บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการเลี้ยงปลานิลในกระชังนั้นแม้ว่าให้ผลตอบแทนสูง แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงทราบดีว่าการเลี้ยงปลานิลในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน ปลานิลมีโอกาสตายสูงเนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำ แม้ว่าปกติในน้ำก็จะมีจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นเชื้อเจ้าถิ่นประจำ แต่ในช่วงดังกล่าวจะมีปัจจัยทางกายภาพหลายอย่างไม่ว่าจะเป็นอากาศร้อน น้ำร้อน สลับกับฝนตก น้ำขุ่น น้ำหลาก หรืออื่นๆ ที่ส่งผลให้เชื้อก่อโรคมีจำนวนมากขึ้น และปลานิลซึ่งมีนิสัยตกใจง่ายจะไม่ค่อยกินอาหาร โตช้า เกิดอาการเครียด ทำให้ภูมิต้านทานต่ำ มีการติดเชื้อและตายในที่สุด หากนำปลาที่ยังไม่ตายแต่ติดเชื้อกลุ่ม *A. hydrophila* ไปบริโภค จะทำให้ผู้บริโภคเป็นโรคลำไส้อักเสบ ในกรณีที่มีโรคระบาดและปลานิลทยอยตาย เกษตรกรจะใช้สารปฏิชีวนะในการรักษา แต่มักใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน จุลินทรีย์ก่อโรคจึงดื้อยา ต้องเพิ่มปริมาณสารปฏิชีวนะ สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และมีสารปฏิชีวนะตกค้างในผลผลิต แต่ถ้าหากมีการใช้จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์ โพรไบโอติกจะช่วยสนับสนุนจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ต่อร่างกายให้มีปริมาณสมดุลกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โดยขัดขวางการเจริญและการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรค ช่วยเสริมการย่อยอาหาร ทำให้ดูดซึมอาหารไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จะทำให้สัตว์มีสุขภาพดี มีอัตราการเปลี่ยนอาหารไปเป็นน้ำหนักเพิ่มขึ้น และลดการใช้และการตกค้างของสารปฏิชีวนะ โพรไบโอติกที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตกลุ่มใดควรคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตกลุ่มนั้น จึงจะทำให้เชื่อมั่นได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเกาะติดผนังลำไส้สิ่งมีชีวิตนั้นได้ดี ถ้าใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิล คาดว่าจะสามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยให้ปลาใช้ประโยชน์จากอาหารดีขึ้น เพิ่มความต้านทานโรค ความแข็งแรง การเจริญเติบโตและผลผลิต โพรไบโอติกที่น่าสนใจคือ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. และยีสต์ *Saccharomyces* spp. เพราะนอกจากจะมีสมบัติดังกล่าวแล้วยังเป็นจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย ขยายเชื้อในปริมาณมากได้เร็ว มีอายุการเก็บรักษานาน ใช้อาหารที่ไม่ซับซ้อน เจริญได้ดีในสภาวะกึ่งปลอดเชื้อ ที่สำคัญคือ สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้ผู้ประกอบการผลิตกล้าเชื้อและนำไปใช้ได้อย่างง่าย ราคาถูก ซึ่งจะทำให้เกิดความคล่องตัวและมีความเป็นไปได้สูงในการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิล อันเป็นผลดีต่อทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค

องค์การอนามัยโลกผลักดันให้มีการลดการใช้สารปฏิชีวนะและลดการใช้สารปฏิชีวนะที่ไม่ถูกวิธีลง โดยเน้นที่การจัดการเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการติดโรค ซึ่งจะเป็นวิธีที่ได้ผลดีกว่าวิธีการรักษา และลดการใช้สารเคมีลงไม่ว่าจะเป็นสารปฏิชีวนะ สารซักล้าง และยาฆ่าแมลง (Verschuere

และคณะ, 2000) หนึ่งในวิธีการจัดการเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการติดโรคที่นิยมในปัจจุบันคือ การใช้จุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ก่อโรคมาต่อต้านเชื้อที่ก่อโรค โดยรูปแบบที่ใช้เป็นการใช้จุลินทรีย์ในการหมักอาหาร และรับประทานอาหารหมักที่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตไปเสริมสร้างภูมิต้านทานและ/หรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งมีการใช้รักษาโรคได้ไม่ว่าจะเป็นโรคท้องร่วงจนกระทั่งถึงใช้ป้องกันโรคมะเร็ง (Chukeatirote, 2003) ส่วนใหญ่จะเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า โพรไบโอติก นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความสนใจใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นใช้ปรับปรุงกลิ่นรสของอาหาร ใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ

2.1. โพรไบโอติก (Probiotic)

2.1.1 ความหมายของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งมีผลดีต่อสุขภาพ เห็นได้จากการช่วยสร้างสมดุลภายในระบบทางเดินอาหาร (Song และคณะ, 2006) จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกนั้นประกอบด้วยแบคทีเรีย (กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก บาซิลลัส ไซยาโนแบคทีเรีย) สาหร่ายขนาดเล็ก ฟังไจ ฯลฯ โดยเมื่อเติมจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารสัตว์หรือน้ำดื่มของสัตว์จะทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น (Deseenthum และคณะ, 2007) คำที่มีการใช้เรียกแทนโพรไบโอติก เช่น “friendly”, “beneficial” หรือ “healthy” bacteria (Chukeatirote, 2003)

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากมายหลายชนิด ทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ ดังนั้นถ้าหากจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมีจำนวนมากขึ้นก็สามารถเกาะติดผนังลำไส้ และแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น เป็นการช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคมาเกาะติด และหลั่งสารพิษที่มีผลทำให้เยื่อบุลำไส้อักเสบได้ เมื่อมีการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์และรักษาสมดุลในระบบลำไส้มากขึ้น ซึ่งมีผู้ให้ความหมายคำว่า โพรไบโอติก มากขึ้นตามแนวทางที่ได้ทำการศึกษา ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1998 Fuller ได้ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่เชื้อก่อโรค แต่จะช่วยส่งเสริมสุขภาพของ host ไปในทิศทางที่ดีขึ้น องค์การอาหารและเกษตรและองค์การอนามัยโรค ให้คำจำกัดความของ โพรไบโอติกว่า คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิต หากรับประทานในปริมาณที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ Toma และ Pokrotnieks (2006) ให้ความหมายไว้ว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งหากรับประทานในจำนวนที่เหมาะสมแล้วจะทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ Didier (2005) ได้รายงานว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่ใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารเลี้ยงสัตว์ โดยทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสัตว์

ทะเนตร อุฤทธิ์ (2545) ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่า เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (Living microorganism) เมื่อผสมให้กับสัตว์กิน จะช่วยเพิ่มปริมาณสิ่งมีชีวิตในลำไส้ ทำให้เกิดผลดีต่อสัตว์ แต่ให้ผลขัดแย้งกับจุลินทรีน์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น ยาคูลท์ที่มีจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสก็จัดเป็นโพรไบโอติกอย่างหนึ่ง เมื่อคนกินเข้าไปแล้วจะช่วยสร้างน้ำย่อยได้ดีขึ้น ทำให้ระบบขับถ่ายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลที่ได้คือมีภูมิต้านทานดีขึ้น

