ภาคผนวก ก

สีย้อม และ สารเคมี

สีย้อม

1. สีย้อมแกรม

1.1 Crystal violet solution

Solution A		
Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol เข้มข้นร้อยละ 95	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสีจนละลายหมด

Solution B		
Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันแล้วกรอง

1.2 Gram's iodine solution

Iodine	1.0	กรัม
Potassium Iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

บด Iodine และ Potassium Iodine ผสมให้เข้ากันในโกรง (mortar) จนเป็นผงละเอียด แล้วใช้น้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร ล้างเอาส่วนผสมของ Iodine และ Potassium Iodineใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร

1.3 Safranin solution

Safranin	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Safranin ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 70 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

2. สีย้อม endospore

2.1 Malachite green

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายสีแล้วกรองแล้ว

2.2 Safranin solution

Safranin	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Safranin ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 70 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Ethanol เข้มข้นร้อยละ 70

95% ethanol	70	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร

2. Lugol's iodine

Iodine	5.0	กรัม
KI	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

3. Sulfanilic acid

Sulfanilic acid	0.008	กรัม
5 N acetic acid	10.0	มิลลิลิตร

4. Dimethy-alpha-napthylamine

alpha-napthylamine	0.05	กรัม
5 N acetic acid	10.0	มิลลิลิตร

5. alpha-napthylamine เข้มข้นร้อยละ 10

alpha-napthylamine	1.0	กรัม
ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95	10 .0	มิลลิลิตร

6. KOH เข้มข้นร้อยละ 20

KOH	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	10 .0	มิลลิลิตร

7. Hydrogen peroxide solution เข้มข้นร้อยละ 3

H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100.0	มิลลิลิตร

8. Nitrate test solution

Solution A

Sulphaniliic acid	0.8	กรัม
5 N Acetic acid	100.0	กรัม

ละลาย Sulphaniliic acid ลงใน5 N acetic acid โดยใช้ความร้อนช่วย

Solution B

Treta-methy-p-phenylenediamine hydrochloride	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Treta-methy-p-phenylenediamine hydrochloride ในน้ำกลั่น นำสารละลายใส่ขวดสีชาเก็บในตู้เย็น ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินจะไม่สามารถใช้ในการทดสอบได้

9. Voges-Proskauer test solution

Solution A

alpha-napthylamine	10.0	กรัม
Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95	100.0	มิลลิลิตร

Solution B

KOH	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic soy agar

Pepcreatic digest of casein USA	15.0	กรัม
Papaic digest of soy meal USA	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.3±0.2

2.Tryptic soy broth

Pepcreatic digest of casein USA	15.0	กรัม
Papaic digest of soy meal USA	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

3. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8-7.0

4. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

pH 6.8-7.0

5. Motility test medium

Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

pH 7.2±0.2

6. Nitrate broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potassium nitrate	1.0	กรัม

ปรับ pH 7.0 ก่อนบรรจุอาหารใส่หลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักแก๊สลงในหลอดอาหารในลักษณะคว่ำหลอด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

7. อาหารการสร้างกรดและแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส

$(NH_4)_2$ HPO_4	1.0	กรัม
KCI	0.2	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
Glucose	5.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่างๆ แล้วปรับ pH เป็น 7.0 ก่อนเติม Bromthymol blue ร้อยละ0.04 ลงไปเป็นอินดิเคเตอร์ สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินบรรจุอาหารใส่หลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักแก๊สลงในหลอดอาหารในลักษณะคว่ำหลอด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Starch agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Potato Starch	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0±0.2		

9. Blood agar

Beef extract	5.0	กรัม
Peptone	3.0	กรัม
NaCI	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายให้เข้ากันดีแล้วนำไปฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วเติมเลือดที่แยกไฟบรินออกแล้วลงไป 5-8% ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงจานเพาะเชื้อ

10. Sodium caseinate agar

Sodium caseinate	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$FeSO_4$	trace	
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0±0.2		

11. Mannitol salt agar

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
NaCl	75.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.4±0.2		

12. Voges-Proskauer test

การเตรียม VP broth

Peptone	9.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร แบ่งใส่หลอดขนาด 13×100 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่มีความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม VP reagent

VP-A naphthol เข้มข้นร้อยละ 5 ใน Ethylalcohol เข้มข้นร้อยละ 95 เตรียมจากสารละลาย alpha-naphthol ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ละลายใน ethylalcohol เข้มข้นร้อยละ 95

