้ำหนัก) เพื่อให้ปลากินรักษาโรค

4.10 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22

4.10.1 เพาะเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารข้าวสุกตัดแปลงที่เติมเกลือร้อยละ 3 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำเชื้อไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 7, 14 และ 30 วัน พบว่า มี *Bacillus* sp. UBRU22 ที่มีชีวิตในอาหารตัดแปลงข้าวสุก ที่เวลา 0, 3, 7, 14 และ 30 วัน จำนวน $2.46 \pm 0.21 \times 10^{10}$, $1.24 \pm 1.32 \times 10^{10}$, $8.40 \pm 2.73 \times 10^9$, $6.28 \pm 0.59 \times 10^8$ และ $5.96 \pm 3.48 \times 10^4$ CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13)

4.10.2 เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารข้าวสูกัดแปลงที่เติมเกลือร้อยละ 3 บ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำเชื้อไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนับจำนวน เซลล์จูลินทรีย์ ที่เวลา 0, 3, 7, 14 และ 30 วัน พบว่า มีบราซิลีสที่เหลือรอดในอาหารข้าวสูกัดแปลง ที่เติมเกลือร้อยละ 3 ที่เวลา 0, 3, 7, 14 และ 30 วัน จำนวน $1.22 \pm 0.24 \times 10^{10}$, $1.01 \pm 0.35 \times 10^9$, $1.96 \pm 2.47 \times 10^6$, $7.0 \pm 4.12 \times 10^3$ และ $9.3 \pm 0.58 \times 10^1$ CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 การเจริญของ *Bacillus* sp. UBRU22 ในอาหารข้าวเจ้าสูกัดแปลงที่เติมเกลือร้อยละ 3 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน

เวลา (วัน)	การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. UBRU22 (CFU/g)	
	4°C	37°C
0	$2.46 \pm 0.21 \times 10^{10}$	$1.22 \pm 0.24 \times 10^{10}$
3	$1.24 \pm 1.32 \times 10^{10}$	$1.01 \pm 0.35 \times 10^9$
7	$8.40 \pm 2.73 \times 10^9$	$1.96 \pm 2.47 \times 10^6$
14	$6.28 \pm 0.59 \times 10^8$	$7.0 \pm 4.12 \times 10^3$
30	$5.96 \pm 3.48 \times 10^4$	$9.3 \pm 0.58 \times 10^1$

4.11 ผลของการใช้ *S. cerevisiae* เป็นโปรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิลระดับห้องปฏิบัติการ

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 40~50 กรัม จำนวน 450 ตัว เลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาอุตสาหกรรมอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี แบ่งปลานิลเป็น 3 กลุ่มการทดลองๆ 3 ซ้ำๆ ละ 50 ตัว เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โปรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) อาหารปลา

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) อาหารปลา + 10^9 CFU *S. cerevisiae* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

เลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วันและตรวจวัดค่าอัตราการรอด อัตราการเจริญ ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง พบว่า T1, T2 และ T3 มีอัตราการรอดสูงโดยวัดได้ร้อยละ 99.5 ± 0.5 , 98.2 ± 0.0 และ 99.55 ± 0.45 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14) กลุ่มการทดลอง T2 และกลุ่มการทดลอง T3 มีอัตราการเจริญสูงกว่ากลุ่มควบคุม T1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่มการทดลอง T2 มีอัตราการเจริญสูงสุดโดยมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน คือ T1 (3.02 ± 0.03 g/d), T2 (5.23 ± 0.19 g/d) และ T3 (4.59 ± 0.15 g/d) และค่าอัตราการแลกเนื้อ (FCR) คือ T1 (1.79 ± 0.14), T2 (1.12 ± 0.04) และ T3

(1.60±0.02) การใช้โพรไบโอติก (T2) และการใช้ Oxytetracycline (T3) ทำให้ค่า %Lymphocytes และปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปริมาณเม็ดเลือดแดง (RBC) เกล็ดเลือด (PLT count) ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (HCT) ใน T2 (16.1±1.02) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จาก T1 (23.6±2.52) และ T3 (21.0±0.09) การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของแต่ละกลุ่มการทดลองให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสใน เม็ดเลือดแดงของปลาไนที่ใช้ *S. cerevisia* เป็นโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงใน ห้องปฏิบัติการ 30 วัน

Treatment*	T1	T2	T3
Survival Rate (%)	99.5±0.5 ^a	98.2±0.0 ^b	99.55±0.45 ^a
ADG (g/d)	3.02±0.03 ^a	5.23±0.19 ^b	4.59±0.15 ^c
FCR	1.79±0.14 ^a	1.12±0.04 ^b	1.60±0.02 ^c
Lymphocyte (%)	97.12±0.57 ^a	98.12±0.22 ^b	99.05±0.12 ^c
WBC (K/Cu.mm)	682.35±24.59 ^a	260.35±18.81 ^b	580.09±25.08 ^c
RBC (M/uL)	1.33±0.12 ^a	1.09±0.05 ^a	1.30±0.87 ^a
HCT (%)	23.6±2.52 ^a	16.1±1.02 ^b	21.0±0.09 ^a
PLT Count (K/Cu.mm)	70.0±15.08 ^a	74.23±25.08 ^a	88.17±23.52 ^a
Micronucleus (%)	0.48±0.13 ^a	0.49±0.14 ^a	0.50±0.07 ^a

^{abc} หมายถึง ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95%

*T1 = อาหารปลา

T2 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *S. cerevisiae* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

4.12 ผลของการใช้ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลาไนในกระชังระดับภาคสนาม

ใช้ปลาน้ำหนักประมาณ 40~50 กรัม จำนวน 9,000 ตัว เลี้ยงในแม่น้ำชี ขนาดกระชัง 3 x 6 x 3 เมตร แบ่งปลาไนเป็น 2 กลุ่มการทดลองๆ 2 ซ้ำๆ ละ 1,500 ตัว เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) อาหารปลา

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) อาหารปลา + 10^9 CFU *S. cerevisiae* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
เลี้ยงปลาเป็นเวลา 120 วันและตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญ ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง พบว่า กลุ่มควบคุม (T1) และกลุ่มที่ใช้ *S. cerevisiae* (T2) มีอัตราการรอดเป็นร้อยละ 80.9±0.5 และ 87.65±0.1 ตามลำดับ โดยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลกระชังที่ใช้ *S. cerevisiae* เป็นโปรไบโอติก 120 วัน

Treatment*	T1	T2
Survival Rate (%)	80.9±0.5 ^a	87.65±0.1 ^a
ADG (g/d)	6.33±0.01 ^a	6.62±0.01 ^b
FCR	1.63±0.02 ^a	1.57±0.01 ^b
Lymphocyte (%)	61.5±6.5 ^a	98.0±1.25 ^b
WBC (K/Cu.mm)	719.86±74.97 ^a	845.11±54.33 ^a
RBC (M/uL)	1.52±0.19 ^a	1.97±0.11 ^b
HCT (%)	29.65±3.85 ^a	33.2±2.34 ^a
PLT Count (K/Cu.mm)	95.0±51.0 ^a	57±13.55 ^a
Micronucleus (%)	0.47±0.02 ^a	0.48±0.05 ^a