สุนทร ผ่องพุฒ และคณะ (2549) ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่าโพรไบโอติกหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารในร่างกายมนุษย์และสัตว์ โดยที่เมื่อมนุษย์หรือสัตว์บริโภคอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกแล้ว จุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้นจะยังคงมีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญ การทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายและสารต้านทานโรคหลายชนิด โดยที่ไม่กระทบต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นของร่างกายในเชิงลบแต่จะทำงานร่วมกันหรือ ส่งเสริมกันเพื่อช่วยให้ร่างกายเจริญเติบโตตามปกติ กล่าวโดยรวมได้ว่าโพรไบโอติกหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เป็นตัวที่ให้ประโยชน์ต่อลำไส้ สามารถสร้างความสมดุลให้กับร่างกาย ทำให้ร่างกายมีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคภัยเบียดเบียน

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และบุญเสริม วิทยชำนาญกุล (2551) กล่าวว่า โพรไบโอติกในที่นี้ คือจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะเป็นแบคทีเรีย หรือเชื้อราหรือยีสต์ก็ได้ จากคำจำกัดความนั่นคือจุลินทรีย์ที่ผู้บริโภคบริโภคเข้าไปแล้วสามารถเข้าไปยึดเกาะบริเวณผิวหน้าของทางเดินอาหารโดยที่ยังมีชีวิตอยู่ เมื่อเข้าไปยึดเกาะบริเวณทางเดินอาหารแล้วโพรไบโอติกจะสามารถเอื้อประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้

2.1.2 ความสมดุลของปริมาณจุลินทรีย์

สุนทร ผ่องพุฒและคณะ (2549) รายงานว่า โดยปกติแล้วร่างกายของมนุษย์และสัตว์ที่มีสุขภาพปกติแข็งแรงจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดอาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในระบบทางเดินอาหาร แบ่งออกเป็น 2 พวกดังนี้

1) จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ได้แก่ *Shigella, Clostridium, Samonella* ซึ่งจะทำให้เกิดอาการท้องเสียและการเจริญเติบโตลดลง

2) จุลินทรีย์ไม่ก่อโรค (non-pathogen) ได้แก่ *Lactobacillus, Streptococcus, Bifidobacterium* ฯลฯ ซึ่งเป็นชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากจะไปควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค ไม่ให้มีปริมาณมากจนทำให้เป็นอันตรายกับคนหรือสัตว์ แบคทีเรียพวกนี้สามารถสร้างกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก กรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซินและสารอื่นๆ มากำจัดจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้ยังสามารถแก่งแย่งและยึดติดกับผนังลำไส้ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถแก่งแย่งและยึดติดกับผนังลำไส้ได้ จึงถูกขับออกจาก

ร่างกายในที่สุด การอยู่ร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ก่อโรคกับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกาย ควรมีอัตราส่วนที่เหมาะสมของแบคทีเรีย 2 กลุ่ม โดยพบว่าถ้าพบในอัตราส่วนร้อยละ 15 : 85 หรือ 1 : 6 จึงจะทำให้ร่างกายอยู่ในสมดุล

2.1.3 สมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

สุนทร ผ่องพุฒและคณะ (2549) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกไว้หลายประเด็นดังต่อไปนี้

1) หลักการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก

1.1) เป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรค เป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดสูง เช่นในกระเพาะอาหาร และสามารถทนต่อเกลือ น้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง

1.2) สามารถเจริญเพิ่มจำนวนและมีเมแทบอลิซึมเพิ่มขึ้นมากในระบบทางเดินอาหารได้

1.3) สามารถแข่งขันเข้ายึดเกาะกับจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

1.4) ผลิตกรดอินทรีย์และต่อต้านจุลชีพซึ่งมีผลลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

1.5) มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์และทำให้สัตว์มีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

1.6) เพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน

1.7) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ และแสดงให้เห็นผลดีกว่าการไม่เติมโพรไบโอติกได้ชัดเจน

2) ลักษณะของโพรไบโอติกที่ดี

2.1) เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความต้านทานโรคได้ดี

2.2) ไม่ทำให้เกิดโรคไม่เป็นพิษและไม่ตกค้างในซากสัตว์

2.3) เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้าย

2.4) ทนต่อสภาพกรดในทางเดินอาหารและน้ำดีในลำไส้ได้

2.5) ไม่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

2.6) สามารถขยายการผลิตสู่การค้าได้

2.7) มีความคงตัวและสามารถเก็บไว้ได้นาน

2.8) สามารถอยู่รอดในลำไส้คนและสัตว์ได้

3) ประโยชน์ของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก

3.1) ประโยชน์ด้านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประกอบด้วย

(1) สร้างสารต่อต้านจุลชีพ

(2) แย่งอาหารจากจุลินทรีย์อื่นๆ

(3) แย่งพื้นที่จับกับผนังทางเดินอาหาร

3.2) ประโยชน์ด้านการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น B-galactosidase ที่ช่วยบรรเทาภาวะที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในระบบทางเดินอาหารได้

3.3) ประโยชน์ด้านการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มระดับแอนติบอดี

(1) เพิ่มระดับแอนติบอดี

(2) เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแมคโคฟาจ (macrophage)

2.1.4 โพรไบโอติกและระบบภูมิต้านทาน

ได้มีการการศึกษาถึงผลของโพรไบโอติกที่มีต่อระบบภูมิต้านทานมากว่า 20 ปีแล้ว โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิต้านทานของร่างกายให้เกิดการตอบสนองได้เช่นเดียวกับการตอบสนองแบบปกติของร่างกาย เช่น พบว่าการกระตุ้นระบบภูมิต้านทานของร่างกายระหว่างเชื้อ *Bifidobacterium* กับเชื้อ *Lactobacillus* จะมีผลในการกระตุ้นระบบภูมิต้านทานที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติแล้วการตอบสนองของร่างกายเพื่อสร้างภูมิต้านทานที่มีมาแต่กำเนิดและภูมิต้านทานที่สร้างขึ้นภายหลังถูกควบคุมโดยผ่านทาง cytokine การที่ร่างกายได้รับจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจะทำให้มีการผลิตปริมาณ cytokine เพิ่มขึ้น ทำให้อายุการทำงานของเซลล์จับกินนานขึ้น ชนิด ปริมาณ และวิธีการรับจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิต้านทานของร่างกาย เพราะไปมีผลต่อการต่อต้านกับสิ่งแปลกปลอมได้ไม่เท่ากันที่แตกต่างกัน โพรไบโอติกสามารถปกป้องร่างกายจากจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดังนี้