VP-B เตรียมจาก Potassium Hydroxide (KOH) เข้มข้นร้อยละ 40

VP-C เตรียมจาก Creatine ความเข้มข้นร้อยละ 0.3

13. การทดสอบการทนเกลือ

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

เตรียม Sodium chloride เข้มข้นร้อยละ 0, 5, และ 7 โดยละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. การหมักการย่อยน้ำตาล

Peptone	1.250	กรัม
NaCI	0.625	กรัม
Bromcresol purple	0.00025	กรัม
Sugar (Glucose/Lactose/Manitol)	1.250	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
pH 7.0±0.2		

15. Cytophaga agar

Tryptone	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Beef extract	0.2	กรัม
Sodium Acetate	0.2	กรัม
Agar	14.0	กรัม
Distillated water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วเติม Agar นำใบต้มจน Agar ใสหรือละลาย ปรับปริมาตรรวมเป็น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ flask แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารอุ่นอุณหภูมิประมาณ 45-50 เซลเซียส จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 10-15 มิลลิลิตร รอให้อาหารแข็งก่อนแล้วจึงนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ

เรื่อง

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทดแทนสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ

\

เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทดแทนสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ

โดย

ว่าที่ ร.ต.(หญิง) ดร. เกศินี จันทรโสภณและคณะ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

ร่วมกับ

บริษัทเบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด

ณ พื้นที่เพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจในกระชังและบ่อดินเขตจังหวัดอุบลราชธานี

ประจำปีงบประมาณ 2555

คำนำ

เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทดแทนสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อใช้ประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการให้แก่ กลุ่มผู้เลี้ยงปลาเศรษฐกิจในกระชังและบ่อดินในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นกลุ่มลูกฟาร์มของบริษัทเบทาโกรอุตสาหกรรม จำกัด โดยมีวัตถุประสงค์คือ ต้องการลด-เลิกการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ การอบรมนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง ผลของการใช้โพรไบโอติกบาซิลลัสที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารปลานิลและยีสต์ขนมปังต่อการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* (งบประมาณแผ่นดินปี 2555 มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี) โดยมีเนื้อหา 2 ส่วน คือ

ภาคบรรยาย ประกอบด้วย ที่มาและความสำคัญของการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจความหมายและความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับโพรไบโอติก และการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

ภาคปฏิบัติ ประกอบด้วย การเตรียม การขยายและเก็บรักษาหัวเชื้อบาซิลัสและยีสต์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในปลาเศรษฐกิจ

ทั้งนี้ เพื่อให้กลุ่มได้ใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจนำสิ่งที่ได้จากการอบรมครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการประกอบกิจการต่อไป

ว่าที่ ร.ต. (หญิง) ดร. เกศินี จันทรโสภณและคณะ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

ที่มาและความสำคัญของการใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ

ปลาน้ำจืดเป็นอาหารหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งของคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อประชากรเพิ่มจำนวนมากขึ้นปลาน้ำจืดจากธรรมชาติที่หาได้นั้นไม่เพียงพอต่อการบริโภค จึงมีการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจเพื่อให้ได้อาหารจากปลาเพิ่มขึ้น จากรายงานของสุพรม พวงอินทร์ (2555) พบว่า จังหวัดอุบลราชธานี มีผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีทั้งสิ้น 23,823 ราย จำนวน 29,500 บ่อ จำนวน 7,305 กระชัง ผลผลิตรวม 115,679.49 ตัน มูลค่า 570,277,870 บาท

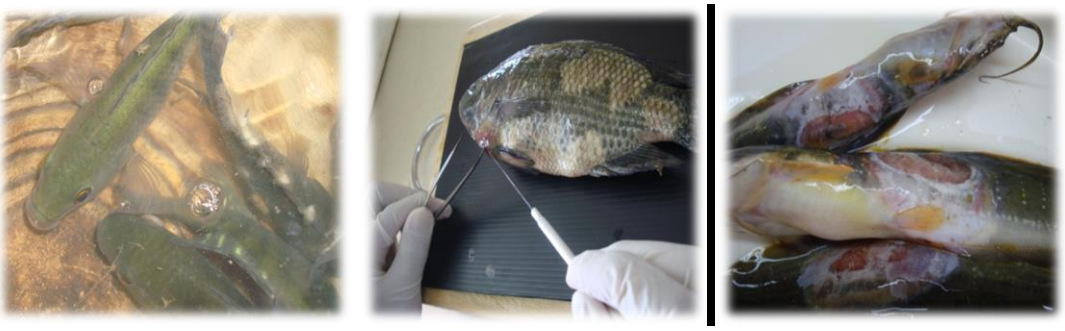
รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงปลาในกระชัง

รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงปลาในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน

การเพาะเลี้ยงปลาในกระชังเป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลตอบแทนสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในบ่อร้อยละ 30-40 แต่การเลี้ยงปลากระชังในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝนมีความเสี่ยงจากโรคระบาดที่เกิดจากแบคทีเรียซึ่งเป็นเชื้อเจ้าถิ่นในน้ำ คือแบคทีเรียรูปกลมและแบคทีเรียรูปท่อนสั้น ลักษณะของปลาที่ติดเชื้อคือ ปลาตกเลือดตามตัว ท้องบวมมีเลือดปน มีแผลหลุม เชื้อกลุ่มนี้ทนอุณหภูมิสูงได้ดี หากมีเชื้อกลุ่มนี้เหลือรอดในผลิตภัณฑ์อาหารจากปลาจะก่อโรคลำไส้อักเสบในผู้บริโภค (ตรี วาทกิจ, 2549)

รูปที่ 3 ลักษณะของปลาที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย (ท้องบวม ตกเลือด)

สำหรับฤดูที่มีน้ำหลาก หรือฤดูหนาว หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมมากในรอบวัน จะพบโรคระบาดที่ทำให้ปลาตายมากหรืออาจตายยกกระชัง คือมีรอยด่างสีเทาตามลำตัว ครีบ และที่ส่วนหัว มีการตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ บ้างตามขอบรอยด่าง ลำตัวเปื่อยเป็นแผลตะกอนสีเหลือง และปลามีเมือกมากเมื่อนำเมือกมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบแบคทีเรียรูปท่อนผอมยาว



รูปที่ 4 ลักษณะของปลาที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย (ตัวด่าง เป็นแผลตะกอนสีเหลืองคล้ายน้ำร้อนลวก)

ในประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อกลุ่มนี้ทั้งในลูกปลาขนาดเล็กและปลาขนาดใหญ่ การรักษาปลาที่ติดเชื้อของโรคระบาดจากแบคทีเรียนิยมใช้สารปฏิชีวนะผสมกับอาหารให้ปลากินติดต่อกัน 7 วัน แต่การใช้สารปฏิชีวนะเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์ก่อโรคเกิดการดื้อยา ต้องใช้ในปริมาณที่มากขึ้น และมีสารปฏิชีวนะตกค้างในผลผลิต นอกจากไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคแล้ว ยังสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายจนอาจถึงระดับที่ได้ผลตอบแทนไม่คุ้มทุนที่ลงไป จึงจำเป็นต้องหาทางเลือกใหม่ที่ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ

รูปที่ 4 สารปฏิชีวนะที่ใช้รักษาปลาที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับโพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต อาจเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ รา หรือสาหร่าย ที่มีผลต่อร่างกายด้วยการช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ผลิตสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และเพิ่มภูมิต้านทานของร่างกาย โพรไบโอติกที่มีการใช้ในมนุษย์และผู้บริโภคในประเทศไทยคุ้นเคยดีคือจุลินทรีย์แลกโตบาซิลัส สเตรปโตคอกคัส และบิฟีโอแบคทีเรียมในนมเปรี้ยวชนิดต่างๆ และโพรไบโอติกแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่อยู่ในข้าวหมาก เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพ หากเป็นโพรไบโอติกที่ใช้ในสัตว์น้ำนั้นนอกจากช่วยให้สัตว์มีการเจริญและสุขภาพดีแล้ว ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วย ซึ่งเมื่อน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นน้ำที่มีคุณภาพดีแล้วย่อมทำให้สัตว์น้ำนั้นแข็งแรงและต้านทานโรคได้มากขึ้นด้วย ดังนั้นการที่เกษตรกรใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์น้ำจะช่วยควบคุมและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยให้สัตว์ใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากขึ้น เพิ่มการเจริญเติบโต ความแข็งแรงและความต้านทานโรค ทำให้ได้ผลผลิตมากกว่าเดิม

การใช้โพรไบโอติกเพาะเลี้ยงปลา

มีงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศรายงานถึงการผสมโพรไบโอติกบาซิลลัสและ/หรือยีสต์ในอาหารปลาว่าให้ผลผลิตและความต้านทานโรคได้มากกว่าการใช้สารปฏิชีวนะในปลาหลายชนิด เช่น การใช้บาซิลัสในปลาคาร์พ (Ghosh et al., 2004) การใช้ยีสต์ในปลาเทร้าสายรุ้ง (Wache et al., 2006)

จากงานวิจัยของเกศินี จันทรโสภณและคณะ (2553) ได้ลองใช้เชื้อบาซิลัส UBRU4 ที่คัดแยกได้จากไส้ปลานิลผสมในอาหารเพาะเลี้ยงปลานิลที่มีการฉีดเชื้อโรคเข้าไปในตัวปลาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรค และพบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับบาซิลัสมีอัตราการรอดร้อยละ 100 ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกปลาตายหมด อย่างไรก็ตาม เชื้อโพรไบโอติกบาซิลัส UBRU4 ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแบบที่ทำให้ปลามีลักษณะตกเลือด ท้องบวม และตาโปนได้ แต่ยังไม่สามารถรักษาปลาที่ติดเชื้อก่อโรคแบบที่ปลามีลักษณะตัวด่างสีเทา มีแผลตะกอนสีเหลืองตามลำตัว เหงือก ครีบ และหางกร่อน และปลามีเมือกมาก ซึ่งพบอาการในลักษณะนี้มากในช่วงรอยต่อระหว่างฤดู และช่วงที่สิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงมากในรอบวัน ซึ่งเชื้อโรคกลุ่มนี้จะทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็วและจำนวนมาก

รูปที่ 5 การคัดแยกเชื้อโพรไบโอติกบาซิลัสจากไส้ปลาและทดลองใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา

ต่อมาเกศินี จันทรโสภณและคณะ (2555) ได้ทดลองใช้ยีสต์ขนมปังผสมในอาหารปลานิลเปรียบเทียบกับการใช้สารปฏิชีวนะ และพบว่าการใช้ยีสต์ขนมปังผสมในอาหารปลาจะช่วยให้ปลาเจริญเติบโตได้มากกว่ากลุ่มที่กินอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สำหรับการรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรียคณะผู้วิจัยได้ใช้เชื้อบาซิลัส UBRU22 ที่คัดแยกได้จากไส้ปลานิลที่มีการติดเชื้อก่อโรคดังกล่าว โดยผสมในอาหารเพาะเลี้ยงปลานิล จากนั้นจึงฉีดเชื้อโรคทั้งแบบที่ทำให้ปลาตกเลือด ท้องบวมผสมกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคแบบตัวด่าง ครีบ เหงือก และหากกร่อนเข้าไปในตัวปลาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ผลการทดลองพบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับบาซิลัส UBRU22 มีอัตราการรอด

ร้อยละ 93.33 ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกปลาตายหมด เพียงแต่พบว่า การใช้เชื้อโพรไบโอติกบาซิลัส UBRU22 ผสมในอาหารปลาจะไม่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลานิล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า กรณีที่ปลาไม่มีการตัดเชื้อโรคระบาด ควรใช้ยีสต์ขนมปังผสมในอาหารเพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลา แต่หากปลามีการติดเชื้อโรคระบาดจากแบคทีเรีย ควรใช้โพรไบโอติกบาซิลัส UBRU22 รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในปลาให้หายเสียก่อน จากนั้นจึงใช้ยีสต์ช่วยส่งเสริมการเจริญ ซึ่งวิธีนี้จะเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ ช่วยแก้ปัญหาความอ่อนแอของปลาที่เพาะเลี้ยง ทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น ทั้งยังเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมไปพร้อมกัน ที่สำคัญคือลดภาระค่าใช้จ่ายสารปฏิชีวนะ ลดความเสี่ยงของเกษตรกรกลุ่มผู้เลี้ยงปลาและผู้บริโภค และเป็นวิธีส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเข้าสู่มาตรฐานการปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดีสำหรับการผลิตสัตว์น้ำ (จี เอ พี)