^{abc} หมายถึง ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95%

*T1 = อาหารปลา

T2 = อาหารปลา + 10^9 CFU *S. cerevisiae* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มการทดลอง T2 มีอัตราการเจริญสูงกว่า T1 คือ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันเป็น 6.62±0.01 g/d และ 6.33±0.01 g/d ตามลำดับ และค่าอัตราการแลกเนื้อ คือ T1 (1.63±0.02) และ T2 (1.57±0.01) ทำให้ค่า %Lymphocytes และเม็ดเลือดแดงของ T1 และ T2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือดและไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของแต่ละกลุ่มการทดลองให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.15)

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นมีความสนใจด้านการใช้โปรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร

ควบคุมการเกิดโรค ช่วยย่อยอาหาร ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานโรค (Irianto และ Austin, 2002) และช่วยทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ (Khatab และคณะ, 2009) และที่สำคัญนอกจากนี้คือจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกยังสามารถป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรคด้วยการผลิตสารปฏิชีวนะออกมา หรือไม่เช่นนั้นก็ช่วยแย่งพื้นที่ในระบบทางเดินอาหารของ host กับเชื้อก่อโรคด้วยการเกาะติดกับระบบทางเดินอาหารของ host ทำให้เชื้อก่อโรคเจริญได้น้อยลงหรือเกาะติดในระบบทางเดินอาหารของ host ไม่ได้จึงไม่สามารถทำอันตรายต่อ host ได้ โพรไบโอติกบางกลุ่ม เช่น กลุ่มที่พบโดยธรรมชาติสามารถใช้ส่งเสริมการเจริญและอัตราการรอดตายของสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงแบบฟาร์ม โดยการไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค

โพรไบโอติกที่เป็นกลุ่มยีสต์นั้น มีรายงานว่ายีสต์ที่ใช้ผลิตเครื่องดื่มนั้นนิยมนำเซลล์ที่ตายแล้วไปเป็นอาหารสัตว์ โดยใช้สารอาหารจากเซลล์เป็นอาหารเสริมของสัตว์ที่เลี้ยงเชิงพาณิชย์ด้วยเหตุนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าการใช้โพรไบโอติกยีสต์เป็นอาหารเสริมในปลาเศรษฐกิจน่าจะให้ผลเป็นที่น่าพอใจด้วย การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ยีสต์ขนมปังเป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลกระชัง โดยพบว่าช่วยให้ปลานิลมีอัตราการเจริญสูงกว่าปลานิลกลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์ ผลการศึกษานี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Wache และคณะ (2006) ที่พบว่าการใช้เชื้อ *S. boulardii* และเชื้อ *D. hansenii* เป็นอาหารเสริมในปลาเทร้าสายรุ้งนั้น เชื้อทั้งสองจะมีผลไปกระตุ้นระบบการย่อยอาหารของปลาได้ โดยเฉพาะการใช้เชื้อ *S. boulardii* เสริมในอาหารจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของปลาเทร้าให้เร็วยิ่งขึ้น จากผลการทดลองของ Mortazavi-Tabrizi และคณะ (2008) ที่รายงานว่า การใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงปลาเทร้า นั้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของปลาเทร้าให้สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยีสต์ Pooramini และคณะ (2009) รายงานว่า ปลา *Oncorhynchus mykiss* ที่ให้ *S. cerevisiae* var. *elipsoides* เป็นอาหารเสริมในช่วงอนุบาล จะช่วยให้ปลาเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นมากกว่าการใช้น้ำมันปลาเป็นอาหารเสริมการใช้ *S. cerevisiae* เป็นอาหารเสริมในปริมาณร้อยละ 5 จะช่วยให้ปลาเทร้ามีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการทดลองของ Lara-Flores และคณะ (2010) ที่ใช้โพรไบโอติกยีสต์ 0.1% ผสมในอาหารลูกปลานิลเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีเรียผสมคือ *Streptococcus faecium* และ *Lactobacillus acidophilus* และกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารปกติในปริมาณเท่ากัน ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้ยีสต์เป็นโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญสูงสุด จึงกล่าวได้ว่ายีสต์เป็นโพรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของปลานิล นอกจากการใช้ยีสต์เพื่อกระตุ้นการเจริญแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ใช้ยีสต์หรือสารประกอบจากเซลล์ยีสต์กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานในสัตว์น้ำด้วย โดยงานวิจัยของ Bagni และคณะ (2005) พบว่าการให้สารเบตากลูแคนจากยีสต์ช่วยให้ปลาอะพงมีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และรายงานของ El-Boushy และ

El-Ashram (2006) ที่พบว่าสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา
คอกซ์ฟริกกัน

4.13 ผลของการใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็น โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลระดับ
ห้องปฏิบัติการ

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 40~50 กรัม จำนวน 180 ตัว เลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชา
จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี แบ่งปลานิลเป็น 3
กลุ่มการทดลองๆ 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) อาหารปลา

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) อาหารปลา + 10^9 CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) ให้อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

เลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วันและตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญ ค่าทางโลหิตวิทยา และการ
เกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง พบว่า T1, T2 และ T3 มีอัตราการรอดร้อยละ 66.66 ± 13.34 ,
 86.67 ± 6.66 และ 73.34 ± 6.66 ตามลำดับ โดยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.16) (T2)
และ (T3) มีอัตราการเจริญสูงกว่ากลุ่มควบคุม (T1) อย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มการทดลอง T2 มีอัตรา
การเจริญสูงสุดโดยพบได้จากค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน คือ T1 (3.56 ± 0.10 g/d), T2 (4.97 ± 0.13 g/d)
และ T3 (4.57 ± 0.14 g/d) และค่าอัตราการแลกเปลี่ยนคือ T1 (1.72 ± 0.14), T2 (1.22 ± 0.14) และ T3
(1.58 ± 0.02) การใช้โพรไบโอติก (T2) และการใช้ Oxytetracycline (T3) ทำให้ค่า %Lymphocytes
ปริมาณเม็ดเลือดขาว ปริมาณเกล็ดเลือด และการเกิดไมโครนิวเคลียสไม่แตกต่างกันและแตกต่าง
จากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดย T1 วัดได้ 99.0 ± 0.50 ; 595.85 ± 75.06 ; 59.75 ± 34.42 และ
 0.52 ± 0.03 , T2 วัดได้ 99.33 ± 0.67 ; 565.96 ± 31.13 ; 53.4 ± 20.18 และ 0.49 ± 0.03 และ T3 วัดได้
 99.33 ± 0.67 ; 463.56 ± 209.08 ; 74.5 ± 51.33 และ 0.51 ± 0.04 ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น
T1 วัดได้ 28.67 ± 2.72 , T2 วัดได้ 25.82 ± 2.47 และ T3 วัดได้ 14.35 ± 10.25 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.16)

ตารางที่ 4.16 อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็น โพรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ 30 วัน

Treatment*	T1	T2	T3
Survival Rate (%)	66.66±13.34 ^a	86.67±6.66 ^b	73.34±6.66 ^c
ADG (g/d)	3.56±0.10 ^a	4.97±0.13 ^b	4.57±0.14 ^c
FCR	1.72±0.14 ^a	1.22±0.14 ^b	1.58±0.02 ^c
Lymphocyte (%)	99.0±0.50 ^a	99.33±0.67 ^a	99.33±0.67 ^a
WBC (K/Cu.mm)	595.85±75.06 ^a	565.96±31.13 ^a	463.56±209.08 ^a
RBC (M/uL)	1.72±0.12 ^a	1.49±0.15 ^a	1.03±0.76 ^a
HCT (%)	28.67±2.72 ^a	25.82±2.47 ^a	14.35±10.25 ^b
PLT Count (K/Cu.mm)	59.75±34.42 ^a	53.4±20.18 ^a	74.5±51.33 ^a
Micronucleus (%)	0.52±0.03 ^a	0.49±0.03 ^a	0.51±0.04 ^a

^{abc} หมายถึง ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95%

*T1 = อาหารปลา

T2 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

4.14 ผลการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ของปลานิลที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็น โพรไบโอติกในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Challenge test

นำปลานิลที่ให้ *Bacillus* sp. UBRU22 กับ 0.05% Oxytetracycline มาทดสอบการต้านทาน (Challenge test) ต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* โดยการฉีดเชื้อผสมแบบ Intraperitoneal พบว่า ค่าแอนติบอดีไทเตอร์ของปลานิล ก่อนการฉีดเชื้อของกลุ่มการทดลองที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 (T2) มีค่าสูงสุด รองลงมาคือ กลุ่มการทดลองที่ใช้ 0.05% Oxytetracycline (T3) และ กลุ่มควบคุม (T1) โดยวัดได้ 8.0±0.0, 5.0±0.0 และ 2.33±0.67 ตามลำดับ และหลังจากการฉีดเชื้อ 7 วัน ค่าของแอนติบอดีไทเตอร์ และอัตราการรอดที่วัดได้สูงสุด คือ T2 (8.33±0.58; 64.92±5.27) รองลงมาคือ T3 (6.33±0.58; 28.58±9.53) และสำหรับ T1 ปลาตายทั้งหมด ส่วนค่าทางโลหิตวิทยาของ T2 และ T3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.17)

ตารางที่ 4.17 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ ค่าทางโลหิตวิทยา การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง และอัตราการรอดของปลานิลที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติกและทำ Challenge test ด้วยเชื้อผสม *A. hydrophila* และ *F. columnare*

Treatment*	T1	T2	T3
Antibody titer 0 post – challenged	2.33±0.67 ^a	8.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^c
Antibody titer day 7 post – challenged	ND** ^a	8.33±0.58 ^b	6.33±0.58 ^c
Lymphocyte (%)	ND** ^a	99.25±0.75 ^b	98.75±0.25 ^b
WBC (K/Cu.mm)	ND** ^a	562.23±55.38 ^b	685.56±171.13 ^b
RBC (M/uL)	ND** ^a	1.54±0.21 ^b	1.38±0.08 ^b
HCT (%)	ND** ^a	23.6±3.99 ^b	21.46±2.21 ^b
PLT Count (K/Cu.mm)	ND** ^a	111.5±9.42 ^b	221.66±72.83 ^b
Micronucleus (%)	ND** ^a	0.56±0.08 ^b	0.53±0.07 ^b
Survival Rate (%)	0±0.0 ^a	64.92±5.27 ^b	28.58±9.53 ^c

^{abc} หมายถึง ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95%

*T1 = อาหารปลา

T2 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

**ND = Not detected

จากผลการศึกษาคั้งนี้ที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติกในปลานิลเปรียบเทียบกับการใช้สารปฏิชีวนะออกซิเตตราซัยคลินและกลุ่มควบคุมในระดับห้องทดลองพบว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 มีอัตราการเจริญสูงสุด จากรายงานการวิจัยของสุนทร ผ่องพุดิและคณะ (2549) ได้คัดแยก *Bacillus* UBRU1 จากรบบทางเดินอาหารของปลานิลกระชัง และใช้เป็นอาหารเสริมผสมในอาหารเพาะเลี้ยงปลานิลกระชัง พบว่า ปลานิลกระชังที่ได้รับ *Bacillus* sp. UBRU1 เป็นอาหารเสริมมีอัตราการเจริญมากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่ใช่เชื้อนี้เป็นอาหารเสริม แต่พบว่าปลานิลกระชังกลุ่มนี้มีอาการโลหิตจาง ต่อมา เกษินี จันทโรโสภณและคณะ (2553) ได้คัดเลือกโพรไบโอติก *Bacillus* ที่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ทั้งในหลอดทดลองและในปลานิลได้คือ *B. brevis* UBRU4 ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อ

สอดคล้องกับการศึกษาของ Sanders และคณะ (2003) ที่รายงานว่า เชื้อในกลุ่ม *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่เป็น peptide ที่แตกต่างกันได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีฤทธิ์การยับยั้งได้กว้าง (broad spectrum) เมื่อใช้เป็น โพรไบโอติกเฉพาะเลี้ยงปลานิลกระชังพบว่า *B. brevis* UBRU4 ไม่ช่วยส่งเสริมการเจริญของปลานิล นอกจากนี้ Merrifield และคณะ (2009) ได้รายงานถึงผลของการใช้ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *Enterococcus faecium* เป็น โพรไบโอติกในอาหารปลาเทราห์สายรุ้งซึ่งพบว่า การใช้ *B. subtilis* ผสมกับ *B. licheniformis* นั้นส่งเสริมให้อัตราการกินอาหาร อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็น โปรตีนสูงขึ้น การใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารระดับสูงทำให้ในระบบทางเดินอาหารพบโพรไบโอติกในปริมาณมากขึ้นด้วย การให้อาหารเสริมเป็นโพรไบโอติก *Bacillus* ทำให้ระดับของเม็ดเลือดขาวชนิด leucocyte สูงขึ้น ซึ่งทั้งหมดนี้บ่งชี้ได้ว่าช่วยให้อาหารปลาสายรุ้งมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้มากขึ้น

4.15 ผลของการใช้เชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็น โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลกระชัง

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 30-40 กรัม จำนวน 900 ตัว จากฟาร์มปลานิลเครือข่ายบริษัท ซีพี อ่างทองสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี นำไปเลี้ยงในกระชังโดย แบ่งปลานิลออกเป็น 3 กลุ่ม การทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 100 ตัว เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) อาหารปลา (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) อาหารปลา + 10^9 CFU *B. licheniformis* TISTR 004 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) อาหารปลา + 10^9 CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 21 วันและตรวจวัดค่า อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง พบว่า T1, T2 และ T3 มีอัตราการรอดสูงโดยวัดได้ร้อยละ 99.50 ± 0.5 , 99.82 ± 0.18 และ 100 ± 0.0 ตามลำดับ โดยที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.18) กลุ่มการทดลอง T2 และ T3 มีอัตราการเจริญต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (T1) อย่างมีนัยสำคัญ โดย T1 มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยพบได้จากค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน คือ T1 (6.41 ± 0.63 g/d), T2 (3.74 ± 0.1 g/d) และ T3 (3.39 ± 0.88 g/d) และค่าอัตราการแลกเนื้อวัดได้ T1 (1.35 ± 0.07), T2 (1.77 ± 0.15) และ T3 (1.81 ± 0.05) การใช้โพรไบโอติก (T3) และ (T2) ทำให้ค่า %Lymphocytes แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณเม็ดเลือดขาว การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของแต่ละกลุ่มการทดลองให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณเม็ดเลือดแดงของ T1, T2 และ T3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและเกล็ดเลือดของ T3 แตกต่างจาก T2 และ T1 อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.18 อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลกระชังที่ใช้ *B. licheniformis* TISTR 004 และ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติก 21 วัน

Treatment*	T1	T2	T3
Survival Rate (%)	99.50±0.5 ^a	99.82±0.18 ^a	100±0.0 ^a
ADG (g/d)	6.41±0.63 ^a	3.74±0.1 ^b	3.39±0.88 ^b
FCR	1.35±0.07 ^a	1.77±0.15 ^b	1.81±0.05 ^b
Lymphocyte (%)	98±0.50 ^a	100±0.00 ^b	99±0.00 ^b
WBC (K/Cu.mm)	1.1±0.1 ^a	21.5±20.5 ^a	6.15±5.15 ^a
RBC M/uL	2.32±0.05 ^a	2.39±0.01 ^b	2.14±0.02 ^c
HCT (%)	38.55±0.55 ^a	37.9±0.3 ^a	32.15±1.85 ^b
PLT Count (K/Cu.mm)	135.5±39.50 ^a	117.0±7.0 ^a	256.5±3.5 ^b
Micronucleus (%)	0.44±0.06 ^a	0.51±0.03 ^a	0.55±0.11 ^a

^{abc} หมายถึง ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95%

*T1 = อาหารปลา

T2 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *B. licheniformis* TISTR 004 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

4.16 ผลการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ของปลานิลกระชังที่ใช้

B. licheniformis TISTR 004 และ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติกแบบ Challenge test

เลือกปลานิลจากการทดลองที่ใช้ *B. licheniformis* TISTR 004 และ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติก กลุ่มละ 30 ตัว มีน้ำหนักระหว่าง 60-70 กรัม มาเลี้ยงในกระชังเล็กขนาด 1 x 1 x 3 เมตร และทดสอบการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* โดยการฉีดเชื้อผสมแบบ Intraperitoneal พบว่า ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของปลานิลก่อนการฉีดเชื้อใน T3 และ T2 มีค่าสูงสุด รองลงมาคือ กลุ่มควบคุม (T1) โดยวัดได้ 8.0±0.0, 8.0±0.0 และ 3.0±0.0 ตามลำดับ และหลังจากการฉีดเชื้อ 7 วัน ค่าของแอนติบอดีไตเตอร์ที่วัดได้สูงสุด คือ T3 (8.66±0.58) รองลงมาคือ T2 (8.33±0.58) และ T1 (5.0±0.0) (ตารางที่ 4.19)

ตารางที่ 4.19 ค่าแอนติบอดีไทเตอร์ ค่าทางโลหิตวิทยา การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง และอัตราการรอดของปลานิลกระชังที่ใช้ *B. licheniformis* TISTR 004 และ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติก และ Challenge test ด้วยเชื้อผสมของ *A. hydrophila* และ *F. columnare*

Treatment*	T1	T2	T3
Antibody titer	3.0±0.0 ^a	8.0±0.0 ^b	8.0±0.0 ^c
0 post – challenged			
day 7 post – challenged	5.0±0.0 ^a	8.33±0.58 ^b	8.66±0.58 ^b
Lymphocyte (%)	98.0±1.0 ^a	96.0±0.0 ^a	97.15±1.5 ^a
WBC (K/Cu.mm)	59.85±46.05 ^a	9.4±0.4 ^a	11.1±0.2 ^a
RBC (M/uL)	1.51±0.63 ^a	1.1±0.85 ^a	1.9±0.07 ^b
HCT (%)	25.35±12.85 ^a	17.25±13.75 ^a	31.0±1.2 ^a
PLT Count (K/Cu.mm)	168.0±58.0 ^a	108.0±65.0 ^a	257.75±115.5 ^b
Micronucleus (%)	0.48±0.12 ^a	0.56±0.08 ^a	0.53±0.07 ^a
Survival Rate (%)	13.4±0.5 ^a	73.4±1.09 ^b	86.7±0.0 ^b

^{abc} หมายถึง ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95%

*T1 = อาหารปลา

T2 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *B. licheniformis* TISTR 004 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = อาหารปลา + 10⁹ CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของแต่ละกลุ่มการทดลองมีผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญใน T1, T2 และ T3 ซึ่งวัดได้ร้อยละ 0.48±0.12, 0.56±0.08 และ 0.53±0.07 ตามลำดับ อัตราการรอดหลังจากฉีดเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* เป็นเวลา 7 วัน ที่สูงสุดคือ T2 รองลงมา คือ T3 และ T1 มีค่าเป็นร้อยละ 86.7±0.0, 73.4±1.09 และ 13.4±0.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.19)

เมื่อทำ Challenge test กับ เชื้อผสมระหว่าง *A. hydrophila* และเชื้อ *F. columnare* UBRU1 ในปลานิล พบว่า กลุ่มที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์และอัตราการรอดสูงสุด แต่เมื่อศึกษาในระดับภาคสนามคือเพาะเลี้ยงปลานิลในกระชัง โดยใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เปรียบเทียบกับ *B. licheniformis* TISTR 004 เป็นโพรไบโอติกในปลานิลกระชัง และกลุ่มควบคุม

