บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 ชนิดจุลินทรีย์

1) *A. hydrophila* TISTR 1321 จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

2) *S. cerevisiae* (Fermipan Brown; Instant Dry Yeast) จากบริษัท AB Mauri Vietnam จำกัด ประเทศเวียดนาม

3) *B. brevis* UBRU4 จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

4) *B. lichenifomis* TISTR 004 จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

3.1.2 อาหารปลา เบอร์ 895 บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จังหวัดสมุทรสาคร

3.1.3 นมถั่วเหลืองยูเอชทีรส Original classic จากบริษัท แลกตาซอย จำกัด จังหวัดปราจีนบุรี

3.1.4 น้ำตาลทราย จากบริษัท สหเรือง จำกัด จังหวัดมุกดาหาร

3.1.5 ข้าวเจ้า บริษัทข้าวแสนดี จำกัด อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

3.1.6 ยาปฏิชีวนะ Poly-Oph (ใน 1 มิลลิลิตรประกอบด้วย Neomycin 2 mg polymycin B 5,000 Units และ Gramicidin 0.025 mg)

3.1.7 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 รายการสารเคมี

ชื่อสารเคมี	**บริษัท**	**ประเทศ**
Crystal violate	Asia Pacific specialty chemical Limited	Australia
Iodine	Riedel–de Haun	Germany
Phenol red	BDH Chemicals Ltd.	Germany
Safranine	Scientific Promotion Co. Ltd.	Germany
KOH	Sigma Chemical Co.	USA
Alpha neptol	Sigma Chemical Co.	USA

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Paradimethylaminobenzaldehyde	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
Malachite green	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
D-glucose	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
Ethyl alcohol	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
NaOH	Carlo Erba Reagenti Ltd.	Italy
NaOH	Carlo Erba Reagenti Ltd.	Italy
NaCl	Carlo Erba Reagenti Ltd.	Italy
Oxytetracycline	Merck	Germany
Discs drug of Penicillin, Kanamycin and Streptomycin	Oxoid Ltd.	UK
Formaldehyde	VWR International Ltd.	UK
Petrolium ether	JT Baker	USA
Giemsa staining	Ajax Finechem Pty Ltd.	Australia
Bromocresol purple	Ajax Finechem Pty Ltd.	Australia

3.1.8 เครื่องมือ

ตารางที่ 3.2 รายการเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
Larminar Air Flow	BIO-II-A	Telstar, Spain
pH meter	CG8421/14PH	Schott, Germany
Balance	BP211S	Sartorius, Germany
Incubator	INCUCELL 404	MMM Medcenter, Germany
Autoclave	HVE-50	Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
Vortex Mixer	G-560E	Scientific Industries, INC, USA
Hot Air Oven	600	Memmert, Germany
Anaerobic Jar	Cat No. 134441-2	Boekel Scientific Pricycler, Philadelphia

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
Shaking Water Bath	28L-M, BH281	PolyScience, USA
Spectrophotometer	4001/4	Thermo Spectronic, USA
Centrifuge	1205 ROTOFIX 32	Hettich Zentrifugen, Germany
Vacuum Oven	19	LabCare, USA

3.1.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.3 รายการอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัท	ประเทศ
Plate Count Agar (PCA)	Merck	Germany
Blood Agar Base	High Media	India
Tryptic Soy	High Media	India
Nutrient Broth	High Media	India

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 สถานที่เก็บตัวอย่างปลานิลกระชัง 5 แห่ง และข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มเป้าหมายที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเป็นผู้เลี้ยงปลานิลในเขตจังหวัดอุบลราชธานี

Site I:ฟาร์มปลากระชัง แม่น้ำมูล บ้านบุ่งกาแซว ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

Site II:ฟาร์มปลากระชัง แม่น้ำมูล บ้านคูเดื่อ ตำบลแจระแม อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

Site III:ฟาร์มปลากระชัง แม่น้ำมูล บ้านท่าลาด ตำบลห้วยขะยุง อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

Site IV:ฟาร์มปลากระชัง แม่น้ำชี บ้านท่าไห ตำบลท่าไห อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี

Site V:ฟาร์มปลากระชังลูกฟาร์มของ บริษัท เบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด บริเวณเขื่อนสิรินธร บ้านสุขสำราญ ตำบลนิคมลำโดมน้อย อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี

ข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มเป้าหมายและการเก็บตัวอย่างประกอบด้วย ชื่อที่อยู่ของผู้เลี้ยงปลาหรือผู้ประสานงาน ช่วงเดือนที่เก็บตัวอย่างปลา จำนวนและน้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่เก็บตัวอย่าง

ลักษณะของปลาที่มีการติดเชื้อจากแบคทีเรีย โดยเน้นเก็บตัวอย่างปลานิลที่มีอาการติดเชื้อโรคระบาดจากแบคทีเรีย คือ ปลาตกเลือดตามตัว ท้องบวมมีเลือดปน มีแผลหลุม ตาโปน มีรอยด่างสีเทาตามลำตัว ครีบ และที่ส่วนหัว มีการตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ บ้างตามขอบรอยด่าง ลำตัวเปื่อยเป็นแผลตะกอนสีเหลือง และปลามีเมือกมาก

เมื่อได้ตัวอย่างปลาแล้วบรรจุปลาตัวอย่างในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แช่น้ำแข็ง และขนส่งปลาไปยังห้องปฏิบัติการภายในวันนั้นเพื่อคัดแยกเชื้อ

3.2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare*

คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ที่จะใช้เป็นเชื้อก่อโรคตัวทดสอบจากตัวอย่างปลานิลที่มีลักษณะ มีรอยด่างสีเทาตามลำตัว ครีบ และที่ส่วนหัว มีการตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ บ้างตามขอบรอยด่าง ลำตัวเปื่อยเป็นแผลตะกอนสีเหลือง และปลามีเมือกมาก

1) การเตรียมตัวอย่างเพื่อคัดแยกเชื้อ

นำตัวอย่างปลานิลจากฟาร์มปลาเป้าหมายที่มีลักษณะรอยโรคดังกล่าว มาเพื่อคัดแยกเชื้อจากผิวที่มีรอยแผลตะกอนสีเหลือง และเหงือกที่เปื่อยเป็นแผล โดยหากปลายังไม่ตายทำให้ปลาสลบด้วยการรมอีเทอร์ ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อสวอบเชื้อที่ผิวซึ่งเป็นแผลมีตะกอนสีเหลือง และที่เหงือกที่เปื่อยเป็นแผล นำไปเพาะเชื้อโดยดัดแปลงวิธีการของ Kubilay และคณะ (2008) โดยใช้อาหาร Cytophaga agar ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Poly-Oph 4 มิลลิลิตรต่อลิตร ด้วยวิธี spread plate บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน เลือกโคโลนีที่มีสีเหลือง ขอบไม่เรียบ ไปคัดแยกให้บริสุทธิ์ต่อ 7-10 ครั้ง

2) จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีเหลืองที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับผลการจัดจำแนกเชื้อ *F. columnare* ทางชีวเคมีของ Kubilay และคณะ (2008) และ AFS-FHS Blue Book (2007)

3.2.3 การคัดแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกบาซิลลัส

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาคัดแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสที่มี 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มแรกเป็นตัวอย่างปลานิลที่มีลักษณะรอยติดเชื้อโรคระบาดจากแบคทีเรีย Site I, Site II, Site III, Site IV และ Site V คือ ปลา ตกเลือดตามตัว ท้องบวมมีเลือดปน มีแผลหลุม ตาโปน มีรอยด่างสีเทาตามลำตัว ครีบ และที่ส่วนหัว มีการตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ บ้างตามขอบรอยด่าง ลำตัวเปื่อยเป็นแผลตะกอนสีเหลือง และปลามีเมือกมาก

กลุ่มที่สองเป็นเชื้อที่คัดได้จาก ไส้ปลานิล อาหาร ดิน และแบคทีเรียบำบัดน้ำโดยเก็บตัวอย่างกลุ่มที่สองในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม ปี 2554 ดังนี้

(1) ไส้ปลานิล โดยเป็นปลานิลกระชังอายุ 3 เดือน จำนวน 10 ตัว จากฟาร์มปลา บ้านท่าลาด ตำบลท่าลาด อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี และอายุ 2 เดือนจำนวน 10 ตัว จากฟาร์มปลาบ้านท่าไห ตำบลท่าไห อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี

(2) อาหาร มีดังนี้

- ขนมโมจิ ขนมลูกเต๋า ขนมเปี๊ยะ ขนมปังไส้ถั่ว เต้าเจี้ยวตราเด็กสมบูรณ์ กะปิตราเรือใบ กะปิชลบุรี ถั่วเหลือง จากห้างสรรพสินค้ายงสงวน เซฟแลนด์ สาขาชยางกูร ถนนชยางกูร ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- ขนมกะหรี่ปั๊บ จากตลาดสดสิทธิธรรม ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

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

- ถั่วแผ่น จากชุมชนราชธานีอโศก ตำบลคำน้ำแซบ อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี

(3) ดิน

ดินสวน

- บ้านเลขที่ 78/1 บ้านโพนเมือง ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัดอุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 75 ถนนเจริญราษฎร์ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 15/4 ถนนชยางกูร ตำบลขามใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 19 ถนนนิคมสายกลาง ตำบลในเมือง อำเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- สวนอาหาร ท กุ้งเผา ถนนชยางกูร ตำบลขามใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- บ้านเลขที่ 138 หมู่ 9 บ้านเวียงเหนือ ตำบลเวียงเหนือ อำเภอกันทรลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ

ดินโคลน

- อ่างเก็บน้ำห้วยม่วง ถนนชลประทาน-ท่าบ่อ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- สระซิงเกอร์ หลังอาคาร 5 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เลขที่ 2 ถนนราชธานี ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- สระน้ำบริเวณศูนย์ศิลปะวัฒนะธรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เลขที่ 2 ถนนราชธานี ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

- ห้วยพอก หมู่ 1 บ้านโพนเมือง ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัดอุบลราชธานี

- ห้วยมะแซว หมู่ 13 บ้านโพนเมือง ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัดอุบลราชธานี

- ห้วยวังโดน หมู่ 15 บ้านโพนเมือง ตำบลโพนเมือง อำเภอเหล่าเสือโก้ก จังหวัดอุบลราชธานี

(4) แบคทีเรียบำบัดน้ำ (Aquariuma) ซึ่งเป็นเชื้อผสมของแบคทีเรีย 18 สายพันธุ์จากบริษัท Aquariuma ประเทศสหรัฐอเมริกา

1) การเตรียมตัวอย่างจากทั้งสองกลุ่มเพื่อคัดแยกเชื้อโดยดัดแปลงวิธีการของ เกศินี จันทรโสภณและคณะ (2553) ดังนี้

-กลุ่มตัวอย่างที่เป็นปลา หากปลายังไม่ตายทำให้ปลาสลบด้วยการรมอีเทอร์ ฉีดล้างผิวนอกด้วย 70% แอลกอฮอล์ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดเปิดท้องปลาและแยกเอาเฉพาะระบบทางเดินอาหารปลาบรรจุถุงพลาสติกปลอดเชื้อ นำไปต้มในน้ำ 100 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที เพื่อคัดแยกหาเชื้อกลุ่มบาซิลลัสด้วยวิธี cross streak บนอาหาร Tryptic soy agar และ Tryptic soy agar ที่เติม 6.5% NaCl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่แตกต่างกันไปคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อ 7-10 ครั้ง จากนั้นนำไปทดสอบการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้อาหาร Blood agar

-กลุ่มตัวอย่างที่อาหาร ดินและแบคทีเรียบำบัดน้ำ โดยนำตัวอย่างแต่ละอย่างไปผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:1 ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รอให้เย็นถ่ายเชื้อไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไป streak บนอาหาร Tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดแยกเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ 7-10 ครั้ง นำไปเก็บไว้ในอาหาร Nutrient agar slant

2) การคัดเลือกโพรไบโอติกบาซิลลัสตามวิธีการของเกศินี จันทรโสภณและคณะ (2553)