1) กระตุ้นให้ร่างกายผลิตเซลล์ cytokine เพิ่มขึ้น

2) เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์จับกินทั้งที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ macrophages

3) เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ต่อสู้สิ่งแปลกปลอมของร่างกาย

4) ทำให้แอนติบอดีแบบเฉพาะต่อจุลินทรีย์ก่อโรคทำงานได้สูงขึ้น (Toma และ Pokrotnieks, 2006)

2.1.5 ปริมาณโพรไบโอติกที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย

การกำหนดปริมาณที่เหมาะสมในการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกให้เกิดประโยชน์ต่อการรักษาร่างกายนั้นยังไม่มีการระบุปริมาณที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตที่อยู่ในระดับที่เรียกว่า “therapeutic minimum” นั้นจะต้องให้ผู้บริโภคได้รับในจำนวนที่จะก่อให้เกิดผลต่อร่างกายได้โยเกิร์ตเป็นตัวอย่างที่ดีในการที่ผู้บริโภคได้รับจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก การใช้วิธีรับประทานนั้นได้กำหนดให้ใน 100 กรัมของโยเกิร์ตที่รับประทานจะต้องมีจุลินทรีย์ไม่ต่ำกว่า 10^8 CFU/mL โดยที่อายุการเก็บสุดท้ายของโยเกิร์ตจะต้องมีจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจำนวน 2×10^6 ของเซลล์ที่มีชีวิตต่อโยเกิร์ต 1 mL ปริมาณโยเกิร์ตที่รับประทานประจำวันควรได้รับจุลินทรีย์ไม่ต่ำกว่า 1×10^9 cell อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกในอาหารหมักจะลดลงตามเวลาการเก็บรักษา ดังนั้นจึงมีการใช้โพรไบโอติกที่ผลิตเป็นยาเม็ดหรือแคปซูลในรูปของเซลล์แบบแห้งแข็ง (lyophilized cultures) ด้วย (Toma และ Pokrotnieks, 2006)

เนื่องจากมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกในหลายรูปแบบ จึงมีความพยายามในการค้นหาจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ๆ อยู่เสมอเพื่อที่จะใช้ในงานเฉพาะด้าน เช่น การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ในฟาร์มเลี้ยงปลาต้องการใช้โพรไบโอติกที่สามารถทนต่อสภาวะในการเพาะเลี้ยงปลาที่มีเกลือสูงและค่าพีเอชต่ำ (Chukeatirote, 2003) ซึ่งโพรไบโอติกที่ใช้กับสัตว์เศรษฐกิจมีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แบคทีเรียกรดแลกติก บาซิลลัส และยีสต์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ใช้เหล่านี้จะต้องมีความปลอดภัยและสามารถออกฤทธิ์ได้ในระบบทางเดินอาหาร (Didier, 2005)

2.2 ปลานิล

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอเทศ ลักษณะพิเศษของปลานิลนั้นมีริมฝีปากเสมอกัน มีเกล็ด 4 แถว ตรงบริเวณแก้มมี 4 แถว ตามลำดับ มีลายพาดตามขวางจำนวน 9-10 แถบ นอกจากนั้นลักษณะทั่วไปคือ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มหนึ่งจุด บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลังครีบก้นและครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำตัดขวาง แลดูคล้ายลายข้าวตอก โดยทั่วไปปลานิลอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงตามแม่น้ำลำคลอง หนอง บึง และทะเลสาบเป็นปลาที่อยู่ในน้ำกร่อย มีความอดทน และสามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้เป็นอย่างดี (สุกัญญา นิลมณี และอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

2.2.2 ความเป็นมา

ตามที่พระบาทสมเด็จพระจักรพรรดิอากิฮิโตเมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมาร แห่งประเทศญี่ปุ่นทรงจัดส่งปลานิล จำนวน 50 ตัว ความยาวเฉลี่ยตัวละประมาณ 9 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 14 กรัม มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 นั้น ในระยะแรกได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดินเนื้อที่ประมาณ 10 ตารางเมตร ในบริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต เมื่อเลี้ยงมา 5 เดือนเศษ ปรากฏว่ามีลูกปลาเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก จึงได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้เจ้าหน้าที่สวนหลวงขุดบ่อขึ้นใหม่อีก 6 บ่อ ต่อจากนั้น ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้กรมประมงจัดส่งเจ้าหน้าที่วิชาการมาตรวจสอบการเจริญเติบโตเป็นประจำทุกเดือน โดยที่ปลานิลนี้เป็นปลาจำพวกกินพืช เลี้ยงง่าย มีรสดี ออกลูกดก เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ในเวลา 1 ปีจะมี น้ำหนักประมาณครึ่งกิโลกรัม และมีความยาวประมาณ 1 ฟุตจึงได้ให้ปลานี้แพร่ขยายพันธุ์ ดังนั้นเมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2509 พระราชทานชื่อปลานี้ว่า " ปลานิล " (สุกัญญา นิลมณีและอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

2.2.3 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

ปลานิลถูกจำแนกชั้นเพื่อจัดลำดับทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

อาณาจักร: Animalia

ไฟลัม: Chordata

ชั้น: Actinopterygii

ตระกูล: Perciformes

วงศ์: Cichlidae

สกุล: *Oreochromis*

สปีชีส์: *O. niloticus* (Wikipedia (a), 2008)

2.2.4 แหล่งกำเนิดและการแพร่กระจาย

ปลานิล (Nile tilapia) อยู่ในวงศ์ Cichlidae จัดอยู่ในกลุ่มปลากินพืช มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* สามารถเลี้ยงได้ในสภาพพื้นที่หลากหลายเช่น บ่อดิน บ่อซีเมนต์ กระชัง และสามารถเลี้ยงรวมกับปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ ได้ ปลานิลเป็นปลาที่โตเร็วเป็นที่ของผู้นิยมบริโภค ปัจจุบันภาครัฐได้ส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงเป็นปลาเศรษฐกิจมากขึ้น สายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์จิตรลดา 3 และปลาลูกผสมซึ่งเป็นปลาที่ทนต่อสภาพแวดล้อมของประเทศไทยและมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว เช่น ปลาทับทิม ปลานิลแดงและปลามรกต เป็นต้น จากสมบัติที่ดีดังกล่าว ทำให้ปลานิลถูกคัดเลือกให้เป็นปลาตัวแทนของสัตว์ที่ใช้

ในการทดลองวิจัยทางชีววิทยา และทางพันธุศาสตร์ของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ปลานิลยังเป็นปลาที่มีรสชาติดี (สุกัญญา นิลมณีและอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

2.2.5 วิธีการเพาะพันธุ์

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ลูกดก แข็งแรง อดทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถวางไข่ได้ทั้งในบ่อเลี้ยงและแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป โดยมีการผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดทั้งปี ปริมาณไข่ที่ได้จะอยู่ระหว่าง 50-600 ฟอง ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของแม่ปลา ความแตกต่างระหว่างเพศ เห็นได้ชัดเจนจากลักษณะของติ่งเพศ โดยเพศเมียจะมีติ่งเพศปลายมน ช่องเปิดบนติ่งเพศมีถึง 2 ช่อง คือ ช่องเปิดที่ปลายติ่งเป็นทางออกช่องปัสสาวะ ส่วนช่องเปิดตามขวางบริเวณกึ่งกลางของติ่งเพศเป็นทางออกของไข่ ส่วนปลาตัวผู้ติ่งเพศยาวเรียวปลายแหลม ช่องเปิดมีเพียงช่องเดียวที่ปลายติ่ง สำหรับสีสันนั้นปลาตัวผู้ส่วนใหญ่บริเวณใต้คางจะมีสีคล้ำเป็นสีแดงอมม่วง ตัวเมียส่วนใหญ่ใต้คางมีสีเหลือง แต่มีบ้างเช่นกันที่พบว่าตัวผู้อาจมีสีเหลืองที่ใต้คาง จึงไม่ควรใช้สัญลักษณ์สีในการแยกเพศ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ของปลานิลนับว่าเป็นที่น่าสนใจมาก โดยเริ่มจากการที่ปลาตัวผู้เริ่มขุดหลุมตื้นๆ ที่ก้นบ่อคอยเฝ้ารักษาอาณาเขตของมัน เมื่อมีปลาตัวเมียว่ายน้ำมาใกล้ๆ ตัวผู้ก็จะเข้ามาเกี้ยวพาราสี และนำตัวเมียมายังรังหรือหลุมที่ขุดไว้ หลังจากการเกี้ยวพาราสีได้สักครู่ปลาก็จะผสมพันธุ์ ไข่ที่ผสมแล้วก็จะตกลงสู่กันรัง ซึ่งปลาตัวเมียจะรีบอมไว้ในปากและว่ายน้ำหนีไปทันที เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวแล้ว ลูกปลาก็ยังคงอยู่ในปากแม่ โดยจะออกมาหากินข้างนอกบ้างจนกว่าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ จึงจะออกจากแม่ (สุกัญญา นิลมณีและอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

1) การคัดพ่อแม่พันธุ์ ปลานิลเป็นปลาที่เจริญพันธุ์เร็ว โดยเจริญพันธุ์เมื่ออายุได้ 3-4 เดือน สำหรับพ่อแม่พันธุ์ ที่ใช้เพาะควรมีขนาดไม่ต่ำกว่า 50 กรัม สำหรับเพศเมียและเพศผู้ โดยเลือกปลาที่แข็งแรงตัวเมียมีท้องค่อนข้างอูม ติ่งเพศพอง

2) วิธีการเพาะ การเพาะปลานิลจะให้ผลและมีประสิทธิภาพ จะต้องเอาใจใส่ และมีการจัดการที่ดี เช่น การเตรียมบ่อ การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ การเพาะพันธุ์ การตรวจสอบลูกปลา และการอนุบาลลูกปลา เป็นต้น การเพาะพันธุ์ปลานิลแบ่งออกเป็น 3 วิธีคือ

2.1) การเพาะพันธุ์ปลานิลในบ่อดิน บ่อเพาะปลานิลควรเป็นบ่อรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีเนื้อที่ตั้งแต่ 50-1,600 ตารางเมตร สามารถเก็บน้ำได้ระดับสูง 1 เมตร บ่อควรมี เชิงลาดตามความเหมาะสม เพื่อป้องกันดินพังทลาย และมีชานบ่อกว้าง 1-2 เมตร ถ้าเป็นบ่อเก่าก็ควรวิดน้ำและสาดเลนขึ้น ตกแต่งภายในบ่อให้ดินแน่น ใส่โล่ติ๊นกำจัดศัตรูของปลา อัตราส่วนใช้โล่ติ๊นแห้ง 1 กิโลกรัมต่อปริมาตรของน้ำ 100 ลูกบาศก์เมตร โรยปูนขาวให้ทั่วบ่อ 1 กิโลกรัมต่อพื้นที่บ่อ 10 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ใส่ปุ๋ยคอกแห้ง 300 กิโลกรัมต่อไร่ ตากบ่อทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วันจึงเปิด

หรือสูบน้ำเข้าบ่อผ่านผ้ากรองหรือตะแกรงตาถี่ให้มีระดับสูงประมาณ 1 เมตร การใช้บ่อดินเพราะปลานิลจะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอื่นๆ เพราะเป็นบ่อที่มีลักษณะคล้ายคลึงธรรมชาติ และการผลิตลูกปลานิลจากบ่อดินจะได้ผลผลิตสูง ต้นทุนต่ำกว่าวิธีอื่น

2.2) การเพาะพันธุ์ปลานิลในบ่อซีเมนต์ ก็สามารถใช้ผลิตลูกปลานิลได้ รูปร่างของบ่อจะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าหรือรูปกลมก็ได้ มีความลึกประมาณ 1 เมตร พื้นที่ผิวน้ำตั้งแต่10 ตารางเมตรขึ้น ทำความสะอาดบ่อและเติมน้ำทีกรองด้วยผ้าไนล่อนหรือมุ้งลวดตาถี่ให้มีระดับน้ำสูงประมาณ 80 เซนติเมตร ถ้าใช้เครื่องเป่าลมช่วยเพิ่มออกซิเจนในน้ำ จะทำให้การเพาะเลี้ยงปลานิลด้วยวิธีนี้ได้ผลดียิ่งขึ้น

2.3) การเพาะปลานิลในกระชัง ขนาดของกระชังที่ใช้ประมาณ 5-8-2 เมตร วางกระชังในบ่อดินหรือในหนองบึง อ่างเก็บน้ำให้พื้นกระชังอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำ ประมาณ 1 เมตรใช้หลักไม้ 4 หลัก ผูกตรงมุม 4 มุม ยึดปากและพื้นกระชังให้แน่นเพื่อให้กระชังขึงตึง การเพาะปลานิลด้วยวิธีนี้มีความเหมาะสมที่จะใช้ผลิตลูกปลา ในกรณีที่เกษตรกรไม่มีที่ดินก็สามารถเลี้ยงปลาได้ เช่น เลี้ยงในอ่างเก็บน้ำ หนองบึง และลำน้ำต่างๆ เป็นต้น (สุกัญญา นิลมณีและอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

2.2.6 คุณภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการเลี้ยงปลาในบ่อคือคุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาซึ่งจำแนกตามปัจจัยที่สำคัญได้ดังนี้

1) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงปลาควรมีสมบัติดังนี้ หากอุณหภูมิสูงปริมาณออกซิเจนจะละลายได้น้อยและน้ำที่อุณหภูมิต่ำปริมาณออกซิเจนละลายได้สูง ปกติปลาจะชอบอาศัยอยู่ที่อุณหภูมิของน้ำระหว่าง 25-32 องศาเซลเซียสความขุ่น