ที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก พบว่า กลุ่มควบคุมกลับมีอัตราการเจริญสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ใช้โพรไบโอติกทั้งที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 และที่ใช้ *B. licheniformis* TISTR 004 ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาที่มีก่อนนี้หลายเรื่องที่ยืนยันว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกปลาได้ดี (Salinas และคณะ, 2005; Balca'zar และ Rojas-Luna, 2007; Aly และคณะ, 2008) มีรายงานที่ *B. licheniformis* สามารถย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ดี (Farzanfar และคณะ, 2006) ดังนั้นการใช้เชื้อนี้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารในลูกปลาเทราจึงส่งผลให้มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นเนื่องจากช่วยในระบบการย่อยทำงานได้ดีขึ้น (Wache และคณะ, 2006) Zhou และคณะ (2009) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกต่างชนิดกัน คือ *B. subtilis* B10, *B. coagulans* B16 และ *Rhodopseudomonas palustris* G06 โดยการเติมเชื้อลงไปลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลานิล และพบว่าปลานิลที่เติมเชื้อ *B. coagulans* B16 และเชื้อ *R. palustris* G06 ลงไปในน้ำเลี้ยงปลา ทำให้ปลามีค่าน้ำหนักสุดท้ายสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลที่เติมเชื้อ *B. subtilis* B10 ลงไปในน้ำเลี้ยงปลา และกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเชื้อใดๆ

อย่างไรก็ตามเมื่อทำ Challenge test กับเชื้อผสมระหว่าง *A. hydrophila* และเชื้อ *F. columnare* UBRU1 ในปลานิลกระชังที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 เป็นโพรไบโอติก พบว่า กลุ่มที่ใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์และอัตราการรอดสูงสุด แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มการทดลองที่ใช้ *B. licheniformis* TISTR 004 อย่างมีนัยสำคัญ หากแต่ทั้งสองกลุ่มนี้จะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้สนับสนุนการศึกษาของเกศินี จันทรโสภณและคณะ (2553) ที่พบว่าการใช้เชื้อ *B. brevis* UBRU4 เป็นโพรไบโอติกในปลานิลกระชัง ทำให้ปลานิลมีอัตราการเจริญต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์และอัตราการรอดสูงสุดเมื่อทำ Challenge test กับเชื้อ *A. hydrophila* นอกจากนี้ Zhou และคณะ (2009) ได้รายงานว่าการเติมเชื้อโพรไบโอติก *B. coagulans* B16 และ *R. palustris* G06 ลงในน้ำเลี้ยงปลานิลนั้นสามารถช่วยกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันและทำให้ปลานิลมีสุขภาพดีขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการผลการศึกษานี้ที่พบว่า การใช้โพรไบโอติกเป็นอาหารเสริมในปลานิลเพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน คือ มีค่าแอนติบอดีไทเตอร์สูงขึ้นหลังจากได้รับเชื้อภายใน 7 วัน

สำหรับค่าทางโลหิตวิทยาโดยเฉพาะปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ปริมาณเกล็ดเลือดในแต่ละกลุ่มการทดลองมีค่าที่แตกต่างกันทางสถิติบ้างแต่ไม่มากนัก และปลานิลกลุ่มการทดลองที่ได้รับโพรไบโอติกเป็นอาหารเสริมนั้น ไม่มีอาการของโรคโลหิตจาง ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 ซึ่งมีสมบัติเป็น *B. licheniformis* เป็นโพรไบโอติกในปลานิลไม่ส่งผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของปลานิล แม้ว่า *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เม็ดเลือดแดงใน

อาหาร Blood agar แดก แต่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้โดย Khattab และคณะ (2009) ที่กล่าวว่าการใช้จุลินทรีย์บางชนิดเสริมในอาหารปลานิลจะทำให้มีผลเชิงลบของค่าทางโลหิตวิทยา เช่น การใช้ *Psuedomonas* sp. เป็นอาหารเสริมแก่ปลานิลจะมีผลให้ค่าทางโลหิตวิทยาต่ำกว่ากลุ่มการทดลองที่เป็นกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ Palikova และคณะ (2004) ยังพบว่า ถ้ามีการใช้สารสกัดจาก *Cyanobacteria* เป็นอาหารเสริมในปลาการ์ฟแล้วจะพบว่าปลาการ์ฟมีการตกเลือดบริเวณผิวหนัง นัยน์ตา ตับอ่อน และถุงลม และแม้ว่า *Bacillus* sp. UBRU22 จะทำให้มีเม็ดเลือดแดงในอาหาร Blood agar แดก แต่ยังไม่มีการศึกษาที่พบว่าเชื่อดังกล่าวทำให้ปลานิลมีอาการโลหิตจาง สาเหตุที่ *B. licheniformis* ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกนั้นคาดว่ามาจากการที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตสารที่เป็นกลุ่มสารลดแรงตึงผิวได้ซึ่งเหมือนกับสารลดแรงตึงผิวทั่วไปคือเป็นสารที่มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Noudeh และคณะ (2010) ที่รายงานว่า *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น glycolipids, lipopeptides, fatty acids, polysaccharide-protein complexes, peptides, phospholipids และ neutral lipids สารลดแรงตึงผิวที่ *Bacillus licheniformis* คือสาร lipopeptide ที่เรียกว่า Lichenysin ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพ โดยมีการประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร น้ำมัน เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยา เช่น emulsification, phase separation, wetting, foaming และ surface activity และในการบำบัดน้ำเสียสารลดแรงตึงผิวยังช่วยกำจัดสารอันตรายออกไปจากแหล่งน้ำ แต่ในกรณีการทดลองครั้งนี้ค่าค่า *Bacillus* sp. UBRU22 ที่ปลานิลใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นไม่อยู่ในสถานะที่เหมาะสมในการผลิตสาร Lichenysin ค่าทางโลหิตวิทยาในปลานิลจึงไม่มีผลกระทบ

นอกจากนี้ผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าร้อยละของการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของเกศินี จันทร โสภณและคณะ (2553) ผลการทดลองนี้แสดงว่าการใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 และ *B. licheniformis* TISTR 004 เป็นโพรไบโอติกในปลานิลนั้นไม่ทำให้สารพิษธรรมชาติในปลานิลเกิดความเสียหาย (Ali และคณะ, 2008) จึงยืนยันได้ว่าเชื่อดังกล่าวมีความปลอดภัยสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในการเพาะเลี้ยงปลานิล

อย่างไรก็ตาม ด้วยว่า *Bacillus* sp. UBRU22 ทำให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตช้าลง จึงควรใช้เชื้อนี้เสริมในอาหารให้แก่ปลานิลในกรณีรักษาโรคระบาดจากเชื้อกลุ่ม *Aeromonas* และ/หรือเชื้อกลุ่ม *Flavobacterium* โดยใช้ระยะเวลาหนึ่งจนกว่าโรคจะหยุดระบาดในกระชังปลานั้นแล้วจึงกลับมาให้อาหารตามปกติ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ เชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 ที่เหลืออยู่ในระบบทางเดินอาหารปลาจะลดลงจนเหลือไม่มากเกินสมดุลของเชื้อกลุ่ม friendly

bacteria เนื่องจากเชื่อว่าเป็นแบคทีเรียที่ไม่จับติดในระบบทางเดินอาหารหรือ Transient bacteria (Sanders และคณะ, 2003)