รูปที่ 6 การใช้เชื้อโพรไบโอติกบาซิลัสจากไส้ปลาและทดลองใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา

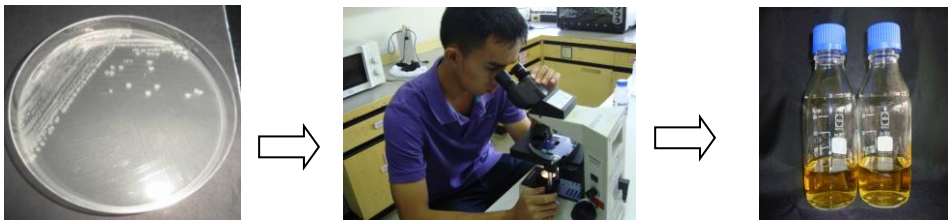
ภาคปฏิบัติ

การเตรียม การขยายและเก็บรักษาหัวเชื้อบาซิลัสและยีสต์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในปลาเศรษฐกิจ

1. การเตรียมและการขยายหัวเชื้อบาซิลลัส UBRU22

1.1) การเตรียมและการขยายหัวเชื้อในอาหารสังเคราะห์

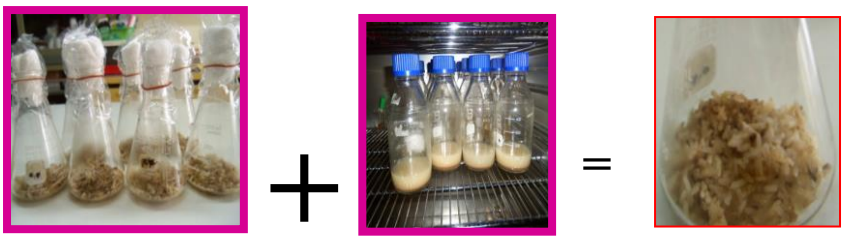
นำบาซิลลัส UBRU22 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แบบอาหารแข็งบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และนำเชื้อไปย้อมสีเพื่อตรวจสัณฐานของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อมีสัณฐานเหมือนกันหมดแสดงว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์จึงใช้เป็นกล้าเชื้อ ถ่ายเชื้อไปเพาะในอาหารสังเคราะห์แบบอาหารเหลวบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารดัดแปลง



1.2) การเตรียมและการขยายหัวเชื้อในอาหารดัดแปลงแบบอาหารแข็ง

1) เตรียมอาหารแข็ง โดยใช้ข้าวเจ้าเกษตร 920 กรัม อาหารปลาชนิดเม็ดแบบลอยน้ำ 50 กรัม เกลือแกง 30 กรัม เติมน้ำสะอาด 1,200 มิลลิลิตร หุงข้าวให้สุก รอจนข้าวเย็น คดข้าวใส่ขวดแก้ว 16 ออนซ์ จำนวน 100 กรัม ปิดฝาสนิท และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2) ถ่ายกล้าเชื้อบาซิลลัส UBRU22 จากอาหารสังเคราะห์ จำนวน 10 มิลลิลิตรลงในอาหารข้าวสุก บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ไว้ใช้ขยายเชื้อในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลว



1.3) การเตรียมและการขยายหัวเชื้อในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลว

1) ต้มน้ำสะอาด 2 ลิตร โดยเติมเกลือ 30 กรัมหรือ 2 ช้อนโต๊ะและน้ำตาล 60 กรัม หรือ 4 ช้อนโต๊ะ ในหม้อที่มีฝาปิดและปิดให้มิดชิด เมื่อน้ำเดือดยกลงจากเตาและนำหม้อน้ำไปหล่อโดยที่ปิดฝามิดชิดตลอดจนได้น้ำสุกเย็น

2) นำแอลกอฮอล์แบบเช็ดแผลทำสะอาดบริเวณโต๊ะถ่ายเชื้อโดยใช้สำลีเช็ดให้ทั่ว ใช้แอลกอฮอล์เช็ดมือ และเช็ดกรรไกร จากนั้นนำนมถั่วเหลืองยูเอชทีรสหวานมาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อที่กล่องโดยเน้นตรงส่วนที่จะตัดและบริเวณใกล้เคียงให้ทั่ว

3) ตัดกล่องนมและเทนมใส่ในถุงพลาสติกใหม่ (ปลอดเชื้อ) ขนาด 14x20 นิ้ว ตามด้วยน้ำเกลือผสมน้ำตาลที่ต้มสุกและเย็นแล้ว 2 ลิตรใส่ถุงขยายเชื้อ โดยเททั้งนมและน้ำอย่างรวดเร็วและไม่มีส่วนใดสัมผัสกับถุงด้านใน

4) ใช้ช้อนที่เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ตักเชื้อบาซิลลัส UBRU22 ในอาหารข้าวสุกประมาณ 2 ช้อนโต๊ะใส่ในถุงขยายเชื้อ

5) ใช้แอลกอฮอล์กลั้วสายยางเป่าลมให้สะอาด นำคอขวดสวมเข้ากับถุงขยายเชื้อต่อสายยางผ่านจุกสำลีที่ใช้ปิดคอขวดให้แน่นโดยให้สายยางยาวถึงก้นถุง ใช้สำลีอุดปลายสายยางเพื่อกรองอากาศก่อนต่อสายยางเข้ากับปั๊มลมและเป่าอากาศเข้าไปให้หัวเชื้อบาซิลลัส UBRU22 ที่อยู่ในถุงขยายเชื้อ และบ่มให้เชื้อในถุงขยายเชื้อเจริญเพิ่มจำนวนในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลว 24 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อที่ขยายเชื้อให้พร้อมใช้กับปลา

6) นำหัวเชื้อที่พร้อมใช้งานนี้ 1 ลิตรคลุกผสมกับอาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำจำนวน 20 กิโลกรัม โดยต้องผสมน้ำอีกครั้งก่อนคลุกผสมกับอาหารปลา และรอจนสารละลายที่มีเชื้อบาซิลลัส UBRU22 ซึมเข้าสู่เม็ดอาหารประมาณ 30 นาทีก่อนหว่านให้เป็นอาหารของปลาที่ติดเชื้อโรคระบาดจากแบคทีเรีย ใช้วิธีนี้วันละ 1 ครั้งโดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ไม่เกิน 7 วันปลาก็จะกลับหายจากโรคระบาดได้ใช้ต่อไปประมาณ 3 วัน จากนั้นจึงหยุดใช้

8) กรณีที่ไม่มีนม ให้ใช้อาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำ 100 กรัมต้มในน้ำสะอาด 2 ลิตรให้เดือดนาน 5-10 นาที ใช้น้ำเดือดปรับปริมาตรน้ำในหม้อให้อยู่ที่ 2 ลิตร ปิดฝาหม้อให้มิดชิดยกลงจากเตาและนำหม้อน้ำไปหล่อโดยที่ปิดฝามิดชิดตลอดเวลาจนได้น้ำอาหารปลาต้มสุกและเย็น เทใส่ในถุงพลาสติกใหม่ (ปลอดเชื้อ) ขนาด 14x20 นิ้ว โดยไม่มีส่วนใดสัมผัสกับถุงด้านในก่อนถ่ายหัวเชื้อบาซิลลัส UBRU22 ในอาหารข้าวสุกประมาณ 2 ช้อนโต๊ะ จากนั้นจึงเป่าอากาศเพื่อขยายหัวเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้นก่อนนำไปใช้ผสมอาหารปลาเพื่อรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรีย

2. การเตรียมและการขยายหัวเชื้อยีสต์

2.1) การเตรียมและการขยายหัวเชื้อในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลว

1) ต้มน้ำสะอาด 2 ลิตรโดยเติมน้ำตาล 120 กรัมหรือ 8 ช้อนโต๊ะ ในหม้อที่มีฝาปิดและปิดให้มิดชิด เมื่อน้ำเดือดยกลงจากเตาและนำหม้อน้ำไปหล่อโดยที่ปิดฝามิดชิดตลอดจนได้น้ำสุกเย็น

2) เทน้ำผสมน้ำตาลที่ต้มสุกและเย็นใส่ในถุงพลาสติกใหม่ (ปลอดเชื้อ) ขนาด 14x20 นิ้ว ซึ่งเป็นถุงขยายเชื้อ โดยเททั้งหมดรวดเร็วและไม่มีส่วนใดสัมผัสกับถุงด้านใน

3) ใช้ช้อนที่เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ตวงเชื้อยีสต์ 1/2 ช้อนชา ใส่ในถุงขยายเชื้อ

4) ใช้แอลกอฮอล์กลั้วสายยางเป่าลมให้สะอาด นำคอขวดสวมเข้ากับถุงขยายเชื้อต่อสายยางผ่านจุกสำลีที่ใช้ปิดคอขวดให้แน่นโดยให้สายยางยาวถึงก้นถุง ใช้สำลีอุดปลาย

สายยางเพื่อกรองอากาศก่อนต่อสายยางเข้ากับปั๊มลมและเป่าอากาศเข้าไปให้หัวเชื้อยีสต์ที่อยู่ในถุงขยายเชื้อเจริญเพิ่มจำนวนในอาหารดัดแปลงแบบอาหารเหลว 24 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อที่ขยายเชื้อให้พร้อมใช้กับปลา

5) นำหัวเชื้อยีสต์ที่พร้อมใช้งานนี้ 1 ลิตรคลุกผสมกับอาหารปลาชนิดเม็ดลอยน้ำจำนวน 20 กิโลกรัม โดยต้องผสมน้ำอีกครั้งก่อนคลุกผสมกับอาหารปลา และรอจนสารละลายที่มีเชื้อยีสต์ซึมเข้าสู่เม็ดอาหารประมาณ 30 นาทีก่อนหว่านให้เป็นอาหารของปลา ใช้วิธีนี้วันละ 1 ครั้งปลาจะเจริญเติบโตเร็วขึ้น แต่ถ้าปลาเริ่มมีอาการติดโรคให้หยุดใช้ยีสต์ และให้ใช้หัวเชื้อ UBRU22 ในการรักษา เมื่อปลาหายจากการติดโรคระบาดจึงกลับมาใช้ยีสต์อีก

เอกสารอ้างอิง

เกศินี จันทรโสภณ, ปริญญา มูลสินและสัมฤทธิ์ ประวิทย์ธนา. **ศักยภาพของการใช้และผลิต *Bacillus* sp. และ *Saccharomyces* sp. ที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารของปลานิลเป็นโพรไบโอติก.** สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2552.

เกศินี จันทรโสภณ, ปริญญา มูลสินและสัมฤทธิ์ ประวิทย์ธนา. **ศักยภาพของการใช้และผลิต *Bacillus* sp. และ *Saccharomyces* sp. ที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารของปลานิลเป็นโพรไบโอติก.** สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2553.

ตรี วาทกิจ. **การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในปลานิลหลังการเก็บเกี่ยวและการเหลือรอดของเชื้อกลุ่ม *Aeromonas hydrophila* ระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2549.

สุพรม พวงอินทร์. **สภาวะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจังหวัดอุบลราชธานี ปี 2555**. กลุ่มพัฒนาและส่งเสริมอาชีพการประมง สำนักงานประมงจังหวัดอุบลราชธานี กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (ออนไลน์) 2555. (อ้างเมื่อ 1 ตุลาคม 2555). จาก http://www.**fisheries.go.th**/fpo-ubon/web2/.

Ghosh K, Sen KS, Ray AK. Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (hanilton, 1822) spawn fed diets fermented with intestinal bacterium, *Bacillus circulans*. **Acta. Ichthyol. Piscat.** 2004. 34 (2): 155-165.

Waché Y, Françoise A, Gatesoupe F, Zambonino J, Gayet V, Labbé L, Quentel C. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. **Aquaculture.** 2006. 258: 470-478.

แบบประเมินผลการอบรม

เรื่อง

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทดแทนสารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจ

กรุณาประเมินผลการอบรมเชิงปฏิบัติการโดยการกาเครื่องหมาย √ ลงในช่องว่าง

1.การอบรมครั้งนี้ช่วยให้มีความรู้เพิ่มขึ้นเพียงใด

..... …… …….. …….. ……..

มากที่สุด มาก เฉยๆ น้อย น้อยที่สุด

2.หลังการอบรมครั้งนี้ต้องการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาทดแทนสารปฏิชีวนะหรือไม่

..... …… …….. …….. ……..

ต้องการมากที่สุด ต้องการมาก เฉยๆ ไม่ต้องการ ไม่ต้องการมากที่สุด

3.ผู้เข้าอบรมมีความพึงพอใจต่อการอบรมครั้งนี้มากเพียงใด

..... …… …….. …….. ……..

มากที่สุด มาก เฉยๆ น้อย น้อยที่สุด

ขอบพระคุณมาก