2) ความขุ่นของน้ำตามธรรมชาติเกิดจากสารอินทรีย์ เช่น ตะกอน โคลนตม ซึ่งเป็นอุปสรรค์ต่อการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ ความขุ่นของน้ำจะประกอบด้วยแพลงก์ตอนสีเขียว หากมีมากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อปลาได้

3) ค่าพีเอช น้ำที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.5-8.5 เหมาะแก่การเลี้ยงปลามากที่สุด หากน้ำเป็นกรดมากปลาจะไม่อยากกินอาหาร ความต้านทานโรคต่ำหากน้ำเป็นด่างมากปลาจะตาย

4) คาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปคาร์บอนไดออกไซด์จะมาจากการหายใจของพืชและสัตว์และการสลายอินทรีย์สาร ปลาจะหลีกเลี่ยงไม่อยู่น้ำที่ระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงเกินกว่า 5 ppm

5) ก๊าซแอมโมเนียมเป็นก๊าซที่มีพิษต่อปลามาก ซึ่งเกิดจากเศษอาหารที่หลงเหลืออยู่และมูลต่างๆ ที่ปลาขับถ่ายออกมาทำให้ปลาเบื่ออาหาร เคลื่อนไหวช้าลง ก๊าซไข่เน่าเกิดจากการ

หมักหมม และการย่อยสลายอินทรีย์สารในก้นบ่อจะทำให้เกิดปัญหานี้ถ้าให้อาหารปริมาณมาก แม้มีก๊าซไข่เน่าเพียง 0.1-0.2 ppm ก็อาจทำให้ปลาตายได้ (Wikipedia (a), 2008)

2.2.7 สมบัติและนิสัย

ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จากการศึกษาพบว่าปลานิลทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในล้านส่วน ทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ดีในช่วง 6.5-8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสพบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนัก ทั้งนี้เป็น เพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน (Wikipedia (a), 2008)

2.3 เชื้อ *Aeromonas hydrophila*

เชื้อ *A. hydrophila* ก่อให้เกิดโรคที่เป็นเชื้อที่อยู่ใน Family Vibrionaceae ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำจืดชนิดต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะปลา แบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นตรง เคลื่อนที่โดยใช้ flagellum ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน พบได้ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในปลาน้ำจืดโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งที่มีปริมาณสารอินทรีย์ ซึ่งเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคต่างๆในปลา เช่น เกิดการตกเลือดในปลา มีการตกเลือดรอบปาก เป็นต้น กลไกการเกิดโรคในปลาเนื่องจากเชื้อ จะเป็นการติดเชื้อในระบบภายในตัวของปลา โดยที่เชื้อจะเข้าทางปาก แต่ในกรณีที่ผิวหนัง หรือเหงือกถูกทำลายและเป็นแผลเชื้อก็สามารถเข้าทางนารี แล้วเชื้อก็จะไปเพิ่มจำนวนภายในร่างกาย และบริเวณที่เข้าไป ต่อจากนั้นเชื้อก็จะแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด โดยที่อาการของโรคแบ่งออกเป็น อาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน อาการรุนแรงแบบเฉียบพลันที่มีลักษณะท้องมาน บวมน้ำ และแผลตื้น แบบเป็นแผลเรื้อรังตามตัวและแบบไม่แสดงอาการของโรค การวินิจฉัยโรค สมารถทำได้โดยการเพาะเชื้อจากปลาที่ปรากฏอาการติดเชื้อ โดยทำการแยกเชื้อโดยทำการเพาะแยกเชื้อจากแผล และอวัยวะเป้าหมายทำการเพาะเชื้อโดยการ Streak บน RS-medium หรืออาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาบ่มไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ส่วนการรักษาใช้ oxytetracycline ผสมในอาหารในอัตรา 55 มิลลิกรัม/ปลา 1 กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 10 วัน (สุกัญญา นิลมณีและอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

1) ลักษณะของอาการที่พบ เช่น โรคเกล็ดพอง และ โรคตกเลือด

2) รูปร่างของเชื้อ *A. hydrophila*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นตรง ขนาดความยาวโดยทั่วไปประมาณ 1.0-1.5 ไมครอน (2-4.5 เท่าของความกว้าง) เคลื่อนที่โดยใช้หนวด (Flagellum) ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างสารสี DNA ประกอบด้วย Gaunine-Cytosine 57-63 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีแคปซูล ลักษณะโคโลนี

โดยทั่วไปมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวล มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ บางครั้งพบเป็นสายสั้นๆ

3) สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *A. hydrophila*

ลักษณะเหมือนกับแบคทีเรียใน Family Enterobacteraceae เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆ ไปสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารและให้พลังงานได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุดประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ช่วง pH 5.5-9.0 สามารถผลิต extracellular enzymes ได้แก่ hemolysins, cytotoxins, enterotoxin, gelatinase, โดยการถ่ายทอดทาง plasmid ทำให้เพิ่มความรุนแรงของเชื้อมากขึ้น ส่วนปฏิกิริยาต่างๆ ที่ทดสอบพบว่า cytochome oxidase test ให้ผลบวก สามารถสร้าง indole ได้ เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ หรือ Rimler-Shotts medium ซึ่งใช้แยกเชื้อนี้ออกจากเชื้อแบคทีเรีย

4) การแพร่กระจายของเชื้อ *A. hydrophila*

เชื้อ *A. hydrophila* ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Motile aeromonas disease พบได้ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในปลาน้ำจืดโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน น้ำกร่อยที่มีความเค็มไม่เกิน 10 ppm ในดินและปลาทะเล เช่น ปลาไน ปลาไหลทะเล ปลาทอง ปลาช่อน ปลาดุกด้าน ปลาสวาย ปลากระดี่ ปลาในตระกูลปลานิล ปลา Golden shiners ปลา Channel catfish นอกจากนั้นยังพบในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ สัตว์เลื้อยคลาน เช่น งู จระเข้ ตะพาบน้ำ สัตว์เลือดอุ่น เช่น วัว ควาย มนุษย์ เป็นต้น (สุกัญญา นิลมณีและอุบลรักษ์ คำแผ่น, 2552)

2.4 เชื้อ *Flavobacterium columnare*

F. columnare เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคคอลัมนาริส (columnaris) ซึ่งปกติจะพบในปลาน้ำจืดโดยพบเชื้อที่ผิวหนัง เหงือกและหางของปลา เมื่อปลาติดเชื้อก่อโรคนี้แล้วจะทำให้ปลาตายจำนวนมากพร้อมกัน ลักษณะอาการของโรคที่พบคือ ปลามีแผลกร่อนสีเทาขาวหรือสีเหลืองที่ผิว มีอาการตัวด่างที่ผิว เหงือกส่วนปลายเป็นแผลและมีสีซีด ครีบและหางเป็นแผลกร่อน โดยจะพบโรคระบาดจากการติดเชื้อนี้มากในช่วงที่มีความแปรปรวนของสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันมากในรอบวัน เช่น ในฤดูฝนหรือรอยต่อระหว่างฤดู สาเหตุของการติดเชื้อของปลามาจากหลายปัจจัย อาทิเช่น การเพาะเลี้ยงปลาในเชิงการค้าที่มีการเลี้ยงแบบหนาแน่นมากไป การขนส่งหรือเคลื่อนย้ายปลาและวิธีการที่ใช้ในการขนส่งหรือเคลื่อนย้ายปลาก่อให้เกิดแผลภายนอกของปลา การติดเชื้อนั้นติดได้ในปลาทุกขนาด โดยเชื้อ *F. columnare* จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มแรกที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ทำให้ที่ทำให้เกิดแผลกร่อนที่เหงือก ผิว ครีบและหาง โดยการติดเชื้อจะเกิดแบบเป็น

ขั้นเป็นตอน ซึ่งปกติแล้วโรคติดเชื้อเกิดจากเชื้อโรคที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม แต่ปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อคือ อุณหภูมิของน้ำที่แปรปรวน ระดับของออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ต่ำลง น้ำมีปริมาณแอมโมเนียและสารอินทรีย์ในปริมาณสูง เป็นต้น สิ่งเหล่านี้ทำให้ปลาเกิดการติดเชื้อ *F. columnare* ก่อนต่อจากนั้นจุดที่ติดเชื้อจะมีเชื้อราติดเชื้อซ้ำเข้าไปอีกครั้ง (Kubilay และคณะ, 2008)

F. columnare เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหาร Cytophaga agar มีการเจริญเล็กน้อยหรือไม่เจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหาร Cytophaga agar มีสีเหลือง ผิวหน้าแห้ง ขอบเป็น Rhizoid แพร่กระจายจับติดกับผิวหน้าอาหารวุ้น เซลล์มีรูปร่างผอมยาวขนาด 0.4 x 2-20 μm อยู่รวมเป็นกลุ่มก้อนมีลักษณะเหมือนมัดของฟางที่เป็นท่อนยาว (haystucks) สามารถเคลื่อนที่หรือไถลไปบนผิวหน้าอาหาร (ชาญณรงค์ รอดคำ, 2550)

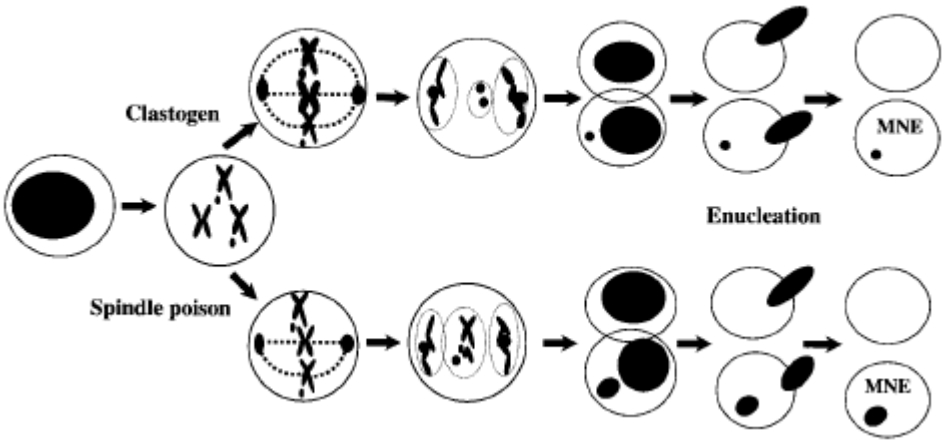
สมบัติทางชีวเคมีของ *F. columnare* มีดังนี้ ผลิตกรดได้จากคาร์โบไฮเดรต (กลูโคส, แลกโตส, กาแลกโตสและซูโครส) ไม่รีดิวซ์ไนเตรต ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์และเอนไซม์คาตาเลสได้แบบ weak ย่อยโปรตีนที่เป็นเจลาติน เคซีน อัลบูมิน ผลิตเม็ดสี Flexirubin โดยเมื่อหยดสารละลาย 20% KOH ลงบนโคโลนีเชื้อจะพบว่าโคโลนีสีเหลืองจะเปลี่ยนสีส้มน้ำตาล (Nilsen และคณะ, 2011)

2.5 การทดสอบไมโครนิวเคลียส (Micronucleus test)

ไมโครนิวเคลียสเป็น cytoplasmic chromatin-containing bodies ที่เกิดจากการที่ชิ้นส่วนของโครโมโซมหลุดออกมาจากโครโมโซมใหญ่ในการแบ่งตัวระยะ แอนาเฟส และไม่กลับไปเชื่อมกับโครโมโซมที่หลุดขาดออกมาในระหว่างการแบ่งเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากสารพันธุกรรมได้รับความเสียหายจากสารเคมีหรือสารก่อกลายพันธุ์บางอย่าง การทดสอบไมโครนิวเคลียสจึงเป็นการทดสอบว่าเซลล์หรือสัตว์ทดลองได้รับสารก่อกลายพันธุ์ที่ไปทำลายโครโมโซมให้ขาดหลุดออกจากกันได้หรือไม่ ซึ่งวิธีการทดสอบไมโครนิวเคลียสเป็นวิธีการที่ทดสอบความเสียหายของโครโมโซมที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบผลของสารเคมีต่อความเสียหายของโครโมโซมชนิดนี้ ในการตรวจนับจำนวนไมโครนิวเคลียสพัฒนาวิธีการนับจากวิธีการของ Fenech et al. (2003) โดยที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไมโครนิวเคลียสจะต้องเล็กกว่านิวเคลียสปกติ 3 เท่า และการย้อมใช้วิธีเดียวกันกับการย้อมนิวเคลียสปกติ (Ali และคณะ, 2008)

โครโมโซมของเม็ดเลือดแดงเกิดความเสียหายกลายเป็นไมโครนิวเคลียสนั้น เป็นผลมาจากการที่ร่างกายสัมผัสกับสารเคมีที่ก่อกลายพันธุ์ ทำให้การแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟสมีชิ้นส่วนของโครโมโซมหลุดขาดออกมา เมื่อเข้าสู่ระยะทีโลเฟสจึงเห็นเป็นโครโมโซมขนาดเล็กลอยอยู่ใน

ไซโตพลาสซึมด้วย (Sato และ Tomita, 2001) การทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาจึงสามารถบ่งชี้ถึงการที่ปลาได้รับสารก่อกลายพันธุ์ได้ ซึ่งการใช้ปลาบ่งชี้การเป็นสารก่อกลายพันธุ์ในน้ำเป็นวิธีที่ง่าย เชื่อถือได้ มีความไวในการทดสอบ และเป็นวิธีที่ไม่ขึ้นกับลักษณะทาง karyotype (Ali และคณะ, 2008)



ภาพที่ 2.1 การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงโดยสารก่อกลายพันธุ์ (Sato และ Tomita, 2001)