2.1) นำบาซิลลัสที่คัดแยกได้และทำให้บริสุทธิ์แล้วมาคัดเลือกหาเชื้อที่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธี Spot on lawn โดยนำเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 ที่อายุ 24 ชั่วโมงในอาหาร Trypic soy broth จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Tryptic soy agar ถ่ายเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากอาหารแข็ง อายุ 24 ชั่วโมง ทับลงบนรอยที่ขีดลากเชื้อ *A. hydrophila* แบบ Spot on lawn บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจเลือกเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณใสบนรอยที่ขีดลากเชื้อ *A. hydrophila* ได้ ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

2.2) นำบาซิลลัสที่ยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้มาคัดเลือกหาเชื้อที่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *F. columnare* ด้วยวิธี Spot on lawn โดยนำเชื้อ *F. columnare* ที่อายุ 7 วันในอาหาร Cytophaga broth จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Cytophaga agar ถ่ายเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากอาหารแข็ง อายุ 24 ชั่วโมง ทับลงบนรอยที่ขีดลากเชื้อ

F. columnare เอาไว้แบบ Spot on lawn บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน ตรวจเลือกเชื้อที่สามารถสร้างโซนใสบนรอยที่ขีดลากเชื้อ *F. columnare* ได้ ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. columnare* ได้

2.3) นำบาซิลลัสที่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ได้ด้วยวิธี Spot on lawn มาทดสอบการต่อต้านการเจริญของเชื้อทั้งสองด้วยวิธี Agar well diffusion โดยนำสารละลายเชื้อบาซิลลัสในอาหาร Tryptic soy broth ที่อายุ 24 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.2 ไมครอน แบบปลอดเชื้อพักไว้ นำเชื้อ *A. hydrophila* หรือ *F. columnare* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวตามสภาวะของแต่ละเชื้อจำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ใช้ cork borer เจาะอาหารที่ขีดลากเชื้อแล้วให้เป็น well นำส่วนใสของเชื้อบาซิลลัสที่กรองไว้ 15 ไมโครลิตร ใส่ใน well นำไปบ่มตามสภาวะของแต่ละเชื้อ ตรวจเลือกเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณใสจาก well ในอาหารที่ขีดลากด้วยเชื้อ *A. hydrophila* หรือ *F. columnare* ได้ ซึ่งแสดงว่าส่วนใสของเชื้อนั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* หรือ *F. columnare* ได้ และจัดจำแนกเชื้อนั้นในขั้นตอนต่อไป

3.2.4 การจัดจำแนกโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากระบบทางเดินอาหารปลานิล (เกศินี จันทรโสภณ และคณะ, 2553)

จัดจำแนกโพรไบโอติกบาซิลลัสโดยวิธีทางกายภาพและชีวเคมีในระดับ species จากการตรวจลักษณะสัณฐานวิทยา การติดสีแกรม รูปร่างและตำแหน่งของสปอร์ ความไวต่อสารปฏิชีวนะ Penicillin, Kanamycin และ Streptomycin กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ความสามารถในการเคลื่อนที่ การย่อยแป้ง การรีดิวซ์ไนเตรท การสร้างกรดและแก๊สจากกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 4 และ 6.5

3.2.5 ศึกษาการขยายเชื้อโดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจากวิธีการของเกศินี จันทรโสภณและคณะ, 2553)

1) ศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้

1.1) นำบาซิลลัสที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้เป็นกล้าเชื้อ

1.2) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ถ่ายกล้าเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Tryptic soy broth ในขวด blue top ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตรบ่มที่ 25,

30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธี Dilution plate count

1.3) ศึกษา pH ที่เหมาะสม ถ่ายกล้าเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร Tryptic soy broth ที่อยู่ในขวด blue top ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ของอาหารแต่ละชนิดให้เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธี Dilution plate count

2) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ ในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลว

2.1) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของนมถั่วเหลืองยูเอชที (แลกตาซอย) ที่ใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยละลายนมถั่วเหลืองในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15, 20, 25 และ 100 บรรจุขวด blue top ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ถ่ายกล้าเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในอาหารที่ศึกษา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธี Dilution plate count

2.2) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้อาหารปลานิลเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยละลายอาหารปลานิลชนิดเม็ดในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 บรรจุขวด blue top ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ถ่ายกล้าเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในอาหารที่ศึกษา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญ เติบโตโดยใช้วิธี Dilution plate count

3) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ในอาหารดัดแปลงแบบอาหารแข็ง

3.1) ศึกษาความชื้นที่เหมาะสมของอาหารข้าวสุก

เตรียมอาหารแข็งคือข้าวเจ้าหุงสุกที่เติมอาหารปลาที่เหมาะสมจาก 2.2 และเติมน้ำกลั่นให้ข้าวหุงสุกมีความชื้นที่ระดับร้อยละ 60, 65, 70 และ 75 บรรจุอาหารข้าวสุกในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 100 กรัม ถ่ายกล้าเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้จำนวน 10 มิลลิลิตรลงในอาหารที่ศึกษา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธี Dilution plate count

3.2) ศึกษาปริมาณเกลือที่เหมาะสมของอาหารข้าวสุก

เตรียมอาหารแข็งคือข้าวเจ้าหุงสุกที่เติมอาหารปลาที่เหมาะสมจาก 2.2 เติมน้ำกลั่นให้ข้าวหุงสุกมีความชื้นที่เหมาะสมจาก 3.1 และเติมเกลือที่ระดับร้อยละ 1, 2, 3, และ 4 บรรจุอาหารข้าวสุกที่ปรับปริมาณเกลือแล้วในขวด blue top ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 100 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นถ่ายเฉพาะเชื้อ *Bacillus* จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ศึกษา บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยใช้วิธี Dilution plate count

3.2.6 ศึกษาอายุการเก็บรักษาเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจากวิธีการของเกศินี จันทรโสภณ และคณะ, 2553)

เพาะเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้ในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลวและอาหารดัดแปลงแบบอาหารแข็งในสภาวะที่เหมาะสม นำเชื้อไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกันและตรวจวัดจำนวนเชื้อที่เวลาต่างๆ ดังนี้

1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี Dilution plate count ที่เวลา 0, 3, 7, 14 และ 30 วัน

2) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี Dilution plate count ที่เวลา 0, 3, 7, 14 และ 30 วัน

3.2.7 ศึกษาผลของการใช้เชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้และ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลระดับห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงจากวิธีการของเกศินี จันทรโสภณและคณะ, 2553)

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 40-50 กรัม จำนวน 450 ตัว จากฟาร์มปลานิลเครือข่ายบริษัทซีพี อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี นำไปเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เพื่อให้ปลาปรับตัวในถังพลาสติกขาวขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร ระดับน้ำ 50 เซนติเมตร ให้อากาศโดยใช้แอร์ปั๊มให้มากพอ เปลี่ยนน้ำโดยเหลือน้ำเดิมไว้ร้อยละ 30 ทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้นโดยแบ่งให้ 2 เวลาคือ เวลา 8.00 น และ 16.00 น เป็นเวลา 14 วัน แบ่งปลานิลเป็น 3 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 50 ตัว ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร ระดับน้ำ 50 เซนติเมตร ให้อากาศโดยใช้แอร์ปั๊มให้มากพอ เปลี่ยนน้ำโดยเหลือน้ำเดิมไว้ร้อยละ 30 ทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้น เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 ให้อาหารปลา

กลุ่มทดลองที่ 2 ให้อาหารปลา + 10^9 CFU *S. cerevisiae* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 ให้อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

การทดลองเลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วันและตรวจวัดค่า อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง ดังนี้

1) อัตราการเจริญ (ดัดแปลงวิธีการของ Song และคณะ, 2006)

ชั่งน้ำหนักปลาเพื่อตรวจวัดอัตราการเจริญดังนี้

1.1) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่อวันหรือ Average daily growth (ADG)

$$ADG = (Wt - Wi) / t$$

เมื่อ Wi คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยต่อตัวก่อนทดลอง Wt คือ น้ำหนักปลาเฉลี่ยต่อตัวหลังการทดลอง

t คือ จำนวนวันที่ทดลอง โดยมีหน่วยเป็น กรัมต่อตัวต่อวัน

1.2) อัตราการแลกเนื้อหรือ Feed conversion ratio (FCR)

FCR = น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมดเฉลี่ยต่อตัวต่อวัน / (Wt –Wi)

2) อัตราการรอด

นับจำนวนปลาที่รอดชีวิตในแต่ละซ้ำของแต่ละกลุ่มการทดลอง นำมาคำนวณหาอัตราการรอดดังนี้

$$\text{อัตราการรอด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่รอดชีวิตในแต่ละซ้ำ x 100}}{\text{จำนวนปลาที่ใช้ทดลองในแต่ละซ้ำ}}$$

3) ค่าทางโลหิตวิทยา ประกอบด้วย ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นหรือค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเกล็ดเลือด ปริมาณเม็ดเลือดขาวและร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte

นำปลามาทำให้สลบด้วยการรมอีเทอร์ เก็บตัวอย่างเลือดปลาโดยใช้เข็มเบอร์ 21 เก็บเลือดบริเวณ caudal vein และแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 นำเลือดใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวหรือหลอด heparinized tube และส่งไปตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ปริมาณเกล็ดเลือด และปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยใช้เครื่อง Flow-cytometer (บริษัท อุบล อาร์ ไอ เอ จำกัด สาขาอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี)

ส่วนที่ 2 ทำการสเมียร์แบบฟิล์มบาง ทิ้งให้แห้งในบรรยากาศปกติ 24 ชั่วโมง ฟิกรอยสเมียร์ ด้วยเมทานอล 10 นาที ย้อมด้วยสีจิมซา (10% Giemsa (v/v) staining) ตรวจหาร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte โดยนับจากเม็ดเลือดขาวจำนวน 200 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x และคำนวณเป็นร้อยละจากเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

ส่วนที่ 3 นำเลือดมาใส่ในหลอดปลอดเชื้อโดยให้ได้เลือด 1 มิลลิลิตร ทิ้งเลือดให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำเข้าตู้เย็นอีก 24 ชั่วโมง แยกเอาเฉพาะซีรัมไปเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้วิเคราะห์แอนติบอดีไตเตอร์

4) ร้อยละของการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง (ดัดแปลงจาก Ali et al, 2008)

นำสไลด์เลือดแบบฟิล์มบางมาตรวจนับการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง โดยตรวจหาจากเม็ดเลือดแดงจำนวน 2,000 เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x และคำนวณเป็นร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่เกิดโมโครนิวเคลียส

3.2.8 ศึกษาผลของการใช้ *S. cerevisiae* เป็นโพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลานิลในกระชังระดับภาคสนาม

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 40~50 กรัม จำนวน 9,000 ตัว จากฟาร์มปลานิลเครือข่ายบริษัทซีพี อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี นำไปเลี้ยงในแม่น้ำชี ขนาดกระชัง 3x6x3 เมตร ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้นโดยแบ่งให้ 2 เวลาคือ เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. เป็นเวลา 7 วัน แบ่งปลานิลเป็น 2 กลุ่มการทดลองๆ 3 ซ้ำๆ ละ 1,500 ตัว เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) ให้อาหารปลา

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

เลี้ยงปลาเป็นเวลา 120 วันและตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญ ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง (3.2.7)

3.2.9 ศึกษาผลของการใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลระดับห้องปฏิบัติการ

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 40~50 กรัม จำนวน 180 ตัว จากฟาร์มปลานิลเครือข่ายบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี นำไปเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เพื่อให้ปลาปรับตัวในถังพลาสติกขาวขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร ระดับน้ำ 50 เซนติเมตร ให้อากาศโดยใช้แอร์ปั๊มให้มากพอ เปลี่ยนน้ำโดยเหลือน้ำเดิมไว้ร้อยละ 30 ทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้นโดยแบ่งให้ 2 เวลาคือ เวลา 8.00 น. และ 16.00 น. เป็นเวลา 14 วัน แบ่งปลานิลเป็น 3 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว ในถังแสตนเลส 200 ลิตร ระดับน้ำ 50 เซนติเมตร ให้อากาศโดยใช้แอร์ปั๊มให้มากพอ เปลี่ยนน้ำโดยเหลือน้ำเดิมไว้ร้อยละ 30 ทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้น 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) อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

การทดลองเลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วันและตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญ ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง

3.2.10 ศึกษาการต่อต้านเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี Challenge test ของการใช้ *Bacillus* sp. UBRU22 เป็นโพรไอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลระดับห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงจากวิธีการของเกศินี จันทรโสภณและคณะ, 2553)

ใช้ปลานิลจาก 3.2.9 ทั้ง 3 กลุ่มการทดลองมาทดสอบการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ดังนี้

1) เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองก่อนทำ Challenge test เพื่อแยกเอาเฉพาะซีรัมไปตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

2) วัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ (ดัดแปลงจาก Kituncharuin, 2006; Mohanty et al., 2007) ดังนี้

2.1) เตรียมแอนติเจน โดยเพาะเลี้ยง *A. hydrophila* ในอาหาร Tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยง *F. columnare* ในอาหาร Cytophaga broth บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส 7 วัน นำเชื้อทั้งสองมาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำให้เป็นสารละลายโดยใช้ 0.85% NaCl จากนั้นทำให้เชื้อตายโดยเติมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ร้อยละ 35 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร นาน 60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง มาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำเป็นสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ที่ 10^7 CFU/mL ในสารละลาย 0.85% NaCl และทดสอบการตายของเชื้อโดยนำไปเพาะในอาหารและสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงปกติ โดยเมื่อครบตามกำหนดเพาะเชื้อจะต้องไม่มีการเจริญของเชื้อใดๆ

2.2) การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรัมของปลานิลตัวอย่าง โดยวิธี Microtiter plate agglutination technique ซึ่งเป็นการวัดระดับการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนเป็นแผ่นระหว่างแอนติเจน *(A. hydrophila* และ *F. columnare)* กับแอนติบอดีในซีรัมของปลานิลตัวอย่างที่มีการเจือจางแบบ Serially twofold dilution ใน 96 well microtiter plate ค่าแอนติบอดีไตเตอร์อ่านจากส่วนกลับของระดับความเจือจางสุดท้ายของซีรัมใน Microtiter plate สุดท้ายที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา (Minimal positive agglutinin) โดยนำมาอ่านเป็นค่าของ Log ฐาน 2 ($Log_2 N$, เมื่อ N เป็นส่วนกลับของ Microtiter plate สุดท้ายที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา)

3) เตรียมเชื้อทดสอบ โดยเพาะเลี้ยง *A. hydrophila* ในอาหาร Tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำ *A. hydrophila* มาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำเป็นสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ที่ 10^9 CFU/mL ในสารละลาย

0.85% NaCl และเพาะเลี้ยง *F. columnare* ในอาหาร cytophaga broth บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส 7 วัน นำเชื้อทั้งสองมาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำเป็นสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ที่ 10^9 CFU/mL ในสารละลาย 0.85% NaCl

4) ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ในปลานิลแบบ Challenge test โดยนำเชื้อทั้งสองผสมอย่างละเท่ากันไปฉีดให้ปลานิลแต่ละกลุ่มทดลองแบบ Intraperitoneal ในปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักต่อตัว 100 กรัม

5) หลังการทำ Challenge test 7 วัน นับจำนวนปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองที่เหลือรอดเพื่อคำนวณอัตราการรอด

6) เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองหลังทำ Challenge test 7 วัน ตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง และค่าแอนติบอดีไตเตอร์

3.2.11 ศึกษาผลของการใช้เชื้อบาซิลลัสที่คัดเลือกได้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลระดับภาคสนาม

ใช้ปลานิลน้ำหนักประมาณ 30-40 กรัม จำนวน 1,000 ตัว จากฟาร์มปลานิลเครือข่ายบริษัทซีพี อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี นำไปเลี้ยงในกระชังโดย แบ่งปลานิลออกเป็น 3 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 100 ตัว ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้น เลี้ยงปลาให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้โพรไบโอติก ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 ให้อาหารปลา (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มทดลองที่ 2 ให้อาหารปลา + 10^9 CFU *B. licheniformis* TISTR 004 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 ให้อาหารปลา + 10^9 CFU *Bacillus* sp. UBRU22 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

เลี้ยงปลาเป็นเวลา 21 วันและตรวจวัดค่า อัตราการเจริญ อัตราการรอด ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง

3.2.12 การศึกษาการต่อต้านเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี Challenge test ระดับภาคสนาม

ใช้ปลานิลจาก 3.2.11 ที่มีสุขภาพดีจำนวน 30 ตัว ต่อกลุ่มการทดลอง ทดสอบการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* ดังนี้

1) เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองก่อนทำ Challenge test เพื่อแยกเอาเฉพาะซีรัมไปตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์

2) เตรียมเชื้อทดสอบ โดยเพาะเลี้ยง *A. hydrophila* ในอาหาร Tryptic soy broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำ *A. hydrophila* มาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำเป็นสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ที่ 10^{12} CFU/ml ในสารละลาย 0.85% NaCl และเพาะเลี้ยง *F. columnare* ในอาหาร Cytophaga broth บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส 7 วัน นำเชื้อทั้งสองมาปั่นล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที โดยล้าง 3 ซ้ำ ทำเป็นสารละลายที่มีปริมาณเซลล์ที่ 10^{9} CFU/ml ในสารละลาย 0.85% NaCl

3) ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* แบบ Challenge test โดยนำเชื้อทั้งสองผสมอย่างละเท่ากันไปฉีดให้ปลานิลแต่ละกลุ่มทดลองแบบ Intraperitoneal ในปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักต่อตัว 100 กรัม

4) หลังการทำ Challenge test 7 วัน นับจำนวนปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองที่เหลือรอดเพื่อคำนวณอัตราการรอด

5) เก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจากทุกกลุ่มการทดลองหลังทำ Challenge test 7 วัน ตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา การเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง และค่าแอนติบอดีไตเตอร์

3.2.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทดสอบแบบ Multi-way analysis of variance (MANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างทดสอบแบบ Duncan's new multiple rang test (DMRT)

3.2.12 ถ่ายทอดเทคโนโลยี

ถ่ายทอดเทคโนโลยีการขยายเชื้อและการใช้โพรไบโอติกในปลาเศรษฐกิจ โดยจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ การผลิตและใช้กล้าเชื้อโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลานิลแก่กลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในกระชัง ประกอบด้วยกลุ่มเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ 4 กลุ่มดังนี้

1) ฟาร์มปลากระชังแม่น้ำมูล ของนายเลอ ดายา บ้านบุ่งกาแซว ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

2) ฟาร์มปลากระชังลูกฟาร์มของ บริษัท เบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด ณ เขื่อนสิรินธร บ้านสุขสำราญ ตำบลนิคมลำโดมน้อย อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี (นายสัตวแพทย์พิศิษฐ์ สุภาพ ผู้ประสานงาน)

3) ฟาร์มปลาอนุบาลในบ่อดินของนายศักดินา นักรำ บ้านคำไฮ ตำบลคำไฮ อำเภอสำโรง จังหวัดอุบลราชธานี

4) ฟาร์มปลากระชังของนางพานทอง ทุมคำ บ้านท่าไห ตำบลท่าไห อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี

หลักสูตร เนื้อหาภาคทฤษฎี เป็นการให้ความรู้เกี่ยวกับโพรไบโอติก โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Aeromonas hydrophila* และ *F. columnare* เนื้อหาภาคปฏิบัติ เป็นการสาธิตวิธีการขยายเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก และอธิบายวิธีนำไปใช้เพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงธุรกิจ

ติดตามและประเมินผลหลังจากที่มีการทดลองใช้โพรไบโอติกในฟาร์มปลาจริงของกลุ่มเป้าหมายโดยใช้แบบประเมินผลการอบรมหลังการอบรมเชิงปฏิบัติการ และติดตามข้อมูลผลการใช้โพรไบโอติกบาซิลัสในการรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรียในฟาร์มปลาของกลุ่มเป้าหมาย โดยเก็บข้อมูลเป็นผลผลิตที่ได้หรือตัวเลขการตายของปลาเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเดิมที่ใช้หรือการใช้ยาปฏิชีวนะ และความต้องการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาของกลุ่มต่อไป