รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปีงบประมาณ 2557

ผลของแบคทีเรียแลกติกชนิดต่างๆ ในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้สารอาหารและความต้านทานโรคในปลาดุกลูกผสม

Effect of Various Lactic Acid Bacteria Supplements on Growth Performances, Nutrients Utilization Efficiency and Disease Resistance in Hybrid Catfish

สุภฎา ดีรัฐนิคม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

กรกฎาคม 2558

คำรับรองคุณภาพ

รายงานวิจัยเรื่อง ผลของแบคทีเรียแลกติกชนิดต่างๆ ในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้สารอาหาร และความต้านทานโรคในปลาดุกลูกผสม

ผู้วิจัย **สุภฎา คีรีรัฐนิคม และอานุช คีรีรัฐนิคม**

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอรับรองว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว มีความเห็นว่าผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☑ ดี
- ☐ ปานกลาง
- ☐ พอใช้
- ☐ ต่ำ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรพันธุ์ เขมคุณาศัย)

ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา

7 กันยายน 2558

รหัสโครงการ 2557A10562009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของแบคทีเรียแลกติกชนิดต่างๆ ในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้สารอาหารและความต้านทานโรคในปลาดุกลูกผสม

Effect of Various Lactic Acid Bacteria Supplements on Growth Performances, Nutrients Utilization Efficiency and Disease Resistance in Hybrid Catfish

สุภฎา คีรีรัฐนิคม
อานุช คีรีรัฐนิคม

สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ ดำเนินการสำเร็จลุล่วงจากการสนับสนุนของคณะทำงานทั้งบุคลากร และนิสิตระดับปริญญาตรี และปริญญาโทของสาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และสิ่งแวดล้อม และสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* (TISTR 108), *Lactobacillus lactis* (TISTR 1464), *Lactobacillus plantarum* (TISTR 1465) ที่ระดับ $1x10^6$ CFU/g อาหารทดลอง ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสม(*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*)โดยเทียบกับอาหารทดลองชุดควบคุม และอาหารทดลองเสริมหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร (EM) และอาหารทดลองเสริมจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ โดยเลี้ยงปลาดุกลูกผสม ขนาด 1.94-1.96 กรัมต่อตัว ในบ่อพลาสติก ปริมาตรน้ำ 250 ลิตร 4 ซ้ำต่อชุดการทดลองเลี้ยงปลาเป็นเวลา 60 วัน ด้วยอาหารแต่ละชุดการทดลอง วันละ 2 ครั้ง ผลการทดลอง พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของปลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($P>0.05$) โดยในระยะเริ่มต้นการทดลอง ปลามีน้ำหนักเฉลี่ยในช่วง 1.95 ± 0.04 - 1.96 ± 0.06 กรัม จนกระทั่งวันที่ 60 ของการทดลอง พบว่าปลามีน้ำหนักเฉลี่ย 35.04 ± 1.47 – 36.52 ± 9.01 กรัมต่อตัว ค่าอัตราการแลกเนื้อมีค่าระหว่าง 1.82 ± 0.10 - 2.04 ± 0.79 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกชุดการทดลอง อัตราการรอดตาย ตลอดจนค่า hepatosomatic index และ condition factorไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในปลาที่ได้รับอาหารทดลองทุกสูตร ($P>0.05$) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม และอาหารผสมน้ำหมักชีวภาพมีปริมาณโปรตีนในตัวปลาอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารทดลองผสมแบคทีเรียแลคติกทุกชนิด และอาหารผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร (EM) มีโปรตีนในตัวสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ความชื้นในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริมน้ำหมักชีวภาพมีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* และ *Lactobacillus plantarum* ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามปลาที่ได้รับอาหารทดลองทุกสูตรมีไขมัน และเถ้าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำปลาที่ได้รับอาหารผสมจุลินทรีย์แต่ละชนิด มาตรวจสอบความต้านทานโรค *Aeromonas hydrophila* พบว่าการรอดตายของปลาหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($P>0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus rhamnosus*ผสมในอาหารจะช่วยให้ปลาดุกลูกผสม มีปริมาณโปรตีนในตัวมากขึ้น ขณะที่มีความชื้นในตัวปลาน้อยลง แต่การเสริมแบคทีเรียแลกติก และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อความต้านทานโรคของปลา

Abstract

Study on the supplementation of lactic acid bacteria included *Lactobacillus rhamnosus* (TISTR 108), *Lactobacillus lactis* (TISTR 1464), *Lactobacillus plantarum* (TISTR 1465) at the dietary concentration of $1x10^6$CFU/g feed on growth performance and feed utilization of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*). Treatments were compared to the control feed, the diet supplemented with agricultural effective microorganism (EM) and the diet mixed with fermented bio-extract. Thirty catfish with an average body weight of 1.94-1.96 g were cultured in 250 l plastic tank for 60 day. The fish was fed with experimental feed twice a day. Results found that the body weight of catfish fed all test diet were not significantly different ($P>0.05$). At start of the trial, experimental fish had the initial weight of 1.95 ± 0.04 - 1.96 ± 0.06 g, on day-60 the average of fish body weight ranging between 35.04 ± 1.47 – 36.52 ± 9.01 g. Feed conversion was not significantly different ($P>0.05$) and ranging between 1.82 ± 0.10 - 2.04 ± 0.79. Survival, hepatosomatic index and condition factor was not significantly different ($P>0.05$). Final body composition analysis reveal the lowering of protein content in carcass of the catfish fed control and test diet supplemented with fermented bio-extract. Fish fed all test diet mixed with lactic acid bacteria and EM had higher protein content compared to the control group ($P<0.05$). Moisture in the fish fed diet mixed with fermented bio-extract was higher than the catfish fed *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* ($P<0.05$). However, lipid and ash in catfish fed all test diet were not different ($P>0.05$). Results from disease challenge test by *Aeromonas hydrophila* showed a similar mortality among each treatment ($P>0.05$). In conclusion supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* resulted in the increasing of body protein content and lowering of moisture, all microorganism supplemented did not increase disease resistance of the hybrid catfish in this study.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	4
อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในประเทศไทย	4
โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และกลไกการทำงาน	4
การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกในอาหารสัตว์น้ำ	6
การประยุกต์ใช้โปรไบโอติก ในอาหารสำหรับปลากลุ่มปลาดุก	7
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	9
การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสม และอัตราการรอดตายภายหลังได้รับเชื้อก่อโรค	9
การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดที่เหมาะสม ต่อประสิทธิภาพการผลิต และผลผลิตปลาดุกลูกผสมในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา	13
บทที่ 4 ผลการศึกษา	16
การเตรียมอาหารปลาทดลอง และการวิเคราะห์คุณภาพอาหาร	16
ผลการทดลองที่ 1 ผลของการเสริมแบคทีเรียชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสม และอัตราการรอดตาย	17
ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริม *Lactobacillus rhamnosus* ต่อประสิทธิภาพการผลิต และผลผลิตปลาดุกลูกผสมในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา	24
บทที่ 5 วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	34

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (g) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน 19

ตารางที่ 2 อัตราการเจริญเติบโต (%), การเจริญเติบโตจำเพาะ (%) , การแลกเนื้อ และการรอดตาย (%) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน 20

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน 20

ตารางที่ 4 ดัชนีมวลตัว (CF) และดัชนีตัวต่อตับ (HSI) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน 21

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และการสะสมไขมัน (lipid retention)ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน 21

ตารางที่ 6 แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g) ในส่วนลำไส้ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน 23

ตารางที่ 7 การรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ หลังจากได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila*เป็นเวลา 10 วัน 23

ตารางที่ 8 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (g) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เลี้ยงในกระชังเป็นเวลา 60 วัน 25

ตารางที่ 9 อัตราการเจริญเติบโต (%), การเจริญเติบโตจำเพาะ (%), การแลกเนื้อ และการรอดตาย (%) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน 26

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน 26

ตารางที่ 11 ดัชนีมวลตัว (CF) และดัชนีตัวต่อตับ (HSI) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน 28

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 12ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และ การสะสมไขมัน (lipid retention) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน 28

ตารางที่ 13 แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g) ในส่วนลำไส้ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน 29

ตารางที่ 14 การรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริมเซลล์ *L. rhamnosus*หลังจากได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เป็นเวลา 10 วัน 29

บทที่ 1

บทนำ

ปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) เป็นปลาน้ำจืดมีการเจริญเติบโตเร็วเลี้ยงได้ในอัตราที่หนาแน่นและให้ผลผลิตสูงและเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับต้นๆ ปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ อย่างแพร่หลายมีมูลค่าการตลาดสูง ทั้งในประเทศไทย และประเทศในภูมิภาคอาเซียน ทั้งนี้ปัญหาของอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมคือต้นทุนอาหาร ปัญหาคุณภาพน้ำและโรคปลาในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งเป็นผลมาจากการจัดการอาหาร และประสิทธิภาพการใช้สารอาหารของปลาซึ่งน้อยกว่าที่ควร ส่วนปัญหาโรคปลาเกิดขึ้นทั้งจากการจัดการอาหารไม่เหมาะสม ส่งผลให้คุณภาพน้ำต่ำลง ตลอดจนเชื้อก่อโรคที่เพิ่มปริมาณมากขึ้นในระบบการเลี้ยง การพัฒนาสูตรอาหารให้ปลาสามารถย่อยและนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น และการจัดการอาหารให้เหมาะสม ตลอดจนการควบคุมเชื้อก่อโรคในระหว่างการเลี้ยงเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด และมีความยั่งยืนในอนาคต แนวทางการพัฒนาการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมให้มีต้นทุนต่ำลงสามารถทำได้ โดยการพัฒนาวัตถุดิบอาหารทดแทนที่มีราคาถูกลง โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรต่างๆ เช่น กากปาล์ม กากมะพร้าว และการพัฒนาเทคโนโลยีในการช่วยให้ปลาสามารถย่อย และใช้สารอาหารจากวัตถุดิบต่างๆ ให้มากขึ้น เช่น การใช้จุลินทรีย์ หรือเอนไซม์ช่วยย่อยวัตถุดิบในอาหาร การใช้กรดอินทรีย์เสริมในอาหารเพื่อให้ปลาย่อยอาหารได้มากขึ้น ซึ่งจะเป็นการลดปริมาณอาหารที่ต้องใช้ในการเลี้ยงปลาลงได้ และนำไปสู่การลดต้นทุนการผลิตในส่วนค่าอาหารปลา จากรายงานการศึกษาในปลาดุกแอฟริกัน (*Clarias gariepinus*) พบว่า การเสริมแบคทีเรียแลกติกในอาหารมีผลให้ปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมแบคทีเรีย และยังมีความต้านทานต่อโรคติดเชื้อมากขึ้น (Ayoola *et al.*, 2013) ทั้งนี้การทำงานของแบคทีเรียแลคติกในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาเกิดขึ้นได้เนื่องจากการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยอาหารในทางเดินอาหารของปลา การสร้างกรดอินทรีย์ในอาหาร และทางเดินอาหารเพื่อให้น้ำย่อยของปลาทำงานได้มากขึ้น (Welker and Lim, 2011) ในขณะที่การช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรค และการเพิ่มความต้านทานโรคในปลาจากแบคทีเรียแลคติกเกิดขึ้นโดยลักษณะการทำงานเป็นโปรไบโอติกในทางเดินอาหารของปลา กล่าวคือ แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ และโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกยัง

สามารถทำหน้าที่กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Zhou *et al.*, 2010)

แม้ว่าปลาดุกลูกผสมเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีการดำเนินการเลี้ยงมาเป็นเวลานาน และมีปริมาณการเลี้ยง และผลผลิตสูงมากในปัจจุบัน แต่กลับมีรายงานการศึกษาการเสริมจุลินทรีย์ในอาหารเพื่อให้ผลในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อย และการใช้ประโยชน์จากอาหาร ทั้งในด้านเพิ่มการใช้สารอาหาร และเพิ่มการเจริญเติบโตของปลา รวมทั้งเพิ่มภูมิคุ้มกัน และการรอดตายของปลาให้มากขึ้น การทดลองนี้จึงมุ่งตรวจสอบผลการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และนำผลการทดลองประยุกต์ใช้ในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาในระดับฟาร์ม ซึ่งจะทำให้สามารถนำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสม
2. ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ต่อองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ค่า hepatosomatic index และ condition factor และประสิทธิภาพการสะสมโปรตีน และไขมันของปลาดุกลูกผสม
3. ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ต่ออัตราการรอดตายของปลาดุกลูกผสมภายหลังได้รับเชื้อก่อโรค

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งเน้นตรวจสอบผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* เทียบกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร และจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพที่เสริมในอาหารปลาดุกลูกผสม ต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ค่า hepatosomatic index และ condition factor การสะสมสารอาหารในตัวปลา และอัตราการรอดตายของปลาดุกลูกผสมภายหลังได้รับเชื้อก่อโรค และประเมินผลการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดที่เหมาะสม ต่อประสิทธิภาพการผลิต และต้นทุนการผลิตปลาดุกลูกผสมในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา

ทฤษฎี สมมติฐานและหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

ปลาดุกลูกผสมเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีปริมาณผลผลิตสูง แต่มักประสบปัญหาต้นทุนค่าอาหารสูง และเกิดโรคในระหว่างการเลี้ยง จากการศึกษาในปลาดุกแอฟริกัน และปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ พบว่าการเสริมแบคทีเรียแลคติกในอาหาร สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต เพิ่มการใช้สารอาหารและประสิทธิภาพการย่อยอาหาร และเพิ่มการรอดตายของปลาให้มากขึ้น แต่แบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพการทำงานแตกต่างกันออกไป ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการทดสอบผลการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกชนิดที่ดีที่สุด ที่จะส่งผลเพิ่มการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ค่า hepatosomatic index และ condition factor และการรอดตายของปลาดุกลูกผสม เทียบกับจุลินทรีย์ทางการเกษตร ได้แก่ จุลินทรีย์ EM และน้ำหมักชีวภาพ ที่เกษตรกรนิยมใช้ในการเลี้ยงปลาดุกลูกผสม โดยเป็นการทดสอบผลในสภาพบ่อพลาสติกที่ไม่มีความแปรปรวนจากจุลินทรีย์อื่นๆ เมื่อทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุด แล้ว จะนำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาใช้ในระบบการทดลองแบบกระชังแขวนในบ่อที่มีความแปรปรวนของจุลินทรีย์สูง ซึ่งอาจพบลักษณะการตอบสนองทั้งด้านการเจริญเติบโตและองค์ประกอบจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของปลา ที่แตกต่างจากการทดลองในบ่อพลาสติก หากผลการทดลองระบบบ่อพลาสติกให้ผลไม่แตกต่างกับในกระชังในบ่อขนาดใหญ่ แสดงว่าจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ในอาหารทดลองมีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาในระดับฟาร์ม ซึ่งจะนำไปสู่การลดต้นทุนค่าอาหาร และลดปริมาณอาหารที่ต้องใช้ในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในประเทศไทย

ปลาดุกลูกผสมเป็นปลาที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยเพศเมีย(*Clarias macrocephalus*) กับปลาดุกเทศเพศผู้ (*Clarias gariepinus*) เป็นที่นิยมเลี้ยงของเกษตรกร เนื่องจากเลี้ยงง่าย มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและมีความทนทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดีและมีการบริโภคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีรสชาติดีและราคาถูกในปี พ.ศ. 2553 การเลี้ยงปลาดุกลูกผสมรวมทุกภาคของประเทศไทยมีพื้นที่ 65,624 ไร่ โดยมีปริมาณผลผลิตรวม 128,485 กก. และมีการขยายตัวของพื้นที่การเลี้ยง และปริมาณการเลี้ยงเพิ่มขึ้นทุกปี ทั้งนี้ราคาผลผลิตปลาดุกลูกผสม ปี พ.ศ. 2556 ราคาต่ำสุด 35 บาท/กก. สูงสุด 55 บาท/กก. โดยมีราคาปกติ 45 บาท/กก. ปัญหาที่พบในการประกอบการเลี้ยงปลาดุกได้แก่ ปัญหาต้นทุนการผลิตสูง ซึ่งเกิดจากราคาต้นทุนค่าอาหารเพิ่มสูงขึ้น และการจัดการอาหาร ตลอดจนประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาในระบบการเลี้ยงต่ำกว่าที่ควร นอกจากนี้ยังพบปัญหาน้ำเสียในระหว่างการเลี้ยง นำไปสู่การเกิดโรคในระบบการเลี้ยงปลา (ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556)

โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และกลไกการทำงาน

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาเพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ช่วยในการย่อยอาหาร และ/หรือป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำ กลไกการทำงานของโปรไบโอติกเกิดขึ้นภายในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลา โปรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคโดยการแย่งยึดเกาะภายในลำไส้กับจุลินทรีย์ก่อโรคและ/หรือ สร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่นbacteriocins ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์บางชนิดโปรไบโอติกยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคกระบวนการทำงานของโปรไบโอติกประกอบด้วยประเด็นต่างๆ ได้แก่ (Verschuere *et al.*, 2000 ;Balcazar *et al.*, 2006)

การแข่งขันยึดเกาะในระบบทางเดินอาหาร : กลไกการก่อตัวของเชื้อก่อโรคเกิดจากการยึดเกาะภายในลำไส้หรือในเนื้อเยื่อบุผิวกรณีที่มีแบคทีเรียหลายชนิดในทางเดินอาหารจะเกิดการแข่งขันกันแย่งตัวรับ (recepter) ในกรณีที่การลงเกาะของโปรไบโอติกเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่า จะทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเข้ามายึดเกาะกับตัวรับภายในผนังของลำไส้ (Verschure *et al.*, 2000)

การผลิตสารประกอบที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค : จุลินทรีย์ที่มีการสร้าง bactericidal หรือ bacteriostatic ที่มีผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆจะสามารถขัดขวางการก่อโรคในลำไส้ได้ antibacterial อาจเกิดจากปัจจัยเดียวหรือหลายปัจจัยเช่นการผลิต antibiotic (Temmerman *et al.*, 2003) การผลิต bacteriocins (Bruno and Montville, 1993) siderophores, lyzosyme, protease, hydrogen peroxide, การเปลี่ยนแปลง pH โดยการสร้างกรดอินทรีย์ (Sugita *et al.*, 1997) เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างสารประกอบเช่น bacteriocins ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ Ringo and Gatesoupe (1997) กล่าวว่าแลกติกเอซิดแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยปกติแลกติกเอซิดแบคทีเรียมีส่วนช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้ของปลา โดยแลกติกเอซิดแบคทีเรียสามารถสร้าง bacteriocins เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และช่วยลด pH ในระบบทางเดินอาหารจากผลของเมตาบอลิซึม CO_2 หรือกรดอินทรีย์ต่างๆ

การแข่งขันกันใช้สารเคมีหรือพลังงาน : ในการแข่งขันกันใช้สารเคมีหรือการใช้พลังงานอาจเป็นตัวกำหนดกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกันในระบบนิเวศโดยทั่วไปเป็นการแข่งขันของจุลินทรีย์กลุ่ม heterotropes ในการใช้สารประกอบอินทรีย์เช่นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานอื่นๆ (Rico-Mora *et al.*, 1998) รวมทั้งการแก่งแย่งแร่ธาตุบางชนิด เช่นการแย่งใช้ธาตุเหล็กโดยจุลินทรีย์

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้าง siderophores ในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรค โดย siderophoreแย่งใช้ธาตุเหล็กในการเจริญเติบโต (Gatesoupe, 1997)

แหล่งอาหารและสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหาร : เมื่อโปรไบโอติกผ่านลงไปในระบบทางเดินอาหารแล้วสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตและสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในกระบวนการย่อยอาหารเช่น amylase, protease และ lipase ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยอาหารและกระบวนการย่อยสารอินทรีย์และโปรตีนเสริมสร้างการเจริญเติบให้สูงขึ้นและป้องกันโรคต่างๆในลำไส้ (Lara-Flores *et al.*, 2003) Balcazar *et al.* (2006) รายงานว่า จุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Agrobacterium* sp. *Pseudomonas* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp. และ *Staphylococcus* sp. อาจมีส่วนช่วยในกระบวนการย่อยอาหารในปลาอาร์กติกชาร์ (*Salvelinus alpinus*) Lara-Flores *et al.* (2010) พบว่า activity ของ alkaline phosphate สูงขึ้นในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าโปรไบโอติกช่วยกระตุ้นในการทำงานของ brush border membrane ของ enterocytic

การเพิ่มการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน : ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะสามารถกระตุ้นโดยใช้โปรไบโอติกได้ ตัวอย่างเช่น *Clostridium butyricum* สามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ Vibrioให้กับปลา rainbow trout ด้วยการเพิ่ม Phagocytosis activity ขณะที่ Nikoskelainen *et al.*

(2003) ได้ทำการศึกษาการทดลองใช้แลกติกเอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 ผสมลงในอาหารที่ระดับ 10^5cfu/gปรากฏว่าสามารถกระตุ้น Respiratory burst ในปลา rainbow trout ได้มากขึ้น

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกในอาหารสัตว์น้ำ

มีรายงานการคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรียมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกผสมลงในอาหาร ทั้งนี้แลกติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยแลกโตสเป็นกรดแลกติกทำให้ pH ภายในระบบทางเดินอาหารลดลงทำให้มีสภาพไม่เหมาะสมในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรคตัวอย่างจุลินทรีย์กลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรียเช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์บุผิว และผลิต bacteriocins ที่มีฤทธิ์เป็น antibiotic และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Fuller, 1989) Essa *et al.* (2010) ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* และเชื้อผสมทั้ง*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* และ *Saccharomyces cerevisiae*โดยผสมเชื้อแต่ละชุดการทดลองในปริมาณ 10^7CFU/g ในอาหารเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกชุดการทดลอง มีการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ผสมโปรไบโอติก และยังพบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus subtilis* และ *Lactobacillus plantarum* มีกิจกรรมของเอนไซม์ amylase, protease และ lipase มากขึ้นกว่าชุดควบคุม และส่งผลให้ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีค่าประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตจากอาหารได้มากขึ้นกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่ผสมโปรไบโอติก

การเสริมแบคทีเรียทั้งในกลุ่ม Bacillus และ Lactobacillus ในอาหารมีผลช่วยให้ปลามีประสิทธิภาพการย่อยสารอาหารได้มากขึ้น Ghazalah *et al.* (2010) รายงานการทดลองใช้ส่วนผสมเชิงการค้า Premalac® ซึ่งประกอบด้วยเชื้อผสมของ *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergilus oryzae*, *Bifidobacterium bifedum*, *Streptococcus faecium* Torula yeast และส่วนผสมเชิงการค้า Biogen® ซึ่งประกอบด้วย hydrolytic enzyme กับ *Bacillus subtilis*เสริมในอาหารสำหรับปลานิลโดยทดลองในอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกันที่ระดับ 25, 27.5 และ 30% โปรตีน ผลการทดลองพบว่าทั้ง Premalac® และ Biogen® เสริมในอาหารโปรตีน 27.5 และ 30% ที่ระดับ 2 g/kg มีผลให้ปลามีการเจริญเติบโตมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อทำการคำนวณค่าประสิทธิภาพการผลิตเชิงเศรษฐกิจพบว่าการใช้ Biogen® เสริมในอาหารที่มีระดับโปรตีน 27.5% จะทำให้เกิดความคุ้มค่าเชิงเศรษฐกิจในการเลี้ยงปลามากที่สุด

ในด้านการประยุกต์ใช้ Lactobacillus เป็นโปรไบโอติกเสริมในอาหารเพื่อป้องกันโรคในปลา Zhou *et al.* (2010) ได้ทดลองใช้ *Lactobacillus lactis* ผสมในน้ำเลี้ยงปลานิล (เติมในน้ำ 10^7CFU/ml ทุก 4 วัน) เลี้ยงปลาเป็นเวลา 40 วัน พบว่าปลาที่ได้รับโปรไบโอติกมีน้ำหนักต่อตัว และอัตราการเจริญต่อวันสูงกว่าปลาในชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีปริมาณโปรตีนรวม และ globulin ในเลือดมีค่าสูงขึ้นกว่าปลาชุดควบคุม ในด้านระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าค่า respiratory bust, lyzozyme content, myeloperoxidase และ superoxide dismutase ของปลาที่ได้รับโปรไบโอติกมีค่าเพิ่มมากขึ้นกว่าปลาในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก Daga *et al.* (2013) รายงานผลการศึกษาการใช้เชื้อผสมของ Lactobacillus กับ Enterococcus (FAA) และเชื้อผสมของ Lactobacillus กับ Pediococcus (FAB) เป็นโปรไบโอติกเสริมลงในอาร์ทีเมียวัยอ่อน เพื่อใช้อนุบาลลูกปลา turbot (*Psetta maxima*) เป็นระยะเวลา 34 วัน ผลการทดลองพบว่าลูกปลาที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกทั้ง 2 ชุดการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่ม Vibrio ในทางเดินอาหารลดลง แต่จะมีปริมาณของ Lactobacillus เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม นอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติก ยังช่วยให้ลูกปลามีอัตราการรอดตายในช่วง 35-80 วันหลังฟักออกจากไข่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในอาหารสำหรับปลากลุ่มปลาดุก

แม้ว่ามีการดำเนินการเลี้ยงปลาดุกชนิดต่างๆ มาเป็นเวลานาน แต่รายงานการใช้โปรไบโอติกในอาหารสำหรับปลาดุกยังคงมีอยู่น้อยมาก Dhanasekaran *et al.* (2008) ได้ทดลองแยกเชื้อจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ พบแบคทีเรียแลคติก *Lactabacillus* sp. ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas* sp. และ *Vibrio parahemolyticus* ในหลอดทดลองได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียแลคติกชนิดดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อช่วยลดปัญหาเชื้อก่อโรคในปลาดุก ในขณะที่ Kolndadacha *et al.* (2013) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวหนังของปลาดุก (*Clarias anguilaris*) และได้รายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus firmus*และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ดีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ El-Haroun (2007) ทำการทดลองใช้ส่วนผสมจุลินทรีย์เชิงการค้า Biogen® ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* $6x10^7$ CFU/g และเอนไซม์ไฮโดรไลติกโดยผสมจุลินทรีย์เชิงการค้า Biogen® ในอาหารให้กับปลาดุกแอฟริกัน (*Claria sgariepinus*) ในปริมาณ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2% ในอาหาร พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองผสมจุลินทรีย์เชิงการค้า Biogen® ใน

ปริมาณ 0.5% ขึ้นไปมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว อัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนเพิ่มมากขึ้นกว่าชุดควบคุม ผลการทดลองดังกล่าวทำให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณอาหารที่ต้องใช้เลี้ยงปลาลงได้โดยที่ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี เป็นการลดต้นทุนค่าอาหาร อย่างไรก็ตามส่วนผสมจุลินทรีย์เชิงการค้าที่นำมาใช้ทดสอบในการทดลองนี้มีส่วนประกอบทั้งเซลล์แบคทีเรีย และเอนไซม์ จึงทำให้ไม่สามารถให้ข้อสรุปในด้านกลไกที่กระตุ้นให้ปลาดุกมีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดีขึ้นอย่างชัดเจนAyoola*et al.* (2013) ทำการทดลองใช้ส่วนผสมเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus*และ *Bifidobacterium*เป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารให้กับปลาดุกแอฟริกันระยะวัยรุ่น โดยใช้อาหารโปรไบโอติกในปริมาณ 0.5, 1, 1.5 และ 2 % ในอาหาร พบว่า ปลาดุกที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0.5% และอาหารชุดควบคุมมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกในระดับ 1-2% ในขณะที่โปรไบโอติกมีผลต่อองค์ประกอบเลือดของปลาดุก โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0.5-1.5% มีปริมาณเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และค่า %PCV เพิ่มสูงขึ้นกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม อย่างไรก็ตามปลาที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในปริมาณ 2% กลับมีค่าองค์ประกอบเลือดลดลงและไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสม และอัตราการรอดตายภายหลังได้รับเชื้อก่อโรค

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (complete randomized design, CRD) ประกอบด้วยการศึกษาผลของแบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ 3ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* เทียบกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร (EM) และจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ (กรมพัฒนาที่ดิน)ในระดับที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/g อาหาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมแบคทีเรียแลคติก รวมทั้งสิ้น 6 ชุดการทดลอง ดำเนินการทดลองชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ

การเตรียมปลาทดลอง

นำปลาดุกลูกผสมขนาด 3-5 เซนติเมตร จำนวน 2000 ตัวจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดพัทลุง มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสกลมขนาดความจุ 2000 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง เพื่อปรับสภาพปลาให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม และทำการสุ่มปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 30ตัวลงเลี้ยงในบ่อพลาสติกปริมาตรน้ำ 250 ลิตร จำนวน 24บ่อ ติดตั้งระบบให้อากาศ และระบบเปลี่ยนถ่ายน้ำในอัตราการถ่ายน้ำ 25-50% ต่อวัน ด้วยระบบเติมน้ำแบบน้ำไหลผ่าน

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติก

เตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดตามวิธีการของ Essa *et al.* (2010) โดยเลี้ยงหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ขยายปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30-35^{0}C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 10000 rpm 15 นาที ล้างเซลล์ที่แยกได้ 2 ครั้งด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7 และนำมาใช้ผสมในอาหารทดลองแต่ละสูตรก่อนนำไปผสมอาหารให้ปลาในแต่ละชุดการทดลอง

ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร (EM) และจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ จัดเตรียมตามวิธีการของกรมพัฒนาที่ดิน แล้วนำมาใช้ผสมในอาหารทดลองแต่ละสูตร

การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองโดยใช้สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกลูกผสมที่มีปริมาณโปรตีน 36% ไขมัน 12% (Van Weerd, 1995) ในลักษณะอาหารอัดเม็ดจมน้ำ โดยมีการใช้กากปาล์มบดเป็นวัตถุดิบทดแทนรำละเอียด และกากถั่วเหลืองในปริมาณ 25% ของสูตรอาหาร ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าระดับของกากปาล์มที่ควรใช้ในอาหารปลาดุกลูกผสม ผลิตอาหารตามขั้นตอนการผลิตอาหารตามวิธีการของ Kiriratnikom and Kiriratnikom (2012) นำอาหารสำหรับเลี้ยงปลาในแต่ละชุดการทดลองมาผสมเซลล์จุลินทรีย์ ตามชุดการทดลอง โดยฉีดพ่นเซลล์แบคทีเรียแลคติกในสารละลาย PBS ลงบนอาหารทดลองในปริมาณที่มีเซลล์แบคทีเรียแลคติก $1x10^6$CFU/g โดยเตรียมอาหารผสมเซลล์ดังกล่าวในปริมาณที่ใช้หมดใน 24 ชั่วโมงส่วนอาหารทดลองชุดควบคุมเชิงลบเตรียมโดยผสมอาหารด้วยสารละลาย PBS ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ในปริมาณ 1% (w/v) ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารแต่ละสูตรก่อนนำไปใช้เลี้ยงปลาโดยตรวจนับด้วยวิธี total viable count (TVC) ตามวิธีการของ Daga *et al.* (2013) โดยการเพาะเชื้อบนจานอาหาร plate count agar เพื่อตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกโดยเพาะเชื้อบนจานอาหาร MRS agar

เลี้ยงปลาด้วยอาหารในแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารวันละ 2 เวลา คือ 08.00-9.00 น. และ 16.00-17.00 น. โดยให้อาหารในปริมาณ 3-5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลาการทดลอง 60 วัน

การเก็บข้อมูล

การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทั้งหมดในแต่ละตู้ทดลองตั้งแต่เริ่มทดลอง และทุก 10 วัน ของการทดลอง นับจำนวนปลาทุกครั้งที่มีการชั่งน้ำหนัก แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต การรอดตาย และการแลกเนื้อ ตามสมการดังต่อไปนี้(Halver and Hardy, 2002)

1. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain ,WG; เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}} \times 100$$

2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(Specific growth rate; เท่าต่อวัน)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น})}{\text{เวลาในการทดลอง}}$$

3. อัตราการรอดตาย (Survival rate;เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}$$

4. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ(Feed conversion ratio, FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักรวมของอาหารทั้งหมดที่ปลากินในแต่ละหน่วยการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาทดลองในแต่ละหน่วยการทดลอง (กรัม)}}$$

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำปลาจากแต่ละชุดการทดลองจำนวน 8 ตัว สลบให้หมดความรู้สึกด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาที แล้วมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน และปริมาณเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990)

การตรวจสอบhepatosomatic index, condition factor ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และค่าการสะสมไขมัน (lipid retention)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 8 ตัว สลบปลาให้หมดความรู้สึกด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนัก วัดความยาวเหยียด (total length, TL) ผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อชั่งน้ำหนักตับทั้งหมด นำข้อมูลที่ได้มาตรวจสอบค่า hepatosomatic index (Anwar and Jafri, 1995) และ condition factor (Toko *et al.*, 2007)และนำผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา คำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention)และ การสะสมไขมัน(lipid retention) ตามวิธีการของ Halver and Hardy (2002)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER)} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (g)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (g)}}$$

$$\text{ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention, \%)} = \frac{\text{น้ำหนักโปรตีนในตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (g)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (g)}} \times 100$$

$$\text{ค่าการสะสมไขมัน(lipid retention, \%)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันในตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (g)}}{\text{น้ำหนักไขมันที่ปลากิน (g)}} \times 100$$

การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาดุกลูกผสม 8 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองสลบด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาทีผ่าตัดแยกส่วนลำไส้ของปลาออกมาบดด้วยโกร่งปลอดเชื้อ เพื่อเตรียมเป็น serial dilution ด้วย sterile PBS เพื่อนำมาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ตามวิธีการของ Daga *et al.* (2013) โดยการเพาะเชื้อบนจานอาหาร plate count agar และ MA เพื่อตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกโดยเพาะเชื้อบนจานอาหาร MRS agar

การทดสอบความต้านทานโรค

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาดุกลูกผสม 30 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับ 10^5 CFU/ml เข้าช่องท้อง ตัวละ 0.1 ml นำปลาทดลองดังกล่าวแยกเลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 30x30x60 เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว ตรวจสอบการรอดตายของปลาทุกวันเป็นระยะเวลา 10 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบ One way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Ducanmultiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป SPSS version 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริมแบคทีเรียแลคติกชนิดที่เหมาะสม ต่อประสิทธิภาพการผลิต และผลผลิตปลาดุกลูกผสมในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (complete randomized design, CRD) ประกอบด้วยการศึกษาผลของจุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 เทียบกับชุดควบคุมซึ่งได้รับอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่ผสมแบคทีเรียแลคติกรวมทั้งสิ้น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ

การเตรียมปลาทดลอง

นำปลาดุกลูกผสมขนาด 3-5 เซนติเมตร จำนวน 1000 ตัวจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดพัทลุง มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสกลมขนาดความจุ 3000 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง เพื่อปรับสภาพปลาให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม และทำการสุ่มปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 100 ตัวลงเลี้ยงในกระชังแต่ละใบที่มีขนาด 2x3 เมตร จำนวน 8 กระชังที่ติดตั้งไว้ในบ่อดิน ขนาด 15×8เมตร ความลึก 0.8 เมตร

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติก

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ตามวิธีการของ Essa *et al.* (2010) โดยเลี้ยงหัวเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ขยายปริมาณเชื้อโดยเลี้ยงในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30-35^{0}C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 10000 rpm 15 นาที ล้างเซลล์ที่แยกได้ 2 ครั้งด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7

การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองและผสมจุลินทรีย์ตามวิธีการในการทดลองที่ 1 ส่วนอาหารทดลองชุดควบคุมเตรียมโดยผสมอาหารด้วยสารละลาย PBS ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ในปริมาณ 1% (w/v) ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

เลี้ยงปลาด้วยอาหารในแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารวันละ 2 เวลา คือ 08.00-9.00 น. และ 16.00-17.00 น. โดยให้อาหารในปริมาณ 3-5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลาการทดลอง 6 สัปดาห์

การเก็บข้อมูล

การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทั้งหมดในแต่ละกระชังตั้งแต่เริ่มทดลอง และทุก10 วันของการทดลอง เป็นระยะเวลา 60 วัน นับจำนวนปลาทุกครั้งที่มีการชั่งน้ำหนัก แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต การรอดตาย และการแลกเนื้อ ตามสมการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำปลาจากแต่ละชุดการทดลองจำนวน 8 ตัว สลบให้หมดความรู้สึกด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน และปริมาณเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990)

การตรวจสอบhepatosomatic index, condition factor ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และค่าการสะสมไขมัน (lipid retention)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 8 ตัว สลบปลาให้หมดความรู้สึกด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนัก วัดความยาวเหยียด (total length, TL) ผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อชั่งน้ำหนักตับทั้งหมด นำข้อมูลที่ได้มาตรวจสอบค่า hepatosomatic index (Anwar and Jafri, 1995) และ condition factor (Toko *et al.*, 2007)และนำผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา เพื่อคำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention)และ การสะสมไขมัน(lipid retention) ตามวิธีการของ Halver and Hardy (2002) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาดุกลูกผสม 8 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองสลบด้วยสารละลายน้ำมันกานพลู (clove oil) 100 ppm เป็นเวลา 15 นาทีผ่าตัดแยกส่วนลำไส้ของปลาออกมาบดด้วยโกร่งปลอดเชื้อ แล้วเตรียมเป็น serial dilution ด้วย sterile PBS เพื่อนำตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการของ Daga *et al.* (2013) โดยการเพาะเชื้อบนจานอาหาร plate count agar และ MA เพื่อตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกโดยเพาะเชื้อบนจานอาหาร MRS agar

การทดสอบความต้านทานโรค

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาดุกลูกผสม 30 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ที่ระดับ 10^5 CFU/ml เข้าช่องท้อง ตัวละ 01. ml นำปลาทดลองดังกล่าวแยกเลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 30x30x60 เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว ตรวจสอบการรอดตายของปลาทุกวันเป็นระยะเวลา 10 วัน

การวิเคราะห์เชิงเศรษฐศาสตร์ของการใช้แบคทีเรียแลคติกในอาหาร

ตรวจสอบปริมาณผลผลิต และต้นทุนการผลิต โดยคำนวณต้นทุนค่าอาหารต่อผลผลิตระหว่างสูตรอาหารที่มีการผสมแบคทีเรียแลคติก เทียบกับอาหารชุดควบคุมไม่ผสมแบคทีเรียแลคติก ตามสมการ

ต้นทุนต่อปริมาณผลผลิต = FCR x ราคาอาหารต่อกิโลกรัม

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย t-test โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป SPSS version 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเตรียมอาหารปลาทดลอง และการวิเคราะห์คุณภาพอาหาร

เตรียมอาหารทดลองโดยใช้สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกลูกผสมที่มีปริมาณโปรตีน 36% ไขมัน 12% (Van Weerd, 1995) ในลักษณะอาหารอัดเม็ดจมน้ำ โดยมีการใช้กากปาล์มบดเป็นวัตถุดิบทดแทนรำละเอียด และกากถั่วเหลืองในปริมาณ 25% ของสูตรอาหาร ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าระดับของกากปาล์มที่ควรใช้ในอาหารปลาดุกลูกผสม ผลิตอาหารตามขั้นตอนการผลิตอาหารตามวิธีการของ Kiriratnikom and Kiriratnikom (2012) ก่อนการผลิตอาหารได้จัดซื้อวัตถุดิบอาหาร นำมาร่อนด้วยตะแกรงละเอียด ขนาด 0.5 มิลลิเมตร แล้วสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการบางประการ สำหรับการออกแบบสูตรอาหารทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาใช้ออกแบบสูตรอาหารทดลองดังนี้

ปลาป่น	30	%
เศษไก่ป่น	12	%
กากถั่วเหลือง	16.5	%
รำละเอียด	3	%
มันสำปะหลังบด	6	%
กากปาล์ม	25	%
ข้าวโพดป่น	3	%
วิตามิน	1	%
แร่ธาตุ	0.5	%
น้ำมันถั่วเหลือง	3	%

วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองที่ผลิตขึ้น พบว่ามีปริมาณความชื้น 5.4 % ปริมาณโปรตีน 33.2 % ไขมัน 11.3 % และเถ้า 10.8 %

ผลการทดลองที่ 1 ผลของการเสริมแบคทีเรียชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสม และอัตราการรอดตาย

การเจริญเติบโตของปลา

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริมแบคทีเรียชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 1 พบว่าการเจริญเติบโตของปลาดุกทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ตลอดระยะเวลาของการทดลอง โดยปลาดุกลูกผสมเมื่อเริ่มการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.95 กรัม และมีน้ำหนักสุดท้ายอยู่ในช่วง 35.04±1.47-36.77±4.08 กรัมต่อตัวอัตราการเจริญเติบโต, การเจริญเติบโตจำเพาะ, การแลกเนื้อ และการรอดตาย ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วันแสดงในตารางที่ 2 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตมีค่าในช่วง 1682.74 ± 79.60-1823.91 ± 208.33 % สำหรับค่าการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าในช่วง 4.74 ± 0.59-4.89 0.21% วัน ส่วนการแลกเนื้อ และการรอดตายมีค่าในช่วง 1.82 ± 0.10-2.04 ± 0.79 และ 72.50 ± 11.01-76.67 ± 12.77 % ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าทั้งค่าอัตราการเจริญเติบโต, การเจริญเติบโตจำเพาะ, การแลกเนื้อ และการรอดตายของปลาดุกที่ได้รับอาหารทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05)

องค์ประกอบทางเคมี

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำปลาจากแต่ละชุดการทดลอง มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ปริมาณ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า พบว่า ความชื้นของตัวปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีความชื้นในตัวน้อยกว่าและมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับปลาในชุดการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ปลาดุกที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus*, *L. lactis*, *L. plantarum* และน้ำหมักชีวภาพมีความชื้นในตัวอยู่ในช่วง 73.58 ± 1.43-75.52 ± 0.89% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) อย่างไรก็ตามปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริม EM มีความชื้นในตัวสูงกว่า และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับปลาดุกที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus*, *L. plantarum* และน้ำหมักชีวภาพ (ตารางที่ 3) จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวปลาพบว่า ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุมและชุดทดลองเสริมน้ำหมักชีวภาพมีปริมาณโปรตีนในตัวปลาอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus*, *L. lactis*, *L. plantarum* และ EM มีปริมาณโปรตีนในตัวสูง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม (P<0.05) ในขณะที่ปริมาณไขมัน และเถ้าในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองในครั้งนี้มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05)

การตรวจสอบ condition factor,hepatosomatic index ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และค่าการสะสมไขมัน (lipid retention)

ดัชนีมวลตัว (CF, condition factor) และดัชนีตัวต่อตับ (HSI, hepatosomatic index) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆแสดงในตารางที่ 4 พบว่าค่าดัชนีมวลตัว มีค่าอยู่ในช่วง 0.89 ± 0.02-0.91 ± 0.04และดัชนีตัวต่อตับ มีค่าระหว่าง 1.32 ± 0.07-1.45 ± 0.07 % ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05)

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และค่าการสะสมไขมัน (lipid retention)แสดงในตารางที่ 5 ผลการทดลองพบว่าการเสริมจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารปลาดุกลูกผสมไม่มีผลต่อค่าดังกล่าว ทั้งนี้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีค่าในช่วง 1.22 ± 0.72-1.47 ± 0.32การสะสมโปรตีนมีค่าในช่วง 17.42 ± 7.38-21.36 ± 5.43% และการสะสมไขมันมีค่าในช่วง 18.55 ± 7.67-36.20 ± 7.54% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05)

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (g) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

	0 day	10 day	20 day	30 day	40 day	50 day	60 day
T1 Control	1.95 ± 0.04 ^{ns}	5.82 ± 0.30 ^{ns}	9.87± 0.55 ^{ns}	13.65 ± 0.88 ^{ns}	20.44 ± 0.70 ^{ns}	28.75 ± 0.65 ^{ns}	36.00 ± 6.78 ^{ns}
T2*L. rhamnosus*	1.96 ± 0.06 ^{ns}	5.55 ± 0.22 ^{ns}	9.75± 0.67 ^{ns}	13.52 ±1.25 ^{ns}	20.08 ± 0.10 ^{ns}	28.66 ± 1.64 ^{ns}	35.04 ± 1.47 ^{ns}
T3*L. lactis*	1.95 ± 0.03 ^{ns}	5.62 ± 0.25 ^{ns}	9.54 ± 0.67 ^{ns}	13.20 ± 0.70 ^{ns}	20.60 ± 0.73 ^{ns}	28.78 ± 1.36 ^{ns}	35.13 ± 12.49 ^{ns}
T4*L. plantarum*	1.95 ± 0.04 ^{ns}	5.66 ± 0.16 ^{ns}	9.80 ± 0.35 ^{ns}	13.53 ± 0.46 ^{ns}	20.12 ± 1.04 ^{ns}	28.79 ± 2.43 ^{ns}	36.77 ± 4.08 ^{ns}
T5EM	1.95 ± 0.04 ^{ns}	5.55 ± 0.28 ^{ns}	9.34 ± 0.89 ^{ns}	13.19 ± 0.84 ^{ns}	20.35 ± 0.45 ^{ns}	28.94 ± 1.02 ^{ns}	36.20 ± 5.16 ^{ns}
T6น้ำหมักชีวภาพ	1.95 ± 0.06 ^{ns}	5.83 ± 0.37 ^{ns}	9.84 ± 0.68 ^{ns}	13.60 ± 0.08 ^{ns}	20.41 ± 0.71 ^{ns}	28.76 ± 1.36 ^{ns}	36.52 ± 9.01 ^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 2 อัตราการเจริญเติบโต (%), การเจริญเติบโตจำเพาะ (%), การแลกเนื้อ และการรอดตาย (%) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

	Weight gain (%)	**Specific growth rate (%/day)**	**FCR**	**Survival (%)**
T1 Control	1741.31 ± 326.88^{ns}	4.84 ± 0.34^{ns}	1.91 ± 0.32^{ns}	73.33 ± 4.71^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	1682.74 ± 79.60^{ns}	4.80 ± 0.09^{ns}	1.96 ± 0.58^{ns}	76.67 ± 12.77^{ns}
T3 *L. lactis*	1689.68 ± 655.54^{ns}	4.74 ± 0.59^{ns}	1.89 ± 0.80^{ns}	75.83 ± 3.19^{ns}
T4 *L. plantarum*	1823.91 ± 208.33^{ns}	4.89 0.21^{ns}	1.82 ± 0.10^{ns}	75.00 ± 9.62^{ns}
T5 EM	1741.62 ± 253.06^{ns}	4.86 ± 0.21^{ns}	2.04 ± 0.79^{ns}	72.50 ± 11.01^{ns}
T6 น้ำหมักชีวภาพ	1782.82 ± 488.01^{ns}	4.84 ± 0.46^{ns}	1.97 ± 0.60^{ns}	75.55 ± 3.85^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

	Moisture	**Protein**	**Lipid**	**Ash**
T1 Control	71.22 ± 1.23^{a}	49.69 ± 1.26^{a}	29.77 ± 6.22^{ns}	12.90 ± 0.89^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	73.58 ± 1.43^{b}	56.62 ± 1.78^{bc}	27.95 ± 7.24^{ns}	14.07 ± 2.99^{ns}
T3 *L. lactis*	75.52 ± 0.89^{bc}	56.94 ± 1.71^{bc}	26.34 ± 4.16^{ns}	16.19 ± 1.35^{ns}
T4 *L. plantarum*	73.76 ± 1.21^{b}	57.29 ± 1.82^{bc}	30.45 ± 1.57^{ns}	13.69 ± 0.37^{ns}
T5 EM	76.61 ± 1.16^{c}	59.43 ± 2.64^{c}	22.28 ± 3.07^{ns}	16.34 ± 2.33^{ns}
T6 น้ำหมักชีวภาพ	74.20 ± 1.60^{b}	53.17 ± 3.36^{ab}	25.85 ± 3.67^{ns}	14.66 ± 1.40^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

Means within columns not sharing the same superscript are significantly different (P<0.05).

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 4 ดัชนีมวลตัว (CF) และดัชนีตัวต่อตับ (HSI) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

	CF	HIS (%)
T1 Control	0.91 ± 0.04^{ns}	1.33 ± 0.19^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	0.89 ± 0.02^{ns}	1.37 ± 0.19^{ns}
T3 *L. lactis*	0.91 ± 0.02^{ns}	1.45 ± 0.07^{ns}
T4 *L. plantarum*	0.90 ± 0.02^{ns}	1.38 ± 0.18^{ns}
T5 EM	0.89 ± 0.03^{ns}	1.41 ± 0.08^{ns}
T6 น้ำหมักชีวภาพ	0.90 ± 0.02^{ns}	1.32 ± 0.07^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และการสะสมไขมัน (lipid retention)ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

	PER	Protein retention (%)	Lipid retention (%)
T1 Control	1.47 ± 0.32^{ns}	21.22 ± 4.62^{ns}	36.20 ± 7.54^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	1.39 ± 0.36^{ns}	21.36 ± 5.43^{ns}	29.68 ± 7.28^{ns}
T3 *L. lactis*	1.22 ± 0.72^{ns}	19.87 ± 10.57^{ns}	22.72 ± 12.74^{ns}
T4 *L. plantarum*	1.23 ± 0.52^{ns}	18.80 ± 7.72^{ns}	28.77 ± 11.33^{ns}
T5 EM	1.25 ± 0.53^{ns}	17.42 ± 7.38^{ns}	18.55 ± 7.67^{ns}
T6 น้ำหมักชีวภาพ	1.30 ± 0.57^{ns}	18.02 ± 7.85^{ns}	25.07 ± 10.46^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

จากการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ ของปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตร ในช่วง $3.52x10^7 \pm 1.72x10^7$- $8.78x10^7 \pm 1.39x10^7$cfu/gทั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง ($P>0.05$)(ตารางที่ 6)

การทดสอบความต้านทานโรค

จากการตรวจสอบการรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตร หลังจากที่นำมาทดสอบความต้านทานโรค โดยฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* เข้าช่องท้องเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าตลอดระยะเวลาที่นำมาทดสอบมีการตายของปลาเกิดขึ้นน้อยมาก เมื่อปลาได้รับเชื้อก่อโรคไปแล้วเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีการรอดตายอยู่ในช่วง 73.33 ± 5.77-83.33 ± 15.28% และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง ($P>0.05$) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g) ในส่วนลำไส้ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

	Total bacteria (cfu/g)
T1 Control	$6.68x10^{7} \pm 1.27x10^{7}$ ns
T2 *L. rhamnosus*	$8.78x10^{7} \pm 1.39x10^{7}$ ns
T3 *L. lactis*	$3.52x10^{7} \pm 1.72x10^{7}$ ns
T4 *L. plantarum*	$5.34x10^{7} \pm 6.01x10^{7}$ ns
T5 EM	$3.95x10^{7} \pm 2.74x10^{7}$ ns
T6 น้ำหมักชีวภาพ	$4.89x10^{7} \pm 4.16x10^{7}$ ns

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 7การรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ หลังจากได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เป็นเวลา 10 วัน

	Survival after 10 days of *Aeromonas* challenge (%)
T1 Control	80.00 ± 10.00^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	83.33 ± 15.28^{ns}
T3 *L. lactis*	83.33 ± 15.28^{ns}
T4 *L. plantarum*	76.67 ± 11.55^{ns}
T5 EM	73.33 ± 5.77^{ns}
T6 น้ำหมักชีวภาพ	80.00 ± 10.00^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริม *Lactobacillus rhamnosus* ต่อประสิทธิภาพการผลิต และผลผลิตปลาดุกลูกผสมในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา

การเจริญเติบโตของปลา

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus* แสดงในตารางที่ 8 พบว่าการเจริญเติบโตของปลาดุกที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus* และปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมไม่เสริมจุลินทรีย์ ที่เลี้ยงในกระชังเป็นเวลา 60 วันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) โดยปลาดุกลูกผสมเมื่อเริ่มการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 6.59-6.63 กรัม และมีน้ำหนักสุดท้ายอยู่ในช่วง 96.65±2.18-97.50±2.33 กรัมต่อตัวอัตราการเจริญเติบโต, การเจริญเติบโตจำเพาะ, การแลกเนื้อ และการรอดตาย ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองแสดงในตารางที่ 9 พบว่าทั้งอัตราการเจริญเติบโต, การเจริญเติบโตจำเพาะ, การแลกเนื้อ และการรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ *L. rhamnosus* มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมซึ่งไม่ผสมเซลล์ *L. rhamnosus*

องค์ประกอบทางเคมี

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus* มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ปริมาณ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า เทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมซึ่งไม่ผสมเซลล์ *L. rhamnosus* ทั้งปริมาณความชื้น ไขมัน และเถ้าในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม (P>0.05) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในตัวปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus* มีค่าสูงกว่า และแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมซึ่งไม่ผสมเซลล์ *L. rhamnosus* (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 8 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (g) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เลี้ยงในกระชังเป็นเวลา 60 วัน

	0 day	10 day	20 day	30 day	40 day	50 day	60 day
T1 Control	6.59 ± 0.22 ^{ns}	16.92 ± 2.25 ^{ns}	30.07± 4.03 ^{ns}	53.67 ± 5.59 ^{ns}	72.39 ± 8.99 ^{ns}	86.08 ± 20.97 ^{ns}	97.50 ± 2.33 ^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	6.63 ± 0.15 ^{ns}	15.82 ± 0.80 ^{ns}	30.96± 6.23 ^{ns}	57.90 ±1.28 ^{ns}	73.54 ± 9.31 ^{ns}	92.30 ± 6.77 ^{ns}	96.65 ± 2.18 ^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 9 อัตราการเจริญเติบโต (%), การเจริญเติบโตจำเพาะ (%), การแลกเนื้อ และการรอดตาย (%) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน

	Weight gain (%)	**Specific growth rate (%/day)**	**FCR**	**Survival (%)**
T1 Control	1379.73 ± 33.30 ^{ns}	4.49 ± 0.04 ^{ns}	1.04 ± 0.03 ^{ns}	93.00 ± 1.00 ^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	1358.73 ± 64.50 ^{ns}	4.47 ± 0.07 ^{ns}	1.04 ± 0.05 ^{ns}	92.00 ± 5.29 ^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L.rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน

	Moisture	**Protein**	**Lipid**	**Ash**
T1 Control	70.95 ± 0.52 ^{ns}	49.86 ± 2.33 ^{a}	29.42 ± 3.77 ^{ns}	11.94 ± 0.79 ^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	70.97 ± 0.31 ^{ns}	53.16 ± 2.43 ^{b}	29.97 ± 3.40 ^{ns}	11.32 ± 1.08 ^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

การตรวจสอบ condition factor, hepatosomatic index ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และค่าการสะสมไขมัน (lipid retention)

ดัชนีมวลตัว (CF, condition factor) และดัชนีตัวต่อตับ (HSI, hepatosomatic index) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* แสดงในตารางที่ 11 พบว่าค่าดัชนีมวลตัว มีค่าอยู่ในช่วง 0.94 ± 0.01-0.95 ± 0.02และดัชนีตัวต่อตับ มีค่าระหว่าง 1.82 ± 0.05-1.84 ± 0.09 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (P>0.05)

ผลการทดลองพบว่าการเสริม *L. rhamnosus*ในอาหารปลาดุกลูกผสมไม่มีผลต่อค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และค่าการสะสมไขมัน (lipid retention) ดังแสดงในตารางที่ 12 ทั้งนี้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีค่าในช่วง 2.83 ± 0.18-2.90 ± 0.05การสะสมโปรตีนมีค่าในช่วง 41.90 ± 0.77-43.33 ± 2.68% และการสะสมไขมันมีค่าในช่วง 20.68 ± 1.38-23.30 ± 0.41% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม(P>0.05)

การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus* และชุดควบคุม ซึ่งทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าอยู่ในช่วง $5.27x10^7$ ± $3.24x10^7$-$9.34x10^7$ ± $2.47x10^7$cfu/g ทั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ทั้งหมดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)(ตารางที่ 13)

การทดสอบความต้านทานโรค

จากการตรวจสอบการรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตร หลังจากที่นำมาทดสอบความต้านทานโรค โดยฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* เข้าช่องท้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าตลอดระยะเวลาที่นำมาทดสอบไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นทั้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองเสริม *L. rhamnosus* และชุดควบคุม (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 11 ดัชนีมวลตัว (CF) และดัชนีตัวต่อตับ (HSI) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน

	CF	HSI
T1 Control	0.94 ± 0.01^{ns}	1.82 ± 0.05^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	0.95 ± 0.02^{ns}	1.84 ± 0.09^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 12ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ค่าการสะสมโปรตีน (protein retention) และการสะสมไขมัน (lipid retention) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน

	PER	Protein retention (%)	Lipid retention (%)
T1 Control	2.90 ± 0.05^{ns}	41.90 ± 0.77^{ns}	23.30 ± 0.41^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	2.83 ± 0.18^{ns}	43.33 ± 2.68^{ns}	20.68 ± 1.38^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 13แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/g) ในส่วนลำไส้ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริม *L. rhamnosus* เป็นเวลา 60 วัน

	Total bacteria (cfu/g)
T1 Control	$5.27x10^{7} \pm 3.24x10^{7\,ns}$
T2 *L. rhamnosus*	$9.34x10^{7} \pm 2.47x10^{7\,ns}$

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

ตารางที่ 14การรอดตายของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารทดลองเสริมเซลล์ *L. rhamnosus* หลังจากได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เป็นเวลา 10 วัน

	Survival after 10 days of *Aeromonas* challenge (%)
T1 Control	100.00 ± 00.00^{ns}
T2 *L. rhamnosus*	100.00 ± 0.00^{ns}

ค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

ns = non-significant (P>0.05)

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

มีรายงานการคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรียมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกผสมลงในอาหาร ทั้งนี้แลกติกแอซิดแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยแลกโตสเป็นกรดแลกติกทำให้ pH ภายในระบบทางเดินอาหารลดลงทำให้มีสภาพไม่เหมาะสมในการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรคตัวอย่างจุลินทรีย์กลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรียเช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์บุผิว และผลิต bacteriocins ที่มีฤทธิ์เป็น antibiotic และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Fuller, 1989) แต่จากการทดลองใช้แบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ 3 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* (TISTR 108), *Lactobacillus lactis* (TISTR 1464), *Lactobacillus plantarum* (TISTR 1465) เสริมในอาหารปลาดุกลูกผสม โดยเทียบกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร (EM) และจุลินทรีย์จากน้ำหมักชีวภาพ (กรมพัฒนาที่ดิน) ในระดับที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/g อาหาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมแบคทีเรียแลคติก พบว่าแบคทีเรีย และจุลินทรีย์ที่นำมาทดลองไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาตลอดจนไม่มีผลช่วยลดค่าอัตราการแลกเนื้อ นอกจากนี้อัตราการรอดตาย ตลอดจนค่า hepatosomatic index และ condition factor ก็ไม่แตกต่างกันในปลาที่ได้รับอาหารทดลองทุกสูตร แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษานี้อาจไม่มีผลช่วยในการย่อยอาหารหรือเร่งการเจริญเติบโตของปลาดุก ทั้งนี้โปรไบโอติบางชนิดสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตและสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในกระบวนการย่อยอาหารเช่น amylase, protease และ lipase ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยอาหารและกระบวนการย่อยสารอินทรีย์และโปรตีนเสริมสร้างการเจริญเติบโตให้สูงขึ้นและป้องกันโรคต่างๆในลำไส้ (Lara-Flores *et al.*, 2003) Balcazar *et al.* (2006) รายงานว่า จุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Agrobacterium* sp. *Pseudomonas* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp. และ *Staphylococcus* sp. อาจมีส่วนช่วยในกระบวนการย่อยอาหารในปลาอาร์กติกชาร์ (*Salvelinusalpinus*) Lara-Flores *et al.* (2010) พบว่า activity ของ alkaline phosphate สูงขึ้นในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าโปรไบโอติกช่วยกระตุ้นในการทำงานของ brush border membrane ของ enterocytes ผลการทดลองในปลาดุกลูกผสมครั้งนี้ขัดแย้งกับEssa *et al.* (2010) ที่ได้ทำการทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*,

*Lactobacillus plantarum*และเชื้อผสมทั้ง*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* และ *Saccharomyces cerevisiae*โดยผสมเชื้อแต่ละชุดการทดลองในปริมาณ 10^7CFU/g ในอาหารเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมเซลล์โปรไบโอติกทุกชุดการทดลอง มีการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ผสมโปรไบโอติก และยังพบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus subtilis* และ *Lactobacillus plantarum* มีกิจกรรมของเอนไซม์ amylase, protease และ lipase มากขึ้นกว่าชุดควบคุม และส่งผลให้ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีค่าประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตจากอาหารได้มากขึ้นกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่ผสมโปรไบโอติก

การทดลองในปลาดุกลูกผสมครั้งนี้ดำเนินการโดยเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากแหล่งที่สามารถหาได้ง่าย และเก็บรักษาให้มีความบริสุทธิ์ได้ง่าย นั่นคือมุ่งเน้นเลือกแบคทีเรียจากแหล่งเก็บรักษาที่มีในประเทศ และสามารถเข้าถึงแหล่งเก็บรักษาได้ง่าย ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวอาจมีคุณสมบัติที่ดีในเชิงอุตสาหกรรมบางอย่าง แต่ไม่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปลาดุกลูกผสมได้อย่างมีนัยสำคัญ เพราะกลไกการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ควรที่จะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ดำรงอาศัยอยู่ได้ตามธรรมชาติในลำไส้ของสัตว์น้ำที่จะนำมาใช้ จึงมักพบว่ามีการคัดเลือกจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำเพื่อนำมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ หรืออาจอยู่ในรูปเชื้อผสมจากนั้นจึงนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก เพื่อประยุกต์ใช้ในเชิงการค้า ดังเช่นDhanasekaran *et al.* (2008) ได้ทดลองแยกเชื้อจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ พบแบคทีเรียแลคติก *Lactabacillus* sp. ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas* sp. และ *Vibrio parahemolyticus* ในหลอดทดลองได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียแลคติกชนิดดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อช่วยลดปัญหาเชื้อก่อโรคในปลาดุก ในขณะที่ Kolndadacha *et al.* (2013) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวหนังของปลาดุก (*Clarias anguilaris*) และได้รายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus firmus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ดีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองครั้งนี้แม้ว่าแบคทีเรียที่นำมาศึกษาไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลา แต่จากการวิเคราะห์องค์ประกอบตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม และอาหารผสมน้ำหมักชีวภาพมีปริมาณโปรตีนในตัวปลาอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารทดลองผสมแบคทีเรียแลคติกทุกชนิด และอาหารผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตร (EM) มีโปรตีนในตัวสูงซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย และ

จุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ในการทดลองครั้งนี้มีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการย่อย หรือการทำงานของลำไส้ปลา Ghazalah *et al.* (2010) รายงานการทดลองใช้ส่วนผสมเชิงการค้า Premalac® ซึ่งประกอบด้วยเชื้อผสมของ *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergilusoryzae*, *Bifidobacterium bifedum*, *Streptococcus faecium* Torula yeast และส่วนผสมเชิงการค้า Biogen® ซึ่งประกอบด้วย hydrolytic enzyme กับ *Bacillus subtilis* เสริมในอาหารสำหรับปลานิลโดยทดลองในอาหารที่มีระดับโปรตีนต่างกันที่ระดับ 25, 27.5 และ 30% โปรตีน ผลการทดลองพบว่าทั้ง Premalac® และ Biogen® เสริมในอาหารโปรตีน 27.5 และ 30% ที่ระดับ 2 g/kg มีผลให้ปลามีการเจริญเติบโตมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อทำการคำนวณค่าประสิทธิภาพการผลิตเชิงเศรษฐกิจ พบว่าการใช้ Biogen® เสริมในอาหารที่มีระดับโปรตีน 27.5% จะทำให้เกิดความคุ้มค่าเชิงเศรษฐกิจในการเลี้ยงปลามากที่สุด

แบคทีเรียแลคติกหลายชนิดสามารถใช้เป็นโปรไบโอติกในการช่วยเสริมความต้านทานโรคในปลา Ringo and Gatesoupe (1997) กล่าวว่าแลกติกเอซิดแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยปกติแลกติกเอซิดแบคทีเรียมีส่วนช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้ของปลา โดยแลกติกเอซิดแบคทีเรียสามารถสร้าง bacteriocins เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และช่วยลด pH ในระบบทางเดินอาหารจากผลของเมตาบอลิซึม CO_2 หรือกรดอินทรีย์ต่างๆกลไกการทำงานของโปรไบโอติกเกิดขึ้นภายในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลา โปรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคโดยการแย่งยึดเกาะภายในลำไส้กับจุลินทรีย์ก่อโรค และ/หรือ สร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่น bacteriocins ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์บางชนิด โปรไบโอติกยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (Verschuere *et al.*, 2000 ; Balcazar *et al.*, 2006) แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเสริมจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอาหารให้กับปลาดุกลูกผสม ไม่มีผลต่อการรอดตายของปลาหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Zhou *et al.* (2010) ซึ่งได้ทดลองใช้ *Lactobacillus lactis* ผสมในน้ำเลี้ยงปลานิล (เติมจุลินทรีย์ลงในน้ำ 10^7CFU/ml ทุก 4 วัน) เลี้ยงปลาเป็นเวลา 40 วัน พบว่าปลาที่ได้รับโปรไบโอติกมีน้ำหนักต่อตัว และอัตราการเจริญต่อวันสูงกว่าปลาในชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีปริมาณโปรตีนรวม และ globulin ในเลือดมีค่าสูงขึ้นกว่าปลาชุดควบคุม ในด้านระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าค่า respiratory bust, lyzozyme content, myeloperoxidase และ superoxide dismutase ของปลาที่ได้รับโปรไบโอติกมีค่าเพิ่มมากขึ้นกว่าปลาในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก และ Daga *et al.* (2013) รายงานผลการศึกษาการใช้เชื้อผสมของ Lactobacillus กับ Enterococcus (FAA)

และเชื้อผสมของ Lactobacillus กับ Pediococcus (FAB) เป็นโปรไบโอติกเสริมลงในอาร์ทีเมียวัยอ่อน เพื่อใช้อนุบาลลูกปลา turbot (*Psetta maxima*) เป็นระยะเวลา 34 วัน ผลการทดลองพบว่าลูกปลาที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกทั้ง 2 ชุดการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่ม Vibrio ในทางเดินอาหารลดลง แต่จะมีปริมาณของ Lactobacillus เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารทดลองชุดควบคุม นอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติก ยังช่วยให้ลูกปลามีอัตราการรอดตายในช่วง 35-80 วันหลังฟักออกจากไข่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วยซึ่งสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองมีความแตกต่างกันดังกล่าวเกิดขึ้นได้เนื่องจากโครงสร้าง และองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน และนับเป็นปัจจัยสำคัญที่จะมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลา Ringo and Gatesoupe (1997) กล่าวว่าแลกติกเอซิดแบคทีเรียทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยปกติแลกติกเอซิดแบคทีเรียมีส่วนช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้ของปลา โดยแลกติกเอซิดแบคทีเรียสามารถสร้าง bacteriocins เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และช่วยลด pH ในระบบทางเดินอาหารจากผลของเมตาบอลิซึม CO_2 หรือกรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกก็สามารถช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ เช่น *Clostridium butyricum* สามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ Vibrioให้กับปลา rainbow trout ด้วยการเพิ่ม Phagocytosis activity ขณะที่ Nikoskelainen *et al.* (2003) ทดลองใช้แลกติกเอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 ผสมลงในอาหารที่ระดับ 10^5cfu/gปรากฏว่าสามารถกระตุ้น Respiratory burst ในปลา rainbow trout ได้มากขึ้น

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus rhamnosus* ผสมในอาหารจะช่วยให้ปลาดุกลูกผสม มีปริมาณโปรตีนในตัวมากขึ้น ขณะที่มีความชื้นในตัวปลาน้อยลง ซึ่งให้ผลในทิศทางเดียวกันทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองกึ่งภาคสนาม แต่การเสริมแบคทีเรียแลกติก และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อความต้านทานโรคของปลา

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2556) **ปลาดุก : เนื้อที่เพาะเลี้ยง ผลผลิตผลผลิตต่อไร่และจานวนครัวเรือนผู้เลี้ยงรายจังหวัดปี 2551-2553.** สืบค้นจากwww.oae.go.th/download/prcai/fishing/catfish51-53.pdf.

AOAC. (1990). **Official Methods of Analysis.** 15th ed. Washington, DC.; The Association of official Analytical Chemists.

Anwar, M.F. and Jafri, A.K. (1995). Effect of varying dietary lipid levels on growth, feed conversion, nutrient retention and carcass composition of fingerling catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Asian Fisheries Science** 8, 55-62.

Ayoola, S.O., Ajani E.K. and Fashae, O.F. (2013). Effect of Probiotics (Lactobacillus and Bifidobacterium) on Growth Performance and Hematological Profile of *Clarias gariepinus* Juveniles. **World Journal of Fish and Marine Sciences.** 5 (1), 1-8.

Balcazar, J.L., Blas, I.D., Ruiz-Zarzuela, I., Cunngham, D., Vndrell, D. and Mu-zquiz, J.L. (2006). The role of probiotic in aquaculture.**Veterinary Microbiology**. 114, 173-186.

Bruno, M.E.C. and Montville, T.J. (1993).Commoon mechanistic action of bacteriocins fromlactic acid bacteria.**Applied environment microbiology**. 59, 3003-3010.

Dagá, P., Feijoo, G., Moreira, M. T., Costas, D., Villanueva, A. G. andLema, J. M. (2013).Bioencapsulated probiotics increased survival, growth and improved gut flora of turbot (*Psetta maxima*) larvae. **Aquaculture International.**21, 337–345.

Dhanasekaran, D., Saha, S., Thajuddin, N. andPanneerselvam, A. (2008). Probiotic effect of Lactobacillus isolates against bacterial pathogens in *Clarias orientalis*. **FACTA UNIVERSITATIS: Medicine and Biology**. 15(3), 97 – 102.

El Haroun, E. R. (2007). Improved growth rate and feed utilization in farmed African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) through a growth promoter Biogen® supplementation. **Journal of Fisheries and Aquactic Science**. 2(5), 319-327.

Essa, M. A., EL- Serafy, S. S., El-Ezabi, M. M., Daboor, S. M., Esmael, N. A. and Lall, S. P. (2010). Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the Arabian Aquaculture Society**. 5(2), 143-162.

Fuller, R. (1989).A review probiotics in man and animals. **Aquaculture**. 66, 365-378.

Gatesoupe, F.J. (1997). Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. **Aquatic Living Resources**.10, 236-246.

Ghazalah1, A. A., Ali, H. M., Gehad, E. A., Hammouda, Y. A. and Abo-State, H. A. (2010). Effect of Probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)* Fed Low Protein Diets. **Nature and Science**. 8(5), 46-53.

Halver, J. E. and Hardy, R. W. (2002).**Fish Nutrition**, 3rd ed. New York; Academic Press.

Kiriratnikom, S. &Kiriratnikom, A. (2012). Growth, feed utilization, survival and body composition of fingerlings of Slender walking catfish, *Clarias nieuhofii*, fed diets containing different protein levels. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 34(1), 37-43.

Kolndadacha, O. D., Adikwu I. A., Orgem C. M., Atiribom R. Y., andBadmus O. (2013). The potential probiotic bacteria associated with catfish (*Clarias anguillaris*and *Heterobranchus bidorsalis*) in concrete tanks in Kanji Lake area, Nigeria. **International Journal of Microbiology and Immunology Research**. 2(3), 24-28.

Lara-Flores, M., Olivera-Novoa, M.A., Guzman-Mendez, B.E. and Lopez-Madrid, W. (2003). Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoter in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. 216, 193-201.

Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L. andOlivera-Novoa, M.A. (2010). Effect of the inclusion ofa mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal

enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Internatioonal Journal of Fisheries and Aquaculture**. 2, 93-101.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish & Shellfish Immunology**. 15, 443–452.

Rico-mora, R., Voltolina, D. and Villaescusa-Celaya, J.L. (1998). Biological control of *Vibrio alyginolyticus* in *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*). **Aquacultural Engineering**. 19, 1-6.

Ringo, E. and Gatesoupe, F.J. (1998). Lactic acid bacteria in fish : a review. **Aquaculture**.160, 177-203.

Sugita, H., Matso, N., Hirose, Y., Iwato, M. and Deguchi, Y. (1997). Vibrio strain NM 10, isolate from intestine of Japan costal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. **Applied environment microbiology**. 63, 4986-4989.

Temmerman, R., Pot, B.,Huys, G. and Swing, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products.**International Journal of Food Microbiology**. 81, 1-10.

Toko, I., Fiogbe, E. D., Koukpode, B. andKestemont, P. (2007). Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and Vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): Effect of stocking density on growth, production and body composition. **Aquaculture** 262 (1), 65-72.

Van Weerd, J. H. V. (1995). Nutrition and growth in *Clarias* species - a review.**Aquut.Living Resour**.8, 395-401.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. andVerstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Review**64, 655-671.

Welker, T. L. andLim, C. (2011). Use of Probiotics in Diets of Tilapia. **Journal of Aquaculture Research & Development**. S01:014.

Zhou, X., Wang, Y., Yao, J. and Li, W. (2010).Inhibition ability of probiotic, *Lactococcuslactis*, against *A.hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*).International **Journal of Engineering, Science and Technology**. 2 (7), 73-80.