4.17 ผลการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ

ผลการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิลและปลาเศรษฐกิจโดยจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการให้แก่กลุ่มเป้าหมายดังนี้

4.17.1 กลุ่มปลากระชังบ้านท่าไผ่ ซึ่งเป็นกระชังต้นแบบที่มีการใช้ *S. cerevisiae* และ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไบโอติกในช่วงเดือนมิถุนายน ถึงสิงหาคม 2555 ซึ่งพบว่า การใช้โพรไบโอติก *Bacillus* ช่วยรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรียในปลานิลได้โดยมีอัตราการรอดถึงร้อยละ 86.7 ± 0.0 ในขณะที่ปลานิลกลุ่มที่ไม่ใช้โพรไบโอติกรอดตายเพียงร้อยละ 13.4 ± 0.5 และพบว่า การใช้โพรไบโอติกยีสต์ช่วยให้ปลานิลเติบโตมากกว่าการไม่ใช้โพรไบโอติกโดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวันเป็น 6.62 ± 0.0 กรัม ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ใช้โพรไบโอติกมีน้ำหนักเป็น 6.33 ± 0.01 กรัม เมื่อจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่องการใช้โพรไบโอติกในปลาเศรษฐกิจ ในวันที่ 1-2 ตุลาคม 2555 พบว่ามีผู้เข้าร่วมการอบรม 17 คน ดังรายชื่อในตารางที่ 4.20 ผลการประเมินของผู้เข้าอบรมที่มีต่อการอบรมครั้งนี้พบว่า มีความรู้เพิ่มขึ้น มีความต้องการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาทดแทนสารปฏิชีวนะ และมีความพึงพอใจมากถึงมากที่สุดร้อยละ 100

4.17.2 กลุ่มไร่นาสวนผสม บ้านหนองไฮ ตำบลหนองไฮ อำเภอสำโรง จังหวัดอุบลราชธานี โดยมีคุณศักดินา นักร้า เป็นหัวหน้ากลุ่ม กลุ่มได้เพาะเลี้ยงปลาจากลูกปลาขนาดเล็กหรือเรียกว่าปลาเซนต์ และอนุบาลจนเป็นปลารุ่นหรือเรียกว่าปลานิว โดยเพาะเลี้ยงในบ่อดิน มีวงจรการเพาะเลี้ยงประมาณ 60 วัน ก่อนจับขายให้แก่เจ้าของกระชังในเขตอำเภอดอนมดแดง ซึ่งมารับซื้อเองในฟาร์ม ปัญหาของกลุ่มคือ พบว่าลูกปลาเซนต์ที่นำมาอนุบาลนั้นจะเหลือรอดประมาณร้อยละ 10-20 โดยพบว่าลูกปลาจะเริ่มหมุนควงสว่างในช่วงที่เพาะเลี้ยงไปได้ประมาณ 45 วัน และทยอยตายจากอาการตัวดำหรือท้องบวม เนื่องจากกลุ่มนี้เป็นกลุ่มตัวอย่างทำเกษตรอินทรีย์และเป็นสถานที่อบรมเกษตรกร กลุ่มจึงไม่ได้ใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาโรคทำให้ได้ผลผลิตต่ำในเดือนมิถุนายน 2555 กลุ่มพบการเกิดโรคระบาดในปลานิลซึ่งมีลักษณะเป็นการติดเชื้อกลุ่ม *A. hydrophila* และ *F. columnare* จึงแนะนำวิธีการขยายเชื้อและการใช้เชื้อโพรไบโอติกให้แก่หัวหน้ากลุ่มและสมาชิกบางส่วนได้ใช้งานเพื่อแก้ปัญหาปลาตาย จากนั้นจึงจัดอบรมการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจให้แก่กลุ่มใหญ่อีกครั้ง พบว่ามีผู้เข้าร่วมอบรมดังรายชื่อในตารางที่ 4.21 เมื่อกลุ่มสามารถใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิลในบ่อดินแล้ว พบว่าผลผลิตของ

ตารางที่ 4.20 รายชื่อผู้ได้รับการจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการ บ้านท่าไทร ตำบลท่าไทร อำเภอเมืองใน
จังหวัดอุบลราชธานี

ลำดับ ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่
1	นางพานทอง ทุมคำ	136 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
2	นายณรงค์ ทุมคำ	136 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
3	นางแสงจันทร์ นามฤาไชย	1 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
4	นายบรรพต เกื้อสิงห์	52/24 หมู่ 3 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
5	นางบงอร ครองยุติ	37 หมู่ 4 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
6	นายสุรัตน์ ชูเนตร	54 หมู่ 4 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
7	นายเทพากร ระคาบุตร	85 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
8	นางหอมไกร ชูเนตร	174 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
9	นายไสว ตระการจันทร์	163 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
10	นายพัฒนา ชูเนตร	153 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
11	นางสำราญ ใจดี	29 หมู่ 8 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
12	นายบุญมา คันธจันทร์	43 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
13	นางสุพา สังกะเพศ	53 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
14	นายพงษ์พันธ์ ตระการจันทร์	19/15 หมู่ 3 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
15	นายอนุพงษ์ มีโชค	29 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
16	นายถนอน แสงสงคราม	122 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ
17	นายบุญมา ดวงศรี	129 หมู่ 9 ต.ท่าไทร อ.เมืองใน จ.อุบลฯ

กลุ่มที่ได้ทดลองใช้โพรไบโอติกบาซิลลัสรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแล้วนั้น เมื่อเก็บผลผลิตในวันที่ 20 ตุลาคม 2555 สามารถเก็บผลผลิตได้ร้อยละ 60-80 ซึ่งทำให้กลุ่มพึงพอใจมากและส่งสมาชิกเข้ารับการอบรมเทคนิคทางจุลชีววิทยาเพื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UBRU22 ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งต่อไปกลุ่มจะเป็นผู้ขอรับบริการทางวิชาการจากสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. UBRU22 ไว้สำหรับใช้ด้วยตัวเอง ผลการประเมินของผู้เข้าอบรมที่มีต่อการอบรมครั้งนี้พบว่า มีความรู้เพิ่มขึ้น มีความต้องการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาทดแทนสารปฏิชีวนะ และมีความพึงพอใจมากถึงมากที่สุดร้อยละ 100

ตารางที่ 4.21 รายชื่อผู้ได้รับการจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการ บ้านหนองไฮ ตำบลหนองไฮ อำเภอ
สำโรง จังหวัดอุบลราชธานี

ลำดับ ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่
1	นายศักดิ์นา นักร้า	5 หมู่ 3 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
2	นายประจักษ์ วรรณพาล	59 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
3	นายประเสริฐ ไบสูม	116 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
4	นายสะอาด บรรรมณี	118 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
5	นางอุดม บุญเชื้อ	34 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
6	นายผัด แก้วคูณ	91 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
7	นางประกายศรี นิลสุทธิ์	19 หมู่ 3 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
8	นายผ่าน บรรรมณี	8 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
9	นายอุดร บรรรมณี	49 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
10	นายกิจดิษฐ์ แสนคำสอน	77 หมู่ 1 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
11	นายบุญส่ง บรรรดาเทา	21 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
12	นางสาวแว่น แก้วคำชาติ	44 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
13	นายสุณี บัวหลาย	159 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
14	นายคำพูล บัวหลาย	159 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
15	นายอุดร ปาคำทอง	16 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
16	นายคำกอง โคตรสมพงษ์	130 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
17	นางสาวมลฤดี แก้วคำชาติ	59 หมู่ 11 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
18	นางนุลอร ใจเพียร	14 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
19	นายสมบุรณ์ โคตรสมพงษ์	1 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
20	นายสุรัตน์ แก้วคำชาติ	157 หมู่ 6 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
21	นายอรุณศักดิ์ นักร้า	5 หมู่ 3 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
22	นางไพจิตร นักร้า	5 หมู่ 3 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ
23	นางสาวฉัฐพร นักร้า	5 หมู่ 3 ต.หนองไฮ อ.สำโรง จ.อุบลฯ

4.17.3 กลุ่มลูกฟาร์มปลากระชัง บริษัท เบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด โดยมี นายสัตวแพทย์พิศิษฐ์ สุภาพ เป็นผู้ประสานงานโดยในเดือนพฤษภาคม 2555 ผู้ประสานงานพบการเกิดโรคระบาดในปลานิลกระชังของเกษตรกรซึ่งเป็นลูกฟาร์มจึงเก็บตัวอย่างเข้ามาวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในห้องปฏิบัติการสาขาจุลชีววิทยา ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจากรอยโรคพบว่าปลาติดเชื้อกลุ่ม *A. hydrophila* และ *F. columnare* ระหว่างนี้ได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคไปแล้ว จึงจัดอบรมการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* เพื่อรักษาโรคให้กลุ่มเกษตรกรลูกฟาร์มและกลุ่มผู้ประสานงาน ในวันที่ 18-19 สิงหาคม 2555 พบว่ามีผู้เข้าอบรมดังรายชื่อในตารางที่ 4.22 โดยบริษัทได้ทำเรื่องขอใช้โพรไบโอติกมายังมหาวิทยาลัยอย่างเป็นทางการ เกษตรกรลูกฟาร์มของบริษัทได้ทดลองใช้โพรไบโอติก *Bacillus* รักษาโรคระบาดในกระชังปลาตั้งแต่วันที่ 18 สิงหาคม 2555 จำนวน 2 กลุ่ม โดยเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะและพบว่า ผลการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* พบว่าสามารถรักษาโรคได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยจากเดิมที่ปลาในกระชังตายวันละประมาณ 100 ตัว ก็จะตายลดลงเหลือประมาณร้อยละ 50 ของการตายในวันก่อน ณ วันที่สองของการใช้เชื้อจนกระทั่งปลาไม่ตายภายใน 7 วันของการใช้เชื้อ และพบว่าปลาที่ใช้โพรไบโอติกมีอัตราการรอดมากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ผลการประเมินของผู้เข้าอบรมที่มีต่อการอบรมครั้งนี้พบว่า มีความรู้เพิ่มขึ้น มีความต้องการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาทดแทนสารปฏิชีวนะ และมีความพึงพอใจมากถึงมากที่สุดร้อยละ 100 ผู้ประสานงานจึงขอใช้โพรไบโอติก *Bacillus* อย่างต่อเนื่องเพราะมีลูกฟาร์มกระจายอยู่ในหลายพื้นที่ประสบกับปัญหาโรคระบาดในปลาเศรษฐกิจ โดยในอนาคตบริษัทอาจเป็นผู้ที่เข้ามาขอรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตโพรไบโอติก *Bacillus* อย่างเป็นทางการต่อไป และได้วางแผนในการทำวิจัยร่วมกับคณาจารย์และนักศึกษา สาขาจุลชีววิทยา โดยขยายผลทั้งเรื่องเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงปลาไปยังสุกรและสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นที่เป็นลูกฟาร์มของบริษัท

ตารางที่ 4.22 รายชื่อลูกฟาร์มผู้ได้รับการจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการของ บริษัท เบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด ณ เขื่อนสิรินธร อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี

ลำดับ	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่
1	นางจัทนา แก่นธาตุ	38 หมู่ 18 ต.แสนสุข อ.เมือง จ.อุบลฯ
2	นางชลชิต แนวนำปา	218 หมู่ 17 ต.โคกกระชาย อ.ครบุรี จ.นครราชสีมา
3	นายชูศักดิ์ ทองปน	20 หมู่ 12 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
4	นางแดง แก้วคอน	44 หมู่ 9 ต.นิคมลำโดมน้อย อ.สิรินธร จ.อุบลฯ

ตารางที่ 4.22 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่
5	นางทองศรี ทองปน	44 หมู่ 12 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
6	นายธีระ แนวจำปา	121 หมู่ 6 ต.ปะอาว อ.เมือง จ.อุบลฯ
7	นายนันทพร สายสี	4 หมู่ 12 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
8	นายบุญชาญ จำบางพูล	22/36 ถ.แนบเคหาสน์ ต.หัวหิน อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
9	นางบุญมี ห้วยใหญ่	8 หมู่ 12 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
10	นางประกาย รูปงาม	1 หมู่ 9 ต.นิคมลำโดมน้อย อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
11	นายประมวล สุโกภาค	1 หมู่ 9 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
12	นางมณีวรรณ กอบขุนทด	49 หมู่ 12 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
13	นายมนตรี ทองปน	44 หมู่ 12 ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
14	นางรัชณี แก่นธาตุ	59 หมู่ 1 ต.กระโสบ อ.เมือง จ.อุบลฯ
15	นางลำพูน วงศ์สุข	43 หมู่ 4 ต.ปะอาว อ.เมือง จ.อุบลฯ
16	นายวิระพันธ์ บุญล้ำ	18 หมู่ 1 ต.นิคมลำโดมน้อย อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
17	นายวิระศักดิ์ พลเที่ยง	173 หมู่ที่ 5 ต.นาเต้ อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ
18	นายสมชาย สีหมอก	80 หมู่ 9 ต.นิคมลำโดมน้อย อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
19	นางสาวลัทธวรรณ แคนดิ	22/38 ต.หัวหิน อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
20	นางอัญชลี ห้วยใหญ่	22 หมู่ 12 ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
21	นางอัมพวัน ห้วยใหญ่	22 หมู่ 12 ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ
22	นางอาทิตย์ แนวจำปา	43 หมู่ 4 ต.ปะอาว อ.เมือง จ.อุบลฯ
23	นางอารี สุดคาน	18 หมู่ 12 ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลฯ

4.17.4 กลุ่มปลากระชังบ้านบึงกาแซว ซึ่งมีการเลี้ยงปลาทั้งแบบอนุบาลและแบบปลาตลาด เกษตรกรพบปัญหาการเกิดโรคระบาดเป็นระยะและมีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นประจำในปริมาณมาก ในเดือนมิถุนายน 2555 เมื่อเกษตรกรทดลองใช้โพรไบโอติกรักษาโรคระบาดแล้วพบว่าการใช้โพรไบโอติกจะให้ผลกับปลาอนุบาลดีกว่าปลาดตลาด ซึ่งเป็นผลมาจากผลของสารปฏิชีวนะที่ใช้กับปลาดตลาดมาก่อนไปยับยั้งการเจริญของโพรไบโอติก ซึ่งทำให้การใช้โพรไบโอติก

กับปลาขนาดใหญ่ได้ผลไม่ดีเท่ากับการใช้โพรไบโอติกในปลาขนาดเล็กที่ยังไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ โดยที่พบว่าถ้าใช้ยาปฏิชีวนะในช่วงมีโรคระบาดปลาจะตายรวมแล้วประมาณร้อยละ 60 เมื่อทดลองใช้โพรไบโอติกทดแทนยาปฏิชีวนะปลาจะตายรวมแล้วประมาณร้อยละ 40 สมาชิกของกลุ่มยินดีเข้าร่วมโครงการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิลกกระชังเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะต่อไป จึงจัดอบรมการใช้โพรไบโอติกในปลาเศรษฐกิจให้แก่เกษตรกร ดังรายชื่อในตารางที่ 4.23 ในวันที่ 20 ตุลาคม 2555 ผลการประเมินของผู้เข้าอบรมที่มีต่อการอบรมครั้งนี้พบว่า มีความรู้เพิ่มขึ้น มีความต้องการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาทดแทนสารปฏิชีวนะ และมีความพึงพอใจมากถึงมากที่สุด ร้อยละ 100

ตารางที่ 4.23 รายชื่อผู้ได้รับการจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการ ตำบลแจระแม อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

ลำดับที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่
1	นายบัวผิน บรรทร	190 หมู่ 8 ต.เสาชงชัย อ.กันทรลักษ์ จ.ศรีสะเกษ
2	นางคำพา บรรทร	190 หมู่ 8 ต.เสาชงชัย อ.กันทรลักษ์ จ.ศรีสะเกษ
3	นายกมล ชลหิรัญ	79/7 ต.แจระแม อ.เมือง จ.อุบลฯ
4	นางสาวกิตติยาพร ชลหิรัญ	79/7 ต.แจระแม อ.เมือง จ.อุบลฯ
5	นางนุชจรี วงศ์วาน	140/7 ต.แจระแม อ.เมือง จ.อุบลฯ
6	นายสุเทพ พุ่มลำเอียด	30 ถ.เขื่อนธานี ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลฯ

สำหรับการใช้เชื้อบาซิลลัสกลุ่มที่มีรายงานว่าไม่เป็นเชื้อก่อโรคนั้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง (Moriary, 1998) มีการส่งเสริมให้ใช้เชื้อกลุ่มนี้เป็นอาหารเสริมการเจริญของสัตว์น้ำ (Gullian และคณะ, 2004) เชื้อกลุ่มนี้สามารถผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน และเอนไซม์ได้ (Sanders และคณะ, 2003) จึงทำให้เกิดผลดีแก่สัตว์น้ำในเรื่องของสารอาหาร (Bagheri และคณะ, 2008) คือย่อยอาหารได้ดีขึ้นซึ่งทำให้มีอัตราการแลกเนื้อสูงขึ้น ปกติแล้วโพรไบโอติกที่ใช้เป็นอาหารเสริมที่คั้นนั้น คือ ช่วยสร้างวิตามินเพิ่มขึ้น ช่วยย่อยสลายสารประกอบบางอย่างที่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกายทำให้ความเป็นพิษนั้นหมดไป และช่วยย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และย่อยยากให้ย่อยได้ง่ายและร่างกายนำไปใช้ได้มากขึ้น (Irianto และ Austin, 2002) Sanders และคณะ (2003) รายงานว่า โดยทั่วไปแล้ว

Bacillus เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารแบบ transient microbiology โดยจะไม่จับติดกับเยื่อผิวหรือผนังทางเดินอาหารของ host

เมื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ ให้แก่เกษตรกรกลุ่มเป้าหมายที่สนใจเข้าร่วมโครงการแล้ว โดยภาพรวมพบว่าเกษตรกรมีความพึงพอใจในการอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อใช้โพรไบโอติกทดแทนสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจในระดับมากที่สุดถึงร้อยละ 100 ซึ่งผลการอบรมนี้จะสามารถนำไปสู่การลดหรือเลิกใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรียในปลาของกลุ่มเป้าหมายที่เข้าอบรมได้ โดยที่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้สูงขึ้นกว่าเดิมที่ใช้สารปฏิชีวนะ เป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและเพิ่มรายได้ให้แก่กลุ่มเกษตรกร ที่สำคัญคือไม่มีสารต้องห้ามตกค้างในผลผลิต ที่สำคัญคือการใช้โพรไบโอติกนี้ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงปลานูบาล จะทำให้ได้ปลานิลที่แข็งแรงไม่ติดโรคระบาดซึ่งลดความเสี่ยงในการลงทุนของเกษตรกรกลุ่มที่มารับไปเพาะเลี้ยงเป็นปลาตลาดได้ จึงเห็นได้ว่าผลการวิจัยครั้งนี้สามารถช่วยส่งเสริมการเลี้ยงปลานิลทั้งแบบในบ่อดินและในกระชังแบบยั่งยืนได้ โดยเป็นการเพิ่มความรู้ด้านการใช้โพรไบโอติกให้แก่ผู้เลี้ยงปลาในกระชังเพื่อใช้ประโยชน์ด้านการกระตุ้นการเจริญ ใช้ป้องกันและรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรียในปลานิล ซึ่งส่งเสริมให้มีการลดและที่ลดนำไปสู่การเลิกใช้ยารักษาโรคในการเลี้ยงปลา ตลอดจนเป็นแนวทางสำคัญที่ช่วยให้การเลี้ยงปลาในกระชังจะได้เข้าสู่มาตรฐาน GAP เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการบริโภคและสามารถเป็นสินค้าส่งออกจำหน่ายต่างประเทศได้ต่อไป