เนื่องจากปลาสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีมลพิษ ปลาจึงเป็นสัตว์ทดลองที่เหมาะสำหรับใช้ทดสอบไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากการได้รับสารก่อกลายพันธุ์ หรือสารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เราสามารถใช้ปลาเป็นสัตว์ทดลองเรื่องสารพิษทดแทนสัตว์มีกระดูกสันหลังได้ จึงใช้ปลาในการจัดพิสูจน์หาสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมและสารก่อมะเร็งในมนุษย์ได้ (Al-Sabti และ Metcalfe, 1995)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ทศพร เรืองรักษ์ลิขิต (2547) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก คือ แบคทีเรียกรดแลกติกจากทางเดินอาหารปลากระพงขาว พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลกติก 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* แบคทีเรียก่อโรคในปลาได้ เมื่อใช้แบคทีเรียกรดแลกติกผสมในอาหารปลาเพื่อเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว พบว่า มีแบคทีเรียกรดแลกติก 1 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* และเสริมการเจริญของปลากระพงขาวได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกดังกล่าวมีลักษณะทางชีวโมเลกุลใกล้เคียงกับ *Weissella* sp.

ธีราภรณ์ มอไธสงและคณะ (2548) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิลอายุ 5 เดือน พบว่า ปลานิลที่ได้รับวัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* KKU 44002 ผสมในอาหารเป็นเวลาตั้งแต่ 6 สัปดาห์ขึ้นไป มีค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (Relative percent survival) สูงกว่าปลากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ตรี วาทกิจ (2549) ได้ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลานิล คือ เชื้อกลุ่ม *A. hydrophila* ในการแปรรูปปลานิลแบบรมควันแบบเย็น พบว่าหลังจากรมควันแบบเย็นแล้วจะมีเชื้อกลุ่มดังกล่าวเหลือรอดร้อยละ 36-47

นิลุบล กิจอันเจริญและคณะ (2549) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล โดยใช้วัคซีนเตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* KKU 44002 พบว่าปลานิลที่ได้รับวัคซีนมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์และอัตราการรอดสัมพัทธ์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เสาวนิต ทองพิมพ์และคณะ (2549) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากปลานิล น้ำและโคลนบริเวณกระชังเลี้ยงปลานิล จากอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว ข้าว อาหารหมักดอง รวมได้แบคทีเรีย 119 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. caviae, A. hydrophila* และ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ CRIT5 และยังเสริมการเจริญของปลานิลได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกดังกล่าวมีคุณลักษณะตรงกับ *Lactobacillus plantarum*

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (2549) รายงานว่า เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะเป็นสารเสริมชีวนะ โดยสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญและพัฒนาการของสัตว์ (เออโกสเตอรอล (ergosterol) สเตอรอล (sterol) ไขมัน ไกลโคไลปิด และพอลิเปปไทด์บางชนิด) สร้างเอนไซม์ที่ช่วยเสริมการย่อยอาหารของสัตว์ให้ดีขึ้น และช่วยจับกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์ ส่วนเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอิสระ วิตามินบีรวม แร่ธาตุ และกรดไขมันที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์หลายชนิด ผนังเซลล์ส่วนที่เป็นเบตากลูแคนใช้เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกัน

Ghosh และคณะ (2004) พบว่าลูกปลา Rohu ขาดเอนไซม์ที่จำเป็นบางชนิดหรือมีปริมาณเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไม่เพียงพอ จึงได้คัดแยกและใช้ *Bacillus circulans* จากไส้ลูกปลา Rohu เพื่อหมักอาหารลูกปลาเป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ก่อนนำไปเป็นอาหารปลา และพบว่า อาหารลูกปลาที่หมักเป็นเวลา 5 วันทำให้ปลามีอัตราการเจริญและอัตราการรอดสูงสุดร้อยละ 98 และ 98.33 ตามลำดับ

Naviner และคณะ (2006) ได้ตรวจจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อ *Aeromonas* spp. จากลำไส้ปลาเทร้าสายรุ้ง พบว่าปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ปลาในฤดูที่อากาศเย็นจะมีน้อยกว่า 10^2 CFU/g ในฤดูที่อากาศอบอุ่นจะพบระหว่าง 10^5-10^6 CFU/g ผลการทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Aeromonas* spp. 19 ไอโซเลตจากลำไส้ปลา พบว่าทุกไอโซเลตสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะหลายชนิด คือ สเตรปโตมัยซิน ออกซิเตตราซัยคลิน คลอแรมเฟนิคอล และฟลอร์เฟนิคอล

Richard และคณะ (2006) รายงานถึงผลการทดลองใช้โพรไบโอติกที่จำหน่ายทางการค้าเป็นอาหารเสริมในลูกปลานิล พบว่า ปลานิลที่เสริมด้วยโพรไบโอติกมีจำนวนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุม อัตราการรอดจะสูงขึ้นเมื่อให้โพรไบโอติกเสริมเป็นเวลา 39-63 วัน ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโต ไลโซไซม์ total serum immunoglobulin, complement และระดับของแอนติบอดีต่อเชื้อ *Streptococcus iniae*

Wache และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของการใช้ยีสต์ *S. cereviseae* 2 สายพันธุ์เสริมในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงลูกปลา rainbow trout พบว่า สายพันธุ์ *S. boulardii* ทำให้มีอัตราการเจริญเร็วขึ้น

Song และคณะ (2006) ศึกษาผลของการใช้ *Clostridium butyricum* เป็นโพรไบโอติกในอาหารปลา *Miichthys miiuy* ที่ระดับความเข้มข้น 10^3, 10^5, 10^7 และ 10^9 CFU/g พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/g ทำให้ระดับ IgM ในซีรัมและเมือกที่ผิวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเข้มข้น10^7 CFU/g ทำให้ lysozyme activity ในซีรัมสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/g ทำให้ phenoloxidase activity ในซีรัมและอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Haddar และคณะ (2007) รายงานว่า *B. licheniformis* B5 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ bacitracin ได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 1.5% glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน มี 0.05% glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน เสริมด้วย 1.43% inorganic phosphate, 0.0025% magnesium sulfate ที่ pH เริ่มต้นเป็น 7.5 บ่มที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ได้ผลผลิตของ bacitracin เป็น 174.2 units mL^{-1} สารปฏิชีวนะ bacitracin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม β-hemolytic type *Streptococcus* ได้

Abdel-tawwab และคณะ (2008) ได้ศึกษาถึงการใช้ยีสต์ผลิตขนมปังเป็นโพรไบโอติกต่อการเจริญและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลานิล โดยเสริมยีสต์ในอาหารปกติในระดับ 0.0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 และ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารในลูกปลานิล เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* เข้าทางช่องท้องปลานิล สังเกตเป็นเวลา 10 วัน พบว่า การใช้ยีสต์

1.0–5.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ช่วยให้การเจริญ การใช้อาหาร และการเปลี่ยนอาหารเป็นโปรตีนดีขึ้น การตายของปลาลดลงเมื่อเพิ่มระดับของการใช้ยีสต์เสริมในอาหาร โดยมีอัตราการตายต่ำสุดเมื่อใช้ยีสต์ที่ระดับ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

Bagheri และคณะ (2008) ได้ทดลองใช้โพรไบโอติกที่จำหน่ายทางการค้ากลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นอาหารเสริมในลูกปลาเทร้าสายรุ้งที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ T1: 4.8×10^{8}, T2: 1.2×10^{9}, T3: 2.01×10^{9}, T4: 3.8×10^{9}, T5: 6.1×10^{9} CFU/g และกลุ่มควบคุมคือไม่ให้โพรไบโอติก พบว่าอัตราการรอดสูงมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

Kubilay และคณะ (2008) รายงานว่าสามารถคัดแยกเชื้อ *F. columnare* ได้จากลูกปลาเทร้าสายรุ้งที่เลี้ยงในบ่อคอนกรีตซึ่งมีอาการของโรคคอลัมนาริส คือ มีอาการตัวด่าง มีแผลสีเหลืองที่ปลายเหงือก โดยคัดแยกเชื้อได้จากส่วนของหมวกไต ตับและเหงือกของปลาที่ป่วย

Merrifield และคณะ (2009) ศึกษาผลของการใช้ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *Enterococcus faecium* เป็นโพรไบโอติกในอาหารปลาเทร้าสายรุ้ง หลังจากให้อาหารแล้วเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ประสิทธิภาพการเจริญ อัตราการแลกเนื้อ การเกาะติดของโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร และสุขภาพของปลาดีขึ้น การใช้ *B. subtilis* ผสมกับ *B. licheniformis* นั้นส่งเสริมให้อัตราการกินอาหาร อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นโปรตีนสูงขึ้น การใช้โพรไบไอติกเสริมในอาหารระดับสูงทำให้ในระบบทางเดินอาหารพบโพรไบโอติกในปริมาณมากขึ้นด้วย การให้อาหารเสริมเป็นโพรไบโอติก *Bacillus* เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ *E. faecium* ทำให้ระดับของเม็ดเลือดขาวชนิด leucocyte สูงขึ้น ซึ่งทั้งหมดนี้บ่งชี้ได้ว่าช่วยให้ปลาเทร้าสายรุ้งมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้มากขึ้น

Pooramini และคณะ (2009) รายงานถึงผลของการใช้ *S. cerevisia var. elipsoidous* เป็นโพรไบโอติกในอาหารลูกปลาเทร้า โดยให้ยีสต์เป็นอาหารเสริมในระดับร้อยละ 1, 5 และ 10 หลังจากนี้ 25 วัน ไม่พบว่ามีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของลูกปลาเทร้า แต่มีผลต่ออัตราการรอดและอัตราการใช้อาหารของลูกปลาเทร้า ในการทดลองใช้น้ำมันปลาเป็นอาหารเสริมในลูกปลาเทร้าเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์ พบว่า การใช้ยีสต์ร้อยละ 5 เป็นอาหารเสริมทำให้ปลาเทร้ามีอัตราการเจริญจำเพาะ น้ำหนักตัว และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นโปรตีนสูงมากกว่า

Zhou และคณะ (2009) ได้ศึกษาถึงผลของการบำบัดน้ำในบ่อเลี้ยงปลานิลด้วยการใช้โพรไบโอติกเติมลงในน้ำ และศึกษาผลของอัตราการเจริญและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยแบ่งปลานิลก่อนวัยเจริญพันธุ์จำนวน 360 ตัวออกเป็น 4 กลุ่มการทดลองให้โพรไบโอติกชนิดที่แตกต่างกันในระดับความเข้มข้น 1×10^{7} CFU/mL ทุกๆ 2 วัน พบว่า การใช้ *B. coagulans* B16 (T-2) และ *Rhodopseudomonas palustris* G06 (T-3) ทำให้ปลานิลมีน้ำหนัก

สุดท้าย น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว และอัตราการเจริญจำเพาะ มากกว่าการใช้ *B. subtilis* B10 (T-1) และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

Lara-Flores และคณะ (2010) ศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติกยีสต์ร้อยละ 0.1 ผสมในอาหารลูกปลานิลเปรียบเทียบกับการแบคทีเรียผสมคือ *Streptococcus faecium* และ *Lactobacillus acidophilus* และกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารปกติในปริมาณเท่ากัน ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มการทดลองที่ใช้ยีสต์เป็นโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญสูงสุด กล่าวได้ว่ายีสต์เป็นโพรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของปลานิล

Vigneshwaran และคณะ (2010) รายงานว่า *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ keratinase ได้สูง โดยมีค่า enzyme activity ที่ 10.76 U/mL เมื่อใช้ผงขนไก่เป็น substrate ที่ 60 องศาเซลเซียสที่ pH 7.0 ซึ่งมีประโยชน์โดยจะช่วยเปลี่ยนองค์ประกอบของเคอราตินจาก ขนไก่ให้เป็นโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และช่วยบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

Noudeh และคณะ (2010) รายงานว่า *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น glycolipids, lipopeptides, fatty acids, polysaccharide–protein complexes, peptides, phospholipids and neutral lipids ซึ่งทำหน้าที่ได้หลายอย่างในอุตสาหกรรมอาหาร น้ำมัน เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยา เช่น emulsification, phase separation, wetting, foaming และ surface activity และในการบำบัดน้ำเสียสารลดแรงตึงผิวยังช่วยกำจัดสารอันตรายออกไปจากแหล่งน้ำ *B. licheniformis* ผลิตสาร lipopeptide ที่เรียกว่า Lichenysinซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพ แต่พบว่า *B. licheniformis* ทำให้เม็ดเลือดแดงในอาหาร Blood agar แตกได้ซึ่งเหมือนกับสารลดแรงตึงผิวทั่วไปที่มีผลต่อเม็ดเลือดแดงด้วย

Songsiriritthigul และคณะ (2010) รายงานว่า *B. licheniformis* strain DSM8785 สามารถผลิตเอนไซม์ endochitinase (ChiA) ที่เปลี่ยนไคติน (b-1,4 linked N-acetylglucosamine) ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ที่พบมากในปีกแมลง เปลือกกุ้งและปูเป็นสารที่มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น โดย เอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนไคตินในรูปคอลลอยด์ให้เป็น N-acetyl glucosamineและ chitobiose ที่ pH 4.0, 6.0, 9.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสารทั้งสองนี้ใช้ในอุตสาหกรรมยา

Akcan (2011) ได้ศึกษาถึงการใช้เชื้อ *B. licheniformis* ATCC 12759 ผลิตเอนไซม์ extracellular β-galactosidase ซึ่งใช้ประโยชน์ในอุตสหกรรมนมและผลิตภัณฑ์เนยแข็งโดยพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ที่ปริมาณ 2.508.3 U/mg ในอาหารที่มี 0.01% L-tryptophane ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง