แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer*

นางสาวทศพร เรืองรักษ์ลิขิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6477-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LACTIC ACID BACTERIA AS PROBIOTICS IN WHITE SEABASS *Lates calcarifer*

Miss Thosaporn Rueangruklikhit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6477-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer*
โดย	นางสาวทศพร เรืองรักษ์ลิขิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทศพร เรืองรักษ์ลิขิต : แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (LACTIC ACID BACTERIA AS PROBIOTICS IN WHITE SEABASS *Lates calcarifer*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ 165 หน้า. ISBN 974-17-6477-4.

แยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของปลากะพงขาว เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก ด้วยเทคนิค well agar diffusion พบ 5 ไอโซเลต (กำหนดให้เป็น LAB-1 - LAB-5) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* แบคทีเรียก่อโรคในปลาได้ ผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบในอาหารผสมแบบเปียก พบว่า ในอาหารมีปริมาณสารอาหารต่างๆเพียงพอกับความต้องการของปลากะพงขาว ยกเว้นปริมาณไขมันที่ต่ำเกินไป ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์(LC_{50}) หลังจากที่ปลาได้รับเชื้อแล้ว 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 7.76 log_{10} เซลล์/มิลลิลิตร และที่ 96 และ 120 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 7.47 และ 7.26 log_{10} เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำอาหารที่เตรียมได้ไปเลี้ยงปลากะพงขาวในตู้กระจก โดยผสมอาหารกับแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้ให้มีความเข้มข้น 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร พบว่า มีเพียง LAB-4 เท่านั้น ที่มีความสามารถในการเสริมการเจริญเติบโตของปลาและต้านโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อทำการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังโดยใช้ LAB-4 ผสมในอาหารปลาโดยใช้ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดชีวิต การเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) สามารถตรวจพบ LAB-4 ในลำไส้ของปลากะพงขาวทั้ง 2 กลุ่มทดลองและไม่พบ LAB-4 ในกลุ่มควบคุม ปลากะพงขาวที่ตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* แสดงวิการของโรคอย่างชัดเจนและสามารถตรวจพบ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อของปลาที่ตายด้วยเทคนิคทาง Immunohistochemistry พิสูจน์เอกลักษณ์ของ LAB-4 ด้วยการตรวจสอบรูปร่างลักษณะ ปริมาณกรดแลกติกด้วยเทคนิค HPLC และสมบัติบางประการทางชีวเคมี รวมทั้งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อใช้เทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Weissella confusa* ที่มีรายงานใน Genbank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAB-4 มีความใกล้เคียงกับ *Weissella* sp.

สาขาวิชา…….เทคโนโลยีชีวภาพ…………ลายมือชื่อนิสิต…………………………………………

ปีการศึกษา……….2547…………………..ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา......................................

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.................................

4572305923 : PROGRAM BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: LACTIC ACID BACTERIA / PROBIOTICS / WHITE SEABASS *Lates calcarifer*

THOSAPORN RUEANGRUKLIKHIT : LACTIC ACID BACTERIA AS PROBIOTICS IN WHITE SEABASS *Lates calcarifer*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., THESIS-COADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., 165 pp. ISBN 974-17-6477-4.

Lactic acid bacteria were screened from gastrointestinal tract (GI tract) of white seabass in order to investigate the possibility of being probiotics. Using well agar diffusion technique, five isolates(designated as LAB-1 – LAB-5) were found and could inhibit *Aeromonas hydrophila*, a causative agent in white seabass *in vitro*. Proximate analysis of prepared fish feed reached the nutrient requirement for white seabass growth, only lipid was low. Median lethal concentration(LC_{50}) of *A. hydrophila* in white seabass were tested at 7.76, 7.47 and 7.26 $\log_{10}$ cells/ml for 72, 96 and 120 hours, respectively. Culturing white seabass in aquarium with individual LAB at the concentration of 10^7 cells/g feed were tested. Only LAB-4 could grow and resist to *A. hydrophila* infection better than those of the control group ($p<0.05$). White seabass cultured in net cages with LAB-4 feed at two different doses (10^5 and 10^7 cells/g) did not show any significant difference on growth, survival and *A. hydrophila*'s resistance as compared to those results from the control group ($p>0.05$). Under scanning electron microscopic examination showed LAB-4 adherence on fish intestines' surface in both LAB-4 treatment groups while no detection in control group. Confirmation of *A. hydrophila* challenge on white seabass was performed by observing disease manifestation and immunohistochemistry technique. After examination of morphology, biochemical test, lactic acid determination by HPLC from LAB-4 broth culture, including 16S rDNA sequencing (E=0.0 and 99% homology with 16S rDNA of *Weissella confusa*, Genbank), LAB-4 was identified as *Weissella* sp.

Field of study……….Biotechnology……….Student's signature.....................................….
Academic year………….2004……………..Advisor's signature......................................….
Co-advisor's signature..................................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. เจริญ นิติธรรมยง ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ, ผศ. ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ และ ผศ. ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ และ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และ คุณเสรี ดอนเหนือ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการเลี้ยงปลา รวมทั้งห้องวิจัยพันธุศาสตร์โมเลกุล

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร และ น.สพ. เกรียงไกร ประการแก้ว ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำ Immunohistochemistry

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้คำแนะนำ ตลอดชีวิตการศึกษาของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณสมาชิกในครอบครัว ที่ดูแลและให้กำลังใจเสมอมา สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้แก่ชีวิตของปลากะพงขาวทุกตัว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ...จ

กิตติกรรมประกาศ...ฉ

สารบัญ..ช

สารบัญตาราง..ซ

สารบัญรูป..ฌ

บทที่

1. บทนำ..1

2. การตรวจเอกสาร...3

3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง...21

4. ผลการทดลอง...42

5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..66

รายการอ้างอิง...76

ภาคผนวก...83

ภาคผนวก ก...84

ภาคผนวก ข...87

ภาคผนวก ค...91

ภาคผนวก ง...94

ภาคผนวก จ...99

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์...165

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ...19
2. นิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับหานิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัล ดีเอ็นเอของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย…………………………………………………..41
3. ขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากเชื้อทดสอบโดยส่วนน้ำใสของ LAB………43
4. สมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีของ LAB-1 – LAB-5……………………………….44
5. การใช้คาร์โบไฮเดรตของ LAB-1 – LAB-5……………………………………………44
6. การเจริญของ LAB-1 – LAB-5 ในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ…………….45
7. การเจริญของ LAB-1 – LAB-5 ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีระดับความเข้มข้นต่างๆ………..45
8. ระดับโปรตีนและไขมันของส่วนประกอบต่างๆในอาหารปลา…………………………..46
9. ส่วนประกอบของอาหารปลากะพงขาวในการทดลอง…………………..……………46
10. ผลการตรวจวิเคราะห์อาหารปลาแบบเปียก(Moist diet)………………………………..47
11. จำนวนปลากะพงขาวที่ตายหลังเติม *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆใน น้ำเลี้ยงปลา เป็นเวลา 120 ชั่วโมง……………………………………………………48
12. ปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียเฉลี่ยในอาหารปลา(น้ำหนักเปียก)……..………………49
13. น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก........…...………50
14. ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก…….…………51
15. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวในตู้กระจก เป็นระยะเวลา 30 วัน…..……..53
16. น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ในกระชัง………………………....55
17. ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ในกระชัง………………………....56
18. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง เป็นระยะเวลา 60 วัน……………58

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ปลากะพงขาว white seabass *Lates calcarifer*……………………..……………………3
2. ค่า LC_{50} ของ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลากะพงขาวตายที่เวลาต่างๆ…………………...48
3. น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก…………………51
4. ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก…….…………52
5. การรอดชีวิตวันที่ 30 ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิด แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก…..…..52
6. ปริมาณการตายสะสมของปลากะพงขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* หลังการเลี้ยงในตู้กระจก เป็นระยะเวลา 30 วัน…………………………………………54
7. น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ในกระชัง……………………..56
8. ความยาวเฉลี่ยปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ในกระชัง……………………..57
9. การรอดชีวิตวันที่ 60 ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์ต่อกรัมอาหาร ในกระชัง………57
10. ปริมาณการตายสะสมของปลากะพงขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* หลังการเลี้ยงในกระชัง เป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) เซลล์ต่อกรัมอาหาร…………………………………..………………...59
11. ปริมาณการตายสะสมของปลากะพงขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* หลังการเลี้ยงในกระชัง เป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^7 (LAB-4/7)เซลล์ต่อกรัมอาหาร…………………………………………………………59

12a. การยึดเกาะของแบคทีเรียภายในลำไส้ของปลากะพงขาวกลุ่มควบคุม…………………60

12b. การยึดเกาะของแบคทีเรียภายในลำไส้ของปลากะพงขาวกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร ที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อกรัมอาหาร (LAB-4/5)……….60

12c. การยึดเกาะของแบคทีเรียภายในลำไส้ของปลากะพงขาวกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร ที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อกรัมอาหาร (LAB-4/7)…..…..60

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

13a. ปลากลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila*……………..........….61

13b. ปลากลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila*………………………61

13c. วิการของโรคที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila*……...............……61

13d. วิการของโรคที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila*……….............…61

14a. เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปลากะพงขาวกลุ่มควบคุม..62

14b. เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปลากะพงขาวกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila*………………………………………………………………………62

14c. เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเนื้อเยื่อส่วนไขมันของปลากะพงขาวกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วย *A. hydrophila*…………………………………………………………………62

14d. เนื้อเยื่อบริเวณหลอดเลือดของปลากะพงขาวกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila*………………………………………………………………………62

14e. เนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุลำไส้ของปลากะพงขาวกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย *A. hydrophila*…..62

14f. เนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุลำไส้ที่สามารถมองเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย *A. hydrophila*…………………………………………………62

15. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAB-4……………………………………………………...63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อาชีพหลักของคนไทย คือ การเกษตร ซึ่งประกอบด้วย พืช ปศุสัตว์ ประมง ป่าไม้ ในอาชีพดังกล่าวการประมงนับว่าเป็นอาชีพที่สร้างผลผลิตทางการเกษตรก่อให้เกิดกิจกรรมการผลิตทางเศรษฐกิจที่สำคัญมากแขนงหนึ่งของประเทศไทย ผลผลิตทั้งหมดได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง แต่ในปัจจุบันแนวโน้มของการจับสัตว์น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติลดลง ปริมาณที่จับได้ไม่แน่นอน ทำให้มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย และสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ก็คือ ปลากะพงขาวเพราะเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ให้ผลผลิตสูงจึงเป็นปลาที่ได้รับความสนใจจากบรรดาผู้เพาะเลี้ยงและมีแนวโน้มจะประกอบเป็นอาชีพหลักกันมากขึ้น

ปลากะพงขาว(*Lates calcarifer*) เป็นปลาที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมมานานกว่า 20 ปี ทั้งในและต่างประเทศ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และออสเตรเลีย ปลาชนิดนี้มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มสูง ในประเทศไทยนอกจากจะมีการเลี้ยงในกระชังตามชายฝั่งทะเล ยังมีการเลี้ยงในบ่อน้ำจืดในหลายจังหวัด เช่น ปทุมธานี อ่างทอง ชลบุรี เป็นต้น (จิรศักดิ์ และคณะ, 2534) ปลากะพงขาวเป็นปลาที่นิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีรสชาติดีสามารถนำมาปรุงแต่งเป็นอาหารได้หลายแบบรวมทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการ มีส่วนประกอบของไขมันเพียงเล็กน้อยและมีวิตามินบี12 ในปริมาณมาก(สมใจ, 2527) ปลากะพงขาวจึงเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่กรมประมงส่งเสริมให้เลี้ยง ปัจจุบันเกษตรกรไทยนิยมผลิตลูกปลาชนิดนี้ส่งไปจำหน่ายยังประเทศมาเลเซียและไต้หวัน(กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2535) ในการเลี้ยงปลากะพงขาวให้มีสุขภาพแข็งแรงนั้นเป็นสิ่งสำคัญ บางครั้งผู้เลี้ยงประสบปัญหาต่างๆ อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ เช่น กฤษณ์ (2545) ได้ศึกษาปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังจังหวัดสงขลา ปีการผลิต 2543 พบว่า ปัญหาน้ำเสียจากโรงงานและนากุ้งทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงปลาจะมีอาการซึม ลอยตัวขึ้นมาเหนือน้ำและกินอาหารน้อยลง แสดงว่าปลาเริ่มอ่อนแอ จึงเป็นโอกาสให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและเกิดโรคระบาดได้ง่าย แบคทีเรียสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในปลากะพงขาว ได้แก่ *Vibrio* spp. และ *Aeromonas hydrophila* การรักษาโดยทั่วไปนั้นใช้สารปฏิชีวนะ เช่น เททราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล 2.8-3.0 กรัมผสมกับอาหาร 1 กิโลกรัม ให้ปลากินติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 7 วัน หรือ นำสารปฏิชีวนะในปริมาณมากกว่าปริมาณที่กำหนดผสมกับน้ำและนำปลามาแช่ในระยะเวลาสั้นซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวหากใช้อย่างไม่ระมัดระวังอาจทำให้ปลาตายได้(Powell, 2000) ในปัจจุบันพบปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียและปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้าง จึงมีการรณรงค์ให้ลดการใช้สารปฏิชีวนะ และหาวิธีการป้องกันโรคที่เกิดจาก

แบคทีเรียในปลากะพงขาวด้วยวิธีการใหม่ๆ เช่น การใช้วัคซีน พบว่าในลูกปลากะพงขาววัคซีนให้ผลในการป้องกันโรคแต่ไม่สามารถช่วยให้ปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าในลูกปลากะพงขาวที่ไม่รับวัคซีน(จิรศักดิ์ และคณะ, 2534) การใช้โพรไบโอติกเป็นอีกวิธีที่เริ่มมีการศึกษาได้ผลแล้วในไก่(ฐิติพงษ์, 2539) สุกร(Zani, 1988) กุ้ง(วรรนิภา, 2539)และปลาบางชนิด เช่น Rainbow trout(Nikoskelainen, 2001) แต่ยังไม่มีการศึกษาในปลากะพงขาว ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกของปลากะพงขาวเพื่อเพิ่มความต้านทานโรค ความแข็งแรง และการเจริญเติบโตให้แก่ปลากะพงขาวเพื่อให้ธุรกิจการเลี้ยงปลาชนิดนี้ของเกษตรกรมีความเสี่ยงลดลงและเป็นธุรกิจที่ยั่งยืนต่อไป

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการคัดเลือกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของปลากะพงขาวที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและเพิ่มการเจริญเติบโตของปลาได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

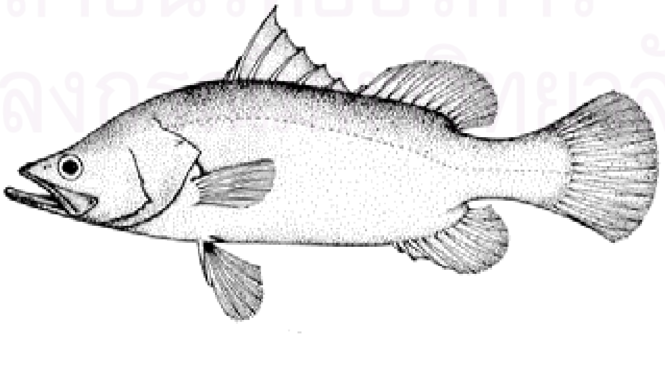
การตรวจเอกสาร

1. ปลากะพงขาว

1.1 **ลักษณะทั่วไป** (รูปที่1)

ลักษณะลำตัวค่อนข้างยาวและหนา แบนข้างเล็กน้อย บริเวณไหล่จะโค้งมน ส่วนตัวจะลาดชันและเว้า ส่วนของขากรรไกรล่างจะยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้นและตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียดบนขากรรไกรบนและล่าง และที่เพดานปาก ตาของปลาชนิดนี้มีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม แผนแก้มมีขนาดใหญ่ มีขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ และเรียงต่อด้วยซี่เล็กๆ จัดตามแนวหลัง ด้านบนส่วนหัวและบนแผ่นเหงือกมีเกล็ดขนาดต่างๆกัน เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่ ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องจะมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบหลังครีบก้น ครีบหาง จะมีสีเทาปนเงินบางๆ มีครีบหลังสองตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็งแหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบางๆ ครีบหลังตอนที่สอง แยกจากตอนแรกอย่างเห็นได้ชัด มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนง มี 10-11 ก้าน ครีบหูและครีบอกยาวไม่ถึงรูก้น ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่สอง ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 7-8 ก้าน ข้อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลม เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 52-61 เกล็ด(สโมสรคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2531)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ปลากะพงขาว white seabass *Lates calcarifer*

ที่มา : www.fao.org

1.2 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) ว่า *Lates calcarifer* (Bloch)

Phylum Chordata

Sub-Phylum Vertebrata

Sub-class Teleostomi

Order Percomorphi

Family Centropomidae

Genus *Lates*

Species *calcarifer*

1.3 แหล่งกำเนิดและการแพร่กระจาย

ปลากะพงขาวเป็นปลาในท้องถิ่นที่พบตามชายฝั่งทะเลและหมู่เกาะของประเทศต่างๆ ในภูมิภาคอินโดแปซิฟิค และจัดเป็นตัวอย่างของปลาเขตร้อนที่มีการแพร่กระจายในบริเวณค่อนข้างกว้างมาก คือ บริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวเปอร์เซีย บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา สาธารณรัฐสังคมนิยมแห่งสหภาพพม่า ไทย มาเลเซีย กัมพูชาประชาธิปไตย สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ตอนเหนือของออสเตรเลีย และตอนใต้ของสาธารณรัฐประชาชนจีน(สมใจ, 2527) เนื่องจากปลากะพงขาวพบในหลายประเทศ ทำให้มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับประเทศนั้นๆ เช่น ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ giant perch, white seabass, silver seaperch, palmer และ cock-up seabass ภาษาอินเดีย begti, gitador และ boor ภาษาฟิลิปปินส์ kakap, katuyot และ bulgan ภาษาอินโดนีเซีย pelak, telap และ petcham เป็นต้น

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ที่สุด เจริญเติบโตได้ดีในน้ำกร่อยและน้ำจืด จัดได้ว่าเป็นปลาประเภทสองน้ำ คือ ในช่วงชีวิตของปลากะพงขาวจะมีการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม ปลากะพงขาวขนาดใหญ่จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากฝั่งมากนัก พบมากตามบริเวณปากแม่น้ำลำคลอง ปากทะเลสาปและปากอ่าวบริเวณที่เป็นป่าไม้ชายเลนที่มีน้ำเค็มท่วมถึง สำหรับประเทศไทยสามารถพบปลากะพงขาวตามชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะบริเวณปากแม่น้ำใหญ่ๆที่มีทางออกติดต่อกับทะเลมีป่าไม้ชายเลนขึ้นปกคลุม เช่น จังหวัดตราด จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม ฯลฯ

ปลากะพงขาวจะผสมพันธุ์และวางไข่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 28-32 ส่วนในพันส่วน ในทะเลที่มีความลึก หลังจากนั้นไข่จะถูกพัดพาเข้าสู่บริเวณชายฝั่งและฟักออกเป็นตัว ลูก

ปลากะพงขาวที่ฟักออกเป็นตัว จะดำรงชีวิตอยู่ในน้ำกร่อยและน้ำจืด จนมีอายุได้ 2-3 ปี มีขนาด 3-5 กิโลกรัม จะเคลื่อนตัวออกสู่ทะเล เพื่อทำการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไป(สมใจ,2527)

1.4 วิธีการเพาะเลี้ยง

แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ

1.4.1 การเลี้ยงปลาในนากุ้ง ส่วนใหญ่จะมีพื้นที่ตั้งแต่ 2 ไร่ขึ้นไป ลูกปลาที่ปล่อยมีขนาด 1-2 เซนติเมตร ความหนาแน่นที่เลี้ยงไร่ละ 800-1,600 ตัว

1.4.2 การเลี้ยงปลาในบ่อน้ำกร่อย ขนาด 2.5-10 ไร่ ความหนาแน่นที่เลี้ยงไร่ละ 1,600-3,200 ตัว

1.4.3 การเลี้ยงปลาในกระชัง เป็นวิธีที่นิยมมาก เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการลงทุนต่ำกว่าการขุดบ่อเลี้ยงเป็นอย่างมาก รวมทั้งสามารถปล่อยพันธุ์ปลาลงเลี้ยงได้เป็นจำนวนมากกว่าเพราะน้ำถ่ายเทได้ดีช่วยให้ปลามีอัตรารอดสูง ขนาดของกระชังที่นิยมใช้ คือ 5x5เมตร สามารถปล่อยเลี้ยงได้ตั้งแต่ 10-20 ตัว/ตารางเมตร(วิเศษและวิไลวรรณ, 2529)

1.5 สมบัติของน้ำในบ่อเลี้ยง(คู่มือชุดทดสอบฟอสเฟต,ไนไตรท์,ไนเตรทและแอมโมเนียรวม ของบริษัท พรีมาเทค จำกัด; มั่นสิน, 2539)

1.5.1 อุณหภูมิของน้ำ ควรมีค่าคงที่ สม่ำเสมอตลอดฤดูการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส

1.5.2 ความเค็มของน้ำ ควรอยู่ในช่วง 27-32 ส่วนในพัน และมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงที่ไม่กว้างมากนัก อย่างไรก็ตามความเค็มของน้ำที่อยู่ในช่วง 10-32 ส่วนในพัน จะสามารถทำการเลี้ยงปลากะพงขาวได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ปลากะพงขาวยังสามารถเจริญเติบโตในน้ำจืดได้เช่นกัน

1.5.3 ปริมาณของออกซิเจนในน้ำ ควรจะมีอยู่ในปริมาณที่สูงพอสมควรและมีค่าคงที่อยู่เสมอไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก นักประมงได้สรุปอิทธิพลของออกซิเจนในน้ำไว้ดังนี้ หากมีออกซิเจนในน้ำน้อยกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร นานหลายชั่วโมง ปลาอาจตายได้ ออกซิเจนในน้ำอยู่ระหว่าง 1-5 มิลลิกรัม/ลิตร ปลาสามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่ถ้าเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องปลาจะเจริญเติบโตช้าและไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ดี ออกซิเจนในน้ำมากกว่า 5 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ไม่เกินระดับอิ่มตัวเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์

1.5.4 ความเป็นกรด-ด่าง(pH) ปลาและสิ่งมีชีวิตในน้ำสามารถดำรงอยู่ได้ที่ pH ที่เป็นกลางประมาณ 6-9 pH ที่สูงหรือต่ำเกินไปจะสร้างความเครียดให้กับปลา บางครั้งถึงกับทำให้สิ่งมีชีวิตในน้ำตายได้ทันที

1.5.5 ความเป็นด่าง(alkalinity) สภาพด่าง หมายถึง ความสามารถของน้ำที่จะรับ H^+ เพื่อทำให้กรดเป็นกลาง ความเป็นด่างจะวัดในรูปของ $CaCO_3$ น้ำที่ใช้เลี้ยงปลาควรมีความเป็นด่างมากกว่า 20-40 ppm และควรมีค่าอยู่ระหว่าง 100-120 ppm ผลของความเป็นด่างนั้นจะส่งผลต่อปริมาณฟอสเฟตและสารอาหารอื่นๆในน้ำด้วย

1.5.6 ฟอสเฟต(PO_4^{3+}) เป็นสารประกอบที่ให้ธาตุอาหารฟอสฟอรัสสำหรับแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรีย ที่จะทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของอาหารธรรมชาติในบ่อ ได้แก่ แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ สัตว์หน้าดิน โดยปกติแล้วปริมาณฟอสเฟตในน้ำจะอยู่ในระดับต่ำตลอดเวลาเนื่องจากฟอสเฟตสามารถดูดซึมอย่างรวดเร็วโดยแพลงก์ตอนและแบคทีเรียอีกทั้งยังตกตะกอนกับแคลเซียมในสภาพที่น้ำมีpHสูง และตกตะกอนกับอลูมิเนียมและเหล็กในสภาพที่น้ำมีpHต่ำ การที่ปริมาณฟอสเฟตในน้ำสูงบ่งชี้ว่าน้ำมีของเสียมาก แพลงก์ตอนพืชจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนอาจทำให้น้ำเน่าเสียซึ่งเป็นต้นเหตุให้ ออกซิเจนในน้ำต่ำลง จนปลาเป็นอันตรายได้ โดยในแหล่งน้ำเค็มทั่วๆไปจะมีฟอสเฟตอยู่ 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร หากปริมาณของฟอสเฟตเปลี่ยนแปลงไปควรแก้ไข ดังนี้ ปริมาณของฟอสเฟตในช่วง 0.0-0.05 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่าพื้นที่ดินกรด ควรปรับpH ดินให้ได้มากกว่า 5.5 และเติมปุ๋ยทริปเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟต 400 กรัม/ไร่ ทุก 7 วัน ปริมาณของฟอสเฟตในช่วง 1.0-10.0 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่ามีการเลี้ยงปลาในปริมาณที่หนาแน่นและอาจมีอาหารตกค้างมาก การเลี้ยงปลาในน้ำเค็มควรควบคุมให้น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และในน้ำจืดควรควบคุมให้น้อยกว่า 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

1.5.7 ไนไตรท์(NO_2^-) เป็นผลผลิตที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนีย การสะสมไนไตรท์ในน้ำจะเกิดขึ้นเมื่อมีการเน่าสลายของสารอินทรีย์และปล่อยแอมโมเนียออกมามาก ในสภาวะที่มีออกซิเจนแอมโมเนียมจะเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และในกรณีที่น้ำมีpHสูงกว่า 8 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทจะลดลงทำให้เกิดการสะสมไนไตรท์ในน้ำ ซึ่งไนไตรท์จะถูกดดูซึมเข้าสู่ปลาทางเหงือกและจะไปทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลบินในเลือดทำให้ไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนได้ เลือดจะเป็นสีน้ำตาล หรือเรียกว่าโรคเลือดสีน้ำตาล ความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอมโมเนียสูง ไนไตรท์ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับที่ทำให้สัตว์น้ำตาย จะทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอและติดโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียได้ง่าย ในน้ำเลี้ยงปลาควรมีไนไตรท์น้อยกว่า 0.1-0.3 มิลลิกรัม/ลิตร

1.5.8 ไนเตรท(NO_3^-) เป็นสารประกอบที่ให้ธาตุอาหารไนโตรเจนสำหรับแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่จะทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของอาหารธรรมชาติในบ่อ ได้แก่ แพลงก์ตอนพืช

แพลงก์ตอนสัตว์ สัตว์หน้าดิน ไนเตรทมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำต่ำมาก แต่การสะสมของไนเตรทในน้ำปริมาณสูงๆ อาจแสดงให้เห็นถึงภาวะในแหล่งน้ำ และในบางสภาวะที่เกิดการขาดออกซิเจนไนเตรทอาจถูกเปลี่ยนกลับไปในรูปไนไตรท์ ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาได้ ในแหล่งน้ำทั่วๆไปจะมีไนเตรทอยู่ 0.0-0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และปริมาณไนเตรทที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลาควรอยู่ในช่วง 0.01-0.05 มิลลิกรัม/ลิตร

1.5.9 แอมโมเนียรวม(NH_4^+/NH_3) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากการปล่อยของเสียจากการกินอาหารพวกโปรตีนออกมาในรูปแอมโมเนียและการเน่าสลายของเศษอาหาร ซึ่งเกิดจากอาหารที่เหลือและเศษอาหารที่ขับถ่ายออกมาภายในบ่อแล้วเกิดการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ภายในบ่อ แอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำมี 2 รูปแบบ คือ แอมโมเนีย(NH_3) ที่ยังไม่แตกตัวจะเป็นพิษกับสัตว์น้ำ และแอมโมเนียมไอออน(NH_4^+) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ปัจจัยที่มีผลต่อแอมโมเนีย คือ ออกซิเจนในน้ำ ค่าpH ปริมาณแอมโมเนียรวมในน้ำช่วง 0.4-2.0 มิลลิกรัม/ลิตร จะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ผลของแอมโมเนียจะทำให้สัตว์อ่อนแอ ติดเชื้อโรคง่าย ไม่สามารถขับถ่ายออกได้ ปริมาณแอมโมเนียรวมในน้ำควรอยู่ในช่วง 0.0-0.06 มิลลิกรัม/ลิตร

1.6 อาหาร

ปลากะพงขาวจะกินอาหารตามช่วงอายุ ช่วงชีวิตส่วนใหญ่จะกินเนื้อหรือกินสัตว์ที่มีขนาดเล็กกว่าเป็นอาหาร จึงจัดเป็น Carnivorous fish เราสามารถแบ่งชนิดและระยะเวลาการให้อาหารในการเลี้ยงปลากะพงขาว ได้ดังนี้

1.6.1 คลอเรลลา จัดเป็นแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาดเล็กมาก เหมาะที่จะใช้เลี้ยงลูกปลากะพงขาวที่มีอายุ 2-10 วัน คลอเรลลาที่ใส่ลงในบ่ออนุบาลจะเป็นอาหารสำหรับให้ลูกปลาและโรติเฟอร์กินเป็นอาหารช่วยบดบังแสงแดดให้กับลูกปลา และช่วยขับของเสียบางอย่างที่ละลายอยู่ในน้ำ เป็นการช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำให้อยู่ในสภาพดีด้วย

1.6.2 โรติเฟอร์ เป็นไรน้ำขนาดเล็ก กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร การให้โรติเฟอร์เป็นอาหารแก่ลูกปลานั้น ใช้ถุงแพลงก์ตอนเก็บรวบรวมโรติเฟอร์จากบ่อเพาะโรติเฟอร์ไปใส่ในบ่ออนุบาลลูกปลาให้เพียงพอ ประมาณ 5-10 ตัวต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร ปกติจะให้โรติเฟอร์เป็นอาหารเมื่อลูกปลาอายุครบ 3 วันจนลูกปลาอายุได้ 14 วัน

1.6.3 อาร์ทีเมีย เริ่มให้อาร์ทีเมียแก่ลูกปลา เมื่อลูกปลาอายุได้ 8 วัน เพราะมีลูกปลาตัวโตที่ สามารถกินอาร์ทีเมียแทนโรติเฟอร์ได้ ปกติแล้วจะให้อาร์ทีเมียจนกว่าลูกปลาจะกินเนื้อปลาบดได้ หรือเมื่อลูกปลามีอายุได้ 20 วัน

1.6.4 เนื้อปลาสับละเอียด ลูกปลามีอายุครบ 21 วันขึ้นไป เริ่มฝึกให้กินเนื้อปลาสับละเอียดโดยในตอนแรกลูกปลาซึ่งไม่เคยกินและยังไม่ยอมกิน ต้องพยายามฝึกเป็นประจำ

1.6.5 เนื้อปลาเป็นชิ้น เมื่อปลาอายุได้ 2-3 เดือน ปลากะพงขาวจะชินกับเหยื่อที่ตายแล้วและปลาเริ่มโต ปลาที่ให้ไม่จำเป็นต้องสับละเอียดอีก ให้หั่นเป็นชิ้นๆ ใช้เลี้ยงปลากะพงขาวจนถึงขนาดที่จะบริโภคหรือขายได้(สมใจ, 2527)

นอกจากอาหารที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น เมื่อปลาผ่านพ้นช่วงอนุบาลลูกปลา สามารถฝึกปลากะพงขาวให้กินอาหารผสม(Mixed Diet)ในรูปอาหารเม็ดแบบเปียก(Moist Pellet)ได้ โดยต้องมีระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของปลา(วิเชียรและคณะ, 2532) ส่วนประกอบทั่วไปของอาหารปลากะพงขาว ประกอบด้วย ปลาป่น, รำข้าว, วิตามิน, แร่ธาตุ, แป้งเจลาติน, วิตามินซี, น้ำมันปลาทะเล, น้ำมันพืช, น้ำ(Boonyaratpalin, 1988)

วิเชียรและคณะ(2532) ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวขนาดความยาวเฉลี่ย 7.57 เซนติเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 5.07 เซนติเมตร ด้วยอาหารผสม(Mixed Diet) และใช้ในรูปอาหารเม็ดแบบเปียก(Moist Pellet) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยใช้อาหารผสมที่มีโปรตีน 3 ระดับ คือ 45, 48 และ 51 % แต่ละระดับมีไขมัน 13 และ 18 % รวมเป็นอาหาร 6 สูตร และเป็นอาหารผสมอีก 1 สูตร ซึ่งมีระดับโปรตีน 54 % ไขมัน 13 % เป็นอาหารเปรียบเทียบ พบว่า อาหารสูตรที่มีโปรตีน 45 % ไขมัน 18 %(จากการคำนวณ) มีอัตราการรอด 100 %และการเจริญเติบโตดีที่สุด และจากการวิเคราะห์อาหารสูตรดังกล่าว พบว่า มีระดับโปรตีน 46.71 % ไขมัน 15.64 %

Catacutan และ Coloso(1997) ศึกษาระดับคาร์โบไฮเดรต 2 ระดับ คือ 15, 20 % และระดับไขมัน 3 ระดับ คือ 6, 12, 18 % ระดับโปรตีนคงที่ 42.5 %ทุกสูตรอาหารในอาหารผสม ปลากะพงขาวที่ใช้มีน้ำหนักเริ่มต้น 0.85-0.93 กรัม เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่มีระดับคาร์โบไฮเดรต 20 %กับระดับไขมัน 12 หรือ 18 % ทำให้น้ำหนักและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีอัตราสูงสุด และสูตรอาหารที่มีระดับคาร์โบไฮเดรต 15 % กับระดับไขมัน 6 % ทำให้น้ำหนักและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีอัตราต่ำสุด

Boonyaratpalin(1997) รายงานระดับสารอาหารที่ปลากะพงขาวต้องการไว้ว่า ปลากะพงขาวต้องการโปรตีน 45-55 %, ไขมัน 15-18 %, คาร์โบไฮเดรต ไม่เกิน 20 % ส่วนระดับและชนิดของวิตามิน, แร่ธาตุขึ้นอยู่กับขนาดและระยะการเจริญของปลา

Williams et al.(2003) ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 230 กรัม ด้วยอาหารผสมที่ระดับโปรตีน 38, 42.5 และ 52 % ไขมัน 7, 12.8 และ 18.3 % พบว่า สูตรอาหารที่มีระดับโปรตีน 52 กับ ไขมัน 18.3 % ทำให้น้ำหนักและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ส่วนปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 80 กรัม ด้วยอาหารผสมที่ระดับโปรตีน 43.8 และ 64.7 % ไขมัน 11.5 และ 22.4 % พบว่า สูตรอาหารที่มีระดับโปรตีน 64.7

กับ ไขมัน 22.4 % ทำให้น้ำหนักและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

1.7 ระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารเริ่มต้นตั้งแต่ปากไปสุดที่รูทวารหนัก อาหารจะผ่านจากช่องปากของปลาตรงเข้าไปในคอหอย(pharynx) ปลาบางชนิด เช่น พวกปลาหลังเขียว(herrings) จะมีคอหอยที่ดัดแปลงเป็นกล้ามเนื้อหนาช่วยในการบดอาหาร ทำหน้าที่คล้ายกระเพาะบดในพวกนก พวกปลากินเนื้อจะมีฟันที่คอหอยทำหน้าที่ช่วยกัดหรือบดอาหารให้เป็นชิ้นเล็กลง ปลากินพืชหรือหอยที่มีเปลือกแข็ง เช่นปลาวงศ์ตะเพียนจะมีฟันที่คอหอยมีลักษณะคล้ายฟันกรามของมนุษย์

จากคอหอยจะเป็นอวัยวะที่เรียกว่า กระเพาะอาหาร(stomach) มีลักษณะเป็นรูปถุงยาวก้นถุงแคบ มีสีน้ำตาลอ่อน ผิวภายนอกเรียบกว่าหลอดคอ กระเพาะอาหารจะทอดไปตามยาวของตัวปลา ผิวภายในของกระเพาะอาหารเป็นรอยย่นถี่ และมีต่อมทำหน้าที่ขับน้ำย่อยอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นส่วนของทางเดินอาหารที่ขยายใหญ่และเจริญดีในพวกปลากินเนื้อที่จับเหยื่อขนาดใหญ่ ปลาหลายชนิดไม่มีกระเพาะอาหารที่แท้จริง มีแต่ท่อทางเดินอาหารที่ขยายใหญ่อยู่ทางด้านหน้าของลำไส้เล็ก(small intestine) ลำไส้เล็กแยกออกจากกระเพาะอาหารด้วยกล้ามเนื้อหูรูด ลักษณะอาจจะเป็นท่อเหยียดตรงหรือขดม้วนทับกันเป็นก้อนใหญ่ ลำไส้เล็กของปลาแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ ส่วนต้น(duodenum) เป็นส่วนที่ยาวกว่าส่วนอื่นและมีกล้ามเนื้อหนาห่อหุ้มไว้ อยู่ถัดจากส่วนท้ายของกระเพาะอาหารทอดยาวไปทางหาง หรืออาจขดงอเล็กน้อย ร่องรอยที่บ่งชี้ว่าแยกออกจากกระเพาะอาหาร คือ มีสีดำกว่ากระเพาะอาหารเพราะมีท่อน้ำดีมาเปิดเข้าในบริเวณนี้ ส่วนกลาง(jejunum) มีขนาดสั้นกว่าแต่สีและขนาดไม่แตกต่างกัน ส่วนปลาย(ileum) มีขนาดสั้นและแคบกว่าส่วนอื่นๆและตรงไปทางท้าย บริเวณส่วนต้นของลำไส้เล็กจะพบไส้ติ่ง(pyloric caeca) เป็นท่อปลายตัน มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ มีความกว้างและยาวต่างๆกันขึ้นกับชนิดของปลามีหน้าที่ช่วยเพิ่มเนื้อที่ในการย่อยอาหาร ส่วนของทางเดินอาหารที่ต่อจากลำไส้เล็ก คือ ลำไส้ใหญ่(large intestine) แยกจากส่วนของลำไส้เล็กโดยรอยคอดกิ่วผนังภายในจะมีรอยย่นมากกว่าของลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ในปลากระดูกแข็งมี rectum แล้วถึงช่องทวาร

นอกจากนี้ยังมีอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารที่สำคัญได้แก่ ตับ(liver) มีหน้าที่ช่วยเก็บอาหารพวกน้ำตาลและไขมันไว้ใช้ในยามขาดแคลน ตับจะช่วยในการย่อยอาหารโดยการสร้างน้ำย่อยไปให้ลำไส้ ช่วยเก็บของเสียจากน้ำดี ถุงน้ำดี(gall bladder หรือ bile sac) เป็นถุงใสค่อนข้างกลม ภายในถุงมีน้ำดี(bile) ซึ่งผลิตจากตับบรรจุอยู่เต็ม น้ำดีมีรสขม จากถุงน้ำดีจะมีท่อเรียกว่า common bile duct นำน้ำดีไปสู่ส่วนต้นของลำไส้เล็กช่วยในการย่อยอาหารประเภทไขมัน

น้ำดีใช้เป็นสารกระจายไขมัน(emulsifying agent) และช่วยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำย่อยอาหารให้เหมาะสม ตับอ่อน(pancreas) มีหน้าที่ผลิตน้ำย่อยและฮอร์โมน(วิมล, 2540; สุภาพร, 1999)

1.8 โรคที่พบ

การเลี้ยงปลากะพงขาว เป็นที่นิยมและได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้เลี้ยงอย่างแพร่หลายและมักจะประสบปัญหาต่างๆ มากมายจากการเพาะเลี้ยง นับตั้งแต่การผสมพันธุ์ เพาะฟัก อนุบาล จนกระทั่งเลี้ยงได้ขนาดที่ตลาดต้องการก็ประสบปัญหาเช่นกัน แต่ปัญหาที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงได้รับความเสียหายอย่างมากคือปัญหาเป็นโรค

โรคเกิดได้จากสาเหตุหลายประการ เช่น คุณภาพของอาหารไม่ครบตามหลักโภชนาการทำให้ปลาอ่อนแอและเกิดโรคได้ หรืออาจเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมอย่างกะทันหัน เช่นในช่วงฤดูฝน คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงมากทั้งความเค็มและอุณหภูมิ ซึ่งจะเกี่ยวข้องไปถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆที่อาจมีผลกระทบกระเทือนต่อปลาด้วย โรคที่พบเสมอในการเลี้ยงปลากะพงขาวมีสาเหตุในการเกิดโรคแตกต่างกัน พอจะสรุปได้ดังนี้

1.8.1 โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

1.8.2 โรคที่เกิดจากตัวเบียน

1.8.3 โรคที่เกิดจากเชื้อรา

1.8.4 โรคที่เกิดจากไวรัส

1.8.5 โรคที่เกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

1.8.6 โรคที่เกิดจากสภาพน้ำไม่เหมาะสม

1.8.7 โรคที่เกิดจากการขาดอาหาร

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียเท่านั้น

1.8.1 โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยทั่วไปในน้ำจะมีแบคทีเรียชนิดต่างๆปนอยู่มากมายหลายชนิดและเมื่อปลาอ่อนแออันสืบเนื่องมาจากขั้นตอนต่างๆ ในการเลี้ยงจะเป็นโอกาสที่เหมาะสมของการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นอย่างยิ่ง เมื่อแบคทีเรียในน้ำได้เข้าสู่ปลาก็จะเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำบริเวณนั้นมีปริมาณแบคทีเรียสูงมากเป็นสาเหตุให้เชื้อแบคทีเรียเข้าเกาะปลาตัวอื่นๆที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเดียวกันและเกิดโรคระบาดขึ้นในที่สุด แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลากะพงขาวมีดังนี้

1.8.1.1 *Vibrio* spp.

มีลักษณะเป็นท่อนสั้นหรือโค้งงอ เจริญได้ดีทั้งในที่ที่และไม่มีมีออกซิเจน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีขนาด 0.5 x 1.0-2.0 นาโนเมตร แบคทีเรียตัวนี้มักอยู่รวมกับ *Aeromonas hydrophila* พบในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในน้ำเค็มและน้ำกร่อย

อาการที่พบ ปลามีอาการตกเลือดตามลำตัวเป็นจุดแดง ครีบกร่อน เป็นแผลบริเวณลำตัว ท้องบวม ตับและไตบวม ถ้าปลามีอาการดังนี้แล้วไม่ได้รับการรักษาทันทีจะทำให้ปลาตายได้

การป้องกันรักษา ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เททราไซคลิน ออกซีเททราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล 2.8-3.0 กรัมผสมกับอาหาร 1 กิโลกรัม ให้ปลากินติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 7 วัน

1.8.1.2 *Aeromonas hydrophila*

รูปร่างเป็นแท่งสั้นตรง มีความยาวประมาณ 1.0-1.8 ไมครอน มีแฟลกเจลลัม 1 เส้น ลักษณะกลมผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวลอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ บางครั้งอาจอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ

อาการที่พบ รอยช้ำแดง เป็นแผลเน่าเปื่อยถ้าเป็นมากครีบจะเปื่อยหลุด สีที่ลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ท้องมีอาการบวมน้ำ ภายในมีน้ำเลือดจางๆปนอยู่

การป้องกันรักษา ต้องมั่นดูแลและรักษาคุณภาพน้ำ หรือคุณสมบัติของน้ำในแหล่งที่เลี้ยงให้อยูในสภาพดีเสมอ แต่หากปลาติดเชื้อนี้แล้วให้ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เททราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล 2.8-3.0 กรัมผสมกับอาหาร 1 กิโลกรัม ให้ปลากินติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 7 วัน หรือ นำสารปฏิชีวนะในปริมาณมากกว่าปริมาณที่กำหนดผสมกับน้ำและนำปลามาแช่ในระยะเวลาสั้นซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวหากใช้อย่างไม่ระมัดระวังอาจทำให้ปลาตายได้

1.8.1.3 *Pseudomonas fluorescense*

มีลักษณะเป็นแท่ง มีขนาดความกว้าง 0.5-1 ไมครอน ความยาว 1.5-4.0 ไมครอน มีแส้ 1 เส้น ใช้เคลื่อนที่ พบได้ทั่วไปในน้ำ ส่วนมากจะอยู่ในน้ำจืดแต่ก็มีพบบ้างในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม แบคทีเรียนี้ติดต่อกันทางปาก ผิวหนังที่เป็นบาดแผล หรือเหงือกเมื่อเข้าไปในตัวปลาจะสร้างสารพิษซึ่งจะทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ปลาเป็นโรคนี้เนื่องจากการจัดการของผู้เลี้ยงไม่ดี คุณสมบัติของน้ำไม่ดี และปัจจัยอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคได้ เช่น สารพิษในน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง และการขาดสมดุลของอาหารก็เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคได้ แบคทีเรียตัวนี้มีการติดต่อกันทางปาก ผิวหนังที่เป็นบาดแผลหรือเหงือกเมื่อเข้าไปในตัวปลาจะสร้างสารพิษซึ่งจะทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ

อาการที่พบ โคนครีบ ปาก ขากรรไกรล่าง และรอบๆทวารเป็นสีแดง ลักษณะภายในเนื้อเยื่อบุช่องท้อง อวัยวะภายในตกเลือด ในลำไส้มีของเหลวปนเลือด ในกล้ามเนื้ออาจจะตกเลือด

การป้องกันรักษา จัดการเกี่ยวกับการเลี้ยงดูและเอาใจใส่ให้ปลามีสุขภาพดีอยู่เสมอ ควบคุมปริมาณการให้อาหาร อัตราการปล่อยเลี้ยงอย่าให้แน่นเกินไป คุณภาพน้ำต้องควบคุมให้ดีอยู่เสมอ การใช้ยาต้องใช้ยาจำพวกต้านจุลชีพ ได้แก่ ออริโอมัยซิน ให้กินในอัตราส่วน 55 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อวัน ผสมในอาหารให้กินนาน 10 วัน หรืออาจละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 10-20 ส่วนในล้านส่วน แช่นานตลอดไป หรือ กานามัยซิน ในอัตราส่วน 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมต่อวัน ผสมในอาหารให้กินนาน 20 วัน

1.8.1.4 *Flexibacter columnaris*

รูปร่างเป็นแท่งยาว พันเป็นสายต่อกัน มีขนาดความกว้าง 0.5-0.7 ไมครอน ความยาว 5-150 ไมครอน พบได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย แบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญบนผิวของปลาทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า "โรคคอลัมนาริส" ซึ่งปกติโรคนี้จะไม่เกิดขึ้นเองแต่จะเกิดจากปลาได้รับความบอบช้ำหรือบาดเจ็บจากการจับ การขนส่งลำเลียง หรือการถูกรบกวนบ่อยๆโดยการยกกระชังขึ้นสูง ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสุขภาพของปลาและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ถ้าปลาบอบช้ำมากอัตราการตายของปลาที่เป็นโรคจะสูงขึ้น ปลาที่มีอายุน้อยจะมีโอกาสเป็นโรคและตายมาก มักจะเป็นกับปลาที่มีขนาดตั้งแต่ 2 นิ้วขึ้นไป โรคนี้จะเกิดมากในช่วงฤดูหนาว ช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ และอาจเป็นสาเหตุของโรคแทรกซ้อนอื่นๆ

อาการที่พบ เริ่มแรกโรคนี้จะเกิดบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บบนลำตัว ครีบ และบริเวณส่วนหัว หลังจากนั้นปลาจะอ่อนแอไม่ค่อยกินอาหาร เคลื่อนไหวช้าลง เกล็ดหลุด บริเวณแผลจะเป็นขุยขาวๆ เหลืองคล้ายเชื้อรา เป็นแถบแผลพาดตามลำตัว ขอบแผลจะมีลักษณะเป็นสีเทาจางๆ มีเมือกปกคลุมหนามาก บางครั้งจะพบจุดเลือดบริเวณนั้นด้วย

การป้องกันรักษา หลังจากการลำเลียงขนย้ายปลาควรมีการป้องกันโดยแช่ปลาในยาเหลือง ความเข้มข้น 25 ส่วนในล้านส่วน 3 วันติดต่อกัน หากปลาติดเชื้อและเป็นโรคนี้ให้ใช้ฟูราเนสความเข้มข้น 1.5 ส่วนในล้านส่วน แช่ใน 1 ชั่วโมง ถ้ายังไม่หายต้องทำซ้ำติดต่อกันนาน 3 วัน อาจใช้คอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 40 ส่วนในล้านส่วน แช่นาน 20 นาที

1.8.1.5 *Flavobacterium* sp.

รูปร่างมีตั้งแต่เป็นแท่งสั้นเกือบกลมจนถึงแท่งยาว เคลื่อนที่โดยใช้แส้ พบได้ทั่วไปในน้ำจืดและน้ำเค็ม พบทั่วไปบนผิวหนังของปลา ปกติแล้ว *Flavobacteria* จะไม่ทำให้เกิดโรคโดยตรงแต่เมื่อมีบาดแผลหรือเกิดอาการเครียด จากสภาพแวดล้อมต่างๆ ทำให้ปลาอ่อนแอ มีความต้านทานน้อยลง *Flavobacteria* sp. จึงเข้าทำอันตรายได้

อาการของโรค มีอาการตกเลือดตามที่ต่างๆภายในจะมีจุดเลือดในเยื่อบุช่องท้อง เยื่อยึดอวัยวะภายใน อวัยวะภายในและกล้ามเนื้อ ลำไส้อาจจะตกเลือด

การป้องกันรักษา ยังไม่มีวิธีรักษาที่แน่นอน แต่ควรป้องกันไม่ให้เกิดโรค โดยการควบคุมการจัดการเกี่ยวกับการเลี้ยง อาหารและคุณภาพน้ำที่ดีจะลดอัตราการเกิดโรคได้

1.8.1.6 *Renibacterium* sp.

รูปร่างเป็นแท่ง ไม่เคลื่อนที่ มักจะอยู่เป็นคู่

อาการของโรค ตาขาวขุ่นมัวและโปนออกมาตาอาจบอดได้ ท้องบวมเล็กน้อย หรือมีฝีใต้ผิวหน้า อวัยวะภายใน เช่น หัวใจ ไตและตับ จะมีก้อนสีขาวอยู่ในเนื้อเยื่อ ไตจะแข็งกว่าปกติ สีดำ มีจุดขาวแทรกอยู่เป็นแห่งๆ

การป้องกันรักษา ใช้อีลิโทรมัยซินหรือซัลฟาเมอราซีน ผสมในอาหารให้ปลากินติดต่อกัน การให้ยาอาจใช้เวลานานถึง 2 เดือน ให้ใช้ในปริมาณต่ำๆ เพราะอาจเป็นผลให้แบคทีเรียดื้อยาได้

2. โพรไบโอติก (Probiotics)

2.1 คำจำกัดความของโพรไบโอติก

Gatesoupe(1999) รายงานคำจำกัดความของ “โพรไบโอติก” ที่มีผู้ศึกษาไว้ ดังนี้

Parker(1974) : จุลินทรีย์และสารที่ก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

Fuller(1989) : จุลินทรีย์มีชีวิตที่เสริมในอาหารสัตว์แล้วให้ผลดีโดยก่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ชนิดนั้น

Tannock(1997) : เซลล์จุลินทรีย์มีชีวิตที่ใช้เสริมลงในอาหารโดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเสริมสุขภาพ

2.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

Gatesoupe(1999) รายงานคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเสริมสุขภาพของสัตว์ ดังนี้

1. ต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระดับหลอดทดลอง
2. มีศักยภาพในการยึดเกาะผนังทางเดินอาหาร
3. เพิ่มความต้านทานโรคเมื่อทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในสัตว์เจ้าบ้าน

ส่วน Gilliland(1979) และ Fuller(1989) รายงานหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ไว้ดังนี้

1. เป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรค เป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เจ้าบ้าน สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดสูง เช่น ในกระเพาะอาหาร และสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง เนื่องจากบริเวณลำไส้เล็กเป็นบริเวณที่มีการหลั่งน้ำดีจากตับอ่อน
2. สามารถเจริญเพิ่มจำนวนและมีเมแทบอลิซึมในระบบทางเดินอาหารได้
3. สามารถแข่งขันเข้ายึดเกาะกับจุลินทรีย์ก่อโรคในบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหารได้
4. ผลิตกรดอินทรีย์และสารต่อต้านจุลชีพซึ่งมีผลลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคลง
5. มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ ทำให้สัตว์มีการสร้างแอนติบอดีมากขึ้น
6. เพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน
7. ในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดียิ่งขึ้น ควรมีสมบัติต่อสารปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์ด้วย

Vine et al.(2004) แนะนำเกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติกของสัตว์น้ำในระดับหลอดทดลองด้วยค่า Ranking Index(RI) ด้วยสูตร $RI=1/(\lambda \times t_d) \times 100$ เมื่อ λ คือ lag period และ t_d คือ ระยะเวลาที่เชื้อเจริญเป็นสองเท่า(doubling time)

2.3 การใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

วรรนิภา(2539) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดีและมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก เมื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆแล้วพบว่าเป็น *Bacillus* sp. โดยใช้อาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมโพรไบโอติก เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและความต้านทานต่อโรคสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสม *Bacillus* S11 อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ได้ทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* D331 พบว่าหลังจากการเลี้ยง 10 วันกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิต 26 % แต่กุ้งกุลาดำในกลุ่มที่มีการเติม *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดชีวิต 100%

Nikoskelainen et al.(2001) รายงานการใช้ *Lactobacillus rhamnosus* ซึ่งมีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในคนป้องกันโรค furanculosis ซึ่งมีสาเหตุมาจาก *Aeromonas salmonicida* ใน rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* พบว่า ที่ความเข้มข้นของ *Lactobacillus rhamnosus* 10^9 เซลล์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การตาย 18.9 % ความเข้มข้น 10^{12} เซลล์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การตาย 46.3 % และกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตาย 52.6 %

Nikoskelainen et al.(2001) ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกในคน 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 / *Lactobacillus casei* Shirota / *Lactobacillus bulgaricus* / *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 / *Bifidobacterium lactis* Bb 12 / *Lactobacillus johnsonii* La 1 และ ในสัตว์ 1 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecium* Tehobak เพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดโรคซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vibrio anguillarum / Flavobacterium psychrophilum* และ *Aeromonas salmonicida* ใน rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ด้วยเทคนิค in vitro ติดตามผลการยึดติดบนเมือก การเจาะทะลุเมือก การยับยั้งการเจริญและการยึดติดของแบคทีเรียก่อโรคด้วยการติดฉลากสารกัมมันตรังสี [methyl-1,2-^{3}H]thymidine บนแบคทีเรียที่สนใจ นอกจากนี้ยังหาความสามารถในการต้านทานต่อน้ำดีอีกด้วย พบว่า โพรไบโอติกมีความสามารถในการยึดติดและเจาะทะลุเมือกของ rainbow trout ได้ดี มีความสามารถในการยับยั้งและยึดติดกับเมือกของ rainbow trout ได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรค และต้านทานต่อน้ำดีได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคเช่นกัน

Gatesoupe(2002) รายงานการใช้โพรไบโอติก Bactocell (*Pediococcus acidilatici*), Levucell (*Saccharomyces cerevisiae*) และฟอร์มัลดีไฮด์ในการลดปริมาณ *Vibrio alginolyticus* ใน *Artemia* nauplii เพื่อใช้ในการเลี้ยง pollack วัยอ่อน พบว่า เมื่อนำ *Artemia* ไปฝักตัวในน้ำที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ปริมาณ 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร อัตราการฝักตัวของ *Artemia* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นนำ *Artemia* ที่ฝักตัวในน้ำที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ไปเลี้ยง Pollack(*Pollachius pollachius*) ติดต่อกันนาน 3 เดือน ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพและทางพันธุกรรมของ *Vibrio alginolyticus* เปลี่ยนแปลงไป และเมื่อนำ *Artemia* ที่ฟักตัวในโพรไบโอติกไปเลี้ยง pollack วัยอ่อน สามารถทำให้ปลามีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่ง *Artemia* ไม่ได้ฟักตัวในโพรไบโอติก

Villamil et al.(2003) รายงานการควบคุม *Vibrio alginolyticus* ใน *Artemia* ด้วยโพรไบโอติกแบคทีเรีย พบว่า *Lactobacillus brevis* สามารถกำจัด *Vibrio alginolyticus* ในน้ำเลี้ยง *Artemia* ได้ทั้งหมด ส่วนใน *Artemia* มี 2 สายพันธุ์ที่สามารถกำจัด *Vibrio alginolyticus* ได้ทั้งหมด คือ *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus brevis* เมื่อทดสอบผลของ extracellular products ของทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ศึกษา พบว่า ทั้ง 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus helveticus* / *Lactobacillus casei* / *Lactobacillus brevis / Lactobacillus mesenteroidesl / Lactibacillus lactis* และ *Lactobacillus acidilatici* สามารถทำให้จำนวน *Vibrio alginolyticus* ลดลงได้

ศิริเพ็ญ(2546) รายงานการใช้ *Bacillus* P11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน พบว่า กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) และสามารถพบเซลล์แบคทีเรียรูปแท่งคล้าย Bacillus ที่

บริเวณผนังลำไส้กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และเมื่อเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 พบว่า กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม

3. แลกติกแอซิดแบคทีเรีย

3.1 ข้อมูลทั่วไปและการจัดจำแนก

แลกติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีวิวัฒนาการมายาวนาน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสกุลและมีสกุลใหม่เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา(Sillanpaa, 2001) โดยทั่วไปมีรูปร่างท่อนและกลม มีการจัดเรียงตัวทั้งแบบคู่, สี่, กลุ่มหรือสายโซ่ยาว ติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีไซโทโครม ไม่สร้างสปอร์ คะตะเลสลบ ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยหรือบางชนิดไม่ต้องการอากาศ ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักคือกรดแลกติก ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน ต้องการคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ อนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิกและวิตามินต่างๆ(Ringo et al., 1998) สามารถพบได้ตามธรรมชาติทั่วไป เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์(พงษ์เทพ, 2546)

แลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม(ฐิติพงศ์, 2538) คือ Homofermentative Lactic Acid Bacteria ได้แก่ แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลกติก 85-95 % ส่วนที่เหลืออาจนำไปใช้เพื่อให้พลังงาน และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria ได้แก่ แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลกติกประมาณ 50 % ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะซิติกและเอทิลแอลกอฮอล์ 20-25 % และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 %

การจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถใช้ลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะสัณฐานวิทยา องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ G+C(โมล%)ในDNA รวมถึงระดับย่อย คือ ระดับ rRNA ได้(Christensen et al., 1999) และในปัจจุบันมีการนำเทคนิคในระดับโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง(Sillanpaa, 2001) มีรายงานการจัดจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียไว้แตกต่างกัน ดังนี้

Ringo(1997) จำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ 8 สกุล ดังนี้ *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus* และ *Carnobacterium*

Axelsson(1998) จำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ 12 สกุล ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus* และ *Weissella*

Sillanpaa(2001) รายงานเกี่ยวกับการจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียไว้ 13 สกุล โดย 12 สกุลแรกนั้นเหมือนกับที่ Axelsson(1998) ได้รายงานไว้ แต่เพิ่ม *Streptococcus sensu stricto* ขึ้นมาอีก 1 สกุล

3.2 แลกติกแอซิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารปลา

แลกติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่พบมากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก(Ouwehand et al., 1999, Nikoskelainen et al., 2001) ในปลาก็เช่นเดียวกัน มีรายงานหลายฉบับรายงานเกี่ยวกับแลกติกแอซิดแบคทีเรียว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารของปลาและมีสมบัติเป็นโพรไบโอติกด้วย(Gildberg et al.,1995, Gildberg et al.,1998, Gatesoupe, 1999) แต่แบคทีเรียในทางเดินอาหารปลาจะเป็นแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพน้ำเลี้ยง และอาหาร

Hagi et al.(2004) รายงานความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในฤดูกาลต่างๆ ในลำไส้ของปลา 4 ชนิด ได้แก่ silver carp(*Hypophthalmichthys molitrix*), common carp(*Cyprinus carpio*), channel catfish(*Ictalurus punctatus*)และ deepboied crucian carp(*Carassius cuvieri*) ที่เลี้ยงใน Kasumigaura Lake ประเทศญี่ปุ่น พบว่า สายพันธุ์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะโดดเด่นแตกต่างกันตามฤดูกาล กล่าวคือ ในเดือนกรกฎาคม 2001 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูร้อน(อุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส) พบ *Lactococcus lactis* จำนวนมากในลำไส้ของปลาทุกชนิด และในเดือนธันวาคม 2001 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูหนาว(อุณหภูมิของน้ำ 4-10 องศาเซลเซียส) พบ *Lactococcus raffinolactis* จำนวนมากในปลาทุกชนิด เมื่อทำการทดลองในช่วงเวลาเดียวกันในปีถัดมาก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน ส่วนในฤดูใบไม้ผลิและใบไม้ร่วง(อุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 13-17 องศาเซลเซียส) สายพันธุ์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ของปลาจะเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ทำให้ไม่มีสายพันธุ์ใดโดดเด่น

3.3 สารยับยั้งการเจริญที่ผลิตโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

3.3.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่แลกติกแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้นระหว่างการเจริญ ทำให้ค่า pH ลดลงในช่วงแรกของการเจริญ มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มไม่ทนกรด เช่น *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. เป็นต้น กรดอินทรีย์มีผลยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ โดยการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้น(Fuller, 1989)

3.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2)ระหว่างการเจริญได้โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงในเซลล์ที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจะถูกสะสมไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญเนื่องจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียขาดเอนไซม์คะตะเลส ทำให้ไม่สามารถคะตะไลส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง เช่น *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. เป็นต้น(Mayra and Bigret, 1993)

3.3.3 ไดอะซิทิล

ไดอะซิทิล(2,3-butanedione) เป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายที่สร้างมาจากไพรูเวท เป็นสารที่มีกลิ่นหอม สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Listeria monocytogenes*, *L. ivanoii*, *L. innocua*, *Salmonella* Anatum, *S.* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila*(Jay, 1982)

3.3 4 คาร์บอนไดออกไซด์

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในเซลล์และรอบๆเซลล์ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย(พงษ์เทพ, 2546)

3.3.5 อะซิทัลดีไฮด์

เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตแบบ hetero fermentative ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับอะซิทัลดีไฮด์ออกมาภายนอกเซลล์ โดยผลของอะซิทัลดีไฮด์ต่อจุลินทรีย์

ชนิดต่างๆนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีรายงานว่าอะซิทัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้(พงษ์เทพ, 2546)

3.3.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารต้านจุลชีพ(Antimicrobial substance)(De Vuyst and Vandamme, 1994) มีโครงสร้างเป็นสายเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวแต่ไม่ทำลายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน ในบางครั้งอาจพบกรดอะมิโนที่ไม่พบในโปรตีนทั่วไป เช่น พบ dehydroalanine และ dehydrobutyrine ในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่ง นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน(proteolytic enzyme) โดยแบคเทอริโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่าน secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	ปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษของผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา : พงษ์เทพ, 2546

3.4 กลไกการออกฤทธิ์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย(คนึงนิจ, 2540)

3.4.1 เมื่อสัตว์กินจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเข้าไปแบคทีเรียนั้นจะแพร่พันธุ์และเกาะผนังทางเดินอาหารเป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเกาะผนังลำไส้ยากขึ้น

3.4.2 แลกติกแอซิดแบคทีเรียจะสร้างกรดอินทรีย์และไฮโรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลให้ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งผลดังกล่าวไม่เหมาะกับการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

3.4.3 การสร้างเอนไซม์ แบคทีเรียบางชนิด เช่น Lactobacilli สร้างแล็กเทสและอะไมเลส ทำให้ได้รับเอนไซม์มากขึ้นเป็นผลทำให้การย่อยอาหารเพิ่มมากขึ้น โดยมีการทำงานแบบพึ่งพาอาศัยกัน(symbiosis)ของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและกระบวนการย่อยอาหาร

3.4.4 การสร้างวิตามินบี จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกสามารถสร้างวิตามินบีหลายชนิดในทางเดินอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้น เนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน การสร้างโปรตีน และยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของประสาทส่วนกลาง

3.4.5 การสร้างสารต้านจุลชีพ มีผู้พบสารต้านจุลชีพหลายชนิดจากสายพันธุ์ที่แน่นอนของ *Lactobacilli* และ *Streptococci* ดังนี้ Acidophilin, Lactocidin, Acidolin, Lactolin, Nisin and diplococcin

3.4.6 การเปลี่ยนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ให้แก่สัตว์ตั้งแต่แรกเกิดเพื่อปรับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร เป็นการช่วยควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค

3.4.7 การแข่งขันเพื่อยับยั้งการออกฤทธิ์ ในปี 1988 และปี 1989 Stark และ Wilkinson ได้วิจัยการแข่งขันการเกาะ การจับและการก่อตัวในทางเดินอาหารของสุกรและไก่ของ *Lactobacilli* และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เพื่อครอบครองพื้นที่ทางเดินอาหาร พบว่า *Lactobacilli* จะแย่งจับและก่อตัวในทางเดินอาหารทำให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะหรือก่อตัวในทางเดินอาหาร หรือป้องกันการเกาะตัวโดยตรงต่อเซลล์ทางเดินอาหารยับยั้งการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทำให้สัตว์มีสุขภาพดี

3.4.8 กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunomodulator) ในลูกสุกรที่ให้กิน *Lactobacilli* พบว่า *Lactobacilli* จะทำหน้าที่เหมือนตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดในทางเดินอาหาร

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์สำคัญที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ(Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument., Germany

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ(Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA

3. เครื่องวัดค่าพีเอช(pH meter) HANNA instruments รุ่น HI 8424

4. เครื่องผสมสาร(Vortex mixter) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., Switzerland

5. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ(Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

6. ตู้บ่มเชื้อ(Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

7. เครื่องเขย่า(Shaker)

8. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

9. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ของบริษัท Biorad, USA

10. เครื่องส่องเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ของบริษัท Biorad, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. ชุดทดสอบความเป็นด่าง AQUA-VBC ของคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. ชุดทดสอบไนไตรท์, ไนเตรท, ฟอสเฟต และ แอมโมเนียรวม ของบริษัท SERA , Germany

เคมีภัณฑ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลกโตแบซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth) ของบริษัท Difco Laboratories,USA

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories,USA

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy Agar) ของบริษัท Difco Laboratories,USA

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories,USA

สารเคมีสำหรับการศึกษา Immunohistochemistry

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 70, 80, 90 และ 95 %(ปริมาตร/ปริมาตร)
2. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์
3. ไซลีน
4. ฟอร์มัลดีไฮด์
5. 0.15 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2
6. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10)

7. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์
8. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 %(ปริมาตร/ปริมาตร)
9. อิโอซิน 0.02 %(น้ำหนัก/ปริมาตร)
10. ฮีมาทอกไซลีน
11. พาราพลาส พลัส พาราฟิน
12. สารละลายเคลือบสไลด์เจลาติน
13. Davidson's fixative
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์
15. กรดไฮโดรคลอริก
16. เปอร์เม้าท์
17. โมโนโคลและโพลีโคลต่อ *Aeromonas hydrophila* เอื้อเฟื้อจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ ภายใต้การดูแลของ รศ. ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

สารเคมีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

1. โซเดียมคลอไรด์ 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร)
2. บัฟเฟอร์ TE
3. Tris-HCl
4. อะกาโรสเจล
5. บัฟเฟอร์ TBE
6. สารละลายเอทิเดียมโบรไมด์
7. สารละลาย dNTP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากทางเดินอาหารปลากะพงขาว

นำปลากะพงขาวที่จับได้จากธรรมชาติและจากฟาร์มเลี้ยงแหล่งต่างๆ เช่น ตลาดสดสามย่าน ตลาดสดมหาชัย กระชังเพาะเลี้ยงปลาในจังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร บ่อเลี้ยงในจังหวัดสมุทรสาคร สะพานปลาในจังหวัดตรัง ขนาด 3-5 กิโลกรัม มาตัดทางเดินอาหารโดยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นนำทางเดินอาหารมาผ่าออกเพื่อเปิดทางเดินอาหาร ใส่ลงไปในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมากระจายเชื้อในอาหารแข็ง MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) และบรอมเครเซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ สังเกตโคโลนีที่มีสีเหลือง เลือกโคโลนีเหล่านั้นมาขีดแยกบนอาหารแข็ง MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้ได้แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่บริสุทธิ์

2. คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

2.1 การเตรียมส่วนใสที่ได้จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

นำแลกติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผ่านแผ่นกรอง (Millipore Membrane Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งส่วนใสที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องปรับ pH และนำส่วนที่สองมาปรับ pH ให้ได้ 6.5 โดยใช้ 1.0 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์

2.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Vibrionaceae ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Vibrio flurialis* และ *Aeromonas hydrophila* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกซอยที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละเชื้อมาปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ใช้สำลีพันปลายไม้ swab เชื้อบนอาหารแข็งทริปติกซอยที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ที่เจาะวุ้นเบอร์ 4(เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร) เจาะลงบน

วุ้นเพาะเชื้อจำนวน 4 หลุม/จานเลี้ยงเชื้อ โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควรหยดส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานเพาะเชื้อไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง

3. ศึกษาสมบัติบางประการของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

3.1 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (Cultural Characteristics)

ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics)

ศึกษาการย้อมสีแกรมดูการติดสี รูปร่าง ขนาด และการจัดเรียงตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical Characteristics)

ดังต่อไปนี้

3.3.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส(ภาคผนวก ค. หมายเลข 2)
3.3.2 คุณสมบัติการเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียประเภท Homofermentative หรือ Heterofermentative(ภาคผนวก ค. หมายเลข 3)
3.3.3 ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตบางชนิดโดยใช้น้ำตาลทดสอบ(ภาคผนวก ค. หมายเลข 9)

3.4 ศึกษาการเจริญของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ

สังเกตการเจริญของเชื้อโดยใช้อาหารเหลว MRS ที่มีเกลือ(NaCl)ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) pH 6.5-6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการติดตามดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง(ภาคผนวก ค. หมายเลข 10)

3.5 ศึกษาการเจริญของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารที่มีเกลือน้ำดีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สังเกตการเจริญของเชื้อโดยใช้อาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) pH 6.5-6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการติดตามดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง(ภาคผนวก ค. หมายเลข 11)

4. การเตรียมอาหารผสมแบบเปียก(Moist Diet)สำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว

4.1 วิเคราะห์ส่วนประกอบแต่ละส่วนของอาหารปลา

หาระดับโปรตีนและไขมันในส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ ปลาป่น, แป้งสาลี, กากถั่วเหลือง, กลูเตน (Wheat gluten), เปลือกกุ้งป่น จากนั้นทำการคำนวณเพื่อให้ได้ระดับโปรตีนและไขมันตามสูตรอาหารที่ต้องการ(Boonyaratpalin, 1997)

4.2 ผสมส่วนประกอบต่าง ๆให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

ผสมปลาเป็ดบด, ปลาป่น, เปลือกกุ้งป่น, กากถั่วเหลือง ให้เข้ากัน แล้วนำแป้งสาลีและกลูเตนที่ละลายในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มาผสมให้เข้ากันอีกครั้ง รอให้เย็น จากนั้นเติมน้ำมันทูน่า, น้ำมันพืช, วิตามินรวม, แร่ธาตุรวม, วิตามินซี (Ascorbic acid) และน้ำ นำเข้าเครื่องผสม

4.3 อัดอาหารปลาด้วยเครื่องอัดอาหารผสมแบบเปียก

นำอาหารที่ได้จากข้อ 4.2 เข้าเครื่องบดเนื้อที่มีรูหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร จะได้อาหารผสมแบบเปียก เก็บอาหารที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาระดับความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, เถ้า, ใยเยื่อและคาร์โบไฮเดรต ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การหาค่าความเข้มข้นของเชื้อทดสอบที่ทำให้ปลากะพงขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์
(Median Lethal concentration; LC_{50}) ตามวิธีของสมบัติ, 2542

5.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เลี้ยง *A. hydrophila* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 18 ชั่วโมง หาจำนวน *A. hydrophila* ใน 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารแข็งทริปติกซอย ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อใช้คำนวณจำนวนเซลล์ที่ต้องการในน้ำเลี้ยงปลา

5.2 ทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50 %

แบ่งปลากะพงขาวอายุ 30 วัน จำนวน 360 ตัว ใส่ตู้กระจกที่บรรจุน้ำ 20 ลิตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ให้อากาศตลอดเวลา เลี้ยงตู้ละ 30 ตัว จำนวน 12 ตู้ แยกเป็น 4 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 3 ซ้ำ เติม *A. hydrophila* ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 ลงในน้ำเลี้ยงปลาปรับให้มีความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับใน 3 กลุ่มทดลอง และอีก 1 กลุ่ม เป็นกลุ่มควบคุมไม่มีการเติม *A. hydrophila* เก็บตัวอย่างน้ำจากทุกตู้หลังเติม *A. hydrophila* เพื่อหาจำนวน *A. hydrophila* ที่แน่นอนในน้ำด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารแข็งทริปติกซอย ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร)

ตลอดการทดลองปลาทุกกลุ่มการทดลองจะได้รับอาหารที่เตรียมได้จากข้อ 4 วันละ 2 ครั้ง บันทึกจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่ม ที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำข้อมูลไปคำนวณหา LD_{50} โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ โพรบิทอะนาลิซิส(probit analysis)

5.3 ตรวจหา *Aeromonas hydrophila* ในปลาที่ตาย

นำปลาที่ตายมาล้างด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) (NSS 0.85 %) ตีป่นด้วยเครื่อง Stomacher ในอัตราส่วนปลาต่อ NSS 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) เท่ากับ 1:9 ทำการเจือจางลำดับส่วน (10-fold dilution) และใช้วิธี plate count โดยใช้อาหารแข็งทริปติกซอย ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร)

6. การผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อใช้เลี้ยงในตู้กระจก

6.1 เตรียมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้มาเพาะในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.2 ผสมเซลล์แลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากะพงขาว

ผสมเซลล์สดที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร

6.3 ตรวจนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารปลากะพงขาว(จากข้อ 6.2)

นำอาหารเลี้ยงปลากะพงขาว 1 กรัม มาแขวนลอยใน NSS 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางตามลำดับนำค่าการเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร มากระจายเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิต

เก็บอาหารที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาระดับความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, เถ้า, ใยเยื่อและคาร์โบไฮเดรต ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 30 วัน ในตู้กระจก

เลี้ยงปลากะพงขาวอายุ 30 วัน ในตู้กระจกที่บรรจุน้ำ 20 ลิตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ให้อากาศตลอดเวลา เลี้ยงตู้ละ 20 ตัว ปรับสภาพปลาก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ การทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 2 ซ้ำ ได้แก่ กลุ่มควบคุม เลี้ยงปลากะพงขาวโดยให้อาหารที่ไม่มีการผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย และ กลุ่มทดลองที่ 1-5 เลี้ยงปลากะพงขาวโดยให้อาหารที่ผสมด้วยแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ โดยทุกกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร ทุกกลุ่มทดลองให้อาหารวันละ 2 ครั้ง โดยให้อาหารครั้งละ

10 %(น้ำหนักอาหารแห้ง/น้ำหนักปลา) ทำการบันทึกผลการทดลองทุก 15 วัน โดยติดตามน้ำหนัก, ความยาวของปลา, แบคทีเรียและคุณภาพน้ำในน้ำเลี้ยงปลา เปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาวทุกกลุ่มทดลอง วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และ Duncan's multiple range test

8. การทดสอบความสามารถของปลากะพงขาวในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila*

เลี้ยงแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* ในอาหารเหลวทริปติกซอยที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 18 ชั่วโมง นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคโดยวิธีแช่(Immersion challenge) ใช้ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร เติมลงในตู้เลี้ยงปลาทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยปลาที่ใช้ทดสอบได้จากการรวบรวมปลาที่รอดชีวิตจากการเลี้ยงในข้อ 7 ทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน ติดตามจำนวนปลาที่รอดชีวิตวันละ 1 ครั้ง, แบคทีเรียในน้ำและในทางเดินอาหาร, อาการของปลาและยืนยันว่าปลาติดเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธี plate count(เช่นเดียวกับข้อ 5.2)

9. การผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อใช้เลี้ยงในกระชัง

9.1 เตรียมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้มาเพาะในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.4 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการขยายขนาดการเลี้ยงแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.4 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.2 ผสมเซลล์แลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากะพงขาว

ผสมเซลล์สดที่เตรียมได้จากข้อ 9.1 กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^5, 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร

9.3 ตรวจนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารปลากะพงขาว(จากข้อ 9.2)

นำอาหารเลี้ยงปลากะพงขาว 1 กรัม มาแขวนลอยใน NSS 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางตามลำดับนำค่าการเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร มากระจายเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.4 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิต

เก็บอาหารที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาระดับความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, เถ้า, ใยเยื่อและคาร์โบไฮเดรต ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 60 วัน ในกระชัง

10.1 สถานที่เลี้ยง

เลี้ยงในบ่อเนื้อที่ประมาณ 1 ไร่ ที่ตำบล บึงบอน อำเภอ หนองเสือ จังหวัด ปทุมธานี ความเค็มของน้ำในบ่อ 4 ส่วนในพันส่วน โดยใช้อวนไนลอนสีฟ้าขนาดตา 1 มิลลิเมตร ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.0 เมตร สูงจากก้นบ่อ 0.5 เมตร ทั้งหมด 18 กระชัง

10.2 การเลี้ยงปลาในกระชัง

เลี้ยงปลากะพงขาวอายุ 60 วัน กระชังละ 60 ตัว ปรับสภาพปลาก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ การทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 6 ซ้ำ ได้แก่ กลุ่มควบคุม เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารที่ไม่ผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย กลุ่มทดลองที่ 1 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารที่ผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10^5 เซลล์/กรัมอาหาร(LAB-4/5) และกลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงปลากะพงขาวที่ผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร(LAB-4/7) ทุกกลุ่มทดลองให้อาหารวันละ 2 ครั้ง โดยให้อาหารครั้งละ 10 %(น้ำหนักอาหารแห้ง/น้ำหนักปลา) ทำการบันทึกผลการทดลองทุก 15 วัน โดยติดตามน้ำหนัก, ความยาวของปลา, แบคทีเรียและคุณภาพน้ำในน้ำเลี้ยงปลา เปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวของปลากะพงขาวทุกกลุ่มทดลอง วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และ Duncan’s multiple range test

11. การทดสอบความสามารถของปลากะพงขาวในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila*

เลี้ยงแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* ในอาหารเหลวทริปติกซอยที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.4 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 18 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีแล้วล้างเซลล์ด้วย NSS 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคโดยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection challenge) ใช้ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร โดยปลาที่ใช้ทดสอบได้จากการรวบรวมปลาที่รอดชีวิตจากการเลี้ยงในข้อ 10 ทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน ติดตามจำนวนปลาที่รอดชีวิตวันละ 1 ครั้ง, แบคทีเรียในน้ำและในทางเดินอาหาร, อาการของปลาและยืนยันว่าปลาติดเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry

12. การตรวจดูแบคทีเรียในทางเดินอาหารปลากะพงขาว โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

เมื่อเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง ครบ 60 วันแล้ว เก็บตัวอย่างปลาทั้ง 3 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม กลุ่ม LAB-4/5 และ LAB-4/7 มาส่องดูแบคทีเรียในทางเดินอาหารเพื่อตรวจหา LAB-4 โดยส่งตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM มีดังนี้

12.1 การเก็บตัวอย่างและการรักษาตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาล้างในน้ำเกลือหรือบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อ ดองตัวอย่างในน้ำยาประเภทอัลดีไฮด์ หรือ Primary fixation ชนิดอื่น หลังการดองล้างด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้เป็นตัวทำละลายใน fixation ทำการดองในน้ำยาออสเมี่ยม (post fixation)

12.2 การขจัดน้ำออก (dehydration) **และการทำให้แห้ง** (drying)

ขจัดน้ำออกโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน จากความเข้มข้นขั้นต่ำ(30 %) ไปจนถึงความเข้มข้นสูง(100 %) และทำให้แห้งในอากาศธรรมดาหรือวิธี critical point drying(CPD) วางแผ่นตัวอย่าง บนแผ่นวางตัวอย่าง (specimen stub)

12.3 การฉาบผิวด้วยโลหะหนัก (metal coating)

นำตัวอย่างที่แห้งแล้ววางลง stub ใช้กาวเชื่อมผิวล่างของตัวอย่างให้ติดบน stub กาวที่ใช้จะเป็นโลหะผสม หรือสารที่เป็นตัวนำไฟฟ้า(conductive agent) เช่น ผงถ่าน เรียกว่า carbon colloidal adhesive การติดตัวอย่างบน stub นี้ เรียกว่า mounting หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยโมเลกุลของโลหะหนัก(metal coating) เช่น ทองผสมพาลาเดียม ใน vacuum evaporator หรือ sputtering unit

12.4 การใช้กล้อง scanning electron microscope(SEM)

12.4.1 เปิดระบบไฟฟ้าและเปิดสวิทซ์ระบบสูญญากาศให้ได้สูญญากาศที่เหมาะสม

12.4.2 ตรวจสอบสภาพเครื่อง โดยใช้ตัวอย่างเพื่อตรวจสอบคุณภาพ(control sample) วางบน stage ภายใน specimen chamber

12.4.3 เลือก high voltage ที่เหมาะสมหลังจากได้ทำให้มีสูญญากาศที่เหมาะสม แล้วทำให้เกิด electron beam

12.4.4 ที่กำลังขยาย 1,000-2,000 เท่า เริ่มทำการปรับลำแสง electron และ aperture ให้มีแนวเดียวกัน ขั้นตอนนี้เรียกว่า beam alignment

12.4.5 แก้ไข astigmatism ที่กำลังขยายสูง(ประมาณ 80,000-100,000 เท่า) จนภาพคมชัด

12.4.6 ปิด electron beam และ high voltage

12.4.7 เปลี่ยนตัวอย่างเพื่อตรวจสอบ

12.4.8 เปิด high voltage และ electron beam

12.4.9 ตรวจสอบตัวอย่างตามกำลังขยายที่ต้องการ

12.4.10 เลือกบริเวณตัวอย่างที่ต้องการศึกษาและถ่ายภาพ

12.4.11 เพิ่มกำลังขยายของภาพที่บริเวณนั้นและทำการ focus ให้ภาพคมชัด

12.4.12 ลดกำลังขยายลงตามต้องการเพื่อถ่ายภาพ

12.4.13 เมื่อเสร็จภาระกิจแล้ว ลดกำลังขยายของกล้อง(1,000 เท่า) ปิด electron beam และ high voltage ปิดสวิทซ์เครื่องเมื่อเสร็จการใช้งาน

13. วิการของปลาที่ได้รับ *Aeromonas hydrophila* และการตรวจเนื้อเยื่อด้วย Immunohistochemistry

สังเกตลักษณะภายนอกและอวัยวะภายในของปลาที่ได้รับเชื้อและตรวจเนื้อเยื่อด้วย Immunohistochemistry โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

13.1. การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

13.1.1 นำตัวอย่างปลาและอวัยวะภายใน มาแช่ในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

13.1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างให้น้ำยาออก

13.1.3ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆกัน

แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 90 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 % จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 % ที่ผสมกับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่กับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีนปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

13.1.4 ขั้นตอนนำสารใหม่เข้ามาแทนที่(clearing)

แช่ไซลีน จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง

13.1.5 ขั้นตอนการแช่ให้แข็งตัว(impregnation) ในพาราพลาสต์

แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวปริมาณ 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 45 นาที

13.1.6 ขั้นตอนการฝังพาราพลาสต์(embedding)

นำอวัยวะในแต่ละส่วนของปลา จัดเรียงในก้นพิมพ์สี่เหลี่ยม จัดให้อวัยวะอยู่ตรงกลาง จากนั้นเทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงไปให้เต็มพิมพ์ ปิดด้วยกรอบพลาสติกด้านบน ที่ต้องนำไปใช้ในการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม รอจน แข็งตัวจึงแกะพิมพ์ออก

13.1.7 ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ(sectioning)

ตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ฝังในพาราพลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโตมแบบใช้มือหมุน(rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 0.8 ไมครอน เรียงต่อกัน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น ให้พอดี

กับขนาดเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตึงเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

13.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี Indirect peroxidase immunohistochemistry

13.2.1 ขั้นตอนการเอาพาราพลาสต์ออก(deparaffination)

นำสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น วางบนตะกร้า(slide basket) แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10,5 และ 5 นาที

13.2.2 ขั้นตอนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ(hydration) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ

แช่ในไซลีนที่ผสมนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 90 % เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 80 % เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 5 นาที น้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที สารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

13.2.3 ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 1

นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ หยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนแบบไม่จำเพาะโดยวางสไลด์ในกล่องที่ปิดฝาภายในบุด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้นเพื่อรักษาความชื้นตลอดเวลา ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเนื้อเยื่อออก ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ 2 ให้เป็นเนื้อเยื่อควบคุม หยดแอนติบอดีที่ 1 ให้คลุมเนื้อเยื่อที่ 1 และ 3 โดยแอนติบอดีที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี และโพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยแอนติบอดีทั้งสองชนิดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:5 เก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ ที่37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

13.2.4 ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 2

ล้างแอนติบอดีที่ 1 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ หยดแอนติบอดีที่ 2 ได้แก่ Goat antimouse IgG heavy และ light chain horseradish peroxidase conjugate(GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเนื้อเยื่อเก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

13.2.5 ขั้นตอนในการใส่ซับสเตรท

ล้างแอนติบอดีที่ 2 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อแต่ละสไลด์มาทำปฏิกิริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์(DAB) 0.03 % ปริมาณ 15 มิลลิกรัม และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 % ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ถึงขั้นนี้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์บริเวณที่ให้ผลบวกจะสามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13.2.6 ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีน(hematoxylin)

นำเนื้อเยื่อ 3 แผ่นแรก หรือ 1 ชุด มาย้อมสีฮีมาทอกไซลีน และอีก 1 ชุด ย้อมสีอิโอซินเพียงอย่างเดียว นำเนื้อเยื่อชุดแรกมาย้อมสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 10 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 % เพื่อล้างสีส่วนเกินออกอย่างรวดเร็ว แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 % ให้เนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีน้ำเงินจาง แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที

13.2.7 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ(dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ

แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 80 % เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 90 % เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีทับ (counterstain) ในเนื้อเยื่อด้วยสีอิโอซิน 0.02 % ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จากนั้นแช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1: 1 เป็นเวลา 5 นาที ไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

13.3 การทำสไลด์ถาวร

ผนึกสไลด์โดยหยดเปอร์เม้าท์ ประมาณ 3 หยดบนสไลด์ นำกระจกสไลด์มาปิดโดยแตะขอบด้านหนึ่งเอียงทำมุม 45 องศา แล้วค่อยๆวางลงโดยไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาทำการตรวจหาตำแหน่งการติด *A. hydrophila* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในบริเวณต่างๆของเนื้อเยื่อปลา

14. การวิเคราะห์หากรดแลกติกในส่วนน้ำใสที่ได้จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)(Lefebvre et al., 2002 และ Staniforth et al., 1999)

14.1 การเตรียมส่วนใสที่ได้จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

นำแลกติกแอซิดแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผ่านแผ่นกรอง (Millipore Membrane Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

14.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางลำดับส่วนให้มีความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และใช้อาหารเหลว MRS เป็นสารมาตรฐานที่ไม่มีกรดแลกติก

14.3 สภาวะที่ใช้

โครมาโทกราฟีที่ใช้วิเคราะห์เป็นของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ตัวฉีด(injector) รุ่น Shimadzu CTO-2A ปั๊ม(pump)วิเคราะห์ของเหลว รุ่น Shimadzu LC-3A ตัวตรวจวัดด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร(210 nm UV Detector) รุ่น LDC analytical Spectro Monitor®4100 คอลัมน์ที่ใช้เป็นแบบ reversed phase MERCK 50942 LiChroCART®C_8 125-4 ความยาว 12.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค(particle size) 5 ไมครอน ตัววิเคราะห์ข้อมูล รุ่น Shimadzu C-R1A chromatopac ตัวชะ(mobile phase) ที่ใช้ คือ กรดฟอสโฟริก(H_3PO_4) pH 2.38 อัตราการไหล(flow-rate) 0.6 มิลลิลิตร/นาที และปริมาตรที่ฉีด 50 ไมโครลิตร

15. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA) **ของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย**(Heilig et al.,2002; Kabadjova et al.,2002; Temmerman et al.,2004)

15.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างตะกอนด้วย NSS 0.85 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) นำไปเหวี่ยงที่สภาวะเดิมอีกครั้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer (1.0 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH=8.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางด้วย Tris-HCl (10 mM, pH=8) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Araujo et al.,2004

15.2 การตรวจหาจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่หลอมในกรดอะซิติก เทลงในแม่พิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ เท TBE buffer (1.0 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 10 mM Boric acid, pH=8.0) ให้ท่วมเหนือผิวหน้าของอะกาโรสเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม นำมาหยดลงในช่องวิ่ง โดยใช้ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละช่องวิ่ง นำเข้าเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซีส หลังจากแยกจนสีติดตามเคลื่อนที่ลงมาเกือบถึงขอบล่างเจล ปิดเครื่องแล้วนำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบสีดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

15.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) **เพื่อหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของดีเอ็นเอ**

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในหลอด Master mix ดังนี้

1. น้ำกลั่น	46.0	ไมโครลิตร
2. 10X PCR buffer	10.0	ไมโครลิตร
3. สารละลาย dNTP	100.0	ไมโครโมลาร์

4. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.0 ไมโครโมลาร์

5. Forward primer 10F 5’-AGTTTGATCCTGGCTC-3’ 0.2 ไมโครโมลาร์

6. Reverse primer 1540R 5’-AAGGAGGTGATCCAGCC-3’ 0.2 ไมโครโมลาร์

7. Taq DNA polymerase 1.0 หน่วย

8. DNA (ไม่เจือจาง, เจือจาง 10, 100, 1000 เท่า) 2.0 ไมโครลิตร

ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 25 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PCR Thermohybaid PxE 0.2 สภาวะที่ใช้ ดังนี้

Hot start	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที
Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
Annealing	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1.30 นาที
Final	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด 35 รอบ

15.4 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 %(น้ำนัก/ปริมาตร) ที่หลอมใน TBE buffer เทลงในแม่พิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ เท TBE buffer ให้ท่วมเหนือผิวหน้าของอะกาโรสเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม หยดลงในช่องวิ่ง โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละช่องวิ่ง นำเข้าเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซีส หลังจากแยกจนสีติดตามเคลื่อนที่ลงมาเกือบถึงขอบล่างเจล ปิดเครื่องแล้วนำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบสีดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

15.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อนำดีเอ็นเอไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในหลอด Master mix ดังนี้

1. น้ำกลั่น 46.0 ไมโครลิตร

2. 10X PCR buffer 10.0 ไมโครลิตร

3. สารละลาย dNTP 100.0 ไมโครโมลาร์

4. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.0 ไมโครโมลาร์

5. Forward primer 10F 5’-AGTTTGATCCTGGCTC-3’ 0.2 ไมโครโมลาร์

6. Reverse primer 1540R 5’-AAGGAGGTGATCCAGCC-3’ 0.2 ไมโครโมลาร์

7. Taq DNA polymerase 1.0 หน่วย

8. DNA (เจือจาง 100 เท่า) 2.0 ไมโครลิตร

ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 25 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PCR Thermohybaid PxE 0.2 สภาวะที่ใช้ ดังนี้

Hot start	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เวลา 3 นาที
Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
Annealing	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เวลา 1.30 นาที
Final	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เวลา 7 นาที

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทั้งหมด 35 รอบ

15.6 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่หลอมใน TBE buffer เทลงในแม่พิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัว วางชิ้นอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ เท TBE buffer ให้ท่วมเหนือผิวหน้าของอะกาโรสเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม นำมาหยดลงใน 5 ช่องวิ่ง เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากพอที่จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ โดยแบ่ง 4 ช่องวิ่งไว้ไม่ต้องนำไปย้อมสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์และตรวจแถบสีด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อไม่ให้ดีเอ็เอถูกทำลาย ส่วนอีก 1 ช่องวิ่งและดีเอ็นเอมาตรฐานให้นำไปย้อมเอทิเดียมโบรไมด์และตรวจหาแถบสีด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับตำแหน่งของดีเอ็นเอของ 4 ช่องวิ่งที่ไม่ได้ทำการย้อม จากนั้นตัดเจลบริเวณเดียวกับที่เกิดแถบสีบน 1 ช่องวิ่งที่ถูกย้อมและบนดีเอ็นเอมาตรฐาน

15.7 การแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIA quick®Gel extraction kit

นำอะกาโรสเจลที่ตัดได้ในข้อ 15.6 มาทำการแยกดีเอ็นเอ ตามขั้นตอน ดังนี้

15.7.1 ชั่งน้ำหนักอะกาโรสเจล

15.7.2 เติม QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักอะกาโรสเจล

15.7.3 บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนอะกาโรสเจลละลายหมด เขย่าทุก 2-3 นาที

15.7.4 ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick column เหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที

15.7.5 ปิเปต QG buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงใน QIAquick column เหวี่ยงด้วยความเร็ว13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที

15.7.6 ปิเปต PE buffer ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงใน QIAquick column เหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที

15.7.7 เททิ้งและเหวี่ยงอีกครั้ง

15.7.8 ย้าย QIA column มาไว้ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่

15.7.9 ชะดีเอ็นเอด้วย EB buffer ปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยให้ปิเปตลงตรงกลางเยื่เลือกผ่าน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที เหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ได้สารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการ

15.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้จากข้อ 15.7 โดยใช้บริการจากหน่วยบริการชีวภาพ(BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ(สวทช.) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ forward และ reverse ดังแสดงในตารางที่ 2 เพื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอจนครบ 1,500 นิวคลีโอไทด์

รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ใน Gen Bank โดยโปรแกรม Blast

ตารางที่ 2 นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์(5'-3')	เอกสารอ้างอิง
10F	AGTTTGATCCTGGCTC	Auburn University Environment Institute, 2002
350F	TACGGGAGGCAGCAG	Weber et al., 2001
1240R	CCATTGTAGCACGTGT	Laurie et al., 2002
1540R	AAGGAGGTGATCCAGCC	Lambert et al., 1998

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากทางเดินอาหารปลากะพงขาว

ใช้ปลากะพงขาวทั้งหมด 20 ตัว และจากการนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS พบว่า มีจำนวน 9.5×10^{6}-5.5×10^{8} เซลล์/กรัมของทางเดินอาหาร เลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองและสร้างกรด มาทำการแยกซ้ำจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์มาทดสอบการสร้างเอมไซม์คะตะเลส เก็บโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นลบไว้ในอาหารกึ่งแข็ง MRS โดยเทพาราฟินปิดทับบนผิวหน้าของอาหาร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกต่อไป จากการทดลองสามารถเก็บแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลต

2. คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

นำส่วนใสที่ได้จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียในข้อ 1 มาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งปรับ pH ให้เป็น 6.5 อีกส่วนหนึ่งไม่ปรับ pH มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio flurialis* และ *Aeromonas hydrophila* พบว่า มี 5 ไอโซเลต (กำหนดให้เป็น LAB-1 – LAB-5) ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้โดยส่วนน้ำใสทั้ง 2 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากเชื้อทดสอบโดยส่วนน้ำใสของ LAB

แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้ / ส่วนน้ำใส	บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นกับเชื้อทดสอบ(มิลลิเมตร)			
	V. parahaemolyticus	*V. vulnificus*	*V. flurialis*	*A. hydrophila*
LAB-1 pH 4.5	11.0	10.0	10.0	16.5
pH 6.5	0	0	0	13.5
LAB-2 pH 4.5	12.0	10.0	12.0	12.0
pH 6.5	0	0	0	10.0
LAB-3 pH 4.5	12.0	0	0	14.0
pH 6.5	0	0	0	11.0
LAB-4 pH 4.5	0	11.0	11.0	19.5
pH 6.5	0	0	0	11.5
LAB-5 pH 4.5	0	0	0	14.5
pH 6.5	0	0	0	11.0

3. **ศึกษาสมบัติบางประการของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย**

เมื่อได้ LAB-1 – LAB-5 แล้วนำมาทดสอบสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4-7 จากตารางทั้ง 3 ตารางแสดงให้เห็นว่าทั้ง 5 ไอโซเลต เซลล์ติดสีน้ำเงินของแกรมบวก มีทั้งรูปร่างแท่ง(rod) รูปร่างกลม(cocci) รี(coccobacilli) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ คะตะเลสและออกซิเดสเป็นลบ ซึ่งเป็นสมบัติเบื้องต้นของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีของ LAB-1 – LAB-5

ลักษณะที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ				
	LAB-1	LAB-2	LAB-3	LAB-4	LAB-5
Gram's stain	+	+	+	+	+
Shape	แท่ง	แท่ง	กลม	รี	รี
Motile	-	-	-	-	-
Catalase test	-	-	-	-	-
Oxidase test	-	-	-	-	-
Indole test	-	-	-	-	-
Methyl red test	-	-	+	-	+
Voges proskauer test	-	-	-	-	-
Ornithin test	-	-	-	-	-
Citrate test	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	-	+	-	+
Homofermentative	-	-	+	-	+
Heterofermentative	+	+	-	+	-

ตารางที่ 5 การใช้คาร์โบไฮเดรตของ LAB-1 – LAB-5

คาร์โบไฮเดรต	ผลการใช้คาร์โบไฮเดรต				
	LAB-1	LAB-2	LAB-3	LAB-4	LAB-5
Arabinose	-	+	-	-	+
Glucose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	-	+
Lactose	-	-	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การเจริญของ LAB-1 – LAB-5 ในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	ความสามารถในการเจริญ				
	LAB-1	LAB-2	LAB-3	LAB-4	LAB-5
0	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
6	+	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 การเจริญของ LAB-1 – LAB-5 ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นเกลือน้ำดี (%น้ำหนัก/ปริมาตร)	ความสามารถในการเจริญ				
	LAB-1	LAB-2	LAB-3	LAB-4	LAB-5
0	+	+	+	+	+
0.1	+	+	-	+	+
0.3	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-
0.7	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียมอาหารผสมแบบเปียก(Moist Diet)สำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว

ทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีนและไขมันของส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารปลา ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ระดับโปรตีนและไขมันของส่วนประกอบต่างๆในอาหารปลา

ส่วนประกอบ	%โปรตีน	%ไขมัน
ปลาป่น	61.4	8.91
แป้งสาลี	11.53	2.12
กากถั่วเหลือง	44.88	3.15
กลูเตน	79.07	1.63
เปลือกกุ้งป่น	48.67	6.35

จากนั้นคำนวณส่วนประกอบต่างๆ ที่จะใช้ผสมเพื่อให้ได้ระดับโปรตีน 40-45 % และไขมัน 12-18 % จะได้ส่วนประกอบดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของอาหารปลากะพงขาวในการทดลอง

ส่วนประกอบ	%(น้ำหนัก/น้ำหนัก)
ปลาป่น	57
แป้งสาลี	20
เปลือกกุ้งป่น	2
กากถั่ว	4.4
กลูเตน (Wheat gluten)	5
วิตามินรวม	2
แร่ธาตุรวม	2
วิตามินซี (Ascorbic acid)	0.1
น้ำมันทูน่า	6
น้ำมันพืช	1.5
น้ำ	30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมอาหารปลาครั้งแรกนี้ อาหารปลาแห้งและแข็งเกินไป เมื่อนำไปให้ปลากิน พบว่า ปลาไม่กินอาหารที่เตรียมได้ จึงทำการปรับสูตรอาหารโดยเพิ่มปลาเป็ดบดลงไปเพื่อเป็นการเพิ่มกลิ่นคาวปลาและปรับความชื้นในอาหารให้เหมาะสม โดยได้ส่วนประกอบทั้งหมดเหมือนเดิม แต่ลดปริมาณปลาป่นลงเหลือ 20 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วใส่ปลาเป็ดบดลงไป 37 %(น้ำหนัก/น้ำหนัก) เมื่อนำไปให้ปลากิน พบว่า ปลากินอาหารได้ดี จึงใช้อาหารที่เตรียมครั้งที่ 2 นี้ตลอดการทดลอง ผลการวิเคราะห์อาหารปลา โดยฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการตรวจวิเคราะห์อาหารปลาแบบเปียก(Moist diet)

องค์ประกอบ	ระดับ(%)
ความชื้น	50.28
โปรตีน	21.04
ไขมัน	3.37
เถ้า	5.08
เยื่อใย	1.61
คาร์โบไฮเดรต	18.62

ผลวิเคราะห์อาหารปลาที่แสดงในตารางที่ 10 เป็นผลวิเคราะห์อาหารเปียกซึ่งมีระดับความชื้นประมาณ 50 % เมื่อคำนวณในรูปอาหารแห้ง พบว่า องค์ประกอบต่างๆในอาหารปลาจะเพิ่มขึ้นอีก 1 เท่าตัว เนื่องจากในอาหารปลามีความชื้นอยู่ 50.28 %

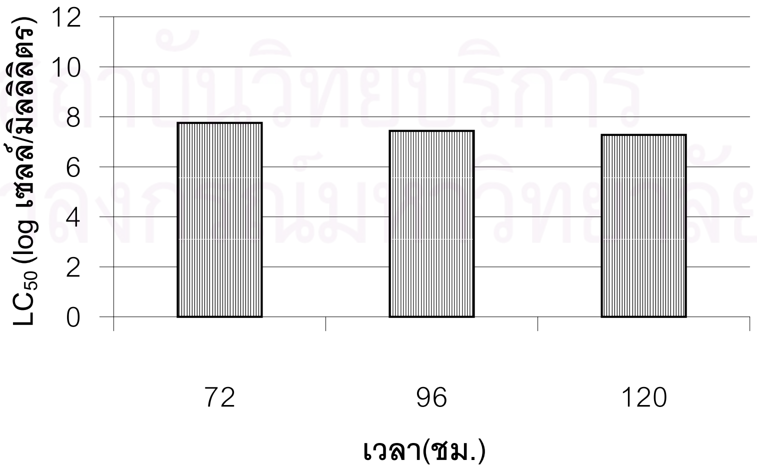
5. การหาค่าความเข้มข้นของเชื้อทดสอบที่ทำให้ปลากะพงขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Median Lethal concentration; LC_{50})

ปลาที่ใช้ทดสอบนี้อายุ 30 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 0.35 กรัม ความยาวเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร ตรวจนับจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มซึ่งมีความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่แตกต่างกันแสดงผลในตารางที่ 11 นำผลไปวิเคราะห์ค่า LC_{50} โดยโปรแกรมโพรบิท อะนาลิซีส ได้ค่า LC_{50} ของ *A. hydrophila* เท่ากับ 7.76, 7.47, 7.26 $\log_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร ที่ 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ นับจำนวน *A. hydrophila* จากปลาที่ตายได้ 1.0×10^7 – 1.29×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

นำ LC_{50} ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ โพรบิทอะนาลิซิส ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับเวลาได้ผลดังรูปที่ 2

ตารางที่ 11 จำนวนปลากะพงขาวที่ตายหลังเติม *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำเลี้ยงปลา เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

A. hydrophila (เซลล์/มิลลิลิตร)	log cell number	N (ตัว)	จำนวนปลาตายสะสม(ตัว)					
			0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.
0(ควบคุม)	-	30	0	0	0	0	0	0
7.1×10^{6}	6.85	30	0	0	0	0	0	0
8.1×10^{6}	6.91	30	0	0	0	0	0	0
8.2×10^{6}	6.91	30	0	0	0	0	0	0
4.0×10^{7}	7.60	30	0	0	0	4	23	30
4.3×10^{7}	7.63	30	0	0	0	4	25	30
5.4×10^{7}	7.73	30	0	0	0	6	27	30
1.8×10^{8}	8.26	30	0	0	29	30	30	30
2.1×10^{8}	8.32	30	0	0	0	30	30	30
3.0×10^{8}	8.48	30	0	0	0	30	30	30



รูปที่ 2 ค่า LC_{50} ของ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลากะพงขาวตายที่เวลาต่างๆ

ผลการวิเคราะห์ค่า LC_{50} แสดงให้เห็นว่าเมื่อปลาได้รับ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 7.76 $\log_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะทำให้ปลาตาย 50 % ส่วนชั่วโมงที่ 96 และ 120 นั้นความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่จะทำให้ปลาตาย 50 % คือ 7.47, 7.26 $\log_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ได้จากการทดลองนี้ไปใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองขั้นต่อไป

6. การผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อใช้เลี้ยงปลาในตู้กระจก

เมื่อนำแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต (LAB-1 – LAB-5) มาผสมกับอาหารปลาให้ได้ความเข้มข้น 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร ให้เข้ากัน ทำการตรวจหาจำนวนเซลล์ในอาหารปลาทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน แสดงผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียเฉลี่ยในอาหารปลา (น้ำหนักเปียก)

LAB-	ปริมาณเซลล์ใน 1 กรัมอาหาร(น้ำหนักเปียก)				
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
0(ควบคุม)	$1.7x10^3$	$1.5x10^3$	$1.2x10^3$	$2.0x10^3$	$2.1x10^3$
1	$1.5x10^7$	$1.3x10^7$	$1.3x10^6$	$2.0x10^6$	$3.5x10^6$
2	$8.1x10^7$	$8.0x10^7$	$1.5x10^7$	$1.5x10^7$	$1.5x10^6$
3	$3.0x10^7$	$2.6x10^7$	$1.5x10^7$	$2.3x10^6$	$1.8x10^6$
4	$1.1x10^7$	$1.0x10^7$	$1.1x10^7$	$1.7x10^6$	$1.2x10^6$
5	$3.0x10^7$	$2.8x10^7$	$2.9x10^7$	$3.0x10^6$	$2.5x10^6$

7. การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 30 วัน ในตู้กระจก

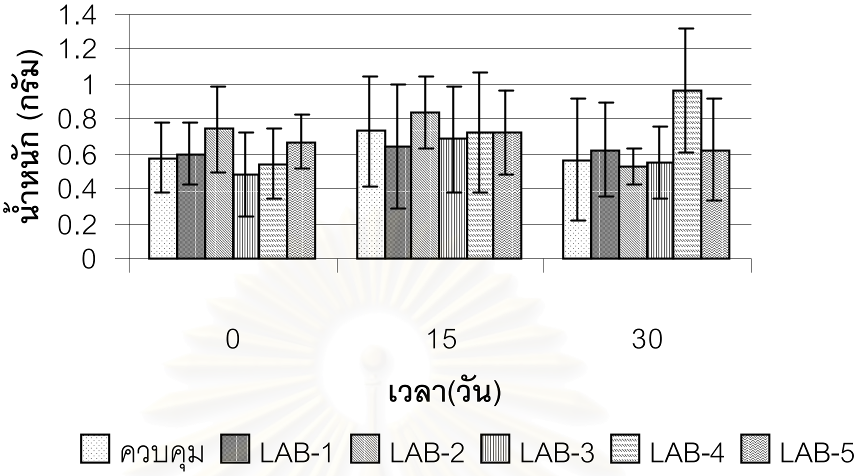
นำแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A.hydrophila* มาผสมในอาหารปลาเพื่อเลี้ยงปลากะพงขาวอายุ 30 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยทุกๆ 15 วัน จะทำการชั่งน้ำหนัก วัดความยาวของปลาและตรวจสอบคุณภาพน้ำเลี้ยงปลา พบว่า วันที่ 0 น้ำหนักเฉลี่ยของปลากลุ่ม LAB-2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) กับปลากลุ่ม LAB-3 และ LAB-4 ในด้านของความยาวเฉลี่ย ปลากลุ่ม LAB-5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p<0.05$) กับปลากลุ่มควบคุมและกลุ่ม LAB-1 แต่เมื่อเลี้ยงไป 15 วัน น้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของปลาแต่ละกลุ่มจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$) และเมื่อเลี้ยงปลาครบ 30 วัน ปลากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4(LAB-4)มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นแตกต่างจากน้ำหนักเฉลี่ยของปลากลุ่มควบคุมและปลากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) ความยาวเฉลี่ยของปลากลุ่ม LAB-4 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของปลากลุ่มควบคุม, LAB-1, LAB-2, LAB-3 และ LAB-5 มีน้ำหนักเฉลี่ยลดลงจากวันที่ 0 และวันที่ 15 น้ำหนักเฉลี่ยของปลาแสดงในตารางที่ 13 และ/หรือ รูปที่ 3 ความยาวเฉลี่ยของปลาแสดงในตารางที่ 14 และ/หรือ รูปที่ 4 เมื่อพิจารณาจำนวนปลาที่รอดชีวิตพบว่า ปลาในกลุ่ม LAB-4 มีจำนวนปลาที่รอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ จำนวนปลาที่รอดชีวิตแสดงในรูปที่ 5 และผลตรวจคุณภาพน้ำแสดงในตารางที่ 15 ซึ่งสมบัติต่างๆของน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากะพงขาว ยกเว้นปริมาณไนไตรท์ที่อยู่ในระดับที่ค่อนข้างอันตราย จึงได้ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 % ของปริมาตรน้ำในตู้ทุกๆ 2 วัน

ตารางที่ 13 น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก

กลุ่ม / วันที่	น้ำหนักเฉลี่ย(กรัม)		
	0	15	30
ควบคุม	$0.58^{ab} \pm 0.20$	$0.73^{a} \pm 0.31$	$0.57^{b} \pm 0.35$
LAB-1	$0.60^{ab} \pm 0.18$	$0.64^{a} \pm 0.36$	$0.63^{b} \pm 0.27$
LAB-2	$0.74^{a} \pm 0.25$	$0.83^{a} \pm 0.21$	$0.53^{b} \pm 0.11$
LAB-3	$0.48^{b} \pm 0.24$	$0.68^{a} \pm 0.31$	$0.55^{b} \pm 0.21$
LAB-4	$0.54^{b} \pm 0.20$	$0.73^{a} \pm 0.35$	$0.97^{a} \pm 0.36$
LAB-5	$0.67^{ab} \pm 0.16$	$0.73^{a} \pm 0.24$	$0.63^{b} \pm 0.29$

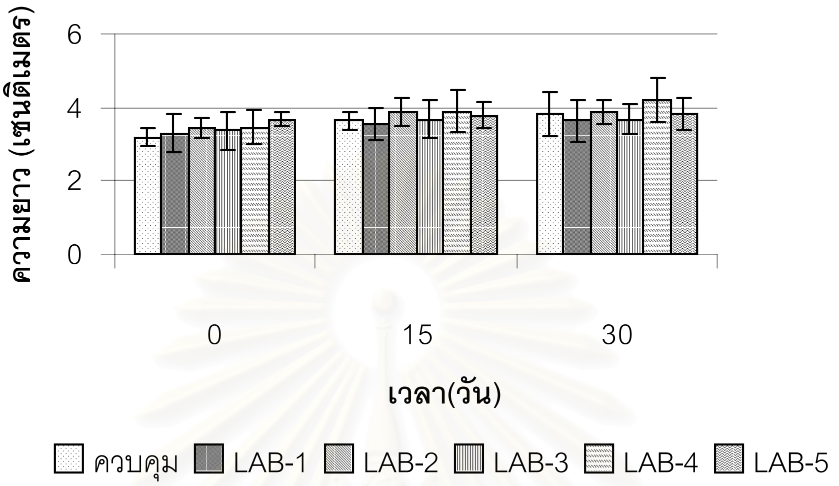
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



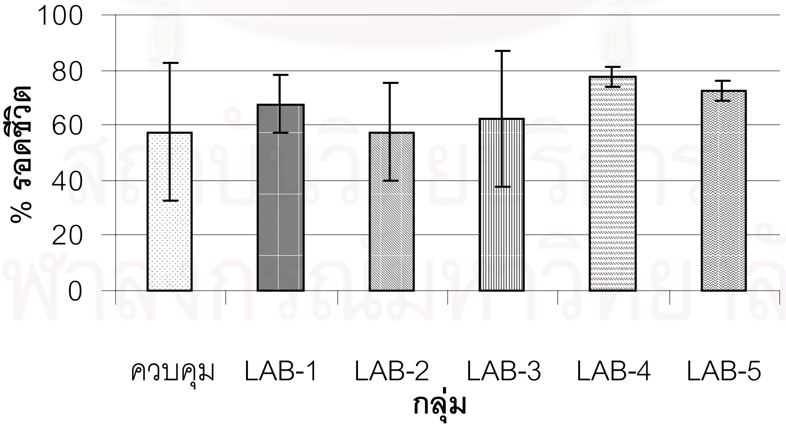
รูปที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก

ตารางที่ 14 ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก

กลุ่ม / วันที่	ความยาวเฉลี่ย(เซนติเมตร)		
	0	15	30
ควบคุม	$3.19^{b} \pm 0.24$	$3.63^{a} \pm 0.26$	$3.82^{ab} \pm 0.60$
LAB-1	$3.29^{b} \pm 0.51$	$3.54^{a} \pm 0.46$	$3.65^{b} \pm 0.57$
LAB-2	$3.44^{ab} \pm 0.52$	$3.87^{a} \pm 0.37$	$3.88^{ab} \pm 0.32$
LAB-3	$3.36^{ab} \pm 0.52$	$3.67^{a} \pm 0.52$	$3.68^{b} \pm 0.43$
LAB-4	$3.46^{ab} \pm 0.49$	$3.90^{a} \pm 0.58$	$4.18^{a} \pm 0.60$
LAB-5	$3.67^{a} \pm 0.20$	$3.78^{a} \pm 0.36$	$3.81^{ab} \pm 0.42$



รูปที่ 4 ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก



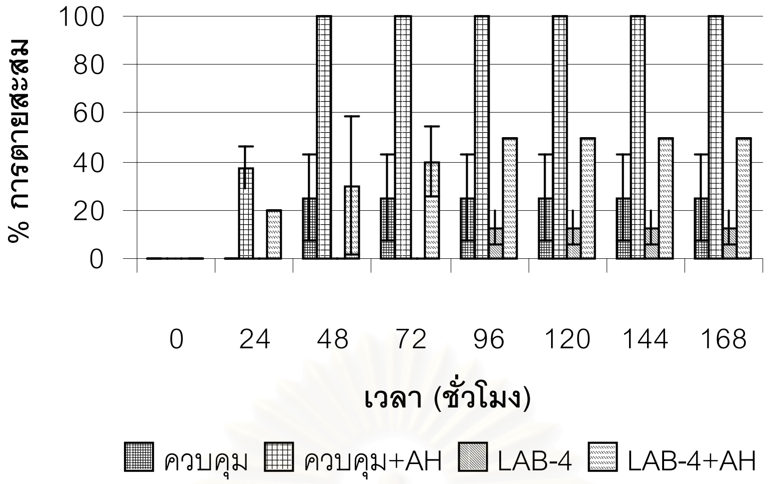
รูปที่ 5 การรอดชีวิตวันที่ 30 ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในตู้กระจก

ตารางที่ 15 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวในตู้กระจก เป็นระยะเวลา 30 วัน

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)					
	ควบคุม	LAB-1	LAB-2	LAB-3	LAB-4	LAB-5
ไนไตรท์ (mg/l)	0.3-0.5	0.3-0.5	0.3-0.5	0.3-0.5	0.3-0.5	0.3-0.5
ไนเตรท (mg/l)	10-20	10-20	10-20	10-20	5-20	10-20
ฟอสเฟต (mg/l)	0.1-0.25	0.1-0.25	0.1-0.25	0.1-0.25	0.1-0.25	0.1-0.25
อุณหภูมิ (^{o}C)	28.5-29.5	28.5-29.5	28.5-29.5	28.5-29.5	28.5-29.5	28.5-29.5
pH	7.7-8.0	7.7-8.0	7.7-8.0	7.7-8.0	7.7-8.0	7.7-8.0
ความเค็ม (ppt)	20	20	20	20	20	20
อัลคาลินิตี้ (mg/l)	80-90	80-90	80-90	80-90	80-90	80-90
แอมโมเนียม (mg/l)	0	0	0	0	0	0
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	6.5-8.0	6.5-8.0	6.5-8.0	6.5-8.0	6.5-8.0	6.5-8.0

8. การทดสอบความสามารถของปลากะพงขาวในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ในตู้กระจก

หลังการเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* พบว่า เมื่อเลี้ยงครบ 30 วัน ปลากะพงขาวในกลุ่ม LAB-4 มีจำนวนปลาที่รอดชีวิตสูงสุด มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและดีกว่าปลาในกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงนำปลาในกลุ่ม LAB-4 มาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* ความเข้มข้นประมาณ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร (ค่า LC_{50} จากข้อ 5) ด้วยวิธีแช่ (Gildberg, 1998; Rengpipat, 1998; Phianphak, 1999) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง ปลากลุ่มควบคุมมีการตายสะสม 37.5 % กลุ่ม LAB-4 มีการตายสะสม 20 % และที่ 48 ชั่วโมง ปลาในกลุ่มควบคุมมีการตายสะสม 100 % ในขณะที่กลุ่ม LAB-4 มีการตายสะสม 30, 40 และ 50 % ที่ 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6 นับจำนวน *A. hydrophila* จากปลาที่ตายได้ 1.3×10^6 – 4.2×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร



รูปที่ 6 ปริมาณการตายสะสมของปลากะพงขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* หลังการเลี้ยงในตู้กระจก เป็นระยะเวลา 30 วัน

จากการทดลองข้างต้น(ข้อที่ 7 และ 8) จะได้ว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ(LAB-1, LAB-2, LAB-3, LAB-4 และ LAB-5) ในตู้กระจกซึ่งเป็นระบบการเลี้ยงแบบปิดนั้น ปลากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4(LAB-4) สามารถเสริมการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวได้ โดยพิจารณาจากน้ำหนักและความยาวของปลา รวมทั้งสามารถต้านทานโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้น จึงเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4(LAB-4) มาผสมในอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อนำไปเลี้ยงปลาในกระชังต่อไป โดยจะทำการทดลอง 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร

9. การผสม LAB-4 กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อใช้เลี้ยงปลาในกระชัง

นำ LAB-4 มาผสมในอาหารปลาโดยเตรียมทุก 7 วัน ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร ทำการตรวจหาจำนวนเซลล์ในอาหารปลาวันที่ 0 และ 7 พบว่า กลุ่มควบคุมมีแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 1.3×10^3- 2.1×10^3 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารปลาในกลุ่มทดลองมีความเข้มข้นของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 2.0×10^5 – 6.6×10^5 และ 2.3×10^7 – 4.3×10^7 เซลล์/กรัมอาหาร

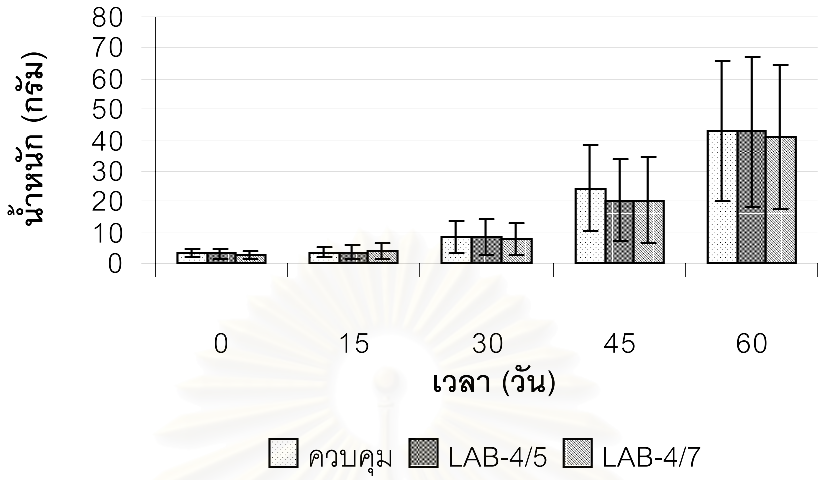
10. การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 60 วัน ในกระชัง

เลี้ยงปลากะพงขาวอายุ 60 วัน ด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร ในกระชังเป็นระยะเวลา 60 วัน โดยแบ่งกระชังออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 กระชัง (ตำแหน่งของกระชังแสดงในภาคผนวก ง. หมายเลข 1) ทำการชั่งน้ำหนัก วัดความยาวของปลา และตรวจสอบคุณภาพน้ำเลี้ยงปลา ทุก 15 วัน พบว่า วันที่ 0, 15 และ 30 น้ำหนักและความยาวของปลาไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกกลุ่มทดลอง แต่พบว่าวันที่ 45 ของการเลี้ยง ปลาในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักและความยาวมากกว่าปลาในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4 ทั้ง 2 ความเข้มข้น คือ 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร (LAB-4/5 และ LAB-4/7) อย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) และทั้งน้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$)ในทุกกลุ่มทดลองในวันที่ 60 ของการเลี้ยง น้ำหนักเฉลี่ยของปลาแสดงในตารางที่ 16 และ/หรือ รูปที่ 7 ความยาวเฉลี่ยของปลาแสดงในตารางที่ 17 และ/หรือ รูปที่ 8 จำนวนปลาที่รอดชีวิตหลังจากเลี้ยงครบ 60 วัน แสดงดังรูปที่ 9 เห็นได้ว่าปลาทั้ง 3 กลุ่มมีปลาที่รอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$) และผลตรวจคุณภาพน้ำแสดงในตารางที่ 18 ซึ่งสมบัติต่างๆของน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากะพงขาว

ตารางที่ 16 น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์/กรัมอาหาร ในกระชัง

กลุ่ม / วันที่	น้ำหนักเฉลี่ย(กรัม)				
	0	15	30	45	60
ควบคุม	$3.18^a \pm 1.40$	$3.47^a \pm 1.80$	$8.51^a \pm 5.34$	$24.37^a \pm 14.19$	$42.90^a \pm 22.62$
LAB-4/5	$2.93^a \pm 1.49$	$3.54^a \pm 2.07$	$8.61^a \pm 5.77$	$20.42^b \pm 13.12$	$42.71^a \pm 24.28$
LAB-4/7	$2.85^a \pm 1.25$	$3.97^a \pm 2.79$	$7.91^a \pm 5.24$	$20.18^b \pm 14.00$	$40.97^a \pm 23.45$

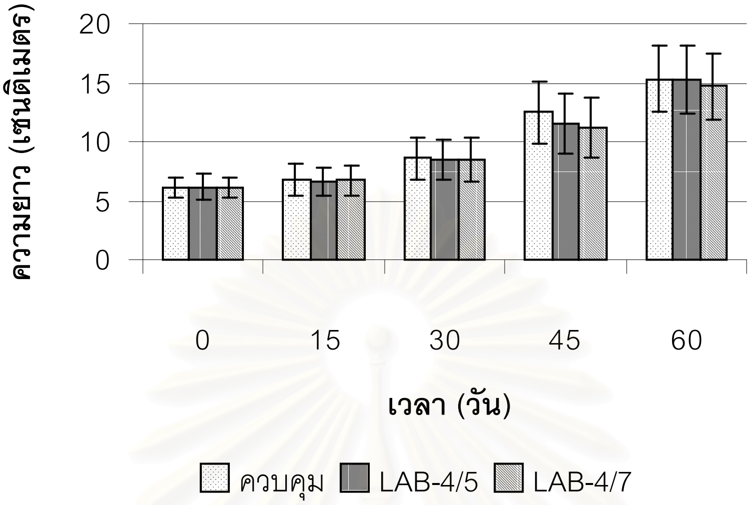
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



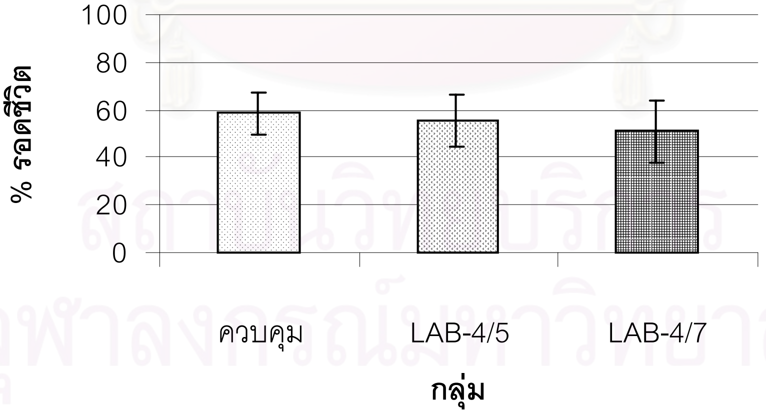
รูปที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5(LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์/กรัมอาหาร ในกระชัง

ตารางที่ 17 ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์/กรัมอาหาร ในกระชัง

กลุ่ม / วันที่	ความยาวเฉลี่ย(เซนติเมตร)				
	0	15	30	45	60
ควบคุม	$6.11^a \pm 0.88$	$6.72^a \pm 1.34$	$8.57^a \pm 1.71$	$12.48^a \pm 2.57$	$15.29^a \pm 2.80$
LAB-4/5	$6.18^a \pm 1.08$	$6.56^a \pm 1.22$	$8.47^a \pm 1.70$	$11.55^b \pm 2.58$	$15.21^a \pm 2.86$
LAB-4/7	$6.06^a \pm 0.89$	$6.74^a \pm 1.30$	$8.50^a \pm 1.84$	$11.24^b \pm 2.55$	$14.68^a \pm 2.83$



รูปที่ 8 ความยาวเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์/กรัมอาหาร ในกระชัง



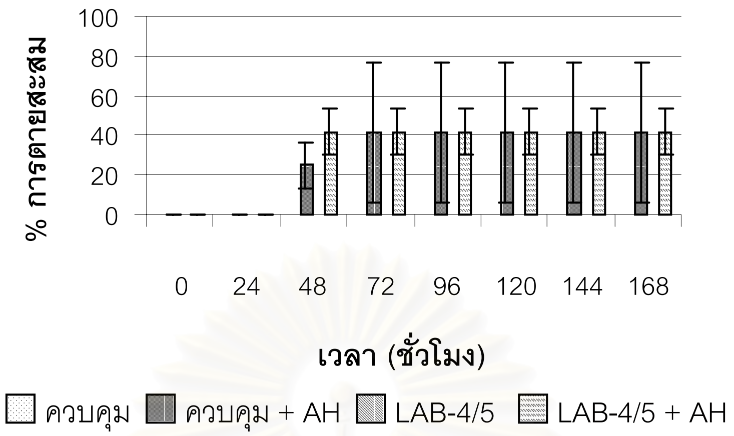
รูปที่ 9 การรอดชีวิตวันที่ 60 ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์/กรัมอาหาร ในกระชัง

ตารางที่ 18 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง เป็นระยะเวลา 60 วัน

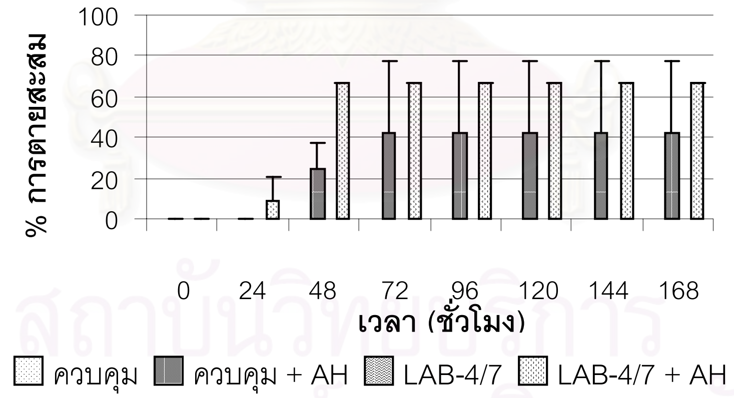
คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)		
	ควบคุม	LAB-4/5	LAB-4/7
ไนไตรท์ (mg/l)	0.1-0.3	0.1-0.3	0.1-0.3
ไนเตรท (mg/l)	0.0	0.0	0.0
ฟอสเฟต (mg/l)	0.25-0.50	0.25-0.50	0.25-0.50
อุณหภูมิ (^{o}C)	30.0-32.0	30.0-32.0	30.0-32.0
pH	7.5-8.5	7.5-8.5	7.5-8.5
ความเค็ม (ppt)	4.0	4.0	4.0
อัลคาลินิตี้ (mg/l)	110-150	110-150	110-150
แอมโมเนียม (mg/l)	0.009-0.03	0.009-0.03	0.009-0.03
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	8.50-8.59	8.50-8.59	8.50-8.59

11. การทดสอบความสามารถของปลากะพงขาวในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila*

หลังการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังเป็นระยะเวลา 60 วัน นำปลาที่เหลือมาเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* ความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/ml ด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง (Austin, 1995; Nikoskelainen, 2001) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ปลาทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม, LAB-4/5 และ LAB-4/7 มีจำนวนปลาตายสะสมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีด *A. hydrophila* ไม่มีการตาย ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11



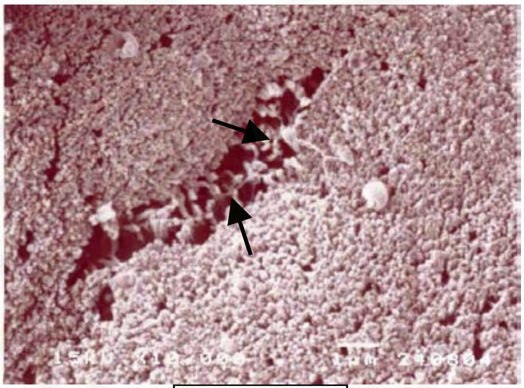
รูปที่ 10 ปริมาณการตายสะสมของปลากะพงขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* หลังการเลี้ยงในกระชัง เป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^5 (LAB-4/5) เซลล์/กรัมอาหาร



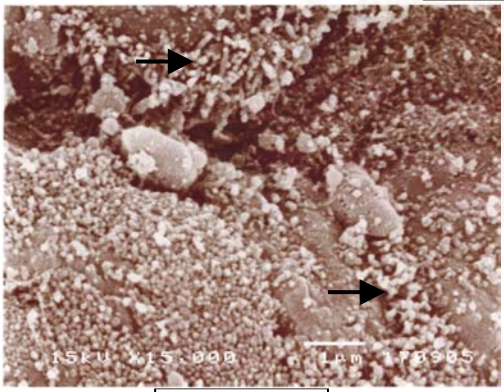
รูปที่ 11 ปริมาณการตายสะสมของปลากะพงขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* หลังการเลี้ยงในกระชัง เป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ความเข้มข้น 10^7 (LAB-4/7)เซลล์/กรัมอาหาร

12. การตรวจดูแบคทีเรียในทางเดินอาหารปลากะพงขาว โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

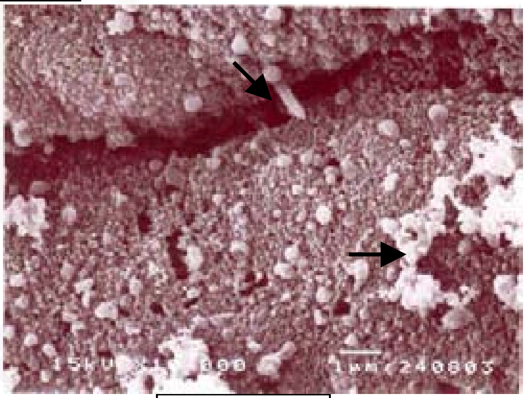
เมื่อนำลำไส้ของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วย LAB-4 ทั้ง 2 กลุ่ม (LAB-4/5 และ LAB-4/7) และกลุ่มควบคุม ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า บริเวณเยื่อบุลำไส้มีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ (villi) ซึ่ง villi เหล่านี้ทำหน้าที่ดูดซึมอาหาร ทำให้ภาพที่เห็นจากกล้องนั้นเป็นด้านบนของvilli แบคทีเรียในทางเดินอาหารของปลาทั้ง 3 กลุ่มมีอยู่น้อยมาก แต่ในกลุ่ม LAB-4/5 และ LAB-4/7 นั้นจะพบกลุ่มของแบคทีเรียรูปร่างรียึดเกาะอยู่บน villi ในขณะที่ไม่พบกลุ่มของแบคทีเรียเหล่านี้ในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 12a, 12b และ 12c



รูปที่ 12a



รูปที่ 12b



รูปที่ 12c

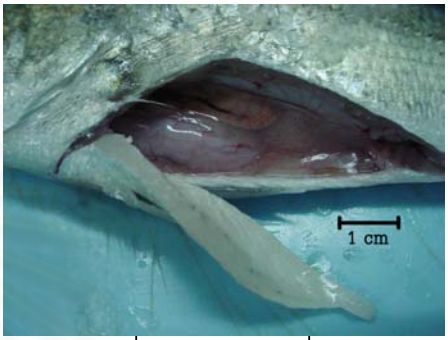
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12a-c การยึดเกาะของแบคทีเรียภายในลำไส้ของปลากะพงขาวโดยรูปที่ 12a เป็นลำไส้ของปลากลุ่มควบคุม(ตำแหน่งของลูกศร คือ villi) 12b เป็นลำไส้ของปลากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^5 เซลล์/กรัมอาหาร(LAB-4/5) และ 12c เป็นลำไส้ของปลากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น10^7 เซลล์/กรัมอาหาร(LAB-4/7) (ตำแหน่งของลูกศรในรูปที่ 12 b และ c คือ แบคทีเรียที่ยึดเกาะภายในลำไส้ของปลา)

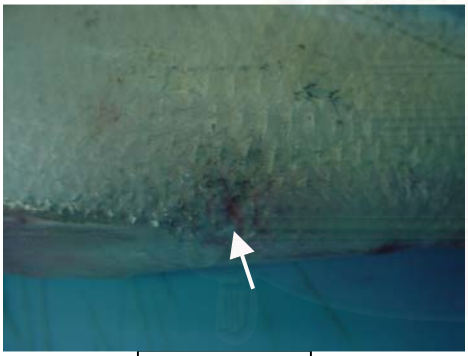
13. วิการของโรคและการตรวจหา *A. hydrophila* ด้วย Immunohistochemistry

ปลาที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องจะมีแผลตามลำตัวและมีอาการตกเลือดที่อวัยวะภายใน ส่วนปลาในกลุ่มควบคุมจะไม่มีอาการดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 13

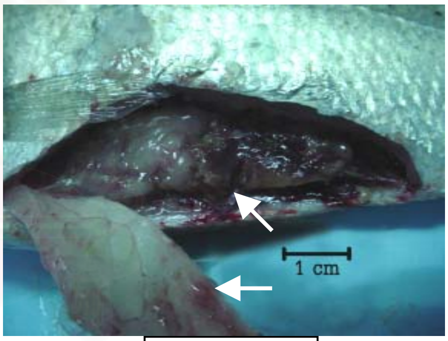
รูปที่ 13a



รูปที่ 13b



รูปที่ 13c



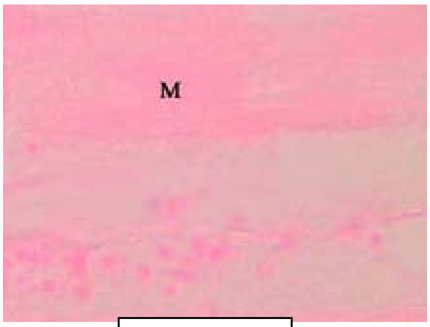
รูปที่ 13d

รูปที่ 13a-d วิการของโรคที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* โดยรูป 13a และ 13b เป็นปลาในกลุ่มควบคุม 13c และ 13d เป็นปลาในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค(ตำแหน่งลูกศร คือ แผลภายนอกและอาการตกเลือดที่อวัยวะภายใน)

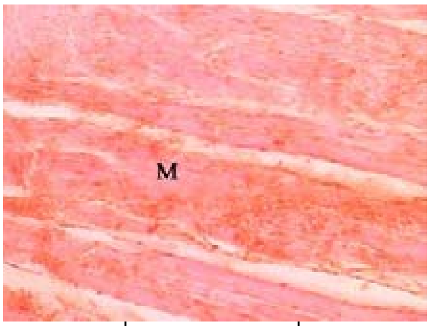
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้นเก็บตัวอย่างปลาที่ตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* มาตรวจดูพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ โดยนำเนื้อเยื่อมาตรวจด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ (monoclonal antibody) ต่อ *A. hydrophila* พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณต่างๆของปลาที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* สามารถตรวจพบบริเวณติดเชื้อซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อต่างๆได้ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าปลาที่ตายจากการทดลองนั้นมีสาเหตุมาจาก *A. hydrophila* ดังแสดงในรูปที่ 14

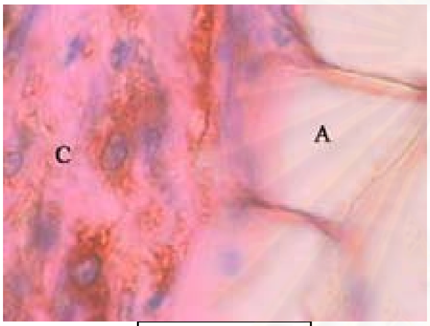
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



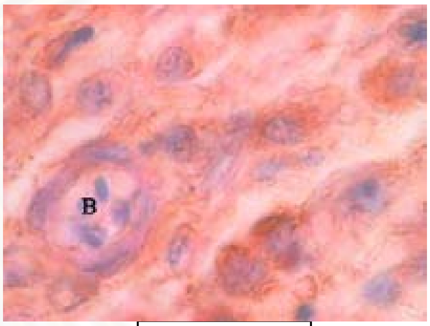
รูปที่ 14a



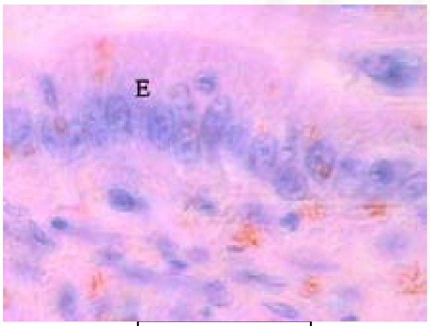
รูปที่ 14b



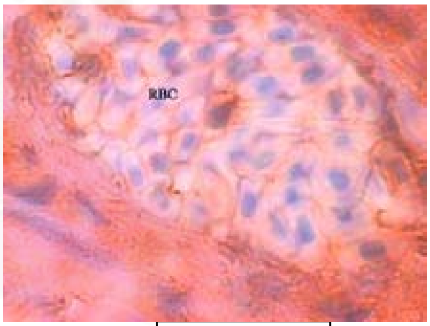
รูปที่ 14c



รูปที่ 14d



รูปที่ 14e



รูปที่ 14f

รูปที่ 14a-f เนื้อเยื่อบริเวณต่างๆของปลากะพงขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* โดยรูปที่ 14a(AH-44,IgG2a) และ 14b(AH-29,IgG2a)เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อ(Muscle)ของปลากลุ่มควบคุมและปลากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย *A. hydrophila* ตามลำดับ หลังการย้อมด้วยอิโอซิน 14c(AH-2,IgG2b)เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน(Connective tissue) และเนื้อเยื่อส่วนไขมัน(Adipose tissue) 14d(AH-2,IgG2b)เนื้อเยื่อบริเวณหลอดเลือด(Blood vessel) 14e(AH-2,IgG2b)เนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุลำไส้(Intestinal Epithelium tissue) 14f(AH-2,IgG2b)เนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุลำไส้ที่สามารถมองเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดง(Red Blood Cell) ของกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำหลังการย้อมด้วยฮีมาทอกซิลินและอิโอซิน

14. การวิเคราะห์หากรดแลกติกในส่วนน้ำใสที่ได้จาก LAB-4 โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการทดลองในข้อที่ 3 ทำให้ทราบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ LAB-4 จึงนำคุณสมบัติที่ได้ไปเทียบเคียงกับที่มีรายงานไว้ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 หลังจากการเทียบเคียงแล้ว พบว่า คุณสมบัติของ LAB-4 นั้นยังไม่เพียงพอสำหรับการระบุสายพันธุ์ของ LAB-4 ในเบื้องต้นนั้นทราบเพียงแต่ว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลกติก จึงทำการวิเคราะห์ส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง LAB-4 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในที่ที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดเพื่อเป็นการตรวจสอบและหาปริมาณของกรดแลกติกที่ LAB-4 สร้างขึ้น จากผลการทดลอง พบว่า LAB-4 มีการสร้างกรดแลกติก ความเข้มข้น 730 mM (จากกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแลกติก ภาคผนวก ง. หมายเลข 2)

15. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16เอส ไรโบโซมัลดีเอ็นเอของ LAB-4

หลังจากที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า LAB-4 สามารถสร้างกรดแลกติกได้ จึงทำการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ LAB-4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้นิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งจะได้เป็น PCR product และเมื่อส่ง PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ribosomal DNA แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเชื่อมต่อกัน ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' CGCTTTGTGGTTCAACTGACTTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGC
AAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATA
ACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTGTTATTTAA
AAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGG
TAATGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAAT
GGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA
ATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGT
AAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAATGTGTGACGGTA
TCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTC
CAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTG
AAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACTTGAGTG

CAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTG
TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTA
GGTGTTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTATCCAGGTCTTGACAT
CCCTTGACAACTCCAGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGAAGTCAGATCATCATAGCCCCTTATGACATGGGGCT
ACACACGTAGTCTACAATGGCGATATACAAGCGACGTTGTCCAACACCGCCGAAGGG
TGAGCTAATCTCATTTAAGTACGCTCTCAGTTCGGACCGTATGGTTGCAACCTGGCCT
ACAAGCAATGCTCGGAATGCAGCCTAGTAATACTGCGGATCAGCAGCGCTCGCGGT
GTATACGTTACCCGGGTGGTTGTACTATCACCGTCCTGTCTACATCCACGAGAGCTTT
GTAACAGCCCAAAGTCCGTTGGGGTTACCCGATCGGGAGCCAGCCGCTTATAAGGT
GGGACTAGGATG 3’

รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAB-4

จากนั้นนำไปเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ใน Genbank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Weissella confusa* โดยมีค่า E = 0.0 และระดับความคล้าย(Identities) 99 % (ภาคผนวก ง. หมายเลข 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

1. คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากทางเดินอาหารปลากะพงขาว

เมื่อนำทางเดินอาหารส่วนต่างๆ (ลำไส้, กระเพาะ, ไส้ติ่ง) ของปลากะพงขาวทั้ง 20 ตัว จากที่จับได้ในทะเล แหล่งน้ำกร่อยและจากการเพาะเลี้ยงในกระชังมาทำการแยกหาแลกติกแอซิดแบคทีเรียโดยปลาที่คัดเลือกมานั้นจะมีขนาด 3.0-5.0 กิโลกรัม อายุ 2-3 ปี ซึ่งเป็นช่วงขนาดและอายุของการผสมพันธุ์และวางไข่(สมใจ, 2527) เป็นปลาที่มีสุขภาพดี สังเกตจากลักษณะภายนอกของปลาต้องไม่มีแผล เกล็ดไม่หลุด หางไม่เปื่อย ลักษณะการว่ายน้ำของปลาต้องปราดเปรียวว่องไว ซึ่งเป็นลักษณะที่โดดเด่นของปลากะพงขาว มาแยกหาแลกติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS พบแบคทีเรียจำนวน 9.5×10^{6} – 5.5×10^{8} เซลล์/กรัมของทางเดินอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jankauskiene (1995), Ringo and Gatesoupe (1998) รายงานว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์เป็นส่วนหนึ่งของแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของปลาที่มีสุขภาพดี Hagi et al. (2004) ศึกษาสายพันธุ์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ของปลาน้ำจืด 4 ชนิด ที่เลี้ยงในบ่อโดยใช้น้ำจากทะเลสาบ Kasumigaura และให้อาหารปลาปกติ (commercial diet) พบว่า สายพันธุ์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะแตกต่างกันตามฤดูกาลและไม่ขึ้นกับชนิดของปลา กล่าวคือ ในฤดูร้อน (อุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส) พบ *Lactococcus lactis* 9.0×10^{5} – 4.8×10^{7} CFU/ กรัมลำไส้ ฤดูหนาว (อุณหภูมิของน้ำ 4-10 องศาเซลเซียส) พบ *Lactococcus raffinolactis* 5.2×10^{5} – 3.9×10^{6} CFU/ กรัมลำไส้ ส่วนในฤดูใบไม้ผลิและใบไม้ร่วง (อุณหภูมิของน้ำ 13 และ 17 องศาเซลเซียส) ไม่พบว่ามีสายพันธุ์ใดของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีจำนวนสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆอย่างโดดเด่น ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมี 1.3×10^{6} – 1.9×10^{9} CFU/ กรัมลำไส้ เห็นได้ว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของปลานั้นขึ้นกับสิ่งแวดล้อมที่เลี้ยง ได้แก่ น้ำ อาหาร และกลไกการต้านแบคทีเรียของปลา (Olafsen, 2001; Jankauskiene, 2000a)

2. คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Vibrio flurialis* และ *Aeromonas hydrophila*

ด้วยเทคนิค well agar diffusion พบว่า ส่วนน้ำใสของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย มีค่า pH 3.5 - 4.5 ซึ่งมีภาวะเป็นกรดที่สร้างโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรีย จึงทำการปรับ pH ให้ได้ค่าประมาณ 6.5 เพื่อศึกษาความสามารถของแลกติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลังขจัดอิทธิพลของกรด ส่วนการที่จะระบุประเภทของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจะต้องทำการศึกษาต่อไป จาก 74 ไอโซเลต พบ 5 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* และพบว่าส่วนน้ำใสของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ไม่ได้ผ่านการปรับ pH (pH 3.5-4.5) มีความสามารถในการยับยั้ง *A. hydrophila* มากกว่า (บริเวณใสกว้างกว่า)ส่วนน้ำใสที่ผ่านการปรับ pH เป็น 6.5 เนื่องจากผลของกรดแลกติกร่วมกับสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคประเภทอื่นๆ การคัดเลือกโพรไบโอติกด้วยเทคนิค well agar diffusion นี้เป็นวิธีพื้นฐานที่ทำกันอย่างแพร่หลาย (ฐิติพงศ์, 2538; วรรนิภา, 2539; Joseph *et. al.*, 1998; วิลาวัณย์, 2543; ศิริเพ็ญ, 2546) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่ายสะดวก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลาน้อย ส่วนข้อเสีย คือ สารที่ทดสอบต้องมีความสามารถในการยับยั้งสูง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว (sensibility) สูง ถ้าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่อยู่ในส่วนน้ำใสมีต่ำ อาจทำให้ไม่เกิดการยับยั้ง หากใช้วิธีนี้ในการคัดเลือกโพรไบโอติกจึงควรลดปริมาณน้ำในส่วนน้ำใสและใช้ส่วนใสที่นำน้ำออกแล้วในปริมาตรที่กำหนดไว้ (100 ไมโครลิตร) เพื่อให้สารต้านจุลชีพมีความเข้มข้นมากขึ้น มีรายงานหลายฉบับที่ใช้เทคนิคการคัดเลือกโพรไบโอติกที่แตกต่างจากนี้ ดังเช่น Gibson et al. (1998) ศึกษาความสามารถของ Bacteriocin-like inhibitory substance ที่สร้างจาก *Aeromonas media* A199 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำและมนุษย์ ด้วยเทคนิค diametric-streak เพื่อดูการเกิดบริเวณยับยั้ง Jacobsen et al. (1999) คัดเลือก *Lactobacillus* spp. 47 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในคนในเบื้องต้นทำการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro) ด้วยวิธี agar spot เพื่อหา Antimicrobial activity นอกจากนั้นยังทดสอบความสามารถในการเกาะติด ความทนทานต่อ pH และน้ำดี Nikoskelainen et al. (2001) คัดเลือกโพรไบโอติกโดยใช้สมบัติการยึดติดบนเมือก การเจาะทะลุเมือก การยับยั้งการเจริญและการยึดติดของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยการติดฉลากสารกัมมันตรังสี [methyl-1,2-^{3}H]thymidine บนแบคทีเรียที่สนใจ นอกจากนี้ยังหาความสามารถในการต้านทานต่อน้ำดีอีกด้วย Villamil et al. (2003) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วย extracellular products (EPCs) ของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ใน 96-well plate โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อดูเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระดับหลอดทดลอง (in vitro) ดังนั้น ควรเพิ่มเกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติก เช่น การทดสอบความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อบุทางเดินอาหารในระดับหลอดทดลอง ความสามารถในการทนเกลือ (NaCl) และเกลือน้ำดี (bile salt) ในภาวะจำลองที่คล้ายคลึงกับภาวะภายในทางเดินอาหารของปลา หรือการใช้เทคนิคต่างๆ มากกว่า 1 เทคนิคในการยืนยันผลการทดสอบ

3. ศึกษาสมบัติบางประการของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

นำ 5 ไอโซเลต ที่ให้ผลยับยั้ง *A. hydrophila* มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี พบว่า ผลการทดสอบของ 5 ไอโซเลต เป็นแกรมบวก มีทั้งรูปร่างแท่ง(rod), กลม(cocci) และรี (coccobacilli) ไม่เคลื่อนที่ ผลทดสอบคะตะเลสและออกซิเดสเป็นลบ โดยเมื่อนำไปเปรียบเทียบคุณสมบัติที่มีรายงานไว้ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th พบว่า สมบัติเหล่านี้เป็นลักษณะของแบคทีเรียกลุ่มแลกติก ส่วนความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งพลังงานได้ มีบางไอโซเลตที่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนส, แมนนิทอล และแลกโทสได้ และไม่มีไอโซเลตใดที่สามารถใช้น้ำตาลอิโนซิทอลได้ นอกจากนี้ยังพบว่าทุกไอโซเลตทนเกลือ (NaCl) ได้ในช่วง 4-6 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) และทนเกลือน้ำดี (bile salt) ได้ 0.1 %(น้ำหนัก/ปริมาตร) ยกเว้น LAB-3 ที่ไม่สามารถทนเกลือน้ำดีได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th พบว่า สมบัติของ LAB-4 ยังไม่เพียงพอที่จะระบุสายพันธุ์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ การที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์จาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ได้นั้นอาจเนื่องจากสมบัติทางชีวเคมี ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ทดสอบนั้นน้อยเกินไปและการแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่มแลกติกนั้นมีการจัดจำแนกใหม่อยู่เสมอ ดังนั้น ในการหาเอกสารทางวิชาการอ้างอิงเพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่มแลกติกนั้นจึงควรเป็นเอกสารที่มีรายงานในปัจจุบันไม่ควรนำเอกสารเก่าๆ มาใช้อ้างอิง

4. การเตรียมอาหารผสมแบบเปียก(Moist Diet)สำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว

หลังจากนั้นเตรียมอาหารปลาผสมแบบเปียก (Moist Diet) ให้มีระดับโปรตีน 45-50 % และ ระดับไขมัน 13-18 % (วิเชียร และคณะ, 2532; Catacutan et al., 1997, Boonyaratpalin, 1997; Williams et al., 2003) โดยการเตรียมอาหารปลาครั้งแรกใช้สูตรอาหารของ Boonyaratpalin, 1997 ซึ่งไม่มีปลาเป็ดบดเป็นส่วนประกอบ ฝึกให้ปลากินอาหารผสมมื้อละน้อยๆ ก่อนโดยให้รวมกับปลาเป็ดบดซึ่งเป็นอาหารเดิมที่ปลากินอยู่ และค่อยๆเพิ่มปริมาณอาหารผสมและลดปริมาณปลาเป็ดบด ปรากฏว่า ปลาไม่ยอมกินอาหารผสม ทำให้เกิดปัญหาน้ำเสีย จึงต้องทำการดัดแปลงสูตรอาหารโดยเพิ่มปลาเป็ดบดลงไปในสูตรอาหารด้วยเพื่อเพิ่มกลิ่นคาว เมื่อนำมาให้ปลากินปรากฏว่าปลากินได้ดีขึ้นแต่ยังน้อยกว่าการให้อาหารสด (ปลาเป็ดบด) สาเหตุที่ต้องใช้อาหารผสมแบบเปียกเนื่องจากสามารถระบุระดับความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, เถ้า, เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรตที่แน่นอนได้ และจากการวิเคราะห์อาหารผสมแบบเปียก พบว่า ในอาหารปลา 1

กรัม(น้ำหนักเปียก) มีโปรตีน, ไขมันและความชื้น 21.04, 3.37 และ 50.28 % ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณโปรตีนและไขมัน ในอาหารปลา 1 กรัม(น้ำหนักแห้ง) จะพบว่ามีโปรตีน 42.08 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นและได้โปรตีนในระดับที่ต้องการ ส่วนไขมันมี 6.74 % ซึ่งต่ำกว่าที่ต้องการ คือ 13-18 % ปลาที่ได้รับไขมันไม่เพียงพอจะแสดงอาการบริเวณครีบและผิวหนัง ตาผิดปกติ เกิดการช็อก เบื่ออาหาร โตช้า ตับบวมและอ่อน (Boonyaratpalin, 1997) แต่ปลาที่เลี้ยงในครั้งนี้ไม่แสดงอาการดังกล่าวอาจเป็นเพราะระยะเวลาที่เลี้ยงสั้น คือ ในตู้กระจก 30 วัน ในกระชัง 60 วัน และใช้อาหารเดียวกันในทุกกลุ่มทดลอง ข้อเสียของการให้อาหารผสมแบบเปียก คือ อัตราการเจริญเติบโตของปลาจะต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสดและน้ำเสียง่ายกว่าอาหารสดที่ปลามักจะกินหมดในทันที โดยปกติแล้วจะให้อาหารปลา(น้ำหนักแห้ง) 5-10 %ของน้ำหนักปลา (สโมสรคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2531) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงใช้อาหารปลาผสมแบบเปียกที่ดัดแปลงจาก Boonyaratpalin, 1997 ในการเลี้ยงปลา

5. การหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลากะพงขาวตาย 50 % (Median Lethal concentration ; LC_{50})

การหาค่า Median lethal concentration(LC_{50}) ของ *A. hydrophila* ต่อปลากะพงขาว โดยทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำทั่วไป สัตว์และคนปกติ (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2533) มีรายงานว่าพบโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* ทั้งในสัตว์และคนเป็นครั้งแรกในไทยเมื่อปี 1976 และ อีกครั้งในปี 1979 ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ในน้ำที่สามารถก่อให้เกิดโรคระบาดในปลา คือ 10^3-10^5 เซลล์/มิลลิลิตร และ Saitanu et al. 1976 รายงานว่า 24 ชั่วโมงหลังจากที่ปลา clariid catfish ได้รับ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 8×10^6 เซลล์ ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) จะสร้างสารที่ทำให้หลอดเลือดของปลาได้รับความเสียหาย (hemorrhagic lesion) (Saitanu, 1986) เกรียงศักดิ์และคณะ, 2533 รายงานค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาติดเชื้อ 50 % (Infective dose 50 % : ID_{50}) ของ *A. hydrophila* 4 สายพันธุ์ ในปลาดุกด้านและปลาช่อน พบว่า ในปลาทั้ง 2 ชนิดและ *A. hydrophila* ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า ID_{50} อยู่ในช่วง 9.49×10^5 - 5.08×10^8 จากรายงานต่างๆจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่น่าจะทำให้ปลาตาย 50 %(LC_{50}) จะอยู่ในช่วง 10^6-10^8 หรือ 6-8 $\log_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร ดังนั้น จึงทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ในช่วงดังกล่าว พบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เหนี่ยวนำด้วยความเข้มข้นของ *A. hydrophila* 6.85 และ 6.91 $\log_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร ไม่มีปลาตาย ตลอด 120 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 7.60, 7.63, 7.73,

8.26, 8.32 และ 8.48 log $_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร ปลาตายทั้งหมดที่เวลา 120 ชั่วโมง จึงได้ว่า 7.76, 7.47, 7.26 $\log_{10}$ เซลล์/มิลลิลิตร เป็นค่า LC_{50} ที่เวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ นำค่า LC_{50} นี้ ไปใช้ในการทดลองต่อไป ยืนยันสาเหตุการตายของปลาด้วยวิธี plate count พบ *A. hydrophila* 1.0 x 10^7 – 1.29 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

6. การผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้กับอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อใช้เลี้ยงปลาในตู้กระจกและกระชัง

การผสมแบคทีเรียในอาหารปลา การทดลองในระดับตู้กระจกใช้อาหารที่ไม่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (กลุ่มควบคุม) และอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร (กลุ่มทดลอง LAB 1-5) ทันทีที่ผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากลุ่มทดลองเรียบร้อยแล้ว (วันที่ 0) ทำการตรวจนับปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารแต่ละกลุ่ม พบว่าในอาหารกลุ่มควบคุมมีแลกติกแอซิดแบคทีเรียอยู่ 10^3 เซลล์/กรัมอาหาร เนื่องจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและพบมากในอินทรียสาร เช่น พืชที่เน่าเปื่อย ลำไส้หรืออวัยวะขับถ่ายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sillanpaa, 2001) ดังจะเห็นได้ว่าในอาหารปลาผสมที่ทำการเตรียมขึ้นมานั้นประกอบไปด้วยอินทรียสารมากมาย ได้แก่ ปลาเป็ดสดบด ปลาป่น เปลือกกุ้งป่น น้ำมันทูน่า แต่เมื่อพิจารณาดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS พบว่าแต่ละโคโลนีจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น บางโคโลนีมีขนาดใหญ่ ผิวหน้าและขอบเรียบ บางโคโลนีมีขนาดเล็กและขอบหยัก เป็นต้น และลักษณะของโคโลนีไม่เหมือนกับแลกติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มทดลอง จึงเชื่อได้ว่าแบคทีเรียที่พบในอาหารกลุ่มควบคุมนั้นไม่ใช่แลกติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกับกลุ่มทดลองแต่น่าจะเป็นสายพันธุ์อื่นๆที่มาจากส่วนประกอบต่างๆของอาหาร และเมื่อตรวจนับปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า ทุกกลุ่มทดลองที่ให้อาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 1 - 5 (LAB-1, LAB-2, LAB-3, LAB-4 และ LAB-5) มีปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร และลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS เป็นลักษณะเดียวกันทั้งจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นทำการตรวจนับปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่า กลุ่มควบคุมมีปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียเท่าเดิม คือ 10^3 เซลล์/กรัม ตลอด 28 วัน ส่วนในกลุ่มทดลอง วันที่ 7 ปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในทุกกลุ่มทดลองยังคงที่ (เท่ากับวันที่ 0) วันที่ 14 กลุ่ม LAB-1 มีปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารลดลง 1 log cycle ในขณะที่กลุ่มอื่นๆยังคงที่ (เท่ากับวันที่ 0) วันที่ 21 ปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหาร ทุกกลุ่มทดลองลดลง 1 log cycle ยกเว้นกลุ่ม LAB-2 วันที่ 28 ปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียลดลง 1 log cycle ทุกกลุ่มทดลอง จากผล

การทดลองแสดงเห็นว่าไม่ควรเตรียมอาหารปลาที่ผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไว้นานเพราะปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะลดลง ดังนั้น เมื่อคัดเลือกได้แล้วว่าจะนำไอโซเลตที่ 4 มาขยายขนาดการเลี้ยงในกระชังเราจึงทำการผสมแลกติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารทุกๆ 7 วัน เพื่อให้ปลาได้รับแลกติกแอซิดแบคทีเรียตามที่ต้องการ และการทดลองในระดับกระชังจะมีอาหาร 3 กลุ่มด้วยกัน คือ อาหารที่ไม่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (กลุ่มควบคุม) อาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร (กลุ่ม LAB-4/5 และ LAB-4/7) เมื่อตรวจนับปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มควบคุม พบว่ามีแลกติกแอซิดแบคทีเรียอยู่ 10^3 เซลล์/กรัมอาหาร และในแต่ละจานเพาะเชื้อจะพบลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันไป เมื่อตรวจนับปริมาณแลกติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่ม LAB-4/5 และ LAB-4/7 มีปริมาณ 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร ตามลำดับ

7. การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 30 วัน ในตู้กระจกและการทดสอบความสามารถของปลากะพงขาวในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ในตู้กระจก

เลี้ยงปลากะพงขาวอายุ 30 วัน ในตู้กระจกด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตด้วยความเข้มข้น 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถเสริมการเจริญเติบโตของปลา และต้านทานโรคได้ ชั่งน้ำหนัก วัดความยาวและนับจำนวนปลาที่รอดชีวิตทุก 15 วัน พบว่า น้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของปลาที่นำมาทดลองนั้นในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีการแตกขนาดมากแม้ว่าจะเป็นปลาที่เกิดจากพ่อ-แม่พันธุ์และเวลาเดียวกันก็ตามและจากการเลี้ยงปลากะพงขาวจะสังเกตเห็นว่า หากปลาตัวไหนมีขนาดใหญ่ก็จะใหญ่กว่าตัวอื่นๆอย่างเห็นได้ชัด ส่วนตัวเล็กก็จะเล็กจนสังเกตเห็นได้ชัดเจนเช่นกัน และจากข้อจำกัดด้านจำนวนลูกพันธุ์ปลาที่ซื้อจากฟาร์มทำให้ไม่สามารถคัดขนาดปลาให้มีขนาดใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลองได้ แต่เมื่อเลี้ยงปลาไป 15 วัน น้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของปลาในทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน และเมื่อเลี้ยงปลาครบ 30 วัน ปลากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4(LAB-4) มีน้ำหนักและความยาวเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) และเมื่อพิจารณาจำนวนปลาที่รอดชีวิต พบว่า ปลาในกลุ่มควบคุมมีการรอดชีวิต 57.5 % ส่วนในกลุ่มทดลอง LAB-1, LAB-2, LAB-3, LAB-4 และ LAB-5 มีปลารอดชีวิต 67.5, 57.5, 62.5, 77.5 และ 60.0 % ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าปลาในกลุ่ม LAB-4 มีปลารอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มอื่นๆด้วย ดังนั้น จึงเลือกไอโซเลต LAB-4 นี้ไปเลี้ยงปลาในกระชังต่อไป สาเหตุที่ปลาในกลุ่มควบคุมมีจำนวนปลารอด

ชีวิตต่ำอาจมาจากอาหารซึ่งปกติแล้วปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อ (carnivore) กินอาหารสดหรืออาหารที่มีชีวิต คือ ในช่วงของการอนุบาล ปลาจะกินโรติเฟอร์ อาร์ทีเมีย เมื่อปลาโตขึ้นก็จะกินเศษปลาหรือปลาเป็ดได้ดี แต่ในงานวิจัยนี้ใช้อาหารผสมแบบเปียกซึ่งมีข้อเสีย คือ ทำให้ปลามีความสามารถในการต้านทานโรคต่ำกว่าปลาที่กินอาหารสด และเมื่อเทียบปริมาณอาหารที่ปลากินก็พบว่าปลาจะกินอาหารสดได้ในปริมาณมากกว่าอาหารผสม ข้อดี คือ สามารถควบคุมระดับของสารอาหารและจำนวนแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้ และโดยทั่วไปแล้วการอนุบาลปลาขนาด 1-2 เซนติเมตร จนถึง 10 เซนติเมตร ส่วนใหญ่จะทำการอนุบาลในกระชังเพราะปลามีอัตราการรอดสูงกว่าการเลี้ยงในบ่อ ด้วยเหตุที่ว่าปลาในกระชังได้อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์อยู่แล้ว การอนุบาลในบ่ออาจเกิดโรคได้ง่ายเพราะปลามักว่ายไปชนข้างบ่อทำให้เกิดแผลได้ง่าย (สมใจ, 2527) ทำให้ปลาอ่อนแอและตายได้ง่าย จากนั้นนำปลาที่เหลือจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม LAB-4 มาทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *A. hydrophila* ด้วยวิธีแช่ (Immersion challenge) พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีปลาตายสะสม 37.5 % ในขณะที่กลุ่ม LAB-4 มีปลาตายสะสม 20 % ที่เวลา 48 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีปลาตายสะสม 100 % กลุ่ม LAB-4 มีปลาตายสะสม 30 % เห็นได้ว่า กลุ่ม LAB-4 สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nikoskelainen et al., 2001; Villamil et al., 2003 ในด้านคุณภาพน้ำปริมาณไนไตรท์อยู่ในระดับค่อนข้างอันตรายเนื่องจากมีเศษอาหารเหลือในตู้ จึงต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละ 50 %ของปริมาตรน้ำในตู้ ทุกๆ 2 วัน ส่วนปริมาณไนเตรท ฟอสเฟต อุณหภูมิ พีเอช ความเค็ม อัลคาลินิตี้ แอมโมเนียมรวม และออกซิเจนที่ละลายในน้ำนั้นอยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเลี้ยงปลา

หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* ความเข้มข้น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยวิธีแช่ในระดับตู้กระจก พบว่า ปลาไม่แสดงอาการจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* เราจึงทำการตรวจหา *A. hydrophila* จากปลาที่ตายด้วยวิธี plate count พบ *A. hydrophila* $1.3 \times 10^6 – 4.2 \times 10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร

8. การเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 60 วัน ในกระชังและการทดสอบความสามารถของปลากะพงขาวในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* รวมทั้งการตรวจดูแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) **และ** Immunohistochemistry

เลี้ยงปลากะพงขาวอายุ 60 วัน ในกระชังด้วยอาหารที่เสริม LAB-4 ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 2 ความเข้มข้น คือ 10^5 (LAB-4/5) และ 10^7 (LAB-4/7) เซลล์/กรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 60 วัน ทุกๆ 15 วัน พบว่า วันที่ 0, 15 และ 30 น้ำหนักและความยาวของปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$)ในทุกกลุ่มทดลอง แต่พบว่าวันที่ 45 ของการเลี้ยง ปลาในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักและความยาวมากกว่าปลาในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4 ทั้ง 2 ความเข้มข้น คือ 10^5 และ 10^7 เซลล์/กรัมอาหาร (LAB-4/5 และ LAB-4/7) อย่างมีนัยสำคัญ($p<0.05$) และทั้งน้ำหนักและความยาวของปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$) ในทุกกลุ่มทดลองในวันที่ 60 ของการเลี้ยง และสมบัติต่างๆของน้ำเลี้ยงปลาอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากะพงขาว

ทำการตรวจเยื่อบุด้านในของลำไส้ปลาเพื่อดูความสามารถในการเกาะติดเยื่อบุลำไส้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(Scanning Electron Microscope) พบว่า เยื่อบุลำไส้มีลักษณะเป็น villi มีกลุ่มของแบคทีเรียที่เกาะอยู่บน villi น้อยแต่สามารถพบกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายกับ LAB-4 ในลำไส้ปลากลุ่ม LAB-4 ทั้ง 2 ความเข้มข้นแต่ไม่พบแบคทีเรียลักษณะเดียวกันในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 12 การที่ปลาทั้ง 3 กลุ่มทดลองให้ผลในการเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านโรคไม่แตกต่างกันอาจเกิดจากการเลี้ยงปลาในกระชังที่ปักอยู่ในบ่อดินเป็นแบบระบบเปิด แบคทีเรียในน้ำน่าจะมีผลต่อสุขภาพปลามากกว่า LAB-4 ที่เสริมในอาหาร เนื่องจากระบบทางเดินอาหารของปลาจะมีการเข้า-ออกของน้ำในบ่อเลี้ยงตลอดเวลา หรืออาจเกิดจากการที่ลำไส้ของปลานั้นยาว ทำให้การใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียว (monoculture) เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยวิธีการผสมแบคทีเรียลงในอาหารนั้นไม่ส่งผลดีต่อสุขภาพปลาขนาดใหญ่

เมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* ความเข้มข้น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection challenge) พบว่า ปลาทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม, LAB-4/5 และ LAB-4/7 มีจำนวนปลาตายสะสมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$) ส่วนในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีด *A. hydrophila* ไม่มีการตาย จากนั้นนำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของปลาที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *A. hydrophila* มาตรวจหา *A. hydrophila* โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry

พบว่า สามารถตรวจพบ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของปลาซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อต่างๆ การเกิดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ ดังแสดงในรูปที่ 14

สาเหตุของการเปลี่ยนแปลงวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากวิธีแช่มาเป็นวิธีฉีดเข้าช่องท้อง เนื่องจากขนาดของปลาหลังเลี้ยงในกระชังครบ 60 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ย 42.21 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.06 เซนติเมตร และเลี้ยงในถังน้ำปริมาตร 100 ลิตร หากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยวิธีการแช่จะทำให้ต้องเตรียมเชื้อปริมาณมากจึงเห็นว่าวิธีการฉีดเป็นวิธีที่เหมาะสมกับปลาขนาดของปลาและปลาได้รับเชื้อโดยตรง ปลาที่ได้รับเชื้อจะมีแผลข้างลำตัวและจะมีจ้ำเลือดที่อวัยวะภายใน (Camus et al., 1998; Cipriano, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งแตกต่างจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยวิธีแช่ ซึ่งไม่พบแผลบริเวณลำตัวแต่อวัยวะภายในมีจ้ำเลือด และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆของปลาไปตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* (AH-2,IgG2b; AH-29,IgG2a และ AH-44,IgG2a) พบว่า สามารถตรวจพบการติด *A. hydrophila* ที่บริเวณต่างๆของเนื้อเยื่อในเนื้อเยื่อของปลาทุกกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคซึ่งมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ วิธี Immunohistochemistry นี้เป็นวิธีเดียวกับ Gildberg et al. ในปี 1998 ใช้ในการยืนยันว่า *Carnobacterium divergens* สามารถเกาะติดในทางเดินอาหารของปลาได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *C. divergens* มีความสามารถในการเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากสามารถตรวจพบ *C. divergens* ได้ในเนื้อเยื่อต่างๆของปลา การยืนยันผลด้วยวิธีนี้มีต้นทุนสูงและผู้ทำต้องมีความชำนาญ ข้อดี คือ มีความถูกต้องสูง

9. การวิเคราะห์หากรดแลกติกในส่วนน้ำใสที่ได้จาก LAB-4 โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์16เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ ของ LAB-4

ตรวจหาความสามารถในการสร้างกรดแลกติกและหาปริมาณของกรดแลกติกที่สร้างจาก LAB-4 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า หลังการเพาะเลี้ยง LAB-4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจพบกรดแลกติกได้ 730 mM ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการระบุว่า LAB-4 เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลกติกอันเป็นคุณสมบัติสำคัญของแบคทีเรียกลุ่มแลกติกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Staniforth et al., 1998; Lefebvre et al., 2002; Magnusson et al., 2003 ที่ใช้เทคนิค HPLC ในการตรวจหากรดแลกติกในสารตัวอย่าง จากนั้นใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ16S rDNA ของ LAB-4 แล้วนำไปเปรียบเทียบกับที่มีรายงานไว้ใน Genbank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Weissella confusa* โดยมี

ค่า E = 0.0 และมีระดับความคล้าย(Identities) 99% ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง(Kabadjova et al., 2002; Heilig et al., 2002; Magnusson et al., 2003; Japoni et al., 2004) ปี 2002 Nam et al. รายงานว่า *W. confusa* strain PL9001 มีความสามารถในการยับยั้ง *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สาเหตุของโรคกระเพาะอาหารอักเสบและมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยใช้เทคนิคการย้อมสีแกรม(Gram staining)และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM) เพื่อดูความสามารถในการยึดเกาะของ *H. pylori* บน human gastric-cell line MKN-45 cells หลังบ่มด้วยสารปฏิชีวนะ(amoxicillin) ส่วนน้ำใสของ PL9001 ทั้งที่ปรับ pH และไม่ปรับ pH พบว่า ปริมาณของ *H. pylori* ในกลุ่มที่บ่มด้วยส่วนน้ำใสของ PL9001 ที่ไม่ปรับ pH มีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มที่บ่มด้วยส่วนน้ำใสของ PL9001 ที่ปรับ pH และที่บ่มด้วยสารปฏิชีวนะ ตามลำดับ ดังนั้น *W. confusa* strain PL9001 จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นโพรไบโอติกได้

จากผลการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่า *Weissella* sp. ที่คัดเลือกได้นั้นมีแนวโน้มที่จะเป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว แต่ควรเลี้ยงในระบบปิดที่มีการหมุนเวียนของโพรไบโอติกตลอดเวลาเนื่องจากการให้โพรไบโอติกต่อสัตว์น้ำควรให้อย่างต่อเนื่องและหากจะให้ผลดีควรให้ตั้งแต่วัยอ่อนโดยเสริมลงไปในอาหาร เช่น ในปลากะพงขาววัยอ่อนจะกินอาหารจำพวกโรติเฟอร์หรืออาร์ทีเมีย จึงควรเพาะโรติเฟอร์หรืออาร์ทีเมียที่จะนำไปเลี้ยงปลาด้วยโพรไบโอติกเพื่อให้โพรไบโอติกไปเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหาร ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะบนเยื่อบุทางเดินอาหารได้ หากต้องการให้โพรไบโอติกกับปลาในช่วงวัยรุ่นซึ่งมีระบบทางเดินอาหารยาว น่าจะมีการปรับจากการใช้แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียว(monoculture) ในการผสมกับอาหารเลี้ยงปลามาเป็นการใช้แบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกหลายๆสายพันธุ์ผสมกัน (cocktailculture) แล้วจึงผสมลงในอาหารเลี้ยงปลาเพื่อไม่เป็นการปรับแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของปลามากเกินไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษณ์ เสรีรัตน์. 2545. การวิเคราะห์ทางเศรษฐกิจของการผลิตปลากะพงขาวในกระชังในจังหวัดสงขลาปีการผลิต 2543. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข, นิคม ชัยศิริ, โสมทัต วงศ์สว่าง และ เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2533. การศึกษาการก่อโรคของเชื้อ แอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิล่า : I. ภูมิไวรัสในปลาดุกด้านและปลาช่อนต่อเชื้อสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งต่างๆกัน. ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำ ครั้งที่ 2., กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, กรมประมง. 2535. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. องค์การค้าคุรุสภา.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, สมภพ รุ่งสุภา, วีรา เคยพุดซา และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2534. การเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาวโดยใช้วิธีป้องกันโรคด้วยวัคซีนต้านเชื้อแบคทีเรีย I : ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย. ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำ ครั้งที่ 3., กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิราภรณ์ โพธิ์เวชกุล. 2546. การประเมินผลของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัสที่เสริมในน้ำดื่มเพื่อเลี้ยงไก่เชิงพาณิชย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์. 2538. การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โอเดียนสโตร์.

ปัญชลี ประคองศิลป์. 2541. การเปรียบเทียบการให้โพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติคในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหารสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3: 173-180.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, ไพพรรณ พรประภา. 2539. การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่น. เล่ม 1, พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

วรรนิภา เพี้ยนภักตร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิมล เหมะจันทร. 2540. ชีววิทยาปลา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมัก พื้นบ้านภาคใต้ของไทย. วารสารสงขลานครินทร์ วทท 2: 178-189.

วิเชียร สาคเรศ, มะลิ บุณยรัตนผลิน และ นันทิยา อุ่นประเสริฐ. 2532. ระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาว-II. เอกสารวิชาการ. 9/2532 มิถุนายน. สถานีประมงน้ำกร่อย กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง.

วิเศษ ชมเดช และ วิไลวรรณ เหมศิริ. 2529. การเพาะสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง เอกสารประกอบการบรรยาย ณ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริเพ็ญ สังข์ชัย. 2546. โพรไบโอติกแบคทีเรียสำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio harveyi*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมบัติ รักประทานพร. 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วยบาซิลัสสายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ พยุงศักดิสถาพร. 2527. ต้นทุนการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาบัญชี คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 1999. มีนวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สโมสรนิสิตคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2531. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว(หลักการและการปฏิบัติ). โครงการหนังสือเผยแพร่ความรู้ทางการประมง.

ภาษาอังกฤษ

Araujo, L.W., Angellis, D.A.D. and Azevedo, L.J. 2004. Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. Brazilian archives of biology and

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

technology 47: 375-380.

Auburn University Environmental Institute. 2002. Identification of bacteria in the environment[online]. Available from : http://www.auburn.edu/academic/classes biol/4600/dale/Lab%20project.htm

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I., and Griffith, D.R.W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*,*Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of fish disease 18: 93-96.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria:classification and physiology. In:Salminen S & von Wright A (eds.) Lactic acid bacteria Microbiology and functional aspects,(pp 1-72) New York : Marcel Dekker.

Boonyaratpalin, M. 1988. Seabass feed. In:Mannual for Training Provincial Fisheries Officers. Prachuab Khiri Khun Coastal Aquaculture Research and Development Center, Thailand, 21 pp. (in Thai).

Boonyaratpalin, M. 1997. Nutrient requirements of marine food fish cultured in southeast Asia. Aquaculture 151: 283-313.

Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstreet, W.G., Thune, R.E. and Hawke, P.J. 1998. Aeromonas bacterial infections-motile Aeromonad septicemia. Southern regional aquaculture center. 478.

Catacutan, M.R., Coloso, R.M. 1997. Growth of juvenile Asian seabass,*Lates calcarifer*,fed varying carbohydrate and lipid levels. Aquaculture 149: 137-144.

Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A. and Steele, J.L. 1999. Peptidase and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhock 76: 217-246.

Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish disease leaflet. 68.

De Vyust, L. and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, London : Chapman&Hall.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriology 66: 365-378.

Fuller, R. 1992. Probiotics:The scientific basis. Chapman and Hall, London, England.

Gatesoupe, F.J. 1999. Review:The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

Gatesoupe, F.J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food larval Pollack,*Pollachius pollachius*. Aquaculture 212: 347-360.

Gibson, L.F., Woodworth, J., and George, A.M. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture 169: 111-120.

Gildberg, A., Mikkelsen, H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture 167: 103-113.

Gildberg, A., Johansen, A., and Bogwald, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon *Salmo salar* fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138: 23–34.

Gilliland, S.E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human:candidate microorganism for use or dietary adjuct. Journal Food Protein 42: 164-167.

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., and Hoshino, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture 234: 335-346.

Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., and M. de Vos, W. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology 68: 114-123.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Wiliams, S.T. (eds.). 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition. Baltimore London. Williams and Wilkins.

Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activitys of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. By In vitro techniques

and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Applied and Environmental Microbiology 65: 4949-4956.

Jankauskiene, R. 1995. The lactoflora on the content of carps intestinal tract. Ecology 1: 59-63.

Jankauskiene, R. 2000a. Defence mechanisms in fish: *Lactobacillus* genus bacteria of intestinal wall in feeding and hibernating carps. Ecology 1: 3-6.

Japoni, A., Alborzi, A., Rasouli, M. and Pourabbas, B. 2004. Modified DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant staphylococci. Iranian Biomedical Journal 8: 161-165.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Applied Environmental Microbiology 44: 525-532.

Joseph, P.J., Dave, R.I., and Shah, N.P. 1998. Antagonism between yoghurt bacteria and probiotic bacteria isolated from commercial starter cultures,commercial yoghurts and a probiotic capsule. Food Australia 50(1): 20-23.

Kabadjova, P., Dousset, X., Cam, V.L., and Prevost, H. 2002. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. Applied and Environmental Microbiology 68: 5358-5366.

Lambert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rossello-Mora, R.A., Del Cueto, C., Dodge, D.E.,Cano, R.J. 1998. *Staphylococcus succinus* sp.nov.,isolated from dominican amber. International Journal of Systematic Bacteriology 48: 511-518.

Laurie, A.A., Jennifer, C., and Michael, T.M. 2002. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of amoxygenic phototrophs in natural environments. Applied and Environmental Microbiology 67: 2922-2926.

Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., and Fontagne-Faucher, C. 2002. Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. Lebensm.Wiss.u.Technology 35: 407-414.

Mayra-Makinen, A. and Bigret, M. 1993. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In S. Saminen and A.V. Wright(eds.), Lactic Acid Bacteria. New York : Marcel Dekker.

Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J. and Schurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 219: 129-135.

Nam, H., Ha, M., Bae, O. and Lee, Y. 2002. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology 68: 4642-4645.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., and Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198: 229-236.

Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., and OuweHand, A.C. 2001. Characterization of the properties of human – and dairy – derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Applied and Environmental Microbiology 67: 2430-2435.

Olafsen J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture 200: 223-247.

Powell, B.D. 2000. The handbook of experimental animal "The laboratory fish". In G. K. Ostrander (ed.), Common diseases and treatment, pp. 79-91. Maryland : Academic Press.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Gronlund, M.-M., Isolauri, E., and Salminen, S.J. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. International Dairy Journal 9: 623-630.

Phianphak, W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Journal science research Chulalongkorn university 24: 42-51.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 167: 301-313.

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

Saitanu, K. 1986. *Aeromonas hydrophila* infections in Thailand. Paper presented at the First Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Sillanpaa, J. 2001. Tissue-Adherence in Lactic Acid Bacteria:Identification and Characterization of the Collogen-Binding S-Layer Protein of *Lactobacillus crispatus*. Department of Biosciences Faculty of science University of Helsinki.

Stanifourth, M., O'Hanlon, M., and Khong, T.M. 1999. Comparative study of lactic acid and polylactides using static headspace, gas chromatography and high-performance liquid chromotography. Journal of Chormatography 833: 195-208.

Temmerman, R., Huys, G., and Swings, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria:culture-dependent and culture-independent methods. Trends in Food Science and Technology 15: 348-359.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., and Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture 219: 43-56.

Vine, N.G., Leukes, W.D., and Kaiser, H. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquqculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters 231: 145-152.

Weber, S., Stubner, S., and Conrad, R. 2001. Bacteria population colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. Apllied and Environmental Microbiology 67: 1318-1327.

Williams, K.C., Barlow, C.G., Rodgers, L., Hockings, I., Agcopra, C., and Ruscoe, I. 2003. Asian seabass *Lates calcarifer* perform well when fed pelleted diets high in protein and lipid. Aquaculture 225: 191-206.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. อาหารเหลวแลกโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth)

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	20.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตรท (tri-ammonium citrate)	2.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตรท (CH_3COONa)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.04	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.5 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 ซ° เป็นเวลา 15 นาที) ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 10 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

2. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 10 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_2$)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 8.6 ± 0.2

4. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility medium)

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.2 ± 0.6

5. อาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium)

บัฟเฟอร์เปปโตน (Buffer peptone)	7.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม

6. อาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon's citrate agar)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.08	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วุ้นผง	15.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.8±0.2

7. อาหารทดสอบน้ำตาล (Phenol red broth base)

ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	5.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ฟีนอลเรด	0.018	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ แบ่งเป็นส่วนๆเพื่อเติมน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ อะราบิโนส กลูโคส ซูโคส แมนนิทอล แลกโตส อินโนซิทอล โดยเติม 1 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชเป็น 6.8±0.2 ใส่หลอดดักก๊าซลงไปในหลอดทดลองเพื่อดูการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของเชื้อด้วย

8. อาหารที เอส ไอ (TSI)

เคซีน (Casein)	10.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	1.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	10.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	10.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.3	กรัม
ฟีนอลเรด (Phenol red)	0.024	กรัม
วุ้นผง (Agar)	13.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ±0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **สารละลายแกรมไอโอดีน** (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยก่อนแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 300.0 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2. **สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตคริสตอลไวโอเลต** (Ammonium oxalate crystal violet solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเลต (Crystal violet)	3.0	กรัม
95เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก และสารละลาย ข เข้าด้วยกันกรองก่อนนำไปใช้

3. **สารละลายอะซิโตนแอลกอฮอล์** (Acetone alcohol solution)

95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	400.0	มิลลิลิตร
อะซิโตน (Acetone)	300.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดปิดฝาแน่น

4. **สารละลายซาฟานิน** (Safranin solution)

ซาฟานิน (Safranin)	0.25	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายซาฟานินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปกรองก่อนใช้

5. สารละลายโคแวกซ์ (Kovac's reagent)

พาราไดเมททิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์	3.0	กรัม
บิวทานอล (Butanol)	75.0	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)	25.0	มิลลิลิตร

ละลายพาราไดเมททิลอะมิโนเบนซาดีไฮด์ในบิวทานอลที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไป เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลายเมททิลเรด (Methyl red solution)

เมททิลเรด (Methyl red)	1.0	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	300.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

ละลายเมททิลเรดในเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 200.0 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

7. สารละลายทดสอบเมททิลคาร์บินอล (VP test solution)

สารละลาย ก

แอลฟาแนพทอล (α-napthol)	5.0	มิลลิลิตร
95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย ข

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค Immunohistochemistry

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. Davidson's fixative

95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	30.0	มิลลิลิตร
100 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลิน	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

3. Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M,pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์(NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	1.15	กรัม

ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ Calf Serum(P_1^+)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8.0	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	400.0	มิลลิลิตร
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรีน	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. 0.2 เปอร์เซ็นต์ Eosin Y ใน 95เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์

Eosin Y	0.2	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	100.0	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

วิธีการจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียและวิธีนับจำนวนเซลล์มีชีวิต

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบทางชีวเคมี

1. การตรวจสอบการติดสีแกรม

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสาละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีออกนาน 10-20 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย Safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ 18-24 ชั่วโมง มาเขี่ยลงบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด โคโลนีที่เกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก โดยใช้ *Bacillus aureaus* ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเชื้อควบคุมในการให้ผลทดสอบคะตะเลสผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

3. การทดสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง เผา loop ให้ร้อนแดงจุ่มลงไปในหลอดเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative จะไม่พบฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative จะพบฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4. การทดสอบเมดทิลเรด (MR test)

เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MR-VP 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง หยด methyl red ลงไป 1 หยด โดยผลบวกจะเห็นสีแดงสด ผลลบจะเป็นสีเหลืองหรือส้ม

5. การทดสอบ Voges-Proskauer(VP test)

เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว MR-VP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อ เติม 5 เปอร์เซ็นต์ α-narphthol solution 0.6 มิลลิลิตร และ 40 เปอร์เซ็นต์ KOH เขย่าให้เข้ากัน โดยผลบวกจะเห็นสีแดงภายใน 5 นาที ผลลบจะเป็นสีเหลือง

6. การทดสอบอินโดล(Indole test)

เพาะเชื้อลงในอาหาร MIO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เติม Kovacs' reagent 0.5 มิลลิลิตร โดยผลบวกจะเห็นสีแดงที่ผิวชั้นบน ผลลบไม่เกิดสี

7. การทดสอบการใช้ซิเตรท(Citrate utilization test)

เพาะเชื้อลงบนผิวอาหารวุ้นที่เอียง(Simmons' Citrate agar) โดยใช้เข็มเขี่ยทำเชื้อเป็นจุด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยผลบวกจะมีการเจริญอาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นน้ำเงิน ผลลบจะไม่มีการเจริญ สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

8. การทดสอบการย่อยเอ็ซคูลิน(Esculin hydrolysis test)

เตรียม Bile-Esculin agar ใส่หลอดทำให้เอียง(slant) เพาะเชื้อโดยการขีดไปขีดมา (streak) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยผลบวกอาหารจะมีสีดำ ผลลบอาหารไม่เปลี่ยนสี

9. การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบลงในอาหารทดสอบน้ำตาล(ภาคผนวก ก. หมายเลข 7) สังเกตการเปลี่ยนสีของฟีนอลเรดจากสีแดงเป็นสีเหลือง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. การทดสอบความสามารถในการทนโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

อบโซเดียมคลอไรด์ที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง นำไปเติมลงในอาหารเหลว MRS ที่มีบรอมเครเซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 2, 4, 6, 8, 10, 12 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) pH 6.5-6.8 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญ สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

11. การทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

เติมเกลือน้ำดีผงสำเร็จของ Difco เติมลงในอาหารเหลว MRS ที่มีบรอมเครเซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) pH 6.5-6.8 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญ สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

12. การนับเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด(Total viable cell count) โดยวิธี Spread plate

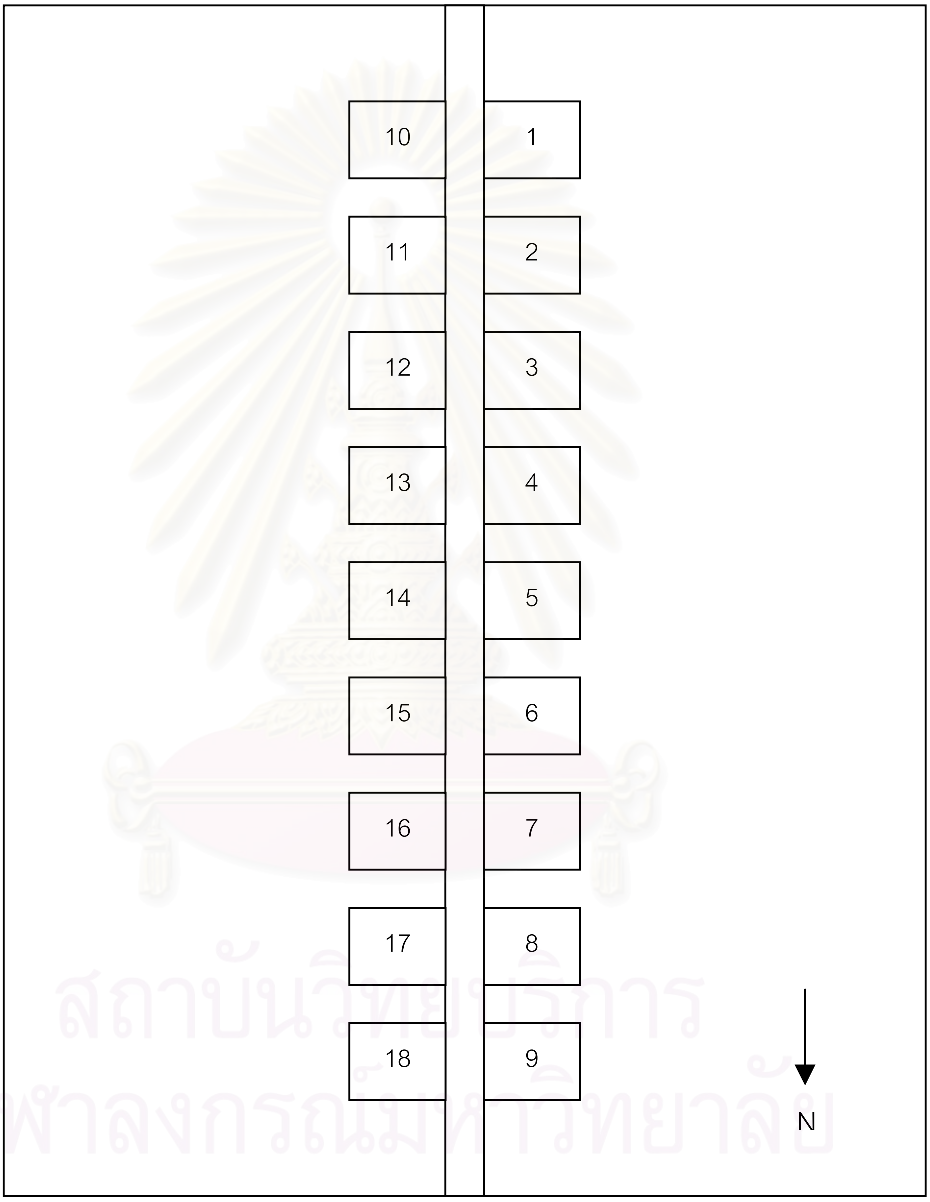
นำตัวอย่างทดสอบที่ต้องการหาจำนวนเชื้อมาทำให้เจือจางเป็นลำดับ(1:10) ในน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเชื้อในแต่ละหลอดที่มีความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมปาดให้กระจายทั่วไปบนจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนกว่าจะแห้ง คว่ำจานเพาะเชื้อ นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ข้อมูลการทดลอง

1. **แผนผังกระชังในบ่อทดลองสำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว**



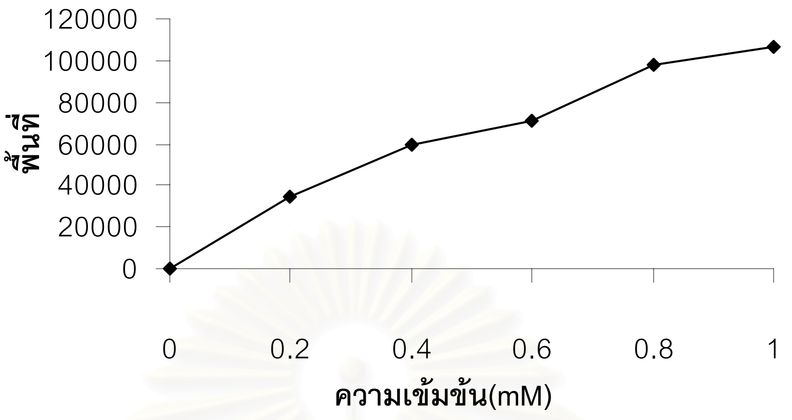
กระชังที่ 1-6 กลุ่มควบคุม

กระชังที่ 7-12 กลุ่มทดลอง LAB-4/5

กระชังที่ 13-18 กลุ่มทดลอง LAB-4/7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแลกติกที่ใช้วิเคราะห์ HPLC**



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแลกติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. **ลำดับนิวคลีโอไทด์**

Weissella confusa DNA for 16S ribosomal RNA, strain JCM 1093

Length = 1477

Score = 2302 bits (1161), Expect = 0.0

Identities = 1198/1205 (99%), Gaps = 4/1205 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 cgctttgtggttcaactgactttgaagagcttgctcagatatgacgatggacattgcaaa 60

|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 30 cgctttgtggttcaactga-tttgaagagcttgctcagatatgacgatggacattgcaaa 88

Query: 61 gagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggaaacctacctcttagcaggggataacatttg 120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 89 gagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggaaacctacctcttagcaggggataacatttg 148

Query: 121 gaaacagatgctaataccgtataacaatgacaaccgcatggttgttatttaaaagatggt 180

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 149   gaaacagatgctaataccgtataacaatgacaaccgcatggttgttatttaaaagatggt 208

Query: 181 tctgctatcactaagagatggtcccgcggtgcattagctagttggtaaggtaatggctta 240

||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 209   tctgctatcactaagagatggtcccgcggtgcattagctagttggtaaggtaatggctta 268

Query: 241 ccaaggcgatgatgcatagccgagttgagagactgatcggccacaatgggactgagacac 300

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 269   ccaaggcgatgatgcatagccgagttgagagactgatcggccacaatgggactgagacac 328

Query: 301 ggcccatactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccacaatgggcgaaagcctgat 360

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 329 ggcccatactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccacaatgggcgaaagcctgat 388

Query: 361 ggagcaacgccgcgtgtgtgatgaagggtttcggctcgtaaaacactgttgtaagagaag 420

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 389   ggagcaacgccgcgtgtgtgatgaagggtttcggctcgtaaaacactgttgtaagagaag 448

Query: 421 aatgacattgagagtaactgttcaatgtgtgacggtatcttaccagaaaggaacggctaa 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 449   aatgacattgagagtaactgttcaatgtgtgacggtatcttaccagaaaggaacggctaa 508

Query: 481 atacgtgccagcagccgcggtaatacgtatgttccaagcgttatccggatttattgggcg 540

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 509   atacgtgccagcagccgcggtaatacgtatgttccaagcgttatccggatttattgggcg 568

Query: 541 taaagcgagcgcagacggttatttaagtctgaagtgaaagccctcagctcaactgaggaa 600

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 569   taaagcgagcgcagacggttatttaagtctgaagtgaaagccctcagctcaactgaggaa 628

```
Query: 601  ttgctttggaaactggatgacttgagtgcagtagaggaaagtggaactccatgtgtagcg 660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 629  ttgctttggaaactggatgacttgagtgcagtagaggaaagtggaactccatgtgtagcg 688

Query: 661  gtgaaatgcgtagatatatggaagaacaccagtggcgaaggcggctttctggactgtaac 720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 689  gtgaaatgcgtagatatatggaagaacaccagtggcgaaggcggctttctggactgtaac 748

Query: 721  tgacgttgaggctcgaaagtgtgggtagcaaacaggattagataccctggtagtccacac 780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 749  tgacgttgaggctcgaaagtgtgggtagcaaacaggattagataccctggtagtccacac 808

Query: 781  cgtaaacgatgagtgctaggtgtttgagggtttccgcccttaagtgccgcagctaacgca 840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 809  cgtaaacgatgagtgctaggtgtttgagggtttccgcccttaagtgccgcagctaacgca 868

Query: 841  ttaagcactccgcctggggagtacgaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgggga 900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 869  ttaagcactccgcctggggagtacgaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgggga 928

Query: 901  cccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaaccttatccagg 960
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct: 929  cccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaacctta-ccagg 987

Query: 961  tcttgacatcccttgacaactccagagatggagcgttcccttcggggacaaggtgacagg 1020
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 988  tcttgacatcccttgacaactccagagatggagcgttcccttcggggacaaggtgacagg 1047

Query: 1021 tggtgcatggttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcg 1080
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1048 tggtgcatggttgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcg 1107
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Query: 1081 caacccttattactagttgccagcattcagttgggcactctagtgagactgccggtgaca 1140

|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||

Sbjct: 1108 caacccttattactagttgccagcattcagttgggcactctagtgagactgccggtgaca 1167

Query: 1141 aaccggaggaaggtggggatgaagtcagatcatcatagccccttatgacatgggctaca

1200

|||||||||||||||||||||| |||| |||||||| ||||||||||||| ||||||||

Sbjct: 1168 aaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatcat-gccccttatgacct-gggctaca 1225

Query: 1201 cacgt 1205

|||||

Sbjct: 1226 cacgt 1230

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. Median Lethal Concentration(LC_{50})

```
                         Output from Probit Procedure
                                       22:00 Saturday, January 11, 1997

------------------------------------- HOUR=48 --------------------------------------
                              Probit Procedure
                          Probit Analysis on CONC

           Probability          CONC 95 Percent Fiducial Limits
                                            Lower        Upper

               0.01             13.2327       .            .
               0.02             12.9477       .            .
               0.03             12.7668       .            .
               0.04             12.6307       .            .
               0.05             12.5201       .            .
               0.06             12.4258       .            .
               0.07             12.3433       .            .
               0.08             12.2693       .            .
               0.09             12.2020       .            .
               0.10             12.1401       .            .
               0.15             11.8838       .            .
               0.20             11.6801       .            .
               0.25             11.5053       .            .
               0.30             11.3483       .            .
               0.35             11.2029       .            .
               0.40             11.0649       .            .
               0.45             10.9314       .            .
               0.50             10.7999       .            .
               0.55             10.6685       .            .
               0.60             10.5350       .            .
               0.65             10.3970       .            .
               0.70             10.2516       .            .
               0.75             10.0946       .            .
               0.80              9.9198       .            .
               0.85              9.7161       .            .
               0.90              9.4598       .            .
               0.91              9.3978       .            .
               0.92              9.3306       .            .
               0.93              9.2566       .            .
               0.94              9.1740       .            .
               0.95              9.0798       .            .
               0.96              8.9692       .            .
               0.97              8.8331       .            .
               0.98              8.6522       .            .
               0.99              8.3672       .            .
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Output from Probit Procedure 23
22:00 Saturday, January 11, 1997

------------------------------------ HOUR=72 -------------------------------------

Probit Procedure
Probit Analysis on CONC

Probability	CONC	95 Percent Fiducial Limits Lower	Upper
0.01	8.08903	.	.
0.02	8.05078	.	.
0.03	8.02652	.	.
0.04	8.00826	.	.
0.05	7.99341	.	.
0.06	7.98077	.	.
0.07	7.96969	.	.
0.08	7.95977	.	.
0.09	7.95075	.	.
0.10	7.94244	.	.
0.15	7.90805	.	.
0.20	7.88071	.	.
0.25	7.85726	.	.
0.30	7.83621	.	.
0.35	7.81669	.	.
0.40	7.79818	.	.
0.45	7.78026	.	.
0.50	7.76263	.	.
0.55	7.74500	.	.
0.60	7.72708	.	.
0.65	7.70857	.	.
0.70	7.68905	.	.
0.75	7.66800	.	.
0.80	7.64455	.	.
0.85	7.61721	.	.
0.90	7.58282	.	.
0.91	7.57451	.	.
0.92	7.56549	.	.
0.93	7.55557	.	.
0.94	7.54449	.	.
0.95	7.53185	.	.
0.96	7.51700	.	.
0.97	7.49874	.	.
0.98	7.47448	.	.
0.99	7.43623	.	.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

------------------------------------ HOUR=96 ---------------------------------------

Probit Procedure
Probit Analysis on CONC

Probability	CONC	95 Percent Fiducial Limits Lower	Upper
0.01	7.89157	7.79070	8.18614
0.02	7.84251	7.75603	8.08649
0.03	7.81138	7.73347	8.02384
0.04	7.78796	7.71605	7.97715
0.05	7.76891	7.70150	7.93956
0.06	7.75270	7.68874	7.90793
0.07	7.73848	7.67721	7.88055
0.08	7.72575	7.66653	7.85638
0.09	7.71418	7.65647	7.83476
0.10	7.70352	7.64684	7.81521
0.15	7.65940	7.60174	7.73954
0.20	7.62434	7.55716	7.68814
0.25	7.59425	7.51158	7.65136
0.30	7.56724	7.46577	7.62323
0.35	7.54221	7.42039	7.60008
0.40	7.51845	7.37556	7.57988
0.45	7.49547	7.33109	7.56144
0.50	7.47285	7.28659	7.54403
0.55	7.45023	7.24156	7.52715
0.60	7.42725	7.19541	7.51038
0.65	7.40350	7.14740	7.49336
0.70	7.37846	7.09656	7.47568
0.75	7.35145	7.04147	7.45682
0.80	7.32137	6.97991	7.43603
0.85	7.28630	6.90795	7.41200
0.90	7.24218	6.81718	7.38200
0.91	7.23153	6.79523	7.37479
0.92	7.21995	6.77136	7.36696
0.93	7.20722	6.74511	7.35836
0.94	7.19301	6.71578	7.34878
0.95	7.17679	6.68231	7.33787
0.96	7.15774	6.64297	7.32507
0.97	7.13432	6.59457	7.30935
0.98	7.10319	6.53020	7.28851
0.99	7.05413	6.42867	7.25573

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Output from Probit Procedure 37
22:00 Saturday, January 11, 1997

-------------------------------- HOUR=120 --

Probit Procedure
Probit Analysis on CONC

Probability	CONC	95 Percent Fiducial Limits Lower	Upper
0.01	7.35180	.	.
0.02	7.34067	.	.
0.03	7.33360	.	.
0.04	7.32829	.	.
0.05	7.32397	.	.
0.06	7.32029	.	.
0.07	7.31706	.	.
0.08	7.31418	.	.
0.09	7.31155	.	.
0.10	7.30913	.	.
0.15	7.29912	.	.
0.20	7.29117	.	.
0.25	7.28434	.	.
0.30	7.27821	.	.
0.35	7.27253	.	.
0.40	7.26714	.	.
0.45	7.26193	.	.
0.50	7.25680	.	.
0.55	7.25166	.	.
0.60	7.24645	.	.
0.65	7.24106	.	.
0.70	7.23538	.	.
0.75	7.22925	.	.
0.80	7.22243	.	.
0.85	7.21447	.	.
0.90	7.20446	.	.
0.91	7.20204	.	.
0.92	7.19942	.	.
0.93	7.19653	.	.
0.94	7.19330	.	.
0.95	7.18963	.	.
0.96	7.18530	.	.
0.97	7.17999	.	.
0.98	7.17293	.	.
0.99	7.16180	.	.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. น้ำหนักและความยาวของปลาที่เลี้ยงในตู้กระจก

The SAS System

23:03 Saturday, January 11, 1997 1

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1	0	1	0	0.4	3.0
2	0	2	0	0.4	3.0
3	0	3	0	0.5	3.0
4	0	4	0	0.4	3.0
5	0	5	0	0.3	3.0
6	0	6	0	0.8	3.5
7	0	7	0	0.5	3.0
8	0	8	0	0.6	3.2
9	0	9	0	0.9	3.5
10	0	10	0	0.5	3.0
11	0	11	0	0.8	3.5
12	0	12	0	0.8	3.6
13	1	1	0	0.6	2.5
14	1	2	0	0.8	3.0
15	1	3	0	0.7	3.5
16	1	4	0	0.4	3.0
17	1	5	0	0.5	3.0
18	1	6	0	0.5	3.0
19	1	7	0	0.5	4.2
20	1	8	0	0.6	3.8
21	1	9	0	0.4	3.0
22	1	10	0	0.7	3.0
23	1	11	0	0.5	3.5
24	1	12	0	1.0	4.0
25	2	1	0	0.8	3.7
26	2	2	0	0.4	3.0
27	2	3	0	0.8	3.7
28	2	4	0	0.6	3.0
29	2	5	0	0.4	3.0
30	2	6	0	0.6	3.5
31	2	7	0	1.0	3.5
32	2	8	0	0.9	3.7
33	2	9	0	0.5	3.7
34	2	10	0	0.9	3.5
35	2	11	0	1.2	3.5
36	2	12	0	0.8	3.5
37	3	1	0	0.3	3.0
38	3	2	0	0.5	3.5
39	3	3	0	0.3	2.7
40	3	4	0	0.6	3.5
41	3	5	0	0.2	2.5
42	3	6	0	0.4	3.0
43	3	7	0	0.7	3.0
44	3	8	0	0.3	3.7
45	3	9	0	0.4	3.5
46	3	10	0	0.3	4.2
47	3	11	0	0.8	3.7
48	3	12	0	1.0	4.0
49	4	1	0	0.4	3.0
50	4	2	0	0.4	2.7
51	4	3	0	0.9	3.5
52	4	4	0	0.7	3.5
53	4	5	0	0.4	2.8
54	4	6	0	0.3	3.0
55	4	7	0	0.4	4.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

56	4	8	0	0.7	4.0

The SAS System
23:03 Saturday, January 11, 1997 2

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
57	4	9	0	0.7	4.0
58	4	10	0	0.8	3.5
59	4	11	0	0.4	3.5
60	4	12	0	0.4	4.0
61	5	1	0	0.6	3.7
62	5	2	0	0.6	4.0
63	5	3	0	0.5	3.5
64	5	4	0	0.9	3.5
65	5	5	0	0.5	3.5
66	5	6	0	0.6	3.5
67	5	7	0	0.8	3.5
68	5	8	0	1.0	4.0
69	5	9	0	0.7	3.7
70	5	10	0	0.6	3.8
71	5	11	0	0.6	3.8
72	5	12	0	0.6	3.5
73	0	1	15	0.8	3.5
74	0	2	15	0.5	3.0
75	0	3	15	0.4	3.5
76	0	4	15	1.4	4.0
77	0	5	15	0.5	3.5
78	0	6	15	0.6	3.7
79	0	7	15	1.2	3.8
80	0	8	15	0.6	3.8
81	0	9	15	0.5	3.8
82	0	10	15	0.5	3.9
83	0	11	15	0.9	3.5
84	0	12	15	0.9	3.6
85	1	1	15	0.5	3.5
86	1	2	15	1.1	4.5
87	1	3	15	0.3	3.0
88	1	4	15	0.5	3.0
89	1	5	15	0.5	3.5
90	1	6	15	0.4	3.0
91	1	7	15	0.6	3.9
92	1	8	15	1.3	3.5
93	1	9	15	0.5	4.0
94	1	10	15	1.1	3.2
95	1	11	15	0.1	3.7
96	1	12	15	0.8	3.7
97	2	1	15	0.9	4.0
98	2	2	15	0.6	3.2
99	2	3	15	0.6	3.8
100	2	4	15	0.9	4.2
101	2	5	15	1.3	4.3
102	2	6	15	0.7	3.8
103	2	7	15	0.7	3.5
104	2	8	15	0.8	3.8
105	2	9	15	1.1	3.8
106	2	10	15	0.8	3.5
107	2	11	15	0.9	4.0
108	2	12	15	0.7	4.5
109	3	1	15	0.6	3.8
110	3	2	15	0.8	3.6
111	3	3	15	0.8	3.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

112	3	4	15	1.0	4.0

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
113	3	5	15	0.3	3.4
114	3	6	15	0.5	3.1
115	3	7	15	0.8	4.0
116	3	8	15	0.3	3.0
117	3	9	15	0.6	3.5
118	3	10	15	0.6	3.5
119	3	11	15	0.5	3.5
120	3	12	15	1.4	5.0
121	4	1	15	0.6	3.5
122	4	2	15	0.9	4.0
123	4	3	15	0.7	3.5
124	4	4	15	0.3	3.2
125	4	5	15	1.2	4.2
126	4	6	15	0.4	3.7
127	4	7	15	0.7	5.0
128	4	8	15	0.8	3.7
129	4	9	15	0.7	4.0
130	4	10	15	1.5	5.0
131	4	11	15	0.5	3.5
132	4	12	15	0.4	3.5
133	5	1	15	0.8	4.0
134	5	2	15	0.8	4.0
135	5	3	15	0.9	4.0
136	5	4	15	0.4	4.0
137	5	5	15	0.7	4.0
138	5	6	15	1.1	4.0
139	5	7	15	0.3	4.1
140	5	8	15	0.6	3.7
141	5	9	15	0.7	3.8
142	5	10	15	1.1	3.2
143	5	11	15	0.7	3.0
144	5	12	15	0.6	3.5
145	0	1	30	0.2	3.2
146	0	2	30	0.5	4.0
147	0	3	30	0.4	3.5
148	0	4	30	0.4	3.5
149	0	5	30	0.6	4.0
150	0	6	30	1.6	5.5
151	0	7	30	0.6	4.0
152	0	8	30	0.7	4.0
153	0	9	30	0.4	3.5
154	0	10	30	0.4	3.4
155	0	11	30	0.6	3.8
156	0	12	30	0.4	3.4
157	1	1	30	1.0	4.5
158	1	2	30	0.5	3.5
159	1	3	30	0.4	3.3
160	1	4	30	0.6	3.6
161	1	5	30	0.3	2.7
162	1	6	30	0.4	3.5
163	1	7	30	0.9	4.3
164	1	8	30	0.9	4.3
165	1	9	30	0.4	3.0
166	1	10	30	0.3	3.2
167	1	11	30	0.9	3.7
168	1	12	30	0.9	4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:03 Saturday, January 11, 1997 4

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
169	2	1	30	0.6	3.9
170	2	2	30	0.5	3.9
171	2	3	30	0.5	4.0
172	2	4	30	0.5	4.0
173	2	5	30	0.6	3.5
174	2	6	30	0.3	3.2
175	2	7	30	0.4	4.2
176	2	8	30	0.6	4.2
177	2	9	30	0.5	3.5
178	2	10	30	0.7	4.0
179	2	11	30	0.5	4.0
180	2	12	30	0.6	4.2
181	3	1	30	0.6	3.7
182	3	2	30	0.7	4.0
183	3	3	30	0.6	3.8
184	3	4	30	0.4	3.7
185	3	5	30	0.5	3.7
186	3	6	30	0.3	3.2
187	3	7	30	0.4	3.2
188	3	8	30	1.1	4.7
189	3	9	30	0.4	3.2
190	3	10	30	0.6	4.0
191	3	11	30	0.5	3.5
192	3	12	30	0.5	3.5
193	4	1	30	0.6	3.7
194	4	2	30	0.7	3.7
195	4	3	30	1.1	5.0
196	4	4	30	0.4	3.5
197	4	5	30	0.4	3.4
198	4	6	30	1.3	4.3
199	4	7	30	1.2	5.0
200	4	8	30	0.9	4.5
201	4	9	30	1.3	4.5
202	4	10	30	1.1	4.3
203	4	11	30	1.4	3.5
204	4	12	30	1.2	4.8
205	5	1	30	0.7	4.0
206	5	2	30	0.4	3.7
207	5	3	30	0.7	4.0
208	5	4	30	0.6	3.5
209	5	5	30	0.2	3.7
210	5	6	30	0.6	4.0
211	5	7	30	0.5	4.5
212	5	8	30	1.1	3.7
213	5	9	30	1.2	4.5
214	5	10	30	0.6	3.2
215	5	11	30	0.6	3.7
216	5	12	30	0.3	3.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
21:28 Saturday, January 18, 1997 10

---------------------------------------TIME=0 --

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
GR	6	0 1 2 3 4 5

Number of observations in by group = 72

The SAS System
21:28 Saturday, January 18, 1997 11

--------------------------------------- TIME=0 ---------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.50569444	0.10113889	2.36	0.0492
Error	66	2.82416667	0.04279040		
Corrected Total	71	3.32986111			

R-Square	C.V.	Root MSE	WEIGHT Mean
0.151867	34.39678	0.20685842	0.60138889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	0.50569444	0.10113889	2.36	0.0492

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	0.50569444	0.10113889	2.36	0.0492

```
                              The SAS System
                                             21:28 Saturday, January 18, 1997  12

---------------------------------------- TIME=0 ------------------------------------

                        General Linear Models Procedure

               Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

        NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
                experimentwise error rate

                       Alpha= 0.05  df= 66  MSE= 0.04279

                  Number of Means     2     3     4     5     6
                  Critical Range  .1686 .1774 .1832 .1874 .1907

          Means with the same letter are not significantly different.

                   Duncan Grouping              Mean      N  GR

                                 A           0.74167     12  2
                                 A
                         B       A           0.66667     12  5
                         B       A
                         B       A           0.60000     12  1
                         B       A
                         B       A           0.57500     12  0
                         B
                         B                   0.54167     12  4
                         B
                         B                   0.48333     12  3


                              The SAS System
                                             21:28 Saturday, January 18, 1997  13

--------------------------------------- TIME=15 ------------------------------------

                        General Linear Models Procedure
                            Class Level Information

                         Class    Levels    Values

                         GR            6    0 1 2 3 4 5


                    Number of observations in by group = 72
```

The SAS System
21:28 Saturday, January 18, 1997 14

------------------------------------ TIME=15 --------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.24569444	0.04913889	0.54	0.7438
Error	66	5.98416667	0.09066919		
Corrected Total	71	6.22986111			

R-Square	C.V.	Root MSE	WEIGHT Mean
0.039438	41.61258	0.30111325	0.72361111

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	0.24569444	0.04913889	0.54	0.7438

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	0.24569444	0.04913889	0.54	0.7438

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
                              The SAS System
                                         21:28 Saturday, January 18, 1997  15

------------------------------------- TIME=15 --------------------------------------

                          General Linear Models Procedure

                 Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

        NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
                experimentwise error rate

                     Alpha= 0.05  df= 66  MSE= 0.090669

                Number of Means     2     3     4     5     6
                Critical Range  .2454 .2582 .2667 .2728 .2776

           Means with the same letter are not significantly different.

                 Duncan Grouping              Mean      N  GR

                               A            0.8333     12  2
                               A
                               A            0.7333     12  0
                               A
                               A            0.7250     12  4
                               A
                               A            0.7250     12  5
                               A
                               A            0.6833     12  3
                               A
                               A            0.6417     12  1


                              The SAS System
                                         21:28 Saturday, January 18, 1997  16

-------------------------------------- TIME=30 -------------------------------------

                          General Linear Models Procedure
                              Class Level Information

                           Class    Levels    Values

                           GR            6    0 1 2 3 4 5


                      Number of observations in by group = 72
```

The SAS System
21:28 Saturday, January 18, 1997 17

-------------------------------------- TIME=30 --------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.60569444	0.32113889	4.15	0.0025
Error	66	5.11083333	0.07743687		
Corrected Total	71	6.71652778			

R-Square	C.V.	Root MSE	WEIGHT Mean
0.239066	43.27384	0.27827481	0.64305556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	1.60569444	0.32113889	4.15	0.0025

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	1.60569444	0.32113889	4.15	0.0025

```
                      The SAS System
                                   21:28 Saturday, January 18, 1997  18

------------------------------------- TIME=30 ------------------------------------

                    General Linear Models Procedure

           Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

  NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
        experimentwise error rate

                 Alpha= 0.05  df= 66  MSE= 0.077437

           Number of Means     2     3     4     5     6
           Critical Range  .2268 .2386 .2464 .2521 .2565

    Means with the same letter are not significantly different.

            Duncan Grouping              Mean      N  GR

                          A            0.9667     12  4

                          B            0.6250     12  1
                          B
                          B            0.6250     12  5
                          B
                          B            0.5667     12  0
                          B
                          B            0.5500     12  3
                          B
                          B            0.5250     12  2
```

```
                      The SAS System
                                   21:34 Saturday, January 18, 1997   1

-------------------------------------- TIME=0 ------------------------------------

                    General Linear Models Procedure
                        Class Level Information

                     Class    Levels    Values

                     GR            6    0 1 2 3 4 5


                 Number of observations in by group = 72
```

The SAS System
21:34 Saturday, January 18, 1997 2

-- TIME=0 ------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.59736111	0.31947222	2.03	0.0859
Error	66	10.39250000	0.15746212		
Corrected Total	71	11.98986111			

R-Square	C.V.	Root MSE	LENGTH Mean
0.133226	11.66626	0.39681497	3.40138889

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	1.59736111	0.31947222	2.03	0.0859

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	1.59736111	0.31947222	2.03	0.0859

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
                              The SAS System
                                            21:34 Saturday, January 18, 1997   3

----------------------------------------- TIME=0 -------------------------------------

                         General Linear Models Procedure

                Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

        NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
                experimentwise error rate

                      Alpha= 0.05  df= 66  MSE= 0.157462

                 Number of Means     2     3     4     5     6
                 Critical Range  .3234 .3403 .3514 .3595 .3658

           Means with the same letter are not significantly different.

                  Duncan Grouping              Mean      N  GR

                                A            3.6667     12  5
                                A
                        B       A            3.4583     12  4
                        B       A
                        B       A            3.4417     12  2
                        B       A
                        B       A            3.3583     12  3
                        B
                        B                    3.2917     12  1
                        B
                        B                    3.1917     12  0


                              The SAS System
                                            21:34 Saturday, January 18, 1997   4

--------------------------------------- TIME=15 --------------------------------------

                         General Linear Models Procedure
                             Class Level Information

                          Class    Levels    Values

                          GR            6    0 1 2 3 4 5


                     Number of observations in by group = 72
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
21:34 Saturday, January 18, 1997 5

-------------------------------------- TIME=15 -----------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.18111111	0.23622222	1.23	0.3040
Error	66	12.65166667	0.19169192		
Corrected Total	71	13.83277778			

R-Square	C.V.	Root MSE	LENGTH Mean
0.085385	11.73622	0.43782636	3.73055556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	1.18111111	0.23622222	1.23	0.3040

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	1.18111111	0.23622222	1.23	0.3040

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
                         The SAS System
                               21:34 Saturday, January 18, 1997   6

------------------------------------- TIME=15 -------------------------------------

                  General Linear Models Procedure

           Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

   NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
         experimentwise error rate

                 Alpha= 0.05  df= 66  MSE= 0.191692

           Number of Means     2     3     4     5     6
           Critical Range  .3569 .3754 .3877 .3967 .4036

     Means with the same letter are not significantly different.

            Duncan Grouping              Mean      N  GR

                          A            3.9000     12  4
                          A
                          A            3.8667     12  2
                          A
                          A            3.7750     12  5
                          A
                          A            3.6667     12  3
                          A
                          A            3.6333     12  0
                          A
                          A            3.5417     12  1


                         The SAS System
                               21:34 Saturday, January 18, 1997   7

------------------------------------- TIME=30 -------------------------------------

                  General Linear Models Procedure
                      Class Level Information

                  Class    Levels    Values

                  GR            6    0 1 2 3 4 5


              Number of observations in by group = 72
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
21:34 Saturday, January 18, 1997 8

------------------------------------- TIME=30 ------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2.18291667	0.43658333	1.74	0.1388
Error	66	16.60583333	0.25160354		
Corrected Total	71	18.78875000			

R-Square	C.V.	Root MSE	LENGTH Mean
0.116182	13.07104	0.50160097	3.83750000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	2.18291667	0.43658333	1.74	0.1388

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	5	2.18291667	0.43658333	1.74	0.1388

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
                     The SAS System
                              21:34 Saturday, January 18, 1997   9

-------------------------------------- TIME=30 -------------------------------------

                  General Linear Models Procedure

         Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

     NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
             experimentwise error rate

                 Alpha= 0.05  df= 66  MSE= 0.251604

          Number of Means     2     3     4     5     6
          Critical Range  .4089 .4301 .4442 .4544 .4624

       Means with the same letter are not significantly different.

           Duncan Grouping              Mean      N  GR

                        A             4.1833     12  4
                        A
                B       A             3.8833     12  2
                B       A
                B       A             3.8167     12  0
                B       A
                B       A             3.8083     12  5
                B
                B                     3.6833     12  3
                B
                B                     3.6500     12  1
```

3. น้ำหนักและความยาวของปลาที่เลี้ยงในกระชัง

The SAS System

23:37 Saturday, January 11, 1997 1

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1	1	1	0	4.49	7.0
2	1	2	0	6.68	8.0
3	1	3	0	3.93	6.0
4	1	4	0	2.37	6.0
5	1	5	0	2.22	5.5
6	1	6	0	7.58	8.0
7	1	7	0	3.58	6.4
8	1	8	0	2.67	5.0
9	1	9	0	3.44	5.5
10	1	10	0	2.84	5.6
11	1	11	0	3.18	6.0
12	1	12	0	2.31	5.6
13	1	13	0	3.12	6.3
14	1	14	0	6.08	7.5
15	1	15	0	4.78	7.5
16	1	16	0	2.98	6.5
17	1	17	0	2.94	6.0
18	1	18	0	1.77	4.5
19	1	1	0	2.22	5.5
20	1	2	0	3.17	6.6
21	1	3	0	2.30	5.5
22	1	4	0	3.08	6.0
23	1	5	0	5.12	7.5
24	1	6	0	3.20	6.0
25	1	7	0	4.35	7.0
26	1	8	0	3.92	6.2
27	1	9	0	5.34	8.0
28	1	10	0	2.90	6.3
29	1	11	0	1.46	5.0
30	1	12	0	2.00	5.0
31	1	13	0	3.08	6.2
32	1	14	0	4.55	7.5
33	1	15	0	3.11	6.5
34	1	16	0	2.83	6.2
35	1	17	0	2.86	6.2
36	1	18	0	4.19	6.7
37	1	1	0	3.92	6.5
38	1	2	0	3.51	6.1
39	1	3	0	2.99	6.5
40	1	4	0	1.81	5.0
41	1	5	0	2.53	6.0
42	1	6	0	2.60	5.5
43	1	7	0	3.11	6.0
44	1	8	0	4.94	7.0
45	1	9	0	2.40	6.0
46	1	10	0	1.65	5.0
47	1	11	0	2.50	6.0
48	1	12	0	3.03	6.0
49	1	13	0	1.44	5.0
50	1	14	0	1.94	5.5
51	1	15	0	2.10	5.0
52	1	16	0	3.25	6.3
53	1	17	0	2.54	6.0
54	1	18	0	3.36	6.0
55	1	1	0	2.67	5.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

56	1	2	0	1.38	4.8

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
57	1	3	0	9.17	8.5
58	1	4	0	5.50	7.5
59	1	5	0	2.21	5.5
60	1	6	0	3.11	6.5
61	1	7	0	5.40	7.6
62	1	8	0	2.34	5.5
63	1	9	0	1.88	5.5
64	1	10	0	2.79	5.5
65	1	11	0	3.10	5.5
66	1	12	0	1.85	5.0
67	1	13	0	3.47	6.8
68	1	14	0	4.52	7.0
69	1	15	0	2.05	5.5
70	1	16	0	6.29	7.5
71	1	17	0	1.39	5.0
72	1	18	0	3.34	6.0
73	1	1	0	3.19	6.2
74	1	2	0	3.96	7.0
75	1	3	0	4.43	7.0
76	1	4	0	1.27	4.5
77	1	5	0	3.00	6.5
78	1	6	0	1.75	5.5
79	1	7	0	2.06	5.5
80	1	8	0	3.85	6.5
81	1	9	0	3.52	6.6
82	1	10	0	1.07	4.5
83	1	11	0	3.78	6.8
84	1	12	0	3.07	6.0
85	1	13	0	2.01	5.8
86	1	14	0	5.14	7.5
87	1	15	0	2.68	6.0
88	1	16	0	3.75	6.5
89	1	17	0	1.74	5.0
90	1	18	0	3.59	6.0
91	1	1	0	6.51	8.0
92	1	2	0	2.53	5.6
93	1	3	0	1.65	5.0
94	1	4	0	2.03	5.5
95	1	5	0	2.74	6.0
96	1	6	0	2.15	6.0
97	1	7	0	3.47	6.5
98	1	8	0	2.53	6.0
99	1	9	0	3.22	6.5
100	1	10	0	4.96	7.0
101	1	11	0	1.89	5.5
102	1	12	0	3.95	7.2
103	1	13	0	1.38	4.8
104	1	14	0	1.41	4.7
105	1	15	0	3.14	6.5
106	1	16	0	2.57	6.0
107	1	17	0	1.66	4.5
108	1	18	0	3.32	6.5
109	2	1	0	2.58	6.0
110	2	2	0	3.44	6.5
111	2	3	0	3.94	6.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

112	2	4	0	2.64	6.0

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
113	2	5	0	1.82	5.0
114	2	6	0	2.92	6.0
115	2	7	0	2.66	6.5
116	2	8	0	11.00	9.2
117	2	9	0	1.08	4.5
118	2	10	0	1.83	5.0
119	2	11	0	2.27	6.0
120	2	12	0	3.67	6.5
121	2	13	0	2.51	6.0
122	2	14	0	4.09	7.0
123	2	15	0	1.59	5.0
124	2	16	0	2.32	6.0
125	2	17	0	2.39	5.5
126	2	18	0	2.52	6.0
127	2	1	0	1.90	5.5
128	2	2	0	2.89	6.5
129	2	3	0	3.82	7.0
130	2	4	0	2.28	5.8
131	2	5	0	5.42	7.5
132	2	6	0	6.79	9.0
133	2	7	0	3.07	6.5
134	2	8	0	4.87	7.5
135	2	9	0	4.36	7.0
136	2	10	0	4.56	7.2
137	2	11	0	0.98	4.5
138	2	12	0	4.12	7.0
139	2	13	0	1.88	5.0
140	2	14	0	1.32	4.8
141	2	15	0	3.33	6.5
142	2	16	0	2.08	6.0
143	2	17	0	1.48	5.0
144	2	18	0	4.64	7.5
145	2	1	0	4.16	7.0
146	2	2	0	1.42	4.5
147	2	3	0	5.64	8.0
148	2	4	0	2.04	5.7
149	2	5	0	4.47	7.0
150	2	6	0	6.48	8.2
151	2	7	0	2.00	5.5
152	2	8	0	2.53	6.0
153	2	9	0	1.97	5.7
154	2	10	0	2.92	6.5
155	2	11	0	2.24	5.8
156	2	12	0	2.37	6.0
157	2	13	0	2.40	6.0
158	2	14	0	1.28	4.7
159	2	15	0	2.32	5.5
160	2	16	0	2.12	5.5
161	2	17	0	1.14	4.5
162	2	18	0	3.52	7.0
163	2	1	0	3.34	6.5
164	2	2	0	4.19	7.0
165	2	3	0	5.14	8.0
166	2	4	0	3.08	6.5
167	2	5	0	2.35	6.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

168	2	6	0	1.80	8.5

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
169	2	7	0	3.25	6.5
170	2	8	0	1.56	5.0
171	2	9	0	2.49	6.0
172	2	10	0	1.89	5.2
173	2	11	0	3.42	6.5
174	2	12	0	3.89	7.0
175	2	13	0	3.11	6.5
176	2	14	0	3.66	7.0
177	2	15	0	2.31	6.0
178	2	16	0	3.19	6.7
179	2	17	0	1.87	5.0
180	2	18	0	5.29	7.7
181	2	1	0	1.34	5.0
182	2	2	0	5.13	8.0
183	2	3	0	5.30	8.0
184	2	4	0	2.09	5.5
185	2	5	0	4.43	7.5
186	2	6	0	4.08	7.5
187	2	7	0	2.19	5.5
188	2	8	0	3.03	6.5
189	2	9	0	3.45	7.0
190	2	10	0	1.26	5.0
191	2	11	0	3.70	7.0
192	2	12	0	1.75	5.0
193	2	13	0	1.22	5.0
194	2	14	0	1.42	4.5
195	2	15	0	2.38	5.5
196	2	16	0	1.34	5.0
197	2	17	0	3.94	7.0
198	2	18	0	2.09	5.5
199	2	1	0	1.79	5.5
200	2	2	0	3.14	6.5
201	2	3	0	1.28	4.5
202	2	4	0	2.79	5.5
203	2	5	0	2.75	6.0
204	2	6	0	3.15	7.0
205	2	7	0	1.30	4.5
206	2	8	0	2.28	6.0
207	2	9	0	3.74	7.0
208	2	10	0	2.45	6.0
209	2	11	0	1.40	5.0
210	2	12	0	3.57	6.5
211	2	13	0	2.80	7.0
212	2	14	0	1.37	5.0
213	2	15	0	4.70	7.5
214	2	16	0	3.17	7.0
215	2	17	0	1.24	4.5
216	2	18	0	1.02	4.5
217	3	1	0	2.97	6.5
218	3	2	0	2.83	6.0
219	3	3	0	3.31	6.5
220	3	4	0	3.48	6.3
221	3	5	0	2.30	5.5
222	3	6	0	1.43	5.0
223	3	7	0	1.81	5.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

224	3	8	0	4.56	7.5

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
225	3	9	0	2.08	5.5
226	3	10	0	2.01	5.5
227	3	11	0	2.20	5.5
228	3	12	0	1.42	5.0
229	3	13	0	2.45	6.0
230	3	14	0	2.82	6.0
231	3	15	0	3.65	6.5
232	3	16	0	2.72	6.0
233	3	17	0	3.73	7.0
234	3	18	0	1.58	5.2
235	3	1	0	1.84	5.0
236	3	2	0	4.01	7.0
237	3	3	0	3.17	6.2
238	3	4	0	3.14	6.2
239	3	5	0	1.72	5.2
240	3	6	0	2.04	5.6
241	3	7	0	4.99	7.5
242	3	8	0	1.91	5.0
243	3	9	0	3.28	6.5
244	3	10	0	2.84	6.0
245	3	11	0	2.25	5.7
246	3	12	0	3.49	6.8
247	3	13	0	3.07	6.1
248	3	14	0	6.04	8.1
249	3	15	0	3.78	7.0
250	3	16	0	2.61	6.0
251	3	17	0	2.37	5.5
252	3	18	0	2.97	6.5
253	3	1	0	1.64	5.5
254	3	2	0	2.71	6.0
255	3	3	0	3.10	6.5
256	3	4	0	4.28	7.0
257	3	5	0	3.28	6.5
258	3	6	0	5.09	7.0
259	3	7	0	2.33	6.0
260	3	8	0	6.75	8.0
261	3	9	0	2.15	5.5
262	3	10	0	2.26	5.5
263	3	11	0	2.62	6.0
264	3	12	0	1.90	5.0
265	3	13	0	3.47	7.0
266	3	14	0	5.86	8.0
267	3	15	0	1.75	5.0
268	3	16	0	3.13	7.0
269	3	17	0	2.65	6.0
270	3	18	0	1.43	5.0
271	3	1	0	1.60	5.0
272	3	2	0	3.30	6.5
273	3	3	0	4.99	8.0
274	3	4	0	1.68	5.0
275	3	5	0	2.39	6.0
276	3	6	0	2.31	6.0
277	3	7	0	2.32	6.0
278	3	8	0	3.56	7.0
279	3	9	0	2.19	5.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

280	3	10	0	7.65	8.5

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
281	3	11	0	3.96	7.0
282	3	12	0	2.73	6.2
283	3	13	0	3.51	7.0
284	3	14	0	2.77	6.0
285	3	15	0	1.19	5.0
286	3	16	0	3.63	6.5
287	3	17	0	2.31	5.5
288	3	18	0	2.57	6.0
289	3	1	0	4.78	8.0
290	3	2	0	2.55	6.0
291	3	3	0	2.61	5.5
292	3	4	0	2.31	5.5
293	3	5	0	6.52	8.0
294	3	6	0	2.54	6.0
295	3	7	0	2.96	6.2
296	3	8	0	1.25	5.0
297	3	9	0	2.49	6.2
298	3	10	0	1.71	5.2
299	3	11	0	3.14	6.2
300	3	12	0	1.36	5.0
301	3	13	0	2.09	5.5
302	3	14	0	2.91	6.0
303	3	15	0	2.63	6.0
304	3	16	0	1.60	5.0
305	3	17	0	3.34	6.0
306	3	18	0	1.92	5.5
307	3	1	0	4.79	7.4
308	3	2	0	1.89	5.0
309	3	3	0	1.73	5.1
310	3	4	0	2.35	6.0
311	3	5	0	2.28	5.5
312	3	6	0	4.18	7.0
313	3	7	0	1.49	4.5
314	3	8	0	2.09	5.5
315	3	9	0	4.50	7.0
316	3	10	0	1.45	5.0
317	3	11	0	3.41	6.5
318	3	12	0	1.40	5.0
319	3	13	0	3.53	6.5
320	3	14	0	3.06	6.0
321	3	15	0	3.32	7.0
322	3	16	0	1.29	4.5
323	3	17	0	1.70	5.0
324	3	18	0	1.06	4.5
325	1	1	15	1.92	5.7
326	1	2	15	8.64	9.5
327	1	3	15	7.66	9.0
328	1	4	15	5.56	8.0
329	1	5	15	8.13	9.5
330	1	6	15	3.32	6.5
331	1	7	15	4.16	7.5
332	1	8	15	2.74	6.0
333	1	9	15	3.37	6.8
334	1	10	15	2.74	6.2
335	1	11	15	2.64	6.0

336	1	12	15	2.02	5.2

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
337	1	13	15	2.80	6.5
338	1	14	15	3.38	6.7
339	1	15	15	2.16	5.8
340	1	16	15	2.42	6.1
341	1	17	15	2.67	6.0
342	1	18	15	1.88	5.2
343	1	1	15	10.48	15.0
344	1	2	15	2.99	7.0
345	1	3	15	4.99	7.5
346	1	4	15	3.02	6.0
347	1	5	15	3.89	7.2
348	1	6	15	4.05	7.2
349	1	7	15	3.93	7.0
350	1	8	15	3.29	7.0
351	1	9	15	3.50	7.0
352	1	10	15	2.79	6.5
353	1	11	15	2.38	5.5
354	1	12	15	2.80	6.5
355	1	13	15	3.33	6.7
356	1	14	15	2.53	6.2
357	1	15	15	1.54	5.5
358	1	16	15	2.70	6.0
359	1	17	15	2.07	5.5
360	1	18	15	2.66	6.2
361	1	1	15	5.14	7.7
362	1	2	15	1.53	5.0
363	1	3	15	5.71	8.3
364	1	4	15	3.28	7.0
365	1	5	15	3.74	7.2
366	1	6	15	3.91	7.2
367	1	7	15	2.87	7.0
368	1	8	15	3.51	7.0
369	1	9	15	3.22	7.0
370	1	10	15	1.94	5.3
371	1	11	15	2.37	6.0
372	1	12	15	3.03	6.5
373	1	13	15	1.51	5.2
374	1	14	15	1.93	5.7
375	1	15	15	2.39	6.0
376	1	16	15	2.47	6.2
377	1	17	15	3.10	6.5
378	1	18	15	2.91	6.0
379	1	1	15	5.32	8.0
380	1	2	15	4.66	7.5
381	1	3	15	4.13	7.0
382	1	4	15	3.10	6.5
383	1	5	15	1.76	5.5
384	1	6	15	4.23	7.0
385	1	7	15	4.02	7.2
386	1	8	15	2.70	6.3
387	1	9	15	2.86	6.0
388	1	10	15	2.15	6.0
389	1	11	15	2.51	6.2
390	1	12	15	2.13	6.0
391	1	13	15	2.62	5.8
392	1	14	15	2.33	6.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
393	1	15	15	1.92	5.5
394	1	16	15	1.89	5.1
395	1	17	15	1.27	4.8
396	1	18	15	1.42	5.2
397	1	1	15	2.91	6.5
398	1	2	15	3.78	7.0
399	1	3	15	3.10	7.0
400	1	4	15	2.25	7.0
401	1	5	15	4.94	7.5
402	1	6	15	1.51	5.5
403	1	7	15	3.84	7.0
404	1	8	15	2.73	6.3
405	1	9	15	3.29	7.0
406	1	10	15	2.79	6.5
407	1	11	15	5.17	8.0
408	1	12	15	3.65	7.0
409	1	13	15	3.30	6.8
410	1	14	15	2.50	6.0
411	1	15	15	2.12	5.5
412	1	16	15	2.16	5.7
413	1	17	15	2.00	5.5
414	1	18	15	1.55	5.5
415	1	1	15	9.37	9.5
416	1	2	15	10.34	10.0
417	1	3	15	5.37	8.2
418	1	4	15	6.99	8.5
419	1	5	15	5.91	8.0
420	1	6	15	5.61	8.0
421	1	7	15	4.10	7.8
422	1	8	15	3.48	6.7
423	1	9	15	5.27	7.7
424	1	10	15	5.07	7.5
425	1	11	15	3.66	7.0
426	1	12	15	2.30	6.0
427	1	13	15	3.59	7.0
428	1	14	15	3.23	6.5
429	1	15	15	3.37	7.0
430	1	16	15	1.95	5.0
431	1	17	15	3.20	6.8
432	1	18	15	1.68	5.5
433	2	1	15	2.86	6.3
434	2	2	15	6.54	8.2
435	2	3	15	4.21	7.0
436	2	4	15	7.37	9.0
437	2	5	15	7.07	8.5
438	2	6	15	4.56	7.7
439	2	7	15	4.50	7.5
440	2	8	15	3.47	7.0
441	2	9	15	3.87	7.0
442	2	10	15	3.27	6.5
443	2	11	15	2.31	6.0
444	2	12	15	5.38	8.0
445	2	13	15	2.82	6.0
446	2	14	15	2.28	5.5
447	2	15	15	3.86	7.0
448	2	16	15	1.87	5.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 9

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
449	2	17	15	3.67	7.0
450	2	18	15	2.03	5.5
451	2	1	15	8.47	9.0
452	2	2	15	2.12	5.5
453	2	3	15	4.06	7.0
454	2	4	15	5.60	7.5
455	2	5	15	3.25	6.8
456	2	6	15	4.52	7.0
457	2	7	15	4.22	6.5
458	2	8	15	2.95	6.0
459	2	9	15	4.10	7.0
460	2	10	15	2.01	5.5
461	2	11	15	1.65	5.0
462	2	12	15	3.68	7.0
463	2	13	15	3.35	6.2
464	2	14	15	2.15	5.0
465	2	15	15	2.60	5.5
466	2	16	15	2.05	6.0
467	2	17	15	1.98	6.0
468	2	18	15	2.55	5.5
469	2	1	15	6.67	8.5
470	2	2	15	6.04	7.5
471	2	3	15	3.96	6.9
472	2	4	15	4.87	7.7
473	2	5	15	4.03	7.0
474	2	6	15	4.29	7.2
475	2	7	15	4.10	7.0
476	2	8	15	2.36	6.8
477	2	9	15	2.49	6.0
478	2	10	15	2.83	6.2
479	2	11	15	2.61	6.2
480	2	12	15	1.53	5.5
481	2	13	15	2.30	5.7
482	2	14	15	1.66	5.5
483	2	15	15	2.57	6.0
484	2	16	15	3.18	6.5
485	2	17	15	2.18	4.8
486	2	18	15	1.02	5.0
487	2	1	15	3.75	6.8
488	2	2	15	1.77	5.0
489	2	3	15	4.65	7.6
490	2	4	15	3.65	7.0
491	2	5	15	6.43	9.0
492	2	6	15	6.37	8.2
493	2	7	15	3.62	7.0
494	2	8	15	3.92	7.0
495	2	9	15	2.16	6.0
496	2	10	15	1.90	5.0
497	2	11	15	3.83	7.2
498	2	12	15	2.10	5.0
499	2	13	15	5.00	10.5
500	2	14	15	1.50	4.7
501	2	15	15	3.45	6.5
502	2	16	15	2.53	6.0
503	2	17	15	2.04	5.2
504	2	18	15	2.30	5.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 10

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
505	2	1	15	18.13	12.0
506	2	2	15	6.58	8.5
507	2	3	15	2.41	6.0
508	2	4	15	4.60	7.5
509	2	5	15	1.54	5.0
510	2	6	15	5.76	8.0
511	2	7	15	5.83	8.5
512	2	8	15	4.09	7.5
513	2	9	15	3.43	6.6
514	2	10	15	3.45	7.0
515	2	11	15	3.14	7.0
516	2	12	15	2.20	5.5
517	2	13	15	3.15	6.5
518	2	14	15	2.28	6.0
519	2	15	15	3.27	7.0
520	2	16	15	2.43	6.0
521	2	17	15	2.08	5.3
522	2	18	15	1.60	5.0
523	2	1	15	4.36	6.5
524	2	2	15	5.76	7.4
525	2	3	15	3.55	6.5
526	2	4	15	2.23	5.2
527	2	5	15	3.65	6.7
528	2	6	15	5.07	7.5
529	2	7	15	4.38	7.0
530	2	8	15	2.86	5.7
531	2	9	15	1.63	5.6
532	2	10	15	2.89	5.7
533	2	11	15	1.98	5.5
534	2	12	15	2.38	6.0
535	2	13	15	2.61	5.5
536	2	14	15	3.02	6.5
537	2	15	15	2.32	5.7
538	2	16	15	1.77	5.3
539	2	17	15	1.73	5.5
540	2	18	15	1.57	5.5
541	3	1	15	4.86	7.0
542	3	2	15	5.56	8.0
543	3	3	15	6.25	8.5
544	3	4	15	3.89	6.8
545	3	5	15	4.14	7.0
546	3	6	15	5.80	7.5
547	3	7	15	4.44	7.7
548	3	8	15	3.66	6.7
549	3	9	15	3.22	6.2
550	3	10	15	4.38	7.5
551	3	11	15	3.45	6.2
552	3	12	15	3.77	7.0
553	3	13	15	3.01	6.0
554	3	14	15	3.30	6.2
555	3	15	15	2.19	5.5
556	3	16	15	1.45	4.8
557	3	17	15	2.27	5.5
558	3	18	15	2.00	4.5
559	3	1	15	8.03	9.1
560	3	2	15	3.94	6.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 11

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
561	3	3	15	4.65	7.7
562	3	4	15	2.58	6.1
563	3	5	15	4.84	7.7
564	3	6	15	4.47	8.0
565	3	7	15	4.49	7.0
566	3	8	15	3.01	6.5
567	3	9	15	4.36	7.2
568	3	10	15	2.90	6.0
569	3	11	15	3.97	7.0
570	3	12	15	4.39	7.2
571	3	13	15	4.22	7.2
572	3	14	15	2.81	6.0
573	3	15	15	1.99	5.8
574	3	16	15	2.78	6.0
575	3	17	15	1.73	5.5
576	3	18	15	3.04	5.7
577	3	1	15	9.90	9.0
578	3	2	15	4.90	8.0
579	3	3	15	7.11	8.7
580	3	4	15	3.17	5.0
581	3	5	15	4.16	7.0
582	3	6	15	4.23	7.0
583	3	7	15	3.22	6.5
584	3	8	15	4.44	7.0
585	3	9	15	2.95	6.5
586	3	10	15	2.63	6.0
587	3	11	15	2.63	6.0
588	3	12	15	2.54	6.0
589	3	13	15	3.03	6.5
590	3	14	15	2.20	5.9
591	3	15	15	1.95	5.2
592	3	16	15	1.54	5.5
593	3	17	15	2.05	5.7
594	3	18	15	1.39	5.2
595	3	1	15	6.80	8.5
596	3	2	15	8.40	9.5
597	3	3	15	5.23	8.0
598	3	4	15	5.99	8.0
599	3	5	15	5.44	8.0
600	3	6	15	4.92	7.4
601	3	7	15	3.14	6.5
602	3	8	15	4.01	6.5
603	3	9	15	3.50	7.0
604	3	10	15	2.41	6.0
605	3	11	15	1.89	5.2
606	3	12	15	2.60	6.0
607	3	13	15	2.78	6.2
608	3	14	15	2.85	6.5
609	3	15	15	2.92	6.0
610	3	16	15	2.92	6.2
611	3	17	15	1.62	5.5
612	3	18	15	2.46	6.0
613	3	1	15	26.00	13.5
614	3	2	15	8.29	9.0
615	3	3	15	7.11	8.0
616	3	4	15	4.37	7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 12

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
617	3	5	15	3.11	6.2
618	3	6	15	5.88	8.4
619	3	7	15	1.69	5.0
620	3	8	15	4.35	7.6
621	3	9	15	3.37	6.0
622	3	10	15	3.20	6.0
623	3	11	15	3.28	6.5
624	3	12	15	3.05	6.0
625	3	13	15	2.88	5.7
626	3	14	15	2.88	6.0
627	3	15	15	1.72	5.1
628	3	16	15	1.78	5.5
629	3	17	15	1.68	5.0
630	3	18	15	2.28	5.2
631	3	1	15	10.95	10.0
632	3	2	15	5.26	8.0
633	3	3	15	6.52	7.5
634	3	4	15	2.92	6.5
635	3	5	15	6.24	8.2
636	3	6	15	4.80	7.6
637	3	7	15	4.93	8.0
638	3	8	15	2.72	6.2
639	3	9	15	3.72	6.5
640	3	10	15	1.77	5.2
641	3	11	15	3.24	7.0
642	3	12	15	2.60	6.0
643	3	13	15	3.94	7.5
644	3	14	15	3.14	7.0
645	3	15	15	2.15	5.6
646	3	16	15	3.20	7.0
647	3	17	15	2.62	6.5
648	3	18	15	1.57	5.0
649	1	1	30	24.68	10.0
650	1	2	30	12.53	9.3
651	1	3	30	19.10	11.5
652	1	4	30	8.20	8.5
653	1	5	30	7.13	8.2
654	1	6	30	13.37	10.7
655	1	7	30	8.30	8.4
656	1	8	30	12.69	9.5
657	1	9	30	6.44	8.3
658	1	10	30	4.67	7.0
659	1	11	30	19.87	12.5
660	1	12	30	6.56	7.5
661	1	13	30	10.96	10.0
662	1	14	30	7.65	9.0
663	1	15	30	6.10	7.6
664	1	16	30	5.22	8.0
665	1	17	30	8.32	9.5
666	1	18	30	10.00	9.5
667	1	1	30	4.20	6.5
668	1	2	30	2.63	6.2
669	1	3	30	8.21	8.6
670	1	4	30	28.43	13.5
671	1	5	30	17.81	11.5
672	1	6	30	3.66	6.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 13

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
673	1	7	30	5.52	8.3
674	1	8	30	5.39	7.5
675	1	9	30	5.23	7.6
676	1	10	30	2.60	7.0
677	1	11	30	9.28	9.7
678	1	12	30	5.24	7.5
679	1	13	30	17.31	11.2
680	1	14	30	2.98	6.5
681	1	15	30	6.24	8.7
682	1	16	30	2.72	6.2
683	1	17	30	4.05	7.0
684	1	18	30	6.62	8.4
685	1	1	30	5.38	6.5
686	1	2	30	13.16	10.5
687	1	3	30	9.27	7.8
688	1	4	30	4.62	7.0
689	1	5	30	9.30	8.5
690	1	6	30	7.05	8.0
691	1	7	30	6.47	8.0
692	1	8	30	3.48	6.0
693	1	9	30	4.36	7.2
694	1	10	30	7.03	8.5
695	1	11	30	7.98	9.0
696	1	12	30	5.60	8.0
697	1	13	30	10.25	9.0
698	1	14	30	4.04	8.0
699	1	15	30	4.84	7.5
700	1	16	30	3.65	7.2
701	1	17	30	10.17	10.0
702	1	18	30	6.31	7.8
703	1	1	30	8.24	9.0
704	1	2	30	7.94	9.0
705	1	3	30	10.43	9.5
706	1	4	30	5.48	8.0
707	1	5	30	3.13	7.0
708	1	6	30	2.61	6.7
709	1	7	30	19.64	12.0
710	1	8	30	14.86	10.8
711	1	9	30	3.36	6.7
712	1	10	30	26.23	12.4
713	1	11	30	15.50	11.2
714	1	12	30	4.50	8.0
715	1	13	30	4.40	7.3
716	1	14	30	2.71	5.5
717	1	15	30	10.53	9.0
718	1	16	30	18.74	12.0
719	1	17	30	10.05	9.6
720	1	18	30	6.90	8.7
721	1	1	30	5.27	7.8
722	1	2	30	8.53	8.5
723	1	3	30	22.68	13.2
724	1	4	30	9.91	9.2
725	1	5	30	7.12	8.4
726	1	6	30	10.78	8.7
727	1	7	30	5.34	8.3
728	1	8	30	8.76	9.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 14

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
729	1	9	30	11.70	10.4
730	1	10	30	11.74	9.8
731	1	11	30	12.45	9.7
732	1	12	30	8.27	9.4
733	1	13	30	6.54	7.8
734	1	14	30	7.91	7.2
735	1	15	30	3.01	6.2
736	1	16	30	11.15	9.6
737	1	17	30	7.90	9.5
738	1	18	30	3.86	6.7
739	1	1	30	9.23	9.0
740	1	2	30	7.54	8.0
741	1	3	30	2.26	6.0
742	1	4	30	6.86	9.2
743	1	5	30	3.13	6.5
744	1	6	30	8.50	8.8
745	1	7	30	4.66	7.6
746	1	8	30	16.67	11.5
747	1	9	30	1.93	5.5
748	1	10	30	2.00	5.5
749	1	11	30	8.05	9.0
750	1	12	30	12.44	10.0
751	1	13	30	11.06	9.7
752	1	14	30	6.30	6.5
753	1	15	30	3.54	6.8
754	1	16	30	3.77	7.0
755	1	17	30	9.23	8.3
756	1	18	30	10.91	10.5
757	2	1	30	11.49	10.7
758	2	2	30	2.86	6.5
759	2	3	30	3.44	6.5
760	2	4	30	5.35	7.8
761	2	5	30	9.59	9.0
762	2	6	30	6.98	9.5
763	2	7	30	6.22	8.3
764	2	8	30	9.96	9.6
765	2	9	30	13.05	10.5
766	2	10	30	3.05	7.2
767	2	11	30	8.07	8.0
768	2	12	30	2.80	6.3
769	2	13	30	9.60	9.2
770	2	14	30	5.14	7.0
771	2	15	30	10.45	10.4
772	2	16	30	3.70	7.1
773	2	17	30	4.87	7.3
774	2	18	30	8.56	8.7
775	2	1	30	7.04	7.8
776	2	2	30	16.99	11.7
777	2	3	30	6.41	8.2
778	2	4	30	5.83	7.8
779	2	5	30	4.76	6.6
780	2	6	30	13.56	9.8
781	2	7	30	8.63	8.5
782	2	8	30	33.10	14.0
783	2	9	30	7.05	8.0
784	2	10	30	24.91	13.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 15

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
785	2	11	30	10.81	9.3
786	2	12	30	7.79	8.4
787	2	13	30	15.55	11.0
788	2	14	30	8.50	8.6
789	2	15	30	6.61	8.0
790	2	16	30	15.33	10.3
791	2	17	30	11.53	9.3
792	2	18	30	9.01	9.3
793	2	1	30	7.10	7.6
794	2	2	30	5.23	8.4
795	2	3	30	13.13	9.5
796	2	4	30	8.30	8.7
797	2	5	30	10.97	9.2
798	2	6	30	24.90	11.5
799	2	7	30	5.60	7.0
800	2	8	30	4.24	7.0
801	2	9	30	5.60	7.7
802	2	10	30	10.93	9.2
803	2	11	30	18.29	10.8
804	2	12	30	8.39	9.0
805	2	13	30	3.11	6.6
806	2	14	30	3.80	7.0
807	2	15	30	2.85	6.3
808	2	16	30	7.25	9.3
809	2	17	30	4.30	7.0
810	2	18	30	9.08	8.7
811	2	1	30	3.87	7.5
812	2	2	30	3.42	6.8
813	2	3	30	5.57	7.8
814	2	4	30	11.79	10.2
815	2	5	30	8.59	8.6
816	2	6	30	11.87	9.7
817	2	7	30	6.85	8.5
818	2	8	30	10.70	10.3
819	2	9	30	11.11	10.0
820	2	10	30	6.17	7.4
821	2	11	30	6.62	6.3
822	2	12	30	4.09	7.0
823	2	13	30	2.91	6.6
824	2	14	30	13.99	9.3
825	2	15	30	4.67	7.4
826	2	16	30	9.13	8.6
827	2	17	30	3.33	5.8
828	2	18	30	3.25	6.5
829	2	1	30	12.90	10.0
830	2	2	30	15.13	10.0
831	2	3	30	11.95	9.5
832	2	4	30	11.66	10.2
833	2	5	30	11.51	10.0
834	2	6	30	39.11	15.0
835	2	7	30	4.00	7.2
836	2	8	30	5.88	7.5
837	2	9	30	2.97	6.2
838	2	10	30	11.85	10.0
839	2	11	30	6.55	8.4
840	2	12	30	7.82	7.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
841	2	13	30	10.83	9.6
842	2	14	30	3.36	6.3
843	2	15	30	7.24	8.5
844	2	16	30	14.72	10.7
845	2	17	30	4.81	7.5
846	2	18	30	4.97	8.0
847	2	1	30	6.01	7.5
848	2	2	30	8.30	8.5
849	2	3	30	6.60	7.7
850	2	4	30	6.41	7.5
851	2	5	30	4.00	6.5
852	2	6	30	3.77	6.2
853	2	7	30	2.43	4.5
854	2	8	30	7.16	7.7
855	2	9	30	6.48	8.4
856	2	10	30	11.10	9.5
857	2	11	30	7.13	8.0
858	2	12	30	16.62	10.7
859	2	13	30	3.22	6.0
860	2	14	30	6.78	7.8
861	2	15	30	5.34	7.8
862	2	16	30	5.60	7.5
863	2	17	30	8.67	8.5
864	2	18	30	6.90	7.6
865	3	1	30	4.30	6.5
866	3	2	30	7.87	8.5
867	3	3	30	6.84	7.7
868	3	4	30	15.56	10.0
869	3	5	30	7.46	8.5
870	3	6	30	2.01	5.6
871	3	7	30	2.46	5.5
872	3	8	30	10.40	9.0
873	3	9	30	6.55	8.5
874	3	10	30	12.24	9.0
875	3	11	30	4.09	6.5
876	3	12	30	5.82	7.4
877	3	13	30	4.62	7.2
878	3	14	30	2.20	5.5
879	3	15	30	4.13	7.0
880	3	16	30	5.08	6.8
881	3	17	30	3.36	6.3
882	3	18	30	6.20	8.5
883	3	1	30	17.11	10.7
884	3	2	30	2.89	9.0
885	3	3	30	10.01	9.3
886	3	4	30	20.04	10.9
887	3	5	30	9.66	8.5
888	3	6	30	2.81	5.5
889	3	7	30	8.44	8.4
890	3	8	30	8.53	8.7
891	3	9	30	6.24	8.5
892	3	10	30	2.90	5.8
893	3	11	30	4.03	6.4
894	3	12	30	5.41	7.8
895	3	13	30	9.16	8.7
896	3	14	30	3.39	6.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 17

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
897	3	15	30	2.89	5.5
898	3	16	30	8.11	8.2
899	3	17	30	2.73	6.0
900	3	18	30	6.49	8.3
901	3	1	30	16.06	11.6
902	3	2	30	6.24	8.0
903	3	3	30	14.07	11.0
904	3	4	30	17.04	10.5
905	3	5	30	5.57	8.0
906	3	6	30	3.43	6.8
907	3	7	30	4.40	7.5
908	3	8	30	10.61	9.6
909	3	9	30	4.97	8.0
910	3	10	30	6.06	8.7
911	3	11	30	5.28	8.0
912	3	12	30	7.41	9.6
913	3	13	30	3.35	8.0
914	3	14	30	11.25	8.7
915	3	15	30	5.53	8.0
916	3	16	30	9.99	9.6
917	3	17	30	5.03	7.0
918	3	18	30	4.02	7.5
919	3	1	30	3.80	7.5
920	3	2	30	7.09	8.6
921	3	3	30	18.94	12.2
922	3	4	30	3.72	7.6
923	3	5	30	8.68	9.5
924	3	6	30	9.99	10.4
925	3	7	30	10.90	10.4
926	3	8	30	6.52	9.0
927	3	9	30	10.42	9.6
928	3	10	30	5.24	7.8
929	3	11	30	9.94	9.2
930	3	12	30	4.73	7.0
931	3	13	30	4.74	7.3
932	3	14	30	5.30	8.3
933	3	15	30	2.76	6.5
934	3	16	30	15.50	11.0
935	3	17	30	2.48	6.5
936	3	18	30	3.47	7.1
937	3	1	30	7.06	8.5
938	3	2	30	14.85	11.0
939	3	3	30	11.23	10.0
940	3	4	30	8.68	9.0
941	3	5	30	2.45	6.5
942	3	6	30	6.12	8.0
943	3	7	30	6.12	8.0
944	3	8	30	7.34	8.5
945	3	9	30	5.46	8.2
946	3	10	30	18.42	12.0
947	3	11	30	38.12	17.0
948	3	12	30	10.70	9.7
949	3	13	30	3.17	6.5
950	3	14	30	7.26	8.6
951	3	15	30	13.29	10.6
952	3	16	30	9.71	9.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 18

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
953	3	17	30	5.16	8.0
954	3	18	30	3.30	6.5
955	3	1	30	5.83	7.7
956	3	2	30	3.48	7.4
957	3	3	30	5.18	7.0
958	3	4	30	6.28	8.5
959	3	5	30	5.99	7.5
960	3	6	30	11.95	10.5
961	3	7	30	8.64	8.7
962	3	8	30	11.06	10.0
963	3	9	30	5.69	8.2
964	3	10	30	4.58	7.6
965	3	11	30	9.49	9.5
966	3	12	30	4.83	7.6
967	3	13	30	14.36	12.0
968	3	14	30	14.65	11.3
969	3	15	30	10.83	9.7
970	3	16	30	6.61	8.7
971	3	17	30	5.84	8.0
972	3	18	30	24.11	13.5
973	1	1	45	41.70	15.0
974	1	2	45	24.90	13.3
975	1	3	45	19.41	12.0
976	1	4	45	27.54	13.3
977	1	5	45	11.98	10.5
978	1	6	45	13.21	10.4
979	1	7	45	21.08	11.5
980	1	8	45	28.07	13.6
981	1	9	45	7.50	8.9
982	1	10	45	5.80	8.5
983	1	11	45	13.80	11.2
984	1	12	45	18.10	13.1
985	1	13	45	20.11	13.4
986	1	14	45	46.26	15.8
987	1	15	45	28.92	14.4
988	1	16	45	39.44	15.0
989	1	17	45	10.08	9.5
990	1	18	45	7.69	9.6
991	1	1	45	21.96	12.4
992	1	2	45	14.14	11.3
993	1	3	45	31.74	14.2
994	1	4	45	28.85	14.4
995	1	5	45	15.74	11.7
996	1	6	45	41.70	16.2
997	1	7	45	8.28	9.2
998	1	8	45	8.49	8.6
999	1	9	45	17.86	12.4
1000	1	10	45	7.15	8.6
1001	1	11	45	6.25	7.8
1002	1	12	45	6.49	8.9
1003	1	13	45	14.42	10.7
1004	1	14	45	47.17	16.5
1005	1	15	45	24.08	12.7
1006	1	16	45	9.60	9.6
1007	1	17	45	21.55	12.7
1008	1	18	45	7.18	8.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1009	1	1	45	12.55	11.4
1010	1	2	45	5.18	7.7
1011	1	3	45	16.14	11.5
1012	1	4	45	37.96	15.2
1013	1	5	45	13.45	11.2
1014	1	6	45	22.32	12.3
1015	1	7	45	28.13	13.5
1016	1	8	45	52.26	16.2
1017	1	9	45	25.57	13.6
1018	1	10	45	6.19	8.0
1019	1	11	45	22.82	13.5
1020	1	12	45	24.23	13.0
1021	1	13	45	40.98	14.5
1022	1	14	45	32.24	15.3
1023	1	15	45	37.03	15.2
1024	1	16	45	15.71	11.7
1025	1	17	45	11.84	10.8
1026	1	18	45	14.92	12.5
1027	1	1	45	23.20	13.2
1028	1	2	45	36.11	14.7
1029	1	3	45	6.19	8.4
1030	1	4	45	11.93	10.4
1031	1	5	45	21.63	12.4
1032	1	6	45	25.15	12.2
1033	1	7	45	48.26	15.2
1034	1	8	45	28.60	14.2
1035	1	9	45	83.07	21.0
1036	1	10	45	14.41	11.0
1037	1	11	45	49.75	17.0
1038	1	12	45	26.60	13.1
1039	1	13	45	33.12	14.0
1040	1	14	45	41.43	15.5
1041	1	15	45	38.55	5.2
1042	1	16	45	30.11	14.4
1043	1	17	45	23.44	13.4
1044	1	18	45	13.92	10.9
1045	1	1	45	18.49	12.2
1046	1	2	45	23.24	12.5
1047	1	3	45	22.15	11.2
1048	1	4	45	21.96	11.5
1049	1	5	45	16.18	12.2
1050	1	6	45	40.60	15.0
1051	1	7	45	21.10	12.2
1052	1	8	45	23.95	13.5
1053	1	9	45	26.52	13.7
1054	1	10	45	28.22	13.6
1055	1	11	45	18.71	12.2
1056	1	12	45	8.59	9.0
1057	1	13	45	54.86	16.6
1058	1	14	45	47.65	15.9
1059	1	15	45	63.55	18.0
1060	1	16	45	11.40	10.0
1061	1	17	45	32.06	13.7
1062	1	18	45	16.52	11.0
1063	1	1	45	55.31	16.4
1064	1	2	45	19.51	12.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1065	1	3	45	20.23	12.0
1066	1	4	45	18.60	11.6
1067	1	5	45	19.53	12.0
1068	1	6	45	6.49	8.6
1069	1	7	45	32.92	14.3
1070	1	8	45	25.82	13.6
1071	1	9	45	11.19	10.0
1072	1	10	45	30.85	14.0
1073	1	11	45	31.58	13.6
1074	1	12	45	38.07	14.2
1075	1	13	45	21.34	11.2
1076	1	14	45	35.63	15.5
1077	1	15	45	39.19	14.5
1078	1	16	45	9.33	9.4
1079	1	17	45	9.32	10.0
1080	1	18	45	18.01	11.8
1081	2	1	45	35.07	13.8
1082	2	2	45	23.89	12.5
1083	2	3	45	23.96	12.1
1084	2	4	45	18.53	11.7
1085	2	5	45	37.10	14.7
1086	2	6	45	20.40	12.5
1087	2	7	45	6.24	8.5
1088	2	8	45	33.85	13.4
1089	2	9	45	40.01	15.4
1090	2	10	45	20.73	11.4
1091	2	11	45	44.25	15.5
1092	2	12	45	22.46	12.4
1093	2	13	45	45.05	16.0
1094	2	14	45	59.70	17.5
1095	2	15	45	49.63	16.4
1096	2	16	45	13.49	11.4
1097	2	17	45	4.89	7.8
1098	2	18	45	9.59	9.2
1099	2	1	45	22.75	12.0
1100	2	2	45	12.99	10.4
1101	2	3	45	20.52	11.5
1102	2	4	45	36.45	14.0
1103	2	5	45	35.04	14.5
1104	2	6	45	13.90	11.4
1105	2	7	45	9.75	10.4
1106	2	8	45	6.85	8.4
1107	2	9	45	30.51	13.2
1108	2	10	45	40.61	16.7
1109	2	11	45	15.01	11.5
1110	2	12	45	10.20	9.7
1111	2	13	45	11.12	9.6
1112	2	14	45	14.80	11.0
1113	2	15	45	14.62	10.7
1114	2	16	45	31.15	14.5
1115	2	17	45	24.26	12.6
1116	2	18	45	23.80	12.7
1117	2	1	45	23.27	12.5
1118	2	2	45	21.18	11.8
1119	2	3	45	24.12	12.6
1120	2	4	45	8.07	8.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 21

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1121	2	5	45	22.49	11.6
1122	2	6	45	14.63	10.6
1123	2	7	45	28.68	13.3
1124	2	8	45	16.84	10.7
1125	2	9	45	10.62	9.2
1126	2	10	45	5.03	7.8
1127	2	11	45	6.62	8.7
1128	2	12	45	9.31	9.4
1129	2	13	45	11.35	10.5
1130	2	14	45	12.43	10.7
1131	2	15	45	5.81	8.2
1132	2	16	45	6.16	8.2
1133	2	17	45	52.06	17.0
1134	2	18	45	4.74	7.6
1135	2	1	45	9.22	9.5
1136	2	2	45	17.41	11.5
1137	2	3	45	6.74	8.0
1138	2	4	45	25.96	14.2
1139	2	5	45	21.26	12.5
1140	2	6	45	15.61	11.2
1141	2	7	45	7.02	8.5
1142	2	8	45	25.10	13.7
1143	2	9	45	29.03	13.0
1144	2	10	45	5.00	7.5
1145	2	11	45	18.40	11.5
1146	2	12	45	8.83	9.0
1147	2	13	45	15.90	11.3
1148	2	14	45	14.18	11.8
1149	2	15	45	5.09	7.4
1150	2	16	45	27.66	13.5
1151	2	17	45	11.61	10.2
1152	2	18	45	8.06	8.5
1153	2	1	45	29.32	13.5
1154	2	2	45	34.15	14.0
1155	2	3	45	13.29	10.4
1156	2	4	45	39.72	14.6
1157	2	5	45	72.78	18.5
1158	2	6	45	27.69	13.5
1159	2	7	45	49.23	15.6
1160	2	8	45	31.93	15.0
1161	2	9	45	28.90	13.0
1162	2	10	45	12.70	9.7
1163	2	11	45	28.67	13.8
1164	2	12	45	28.56	13.7
1165	2	13	45	14.63	11.0
1166	2	14	45	4.33	7.2
1167	2	15	45	11.20	9.7
1168	2	16	45	28.78	13.3
1169	2	17	45	21.63	12.7
1170	2	18	45	20.32	12.6
1171	2	1	45	11.62	10.4
1172	2	2	45	15.28	10.9
1173	2	3	45	6.72	7.7
1174	2	4	45	6.33	8.6
1175	2	5	45	3.18	6.6
1176	2	6	45	4.28	6.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 22

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1177	2	7	45	27.94	12.8
1178	2	8	45	17.92	11.6
1179	2	9	45	9.34	9.5
1180	2	10	45	13.07	10.8
1181	2	11	45	34.55	15.0
1182	2	12	45	22.24	12.0
1183	2	13	45	15.49	11.0
1184	2	14	45	16.13	11.0
1185	2	15	45	3.60	6.5
1186	2	16	45	18.61	11.7
1187	2	17	45	17.85	11.4
1188	2	18	45	24.63	12.7
1189	3	1	45	32.40	14.0
1190	3	2	45	16.79	11.2
1191	3	3	45	17.66	11.5
1192	3	4	45	17.47	10.0
1193	3	5	45	26.62	13.0
1194	3	6	45	26.66	13.0
1195	3	7	45	5.80	7.5
1196	3	8	45	22.24	11.8
1197	3	9	45	14.93	11.0
1198	3	10	45	21.08	11.5
1199	3	11	45	30.66	14.4
1200	3	12	45	22.04	12.5
1201	3	13	45	33.54	14.5
1202	3	14	45	6.30	7.8
1203	3	15	45	5.58	7.0
1204	3	16	45	6.89	8.5
1205	3	17	45	16.39	11.5
1206	3	18	45	9.84	9.2
1207	3	1	45	38.82	14.6
1208	3	2	45	13.90	10.2
1209	3	3	45	10.63	9.7
1210	3	4	45	17.94	11.4
1211	3	5	45	25.60	13.0
1212	3	6	45	20.50	11.8
1213	3	7	45	15.56	11.6
1214	3	8	45	5.21	7.6
1215	3	9	45	24.69	12.7
1216	3	10	45	12.54	10.5
1217	3	11	45	24.13	12.3
1218	3	12	45	16.57	11.2
1219	3	13	45	23.59	12.6
1220	3	14	45	8.40	9.0
1221	3	15	45	8.76	9.2
1222	3	16	45	15.83	11.7
1223	3	17	45	5.92	7.7
1224	3	18	45	21.88	11.6
1225	3	1	45	10.07	9.3
1226	3	2	45	7.54	8.3
1227	3	3	45	14.82	11.0
1228	3	4	45	14.43	10.7
1229	3	5	45	6.29	8.2
1230	3	6	45	28.03	13.4
1231	3	7	45	19.33	12.3
1232	3	8	45	11.03	9.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 23

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1233	3	9	45	16.20	10.3
1234	3	10	45	23.97	12.5
1235	3	11	45	17.28	10.7
1236	3	12	45	8.39	9.0
1237	3	13	45	30.40	13.7
1238	3	14	45	5.56	7.8
1239	3	15	45	6.47	8.0
1240	3	16	45	5.86	7.8
1241	3	17	45	11.63	10.0
1242	3	18	45	21.15	12.2
1243	3	1	45	11.97	9.7
1244	3	2	45	16.87	11.3
1245	3	3	45	8.16	8.7
1246	3	4	45	3.62	6.5
1247	3	5	45	27.80	12.8
1248	3	6	45	3.77	6.7
1249	3	7	45	22.64	12.3
1250	3	8	45	4.78	7.8
1251	3	9	45	4.67	7.2
1252	3	10	45	23.03	12.0
1253	3	11	45	73.84	17.4
1254	3	12	45	20.93	11.7
1255	3	13	45	25.20	13.0
1256	3	14	45	39.93	14.5
1257	3	15	45	6.77	8.0
1258	3	16	45	6.59	8.0
1259	3	17	45	8.70	8.7
1260	3	18	45	4.43	7.3
1261	3	1	45	38.89	14.5
1262	3	2	45	36.91	14.4
1263	3	3	45	21.76	11.8
1264	3	4	45	18.08	11.4
1265	3	5	45	23.89	12.5
1266	3	6	45	38.06	14.6
1267	3	7	45	27.34	13.3
1268	3	8	45	15.65	11.2
1269	3	9	45	17.31	11.2
1270	3	10	45	59.82	16.8
1271	3	11	45	24.02	12.4
1272	3	12	45	26.13	13.0
1273	3	13	45	51.28	16.8
1274	3	14	45	11.33	9.5
1275	3	15	45	19.55	12.0
1276	3	16	45	29.52	13.5
1277	3	17	45	20.18	11.9
1278	3	18	45	5.18	7.3
1279	3	1	45	77.76	18.0
1280	3	2	45	32.60	14.0
1281	3	3	45	9.64	9.2
1282	3	4	45	7.76	8.4
1283	3	5	45	56.71	16.6
1284	3	6	45	28.74	13.7
1285	3	7	45	30.91	13.0
1286	3	8	45	49.55	15.4
1287	3	9	45	27.95	12.6
1288	3	10	45	20.68	11.8

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 24

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1289	3	11	45	31.33	13.70
1290	3	12	45	14.08	10.40
1291	3	13	45	12.49	10.00
1292	3	14	45	10.52	9.90
1293	3	15	45	14.44	10.60
1294	3	16	45	37.15	14.50
1295	3	17	45	7.52	8.80
1296	3	18	45	8.98	8.70
1297	1	1	60	33.14	13.00
1298	1	2	60	73.07	17.50
1299	1	3	60	50.00	15.20
1300	1	4	60	54.01	16.00
1301	1	5	60	65.87	17.00
1302	1	6	60	40.30	14.50
1303	1	7	60	95.30	19.00
1304	1	8	60	39.07	14.50
1305	1	9	60	54.98	16.70
1306	1	10	60	47.39	17.80
1307	1	11	60	45.73	15.20
1308	1	12	60	84.51	18.00
1309	1	13	60	38.74	15.30
1310	1	14	60	58.60	16.50
1311	1	15	60	28.17	13.20
1312	1	16	60	31.82	14.00
1313	1	17	60	18.94	12.00
1314	1	18	60	25.17	15.00
1315	1	1	60	88.01	18.50
1316	1	2	60	61.08	17.80
1317	1	3	60	98.14	20.00
1318	1	4	60	48.80	18.80
1319	1	5	60	36.99	16.70
1320	1	6	60	34.65	15.50
1321	1	7	60	54.34	17.50
1322	1	8	60	33.36	15.50
1323	1	9	60	23.77	14.00
1324	1	10	60	27.54	13.50
1325	1	11	60	10.20	9.00
1326	1	12	60	23.53	13.00
1327	1	13	60	9.02	9.00
1328	1	14	60	9.52	10.12
1329	1	15	60	9.60	10.20
1330	1	16	60	39.00	16.00
1331	1	17	60	35.50	15.50
1332	1	18	60	39.10	16.50
1333	1	1	60	56.73	16.50
1334	1	2	60	88.65	20.50
1335	1	3	60	57.97	15.70
1336	1	4	60	47.49	15.50
1337	1	5	60	47.25	17.50
1338	1	6	60	53.82	18.00
1339	1	7	60	58.24	17.40
1340	1	8	60	54.17	18.00
1341	1	9	60	46.91	17.50
1342	1	10	60	54.87	17.40
1343	1	11	60	39.06	15.50
1344	1	12	60	27.49	14.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 25

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1345	1	13	60	8.75	9.0
1346	1	14	60	23.07	13.5
1347	1	15	60	24.93	12.8
1348	1	16	60	17.02	12.0
1349	1	17	60	10.76	10.0
1350	1	18	60	9.20	9.5
1351	1	1	60	109.10	21.0
1352	1	2	60	84.84	19.0
1353	1	3	60	58.85	18.0
1354	1	4	60	46.75	16.5
1355	1	5	60	64.20	18.0
1356	1	6	60	51.61	17.0
1357	1	7	60	63.84	18.5
1358	1	8	60	82.62	20.0
1359	1	9	60	33.58	14.0
1360	1	10	60	42.10	15.5
1361	1	11	60	16.45	12.4
1362	1	12	60	34.38	14.0
1363	1	13	60	20.32	13.0
1364	1	14	60	23.48	13.0
1365	1	15	60	43.85	16.0
1366	1	16	60	17.19	13.5
1367	1	17	60	32.14	15.0
1368	1	18	60	12.78	11.0
1369	1	1	60	88.06	21.5
1370	1	2	60	75.80	19.5
1371	1	3	60	45.10	16.0
1372	1	4	60	35.40	16.0
1373	1	5	60	45.19	16.4
1374	1	6	60	102.50	20.0
1375	1	7	60	53.78	16.0
1376	1	8	60	40.36	16.0
1377	1	9	60	35.60	17.0
1378	1	10	60	33.84	15.0
1379	1	11	60	37.62	14.5
1380	1	12	60	53.23	16.5
1381	1	13	60	40.13	16.2
1382	1	14	60	34.51	14.5
1383	1	15	60	31.68	13.5
1384	1	16	60	26.90	13.7
1385	1	17	60	20.25	11.5
1386	1	18	60	15.91	11.5
1387	1	1	60	63.80	18.0
1388	1	2	60	32.85	14.5
1389	1	3	60	44.95	15.0
1390	1	4	60	41.42	14.5
1391	1	5	60	47.53	17.2
1392	1	6	60	84.92	19.2
1393	1	7	60	51.60	16.5
1394	1	8	60	39.28	14.5
1395	1	9	60	36.19	16.2
1396	1	10	60	25.87	14.0
1397	1	11	60	48.31	16.2
1398	1	12	60	46.14	16.0
1399	1	13	60	25.89	14.0
1400	1	14	60	33.83	14.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 26

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1401	1	15	60	18.52	11.5
1402	1	16	60	15.34	10.5
1403	1	17	60	11.45	9.5
1404	1	18	60	18.13	11.5
1405	2	1	60	87.33	19.5
1406	2	2	60	57.23	17.3
1407	2	3	60	64.71	17.5
1408	2	4	60	74.63	19.4
1409	2	5	60	33.60	16.0
1410	2	6	60	78.18	19.0
1411	2	7	60	48.25	16.5
1412	2	8	60	68.78	17.5
1413	2	9	60	37.71	14.5
1414	2	10	60	37.77	14.7
1415	2	11	60	49.33	15.5
1416	2	12	60	47.02	15.5
1417	2	13	60	40.01	14.0
1418	2	14	60	42.46	16.2
1419	2	15	60	44.16	17.0
1420	2	16	60	25.23	15.3
1421	2	17	60	29.17	16.0
1422	2	18	60	43.21	15.0
1423	2	1	60	42.34	16.4
1424	2	2	60	60.95	17.5
1425	2	3	60	45.14	15.5
1426	2	4	60	56.37	17.0
1427	2	5	60	69.92	18.5
1428	2	6	60	93.98	21.0
1429	2	7	60	68.22	18.5
1430	2	8	60	55.85	17.5
1431	2	9	60	35.16	15.5
1432	2	10	60	40.83	16.0
1433	2	11	60	31.80	15.5
1434	2	12	60	19.51	13.0
1435	2	13	60	40.56	15.5
1436	2	14	60	35.11	15.5
1437	2	15	60	20.99	14.4
1438	2	16	60	17.19	11.6
1439	2	17	60	17.35	12.0
1440	2	18	60	11.68	10.5
1441	2	1	60	65.88	18.0
1442	2	2	60	41.26	16.0
1443	2	3	60	44.49	16.2
1444	2	4	60	63.96	18.3
1445	2	5	60	71.51	18.8
1446	2	6	60	40.99	15.5
1447	2	7	60	44.58	16.2
1448	2	8	60	36.99	15.2
1449	2	9	60	28.76	13.2
1450	2	10	60	37.40	14.5
1451	2	11	60	21.39	12.5
1452	2	12	60	22.71	12.5
1453	2	13	60	8.55	9.7
1454	2	14	60	18.20	11.5
1455	2	15	60	6.35	8.2
1456	2	16	60	9.30	9.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1457	2	17	60	17.14	12.0
1458	2	18	60	11.87	10.7
1459	2	1	60	90.16	21.0
1460	2	2	60	51.29	16.7
1461	2	3	60	150.02	20.0
1462	2	4	60	85.99	19.3
1463	2	5	60	46.80	16.5
1464	2	6	60	51.93	16.5
1465	2	7	60	33.17	14.5
1466	2	8	60	35.01	14.3
1467	2	9	60	29.03	14.2
1468	2	10	60	41.63	15.0
1469	2	11	60	20.84	12.5
1470	2	12	60	17.47	11.0
1471	2	13	60	32.93	14.2
1472	2	14	60	22.10	13.2
1473	2	15	60	20.11	12.5
1474	2	16	60	9.91	9.5
1475	2	17	60	11.23	11.0
1476	2	18	60	7.83	8.0
1477	2	1	60	55.89	16.5
1478	2	2	60	105.63	20.0
1479	2	3	60	41.43	17.0
1480	2	4	60	99.24	21.0
1481	2	5	60	81.27	19.5
1482	2	6	60	57.30	16.5
1483	2	7	60	75.07	18.0
1484	2	8	60	57.28	17.5
1485	2	9	60	57.55	16.7
1486	2	10	60	44.47	16.4
1487	2	11	60	53.83	16.4
1488	2	12	60	53.63	16.6
1489	2	13	60	38.64	15.5
1490	2	14	60	52.30	16.5
1491	2	15	60	26.88	14.0
1492	2	16	60	30.21	13.7
1493	2	17	60	18.31	11.8
1494	2	18	60	11.01	10.5
1495	2	1	60	69.38	19.0
1496	2	2	60	33.41	14.3
1497	2	3	60	35.41	14.3
1498	2	4	60	48.36	15.5
1499	2	5	60	69.00	18.2
1500	2	6	60	46.27	16.7
1501	2	7	60	34.12	15.0
1502	2	8	60	32.35	14.5
1503	2	9	60	34.91	15.3
1504	2	10	60	32.17	14.7
1505	2	11	60	37.06	15.5
1506	2	12	60	32.47	13.2
1507	2	13	60	27.52	13.5
1508	2	14	60	26.54	13.0
1509	2	15	60	23.09	12.5
1510	2	16	60	30.02	17.0
1511	2	17	60	11.57	10.2
1512	2	18	60	8.38	9.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 28

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1513	3	1	60	60.80	18.2
1514	3	2	60	66.30	17.0
1515	3	3	60	52.76	16.0
1516	3	4	60	48.50	17.4
1517	3	5	60	46.62	15.5
1518	3	6	60	30.23	13.6
1519	3	7	60	41.41	17.0
1520	3	8	60	39.00	14.5
1521	3	9	60	41.27	17.0
1522	3	10	60	30.93	14.0
1523	3	11	60	29.19	14.5
1524	3	12	60	33.11	14.7
1525	3	13	60	30.08	14.6
1526	3	14	60	31.93	14.0
1527	3	15	60	33.47	14.3
1528	3	16	60	27.03	13.5
1529	3	17	60	11.78	9.8
1530	3	18	60	19.55	11.5
1531	3	1	60	35.46	14.5
1532	3	2	60	47.17	16.0
1533	3	3	60	55.38	15.4
1534	3	4	60	60.70	17.6
1535	3	5	60	31.76	14.5
1536	3	6	60	42.16	16.0
1537	3	7	60	23.22	12.5
1538	3	8	60	42.49	15.6
1539	3	9	60	34.14	14.2
1540	3	10	60	47.64	15.2
1541	3	11	60	31.26	13.4
1542	3	12	60	27.71	13.6
1543	3	13	60	12.74	11.0
1544	3	14	60	27.12	13.5
1545	3	15	60	23.18	12.7
1546	3	16	60	24.14	13.3
1547	3	17	60	22.30	13.2
1548	3	18	60	6.09	8.0
1549	3	1	60	46.36	16.5
1550	3	2	60	117.87	17.0
1551	3	3	60	78.48	19.5
1552	3	4	60	34.03	14.8
1553	3	5	60	55.80	17.5
1554	3	6	60	33.55	13.7
1555	3	7	60	57.63	17.0
1556	3	8	60	32.50	14.2
1557	3	9	60	36.91	14.5
1558	3	10	60	33.45	14.0
1559	3	11	60	26.20	13.2
1560	3	12	60	22.57	12.7
1561	3	13	60	19.88	11.5
1562	3	14	60	23.19	11.8
1563	3	15	60	37.28	14.7
1564	3	16	60	6.40	8.2
1565	3	17	60	21.59	12.5
1566	3	18	60	8.62	9.2
1567	3	1	60	106.60	20.8
1568	3	2	60	53.49	16.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:37 Saturday, January 11, 1997 29

OBS	GR	SUBGR	TIME	WEIGHT	LENGTH
1569	3	3	60	73.36	18.0
1570	3	4	60	45.10	16.0
1571	3	5	60	52.68	15.7
1572	3	6	60	42.74	16.3
1573	3	7	60	39.58	15.0
1574	3	8	60	40.33	14.7
1575	3	9	60	37.25	14.2
1576	3	10	60	15.44	11.4
1577	3	11	60	37.38	14.9
1578	3	12	60	35.14	14.7
1579	3	13	60	21.05	11.4
1580	3	14	60	25.62	12.7
1581	3	15	60	15.42	10.5
1582	3	16	60	22.48	12.4
1583	3	17	60	12.79	10.5
1584	3	18	60	8.41	9.0
1585	3	1	60	75.75	18.5
1586	3	2	60	80.20	18.3
1587	3	3	60	101.01	19.7
1588	3	4	60	70.58	18.0
1589	3	5	60	73.84	17.8
1590	3	6	60	56.19	16.3
1591	3	7	60	39.23	15.0
1592	3	8	60	66.98	18.0
1593	3	9	60	51.38	16.0
1594	3	10	60	28.29	13.3
1595	3	11	60	40.01	16.0
1596	3	12	60	54.01	18.0
1597	3	13	60	46.70	15.5
1598	3	14	60	23.54	12.5
1599	3	15	60	37.11	14.5
1600	3	16	60	35.78	17.0
1601	3	17	60	29.31	13.5
1602	3	18	60	23.35	12.2
1603	3	1	60	100.45	20.5
1604	3	2	60	28.39	13.2
1605	3	3	60	12.39	10.5
1606	3	4	60	42.71	12.2
1607	3	5	60	70.74	19.5
1608	3	6	60	113.57	21.5
1609	3	7	60	34.44	14.2
1610	3	8	60	62.20	17.5
1611	3	9	60	95.72	20.5
1612	3	10	60	54.68	16.0
1613	3	11	60	40.00	15.5
1614	3	12	60	54.54	16.8
1615	3	13	60	63.50	18.0
1616	3	14	60	13.85	10.5
1617	3	15	60	18.38	12.0
1618	3	16	60	18.60	12.2
1619	3	17	60	12.55	10.5
1620	3	18	60	9.13	9.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
03:01 Sunday, January 19, 1997 1

--------------------------------------- TIME=0 --------------------------------------

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
GR	3	1 2 3

Number of observations in by group = 324

The SAS System
03:01 Sunday, January 19, 1997 2

--------------------------------------- TIME=0 --------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	6.45364136	3.22682068	1.69	0.1867
Error	321	614.01274630	1.91281229		
Corrected Total	323	620.46638765			

R-Square	C.V.	Root MSE	WEIGHT Mean
0.010401	46.29964	1.38304457	2.98716049

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	6.45364136	3.22682068	1.69	0.1867

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	6.45364136	3.22682068	1.69	0.1867

```
                          The SAS System
                                         03:01 Sunday, January 19, 1997   3

-------------------------------------- TIME=0 --------------------------------------

                  General Linear Models Procedure

           Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

      NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
            experimentwise error rate

                Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 1.912812

                    Number of Means     2     3
                    Critical Range  .3703 .3898

       Means with the same letter are not significantly different.

              Duncan Grouping              Mean      N  GR

                            A            3.1823    108  1
                            A
                            A            2.9258    108  2
                            A
                            A            2.8533    108  3


                          The SAS System
                                         03:01 Sunday, January 19, 1997   4

-------------------------------------- TIME=15 -------------------------------------

                  General Linear Models Procedure
                      Class Level Information

                     Class    Levels    Values

                     GR            3    1 2 3


                Number of observations in by group = 324
```

```
                                   The SAS System
                                                03:01 Sunday, January 19, 1997   5

---------------------------------------- TIME=15 ---------------------------------------

                           General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source                  DF        Sum of Squares      Mean Square    F Value     Pr > F

Model                    2           15.86754136       7.93377068       1.55     0.2136

Error                  321         1641.67182037       5.11424243

Corrected Total        323         1657.53936173

                  R-Square                  C.V.          Root MSE           WEIGHT Mean

                  0.009573              61.75857        2.26146909            3.66179012

Source                  DF             Type I SS      Mean Square    F Value     Pr > F

GR                       2           15.86754136       7.93377068       1.55     0.2136

Source                  DF           Type III SS      Mean Square    F Value     Pr > F

GR                       2           15.86754136       7.93377068       1.55     0.2136


                                   The SAS System
                                                03:01 Sunday, January 19, 1997   6

---------------------------------------- TIME=15 ---------------------------------------

                           General Linear Models Procedure

                   Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

                NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
                      experimentwise error rate

                        Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 5.114242

                          Number of Means     2     3
                          Critical Range  .6055 .6374

                  Means with the same letter are not significantly different.

                     Duncan Grouping             Mean      N  GR

                                 A             3.9719    108  3
                                 A
                                 A             3.5430    108  2
                                 A
                                 A             3.4705    108  1
```

```
                                   The SAS System
                                                03:01 Sunday, January 19, 1997   7

--------------------------------------- TIME=30 --------------------------------------

                              General Linear Models Procedure
                                  Class Level Information

                                 Class     Levels    Values

                                 GR             3    1 2 3


                          Number of observations in by group = 324


                                   The SAS System
                                                03:01 Sunday, January 19, 1997   8

-------------------------------------- TIME=30 ---------------------------------------

                              General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source                  DF         Sum of Squares      Mean Square   F Value     Pr > F

Model                    2            30.59951173      15.29975586      0.51     0.6017

Error                  321          9653.43194352      30.07299671

Corrected Total        323          9684.03145525

                  R-Square                   C.V.         Root MSE          WEIGHT Mean

                  0.003160               65.73626       5.48388518           8.34225309


Source                  DF            Type I SS      Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2          30.59951173      15.29975586      0.51     0.6017

Source                  DF          Type III SS      Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2          30.59951173      15.29975586      0.51     0.6017
```

```
                        The SAS System
                               03:01 Sunday, January 19, 1997   9

---------------------------------------- TIME=30 -------------------------------------

                   General Linear Models Procedure

           Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

      NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
            experimentwise error rate

                  Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 30.073

                     Number of Means     2     3
                     Critical Range  1.468 1.546

        Means with the same letter are not significantly different.

              Duncan Grouping             Mean      N  GR

                           A            8.6053    108  2
                           A
                           A            8.5104    108  1
                           A
                           A            7.9111    108  3


                        The SAS System
                               03:01 Sunday, January 19, 1997  10

---------------------------------------- TIME=45 -------------------------------------

                   General Linear Models Procedure
                       Class Level Information

                     Class    Levels    Values

                     GR            3    1 2 3

               Number of observations in by group = 324
```

-------------------------------------- TIME=45 -----------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	1196.33006728	598.16503364	3.15	0.0442
Error	321	60953.28614352	189.88562662		
Corrected Total	323	62149.61621080			

R-Square	C.V.	Root MSE	WEIGHT Mean
0.019249	63.63226	13.77989937	21.65552469

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	1196.3300672	598.16503364	3.15	0.0442

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	1196.33006728	598.16503364	3.15	0.0442

-------------------------------------- TIME=45 -----------------------------------

General Linear Models Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 321 MSE= 189.8856

Number of Means	2	3
Critical Range	3.689	3.884

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	GR
A	24.369	108	1
B	20.419	108	2
B			
B	20.178	108	3

The SAS System
03:01 Sunday, January 19, 1997 13

------------------------------------- TIME=60 -------------------------------------

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
GR	3	1 2 3

Number of observations in by group = 324

The SAS System
03:01 Sunday, January 19, 1997 14

------------------------------------- TIME=60 -------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: WEIGHT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	244.00681667	122.00340833	0.22	0.8014
Error	321	176763.65908056	550.66560461		
Corrected Total	323	177007.66589722			

R-Square	C.V.	Root MSE	WEIGHT Mean
0.001379	55.61593	23.46626525	42.19342593

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	244.006816	122.00340833	0.22	0.8014

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	244.00681667	122.00340833	0.22	0.8014

```
------------------------------------- TIME=60 ------------------------------------

                    General Linear Models Procedure

          Duncan's Multiple Range Test for variable: WEIGHT

  NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
          experimentwise error rate

                Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 550.6656

                    Number of Means     2     3
                    Critical Range  6.283 6.614

      Means with the same letter are not significantly different.

              Duncan Grouping             Mean      N  GR

                            A           42.901    108  1
                            A
                            A           42.708    108  2
                            A
                            A           40.971    108  3
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
                          The SAS System
                                   03:05 Sunday, January 19, 1997   2

------------------------------------- TIME=0 -------------------------------------

                         General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source                  DF        Sum of Squares     Mean Square   F Value     Pr > F

Model                    2            0.85851852      0.42925926      0.47     0.6236

Error                  321          291.35120370      0.90763615

Corrected Total        323          292.20972222

                  R-Square                  C.V.          Root MSE          LENGTH Mean

                  0.002938              15.57783        0.95269940           6.11574074


Source                  DF             Type I SS     Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2            0.85851852      0.42925926      0.47     0.6236

Source                  DF           Type III SS     Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2            0.85851852      0.42925926      0.47     0.6236


                          The SAS System
                                   03:05 Sunday, January 19, 1997   3

------------------------------------- TIME=0 -------------------------------------

                         General Linear Models Procedure

                  Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

          NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
                experimentwise error rate

                       Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 0.907636

                         Number of Means     2     3
                         Critical Range  .2551 .2685

           Means with the same letter are not significantly different.

                  Duncan Grouping              Mean      N  GR

                                A            6.1806    108  2
                                A
                                A            6.1120    108  1
                                A
                                A            6.0546    108  3
```

```
                          The SAS System
                                     03:05 Sunday, January 19, 1997   4

--------------------------------------- TIME=15 --------------------------------------

                     General Linear Models Procedure
                         Class Level Information

                        Class    Levels    Values

                        GR            3    1 2 3

               Number of observations in by group = 324


                          The SAS System
                                     03:05 Sunday, January 19, 1997   5

--------------------------------------- TIME=15 --------------------------------------

                     General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source                  DF        Sum of Squares     Mean Square   F Value     Pr > F

Model                    2            2.04388889      1.02194444      0.62     0.5363

Error                  321          525.51833333      1.63712876

Corrected Total        323          527.56222222

                  R-Square                  C.V.        Root MSE          LENGTH Mean

                  0.003874              19.17125      1.27950333           6.67407407


Source                  DF           Type I SS     Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2          2.04388889      1.02194444      0.62     0.5363

Source                  DF          Type II         Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2            2.04388889    1.02194444      0.62     0.5363
```

```
                              The SAS System
                                      03:05 Sunday, January 19, 1997   6

-------------------------------------- TIME=15 ---------------------------------------

                     General Linear Models Procedure

            Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

       NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
               experimentwise error rate

                  Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 1.637129

                      Number of Means     2     3
                      Critical Range  .3426 .3606

         Means with the same letter are not significantly different.

               Duncan Grouping              Mean      N  GR

                             A            6.7370    108  3
                             A
                             A            6.7231    108  1
                             A
                             A            6.5620    108  2


                              The SAS System
                                      03:05 Sunday, January 19, 1997   7

--------------------------------------- TIME=30 --------------------------------------

                     General Linear Models Procedure
                         Class Level Information

                       Class    Levels    Values

                       GR            3    1 2 3


                 Number of observations in by group = 324
```

The SAS System
03:05 Sunday, January 19, 1997 8

------------------------------------- TIME=30 ------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.63432099	0.31716049	0.10	0.9014
Error	321	980.47342593	3.05443435		
Corrected Total	323	981.10774691			

R-Square	C.V.	Root MSE	LENGTH Mean
0.000647	20.53352	1.74769401	8.51141975

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	0.63432099	0.31716049	0.10	0.9014

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	0.63432099	0.31716049	0.10	0.9014

The SAS System
03:05 Sunday, January 19, 1997 9

------------------------------------- TIME=30 ------------------------------------

General Linear Models Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 321 MSE= 3.054434

Number of Means	2	3
Critical Range	.4679	.4926

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	GR
A	8.5713	108	1
A			
A	8.4972	108	3
A			
A	8.4657	108	2

The SAS System
03:05 Sunday, January 19, 1997 10

------------------------------------- TIME=45 --------------------------------------

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
GR	3	1 2 3

Number of observations in by group = 324

The SAS System
03:05 Sunday, January 19, 1997 11

------------------------------------- TIME=45 --------------------------------------

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	89.21154321	44.60577160	6.77	0.0013
Error	321	2115.92212963	6.59165772		
Corrected Total	323	2205.13367284			

R-Square	C.V.	Root MSE	LENGTH Mean
0.040456	21.83721	2.56742239	11.75709877

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	89.21154321	44.60577160	6.77	0.0013

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
GR	2	89.21154321	44.60577160	6.77	0.0013

```
                          The SAS System
                                 03:05 Sunday, January 19, 1997  12

------------------------------------- TIME=45 --------------------------------------

                    General Linear Models Procedure

            Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

     NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
             experimentwise error rate

                Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 6.591658

                    Number of Means     2     3
                    Critical Range  .6874 .7236

       Means with the same letter are not significantly different.

              Duncan Grouping              Mean      N  GR

                            A           12.4778    108  1

                            B           11.5500    108  2
                            B
                            B           11.2435    108  3


                          The SAS System
                                 03:05 Sunday, January 19, 1997  13

-------------------------------------- TIME=60 -------------------------------------

                    General Linear Models Procedure
                        Class Level Information

                     Class    Levels    Values

                     GR            3    1 2 3


               Number of observations in by group = 324
```

```
                                The SAS System
                                            03:05 Sunday, January 19, 1997  14

------------------------------------- TIME=60 --------------------------------------

                         General Linear Models Procedure

Dependent Variable: LENGTH

Source                  DF          Sum of Squares     Mean Square   F Value     Pr > F

Model                    2            24.12960741      12.06480370      1.51     0.2230

Error                  321          2568.69824815       8.00217523

Corrected Total        323          2592.82785556

                  R-Square                  C.V.          Root MSE          LENGTH Mean

                  0.009306              18.78523        2.82881163          15.05870370


Source                  DF               Type I SS     Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2             24.12960741     12.06480370      1.51     0.2230

Source                  DF             Type III SS     Mean Square   F Value     Pr > F

GR                       2             24.12960741     12.06480370      1.51     0.2230


                                The SAS System
                                            03:05 Sunday, January 19, 1997  15

------------------------------------ TIME=60 ---------------------------------------

                         General Linear Models Procedure

                   Duncan's Multiple Range Test for variable: LENGTH

                NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the
                        experimentwise error rate

                      Alpha= 0.05  df= 321  MSE= 8.002175

                          Number of Means    2     3
                          Critical Range  .7574 .7973

                  Means with the same letter are not significantly different.

                     Duncan Grouping            Mean      N  GR

                                 A            15.2928    108  1
                                 A
                                 A            15.2074    108  2
                                 A
                                 A            14.6759    108  3
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. จำนวนปลาที่รอดชีวิตหลังเลี้ยงในกระชังครบ 60 วัน

```
                          The SAS System
                                  23:57 Saturday, January 11, 1997   1

                             OBS    A    DATA

                               1    1     38
                               2    1     39
                               3    1     42
                               4    1     28
                               5    1     31
                               6    1     33
                               7    2     28
                               8    2     37
                               9    2     39
                              10    2     29
                              11    2     25
                              12    2     41
                              13    3     36
                              14    3     40
                              15    3     35
                              16    3     30
                              17    3     22
                              18    3     21
```

```
                          The SAS System
                                  23:57 Saturday, January 11, 1997   2

                   General Linear Models Procedure
                       Class Level Information

                      Class    Levels    Values

                      A             3    1 2 3

               Number of observations in data set = 18
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The SAS System
23:57 Saturday, January 11, 1997 3

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DATA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	61.00000000	30.50000000	0.69	0.5188
Error	15	667.00000000	44.46666667		
Corrected Total	17	728.00000000			

R-Square	C.V.	Root MSE	DATA Mean
0.083791	20.20707	6.66833313	33.00000000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	61.00000000	30.50000000	0.69	0.5188

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	61.00000000	30.50000000	0.69	0.5188

The SAS System
23:57 Saturday, January 11, 1997 4

General Linear Models Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: DATA

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 15 MSE= 44.46667

Number of Means	2	3
Critical Range	8.206	8.602

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	A
A	35.167	6	1
A			
A	33.167	6	2
A			
A	30.667	6	3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ทศพร เรืองรักษ์ลิขิต เกิดเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม 2524 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2541-2544 ศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ และในปีการศึกษา 2545 ได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ผลงานทางวิชาการ</u>

ปี 2547 นำเสนอผลงานในงานการประชุมวิชาการประจำปี พ.ศ. 2547 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 เรื่อง นวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ : หนึ่งทางเลือกเพื่อยกระดับสู่ครัวของโลก ในหัวข้อ “แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer*”

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย