วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 25 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2563
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 25 (No.3) September – December 2020 บทความวิจัย

ผลของความถี่ของการให้อาหารผสมโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของปลานิล

Effects of the Frequency of Probiotic Dietary Supplementation on Growth and Immunity of Nile Tilapia

วาสนา กองสมบัติ, นันทพงศ์ คำรังษี และ ชนกันต์ จิตมนัส*

Wassana Kongsombat, Nanthapong Khamrangsri and Chanagun Chitmanat*

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

Received : 17 August 2019

Revised : 31 October 2019

Accepted : 3 February 2020

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของความถี่ของการให้อาหารผสมโปรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus subtillis* (G biotic) ต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยเปรียบเทียบจำนวนวันที่ให้อาหารและจำนวนวันที่ผสมโปรไบโอติก แบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารทุกวันแต่ไม่ผสมจุลินทรีย์ ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหาร 5 วัน/สัปดาห์ และไม่ผสมจุลินทรีย์ ชุดการทดลองที่ 3 ผสมจุลินทรีย์ G biotic 10 มล/อาหาร 1 กก. ให้อาหารทุกวัน ชุดการทดลองที่ 4 ผสมจุลินทรีย์ G biotic 10 มล/อาหาร 1 กก. ให้อาหาร 5 วัน/สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 5 ผสมจุลินทรีย์ G biotic 10 มล/อาหาร 1 กก. ให้อาหารทุกวันแต่ผสม G biotic สัปดาห์เว้นสัปดาห์ แต่ละกลุ่มมีจำนวน 2 ซ้ำ ใช้ลูกปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 20 กรัม กระชังละ 30 ตัว ใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารทุกวัน แต่ผสมโปรไบโอติกสัปดาห์เว้นสัปดาห์ มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุด 84.69±0.59 กรัม ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์มีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของปลานิล แต่อาจจะไม่จำเป็นต้องให้ทุกวัน ส่วนอัตรารอดตาย ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 คือ ร้อยละ 93.34±4.72 และ 93.64±9.43 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 3, 4 และ 5 เท่ากับ ร้อยละ 100±0.00 ตามลำดับแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) การตรวจวัดระบบภูมิคุ้มกันด้วยกิจกรรมไลโซไซม์ตลอดการเลี้ยง 1 เดือน และ 2 เดือน พบว่า ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารทุกวัน แต่ผสมโปรไบโอติกสัปดาห์เว้นสัปดาห์มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารทุกวัน แต่ผสมโปรไบโอติกสัปดาห์เว้นสัปดาห์มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การตรวจวัดระบบภูมิคุ้มกันด้วยการจับกินสิ่งแปลกปลอม ตลอดการเลี้ยง 1 เดือน และ 2 เดือน และหลังทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารทุกวันแต่ผสมโปรไบโอติกสัปดาห์เว้นสัปดาห์มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สรุปได้ว่า จุลินทรีย์โปรไบโอติกช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

คำสำคัญ : โปรไบโอติก ; ปลานิล ; การเจริญเติบโต ; ภูมิคุ้มกัน

***Corresponding author. E-mail** : chanagun1@hotmail.com

Abstract

The effects of the frequency of using *Bacillus subtillis* probiotics (G biotic) dietary supplementation on growth and immunity of Nile Tilapia were investigated by comparing the number of feeding days and the number of probiotic application. There were 5 treatments with 2 replication each. It consisted of treatment 1, control group, feeding daily without probiotic supplement; treatment 2, feeding 5 days/week without probiotic supplement; treatment 3, feeding daily with 10 ml G biotic / 1 kg of feed; treatment 4, feeding 5 days/week with 10 ml G biotic / 1 kg of feed; treatment 5, feeding daily but adding 10 ml G biotic / 1 kg of feed every other week. Fish with an initial weight approximately 20 g were randomly allocated into cages; 30 fish/cage. The experiment period was 60 days. The results showed fish in treatment 5, fed commercial feed daily but applying the probiotic every other week had the highest increased weight, 84.69±0.59 g/fish ($P<0.05$). This study showed that feeding tilapia with probiotic supplementary feed was able to improve growth performance; however, there is no need to apply daily. The fish survival rates in treatments 1 and 2 were 93.34±4.72 and 93.34±9.43 % while treatments 3, 4 and 5 were 100±0.00%, respectively but there was no significant difference ($P>0.05$). Lysozyme activity of fish in treatment 5, 1 month and 2 month after experiment began, was significantly highest ($P<0.05$). In addition, 15 days after *Streptococcus agalactiae* challenge, lysozyme activity of fish in treatment 5 was significantly highest ($P<0.05$). Phagocytosis of fish in treatment 5 before and 15 days after *S. agalactiae* challenge was significantly highest ($P<0.05$). In conclusion, probiotic *B. subtillis* can be applied in tilapia feed to enhance growth and non-specific immunity.

Keywords : probiotics ; Nile Tilapia ; growth performance ; immunity

บทนำ

ธุรกิจการเลี้ยงปลานิลมีส่วนทำให้เกิดความมั่นคงทางอาหารและสร้างงานสร้างอาชีพ ปริมาณการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ของไทยในช่วง 9 เดือนแรก ปี 2562 ปริมาณ 7,603.1 ตัน คิดเป็นมูลค่า 275.1 ล้านบาท ทั้งปริมาณและมูลค่าลดลง 8.9% และ 8.2% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันปีที่ผ่านมา (Fisheries Economics, 2017) อันเนื่องมาจากปัญหาสภาพอากาศไม่เหมาะสม การขาดแคลนน้ำและน้ำท่วม รวมทั้งค่าเงินบาทมีแนวโน้มแข็งค่าขึ้นเมื่อเทียบกับประเทศคู่แข่ง ทำให้ต้นทุนสูงจนไม่สามารถแข่งขันหรือดำเนินธุรกิจต่อไปได้ ในขณะที่ผลผลิตปลานิลยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด ดังนั้นเกษตรกรจึงเร่งเพิ่มกำลังการผลิตต่อหน่วยพื้นที่ โดยการปล่อยปลาในอัตราที่หนาแน่นมาก หากฟาร์มใดขาดการเตรียมบ่อที่เหมาะสม ไม่มีการจัดการที่ดี จะเป็นผลให้สิ่งแวดล้อมในบ่อเสื่อมโทรม ทำให้ปลาเกิดความเครียดเป็นสาเหตุให้เกิดโรคได้ง่าย ปัญหาโรคปลาหลายชนิดมีสาเหตุมาจากการเลี้ยงปลาที่หนาแน่นเกินไป การให้อาหารไม่เหมาะสม (Georgiadis *et al*., 2001) การจัดการน้ำไม่ดี ซึ่งจะเกิดความเสียหายของปลาสูง เกษตรกรรายใหม่เข้ามาสู่วงการอย่างต่อเนื่องในขณะที่รายที่ไม่ประสบผลสำเร็จเกิดหนี้สินต้องออกจากธุรกิจไป

การเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคระบาดสัตว์น้ำ (Wang *et al*., 2016) เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็นจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ โดยเฉพาะในสภาพที่มีความแปรปรวนของสภาพอากาศ การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยให้ปลานิลมีความแข็งแรง ทนต่อสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงและโรคติดเชื้อ การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเป็นทางเลือกในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการป้องกันโรคปลานิล ซึ่งมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภคสัตว์น้ำ โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถมีชีวิตรอด เพิ่มจำนวนและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร หากมีการใช้ในปริมาณที่เหมาะสม จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตโดยการผลิตวิตามินและเอนไซม์ช่วยย่อยอาหารและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรค เพิ่มอัตรารอด มีงานวิจัยโปรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวนมาก (Suwan & Chitmanat, 2017) โดยมีการนำจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus subtilis* มาใช้มากที่สุด แต่การนำมาทดลองในฟาร์มยังมีน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาระยะเวลาที่ใช้และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการทำงานของจุลินทรีย์โปรไบโอติกเพิ่มเติม นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกผสมอาหารให้ปลานิลจะช่วยลดความเครียดของการเลี้ยงในความหนาแน่นสูง (Hai, 2015) Widanarni & Tanbiyaskur (2015) รายงานว่า จุลินทรีย์ *Bacillus* ช่วยป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิด Streptococcosis งานวิจัยนี้ต้องการสร้างทางเลือกให้กับเกษตรกร โดยการทดลองใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อลดการใช้ยาและสารเคมี ลดการใช้น้ำในการเปลี่ยนถ่าย ซึ่งเป็นการลดการใช้พลังงานไปด้วย ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ G Biotic (บริษัท กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด) ซึ่งมีจุลินทรีย์หลัก คือ *B. subtilis* มีการใช้งานในฟาร์มกุ้งทะเลอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่นำมาใช้ในฟาร์มปลานิล ทางบริษัทฯ จึงต้องการนำผลิตภัณฑ์มาทดลองใช้เพิ่มเติมในฟาร์มปลานิล เพื่อให้ปลาแข็งแรง โตเร็วและทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ

วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาผลของความถี่ของการให้อาหารผสมโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของปลานิล

1. <u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

งานทดลองนี้ศึกษาในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรในเขตอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยกางกระชังขนาด 3×3×1 ตารางเมตร ในบ่อดิน โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจำนวน 2 ซ้ำ ใช้ลูกปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 20 กรัม กระชังละ 30 ตัว รวม 300 ตัว

2. <u>การเตรียมอาหารผสมจุลินทรีย์ G biotic</u>

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลานิลที่เกษตรกรนิยมใช้ ผสมกับจุลินทรีย์ G biotic (บริษัท กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด) ในอัตราส่วน 10 มล/อาหาร 1 กก. คลุกให้เข้ากันดี และทำให้อาหารแห้งโดยการผึ่งลมให้แห้งสนิท ประมาณ 1-2 ชั่วโมง กระจายไม่ให้อาหารติดกันเป็นก้อน และทำการเก็บใส่ภาชนะที่สะอาดและนำเก็บไว้ในที่ร่มจนกว่าจะนำไปใช้ เตรียมอาหารใหม่ทุก 1 สัปดาห์ ให้อาหาร 3% ต่อน้ำหนักตัว 2 เวลา เช้า – เย็น การผสมจุลินทรีย์ G biotic โดยแต่ละการทดลองจะแตกต่างกันที่จำนวนวันที่ให้อาหารและจำนวนวันที่ผสมโปรไบโอติก แบ่งชุดการทดลองออกเป็น ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมไม่ผสมจุลินทรีย์ ให้อาหารทุกวันตลอดการเลี้ยง

ชุดการทดลองที่ 2 ชุดควบคุมไม่ผสมจุลินทรีย์ ให้อาหาร 5 วัน/สัปดาห์ตลอดการเลี้ยง

ชุดการทดลองที่ 3 ผสมจุลินทรีย์ G biotic 10 มล/อาหาร 1 กก. ให้อาหารทุกวันตลอดการเลี้ยง

ชุดการทดลองที่ 4 ผสมจุลินทรีย์ G biotic 10 มล/อาหาร 1 กก. ให้อาหาร 5 วัน/สัปดาห์ตลอดการเลี้ยง

ชุดการทดลองที่ 5 ผสมจุลินทรีย์ G biotic 10 มล/อาหาร 1 กก. ให้อาหารทุกวันแต่ผสม G biotic สัปดาห์เว้นสัปดาห์

3. <u>การเก็บข้อมูลการทดลอง</u>

1. เก็บข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลาทดลองทุก 2 สัปดาห์ ตลอดการเลี้ยง

2. วิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน เพื่อนำมาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอด ตามวิธีของ Brown (1957) คือ

1) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily growth rate, ADG) (กรัม/วัน)

$$ADG = \frac{\text{น้ำหนักปลาปัจจุบันที่สุ่มได้ (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาที่สุ่มได้ครั้งก่อน (กรัม)}}{\text{ระยะห่างของวันสุ่ม}}$$

2) อัตราแลกเนื้อ (Feed conversion ratio: FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมด (กิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่จับได้ทั้งหมด (กิโลกรัม)}}$$

3) อัตรารอด (Survival rate) %

$$\text{อัตรารอด} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ} \times 100}{\text{จำนวนปลาที่ปล่อย}}$$

4) น้ำหนักปลาเฉลี่ย (กรัม)

$$\text{น้ำหนักปลาเฉลี่ย} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่สุ่มได้ทั้งหมด (กรัม)}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}}$$

5) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain; กรัมต่อตัว)

$$WG = \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุด} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นทดลอง}$$

4. <u>การตรวจสอบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ</u>

สุ่มเก็บเลือดปลาเดือนละครั้ง เพื่อตรวจวัดไลโซไซม์ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Parry *et al.* (1965) โดยใช้ซีรั่มปลาจำนวน 25 µL ใส่ลงในสารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) 175 µL (0.3 mg mL^{-1} ใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 5.8) วัดการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น OD_{540nm} ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง micro-plate reader

ตรวจวัดการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis activity) ด้วยวิธีการของ Yoshida & Kitao (1991) โดยการใช้เม็ดเลือดขาว 200 µL (2 x 10^6 cells mL^{-1}) หยดลงบนกระจกปิดสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดด้วย RPMI 1640 จากนั้นเติมเม็ด latex beads (Sigma) 2 x 10^7 of beads mL^{-1} จำนวน 200 µL ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จึงล้างออก แล้วตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล ย้อมสีด้วย Diff-Quick staining dye (Sigma) 10 วินาที ล้างออกด้วย PBS (pH 7.4) ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วสุ่มนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 300 เซลล์ คำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอม

ทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือด (Respiratory burst) ทดสอบตามวิธีการของ Secomebs (1990) โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว 175 µL (6 x 10^6 cells mL^{-1}) ใน PBS เติมลงในถาดหลุม 96-well microtiter เติม nitro blue tetrazolium (NBT) 25 µL (1 mg/mL) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งสารละลายส่วนใสด้านบน ล้างด้วยเมธานอล 125 µL เทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วล้างด้วยเมธานอล 70% หลุมละ 125 µL จำนวนสองครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติม 2N KOH จำนวน 125 µL และ DMSO 150 µL จากนั้นไปวัด OD_{655nm}

5. <u>การทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย Streptococcus agalactiae</u>

ตรวจสอบความต้านทานโรคของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกแต่ละความเข้มข้นตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Aly *et al.* (2008) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลานิล จำนวน 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง นำมาทดสอบความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1x10^8 CFU/ml เข้าไปในช่องท้องของปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง ฉีดความเข้มข้นตัวละ 0.2 มิลลิลิตร เลี้ยงปลาทดลองไว้ เป็นระยะเวลา 15 วัน สังเกตอาการและบันทึกการทดลองหาค่าอัตราการรอดตาย ตรวจหาค่ากิจกรรมไลโซไซม์ ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว และค่า Phagocytosis ของปลานิลโดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium) ทุก ๆ 5 วัน ตลอดระยะเวลา 15 วัน

6. <u>การวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล</u>

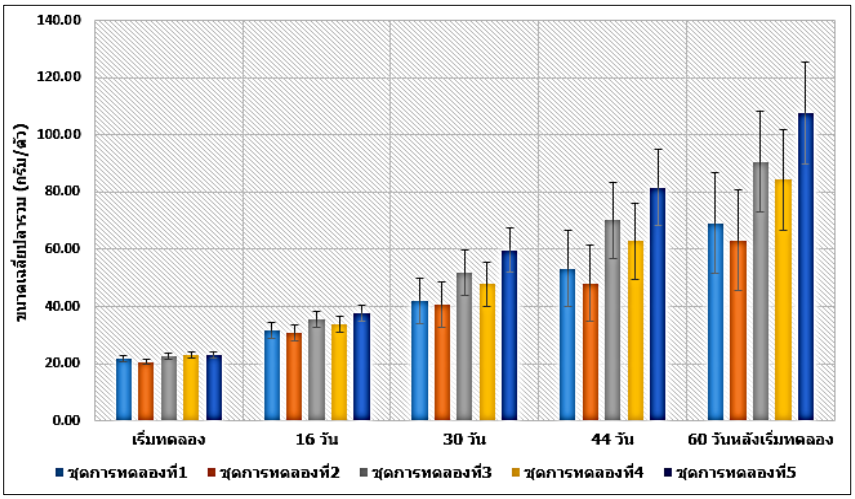
วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way analysis of variance, ANOVA) ทางด้านการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ค่าน้ำหนักสุดท้าย การเจริญเติบโต อัตรารอด และอัตราแลกเนื้อ รวมไปถึงข้อมูลทางด้านค่าภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว และค่า Phagocytosis ของปลานิลโดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium) เพื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test, DMRT ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 15.0

ผลการวิจัย

ผลของความถี่ของการให้อาหารผสมโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของปลานิล เป็นดังนี้

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต

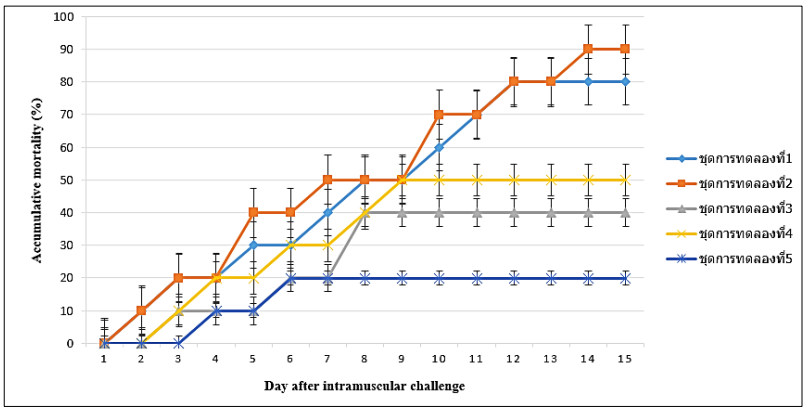
จากการทดลองเลี้ยงปลานิล 60 วัน โดยให้อาหารเสริมโปรไบโอติก 10 มล./ อาหาร 1 กก. พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวันและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลสูงกว่าชุดที่ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 1 & ตารางที่ 1) ปลาที่ได้รับอาหารทุกวันจะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาที่ให้อาหาร 5 วันต่อสัปดาห์



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตาย

จากการทดลองเลี้ยงปลานิลโดยให้อาหารเสริมโปรไบโอติก 10 มล./ อาหาร 1 กก. 60 วัน พบว่า อัตราการแลกเนื้อและอัตราการรอดตายของปลานิลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 1) อัตราการรอดตาย post challenge 5, 10, 15 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 2) อาการที่พบหลังการฉีดเชื้อ คือ ปลามีลักษณะตาขาวขุ่นโปน ครีบกร่อน บริเวณครีบและท้องมีการตกเลือด ท้องบวมน้ำ



ภาพที่ 2 % Accumulative mortality ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังจากฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* เป็นตลอดระยะเวลา 15 วัน

ผลของโปรไบโอติกต่อค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

หลังจากทดลอง 1 เดือน และ 2 เดือน ปลาในชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 3) และ ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว post challenge 5, 10, 15 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4)

ผลของโปรไบโอติกต่อ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium)

หลังจากทดลอง 1 เดือน และ 2 เดือน ปลาในชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่า NBT (Nitroblue Tetrazolium) สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 5) และ ผลของโปรไบโอติกต่อ Phagocytosis โดยวิธีการ NBT (Nitroblue Tetrazolium) (post challenge 5, 10, 15 วัน) พบว่า ชุดการทดลองที่ 5 มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 6)

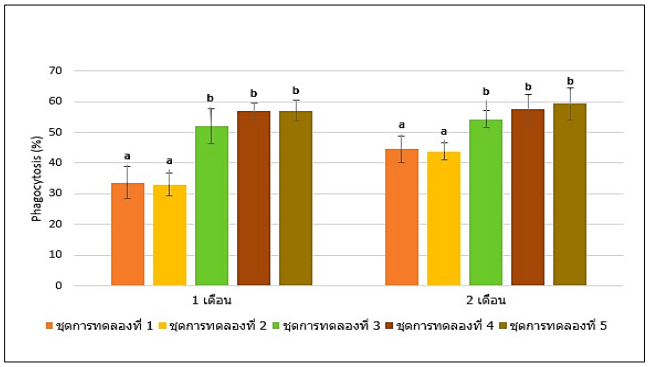
ผลของการทดสอบ Lysozyme activity

การศึกษาผลของ Lysozyme activity พบว่า ที่อายุปลา 1 เดือน และ 2 เดือน ในชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 7) และผลของ Lysozyme activity (post challenge 5, 10, 15 วัน) พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 8)

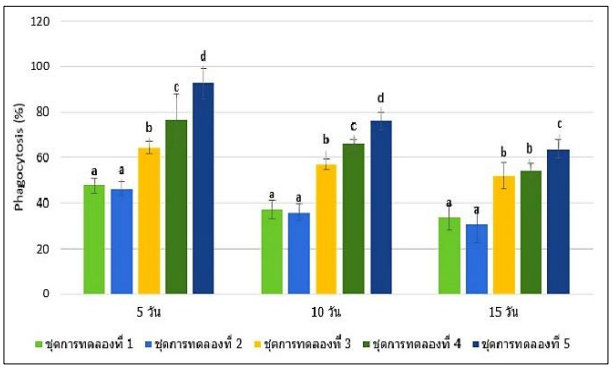
ตารางที่ 1 ผลของการเจริญเติบโตของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังทดลองนาน 60 วัน

การเจริญเติบโต	ชุดการทดลอง				
	ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารตลอดการเลี้ยง	**ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหาร 5 วัน/สัปดาห์**	**ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารผสม G-biotic ตลอดการเลี้ยง**	**ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารผสม G-biotic 5 วัน/สัปดาห์**	**ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารตลอดการเลี้ยงแต่ผสม G biotic สัปดาห์เว้นสัปดาห์**
น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	22.30±1.13[a]	20.67±0.00[a]	22.62±0.30[a]	22.95±1.48[a]	22.95±1.48[a]
น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)	72.25±0.35[a]	63.17±0.00[b]	90.58±0.35[c]	84.30±0.21[d]	107.64±0.90[e]
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	49.95±1.48[a]	42.50±0.00[b]	67.97±0.66[c]	61.35±1.27[d]	84.69±0.59[e]
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(กรัม/วัน)	0.29±0.00[a]	0.27±0.00[a]	0.37±0.01[b]	0.39±0.02[b]	0.47±0.01[c]
อัตราการแลกเนื้อ (FCR)	1.64±0.06[a]	1.62±0.15[a]	1.47±0.18[a]	1.53±0.05[a]	1.39±0.26[a]
อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	93.34±4.72[a]	93.34±9.43[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]

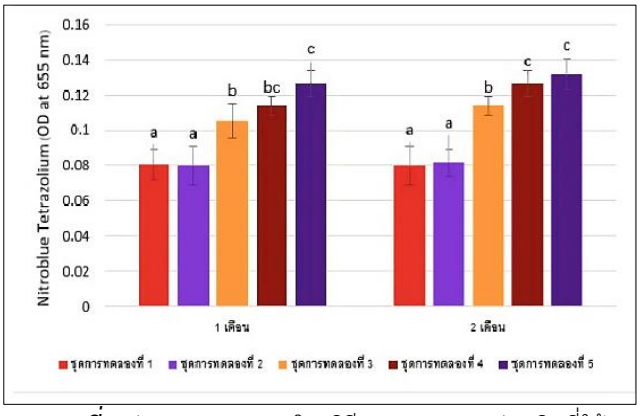
***หมายเหตุ** ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)



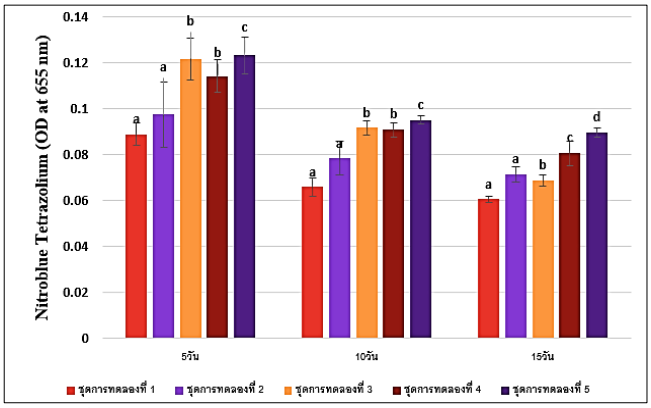
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังการทดลองเลี้ยง 1 เดือน และ 2 เดือน ค่าเฉลี่ย±SD ตามด้วยตัวอักษร (a,b) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



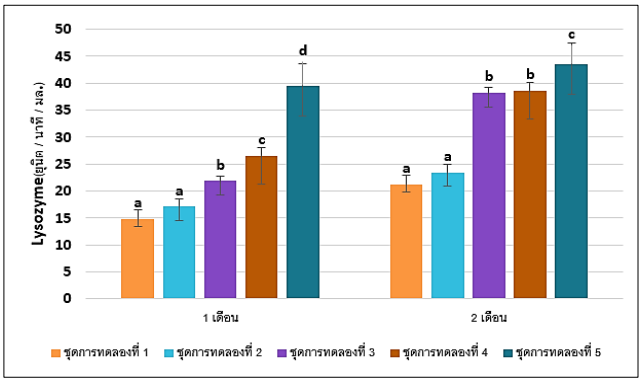
ภาพที่ 4 เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังจากฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน (post challenge 5, 10, 15 วัน) ค่าเฉลี่ย±SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



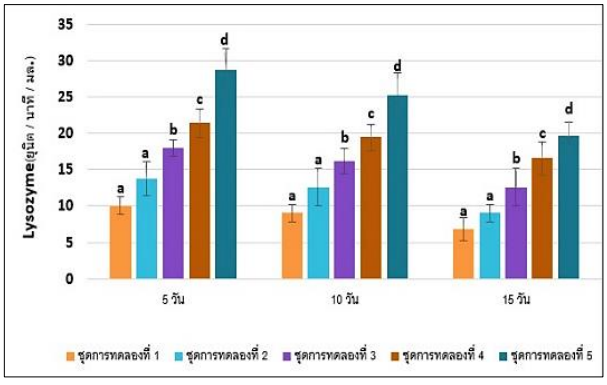
ภาพที่ 5 ค่า Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังการทดลองเลี้ยง 1 เดือน และ 2 เดือน ค่าเฉลี่ย±SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 6 ค่า Phagocytosis โดยวิธีการ NBT ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังจากฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน (post challenge 5, 10, 15 วัน) ค่าเฉลี่ย±SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c, d) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 7 ค่า Lysozyme ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังการทดลองเลี้ยง 1 เดือน และ 2 เดือน ค่าเฉลี่ย±SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c, d) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 8 ค่า Lysozyme ของปลานิลที่ให้อาหารปริมาณต่างกันและโปรไบโอติกต่างกัน หลังจากฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน (post challenge 5, 10, 15 วัน) ค่าเฉลี่ย±SD ตามด้วยตัวอักษร (a, b, c, d) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์ผลการวิจัย

การให้อาหารเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะจะช่วยเสริมภูมิคุ้มกันโรค และลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรีย จากงานวิจัยพบว่า จุลินทรีย์โปรไบโอติกกลุ่ม *B. subtilis* ช่วยเสริมภูมิกันโรคในปลาเทร้าต์ ปลายี่สกเทศ ปลาหมอไทย ปลานิลและกุ้งขาวแวนนาไม (Kuebutornye *et al*., 2019; Mukherjee *et al*., 2019; Wang *et al*., 2019; Rodmongkoldee *et al*., 2017)

ในการศึกษาครั้งนี้ การให้ปลานิลกินอาหารผสมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. (1 มล. มี *B. subtilis* ประมาณ 10^6 CFU) สัปดาห์เว้นสัปดาห์ พบว่า ปลานิลมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodmongkoldee *et al.* (2017) ที่พบว่า ผลของโปรไบโอติกทำให้ปลาหมอมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาหมอที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Senasri (2015) ที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารต่อการเลี้ยงปลานิลในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0, 1, 3 และ 5 กรัม พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยและอัตราการเจริญเติบโต ของปลานิลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าไม่จำเป็นต้องให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน เนื่องจากโปรไบโอติกอาจจะมีชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้ระยะหนึ่ง นอกจากนี้โปรไบโอติกอาจจะช่วยการกินอาหารของปลานิล ส่งผลให้ปลาเจริญเติบโตได้ดีขึ้น หรืออาจจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารของปลาได้ดีขึ้น Essa *et al*. (2010) รายงานว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารผสม *B. subtilis* และ/หรือ *Lactobacillus rhamnosus* มีการทำงานของเอนไซม์อไมเลส โปรติเอส และไลเปสดีขึ้น Promnuan & Kiriratnikom (2018) รายงานว่า ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* 10^5 CFU/กิโลกรัม มากกว่าชุดควบคุมสูงถึงร้อยละ 16 ซึ่งทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อน้อยกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) Rodmongkoldee *et al.* (2017) ศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของปลาหมอ โดยใช้โปรไบโอติกผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปในอัตราส่วนแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาหมอที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1.5 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1.63 ± 0.04 ซึ่งต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตรารอดตายในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) อัตรารอดตายของปลานิลที่สูงขึ้น อาจเนื่องมาจากโปรไบโอติกมีความสามารถในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทานต่อโรค โดยการไปแก่งแย่งพื้นที่เกาะในทางเดินอาหารหรือมีการผลิตสารต้านเชื้อก่อโรค

ภูมิคุ้มกันโรคแบบไม่จำเพาะกลุ่มสารน้ำที่สามารถพบได้จากซีรั่มและเมือกปลา ได้แก่ ไลโซไซม์ (Lysozyme), คะตะเลส (catalase) โปรติเอส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเชื้อโรค ไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส มีความสามารถทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Magnadóttir, 2006) การให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีผลต่อค่าไลโซไซม์แตกต่างกันตามระยะเวลา พบว่า ค่าไลโซไซม์ของปลานิลมีแนวโน้มสูงขึ้นหลังได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1 – 2 เดือน อย่างไรก็ตามเมื่อมีการทดสอบให้สัมผัสเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ค่าไลโซไซม์จะลดลงในช่วง 5 วันแรกและจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 10 เป็นต้นไป แสดงว่า ภูมิคุ้มกันของปลามีการสร้างขึ้นมาหลังปลาติดเชื้อ โดยอาการที่พบหลังให้สัมผัสเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ตามีลักษณะขาวขุ่น บริเวณครีบ ปาก และท้อง มีการตกเลือด ซึ่งเป็นลักษณะอาการทั่วไปของปลาติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ Galagarza *et al.* (2018) รายงานว่า ค่าไลโซไซม์ของปลานิลที่รับอาหารผสม *B. subtilis* แตกต่างกันไปตามระยะเวลา แต่โดยภาพรวมแล้วจะให้ผลดีในระยะยาว (หลังการให้ 51 วัน) Prapansak & Nonthawit (2017) ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus pumilus* ที่แยก

ได้จากปลาที่เลี้ยงในฟาร์ม พบว่า การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคที่เพิ่มขึ้นในปลานิลทั้งการทดลองในห้องปฏิบัติการและในฟาร์ม อย่างไรก็ตาม Richard (2008) ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโปรไบโอติกต่อความต้านทานโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล พบว่า ปลาที่ได้รับโปรไบโอติก ไม่มีความแตกต่างในการเจริญเติบโต ไลโซไซม์ อิมมูโนโกลบูลิน รวมในซีรั่มเสริมระดับแอนติบอดีต่อต้านสเตรปโทคอกคัสเฉพาะหรืออัตราตายเนื่องจากการติดเชื้อ *S. iniae* ก่อนหรือหลัง ดังนั้นแหล่งที่มาของโปรไบโอติกและสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงปลาก็อาจจะมีผลทำให้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันโรคที่แตกต่างกันได้

ขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เป็นกลไกพื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ มีบทบาทสำคัญในการช่วยป้องกันการรุกรานและแพร่กระจายของเชื้อโรค สัตว์น้ำที่กินอาหารเสริม *B. subtilis* จะมีความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น (Nayak, 2010) เช่นเดียวกับงานทดลองนี้ ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกมีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติก หลังการทดลอง ที่อายุ 1 เดือน และ 2 เดือน และหลังจากทำการฉีดเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก *B. subtilis* มีค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงขึ้น อาจจะเนื่องมาจากจุลินทรีย์มีส่วนช่วยในการลดความเครียดของปลาที่เลี้ยงในความหนาแน่นสูง (Telli *et al*., 2014) ค่ากิจกรรมไลโซไซม์สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) Magnadóttir (2006) กล่าวว่า ไลโซไซม์เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแตกสลาย (lytic protein) ที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก สามารถพบได้ใน เมือกปลา ซีรั่ม และเนื้อเยื่อ

การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนในกระบวนการ respiratory burst activity เกิดขึ้นระหว่างขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ วิธีการทดสอบ NBT เป็นการประเมินการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์นิวโทรฟิลและโมโนไซน์ (Şahan *et al*., 2014) ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 10 มล./ อาหาร 1 กก. มีค่า NBT สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ผสมโปรไบโอติก เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน และหลังจากทำการฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* เป็นระยะเวลา 15 วัน

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การให้อาหารปลานิลทุกวันทำให้ปลาเจริญเติบโตดีกว่าการให้อาหารปลา 5 วันต่อสัปดาห์ อย่างไรก็ตาม Villarroel *et al.* (2011) รายงานว่า ปลานิลที่งดให้อาหารทุก ๆ สี่วันมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับปลาที่ให้อาหารทุกวัน ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางในการมาปรับใช้เพื่อลดต้นทุนอาหารและลดปัญหาคุณภาพน้ำได้

สรุปผลการวิจัย

การเสริมโปรไบโอติก 10 มล./อาหาร 1 กก. ร่วมกับการให้อาหารทุกวันแต่ผสมโปรไบโอติกสัปดาห์เว้นสัปดาห์ส่งผลให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องให้โปรไบโอติกทุกวัน เพราะจุลินทรีย์บางส่วนสามารถมีชีวิตอยู่และทำงานได้ในลำไส้ระยะหนึ่ง ทำให้ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการลงทุน นอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติกมีส่วนช่วยให้ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมและกิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลสูงขึ้น ซึ่งอาจจะมีส่วนช่วยให้ปลามีภูมิคุ้มกันโรคหากมีโรคระบาดเกิดขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัย จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2561 โดยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

Essa, M., El-Serafy, S., El-Ezabi, M., Davboor, S., Esmael, N. & Lall, S. (2010). Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Arab. Aquac. Soc*., *5*, 143 – 161.

Fisheries Economics. (2016). *Situation of Tilapia Report*. Retrieved August 1, 2019, from http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/pages/fish%20tilapia.html# (in Thai)

Galagarza, O.A., Smith, S.A., Drahos, D.J., Eifert, J.D., & Kuhn, D.D. (2018). Modulation of innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary supplementation of *Bacillus subtilis* endospores. *Fish & Shellfish Immunology*, *83*, 171 – 179.

Georgiadis, D., Schwarz, S., Baumgartner, R.W., Veltkamp, R., & Schwab, S. (2001). Influence of Positive End-Expiratory Pressure on Intracranial Pressure and Cerebral Perfusion Pressure in Patients with Acute Stroke. *American Heart Association*, *32,* 2088-2092.

Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, *87*, 820 – 828.

Hai, N.V. (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review *Fish & Shellfish Immunology*. *45*, 592 – 597.

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(2), 137 – 151.

Mukherjee, A., Chandra, G., & Ghosh, K. (2019). Single or conjoint application of autochthonous Bacillus strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture*, *512,* https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734302

Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, *29(*1), 2 – 14.

Parry, R.M., Chandau, R.C., & Shahani, R.M. (1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. exp. Biol. Med*, *119*, 384-386.

Prapansak, S., & Nonthawit, A. (2017). Efficacy of viable *Bacillus pumilusisolated* from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. *Fish & Shellfish Immunology*, *67*, 199–210.

Promnuan, K. & Kiriratnikom, S. (2018). Effect of Different Levels of *Bacillus licheniformis* Supplements in Diets on Growth Performance, Feed Utilization and Intestinal Bacteria of Hybrid Red Tilapia. Thaksin.J., *21,* 43 – 50. (in Thai)

Richard, A. (2008). Effects of Probiotic Diet Supplements on Disease Resistance and Immune Response of Young Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, *18*(2), 23-34.

Rodmongkoldee, M., Leelapatra, W, & Thaimuangphol, W, (2017). Effect of Probiotics on Growth Performance and Survival Rate in *Anabas testudineus*. *Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University* (Supplementary). 82-89. (in Thai)

Şahin, K., Yazlak, H., Orhan, C., Tuzcu, M., Akdemir, F. & Şahin, N. (2014). The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout reared under high stocking density. *Aquaculture*, *418* (419), 132-138. doi: 10.1016/j.aquaculture.

Secombes, C. J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Techniques in Fish Immunology*, NJ 07704-3303, 139-154.

Senasri, N. (2015). Effect of *Bacillus* spp. as Probiotic in Feed on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Culture. *Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Journal*, *8*(2), 61-66. (in Thai)

Suwan, C. & Chitmanat, C. (2017). The application of probiotics for Tilapia culture. *Chiang Mai Veterinary Journal*, *15*(1), 15 – 24. (in Thai)

Villarroel, M., Alavriño, J.M.R. & López-Luna, J. (2011). Effect of Feeding Frequency and One Day Fasting on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Water Quality. *The Israeli Journal of Aquaculture*, *63*, 1 – 6.

Wang, L., P. Liu, Z. Y. Wan, S. Q. Huang, Y. F. Wen, G. Lin, & Yue, G. H. (2016). RNA-Seq revealed the impairment of immune defence of tilapia against the infection of *Streptococcus agalactiae* with simulated climate warming. *Fish & Shellfish Immunology*, *55*, 679 – 689.

Wang, Y., Hu, S., Chiu, C., & Liu, C. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. Fish & Shellfish Immunology, *84*, 1050 -1058.

Widanarni and Tanbiyaskur. (2015). Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for the control of streptococcosis in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pak J Biol Sci*, *18*(2), 59 – 66. https://doi.org/10.3923/pjbs.2015.59.66.

Yoshida, T. & Kitao, T. (1991). The Opsonic Effect of Specific Immune Serum on the Phagocytic and Chemiluminescent Response in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* Phagocytes. *Fish Pathology*, *26*(1), 29-33.