



วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

ปีที่ 13 เล่มที่ 1

มกราคม - มิถุนายน 2562

Volume 13 Number 1

January - June 2019

วารสารวิชาการเผยแพร่ความรู้

เทคโนโลยีและส่งเสริมกิจกรรมทางการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

ทั้งเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อม

จัดทำโดย

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง
Journal of Fisheries Technology Research
ISSN 1905-7393

ผู้จัดทำ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ที่ปรึกษา อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

คณบดีคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

หัวหน้ากองบรรณาธิการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุญ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

กองบรรณาธิการ

ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์ ดร.ทวนทอง จุฑาเกตุ	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
รองศาสตราจารย์ ดร.วิภูษิต มั่นทะจิตร	มหาวิทยาลัยบูรพา
รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
รองศาสตราจารย์ ดร.นิวุฒิ หวังชัย	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สำเนา เสาวกุล	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสุรินทร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ เหล่าดี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชยากร ภูมาศ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เลขากองบรรณาธิการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง (ISSN 1905-7393) เป็นวารสารของคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ (มกราคมและกรกฎาคม) ของทุกปี โดยมีนโยบายเพื่อเผยแพร่งานวิจัยและบทความทางวิชาการ ด้านเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำให้แก่องค์กรที่เกี่ยวข้องทั่วประเทศ

ติดต่อสำนักงานกองบรรณาธิการ

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

โทร. 053 875 100 – 2 โทรสาร. 053 875 130

พิมพ์ที่: หจก.สารกวีการพิมพ์ เลขที่ 11 หมู่ 5 ตำบลยางน่อง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ 50140 โทร. 053 438 265

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง
Journal of Fisheries Technology Research

ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน พ.ศ. 2562

ISSN 1905-7393

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมงเป็นวารสารวิชาการ
และเป็นลิขสิทธิ์ของคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

มีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1.เผยแพร่วิชาความรู้และผลงานทางวิชาการ โดยเน้นผลงานจากการวิจัยทางการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ทั้งเชิงเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อม
- 2.เป็นสื่อกลางในการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นทางวิชาการเชิงสร้างสรรค์
- 3.ส่งเสริมอาจารย์ นักวิชาการ นักวิจัย นักศึกษาและผู้ที่เกี่ยวข้องให้มีส่วนร่วมในการถ่ายทอดเทคโนโลยี เผยแพร่และบริการด้านวิชาการแก่สังคม

ข้อคิดเห็นที่ปรากฏและแสดงในเนื้อหาบทความต่างๆ ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ถือเป็นความเห็นและความรับผิดชอบโดยตรงของผู้เขียนโดยเฉพาะ ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทฤษฎีของคณะผู้จัดทำ และมีใช้ความรับผิดชอบของคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ผู้ประสงค์จะนำข้อความใดๆ ไปพิมพ์เผยแพร่ต้องได้รับอนุญาตจากวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมงและผู้เขียนตามกฎหมายว่าด้วยลิขสิทธิ์

บทบรรณาธิการ

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง (ISSN 1905-7393) เป็นวารสารของคณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ (มกราคมและกรกฎาคม) ของทุกปี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นสื่อกลางในการนำเสนอผลงานวิชาการให้กับนักวิจัย นักศึกษา บุคลากร เพื่อการเผยแพร่ข้อมูล นวัตกรรมและองค์ความรู้เชิงวิชาการระหว่างนักวิจัย นักวิชาการกับผู้ใช้ประโยชน์ทุกภาคส่วน เช่น เกษตรกร ภาครัฐและเอกชนและผู้สนใจ

วารสารฉบับนี้ขึ้นปีที่ 13 แล้ว เนื้อหายังคงคุณค่าเพื่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลากหลายชนิด การพัฒนาอุตสาหกรรมเพื่อลดต้นทุน นำของเสียมาก่อให้เกิดประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม สภาพการเลี้ยงกบและโรคที่พบในเขตจังหวัดสกลนครและนครพนม รายงานการดื้อยาปฏิชีวนะในน้ำเสียจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งหวังว่า คงทำให้นักวิจัยและเกษตรกรได้ตระหนักและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ มุ่งงานวิจัยทางเลือกในการใช้จุลินทรีย์และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในเล่มนี้และเล่มที่ผ่านมา หวังว่า คงเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานของท่านเพื่อให้สนองความต้องการของตลาดและผู้บริโภค ปิดเล่มด้วยการใช้ปลาเป็นดัชนีทางชีวภาพเพื่อประเมินความเสี่ยงทางนิเวศวิทยาและมลพิษแหล่งน้ำ

ในนามคณะกรรมการกองบรรณาธิการฯ ต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อผู้เขียนผลงาน คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่พิจารณาผลงาน คณะกรรมการวิชาการของคณะฯ และผู้ประสานงาน ในนามตัวแทนกองบรรณาธิการและกรรมการท่านอื่น ๆ ที่ไม่สามารถเอ่ยนามได้หมด ตลอดจนผู้ให้การสนับสนุนจากหลายฝ่ายด้วยกัน ที่สามารถเป็นการส่งเสริมคุณภาพวารสารและดำเนินการจนทำให้วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมงฉบับนี้ เป็นวารสารวิชาการเข้าสู่ระบบฐานข้อมูลวารสาร ASEAN Citation Index (ACI) ทำให้สามารถสืบค้นบทความได้จาก <http://www.asean-cites.org/> และระบบฐานข้อมูลวารสารไทย ที่สามารถสืบค้นได้จากหน้าเว็บไซต์วารสารที่ http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/Journal_FT หรือเว็บไซต์ของศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย ที่ <http://tci/trf.or.th> นำไปสู่การส่งเสริมคุณภาพวารสารและเผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าต่อการนำประโยชน์ต่อการศึกษาด้านวิชาการและวงการวิชาชีพด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำได้อย่างมั่นคงต่อไป

กองบรรณาธิการ

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาดุกแอฟริกัน *Clarias gariepinus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้ silage จากการหมักใส่ไก่เป็นองค์ประกอบหลัก

Growth performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets containing chicken intestine silage as a main component

เทพรัตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์¹ จงกล พรหมยะ¹ ประจวบ ฉายบุ^{1*} และนวรรตน์ สังเต็ม¹

Thepparath Ungsethaphand¹ Jongkol Promya¹ Prachaub Chaibu^{1*} and Nawarat Sangtem¹

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, 50290 Thailand

*Corresponding author : e-mail; p_chaibu@mju.ac.th

บทคัดย่อ

ศึกษาการใช้ silage ที่หมักจากใส่ไก่ในอัตราส่วนที่ต่างกันต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกแอฟริกัน (*Clarias gariepinus*) หมักใส่ไก่ด้วยกรดซิตริก 8% ผสมรำละเอียดลงใน silage ที่ระดับ 10% 20% 30% และ 40% (RB10, RB20, RB30 และ RB40) และผสมกากถั่วเหลืองที่ระดับ 20% 30% 40% และ 50% (SB20, SB30, SB40 และ SB50) เลี้ยงปลาดุกแอฟริกัน จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว (น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 16.05 กรัม) ระยะเวลาทดลอง 60 วัน โดยใช้อาหารสำเร็จรูปปลาดุกเป็นอาหารควบคุม (Contr) เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ปลาดุกแอฟริกันที่เลี้ยงด้วยอาหาร Contr มีน้ำหนักเพิ่ม อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) สูงกว่า และ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร silage ผสม รำละเอียดทุกระดับ (RB10, RB20, RB30 และ RB40) และ อาหาร silage ผสม กากถั่วเหลืองบางระดับ ได้แก่ SB30, SB40 และ SB50 ตามลำดับ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB20 ($p > 0.05$) อัตรารอดของปลาทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ระดับโปรตีนในเนื้อปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าไม่ได้รับผลกระทบจากอาหารทดลอง ($p > 0.05$) แต่ระดับไขมันในเนื้อปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร silage ผสมกากถั่วเหลืองทุกระดับ (SB20, SB30, SB40 และ SB50) มีค่าต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองผสม silage ได้ไม่เกิน 20% ในการผลิตอาหารเลี้ยงปลาดุกแอฟริกัน (*Clarias gariepinus*)

คำสำคัญ: ใส่ไก่ การหมัก ปลาดุก, กรด citric, by-product

Abstract

Experiments were carried out to investigate the effect of silage from chicken intestine blended with rice bran or soybean meal in the diet on growth performance of African catfish (*Clarias gariepinus*). Eight experimental diets containing various levels of rice bran (RB10, RB20, RB30 and RB40) or soybean meal (SB20, SB30, SB40 and SB50) were mixed in liquid silage and a commercial catfish feed was used as a control diet (Contr). Triplicate groups of 30 fish (initial

weight: 16.05 g) were fed daily at 5% body weight for 60 days. Significant higher ($p<0.05$) in weight gain, specific growth rate (SGR) and lower feed conversion ratio (FCR) were observed in fish fed on Contr diet compared to those fed rice bran inclusion in the diets (RB10, RB20, RB30 and RB40) and some soybean meal inclusion diets (SB30, SB40 and SB50). However, the growth performance was similar in fish fed Contr and SB20 ($p>0.05$). No significant differences were detected in survival rates among fish fed all treatments ($p>0.05$). The carcass protein content were similar in all treatments ($p>0.05$). Lipid contents in fish fed soybean meal inclusion diets (SB20, SB30, SB40 and SB50) were significantly lower ($p<0.05$) than those of the rest diets. The study demonstrated that up to 20% of soybean meal could be incorporated in silage diets of *Clarias gariepinus*.

Key word: chicken viscera, fermentation, citric acid, Catfish, by-product

คำนำ

ในปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงอุตสาหกรรมทำให้สภาวะแวดล้อมเสื่อมโทรมลง เกษตรกรฟาร์มเลี้ยงปลาบางส่วนใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปร่วมกับไส้ไก่สด เพื่อลดต้นทุนการผลิต ทำให้น้ำทิ้งจากฟาร์มก่อมลพิษเกิดปัญหากับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลารายอื่นที่อยู่ใกล้เคียง มีรายงานการศึกษาการหมักเศษของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น เลือดสัตว์ เครื่องในสัตว์ เศษเนื้อปลา ไส้ปลา เป็น silage เพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงปลาได้หลายชนิด Allan *et al.*, (2000) ทดลองใช้เครื่องในไก่จากโรงงานชำแหละ เลี้ยงปลา silver perch วัยรุ่น พบว่า ปลาสามารถย่อยเครื่องในไก่ได้ 83.3-92.1% โดยในเครื่องในไก่ มีโปรตีน 60.3% ไขมัน 18.2% มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน Jayathilakan *et al.*, (2012) กล่าวว่า by-product จากอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์อุดมไปด้วยสารอาหารสำคัญ เช่น กรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุ สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ อย่างไรก็ตามการใช้ by-product จากโรงงานชำแหละไก่ เช่น การนำไส้ไก่สดมาใช้เลี้ยงปลาส่งผลให้เกิดมลพิษทางน้ำ เพราะใน by-product ประกอบด้วย เศษเลือด ไขมัน ขนไก่ และของเสียที่ตกค้างในไส้ Gisbert *et al.*, (2012) ทดลองใช้โปรตีนไฮโดรไลซ์จากเศษเลือดจากโรงงานชำแหละสุกร พบว่าสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนผสมในอาหารเลี้ยงปลา Gilthead sea bream ได้ถึง 12% โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต

ดังนั้น การศึกษาแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพไส้ไก่สดด้วยการหมักด้วยกรด รวมทั้งการปรับปรุงคุณสมบัติด้วยการเสริมวัตถุดิบอาหารสัตว์ เพื่อใช้ในการเลี้ยงปลาอุกัฟิกันต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและคุณภาพน้ำ เพื่อลดมลพิษของน้ำทิ้งจากฟาร์ม จึงเป็นแนวทางสำคัญเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมที่มีต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในบริเวณใกล้เคียง และความปลอดภัยด้านสุขอนามัยของผู้บริโภคได้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเตรียม Silage

นำสับไก่สดผสมเกล็ดน้ำแข็งอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อป้องกันการเน่าเปื่อย เมื่อถึงสถานที่ทดลองใช้มีดคมสับสับไก่เป็นชิ้นเล็ก ใส่ถังพลาสติกที่มีฝาปิดถึงละ 20 กรัม เติม propionic acid 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ป้องกันการเกิดเชื้อรา และ Ethoxyquin 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อป้องกันการเหม็นหืน (Fagbenro และ Fasakin, 1996) เติมกรด citric ให้ได้ความเข้มข้น 8% ปิดฝาปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบระยะเวลาการทดลอง 30 วัน ต้ม silage ที่ได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาทางเคมี ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ของ silage ให้เท่ากับ 6 ด้วยโซเดียมโบคาร์บอเนต (Ungsethaphand *et al.*, 2017)

การวางแผนการทดลอง และการเตรียมอาหารทดลอง

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ผลิตอาหารทดลองจำนวน 8 สูตร (Table 1 และ 2) โดยใช้อาหารสำเร็จรูปปลาตุ๋น (โปรตีน 30%) ซึ่งใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนเป็นอาหารควบคุม (Conrt) ส่วนอาหารอีก 8 สูตร ใช้ silage ที่ได้จากการหมักสับไก่สดด้วยกรด citric 8% ผลิตอาหารทดลองที่มีโปรตีน 29.22% - 40.04% โดยผสมกับรำละเอียด 4 ระดับ 10% (RB10) 20% (RB20) 30% (RB30) และ 40% (RB40) และผสมกากถั่วเหลือง 4 ระดับ 20% (SB20) 30% (SB30) 40% (SB40) และ 50% (SB50) นำส่วนผสมที่ได้ไปอัดเม็ดด้วยเครื่องบดเนื้อ อบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง ให้มีความชื้นเหลืออยู่ประมาณ 10% บรรจุอาหารทดลองในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้แช่ อุณหภูมิ -20° องศาเซลเซียส ตลอดช่วงเวลาของการทดลอง 60 วัน

Table 1 Proximate composition (% dry weight) of dry chicken intestine silage after mixed with rice brand

Rice brand (%)	RB10%	RB20%	RB30%	RB40%
Proximate composition (% dry weight)				
Moisture	7.49±0.30	7.13±0.11	7.30±0.08	7.42±0.05
Crude protein	34.37±0.01	32.65±0.02	30.93±0.02	29.22±0.03
Crude lipid	20.83±0.02	20.22±0.04	19.60±0.06	18.99±0.08
Fiber	7.05±0.01	7.38±0.01	7.72±0.02	8.06±0.03
Ash	6.32±0.01	6.85±0.03	7.38±0.05	7.91±0.07
NFE	31.43±0.03	32.89±0.06	34.36±0.09	35.82±0.12
Gross energy (Kcal/Kg)	450.72±0.76	444.17±0.15	437.62±0.23	431.07±0.30

Table 2 Proximate composition (% dry weight) of dry chicken intestine silage after mixed with soy bean

Soy bean (%)	SB20%	SB30%	SB40%	SB50%
Proximate composition (% dry weight)				
Moisture	9.56±0.17	9.47±0.15	9.58±0.16	9.44±0.14
Crude protein	37.67±0.09	38.46±0.14	39.25±0.18	40.04±0.23
Crude lipid	17.75±0.08	15.89±0.12	14.04±0.16	12.19±0.20
Fiber	6.64±0.03	6.61±0.05	6.58±0.06	6.54±0.08
Ash	5.90±0.01	5.95±0.01	6.01±0.01	6.06±0.02
NFE	32.04±0.14	33.08±0.21	34.12±0.29	35.16±0.36
Gross energy (Kcal/Kg)	438.59±0.52	429.24±0.78	419.90±1.04	410.56±1.30

สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) น้ำหนักเฉลี่ย 16.05 กรัม โดยนำลูกปลามาพักให้ปรับตัวเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนสูมน้ำและซังน้ำหนักลูกปลาเริ่มต้นเพื่อปล่อยลงเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 30 ตัว/บ่อ ในบ่อซีเมนต์กลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เมตร บรรจุน้ำ 100 ลิตร เลี้ยงด้วยอาหารควบคุมเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้ปลาปรับสภาพ ก่อนเริ่มให้อาหารทดลอง ในอัตรา 5% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง (09.00-10.00 น. และ 15.00-16.00 น.) ปรับปริมาณอาหารที่ให้ ทุก 14 วัน และเติมน้ำสดเขยส่วนระเหยไปทุกวัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มตัวอย่างปลาซ้ำละ 3 ตัว ในแต่ละชุดการทดลองเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา โดยวางยาสลบปลาด้วย MS222 80 มิลลิกรัม/ลิตร ในน้ำที่มีการให้อากาศตลอดเวลา (CCAC, 2005)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลอง และเนื้อปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยวิธีการดังต่อไปนี้ วิเคราะห์หาโปรตีนโดย micro-Kjeldahl, ไขมันโดยวิธี dichloromethane extraction ตาม Soxhlet method, เยื่อใย โดยวิธี fritted glass crucible, เถ้า โดยการเผาใน muffle furnace 550 องศาเซลเซียส และความชื้น โดยการอบแห้งในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ AOAC (1990)

การตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำในหน่วยทดลองเมื่อเริ่มต้นและทุก 14 วัน จนเสร็จสิ้นการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิและ dissolved oxygen (DO) ด้วยเครื่อง oxygen meter (YSI Model 59), Total ammonia วิเคราะห์ค่าโดยใช้ spectrophotometer (Hach DR/2000) ส่วนค่า pH วัดโดยใช้เครื่อง pH meter (Schott-Gerate CG 840)

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลด้านประสิทธิภาพและการเติบโต

นับและชั่งน้ำหนักปลาในแต่ละกระชัง ทุกๆ 14 วัน ตลอดการทดลองในแต่ละการทดลอง นำข้อมูลที่ได้ไปปรับปริมาณการให้อาหาร และคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

ก. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR) (%/วัน)

$$= 100 \times \frac{(\ln \text{ น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{ น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง})}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$$

ข. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Weight gain) กรัม

$$= \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม)}$$

ค. อัตรารอด (Survival Rate) %

$$= (\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} / \text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}) \times 100$$

ง. อัตราการแลกเนื้อ (FCR)

$$= \text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน (กรัม)} / \text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละทรีตเมนต์ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยวิธีของ Tukey's test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

เมื่อนำ Silage ที่ได้จากการหมักด้วยกรด citric 8% ไปผสมวัตถุดิบอาหารสัตว์ ได้แก่ รำละเอียดและกากถั่วเหลือง เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและนำไปใช้ จะได้อาหารผสมที่มีระดับโปรตีนเฉลี่ย 29.22% - 40.04% ซึ่ง Gupta *et al.*, (2013) ระบุว่า ปลาตุ๊กด้าน (*Clarias batrachus*) มีความต้องการโปรตีน 30%-40% นอกจากนี้ยังพบว่า การผสมรำละเอียดที่ระดับ 10%, 20%, 30% และ 40% ส่งผลให้ระดับโปรตีน ไขมัน และพลังงานรวมในอาหารผสมทุกระดับลดลง และยังส่งผลให้ระดับ NFE เยื่อใย และเถ้าเพิ่มขึ้นในทุกระดับ (Table 1) ทั้งนี้ เพราะรำละเอียดมีระดับโปรตีนและไขมันต่ำกว่า silage

การนำ silage ที่ได้จากการหมักด้วยกรด citric 8% ไปผสมกากถั่วเหลืองที่ระดับ 20%, 30% , 40% และ 50% ทำให้ได้อาหารผสมที่มีโปรตีนสูงกว่า silage ในทุกระดับ (Table 2) ทั้งนี้ เพราะกากถั่วเหลืองมีระดับโปรตีนสูงกว่า silage นอกจากนี้การผสมกากถั่วเหลืองยังทำให้อาหารผสมที่ได้มีระดับไขมันและพลังงานรวมต่ำกว่า silage ในทุกระดับของการผสม

หากพิจารณา ในแง่ของความปลอดภัยด้านการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ใน silage นั้น Russell and Gould (1991) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษในอาหารส่วนใหญ่จะถูกควบคุมได้ด้วย pH ในอาหารที่ระดับต่ำกว่า 4.2 ในทำนองเดียวกัน Cai *et al.*, (1995) พบว่าการใช้กรด formic 2% ในการหมักสัปปะรดและซากไก่ จะสามารถทำลายเชื้อ Salmonella ได้ภายใน 8 วัน ที่ระดับ pH 3.8 แต่ Middleton and Ferket (2001) รายงานว่า การใช้กรด phosphoric ความเข้มข้นต่างกันหมักซากไก่ เพื่อควบคุม pH ให้อยู่ในระดับ 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 4.5 และ 5.0 นั้น พบว่า ที่ระดับ pH ต่ำกว่า 5.0 สามารถควบคุม fecal coliform แบคทีเรียได้

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*)

ผลการทดลองพบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB20 มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักสุดท้าย, น้ำหนักเพิ่ม, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และ FCR ไม่แตกต่างจากอาหารปลาดุกเล็กสำเร็จรูป ที่เป็นอาหารควบคุม (Contr) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร Contr มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ดีกว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่นที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม อัตราการอดของปลาในการทดลองครั้งนี้ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในทุกสูตรอาหาร (Table 3)

ในการทดลองครั้งนี้ การที่ปลาดุกอัฟริกันที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB20 น้ำหนักสุดท้าย, น้ำหนักเพิ่ม, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และ FCR ไม่แตกต่างจากอาหารควบคุม เพราะปลาดุกอัฟริกันสามารถใช้แหล่งโปรตีนจากถั่วเหลืองได้ดี Imorou Toko *et al.*, (2008) สอดคล้องกับ Fagbenro and Davies (2001) รายงานว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลาดุกอัฟริกันได้ 20-40% โดยไม่ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโต แต่ในการทดลองครั้งนี้ การใช้กากถั่วเหลืองในอัตราที่สูง 40% กลับส่งผลให้ปลา มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้สูตรอาหารที่ไม่มีปลาป่นเป็นองค์ประกอบ ในสูตรอาหาร โดยเป็นที่ทราบกันดีว่า ปลาป่นเป็นแหล่งวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีสารอาหารครบถ้วนมากกว่าแหล่งโปรตีนจากสัตว์และพืชชนิดอื่น เพราะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนและเหมาะสมตามความต้องการของปลา ส่งผลให้ปลา มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่ดี (Gaylord and Gatlin, 1996; Gupta *et al.*, 2013) สอดคล้องกับ Oke *et al.*, (2016) ที่รายงานว่าการใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลาดุกอัฟริกันนั้นมีขีดจำกัดไม่เกิน 30% โดยหากทดแทนในอัตราที่สูงเกินไปจะส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสูตรอาหารที่ไม่มีปลาป่นเป็นองค์ประกอบ เพราะจะมีปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่ครบถ้วนสมดุล Fagbenro and Fasakin (1996) ก็รายงานว่ ปัญหาของการใช้ Silage ที่ได้จากการหมักด้วยกรดในการเลี้ยงปลาคือ Silage ที่ได้จะมีปริมาณกรดอะมิโน tryptophan ต่ำ จึงมีขีดจำกัดในการนำไปทดแทนปลาป่น

เป็นที่น่าสังเกตว่า ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาดุกอัฟริกัน ในการทดลองครั้งนี้ มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ผสมกับ Silage และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อผสมในอัตราที่สูง เช่น ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร RB30 และ RB40 มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร RB10 และ RB20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เพราะการผสมรำละเอียดในอัตราที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณโปรตีนรวมในอาหารลดลง ในขณะที่มีปริมาณเยื่อใยและเถ้าเพิ่มขึ้น (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร Silage ผสมรำละเอียดในทุกระดับ (RB10-RB40) มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Giri *et al.*, (2003) พบว่าปลาดุกลูกผสม (*Clarias batrachus* x *Clarias gariepinus*) ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีรำละเอียด 10% และ 20% มีน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักเพิ่ม สูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่มีรำละเอียด 35% และ 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในทำนองเดียวกัน การผสมกากถั่วเหลืองในอัตราสูง 40% และ 50% (SB40 และ SB50) ทำให้ปลาดุกอัฟริกัน ในการทดลองครั้งนี้ มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกากถั่วเหลืองในอัตราต่ำ 20% (SB20) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการผสมกากถั่วเหลืองในอัตราที่

สูงขึ้นแม้จะทำให้มีระดับโปรตีนในอาหารสูงขึ้น แต่ก็ส่งผลให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและเถ้าสูงขึ้นเช่นกัน (Table 2)

แม้ว่าจะมีการทดลองที่แสดงว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นเลี้ยงปลาได้หลายชนิด Giri *et al.*, (2000) รายงานว่า ปลาตุ๊กตาด้าน (*Clarias batrachus*) มีความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดี โดยพบปริมาณเอนไซม์ α -amylase ในลำไส้สูงขึ้นเมื่อกินอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง Fagbenro and Davies (2001) รายงานว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลาดุกอ์ฟริกกันได้ 20-40% โดยไม่ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดลองของ Imorou Toko *et al.*, (2008) พบว่า ยังคงมีขีดจำกัดในการใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในการเลี้ยงปลาดุกอ์ฟริกกัน โดยพบว่าการใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณที่สูงเกินไปถึง 60% จะส่งผลลบต่อการเจริญเติบโตของปลา ทั้งนี้เพราะมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นไม่เพียงพอในกากถั่วเหลือง สอดคล้องกับ Fagbenro and Davies (2001) ที่รายงานว่าการใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลา โดยไม่ให้ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของปลา จำเป็นต้องเติมกรดอะมิโน methionine เข้าไปในสูตรอาหาร Gupta *et al.*, (2013) ก็รายงานว่าการใช้ปลาดุกที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนมีน้ำหนักเพิ่มสูงกว่า และ FCR ต่ำกว่า ปลาดุกที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้ปลา ไล่ไก่ และกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน

องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา

มีงานวิจัยจำนวนมากระบุว่า องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลาที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากปริมาณอาหารที่ได้รับ อัตราการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละช่วงวัย วัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงปลา และองค์ประกอบทางเคมีและสารอาหารในอาหารเลี้ยงปลา (Degani *et al.*, 1989; Imorou Toko *et al.*, 2007; Imorou Toko *et al.*, 2008)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลาดุกอ์ฟริกกันภายหลังเสร็จสิ้นการทดลอง (Table 4) พบว่า ปริมาณโปรตีนและความชื้นในเนื้อปลาดุกอ์ฟริกกันที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองในการทดลองครั้งนี้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 12.56 -14.69% สอดคล้องกับการทดลองของ Imorou Toko *et al.*, (2008) ที่ทดลองเลี้ยงปลาดุกอ์ฟริกกันด้วยอาหารสำเร็จรูป และอาหารที่ทดแทนปลาป่นด้วยกากถั่วเหลือง 30% และ 60% พบว่ามีปริมาณโปรตีนในเนื้อปลา 12.4%-14.5% โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และ Gupta *et al.*, (2013) เลี้ยงปลาดุกอ์ฟริกกันด้วยอาหารที่ใช้ ปลาป่น ไล่ไก่ ไล่ปลา และกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งโปรตีน พบว่า มีปริมาณโปรตีนในเนื้อปลาอยู่ในช่วง 13.32%-13.75% ($p>0.05$) Fagbenro and Fasakin (1996) ใช้ Silage จากการหมักไล่ไก่ด้วยกรด citric ทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารเลี้ยงปลาดุกอ์ฟริกกัน และ Oke *et al.*, (2016) เลี้ยงปลาดุกอ์ฟริกกันด้วยอาหารที่ใช้ไล่ไก่ทดแทนปลาป่น 0%-50% เปรียบเทียบกับอาหารสำเร็จรูป ซึ่งการทดลองทั้งสอง พบว่าปริมาณความชื้นและโปรตีนในเนื้อปลาไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณไขมันในเนื้อปลาที่เลี้ยงด้วย Silage ผสมกากถั่วเหลืองในทุกระดับ (SB20 - SB50) มีค่าต่ำกว่าเนื้อปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุมและ Silage ผสมรำละเอียดในทุกระดับ (RB10 - RB40) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้เป็นผลมาจากมีปริมาณไขมันในกากถั่วเหลืองต่ำกว่าในรำละเอียด ส่งผลให้

อาหารทดลองที่ผสมกากถั่วเหลืองมีปริมาณไขมันต่ำกว่า (Table 1 และ 2) โดย Giri *et al.*, (2000) และ Gupta *et al.*, (2013) รายงานว่า ปลาตู้ก้านจะมีการสะสมไขมันในเนื้อปลาเพิ่มขึ้นเมื่อกินอาหารที่มีระดับไขมันสูงขึ้น สอดคล้องกับ Oke *et al.*, (2016) ก็รายงานผลเช่นเดียวกันในการทดลองกับปลาตู้ก้าน นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารควบคุมและทดลองที่ใช้ Silage ผสมรำละเอียด มีปริมาณโปรตีนในอาหารต่ำกว่าอาหารทดลองที่ใช้ Silage ผสมกากถั่วเหลือง (Table 1 และ 2) ก็เป็นสาเหตุให้ปลาทดลองมีการสะสมไขมันในเนื้อปลาต่างกัน โดย Giri *et al.*, (2003) อธิบายว่าปลาที่กินอาหารที่มีโปรตีนต่ำกว่าแต่ไขมันสูงกว่า จะมีการสะสมไขมันในเนื้อปลาสูงขึ้น โดย Gupta *et al.*, (2013) ก็รายงานผลเช่นเดียวกันในการทดลองกับปลาตู้ก้าน

ปริมาณไขมันในเนื้อปลาที่กินอาหารควบคุมซึ่งเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูปปลาตู้ก้าน มีค่าสูงกว่าปลาที่กินอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เป็นผลจากปลาปนที่เป็นแหล่งโปรตีนหลักจากสัตว์ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารเม็ดสำเร็จรูป เพราะปลาปนมีปริมาณไขมันสูง (Giri *et al.*, 2000)

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงขีดจำกัดของการใช้ Silage ผสมวัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น รำละเอียดและกากถั่วเหลืองโดยไม่มีปลาปนเป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงปลาตู้ก้าน โดยการผสม Silage กับรำละเอียดในทุกระดับ ตั้งแต่ 10-40% ทำให้ปลาตู้ก้านมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม และสามารถผสม Silage กับกากถั่วเหลืองได้ไม่เกิน 20% โดยไม่ส่งผลเสียกับประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาตู้ก้าน เมื่อเทียบกับอาหารควบคุม แม้ว่าการผสมกากถั่วเหลืองในอัตราที่สูงขึ้นจะทำให้มีปริมาณโปรตีนรวมในอาหารสูงขึ้นก็ตาม

คุณภาพน้ำในบ่อทดลอง

คุณภาพน้ำในบ่อทดลอง DO อยู่ในช่วง 3.38-3.92 มิลลิกรัม/ลิตร pH อยู่ในช่วง 7.41-7.98 Total Ammonia อยู่ในช่วง 0.46-0.55 มิลลิกรัม/ลิตร (Table 4) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของปลาตู้ก้าน ตามรายงานของ Oke *et al.*, (2016) และมีปริมาณแอมโมเนีย และ pH ไม่เกินค่ามาตรฐาน ในประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด (Announcement of the Ministry of Natural Resources and Environment: Issue 2, 2008)

Table 3 Growth, feed conversion ratio and survival rate of African catfish after 60 days

Indicator	feed formula (%Protein)								
	Contr (30)	RB10 (34.37)	RB20 (32.65)	RB30 (30.93)	RB40 (29.22)	SB20 (37.67)	SB30 (38.46)	SB40 (39.25)	SB50 (40.04)
INITIAL weight (g)	16.16 ± 0.04	16.28 ± 0.05	16.31 ± 0.10	16.06 ± 0.05	15.61 ± 0.40	16.28 ± 0.06	16.17 ± 0.15	16.06 ± 0.04	15.56 ± 0.41
FINAL weight (g)	119.11 ± 0.91 ^a	102.18 ± 2.15 ^{bc}	92.91 ± 1.90 ^{cd}	82.66 ± 2.17 ^e	66.86 ± 0.36 ^e	108.60 ± 0.41 ^{ab}	105.29 ± 1.76 ^b	91.04 ± 0.98 ^d	90.21 ± 1.05 ^d
Weight gain (g)	102.94 ± 0.96 ^a	85.89 ± 2.21 ^{bc}	76.59 ± 2.00 ^{cd}	66.61 ± 2.21 ^e	51.25 ± 0.76 ^e	92.33 ± 0.35 ^{ab}	89.12 ± 1.91 ^b	74.96 ± 0.94 ^d	74.65 ± 0.61 ^d
SGR (%/day)	3.33 ± 0.02 ^a	3.06 ± 0.04 ^{bc}	2.89 ± 0.04 ^{cd}	2.73 ± 0.09 ^e	2.42 ± 0.06 ^e	3.16 ± 0.01 ^{ab}	3.12 ± 0.04 ^{abc}	2.89 ± 0.01 ^{cd}	2.93 ± 0.03 ^{bcd}
FCR	1.88 ± 0.04 ^a	2.38 ± 0.21 ^b	3.26 ± 0.19 ^{bc}	3.46 ± 0.34 ^c	3.43 ± 0.07 ^c	1.97 ± 0.01 ^{ab}	2.44 ± 0.66 ^b	2.35 ± 0.03 ^b	2.46 ± 0.27 ^b
Survival (%)	98.00 ± 2.52	83.53 ± 2.94	91.18 ± 2.94	94.12 ± 2.88	87.65 ± 2.94	92.36 ± 3.89	92.36 ± 1.77	90.59 ± 0.05	89.41 ± 2.94

Note: Mean ± se in rows with the different alphabets were statistically different (p<0.05) when compared by Tukey's test

SGR Specific growth rate, FCR Feed conversion ratio

Table 4 Proximate composition (% dry matter basis) in carcass of African catfish fed experimental diets

Indicator	feed formula (%Protein)								
	Contr (30)	RB10 (34.37)	RB20 (32.65)	RB30 (30.93)	RB40 (29.22)	SB20 (37.67)	SB30 (38.46)	SB40 (39.25)	SB50 (40.04)
Moisture	77.62 ± 0.04	78.86 ± 0.05	78.15 ± 0.10	77.51 ± 0.05	78.76 ± 0.40	78.62 ± 0.06	79.02 ± 0.15	78.14 ± 0.04	77.11 ± 0.41
Protein	13.32 ± 0.91	12.90 ± 2.15	13.10 ± 1.90	14.26 ± 2.17	12.65 ± 0.36	13.47 ± 0.41	13.00 ± 1.76	13.80 ± 0.98	14.69 ± 1.05
Lipid	5.23 ± 0.96 ^a	5.06 ± 2.15 ^a	5.44 ± 1.90 ^a	5.31 ± 2.17 ^a	5.50 ± 0.36 ^a	4.11 ± 0.35 ^b	4.29 ± 1.91 ^b	4.82 ± 0.98 ^b	4.41 ± 1.05 ^b
Ash	2.65 ± 0.02 ^a	1.69 ± 0.04 ^b	1.75 ± 0.04 ^b	1.75 ± 0.09 ^b	1.73 ± 0.06 ^b	1.60 ± 0.01 ^b	1.69 ± 0.04 ^b	1.51 ± 0.01 ^b	1.71 ± 0.03 ^b

Note: Mean ± se in rows with the different alphabets were statistically different (p<0.05) when compared by Tukey's test

Table 5 Water quality in the pond after 60 days of experiment

Indicator	feed formula (%Protein)								
	Contr (34.37)	RB10 (34.37)	RB20 (32.65)	RB30 (30.93)	RB40 (29.22)	SB20 (37.67)	SB30 (38.46)	SB40 (39.25)	SB50 (40.04)
Temperature (C)	27.41 $\pm$ 0.48	27.17 $\pm$ 0.12	27.18 $\pm$ 0.39	27.52 $\pm$ 0.11	27.79 $\pm$ 0.14	27.31 $\pm$ 0.52	27.15 $\pm$ 0.43	27.56 $\pm$ 0.24	27.51 $\pm$ 0.16
DO (mg/l)	3.59 $\pm$ 0.44	3.87 $\pm$ 0.01	3.46 $\pm$ 0.22	3.89 $\pm$ 0.10	3.91 $\pm$ 0.12	3.38 $\pm$ 0.41	3.54 $\pm$ 0.26	3.92 $\pm$ 0.12	3.86 $\pm$ 0.01
pH	7.98 $\pm$ 0.26	7.69 $\pm$ 0.01	7.56 $\pm$ 0.12	7.72 $\pm$ 0.09	7.65 $\pm$ 0.04	7.48 $\pm$ 0.12	7.41 $\pm$ 0.03	7.63 $\pm$ 0.06	7.65 $\pm$ 0.09
Total Ammonia (mg/l)	0.51 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.04

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ เช่น รำละเอียด และกากถั่วเหลือง ผสมกับ silage ที่ได้จากการหมักด้วยกรด citric 8% เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและนำไปใช้งาน โดยสามารถใช้กากถั่วเหลืองผสม silage ได้ไม่เกิน 20% ในการผลิตอาหารเลี้ยงปลาตู้ฟัก (Clarias gariepinus) และคุณภาพน้ำในบ่อทดลองมีปริมาณแอมโมเนีย และ pH ไม่เกินค่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทั้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการจัดสรรงบประมาณวิจัย รหัสโครงการวิจัย มจ. 1-60-62.2 และขอขอบคุณคุณอาจารย์ ชำราชการและเจ้าหน้าที่ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้และบุคคลอื่นที่มีได้กล่าวถึงในที่นี้ ที่ได้ให้ความเกื้อหนุน ทำให้การวิจัยในครั้งนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Allan G. L., Parkinson S., Booth M. A., Stone D. A. J., Rowland S. J., Frances J., and Warner-Smith R., 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. Aquaculture 186: 293-310.
- Announcement of the Ministry of Natural Resources and Environment, Issue 2. 2008. Freshwater Aquaculture Discharge Water Criteria Standard. In Royal Government Gazette, 125, Part 21 Ngor, dated January 30, 2008 (pp. 16-19). Ministry of Natural Resources and Environment, Thailand. [In Thai]
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1298 pp.
- Cai, T., Pancorbo, O. C., Merka, W. C., Sander, J. E. and Barnhart, H. M., 1995. Stabilization of poultry processing by-products and poultry carcasses through direct chemical acidification. Bio Resour Technol 52: 69-77.
- CCAC, 2005. CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, CANADA. 87 p.
- Degani, G., Ben-Zvi, Y., and Levanon, D., 1989. The effect of different protein levels and temperatures on growth and feed utilization, growth and body composition of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture 76: 293-301.

- Fagbenro O. A., and Fasakin E. A., 1996. Citric-acid-ensiled poultry viscera as protein supplement for catfish (*Clarias gariepinus*). Biores Technol 58: 13-16.
- Fagbenro, O.A. and O.A. Bello-Olusoi, 1997. Preparation, nutrient composition and digestibility offermented shrimp head silage. Food Chemistry 60:489-493.
- Fagbenro, O.A., and Davies, S.J., 2001. Use of soybean flour (dehulled, solvent-extracted soybean) as a fish meal substitute in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): growth, feed utilization and digestibility. J Appl Ichthyol. 17: 64-69.
- Gaylord, T.G. and Gatlin, D.M. III. 1996. Determination of digestibility coefficients of various feed stuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture, 139: 303-314.
- Giri, S.S., Sahoo, S.K., Sahu, A.K., and Mukhopadhyay, P.K., 2000. Nutrient digestibility and intestinal enzyme activity of *Clarias batrachus* (Linn.) juveniles fed on dried fish and chicken viscera incorporated diets. Biores Technol. 71: 97-101.
- Giri, S.S., Sahoo, S.K., Sahu, A.K., and Meher, P.K., 2003. Effect of dietary protein level on growth, survival, feed utilisation and body composition of hybrid *Clarias* catfish (*Clarias batrachus* x *Clarias gariepinus*). Animl. Feed Sci. and Technol. 104, 169-178.
- Gisbert E., Skalli A., Fernandez I., Kotzananis Y., Zambomino-Infante J. L., and Fabregat R., 2012. Protein hydrolysed from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 338: 96-104.
- Gupta, P., Gupta, A., and Monica., 2013. Effect of fish and chicken viscera incorporated diets on growth, feed utilization and body composition of Asian catfish, *Clarias batrachus* fry. Animl Nutrit. and Feed Technol. 13: 195-203.
- Imorou Toko, I., Fiogbe, E.D., Koukpode, B., and Kestemont, P., 2007. Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): effect of stocking density on growth, production and body composition. Aquaculture 262: 65-72.
- Imorou Toko, I., Fiogbe, E.D., Koukpode, B., and Kestemont, P., 2008. Mineral status of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets containing graded levels of soybean or cottonseed meals. Aquaculture 275: 298-305.
- Jayathilakan K., Sultana K., Radhakrishna K., and Bawa A. S., 2012. Utilization of by products and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. J Food Sci Technol 49(3): 278-293.

- Middelton, T. F. and Ferket, P. R., 2001. Effect of acidification by phosphoric acid storage, temperature and length of storage on the chemical and biological stability of ground poultry mortality carcasses. Poult. Sci. 80: 1144-1153.
- Oke, V. , Odountan, H. O. , and Abou, Y., 2016. Chicken Viscera Meal as a Main Component in Diet for African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) Reared in Earthen Ponds. J Food and Nutri Res 4(12), 799-805.
- Russell, N.J., and Gould, G.W., 1991. Factors affecting growth and survival. In Food Preservatives, Russell, N.J., and Gould, G.W., Eds., Blackie, Glasgow, U.K., pp 13-21.
- Ungsethaphand, T., Promya, P., and Duangwongsa, J., 2017. Improvement nutritional quality of poultry viscera utilization as protein source for fish farm. In Conference Proceedings: MJU Annual Conference 2017, Maejo University, Chiang Mai, Thailand, 47-54. [In Thai]

ผลของการเสริมอินูลินในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ประชากรจุลินทรีย์ ในลำไส้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาดุกลูกผสม

Effects of dietary supplementation of inulin on the growth performance,
gut microbiota and immune response of hybrid catfish

(*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)

ณัฐนันท์ เทียงธรรม* และ พูลทรัพย์ ศิริसानต์

Nattanan Tiengtam* and Poolsap Sirisant

สาขาวิชาประมง คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม จังหวัดนครพนม 48000

Division of Fisheries, Faculty of Agriculture and Technology, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000

*Corresponding author Email: nattanan_tga@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบการใช้อินูลินเป็นสารเสริมโปรไบโอติกในอาหารปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) การทดลองนี้มีกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม ประกอบไปด้วยกลุ่มทดลองที่มีการเสริมอินูลินในระดับที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มที่ไม่มีการเสริมอินูลิน (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่มีการเสริมอินูลินที่ระดับ 1%, 2% และ 3% ทำการทดลองเลี้ยงปลาในบ่อคอนกรีตเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า ปลาที่ได้รับการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีผลทำให้ปลาที่มีสมรรถนะการเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และมีค่าลดลงต่ำสุดในกลุ่มปลาที่ได้รับการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 3% ($P > 0.05$) ปลาทุกกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) การเสริมอินูลินที่ระดับ 1% มีผลทำให้ค่าอิมมูโนโกลบูลินรวม ค่าการทำงานของไลโซไซม์ และค่า ACH50 เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) การเสริมอินูลินส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา การเสริมอินูลินที่ระดับ 1% ทำให้จำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมด แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria แบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. เพิ่มขึ้น และมีจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ลดลง ($P < 0.05$) จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีประโยชน์ต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลาดุกลูกผสมได้

คำสำคัญ: อินูลิน ปลาดุกลูกผสม สมรรถนะการเจริญเติบโต การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

Abstract

This study evaluated the prebiotic effects of dietary inulin on hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*). Four dietary treatments were designed to incorporate inulin at 0 (control), 1%, 2% and 3%. Fish were reared in concrete ponds for 12 weeks. Fish fed the 1% inulin diets had the best growth performances compared with that of fish fed the control diet ($P < 0.05$), and the lowest was observed in fish fed on 3% inulin. There were not significant differences in survival rates among experimental diets ($P > 0.05$). Inulin supplementation at 1% improved total immunoglobulin content, lysozyme activity, and ACH50 activity ($P < 0.05$). Inulin supplementation

affected the population of intestinal microbiota. Dietary supplementation with 1% inulin led to increase intestinal total bacteria, lactic acid bacteria, *Bifidobacterium* spp. and decrease the population of *Vibrio* spp. ($P < 0.05$). These findings indicate that inulin supplementation at 1% had positive effects on growth performance and health of hybrid catfish.

Keywords: inulin, hybrid catfish, growth performance, immune response

คำนำ

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมบริโภคและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยเป็นปลาน้ำจืดที่มีการเลี้ยงมากเป็นอันดับสองของประเทศ รองจากปลานิล มีปริมาณผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสูงถึง 113,825 ตัน ในปี พ.ศ. 2557 คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 5,333.8 ล้านบาท (Information center of fisheries, 2016) และปลาดุกที่นิยมเลี้ยงมากที่สุด คือ ปลาดุกลูกผสม (hybrid catfish) ซึ่งได้จากการนำปลาดุกยักษ์เพศผู้ (*Clarias gariepinus*) มาผสมพันธุ์กับปลาดุกอุยเพศเมีย (*C. macrocephalus*) ได้ปลาลูกผสมที่เนื้อมึนรสชาติดี เลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตเร็ว อย่างไรก็ตาม การขยายตัวของการเลี้ยงแบบหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคตามมา ก่อให้เกิดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีจำนวนมากในการป้องกันและรักษาโรค ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญให้เกิดสารตกค้างในตัวปลา และส่งผลกระทบต่อมายังสุขภาพของผู้บริโภค (FAO, 2002)

พรีไบโอติก (prebiotic) เป็นสารอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ของสัตว์ แต่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์โดยการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นการช่วยส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้าน (Gibson and Roberfroid, 1995) โดย อินูลิน (inulin) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งในกลุ่มฟรุกแทน ซึ่งพรีไบโอติกที่นิยมใช้ในอาหารสำหรับสัตว์น้ำ โครงสร้างของอินูลินประกอบด้วย ฟรุกโตส และกลูโคส ยึดต่อกันด้วยพันธะ β -2,1 ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร แต่ถูกย่อยได้ที่ลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น บิฟิโดแบคทีเรีย (bifidobacteria) และกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ทำให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านี้เพิ่มจำนวนมากขึ้น (Roberfroid, 2002) แม้ว่าอินูลินได้ส่งผลกระทบในเชิงลบต่อการตอบสนองการเจริญเติบโตของปลาบางชนิด (Akrami *et al.*, 2013; Reza *et al.*, 2009) แต่ในหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอินูลินมีประสิทธิภาพต่อการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอด และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันให้กับปลาได้ เช่นในปลา Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) (Mahious *et al.*, 2006a) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Ibrahim *et al.*, 2010) ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Ortiz *et al.*, 2013) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) (Mousavi *et al.*, 2016) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลใดๆ เกี่ยวกับประสิทธิภาพผลของการเสริมอินูลินในอาหารสำหรับปลาดุกลูกผสม ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวาง และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงผลของการเสริมอินูลินในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาดุกลูกผสม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเพิ่มศักยภาพการเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การวางแผนการทดลองและการเตรียมอาหารทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 กลุ่มการทดลอง ในแต่ละกลุ่มการทดลองมี 3 ซ้ำ ได้แก่ กลุ่มที่ไม่มีการเสริมอินูลิน (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่มีการเสริมอินูลินที่ระดับ 1%, 2% และ 3% ตามลำดับ ส่วนผสมและองค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ของอาหารพื้นฐานได้แสดงใน Table 1 โดยวิเคราะห์ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (1990) อาหารทดลองทั้งหมดได้ถูกผลิตโดยใช้เครื่องอัดเม็ดอาหารชนิดเม็ดลอยน้ำ เม็ดอาหารมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร อาหารที่ผลิตได้จะถูกนำไปตากแดดให้แห้ง ประมาณ 2-3 วัน เมื่ออาหารแห้งดีแล้วจึงทำการบรรจุอาหารทดลองลงในภาชนะที่ปิดมิดชิด ซึ่งอาหารพื้นฐานในการทดลองครั้งนี้ได้มีระดับความชื้นในอาหารเท่ากับ 7% โปรตีนเท่ากับ 33.2% ไขมันเท่ากับ 6.9% เยื่อใยเท่ากับ 4.5% และเถ้าเท่ากับ 9.8%

2. ปลาทดลองและการเลี้ยงปลา

นำปลาดุกกลมผสม น้ำหนักเฉลี่ย 7.62-7.64 กรัม มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ ขนาด 2x2x1 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 12 บ่อ (3 ซ้ำ 4 กลุ่มการทดลอง) บ่อละ 30 ตัว สภาพบ่อทดลองมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำปริมาณ 1/3 ของน้ำที่มีอยู่ในแต่ละบ่อทุกสัปดาห์ ทำการเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองตามกลุ่มการทดลองโดยให้ปลากินอาหารจนอิ่ม วันละ 2 มื้อ เข้า-เย็น ตลอดการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สภาพอุณหภูมิน้ำตลอดการทดลองอยู่ในช่วงระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ อยู่ในช่วง 5.21-5.96 มิลลิกรัม/ลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7.42-8.01

3. การศึกษาผลของการเสริมอินูลินต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอด

เมื่อครบกำหนดการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ นับจำนวนปลาที่เหลือในทุกๆ ซ้ำของทุกกลุ่มการทดลองเพื่อคำนวณอัตราการรอด และสุ่มปลาจากแต่ละซ้ำของทุกกลุ่มการทดลองมาจำนวนซ้ำละ 4 ตัว ชั่งน้ำหนัก และทำการประเมินน้ำหนักสุดท้าย (final weight) น้ำหนักปลาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth; SGR) และชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือของแต่ละกลุ่มการทดลองเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio; FCR)

4. การศึกษาผลของการเสริมอินูลินต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาจากแต่ละซ้ำของทุกกลุ่มการทดลองมาจำนวนซ้ำละ 4 ตัว เพื่อวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณคอดหางปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งเลือดเป็น 2 ส่วน คือเลือดส่วนที่หนึ่งใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA (1.5 mg/เลือด 1 ml) นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บพลาสมาที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับวิเคราะห์ค่าอิมมูโนโกลบูลินรวม (total Ig) ตามวิธีการของ Siwicki *et al.* (1994) เลือดอีกส่วนหนึ่งไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บซีรัมที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าการทำงานของไลโซไซม์ (lysozyme activity) ตามวิธีการของ Pitaksong *et al.* (2013) และวิเคราะห์ค่า alternative complement haemolytic 50 activity (ACH50) ตามวิธีการของ Sunyer and Tort (1995)

Table 1 Ingredients and chemical composition (g kg⁻¹) of the basal diet

Ingredients	g kg ⁻¹
Fish meal	368
Soybean meal	249
Rice bran	119
Broken rice	149
Cassava chips	100
Soybean oil	10
Premix ¹	5
Proximate composition (g kg ⁻¹ dry weight)	
Dry matter	930
Crude protein	332
Crude lipid	69
Crude fibre	45
Crude ash	98
Nitrogen-free extract ²	386

Remark: ¹ Vitamin and trace mineral mix provided the following (IU kg⁻¹ or g kg⁻¹ diet): biotin, 0.125 g; folic acid, 0.0015 g; inositol, 0.125 mg; niacin, 0.0158 g; pantothenic acid, 0.015 g; vitamin A, 2500 IU; vitamin B1, 0.0013 g; vitamin B2, 0.0006 g; vitamin B6, 0.0038 g; vitamin B12 0.00003 mg; vitamin D3, 500 IU; vitamin K, 0.004 g; copper, 0.01 g; iron, 0.1 g; selenium, 0.15 mg; zinc, 0.16 g

² Nitrogen-free extract = dry matter - (crude protein + crude lipid + crude fibre + crude ash)

5. การศึกษาผลของการเสริมอินูลินต่อปริมาณประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

เมื่อครบกำหนดการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ทำการสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละซ้ำของทุกกลุ่ม การทดลองมาจำนวนซ้ำละ 4 ตัว เพื่อทำการศึกษาผลของการเสริมอินูลินในอาหารต่อปริมาณประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลา โดยการนำลำไส้ทั้งหมดมาบดให้ละเอียดด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique) หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการบดละเอียดแล้ว ตัวอย่างละ 0.5 กรัม มาเจือจางด้วย 0.9% NaCl ให้ได้ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10¹-10⁴ ด้วยวิธี Ten-fold serial dilution ตามวิธีการของ Leboffe and Pierce (2011) แล้วนำตัวอย่างของเหลวในลำไส้มา Spread plate (150 ไมโครลิตร) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (ศึกษาปริมาณประชากรแบคทีเรียรวมทั้งหมด), อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe agar (ประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria), อาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium agar (ประชากร *Bifidobacterium* spp.) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (ประชากร *Vibrio* spp.) อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-48 ชั่วโมง หลังจากบ่มเสร็จแล้วจึงทำการนับและคำนวณหาปริมาณเชื้อตามวิธีการของ Rawling *et al.* (2009)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองของข้อมูลสมรรถนะการเจริญเติบโต อัตราการอดประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

ผลการเสริมอินูลินในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการอดของปลาดุกลูกผสม (Table 2) พบว่าปลาที่ได้รับการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีผลทำให้ปลามีน้ำหนักตัวสุดท้าย น้ำหนักปลาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (WG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) สูงขึ้น และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ดีที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม สมรรถนะการเจริญเติบโตในด้านต่าง ๆ ของปลาดุกลูกผสมมีแนวโน้มลดลงตามระดับของการเสริมอินูลินที่เพิ่มขึ้น และมีค่าลดลงต่ำสุดในกลุ่มปลาที่ได้รับการเสริมอินูลินที่ระดับ 3% แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับอัตราการอดของปลาดุกลูกผสมจากทุกกลุ่มการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 12 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) Table 3 แสดงผลของการเสริมอินูลินในอาหารต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง พบว่าการเสริมอินูลินที่ระดับ 1% มีผลทำให้ค่าอิมมูโนโกลบูลินรวม ค่าการทำงานของไลโซไซม์ และค่า ACH50 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การเสริมอินูลินในอาหารต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลาดุกลูกผสม พบว่าปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมด แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria แบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. เพิ่มขึ้น และมีจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมอินูลินที่ระดับ 2% และ 3% มีจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) ดังแสดงใน Table 4

Table 2 Growth performance of hybrid catfish fed an experimental diets for 12 weeks (mean $\pm$ SD, $n = 4$)¹

Growth performance	Diet			
	Control	1%	2%	3%
Initial weight (g)	7.64 $\pm$ 0.37	7.62 $\pm$ 0.36	7.63 $\pm$ 0.38	7.62 $\pm$ 0.33
Final weight (g)	152.76 $\pm$ 5.18 ^b	169.85 $\pm$ 6.45 ^a	158.42 $\pm$ 5.06 ^{ab}	151.03 $\pm$ 5.40 ^b
Weight gain (g)	145.12 $\pm$ 5.33 ^b	162.23 $\pm$ 5.75 ^a	150.79 $\pm$ 4.89 ^{ab}	143.41 $\pm$ 5.13 ^b
SGR (% day ⁻¹)	3.33 $\pm$ 0.07 ^b	3.49 $\pm$ 0.05 ^a	3.37 $\pm$ 0.06 ^b	3.31 $\pm$ 0.07 ^b
FCR	1.39 $\pm$ 0.10 ^b	1.15 $\pm$ 0.11 ^a	1.28 $\pm$ 0.14 ^{ab}	1.41 $\pm$ 0.13 ^b
Survival rate (%)	93.33 $\pm$ 3.85	95.00 $\pm$ 1.92	94.17 $\pm$ 3.19	93.33 $\pm$ 2.72

¹ Means with different superscripts in each row differ significantly from each other ($P < 0.05$)

Table 3 Immunological parameters of hybrid catfish fed an experimental diet for 12 weeks (mean $\pm$ SD, $n = 4$)¹

Immunological parameter	Diet			
	Control	1%	2%	3%
Total Ig (g L ⁻¹)	24.70 $\pm$ 1.60 ^b	28.60 $\pm$ 1.70 ^a	27.50 $\pm$ 1.90 ^{ab}	24.30 $\pm$ 1.80 ^b
Lysozyme activity (μ g mL ⁻¹)	7.14 $\pm$ 0.93 ^b	9.26 $\pm$ 1.02 ^a	7.07 $\pm$ 0.97 ^b	6.98 $\pm$ 0.96 ^b
ACH50 (units mL ⁻¹)	199.94 $\pm$ 16.27 ^b	241.04 $\pm$ 14.38 ^a	208.90 $\pm$ 14.61 ^b	197.85 $\pm$ 12.09 ^b

¹ Means with different superscripts in each row differ significantly from each other ($P < 0.05$)

Table 4 Intestinal microbiota of hybrid catfish (log CFU g⁻¹) fed an experimental diets for 12 weeks (mean $\pm$ SD, $n = 4$)¹

Intestinal microbiota	Diet			
	Control	1%	2%	3%
Total bacteria	5.65 $\pm$ 0.17 ^b	5.97 $\pm$ 0.12 ^a	5.80 $\pm$ 0.15 ^{ab}	5.62 $\pm$ 0.16 ^b
Lactic acid bacteria	3.18 $\pm$ 0.10 ^b	3.46 $\pm$ 0.08 ^a	3.19 $\pm$ 0.11 ^b	3.07 $\pm$ 0.07 ^b
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4.61 $\pm$ 0.07 ^b	4.92 $\pm$ 0.09 ^a	4.63 $\pm$ 0.08 ^b	4.50 $\pm$ 0.06 ^b
<i>Vibrio</i> spp.	4.70 $\pm$ 0.11 ^a	4.35 $\pm$ 0.10 ^b	4.52 $\pm$ 0.13 ^{ab}	4.73 $\pm$ 0.09 ^a

¹ Means with different superscripts in each row differ significantly from each other ($P < 0.05$)

วิจารณ์ผล

การเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีผลทำให้ปลาอุกกลุ่มผสมมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากค่าน้ำหนักตัวสุดท้าย น้ำหนักปลาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ได้ทำการวัดตลอดการทดลองมีค่าดีกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ ซึ่งผลการศึกษารังนี้สอดคล้องกับการรายงานการศึกษาในปลาชนิดต่างๆ ได้แก่ ปลานิล ปลา Siberian sturgeon และปลา rainbow trout (Ibrahim *et al.*, 2010; Tiengtam *et al.*, 2015; Mahious *et al.*, 2006a; Ortiz *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตาม การเสริมอินูลินในอาหารกลับไม่มีผลต่อการตอบสนองของการเจริญเติบโตในปลา weaning turbot (*Psetta maxima*) และปลา hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) (Mahious *et al.*, 2006b; Burr *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเสริมอินูลินส่งผลกระทบต่อในเชิงลบต่อการตอบสนองของการเจริญเติบโตของปลา beluga (*Huso huso*) (Reza *et al.*, 2009) ซึ่งผลการเสริมอินูลินในอาหารต่อค่าสมรรถนะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน อาจเกิดจากความแตกต่างกันของชนิดปลา ระดับของการเสริมอินูลิน และช่วงระยะเวลาในการได้รับอาหารที่แตกต่างกัน โดยสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาอุกกลุ่มผสมจะมีแนวโน้มลดลงตามระดับของการเสริมอินูลินที่เพิ่มขึ้น และมีค่าลดลงต่ำสุดในกลุ่มปลาที่ได้รับการเสริมอินูลินที่ระดับ 3% ผลการเจริญเติบโตที่ลดลงนี้อาจเกิดจากจุลินทรีย์ในลำไส้ไม่สามารถหมักย่อยอินูลินในระดับที่สูงมากเกินไปได้และเกิดการสะสมภายในลำไส้ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อการดูดซึมสารอาหารของเซลล์ผนังลำไส้

การกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาโดยการใช้สารเสริมในอาหารเป็นที่ได้รับความสนใจมากสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ปลาอุกกลุ่มผสมที่ได้รับอาหารเสริมอินูลินที่ระดับ 1% มีผลทำให้ค่าภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ค่าอิมมูโนโกลบูลินรวม ค่าการทำงานของไลโซไซม์ และค่า ACH50 เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลานิลที่พบว่าการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 0.5% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น ค่าอิมมูโนโกลบูลินรวม ค่าการทำงานของไลโซไซม์ และค่า ACH50 ได้ (Tientam *et al.*, 2015) โดยพรีไบโอติกสามารถช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ได้ด้วยการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของประชากรแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ และมีผลต่อการทำหน้าที่ของตัวรับคาร์โบไฮเดรตบนเซลล์เยื่ออุ้งลำไส้ และเซลล์ภูมิคุ้มกัน (Seifert and Watzl, 2007) ซึ่งส่วนประกอบของเซลล์ เช่น lipopolysaccharides ของแบคทีเรียที่มีประโยชน์จะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ได้ (Bricknell and Dalmo, 2005) โดยความจริงแล้วแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria และแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. เป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถใช้ประโยชน์จากอินูลิน และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ (Kaplan and Hutkins, 2000; Roller *et al.*, 2004) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่จะถูกจัดให้เป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบนิเวศลำไส้ของสัตว์โดยการผลิตแบคทีริโอซิน (bacteriocins) กรดแลคติก และสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อโรคอื่น ๆ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Ringo *et al.*, 2010) จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปลาอุกกลุ่มผสมที่ได้รับการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกลุ่ม lactic acid bacteria จำนวนแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. เพิ่มขึ้น และจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับผลการศึกษาในปลาชนิดต่าง ๆ ก่อนหน้านี้ เช่น Reza *et al.* (2009) รายงานว่าการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในปลา beluga เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มควบคุม Mourino *et al.* (2012) พบว่าการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 0.5% เป็นเวลา 15 วัน มีผลทำให้จำนวนประชากรแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ในปลา hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Ortiz *et al.* (2013) พบว่าการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 0.5-1% เป็นเวลา 49 วัน สามารถลดจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในส่วนปลายของปลา rainbow trout จากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการเสริมอินูลินในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาอุกกลุ่มผสม โดยพบว่าระดับการเสริมอินูลินในอาหารที่ระดับ 1% มีประโยชน์ต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตและสุขภาพของปลาอุกกลุ่มผสมได้ดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจิตตา จำปา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการดูแลปลาและสถานที่ทดลอง ขอขอบคุณ ทีมนักวิจัยห้องปฏิบัติการอาหารและสุขภาพสัตว์น้ำ สาขาวิชาประมง คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและเป็นการกำลังใจในการทำงานเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- Akrami, R., Iri, Y., Khoshbavar R.H., and Razeghi, M.M. 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. Fish Shellfish Immunol. 35(4): 1235-1239.
- AOAC. 1990. AOAC Official methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 14th ed. AOAC, Arlington, VA. 70 p.
- Bricknell, I., and Dalmo, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 19: 457-472.
- Burr, G., Hume, M., Ricke, S., Nisbet, D., and Gatlin III, D. 2010. In vitro and in vivo evaluation of the prebiotics GroBiotic®-A, inulin, mannanoligosaccharide, and galactooligosaccharide on the digestive microbiota and performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). Microb. Ecol. 59: 187-198.
- FAO. 2002. Antibiotics residue in aquaculture products. Rome: The state of world fisheries and aquaculture. 168 p.
- Gibson, G.R., and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1401-1412.
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., and Abd, E.A. 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol. 29: 241-246.
- Information center of fisheries. 2016. Fisheries statistics of Thailand 2014. Department of fisheries, Bangkok, Thailand. Report No. 11/2016. [in Thai]
- Kaplan, H., and Hutkins, R.W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66(6): 2682-2684.
- Leboffe, M. J., and Pierce, B.E. 2011. A photographic atlas for the microbiology laboratory, 4th ed. Morton Publishing Company, New York, USA. 138 p.
- Mahious, A.S., Van Loo, J., and Ollevier, F. 2006a. Impact of the prebiotics, inulin and oligofructose on microbial fermentation in the spiral valve of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). In: Proceedings of the World Aquaculture Society Meeting. World Aquaculture Society and European Aquaculture Society, Florence, Italy, pp. 564-565.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Mètailler, R., and Ollevier, F. 2006b. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C 1758). Aquac. Int. 14: 219-229.

- Mourino, J.L.P., Vieira, F.N., Jatoba, A.B., Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., and Martins, M.L. 2012. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). *Aquac. Nutr.* 18: 73-80.
- Mousavi, E., Mohammadiarzam, H., Mousavi, S.M., and Ghatrami, E.R. 2016. Effects of inulin, savory and onion powders in diet of juveniles carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) on gut micro flora, immune response and blood biochemical parameters. *Turk. J. Fish. & Aquat. Sci.* 16(4): 831-838.
- Ortiz, L.T., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M.L., Treviño, J., Tejedor, J.L., and Alzueta, C. 2013. Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutr.* 19: 475-482.
- Pitaksong, T., Kupittayanant, P., and Boonanuntanasarn, S. 2013. The effects of vitamins C and E on the growth, tissue accumulation and prophylactic response to thermal and acidic stress of hybrid catfish. *Aquac. Nutr.* 19: 148-162.
- Rawling, M., Merrifield, D.L., and Davies, S.J. 2009. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture*. 294: 118-122.
- Reza, A., Abdolmajid, H., Abbas, M., and Abdolmohammad, A.K. 2009. Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, bodycomposition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (linnaeus, 1758). *J. World Aquac. Soc.* 40: 771-779.
- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., and Mayhew, T.M. 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac. Res.* 41(4): 451-467.
- Roberfroid, M.B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87(S2): S139-S143.
- Roller, M., Rechkemmer, G., and Watzl, B. (2004). Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J. Nutr.* 134(1): 153-156.
- Seifert, S., and Watzl, B. 2007. Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *J. Nutr.* 137: 2563S-2567S.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affect non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41: 125-139.

- Steel, R.G., and Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 2nd ed. McGraw-Hill, New York, USA. 633 p.
- Sunyer, J.O., and Tort, L. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of seabream, *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. Vet. Immunol. Immunopathol. 45: 333-345.
- Tiengtam, N., Khempaka, S., Paengkoum, P., and Boonanuntanasarn, S. 2015. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Anim. Feed Sci. Technol. 207: 120-129.

อัตราการเพาะฟัก ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของไข่หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) หลังสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร

Hatching rate, morphological characteristic and alteration of golden apple snail's egg (*Pomacea canaliculata*) after being exposed to agricultural chemicals
ชุตติมา ถนอมสิทธิ์^{1*} ลัดดาวรรณ บุญปก¹ ธนพงศ์ เปรียบเสนาดี¹ อำนวย วัฒนกรศิริ² หยาดเพชร โอเจริญ³
จักรพันธ์ นาน่วม⁴ วิชชุดา ประสาทแก้ว⁵ และ พอจิต นันทนาวัฒน์⁶

Chutima Thanomsit ^{1*}, Laddawan Boonpok¹, Thanapong Preabsenadee¹, Amnuay Wattanakornsiri ²,
Yhardpetch Ocharoen ³, Jakkaphun Nanuam⁴, Witchuda Prasatkaew ⁵ and Phochit Nanthanawat ⁶

¹Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus,
Surin 32000 Thailand

²Program of Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Surindra Rajabhat University, Surin 32000 Thailand

³Program of Environmental Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

⁴Program of Natural resources and Environment, Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo 27160
Thailand

⁵Department of Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Dhonburi Rajabhat University Samutprakan,
Samutprakan 10540 Thailand

⁶Department of Biotechnology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand

*Corresponding author email address, chutima.tn@rmuti.ac.th

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาการเพาะฟักไข่หอยเชอรี่ในสภาวะต่างๆ กัน โดยการทดลองจะแบ่งออกเป็น 5 ชุดคือ ไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ ไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 ppm ไชเปอร์เมทรินความเข้มข้น 0.26 ppm และเมทิลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.75 ppm โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตร ผลการศึกษาพบว่า ไข่หอยเชอรี่ทุกชุดการทดลองมีอัตราการเพาะฟักสูงกว่า 90% และไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม ($p \geq 0.05$) โดยอัตราการเพาะฟักในกลุ่มควบคุมเฉลี่ยคือ $94 \pm 1.97\%$ ส่วนไข่หอยที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ ไกลโฟเสท ไชเปอร์เมทริน และเมทิลดีไฮด์เฉลี่ย $98.05 \pm 1.30\%$, $92.88 \pm 3.16\%$, $94.32 \pm 3.46\%$ และ $94.12 \pm 3.20\%$ ตามลำดับ ลักษณะสัณฐานวิทยาของ ไข่หอยเชอรี่พบว่า การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไข่หอยเชอรี่จำแนกได้ 5 กลุ่ม คือ ลักษณะไข่ผิดปกติ เปลือกไข่ผิดปกติ ตัวอ่อนผิดปกติ เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และเกิดการเชื่อมกันของเซลล์เนื้อเยื่อ โดยพบว่าสารเคมีทางการเกษตรที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุดคือ สารกำจัดแมลงไชเปอร์เมทริน หลังจากทำการสกัดโปรตีนจากไข่หอยเชอรี่ 2 ระยะ คือ ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (สีชมพูเข้ม) และระยะก่อนการฟักตัวของไข่ (สีชมพูอ่อน) พบว่ารูปแบบโปรตีนที่แยกมีลักษณะแตกต่างกัน พบว่า Perivitellin (PV) จำนวน 3 isoform ขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีน 98, 67 และ 31 กิโลดาลตัน และ Ovorubin (Ov) ขนาด 28 กิโลดาลตัน ผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าไข่หอยเชอรี่มีความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรสูงมาก โดยไม่มีผลต่ออัตราการเพาะฟัก สามารถเป็นประโยชน์ในการประเมินประชากรหอยเชอรี่ในสิ่งแวดล้อม เพื่อแก้ไขปัญหาในเรื่องของการแพร่กระจายและการทำลายสัตว์ท้องถิ่นต่อไป

คำสำคัญ: อัตราการเพาะฟัก ยาฆ่าแมลง เพอร์โวเทลลิน หอยเชอรี่

Abstract

This research aimed to examine on the hatching rate of golden apple snail. Five experimental conditions which based on what snail exposed; (a) water, (2) 1 ppm of glyphosate, (3) 0.26 ppm of cypermethrin, (4) 0.75 ppm of metaldehyde and (5) the control (without any exposure). The results shown that hatching rate of the snail was higher than 90% no statistical difference compared to the control ($p \geq 0.05$). The hatching rate in control group was $94 \pm 1.97\%$ and the average rates found in exposure condition of water, glyphosate, cypermethrin and metaldehyde were $98.05 \pm 1.30\%$, $92.88 \pm 3.16\%$, $94.32 \pm 3.46\%$ and $94.12 \pm 3.20\%$, respectively. For morphological study, the alterations could be classified into 5 groups; abnormal egg, egg shell deformed, fetus abnormal, decomposed tissue and the connection of tissue cells. The agrochemical causing highest alteration was cypermethrin. After the protein of snail egg in both stages; early spawning (dark pink) and early hatchery stage (light pink) were extracted, we found the difference in protein form were occurred. The important proteins found were 3 types comprising; Perivitellin 2 (Pv2) and Ovorubin (Ov). For Perivitellin 2 (Pv2) their molecular weight of protein were 98, 67 and 31 kDa while it was 28 kDa for Ovorubin. From our results, it indicated that golden apple snail highly tolerates to agrochemicals of high hatching rate. Therefore, this findings can be useful in assessing golden apple snail wild population that causing original habitat degradation.

Keywords: Hatching rate; Insecticide; Perivitellin; Ovorubin

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีสิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์ต่างถิ่นอยู่มากกว่า 3,500 ชนิด และยังมีการนำเข้าอย่างต่อเนื่อง ด้วยหลายเหตุผลไม่ว่าจะด้วยความบังเอิญหรือจงใจก็ตาม แม้สิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์ต่างถิ่นบางชนิดจะมีประโยชน์ทั้งในด้านเศรษฐกิจ เกษตรกรรม และปศุสัตว์ เช่น พืชเศรษฐกิจ สมุนไพรรักษาโรค สัตว์เลี้ยง สัตว์เศรษฐกิจ รวมถึงการรวบรวมชนิดพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการอ้างอิงและขยายพันธุ์ในอนาคต อย่างไรก็ตามเมื่อสัตว์ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นเหล่านี้เมื่อนำเข้ามา และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและแพร่ขยายพันธุ์กลายเป็นชนิดพันธุ์ที่รุกรานได้ จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศ หรือทำให้เกิดการครองพื้นที่โดยชนิดพันธุ์เดียว ทำให้สิ่งมีชีวิตพื้นเมืองสูญพันธุ์ และสร้างผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพไปจนถึงการสาธารณสุข สิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจและสังคมได้ในที่สุด (Chalermchutipapha, 2010)

หอยเชอรี่ (Golden Apple Snail) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า หอยโข่งอเมริกาใต้ หรือเป่าฮื้อน้ำจืด จัดเป็นสัตว์ต่างถิ่นที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ และเข้ามาในประเทศไทยผ่านเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่นและประเทศฟิลิปปินส์ (Chankao, 2004) ในปี พ.ศ. 2553 มีรายงานว่าหอยเชอรี่ถูกจัดเป็นสัตว์ต่างถิ่นในลำดับที่ 11 ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับสัตว์พื้นเมืองต่าง ๆ เนื่องจากหอยเชอรี่มีอัตราการขยายพันธุ์ที่รวดเร็วเจริญเติบโตไว สามารถกินอาหารได้หลากหลายประเภท และมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีมากทำให้พบหอยเชอรี่ได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป (Chalermchutipapha, 2010) หอยเชอรี่เพศ

เมื่อยสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในฤดูฝนจะวางไข่ได้ 10-14 ครั้งต่อเดือน ลักษณะของไข่หอยเชอรี่คือไข่จะเป็นเม็ดเล็กๆ เกาะติดกันเป็นกลุ่มๆ ละประมาณ 300-3,000 ฟอง และไข่สามารถฟักเป็นตัวหอยได้ภายใน 7-12 วัน (Chooprateep, 2014) จึงทำให้หอยเชอรี่เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและสามารถแพร่กระจายไปสู่แหล่งน้ำและนาข้าวในพื้นที่ต่างๆ ได้ ดังนั้นหอยเชอรี่จึงกลายเป็นศัตรูพืชที่สำคัญในพื้นที่ทำการเกษตรและพื้นที่ที่ไม่ใช่พื้นที่การเกษตร ส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าว ผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ พืชน้ำ และสัตว์ชนิดอื่น รวมถึงยังส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาที่พบบ่อยในหอยโข่งพันธุ์พื้นเมือง เนื่องจากหอยโข่งพันธุ์พื้นเมือง *Pila ampullacea* Linnaeus, 1758 (Phosri and Laemkom, 2017) และหอยเชอรี่เป็นหอยในวงศ์เดียวกันมีความต้องการและมีบทบาทหน้าที่ในระบบนิเวศเหมือนกันจึงก่อให้เกิดภาวะการแข่งขันกันในระบบนิเวศ (Aroonsrimorakot *et al.*, 2002)

การกำจัดหอยเชอรี่วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ วิธีกล โดยการเก็บหอยทำลายด้วยการทำที่ดักหอยขณะปล่อยน้ำเข้านา รวมทั้งการใช้ใบไม้ เช่น ใบกล้วย และใบมะละกอเพื่อล่อให้หอยล่อให้หอยเข้ามากิน การกำจัดด้วยชีววิธีโดยการใช้ศัตรูธรรมชาติ เช่น เบ็ด นกกระยาง นกปากห่าง นกอีหลุม การใช้ปลาคาร์พและปลาดุกแอฟริกันกินหอยเชอรี่ (Teo, 2006) อย่างไรก็ตามวิธีต่างๆ ก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ที่สำคัญอาจไม่สามารถป้องกันได้ทันเวลา และยังคงใช้แรงงานและเวลามาก ดังนั้นการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดหอยเชอรี่จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง โดยใช้สารเคมีที่กำจัดหอยทาก (Molluscicide) ที่นิยมใช้กันมากคือเมทัลดีไฮด์ (Metaldehyde) แต่มีข้อเสียคืออาจก่อให้เกิดพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยิ่งไปกว่านั้นในบางพื้นที่มีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืชและใช้ผิดประเภทเพื่อควบคุมสัตว์ชนิดอื่นก็จะก่อให้เกิดการตกค้างของสารในกลุ่มดังกล่าวตามมา อย่างไรก็ตามหากใช้ความเข้มข้นไม่สูงพอก็อาจจะไม่ก่อให้เกิดการตาย แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม ดีเอ็นเอ หรือโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในและภายนอก ยิ่งไปกว่านั้นหากหอยเชอรี่มีความทนทานและเกิดการตายหลังจากได้รับสารเคมีในกลุ่มดังกล่าวก็จะทำให้เกิดการสะสม และถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร ซึ่งมนุษย์ที่เป็นผู้บริโภคลำดับสูงสุดก็จะได้รับผลกระทบต่อสุขภาพ (Thanomsit *et al.*, 2017)

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาการเพาะฟักและความทนทานของไข่หอยเชอรี่หลังจากได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ซึ่งยังไม่ได้มีรายงาน ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากหอยเชอรี่และการกำจัดหอยเชอรี่โดยใช้ชีววิธี การศึกษาถึงสภาวะการสัมผัสของสารเคมีทางการเกษตรแบบชั่วคราวจะทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้จริงในสภาพแวดล้อมทั่วไปเพราะในปัจจุบันการใช้สารเคมีทางการเกษตรพบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย สำหรับในการศึกษาค้นคว้านี้จะทำการตรวจสอบความทนทานของไข่หอยเชอรี่โดยประเมินจากอัตราการเพาะฟัก ลักษณะสัณฐานวิทยา และรูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่หอย เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการจัดการสิ่งแวดล้อมและการควบคุมประชากรหอยเชอรี่ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีทางการเกษตรที่นำมาใช้ในการศึกษาอยู่ในรูปแบบทางการค้าและอยู่ในรูปสารละลายคือ ไกลโฟเสท (ไอโซโพรพิลแอมโมเนียม 48% w/v, SL) ไซเปอร์เมทริน (ความเข้มข้น 25% w/v) ส่วนเมทิลดีไฮด์ (เมทิลดีไฮด์ 5 % GB) นั้นจะเป็นผลึกขนาดใหญ่ต้องนำมาละลายน้ำ สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำเจลลิเลคโตรโฟรีซิสเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Rad

2. สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการสุ่มเก็บไข่หอยเชอรี่ จากบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ โดยไข่หอยที่นำศึกษาจะมี 2 ระยะคือไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไข่มีสีชมพูเข้ม) และไข่ระยะที่เตรียมตัวฟัก (ฝักไข่มีสีชมพูอ่อน) โดยขนาดของฝักไข่หอยเชอรี่มีความกว้างโดยเฉลี่ย 1.70 ± 0.26 เซนติเมตร ความยาวโดยเฉลี่ย 3.98 ± 0.48 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 3.29 ± 0.76 กรัม ตามลำดับ โดยนำไข่หอยเชอรี่มาทำการฉีดพ่นและแช่ในน้ำที่มีสารเคมีทางการเกษตรซึ่งเป็นการได้รับสัมผัสแบบชั่วคราว หลังจากนั้นปล่อยให้ไข่และสารเคมีที่ละลายอยู่ค่อยๆ ระเหยไป โดยในการทดลองจะใช้สารเคมีทางการเกษตร 3 ชนิดคือ ไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทิลดีไฮด์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ โดยระดับความเข้มข้นที่ใช้จะอ้างอิงจากค่ามาตรฐานระดับความเป็นพิษสำหรับการศึกษาผลกระทบที่มีต่อสัตว์น้ำ

3. การศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของไข่หอยเชอรี่และ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่

ในการศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของไข่หอยเชอรี่นำไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไข่สีชมพูเข้ม) มาสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร คือ ไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 ppm ไซเปอร์เมทรินความเข้มข้น 0.26 ppm และเมทิลดีไฮด์ 0.75 ppm แบบชั่วคราวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ โดยในการศึกษาถึงเปอร์เซ็นต์การเพาะฟักนี้ไข่ถูกนำมาวางบนจานแก้วเพาะเชื้อและเตรียมน้ำที่มีสารเคมีทางการเกษตรโดยปริมาตรน้ำที่มีสารเคมีทางการเกษตรละลายอยู่จะถูกนำมาเติมลงไปลงในจานแก้วเพาะเชื้อโดยปริมาตรของน้ำคือ 20 มิลลิลิตร ในการศึกษาจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ตรวจสอบการฟักของไข่ทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราเปอร์เซ็นต์การฟักไข่จากแต่ละชุดการทดลองด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One Way Analysis of Variance ; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Minitab 18

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่นั้นทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า และทำการสุ่มไข่ที่มีการฟักครั้งละ 100 ฟอง จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อประเมินลักษณะอาการต่างๆ ที่เปลี่ยนไปเมื่อได้รับสัมผัสสารเคมีแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์อัตราการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของไข่และตัวอ่อนที่พบ

4. การสกัดไขหอยเชอรี่เพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนและการวัดปริมาณโปรตีน

นำไขหอยเชอรี่ทั้งสองระยะคือ ไขหอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไขมีสีชมพูเข้ม) และไขหอยเชอรี่ที่เตรียมตัวฟัก (ฝักไขมีสีชมพูอ่อน) มาบดให้ละเอียดในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.2 ที่มีส่วนผสมของ PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) และ Triton X-100 ในอัตราส่วนไขหอยเชอรี่ 1 กรัม ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ml หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 60 นาที ที่ความเร็วรอบ 350 RCF นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเทียบกับสารมาตรฐาน BSA

5. การศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ศึกษารูปแบบของโปรตีนจากไขหอยเชอรี่ด้วยเครื่อง mini PROTEIN® Tetra Cell โดยใช้ Separating gel 10 % และ Stacking gel 4% ปรับกระแสไฟฟ้าที่ต้องการแยกเป็น 110 โวลต์ ปล่อยให้แถบสีเคลื่อนที่ลงไปจนเกือบถึงปลายสุดของแผ่นเจล และแกะชุดกระจกออกมาหลังจากนั้นนำแผ่นเจลออกจากชุดกระจก ตัดส่วนของแผ่นเจลที่เป็น Stacking Gel ออก นำแผ่นเจลส่วนไปย้อมสี 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน หลังจากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น เพื่อดูแถบโปรตีนและบันทึกผลแถบโปรตีนที่พบเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล (Precision Plus Protein Standard Dual color, Bio-Rad) (ดัดแปลงจาก Thanomsit *et al.*, 2017)

ผลการวิจัย

1. อัตราการเพาะฟักของไขหอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ

การศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการเพาะฟักของหอยเชอรี่พบว่าหลังจากที่ไขหอยเชอรี่ได้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่างๆ แบบชั่วคราว และได้รับสัมผัสกับน้ำซึ่งใช้เป็นไข่เป็นตัวทำละลายสารเคมีเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าการฟักของไขหอยจะเกิดขึ้นในวันที่ 4 ของการศึกษา โดยการฟักจะใช้เวลาทั้งสิ้น 9 วัน (Figure 1) อัตราการฟักของไขหอยเชอรี่ในแต่ละกลุ่มที่ทำการศึกษายู่ในระดับสูง คือมากกว่า 90% โดยอัตราการเพาะฟักของไขในแต่ละกลุ่มมีค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยอัตราการเพาะฟักของไขหอยในกลุ่มควบคุมเท่ากับ $94 \pm 1.97\%$ ไขหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับน้ำเท่ากับ $98.05 \pm 1.30\%$ ไขหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับไกลโฟเสทมีค่าเท่ากับ $92.88 \pm 3.16\%$

ส่วนไขหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินมีค่าเท่ากับ $94.32 \pm 3.46\%$ และไขหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับเมทิลดีไฮด์จะมีค่าเฉลี่ยอัตราการเพาะฟักคิดเป็น $94.12 \pm 3.20\%$ (Figure 2) เมื่อทำการศึกษาถึงระยะเวลาการรวมของการฟักของไขหอยเชอรี่พบว่าหอยเชอรี่ในกลุ่มควบคุม (Figure 3) กลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ (Figure 4) และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0.26 ppm (Figure 6) นั้นจะเริ่มการฟักก่อนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับไกลโฟเสทและเมทิลดีไฮด์ โดยใช้เวลาดังแต่การฟักออกจากไข่จนถึงระยะที่มีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนและเป็นลูกหอยขนาดเล็กทั้งหมดเป็นเวลา 9 วัน ส่วนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับไกลโฟเสทระดับความเข้มข้น 1 ppm จะใช้เวลา 12 วัน (Figure 5) และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับเมทิลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.75 ppm จะใช้เวลาทั้งหมด 10 วัน (Figure 7)

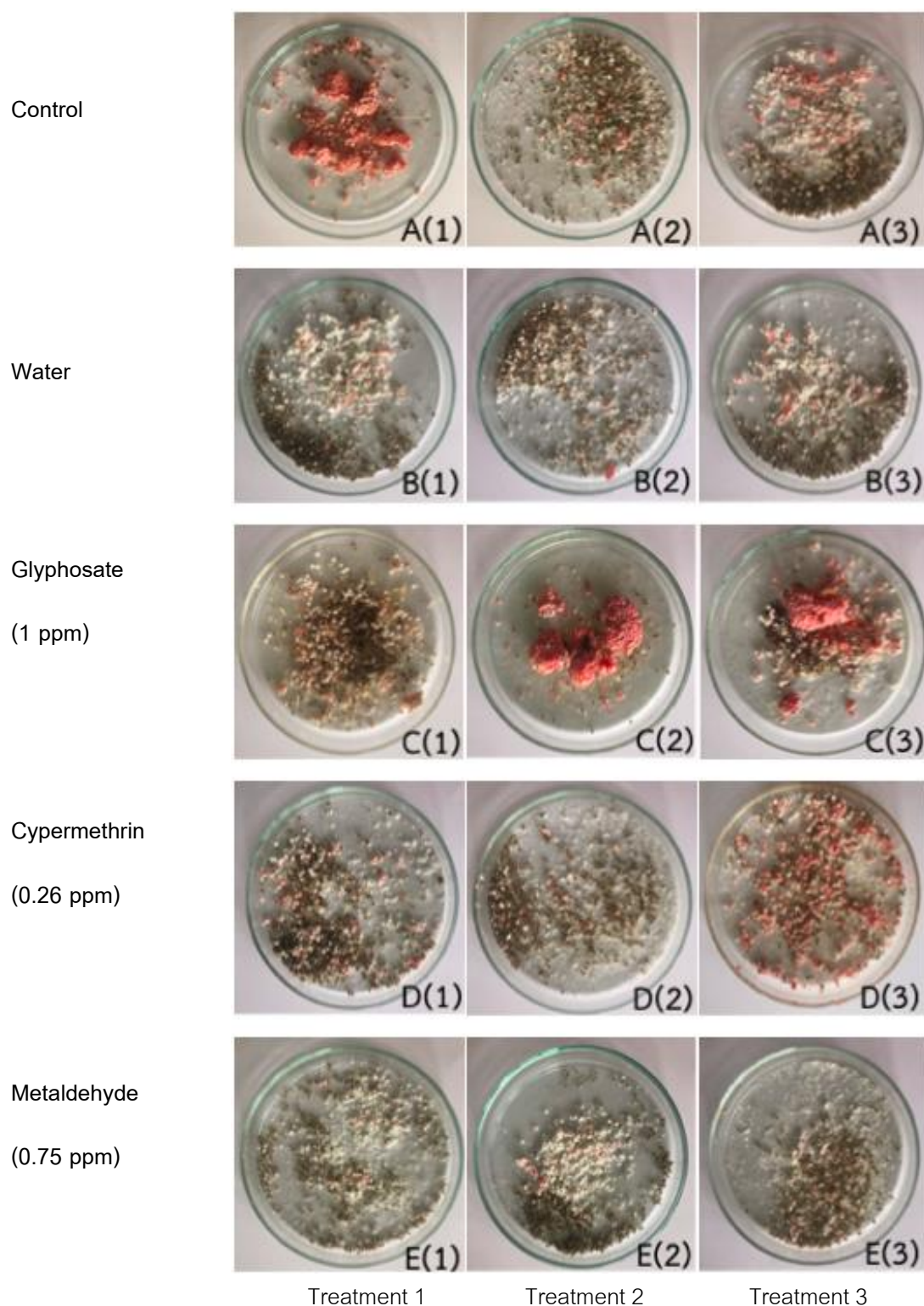


Figure 1 Hatching of apple snail egg after exposed to agro-chemicals (C, D and E) for 6 days comparing to the control group and water immersed group (6 days) (A and B)

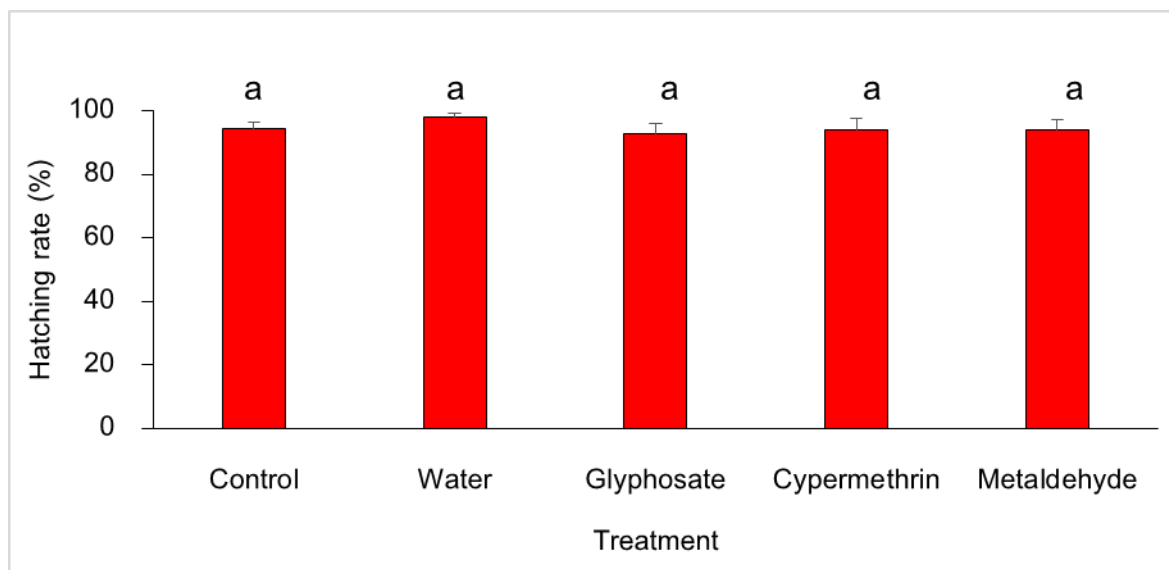


Figure 2 Hatching rate of golden apple snail after exposed to agro-chemicals comparing to the control group and water immersed group ($p=0.05$) (similar English letters means no statistically different calculated by using Minitab 18 software)

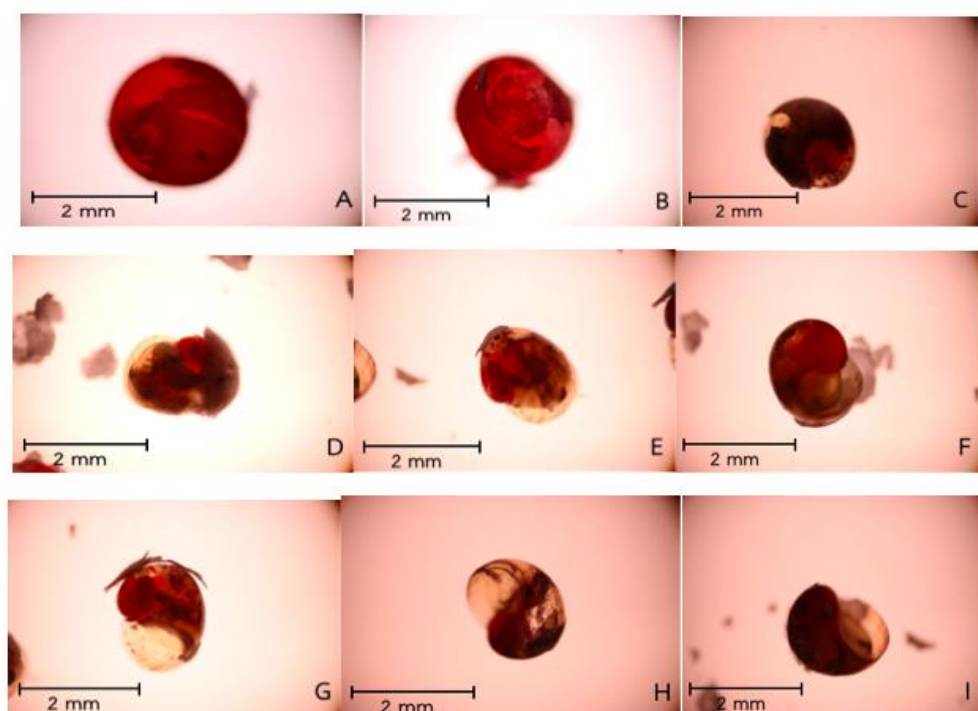


Figure 3 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the control group until the hatching stage. It took 9 days for hatching and developing the embryo (4 x)

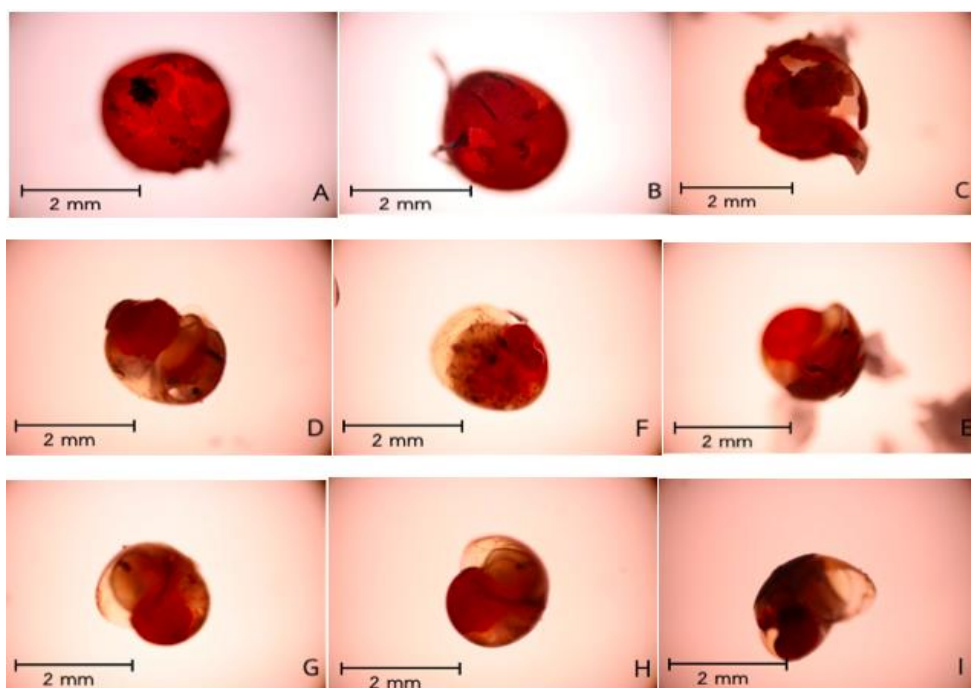


Figure 4 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the water immersed group until the hatching stage. It took 9 days for hatching and developing the embryo (4 x)

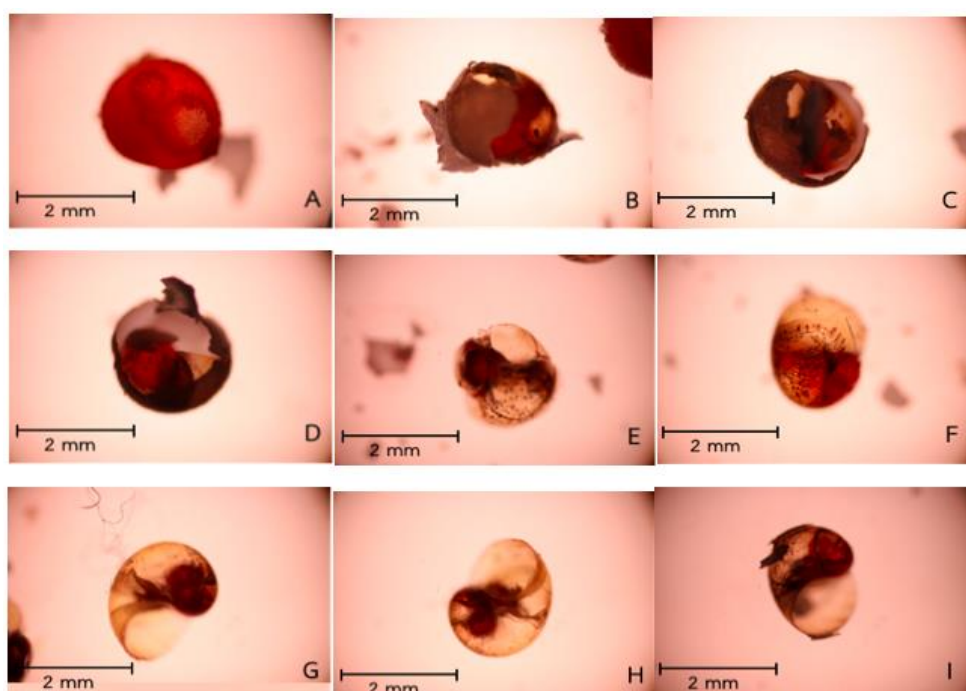


Figure 5 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the glyphosate-exposed group until the hatching stage. It took 12 days for hatching and developing the embryo (4 x)

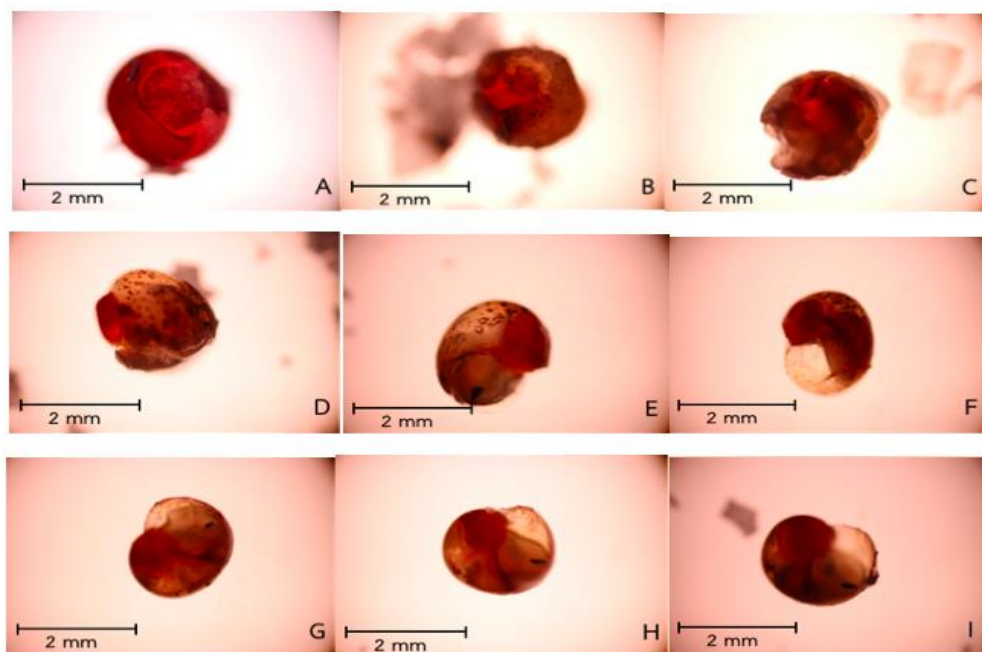


Figure 6 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the cypermethrin-exposed group until the hatching stage. It took 9 days for hatching and developing the embryo (4 x)

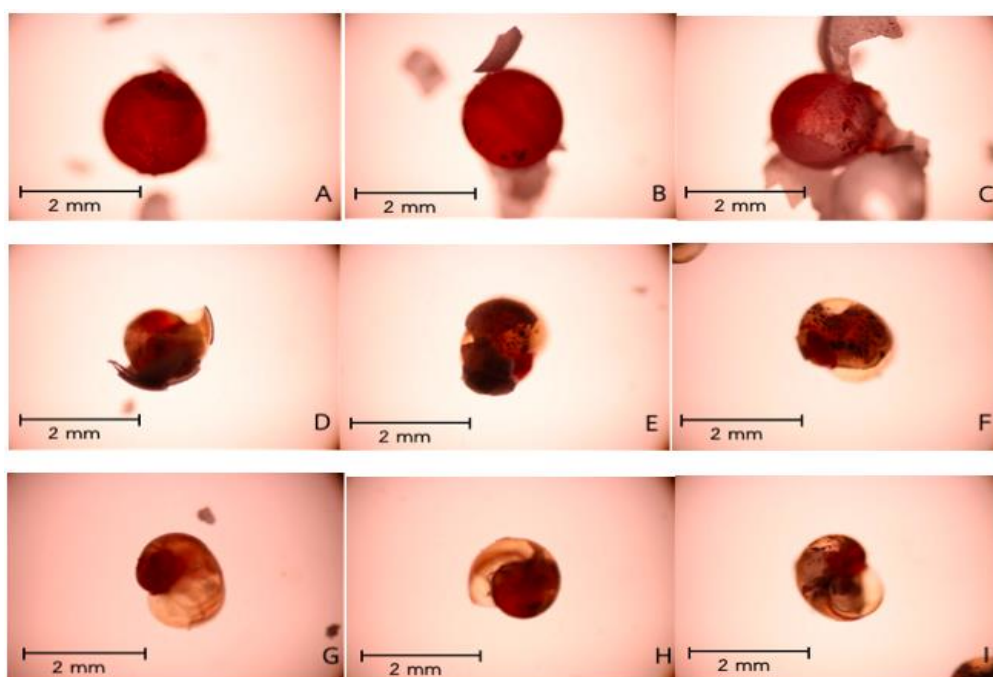


Figure 7 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the metaldehyde exposed group until the hatching stage. It took 10 days for hatching and developing the embryo (4 x)

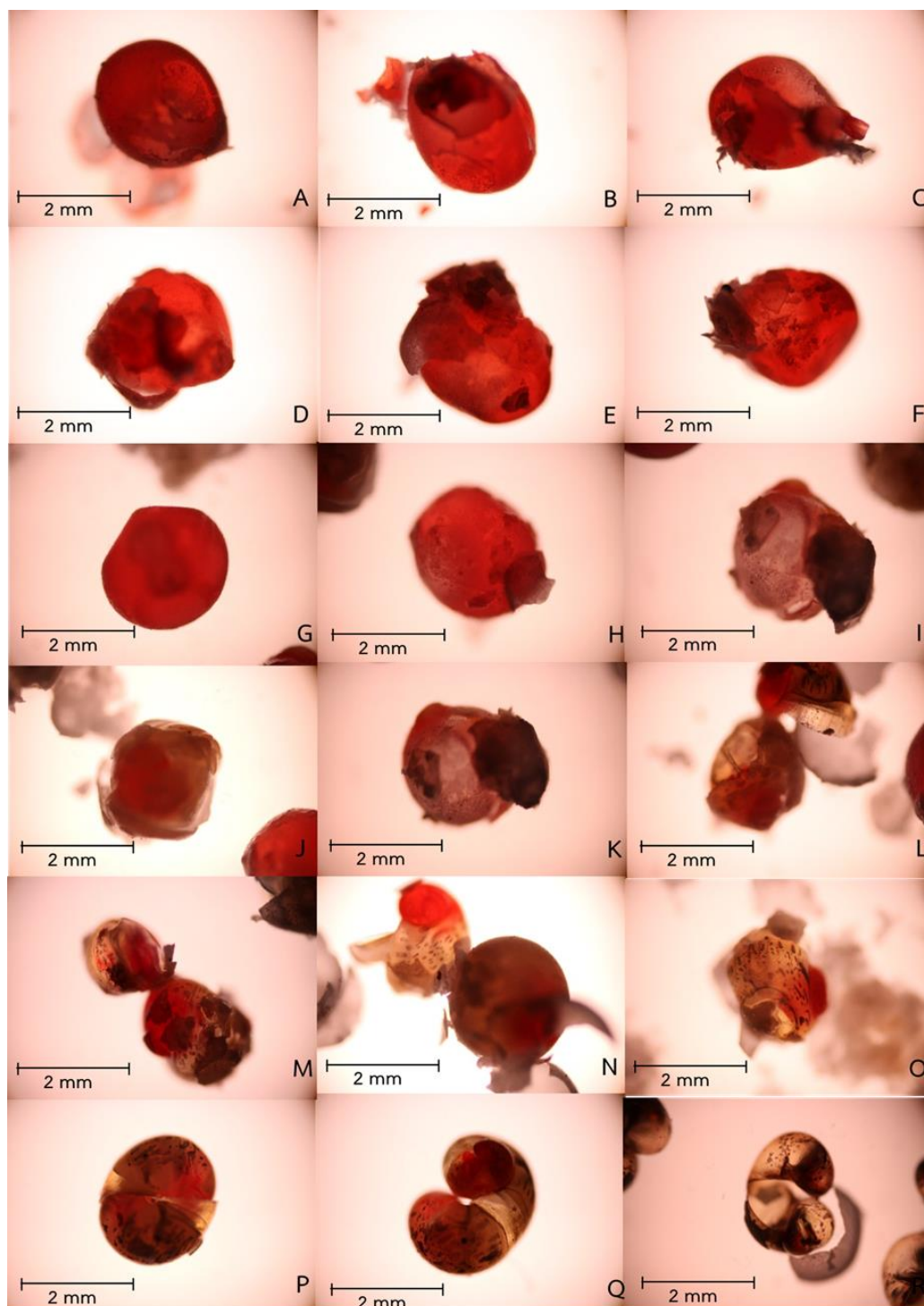


Figure 8 The symptoms noticed after exposure to agro-chemicals; abnormal eggs (I-K), abnormal eggshell (I-K), embryonic abnormalities (L-N), decayed tissue (O), and connected cellular (P-R) (4 x)

2. ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่

หลังจากที่นำไข่หอยเชอรี่มาเพาะฟักในสภาวะแวดล้อมต่างๆ โดยให้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่างๆ แบบชั่วคราว พบอาการผิดปกติที่ตรวจพบได้ในไข่หอยเชอรี่ตั้งแต่ฟัก พัฒนาเป็นตัวอ่อน จนกระทั่งกลายเป็นลูกหอยขนาดเล็ก (Figure 8) โดยพบว่าเมื่อได้รับสัมผัสสารในกลุ่มต่างๆ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 5 ลักษณะ คือ เกิดการผิดปกติของไข่และเปลือกไข่มีอาการผิดปกติโดยการมีเปลือกที่บางมาก ตัวอ่อนผิดปกติ เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และเกิดการเชื่อมกันหรือรวมตัวกันของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะอาการที่เกิดขึ้นพบว่าไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินจะแสดงอาการที่ผิดปกติมากที่สุด คือ ไข่ผิดปกติ $7.33 \pm 0.58\%$ เปลือกไข่ที่พบอาการปกติ $4.67 \pm 0.58\%$ ตัวอ่อนมีลักษณะผิดปกติคิดเป็น $2.67 \pm 0.58\%$ เกิดอาการเนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ยคิดเป็น $1.67 \pm 0.58\%$ และเกิดการเชื่อมกันของเซลล์ตัวอ่อนและเปลือกหอยคิดเป็น $1.33 \pm 0.58\%$ สำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ที่พบในกลุ่มควบคุมพบเพียงอาการผิดปกติของไข่คิดเป็น $1.33 \pm 0.58\%$ (Figure 9)

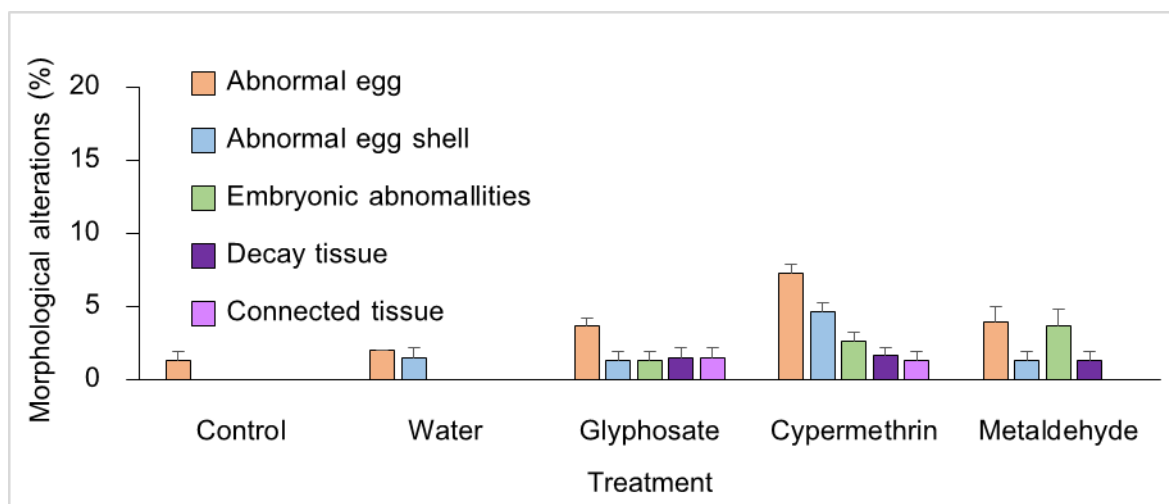


Figure 9 Morphological alterations of golden apple snail egg and its embryo after exposure to agricultural chemicals

3. ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่หอยเชอรี่

เมื่อทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่หอยเชอรี่ทั้งสองระยะ คือ ไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มการวางไข่ (ฝักไข่มีสีชมพูเข้ม : Figure 10 lane 2-4) และไข่ระยะที่เตรียมตัวฟัก (ฝักไข่มีสีชมพูอ่อน : Figure 10 lane 5-6) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Figure 10 lane 1) พบว่าไข่หอยระยะแรกซึ่งมีลักษณะเป็นสีชมพู เมื่อทำการสกัดพบว่าโปรตีนที่แยกได้จะมีหลายชนิดและมีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าไข่หอยเชอรี่ในระยะที่เตรียมจะฟักโดยโปรตีนหลักที่สำคัญที่พบในไข่หอยเชอรี่ในระยะแรกที่หอยวางไข่ได้แก่โปรตีน Perivitellin 2 ซึ่งมีทั้งหมด 3 form ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 98 kDa, 67 kDa และ 31 kDa ตามลำดับโดย Perivitellin 2 ที่เป็นโปรตีนหลักซึ่งมีขนาดโมเลกุล 67 kDa จะมีลักษณะเป็นแถบโปรตีนขนาดใหญ่และมีแถบหนากว่า

เมื่อเปรียบเทียบกับ Perivitellin 2 ที่มีโมเลกุลขนาด 98 และ 31 kDa ส่วนโปรตีนที่สำคัญที่พบเฉพาะในไข่หอยเชอรี่ระยะแรกที่หอยเชอรี่เริ่มวางไข่คือ Ovorubin ซึ่งมีขนาดแถบโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 28 kDa เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและรูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่ระยะแรกที่แม่หอยวางไข่กับไข่หอยระยะที่กำลังจะฟักนั้นพบว่าแถบโปรตีนและปริมาณโปรตีนที่พบในระยะที่ไข่กำลังจะฟักนั้นจะน้อยกว่า โดยไข่หอยที่กำลังจะฟักแถบโปรตีนหลักที่พบคือ Perivitellin 2 ที่มีขนาดโมเลกุล 67 kDa เท่านั้น และ Ovorubin ที่พบมีขนาดแถบโปรตีน 28 kDa ซึ่งลักษณะของแถบโปรตีนที่พบจะมีขนาดบางกว่าและมีสีซีดกว่า (Figure 10)

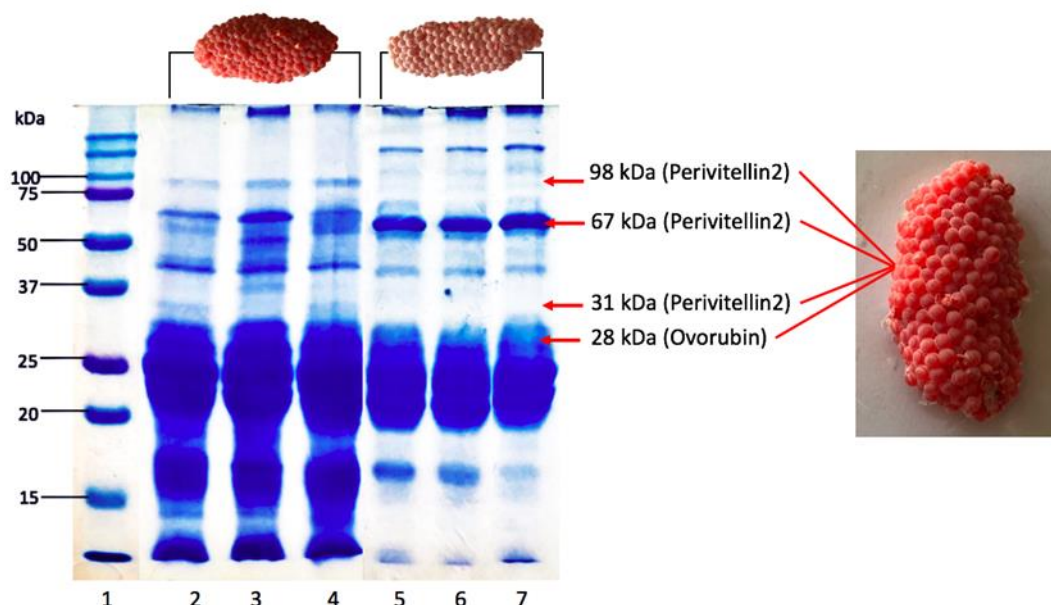


Figure 10 Form of protein extracted from golden apple snail egg which being examined by gel electrophoresis (10% SDS-PAGE); early egg laying (pink, lane 2-4) and Pre-hatching stage (light pink, lane 5-6) comparing to standard protein (lane 1). The important proteins found were Perivitellin (98 kDa, 67 kDa and 31 kDa) and Ovorubin (28 kDa)

อภิปรายผลการทดลอง

หอยเชอรี่ (Golden Apple Snail, *Pomacea canaliculata*) เป็นหอยฝาเดียวชนิดหนึ่ง มีถิ่นกำเนิดในแอฟริกาจัดเป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นที่รุกรานชนิดพันธุ์พื้นเมืองของไทย (Alien species) (Jintasataporn *et al.*, 2004) โดยทั่วไปแล้วหอยน้ำจืดถูกจัดว่าเป็นผู้บริโภคลำดับต้นในห่วงโซ่อาหารที่มีความเสี่ยงในการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อมทางผ่านการกินอาหาร เช่น การกรองกินแพลงตอนหรือกัดกินพืชน้ำต่างๆ รวมทั้งต้นข้าวในนาที่มีการใช้สารปราบศัตรูพืชฉีดพ่น นอกจากนี้ยังอาจได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชที่ละลายอยู่ในแหล่งน้ำสะสมในดินโคลนหรือตะกอนในแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ ยิ่งไปกว่านั้นหอยเชอรี่หรือหอยฝาเดียวชนิดต่างๆ จะอาศัยอยู่ในบริเวณแหล่งน้ำนิ่ง ซึ่งทำให้มีการสะสมของสารพิษและได้รับสัมผัสเป็นเวลานาน จึงถือเป็นสัตว์น้ำที่มีโอกาสได้รับและสะสมสารพิษไว้ในร่างกายได้มาก ดังนั้น หอยฝาเดียว เช่น หอยเชอรี่และหอยขมจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดของการรับสัมผัสสารเคมีหลายชนิด เช่น โลหะหนัก (Heavy metals) ไตรฟิวทิลิน

(Tributyltin) และยาฆ่าแมลง (Insecticide) เป็นต้น (Piyatiratitivorakul and Boonchamoi, 2008; Putkome *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2017). ในขณะเดียวกันการบริโภคหอยฝาดียจากบริเวณที่มีการใช้สารปราบศัตรูพืชจึงมีโอกาสที่ได้รับสารกำจัดศัตรูพืชผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ซึ่งอาจสะสมเป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Thanomsit *et al.*, 2017) หอยเชอรี่มีการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วมากกว่าหอยน้ำจืดชนิดอื่นๆ โดยไขหอยเชอรี่จะมีการฟักตัวอย่างรวดเร็วและมีไข่ในฝักไข่จำนวนมาก และที่สำคัญหอยเชอรี่มีการปรับตัวและแก่งแย่งพื้นที่ได้ดีกว่าหอยฝาดียพื้นเมืองบางชนิด เช่น หอยโข่ง จึงเป็นสาเหตุให้หอยในธรรมชาติบางชนิดลดลงเมื่อมีการเพิ่มจำนวนประชากรของหอยเชอรี่ (Phosri and Laemkom, 2017) สำหรับในประเทศไทยเบื้องต้นยังไม่มีรายงานถึงการฟักของไขหอยเชอรี่เมื่อสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรต่างๆ ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงเป็นการจำลองสภาพธรรมชาติเพื่อให้ทราบถึงความทนทานและความสามารถในการเพาะฟักของหอยเชอรี่และปัจจัยที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไปคือหากได้สัมผัสแต่ไม่ก่อให้เกิดการตายและเกิดการสะสมสารพิษไว้ในร่างกายก็อาจจะส่งผลต่อหอยและผู้บริโภค ซึ่งในปัจจุบันพบว่าประชากรในภาคอีสานมีการบริโภคหอยเชอรี่ด้วย ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาทั้งทางพิษวิทยาและสิ่งแวดล้อมรวมทั้งทรัพยากรประมงด้วยเพราะหอยเชอรี่คือสัตว์ต่างถิ่นที่นำเข้ามาในประเทศไทย ซึ่งหากประเมินถึงความหลากหลายทางชีวภาพก็จะมีผลกระทบในอนาคตอย่างแน่นอน

การศึกษ้อัตราการเพาะฟักของหอยเชอรี่เพื่อประเมินความทนทาน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อไขหอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรในชนิดต่าง ๆ โดยรูปแบบการได้รับสัมผัสเป็นแบบชั่วคราวนั้นพบว่าการศึกษาได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรต่าง ๆ คือ ไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทิลดีไฮด์ ไม่มีผลต่ออัตราการเพาะฟักไข่ แสดงให้เห็นว่าไขหอยเชอรี่มีความทนทานต่อการได้รับสัมผัสสารพิษสูง โดยจำนวนไข่ที่ฟักได้จะอยู่ในช่วง 690-747 ฟอง ในขณะที่การเลี้ยงหอย *C. ramosus* ในประเทศไทยในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนเมษายน พบว่าความสามารถในการฟักไข่ใน ห่อปฏิบัติการอยู่ระหว่าง 116-353 ฟอง แตกต่างจากไขหอยที่จากธรรมชาติที่จะมีการวางไข่ประมาณ 217-734 ฟอง (Nugranad, 1992) โดยปริมาณการฟักของไข่ที่ต่างกันของหอยเชอรี่และหอย *C. ramosus* ในห่อปฏิบัติการอาจเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างชนิด อย่างไรก็ตามขนาดของตัวอ่อนหอย *C. ramosus* ที่ฟักออกมาในวันที่ 15 จะมีขนาด 1.295 mm และ 1.375 mm เมื่อตัวอ่อนมีอายุประมาณ 20 วันซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในหอยเชอรี่ครั้งนี้ที่พบว่าตัวอ่อนของหอยและลูกหอยจะมีขนาดประมาณ 1.73 ± 0.29 mm

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อไขหอยเชอรี่และตัวอ่อนได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นคือ 1) ไข่มีลักษณะผิดปกติ 2) เปลือกไข่มีอาการผิดปกติ โดยการมีเปลือกที่บางมาก 3) การพัฒนาของตัวอ่อนผิดปกติโดยประเมินจากรูปร่าง 4) เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และ 5) เกิดการเชื่อมกันหรือรวมตัวกันของเซลล์นั้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแต่ละอาการที่ประเมินได้นั้นมีค่าไม่เกิน 10% ซึ่งทำให้เป็นที่น่าสังเกตว่าหอยเชอรี่มีการปกป้องกันตัวเองหรือมีความทนทานและการปรับตัวได้ดีมากแม้จะสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ โดยไขหอยเชอรี่นั้นมีโปรตีนที่สำคัญคือ Lipoprotein เช่น Perivitellin 2 และ Ovorubin (Dreon *et al.*, 2003) และเมื่อศึกษาถึงการวิเคราะห์เนื้อหาของ Perivitellin

2 และ Ovorubin พบว่าเป็นโปรตีนหลักที่มีความคงตัวสูง ทนทานต่อการถูกย่อยสลาย และทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงในช่วง pH ค่อนข้างกว้างคือ 4-10 (Cadierno *et al.*, 2017)

ไข่หอยเชอรี่จะมีสารพิษป้องกันตัวเองโดยชั้นแรกคือ สารที่เคลือบผิวของไข่ซึ่งเป็นโปรตีนที่ชื่อว่า Perivitellin 2 (PV2) ซึ่งสารนี้มีผลต่อโปรตีนที่ส่งต่อระบบประสาท (Neurotoxin) (Dreon *et al.*, 2013) ที่มีส่วนประกอบระหว่างแลคตินและ Pore-Forming chains โดยพบว่ามีการทำลายไข่หลังของหนูทดลอง ทำให้หนูอ่อนแรง และหากได้รับปริมาณที่สูงหนูอาจจะตายได้ อย่างไรก็ตาม Perivitellin 2 เป็นสารออกฤทธิ์ค่อนข้างช้า ดังนั้นไข่หอยจึงต้องมีสิ่งป้องกันตัวเองจากธรรมชาติและผู้ล่าเพิ่มอีกชั้น (Cadierno *et al.*, 2017) ซึ่งกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมของไข่หอยเชอรี่ชั้นที่กล่าวถึงนั้นก็คือการที่ไข่หอยเชอรี่มีสีชมพูแดง โดยสีนี้มาจากโปรตีนที่ชื่อว่า Ovorubin ซึ่ง Garin *et al.* (1996) รายงานว่า Ovorubin นี้เป็นโปรตีนที่พบในไข่ในสัดส่วนสูงถึง 65% มีหน้าที่สำคัญคือเป็นแหล่งอาหารและช่วยในการป้องกันตัวอ่อนโดย Ovorubin เป็นโปรตีนที่มีขนาด 28 ถึง 35 kDa

Horn *et al.* (2008) รายงานว่าธรรมชาติของหอยเชอรี่นั้นหอยเพศเมียมีพฤติกรรมที่พยายามจะวางไข่บนที่แห้งเพื่อหลบหนีจากศัตรูหรือผู้ล่า และยิ่งไปกว่านั้นหอยเชอรี่เพศเมียจำเป็นที่จะต้องวางไข่ในที่แห้งเพราะน้ำจะส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเลือกผ่านของผนังเซลล์ของไข่หอยและหากไข่หอยได้สัมผัสกับน้ำนั้นจะไปลดออกซิเจนที่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงจากอากาศ ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิส่งผลกระทบต่อการเพาะฟักหากมีการสัมผัสกับน้ำทั้งการแช่หรือลอยปริ่มน้ำก็จะทำให้อุณหภูมิในการบ่มฟักลดลงหากเปรียบเทียบเทียบกับอุณหภูมิของอากาศด้านบน แต่การศึกษารังนี้พบว่าไข่สามารถฟักตัวได้ตามปกติหากสัมผัสกับน้ำเพียงระยะสั้น โดยพบว่าหลังจากแช่ในน้ำเป็นเวลา 4 วัน จะเริ่มเกิดการฟักตัว และน้ำจะค่อย ๆ ระบายออกไปจากจานเพาะฟัก ทำให้น้ำซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ใต้น้อยลง ซึ่งแม้มีการฉีดพ่นน้ำลงไปบนจานเพาะฟักไข่หอยเชอรี่ก็ไม่มีผลให้อัตราการเพาะฟักเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามพบว่า Ovorubin ไม่มีผลต่อการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ Ovorubin จะมีความทนทานและคงตัวเมื่ออยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง (Frassa *et al.* 2010)

ลักษณะดังกล่าวจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ไข่หอยเชอรี่ทนทานเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม โดย Dreon *et al.* (2003) รายงานว่า Ovorubin เป็นโปรตีนหลักอีกหนึ่งชนิดที่พบในไข่ของหอยเชอรี่โดยเมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและ Immunoblot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Ovorubin ระดับการเจือจาง 1:1,000 พบว่า Ovorubin มี 3 isoform ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเป็น 35 kDa, 32 kDa และ 28 kDa ตามลำดับ (Dreon *et al.*, 2003) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้นี้ที่พบเพียง 1 isoform ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 28 kDa โดย Frassa *et al.* (2010) ทำการศึกษาถึงโครงสร้างและความคงตัวของสารพิษต่อระบบประสาทซึ่งพบในไข่ของหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) ซึ่งเป็น lipoprotein คือ Perivitellin 2 พบว่า Perivitellin 2 ที่แยกได้มี 3 ขนาดคือ 98 kDa, 67 kDa และ 31 kDa โดยแถบโปรตีนหลักมีขนาด 67 kDa และ 31 kDa เมื่อใช้ Proteinase K เป็นตัวเปรียบเทียบ (Frassa *et al.* 2010) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในครั้งนี้นี้ที่พบว่า Perivitellin 2 ที่แยกได้มี 3 ขนาดคือ 98 kDa, 67 kDa และ 31 kDa เช่นเดียวกับการศึกษาของ Dreon *et al.*, (2013) ที่

พบว่า Perivitellin 2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ส่งผลกระทบเป็นพิษต่อระบบประสาท (Neurotoxin) นั้นสามารถแยกได้จากไข่หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) โดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 67 kDa และ 31 kDa ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

การได้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรคือไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทิลดีไฮด์แบบชั่วคราว ไม่มีผลต่ออัตราการเพาะฟักไข่ของหอยเชอรี่ แสดงให้เห็นว่าไข่และตัวอ่อนหอยเชอรี่มีความทนทานต่อสารดังกล่าวค่อนข้างสูง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาหลังจากได้รับสัมผัสสารมีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากไข่ของหอยเชอรี่มีความสามารถในการป้องกันตัวเอง โดยมีการสร้างโปรตีน Perivitellin 2 และ Ovurubin เพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งผลการศึกษาการฟักไข่ของหอยเชอรี่ในห้องปฏิบัติการพบว่าขนาดของไข่หอยเชอรี่มีขนาดเล็กทำให้ไข่หนึ่งฝักสามารถฟักเป็นตัวอ่อนได้จำนวนมาก จึงเป็นข้อมูลที่ทำให้สามารถประเมินประชากรของหอยเชอรี่ต่อไปในอนาคตได้ เพราะแม้ว่าหอยเชอรี่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง แต่หากไม่มีการควบคุมก็จะทำให้สัตว์พื้นเมืองได้รับผลกระทบได้ รวมทั้งการที่ไข่หอยเชอรี่มีความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตร จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการสะสมของสารต่าง ๆ ในหอยเชอรี่ เนื่องจากปัจจุบันมีการนำหอยเชอรี่มาบริโภคเป็นอาหารมากขึ้น ซึ่งผู้บริโภคอาจจะได้รับผลกระทบเชิงลบต่อสุขภาพได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสุรินทร์

References

- Aroonsrimorakot, S., Sangnate V. and Pattanaplung, T. 2002. The utilization of endosulfan to eliminate golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in paddy field. Research report. Faculty of Environment and Resource Studies. Mahidol University. [in Thai]
- Chalermchutipapha, N. 2010. Alien species raids to destroy biodiversity. UPDATE. pp. 51-61. [in Thai]
- Chankao, S. 2004. Study of biodiversity of golden apple snail in central part of Thailand by polymerase chain reaction. Master of Education degree. Chemistry. Faculty of Science. Srinakharinwirot University. Bangkok. Pp. 61 [in Thai]
- Choostrateep, S. 2014. Duration against wetting-drying cycles of lateritic soil block using crushed golden apple snail shell and cement as a binder. School of Civil Engineering. Suranaree University. Pp 62. ([in Thai]

- Cadierno, M. P., Dreon, M. S. and Heras, H. 2017. Apple snail perivitellin precursor properties help explain predators' feeding behavior. *Physiological and Biochemical Zoology* 90(4), 461-470.
- Dreon, M., S., Heres, H., and Pollero, R., J. 2003. Metabolism of Ovourubin, the major Egg lipoprotein from the apple snail. *Molecular and cellular Biochemistry* 243, 9-14.
- Dreon, M., S., Frassa, M., v., Ceolin, M., Ituarte, S., Qiu, J., Sun, J., Fernandez, P., E. and Heras, H. 2013. Novel Animal Defenses Against Predation: A Snail Egg Neurotoxin Combining Lectin and Pore – Forming Chains That Resembles Plant Defense And Bacteria Attract Toxins. *PLUS /ONE*.
- Frassa, M., V., Ceolin, M., Dreon , M., S., and Heras , H. 2010. Structure and stability of the neurotoxin PV2 from the eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804. 1492-1499.
- Garin, C. F., Heras, H. and Pollern, R. J. 1996. Lipoprotein of the egg perivitellin fluid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology* 276, 307-314.
- Horn, K. C., Johnson, D., Boles, K. M., Moore, A., Sienann, E., and Gabler, C. A. 2008. Factors affecting hatching success of golden apple snail eggs: effect of water immersion and cannibalism. *The society of wetland Scientista* 28(2), 544-549.
- Jintasataporn, O., Tabthipwon, P. and Yenmark, S. 2004. *Macrobrachium rosenbergii*; *Pomacea canaliculata*; Fish meal; Feeds; Pepsin; Proteins; Digestibility; Growth; Feed conversion efficiency. *Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Agro-Industry*. Bangkok. pp 181-189. [in Thai]
- Martinez, M. L., Piol, M. N., Nudelman, N. S., and Guerrer, N. R. V. 2017. Tributyltin bioaccumulation and toxic effects in freshwater gastropods *Pomacea canaliculata* after a chronic exposure: field and laboratory studies. *Ecotoxicology* 26, 691-701.
- Nugranad, J.1992. Experimental rearing of *Chicoreus ramosus* larvae at Prachuap KhiriKhan Hatchery. *Phuket. Mar. Boil. Can. Spec. Publ.* 19. 53-64.
- Piyatiratitivorakul, P. and Boonchamoi, P. 2008. Comparative toxicity of mercury and cadmium to the juvenile freshwater snail, *Filopaludina martensi martensi*. *ScienceAsia* 34. 367-370.
- Phosri, D. and Laemkom, T. 2017. Study on Reproductive Biology and Some Relating Factors on Sexual Maturation of Thai Native Apple Snail (*Pila ampullacea* Linnaeus, 1758) in the Rice Field Si Muang Mai, Ubon Ratchathani Province. *Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University* 19(1), 123-137. [in Thai]

- Putkome, S., Cheevaporna, V., and Helandera, H. F. 2008. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity in the Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck) Exposed to Chlorpyrifos, Dichlorvos or Carbaryl Insecticides. *Environment Asia* 2, 15-20.
- Teo, S. S. 2006. Evaluation of different species of fish for biological control of golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck) in rice. *Crop Protection* 25. 1004-1012.
- Thanomsit, C., Maprajuab, A., Prasartkaew, W., Ocharoen, Y., Wattakornsiri, A., Nanuam, J and Nanthanawat, P. 2017. Application of Acetylcholinesterase as biomarker for pesticide exposure to reduce health risk in consuming Pond snail and Golden apple snail. *Proceeding of 8th Innovation and Technology conferences*. Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus, Surin. pp A221-A227. [in Thai]

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ aromatizable androgen, non aromatizable androgen และ aromatase inhibitor ต่อการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนา (*Monopterus albus*)

Efficacy comparison of aromatizable androgen, non aromatizable androgen and aromatase inhibitor induce sex reversal of female swamp eel (*Monopterus albus*) broodstock

ขจรเกียรติ ศรีนวลสม¹ และ รักพงษ์ เพชรคำ¹

Khajornkiat Srinuansom¹ and Rakpong Petkam¹

¹ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

¹ Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

Corresponding author: rakpong@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ aromatizable androgen (17 α -methyl testosterone; MT), non aromatizable androgen (17 α -methyl dihydrotestosterone; MDHT) และ aromatase inhibitor (fadrozole hydrochloride) ต่อการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนา แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1) ฉีดสารละลาย absolute ethanol: vegetable oil อัตรา 1: 10, 2) ฉีดฮอร์โมน MT, 3) ฉีดฮอร์โมน MDHT, 4) ฉีดฮอร์โมน MT ร่วมกับ fadrozole hydrochloride ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม และ 5) ฉีดสาร fadrozole hydrochloride โดยชุดการทดลองที่ 2-5 ฉีดฮอร์โมนหรือสารที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม เลี้ยงแม่พันธุ์ปลาไหลนาเป็นระยะเวลา 90 วัน สุ่มแม่พันธุ์ปลาไหลนาแต่ละชุดการทดลองมาศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์และวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเพศ (testosterone, 17 β -estradiol และ 11-ketotestosterone) ทุก 45 วัน ผลการศึกษาพบว่าการฉีดฮอร์โมน MT (aromatizable androgen) ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม ร่วมกับ fadrozole hydrochloride (aromatase inhibitor) ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ดีที่สุด โดยตรวจพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะ คือ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa

คำสำคัญ: แม่พันธุ์ปลาไหลนา, *Monopterus albus*, เปลี่ยนเพศ, ฮอร์โมนแอนโดรเจน

Abstract

This study aimed to compare among efficacy of aromatizable androgen (17 α -methyl testosterone; MT), non aromatizable androgen (17 α -methyl dihydrotestosterone; MDHT) and aromatase inhibitor (fadrozole hydrochloride) inducing sex reversal of female swamp eel (*Monopterus albus*) broodstock. Five treatments; 1) intraperitoneally injected with absolute ethanol: vegetable oil ratio 1: 10, 2 and 3) intraperitoneally injected with 40 μ g/ 1 g Body weight (BW) of MT and MDHT, 4) intraperitoneally injected with 40 μ g/ 1 g BW of MT mixed with 1 μ g/ 1 g BW of fadrozole

hydrochloride and 5) intraperitoneally injected with 40 μ g / 1 g BW of fadrozole hydrochloride, respectively, in a 90 days experimental period, were conducted. Gonadal histology and sex hormones (testosterone, 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone) of female broodstock were analyzed every 45 days. The results show that injection with 40 μ g / 1 g BW of MT (aromatizable androgen) mixed with fadrozole hydrochloride (aromatase inhibitor) 1 μ g / 1 g BW presented the best result on induction of female broodstock to male based on the evidence of testicular lobules with spermatogonia, spermatocyte, spermatid and spermatozoa. However, further study must be continued.

Keywords: Female broodstock, *Monopterus albus*, sex reversal, androgen

บทนำ

ปลาไหลนา (*Monopterus albus*) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่จัดอยู่ในวงศ์ Synbranchidae ครอบคลุม Synbranchiformes (Kottelat, 2001) พบทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในทุกภาคของประเทศไทย นิยมนำมาบริโภคอย่างแพร่หลายเพราะเนื้อปลามีรสชาติอร่อย (Pattani Inland Fisheries Research and Development Center, 2011) โดยมีปริมาณผลผลิตและมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี รวมปริมาณผลผลิตไม่ต่ำกว่า 1,600 เมตริกตันต่อปี มูลค่าไม่ต่ำกว่า 175 ล้านบาทต่อปี (Information and Communication Technology Center, Department of Fisheries, 2016)

ปลาไหลนามีระบบสืบพันธุ์แบบกะเทย (protogynous hermaphrodite) (Devlin and Nagahama, 2002) ในธรรมชาติแม่พันธุ์ปลาไหลนาเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เมื่อมีขนาดน้ำหนักตัวมากกว่า 300 กรัม หรือความยาวลำตัวมากกว่า 60 เซนติเมตร อายุประมาณ 3 ปีขึ้นไป (Jiwyam 2008; Kwanmuang *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการเพาะขยายพันธุ์

การศึกษาที่ผ่านมา Srinuansom (2017; unpublished data) ประยุกต์ใช้ฮอร์โมน 17 α -methyl testosterone (MT) ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม มาเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ผลการศึกษาพบหลังทำการฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 90 วัน แม่พันธุ์ปลาไหลนาเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ testicular lobule พัฒนาแทรกเต็มพื้นที่ gonadal lamellae มีลักษณะเป็น full cord และพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะ คือ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa ภายใน testicular lobule ดังนั้น มีความเป็นไปได้ที่แม่พันธุ์ปลาไหลนาที่เปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้นั้น สามารถนำมาใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการเพาะขยายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามแม่พันธุ์ปลาไหลนาเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ มีสัดส่วนเพียง 33.3% ส่วนแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่เหลือทั้งหมดเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ (66.6%) ทั้งนี้เนื่องจากฮอร์โมน MT มีคุณสมบัติเป็น aromatizable androgen บางส่วนอาจเปลี่ยนเป็นฮอร์โมน estrogen โดยการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 aromatase (P450arom) ผ่านกระบวนการ aromatization (Liu *et al.*, 2009) ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของฮอร์โมน MT ในการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ลดลง (Li *et al.*, 2006) และเมื่อพิจารณาการศึกษาของ Li *et al.* (2006) ที่ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ aromatizable androgen และ

nonaromatizable androgen ต่อการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลากระรังจุดแดง (*Epinephelus akaara*) ที่มีการสืบพันธุ์แบบ protogynous hermaphrodite เช่นเดียวกับปลาไหลนา พบการนำฮอร์โมน 17 α -methyl dihydrotestosterone (MDHT) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น nonaromatizable androgen หรือฮอร์โมน MT ใช้ร่วมกับ สาร fadrozole hydrochloride ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น aromatase inhibitor มาเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลากระรังจุดแดง ทำให้มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศดีกว่าการใช้ฮอร์โมน MT เพียงอย่างเดียว (Li *et al.*, 2006) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฮอร์โมน androgen ทั้งที่เป็น aromatizable androgen ได้แก่ ฮอร์โมน MT, nonaromatizable androgen ได้แก่ ฮอร์โมน MDHT และ aromatase inhibitor ได้แก่ fadrozole hydrochloride ต่อการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อร่นระยะเวลาที่แม่พันธุ์ปลาไหลนาเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้เร็วให้สั้นลง ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานไปประยุกต์ใช้เหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาเป็นพ่อพันธุ์ หรือปลาชนิดอื่นที่มีลักษณะชีววิทยาสืบพันธุ์ใกล้เคียงกัน เพื่อนำมาใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ ส่งผลให้เกิดการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงปลาให้สูงขึ้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างแม่พันธุ์ปลาไหลนา

รวบรวมแม่พันธุ์ปลาไหลนาขนาดน้ำหนักตัว 60-200 กรัม จากตลาดบางลำภู จังหวัดขอนแก่น มาพักในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.20x1.20 ตารางเมตร (ปริมาตรน้ำ 200 ลิตร) ความหนาแน่น 1 กิโลกรัม/ตารางเมตร เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่พักไว้ จำนวน 85 ตัว ซึ่งน้ำหนักและวัดความยาวลำตัวเริ่มต้นและสุ่มแม่พันธุ์ปลาไหลนา จำนวน 10 ตัว เจาะเลือดเก็บตัวอย่างพลาสมาไปวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเพศและเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ไปศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ก่อนเริ่มทำการทดลอง ส่วนแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่เหลือ จำนวน 75 ตัว สุ่มปล่อยลงในถังพลาสติคขนาด 50x80x40 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 15 ถังๆ ละ 5 ตัว (ปริมาตรน้ำ 30 ลิตร) พร้อมใส่ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร และความยาว 50 เซนติเมตร จำนวน 1 ท่อ เพื่อเป็นที่หลบซ่อน

การเตรียมฮอร์โมนทดลอง

นำฮอร์โมน MT (Cat. No. 69240, Sigma-Aldrich) และ MDHT (Cat. No. S1250010, Sigma-Aldrich) มาละลายใน absolute ethanol และเจือจางในน้ำมันพืช (vegetable oil) อัตรา 1: 10 (Kortner *et al.*, 2009) ส่วน fadrozole hydrochloride (Cat. No. F3806, Sigma-Aldrich) นำมาละลายร่วมกับฮอร์โมนใน absolute ethanol ก่อนเจือจางในน้ำมันพืช อัตรา 1:10 เช่นกัน เก็บสารละลายที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design; CRD) โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1) (ชุดควบคุม) ฉีดสารละลาย absolute ethanol: vegetable oil อัตรา 1: 10, 2) ฉีดฮอร์โมน MT, 3) ฉีดฮอร์โมน MDHT, 4) ฉีดฮอร์โมน MT ร่วมกับ fadrozole hydrochloride ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม (Li *et al.*, 2006) และ 5) ฉีดสาร fadrozole hydrochloride

นำแม่พันธุ์ปลาไหลนามาฉีดฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลองที่ระดับเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม (Srinuansom, 2017) บริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) (Zhuo *et al.*, 2008) โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 30Gx^{1/2} (0.3x13 มิลลิเมตร) ฉีดฮอร์โมนปริมาตร 5 ไมโครลิตร/น้ำหนักปลา 1 กรัม (Tao *et al.*, 1993) เลี้ยงแม่พันธุ์ปลาไหลนาเป็นระยะเวลา 90 วัน (เดือนมีนาคม-พฤษภาคม 2560) โดยให้ปลาชีว ปลาแป้นแก้ว และกุ้งฝอย เป็นอาหารตลอดการทดลอง อัตรา 3-5% ของน้ำหนักตัวปลา วันละ 1 ครั้ง เวลาประมาณ 17.00–18.00 น. (Cao *et al.*, 2008) เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2–3 วัน และให้ระบบลมตลอดการทดลอง จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างแม่พันธุ์ปลาไหลนาแต่ละถึงพลาสติกๆ ละ 2 ตัว (รวมตัวอย่างทั้งหมดชุดการทดลองละ 6 ตัว) มาเก็บตัวอย่างพลาสมาและอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเพศและจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยเก็บข้อมูลทุก 45 วัน จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

การศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadal histology)

เก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์ปลาไหลนา (ส่วนต้น กลาง และปลาย) มาแช่ใน Bouin's solution เพื่อรักษาสภาพ จากนั้นเตรียมชิ้นเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ตามขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ นำไปฝังในพาราฟินและตัดเนื้อเยื่อขนาดความหนา 4-6 ไมโครเมตร หลังจากนั้นย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย haematoxylin และ eosin (H&E) แล้วนำสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ที่ได้ มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CH30) ที่กำลังขยาย 100 และ 400 เท่า เพื่อจัดจำแนกเพศ (Chan and Phillips, 1967; Chan *et al.*, 1972; Tang *et al.*, 1974; Tao *et al.*, 1993)

การเก็บตัวอย่างพลาสมา (blood plasma) และวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเพศ

นำตัวอย่างแม่พันธุ์ปลาไหลนามาทำให้สลบโดยแช่ในน้ำแข็ง ประมาณ 10 นาที จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 26Gx1 (ขนาด 0.45x25 มิลลิเมตร) ที่เคลือบด้วย EDTA (ความเข้มข้น 0.5 M) เจาะเลือดแม่พันธุ์ปลาไหลนาจากเส้นเลือด ventral aorta นำเลือดที่ได้ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centurion, K240R) ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที (Nozu *et al.*, 2009) จากนั้นดูดแยกตัวอย่างพลาสมาใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเพศต่อไป โดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน testosterone (T) และ 17 β -estradiol (E₂) ด้วยวิธี radioimmuno assay (RIA) (Tao *et al.*, 1993) โดยใช้ชุดทดสอบ TESTO-CT2 kit (¹²⁵I-Testosterone) (lower detection limit = 0.08 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) (Cisbio Bioassays, Codolet, France) และ ESTR-CTRIA kit (Estradiol-¹²⁵I) (lower detection limit = 0.008 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) (Cisbio Bioassays, Codolet, France) ตามลำดับ และฮอร์โมน 11-keto testosterone (11-KT) ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Asahina *et al.*, 1995) โดยใช้ชุดทดสอบ Fish 11-keto Testosterone ELISA Kit (lower detection limit = 0.02 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) (Cat. No. MBS269932-96, MyBioSource, San Diego, USA)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบการแจกแจงแบบปกติของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 กลุ่ม ด้วยวิธี Independent-samples t-test และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนก

ทางเดียวของข้อมูลแต่ละชุดการทดลอง (One-way analysis of variance) เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลแต่ละชุดการทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษากายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์ปลาไหลนาก่อนและหลังทำการฉีดฮอร์โมน MT, MDHT และ fadrozole hydrochloride ในแต่ละชุดการทดลอง แสดงใน Table 1 และ Figure 1

Table 1 Effects of MT, MDHT and fadrozole hydrochloride induce sex reversal of female swamp eel (*Monopterus albus*) broodstock at 45 and 90 days

Treatments	No. of Fish	45 days											
		Female stage					Intersex stage				Male stage		
		F1	F2	F3	F4	%	I1	I2	I3	%	M1	M2	%
Fish before injection with androgen (initial time)	10	5	5			100							
1) Absolute ethanol: vegetable oil (1: 10)	6		4	1	1	100				0			0
2) MT (40 µg /g)	6		3			50	1	1		33.3	1		16.7
3) MDHT (40 µg /g)	6		3			50		1	2	50			0
4) MT (40 µg /g) + fadrozole hydrochloride (1 µg /g)	6		2			33.3	1		2	50		1	16.7
5) fadrozole hydrochloride (40 µg /g)	6		3	1		66.6		1		16.7		1	16.7
Fish before injection with androgen (initial time)	-												
1) Absolute ethanol: vegetable oil (1: 10)	6		2	2	2	100				0			0
2) MT (40 µg /g)	6		1	1	2	66.6	1			16.7		1	16.7
3) MDHT (40 µg /g)	6			1	3	66.6		1	1	33.3			0
4) MT (40 µg /g) + fadrozole hydrochloride (1 µg /g)	6			3		50	1	1		33.3		1	16.7
5) fadrozole hydrochloride (40 µg /g)	6		1	2		50	1	2		50			0

Note: F1-F4; female stage; gonad with oocyte of perinucleolus stage (F1), cortical alveoli stage (F2), vitellogenic stage (F3) and maturation stage (F4), respectively. I1-I3; intersex stage; formation of small testicular lobules and spermatogonia in the inner region of gonadal lamellae (I1), development of testicular lobule in the gonadal lamellae and degeneration of ovarian follicles (I2), gonad with a very last stage of sex reversal leading to the formation of a "half cord" male (I3). M1-M2; male stage; gonad with gonadal lamellae of a "full cord" male, complete disappearance of ovarian structures and gonad constituted only testicular tissues (M1), testicular lobules with spermatogonia, spermatocyte, spermatid and spermatozoa (M2).

จาก Table 1 พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่สุ่มมาเริ่มต้น จำนวน 10 ตัว มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียทั้งหมด (Figure 1a-c) และหลังจากฉีดฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 1 มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียทั้งหมด ขณะที่แม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2-5 พบมีการเปลี่ยนเพศจากระบบสืบพันธุ์เพศเมียเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ หรือระบบสืบพันธุ์เพศผู้

ลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์แม่พันธุ์ปลาไหลนาที่ตรวจพบ แบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ 1) ระยะเวลาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ และเพศผู้ ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งมีรายละเอียดคือ 1) ระยะเวลาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (female stage; F) พบ 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (F1) oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ระยะ perinucleolus stage, ระยะที่ 2 (F2) oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ระยะ cortical alveoli stage, ระยะที่ 3 (F3) oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ระยะ vitellogenic stage และระยะที่ 4 (F4) oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ระยะ maturation stage ตามลำดับ (Figure 1a-c) ขณะที่ 2) ระยะเวลาที่มีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ (intersex stage; I) พบ 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (I1) พบเซลล์ oocyte ที่เจริญพัฒนาระยะต่างๆ อยู่รอบด้านนอก gonadal cavity และปรากฏ testicular lobule และเซลล์ spermatogonia พัฒนาเล็กน้อยแทรกอยู่ตามแนวขอบด้านในของ gonadal lamellae, ระยะที่ 2 (I2) มีการเสื่อมสลายของเซลล์ primary oocyte (follicular atresia) รังไข่หดหายเหลือเพียงผนังรังไข่ มีการพัฒนาของ testicular lobule แทรกใน gonadal lamellae และมีการพัฒนาของเซลล์ Leydig cell หรือ interstitial cell ระหว่าง interstitial fibroblast ใน gonadal lamellae และระยะที่ 3 (I3) เนื้อเยื่ออันทะพัฒนาขยายแทรกเข้ามาด้านในของ gonadal lamellae ทำให้ gonadal lamellae มีลักษณะเป็น “half cord” พบเซลล์ spermatogonia แพร่กระจายทั่วอวัยวะสืบพันธุ์ (Figure 1d-f) และ 3) ระยะเวลาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ (male stage; M) พบ 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (M1) testicular lobule พัฒนาแทรกเต็มพื้นที่ gonadal lamellae ทำให้ gonadal lamellae มีลักษณะเป็น “full cord” พบเซลล์ Sertoli cell, Leydig cell และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะ spermatogonia และ spermatocyte ภายใน lobule และระยะที่ 2 (M2) ภายใน testicular lobule พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะ คือ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa (Figure 1g-i)

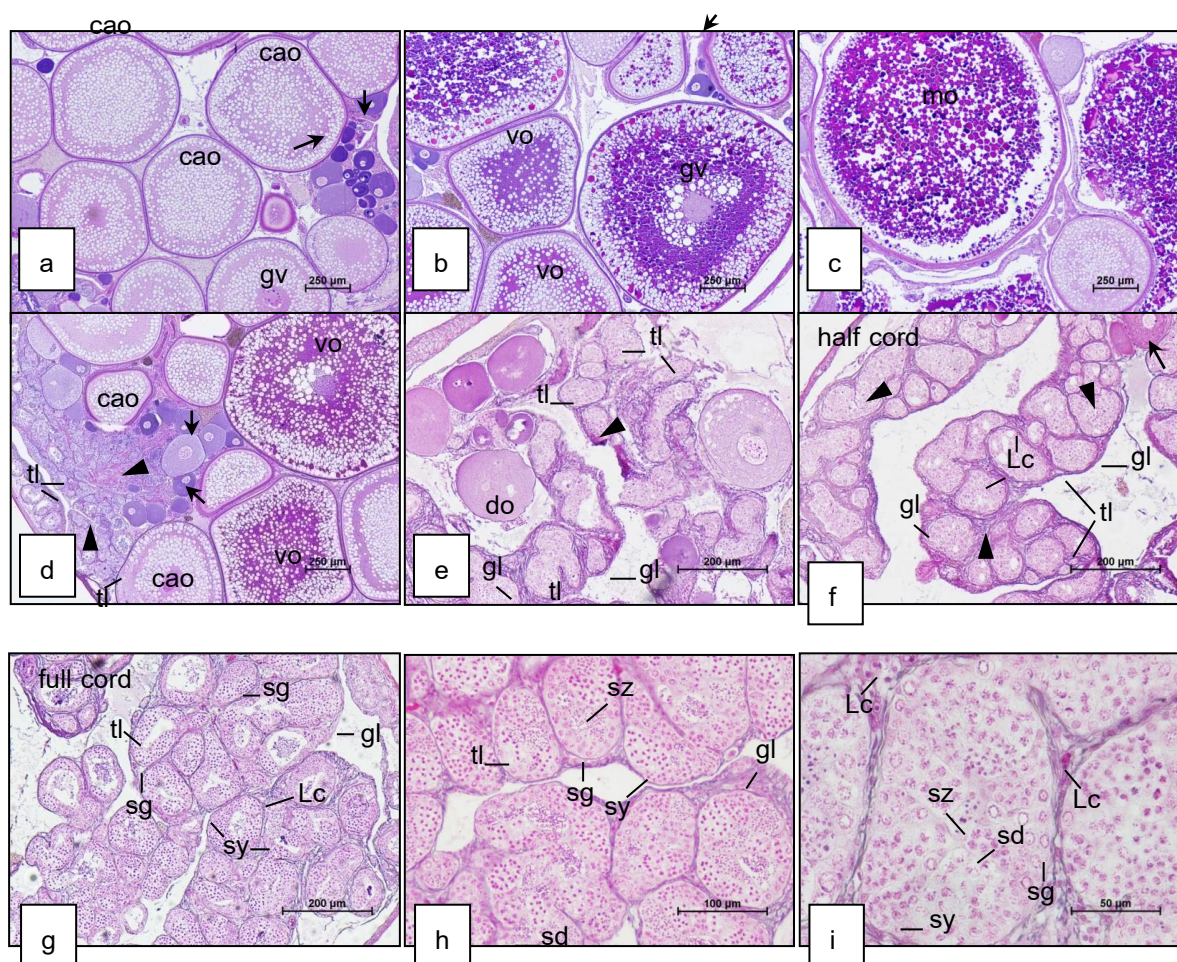


Figure 1 Transverse sections of female *M. albus* broodstock ovary. Female stage (a-c); (a) gonad with oocyte of cortical alveoli stage (F2), (b) vitellogenic stage (F3) and (c) maturation stage (F4), respectively. Intersex stage (d-f); (d) formation of small testicular lobules and spermatogonia in the inner region of gonadal lamellae (I1), (e) development of testicular lobule in the gonadal lamellae and degeneration of ovarian follicles (I2), (f) gonad with a very last stage of sex reversal leading to the formation of a “half cord” male (I3). Male stage (g-i); (g) gonad with gonadal lamellae of a “full cord” male, complete disappearance of ovarian structures and gonad constituted only testicular tissues (M1), (h, i) testicular lobules with spermatogonia, spermatocyte, spermatid and spermatozoa (M2). cao: cortical alveoli oocyte, gv: germinal vesicle, vo: vitellogenic oocyte, mo: mature oocyte, tl: testicular lobule, do: degenerating oocyte, gl: gonadal lamellae, Lc: Leydig cell, sg: spermatogonia, sy: spermatocyte, sd: spermatid, sz: spermatozoa, arrows: perinucleolus oocyte, arrowhead: spermatogonia. H&E stain, Olympus; model CH30 x 400.

เมื่อพิจารณา Table 1 พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2 และ 4 เปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ จำนวน 1 ตัว (คิดเป็น 16.7%) หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน เมื่อพิจารณาลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่เปลี่ยนเพศ พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2 มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พัฒนาอยู่ระยะที่ 1 (M1) คือ testicular lobule พัฒนาแทรกเต็มพื้นที่ gonadal lamellae ทำให้ gonadal lamellae มีลักษณะเป็น “full cord” พบเซลล์ Sertoli cell, Leydig cell และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะ spermatogonia และ spermatocyte ภายใน testicular lobule หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 45 วัน และมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พัฒนาอยู่ระยะที่ 2 (M2) พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะ คือ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa ภายใน testicular lobule หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 90 วัน ขณะที่จุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 4 มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ พัฒนาอยู่ระยะที่ 2 (M2) หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาสัดส่วน (จำนวนตัว หรือ %) แม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2 และ 4 ที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียและระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 90 วัน พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2 มีสัดส่วน 4 (66.6%): 1 (16.7%) ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามาก (สำหรับระบบสืบพันธุ์เพศเมีย) และค่าน้อย (สำหรับระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ) เมื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 4 คือ มีสัดส่วน 3 (50.0%): 2 (33.3%) ตามลำดับ

ดังนั้นจากจำนวนแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่เปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ หรือระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ และจำนวนที่เหลือของแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่ยังคงมีระบบสืบพันธุ์เพศเมีย หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน ตามลำดับ พบการใช้ฮอร์โมน MT (aromatizable androgen) ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม ร่วมกับ fadrozole hydrochloride (aromatase inhibitor) ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม (ชุดการทดลองที่ 4) มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ดีที่สุด รองลงมา คือ การใช้ฮอร์โมน MT (ชุดการทดลองที่ 2), fadrozole hydrochloride (ชุดการทดลองที่ 5) และ MDHT (ชุดการทดลองที่ 3) เพียงอย่างเดียว ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2006) ที่ศึกษาฝั่งฮอร์โมน MT และ MDHT ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม หรือฮอร์โมน MT ใช้ร่วมกับ fadrozole hydrochloride ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ให้กับแม่พันธุ์ปลากะรังจุดแดง (*E. akaara*) เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบสามารถเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลากะรังจุดแดงให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ และการฝั่งฮอร์โมน MT ใช้ร่วมกับ fadrozole hydrochloride มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลากะรังจุดแดงดีกว่าการใช้ฮอร์โมน MT เพียงอย่างเดียว

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Piferrer *et al.* (1994) ที่นำลูกปลาแซลมอน (*O. tshawytscha*) หลังฟักออกเป็นตัวแล้วปรับปรุงพันธุกรรมให้มีระบบสืบพันธุ์เพศเมีย มาแช่ในสารละลายฮอร์โมน MT, MDHT และ fadrozole hydrochloride เพียงอย่างเดียว ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร หรือฮอร์โมน MT ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ใช้ร่วมกับ fadrozole hydrochloride ระดับความ

เข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัม/ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6-12 เดือน พบปลาแซลมอนที่แช่ในสารละลายฮอร์โมน MT ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ใช้ร่วมกับ fadrozole hydrochloride ระดับความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัม/ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศปลาแซลมอนเพศเมียให้มีลักษณะเพศผู้ (masculinization) ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจาก fadrozole hydrochloride ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น aromatase inhibitor จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P450arom ที่เปลี่ยนฮอร์โมน MT เป็นฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงทำให้ฮอร์โมน MT ยังคงมีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศปลาเพศเมีย (Piferrer *et al.*, 1994; Piferrer and Blázquez, 2006)

ผลการศึกษานี้มีบางประเด็นที่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2006) และ Piferrer *et al.* (1994) กล่าวคือ การศึกษาของ Li *et al.* (2006) และ Piferrer *et al.* (1994) พบฮอร์โมน MDHT มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลากระจัดแดงหรือปลาแซลมอนได้ดีกว่าการใช้ฮอร์โมน MT เพียงอย่างเดียว ขณะที่การศึกษานี้พบฮอร์โมน MDHT มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาต่ำกว่าการใช้ฮอร์โมน MT เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเป็นผลยับยั้งการเปลี่ยนเพศจากฮอร์โมนเอสโตรเจนในแม่พันธุ์ปลาไหลนา (Tang *et al.*, 1974) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงประสิทธิภาพของสารกลุ่ม aromatase inhibitor ในการยับยั้งกระบวนการ aromatization และเพิ่มประสิทธิภาพของฮอร์โมน aromatizable androgen ต่อการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศปลาเพศเมียให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้หรือมีลักษณะเพศผู้

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน T, E₂ และ 11-KT (Table 2) พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่สุ่มมาเริ่มต้น มีปริมาณฮอร์โมน T, E₂ และ 11-KT เฉลี่ยเท่ากับ 737.00±159.82, 151.73±24.82 และ 0.051±0.007 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณฮอร์โมนของแม่พันธุ์ปลาไหลนาก่อนและหลังจากฉีดฮอร์โมน MT, MDHT และ fadrozole hydrochloride ในแต่ละชุดการทดลอง พบแม่พันธุ์ปลาไหลนา (แบบรวมเพศ) ในชุดการทดลองที่ 1, 2, 4 และ 5 มีปริมาณฮอร์โมน T เฉลี่ยน้อยกว่าแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่สุ่มมาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ขณะที่แม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2-5 มีปริมาณฮอร์โมน E₂ และ 11-KT เฉลี่ยมากกว่าแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่สุ่มมาเริ่มต้น โดยแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีปริมาณฮอร์โมน E₂ และ 11-KT เฉลี่ยมากกว่าแม่พันธุ์ปลาไหลนาที่สุ่มมาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อาจเนื่องจากแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2-5 มีการเปลี่ยนเพศจากระบบสืบพันธุ์เพศเมียเปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ หรือระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งโดยทั่วไปพบฮอร์โมน 11-KT ในปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศและระบบสืบพันธุ์เพศผู้มีปริมาณมากกว่าปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ทั้งนี้ฮอร์โมน 11-KT มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนเพศของแม่พันธุ์ปลาไหลนา ขณะที่ปริมาณฮอร์โมน E₂ พบปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศมีปริมาณมากกว่าปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมีย อาจเนื่องจากเป็นผลผลิตที่เหลือจากปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียที่มีการเปลี่ยนเพศ (Borg, 1994; Chan and Yeung, 1989; Yeung and Chan, 1987)

Table 2 Plasma T, E₂ and 11-KT levels of female swamp eel (*Monopterus albus* broodstock after intraperitoneal injections of MT, MDHT and fadrozole hydrochloride at 90 days (mean±SE)

Treatments	No. of fish	Sex (No. of Fish)	90 days		
			Sex hormone levels (pg/ml)		
			T	E ₂	11-KT
Fish before injection with androgen (initial time)	10	Female (10)	737.00±159.82 ^a	151.73±24.82 ^b	0.051±0.007 ^b
1) Absolute ethanol: vegetable oil (1: 10)	6	All individuals (6)	131.70±37.72 ^{b, a}	662.49±184.65 ^{a, a}	0.064±0.009 ^{b, a}
		Female (6)	131.70±37.72	662.49±184.65	0.064±0.009
		Intersex (-)	-	-	-
		Male (-)	-	-	-
2) MT (40 µg /g)	6	All individuals (6)	96.67±45.07 ^{b, a}	510.91±119.45 ^{a, a}	0.053±0.003 ^{b, a}
		Female (4)	47.50±7.50	653.25±106.09	0.056±0.003
		Intersex (1)	70.00±0.00	384.11±0.00	0.042±0.000
		Male (1)	320.00±0.00	68.36±0.00	0.049±0.000
3) MDHT (40 µg /g)	6	All individuals (6)	735.00±681.15 ^{a, a}	540.98±171.60 ^{a, a}	0.083±0.008 ^{a, a}
		Female (4)	62.50±20.16	758.55±158.07	0.093±0.004
		Intersex (2)	2,080.00±2,060.00	105.85±88.07	0.063±0.019
		Male (-)	-	-	-
4) MT (40 µg /g) + fadrozole hydrochloride (1 µg /g)	6	All individuals (6)	105.00±45.66 ^{b, a}	397.26±139.50 ^{a, a}	0.084±0.014 ^{a, a}
		Female (3)	73.33±6.67	581.06±180.65	0.088±0.016
		Intersex (2)	40.00±10.00	305.33±259.51	0.094±0.039
		Male (1)	330.00±0.00	29.70±0.00	0.055±0.000
5) fadrozole hydrochloride (40 µg /g)	6	All individuals (6)	131.67±37.54 ^{b, a}	623.81±239.70 ^{a, a}	0.074±0.009 ^{b, a}
		Female (3)	106.67±57.83	699.80±466.76	0.082±0.013
		Intersex (3)	156.67±55.49	547.82±252.27	0.066±0.014
		Male (-)	-	-	-
P-value (DMRT)			0.527	0.843	0.114

Note: Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$). The first letter has shown comparison the means of sex hormone level of *M. albus* between initial time (0 day) and was injected each androgen at 90 days using Independent-samples t test. The last letter has shown comparison the means of sex hormone level of *M. albus* among *M. albus* was injected each androgen at 90 days using Duncan's new multiple range test (DMRT).

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฮอร์โมนของแม่พันธุ์ปลาไหลนา (แบบรวมเพศ) ในแต่ละชุดการทดลอง หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 90 วัน พบแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 3 มีปริมาณฮอร์โมน T เฉลี่ยมากที่สุด (735.00±681.15 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) อาจเนื่องจากชุดการทดลองที่ 3 พบแม่พันธุ์ปลาไหลนา เปลี่ยนเพศมีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ จำนวนทั้งหมด 2 ตัว ซึ่งมีปริมาณฮอร์โมน T เฉลี่ยค่อนข้างสูง คือ 2,080.00±2,060.00 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ส่วนแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 2 มีปริมาณฮอร์โมน T

เฉลี่ยน้อยที่สุด (96.67 ± 45.07 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) ขณะที่แม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 1 และ 4 มีปริมาณฮอร์โมน E_2 และ 11-KT เฉลี่ยมากที่สุด ตามลำดับ (662.49 ± 184.65 และ 0.084 ± 0.014 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) และแม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 4 และ 2 มีปริมาณฮอร์โมน E_2 และ 11-KT เฉลี่ยน้อยที่สุด (397.26 ± 139.50 และ 0.053 ± 0.003 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของแม่พันธุ์ปลาไหลนา กล่าวคือ แม่พันธุ์ปลาไหลนาในชุดการทดลองที่ 4 มีการเปลี่ยนแปลงมีระบบสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ หรือระบบสืบพันธุ์เพศผู้มากที่สุด ซึ่งโดยทั่วไปปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียมีปริมาณฮอร์โมน E_2 สูง และ 11-KT มีปริมาณต่ำ ขณะที่ปลาไหลนาที่มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่มีปริมาณฮอร์โมน E_2 ต่ำ และ 11-KT มีปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูผสมพันธุ์ (Borg, 1994; Yeung and Chan, 1987) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบปริมาณฮอร์โมน T, E_2 และ 11-KT เฉลี่ยของแม่พันธุ์ปลาไหลนาในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

สรุปผล

การใช้ฮอร์โมน MT (aromatizable androgen) ที่ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม ร่วมกับ fadrozole hydrochloride (aromatase inhibitor) ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กรัม มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำเปลี่ยนแปลงเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนาให้มีระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่สุด โดยตรวจพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะ คือ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2559 และภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Asahina, K., A. Kambegawa and T. Higashi. 1995. Development of a microtiter plate Enzyme-linked Immunosorbent Assay for 17α , 20β -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost gonadal steroid. Fisheries Science. 61(3): 491–494.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 109: 31–41.
- Cao, Z., J. Luo, H. Wen. and B. Fu. 2008. Effect of fed diet replaced partly fish meal with soybean meal on rice field eel's growth performance. Journal of Hubei Agricultural Sciences. [Online] Available from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HBNY200809033.htm (abstract) [2018, January 13].
- Chan, S.T.H. and J.G. Phillips. 1967. The structure of the gonad during natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). Journal of Zoological Society of London. 151: 129–141.

- Chan, S.T.H., O. Wai-Sum, F. Tang and B. Lofts. 1972. Biopsy studies on the natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). Journal of Zoological Society of London. 167: 415–421.
- Chan, S.T.H. and W.S.B. Yeung. 1989. Sex steroids in intersexual fishes. Fish Physiology and Biochemistry. 7: 229-235.
- Devlin, R.H. and Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. 208: 191-364.
- Information and Communication Technology Center, Department of Fisheries. 2016. Fisheries statistics of Thailand 2014. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 87 p. [in Thai].
- Jiwyam, W. 2008. Reproductive biology and preliminary propagation of swamp eel (*Monopterus albus* Zuiew) by natural spawning in concrete ponds. KKU Research Journal.13: 15-22. [in Thai].
- Kortner, T.M., E. Rocha and A. Arukwe. 2009. Previtellogenic oocyte growth and transcriptional changes of steroidogenic enzyme genes in immature female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after exposure to the androgens 11-ketotestosterone and testosterone. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 152: 304–313.
- Kottelat, M. 2001. Fishes of Laos. WHT Publications (Pte) Ltd., Sri Lanka. 198 p.
- Kwanmuang, S., B. Maunsa, J. Ajanakitti and S. Rattanasungsri. 1993. Preliminary study on some biological aspects and experiment on breeding of swamp eel, *Fluta alba*. Technical paper No. 54/1993. 37 p. [in Thai].
- Li, G.L., X.C. Liu and H.R. Lin. 2006. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Fish Physiology and Biochemistry. 32: 25–33.
- Liu, J.F., Y. Guiguen and S.J. Liu. 2009. Aromatase (P450arom) and 11 β -hydroxylase (P45011 β) genes are differentially expressed during the sex change process of the protogynous rice field eel, *Monopterus albus*. Fish Physiology Biochemistry. 35: 511–518.
- Nozu, R., Y. Kojima and M. Nakamura. 2009. Short term treatment with aromatase inhibitor induces sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. General and Comparative Endocrinology. 161: 360–364.
- Pattani Inland Fisheries Research and Development Center. 2011. Knowledge of the rice field eel, *Monopterus albus* (Zuiew). Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 12 p. [in Thai].

- Piferrer, F. and M. Blázquez. 2006. Aromatase distribution and regulation in fish. Springer Science and Business Media B.V. 2006: 1–12.
- Piferrer, F., S. Zanuy, M. Carrillo, I.I. Solar, R.H. Devlin and E.M. Donaldson. 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *The Journal of Experimental Zoology*. 270: 255-262.
- Srinuansom, K. 2017. A study on androgen induces sex reversal of female swamp eel (*Monopterus albus*) broodstock. Doctoral dissertation, Khon Kaen University, Khon Kaen. 119 p.
- Tang, F., S.T.H. Chan and B. Lofts. 1974. Effect of steroid hormones on the process of natural sex reversal in the rice-field eel, *Monopterus albus* (Zuiew). *General and Comparative Endocrinology*. 24: 227–241.
- Tao, Y., H. Lin, G.V.D. Kraak and R.E. Peter. 1993. Hormonal induction of precocious sex reversal in the rice field eel, *Monopterus albus*. *Aquaculture*. 118: 131–140.
- Yang, D., F. Chen, G. Ruan and Y. Su. 2008. Relationship between sex reversal, body weight and age of *Monopterus albus*. *Journal of Yangtze University*. [Online] Available from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALCJDN20804015.htm (abstract) [2018, January 13].
- Yeung, W.S.B. and S.T.H. Chan. 1987. The plasma sex steroid profiles in the freshwater, sex-reversing teleost fish, *Monopterus albus* (Zuiew). *General and Comparative Endocrinology*. 65: 233–242.
- Zhou, X., J. Zou, K. Cui, S. Zhong and X. He. 2008. The influence of exogenous methyl testosterone on the gonad developmental process of female and intersexual *Monopterus albus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 32: 861–867.

ผลของการใช้แบคทีเรียแลคติกต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิล

Effect of Lactic Acid Bacteria on Resistance *Streptococcus* sp. in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*)

วีณา จิรัฏฐิวัตรกุล ชัยสาร* และดอกรัก ชัยสาร

Weena Jirattiwatukul Chaisarn* and Dorkrak Chaisarn

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University

*E-mail address: weena026@gmail.com

บทคัดย่อ

การใช้แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของปลากะพงขาวเพื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงปลานิลครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลานิล โดยการผสมแบคทีเรียแลคติก 3.0×10^7 CFU/g ลงในอาหารปลาทดลองที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อนำไปเลี้ยงปลานิลขนาด 6.00 ± 0.14 กรัม นาน 4 สัปดาห์ โดยให้อาหาร ร้อยละ 2 ของน้ำหนักตัว 3 มื้อต่อวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ จากการศึกษาพบปลานิลมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเป็น 18.47 ± 0.42 กรัม ในชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลคติก 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งให้ผลดีที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับอัตราการรอดตายในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และปลานิลที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ : แบคทีเรียแลคติก, *Streptococcus* sp., ปลานิล

Abstract

The using of Lactic acid bacteria from gastrointestinal tract of Sea bass (*Lates calcarifer*) in feed of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture was conducted to examine on growth rate survival rate and resistance to *Streptococcus* sp. in Nile tilapia. The experiment 3.0×10^7 CFU/g of Lactic acid bacteria with the concentration of 0, 1, 3 and 5 g/kg of fish feed were used to feed for 4 weeks. They were laid out in completely randomized design with 3 replications. The results showed that the concentration of 1 g/kg was the best treatment in increasing weight (18.47 ± 0.42 grams) which was significantly different ($p \leq 0.05$) from other treatments. There was no significant difference in survival rate. The best lactic acid bacteria 3 g/kg can inhibit *Streptococcus* sp.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Streptococcus* sp., Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญเนื่องจากจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณความต้องการบริโภคอาหารเพิ่มมากขึ้นด้วยในขณะที่ปริมาณสัตว์น้ำในธรรมชาติลดน้อยลง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงมีบทบาทสำคัญในการที่จะผลิตอาหารให้เพียงพอกับความต้องการที่เพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยแล้วปลาเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับสองรองจากกุ้งทะเล จากข้อมูลของกลุ่มเศรษฐกิจการประมง กรมประมง ประจำปี 2560 รายงานว่าช่วง 6 เดือนแรกของปี 2560 ผลผลิตปลานิลมีปริมาณ 94,990 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2559 ถึงร้อยละ 4.7 และมีปริมาณการส่งออกสูงถึง 3,108.7 ตัน คิดเป็นมูลค่า 189.5 ล้านบาท โดยมีตลาดหลักคือประเทศในตะวันออกกลาง คิดเป็นร้อยละ 31.9 โดยนิยมบริโภคเป็นปลานิลแช่แข็งทั้งตัว คิดเป็นร้อยละ 73.7

การเลี้ยงปลานิลในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น (Intensive culture) โอกาสที่ปลาเผชิญกับความเครียดและอ่อนแอจึงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปลาติดเชื้อและเกิดโรคได้ง่าย โรคส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* เป็นต้น เกษตรกรแก้ปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้ระดับหนึ่ง แต่ปัญหาที่ตามมาคือการปนเปื้อนหรือการตกค้างของยาปฏิชีวนะในตัวปลาซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แนวทางที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้คือการกระตุ้นให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อต่อสู้กับเชื้อก่อโรคได้

ในอดีตได้มีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ปัญหาเรื่องโรคระบาด แต่กลับส่งผลให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยาและเกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมได้ ทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย ปัจจุบันจึงได้มีการแก้ปัญหาดังกล่าวโดยนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในการควบคุมการเลี้ยงอาศัยหลักการควบคุมทางชีวภาพ โดยใช้สิ่งมีชีวิตเพื่อควบคุมสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งไม่ให้เพิ่มจำนวนหรือสร้างความเสียหาย เรียกว่า โพรไบโอติก (Probiotics) การใช้โพรไบโอติกจึงเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ได้รับความนิยมมากในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน (Gatesoupe, 1999; Gomes-Gil *et al.*, 2000) เนื่องจากหลักการดังกล่าวเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรและผู้บริโภค อีกทั้งช่วยในการเจริญเติบโต ด้านทานโรค มีอัตราการรอดสูง ทั้งนี้มีการรายงานการใช้โพรไบโอติกที่มีศักยภาพในการนำมาผสมอาหารปลาแล้วหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus farciminis*, *Psychrobacter namhaensis* และ *Pseudomonas fluorescens* (Suwan and Chitmanat, 2017) และ การใช้โพรไบโอติกในการเสริมอาหารสัตว์จะเป็นการลดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอีกด้วย อีกทั้งสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นรวมทั้งผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเจริญเติบโตต่อไป (Rodmongkoldee, *et al.*, 2017)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก

คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารปลากะพงขาวด้วยเทคนิคการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทุกขั้นตอนดำเนินการด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เริ่มจากนำตัวอย่างปลากะพงขาวมาทำความสะอาดผิวด้วย แอลกอฮอล์เข้มข้น ร้อยละ 70 (v/v) ผ่าตัดเปิดช่องท้องนำเฉพาะส่วนลำไส้ออกมาตัดตามยาวและตามขวางซึ่ง น้ำหนักแล้วนำไปบดให้ละเอียดโดยผสมกับสารละลายเกลือเข้มข้น ร้อยละ 0.85 (w/v) จากนั้นเจือจางตัวอย่าง ด้วยสารละลายเกลือ ทำการคัดแยกแบคทีเรียโดยเทคนิค Pour plate ด้วยอาหารแข็ง De Man Rogosa Sharpe (MRS) ที่เติม Bromocresol purple ความเข้มข้น ร้อยละ 0.004 แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 และเกลือแกง (NaCl) ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ จากนั้นจึงสุ่มเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองที่เกิดวงใสรอบๆ โคโลนี มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS เก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ในอาหารแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง

จากนั้นตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ ย้อมแกรม การเคลื่อนที่ การสร้างสปอร์ การสร้างก๊าซ การผลิตเอนไซม์ Catalase ความสามารถในการทนเกลือที่ระดับต่างๆ และการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทุกไอโซเลตทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ดัดแปลงตามวิธีการของ Siripoke *et al.* (2007) เลือกไอโซเลตที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุดจากค่า Bacteriocin activity (AU/ml) ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ค่า AU (AU/ml)} = \frac{\text{ค่าความเจือจางเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้ง} \times 1,000}{\text{ปริมาณเชื้อที่ใช้}}$$

2. การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ด้วยวิธี Agar well diffusion

เตรียมสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่เลี้ยงบนอาหาร MRS Agar เติมเกลือ ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 แล้วปรับความเข้มข้นให้อยู่ในช่วง 10^5 CFU/ml แล้วทำการทดสอบบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 ด้วยการนำสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. เกลี่ย (Swab) ให้ทั่วผิวน้ำอาหารในจานและวางให้แห้ง จากนั้นเจาะผิวน้ำอาหารแล้วหยอดสารละลายแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ และใช้ยาปฏิชีวนะออกซิเตตราซัยคลินเป็นชุดควบคุม (Control) ลงหลุมละ 60 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (Clear zone)

3. การเตรียมอาหารปลานิลทดลอง

เลี้ยงแบคทีเรียแลคติกโอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุดให้ได้ปริมาณ 3.0×10^7 CFU/g ในอาหารเหลว MRS แล้วนำไปประเหยแห้งเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำผงเชื้อที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วผสมลงในอาหารทดลองด้วยวิธีการสเปรย์แล้วผึ่งให้แห้ง เก็บรักษาอาหารทดลองที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งตัวอย่างอาหารทดลองที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โดยทำการวิเคราะห์ค่าโปรตีน (Crude protein), ไขมัน (Crude fat), ความชื้น (Moisture), เถ้า (Ash) คาร์โบไฮเดรตและกากใย (Carbohydrate) ในอาหารทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete randomized design, CRD) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง การทดลองละ 20 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารทดลองไม่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารทดลองผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ความเข้มข้น 1 กรัมต่อ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารทดลองผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ความเข้มข้น 3 กรัมต่อ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารทดลองผสมแบคทีเรียกรดแลคติก ความเข้มข้น 5 กรัมต่อ 1 กิโลกรัม

4. การเลี้ยงปลานิลทดลอง

เลี้ยงปลานิลน้ำหนัก 6.00 ± 0.14 กรัม จำนวน 240 ตัว ในถังพลาสติกความจุ้น้ำ 250 ลิตร ปรับสภาพปลาให้คุ้นกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เริ่มการทดลองผสมแบคทีเรียแลคติกความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ลงในอาหารทดลองตามชุดการทดลอง แล้วให้ปลานิลกินอาหารปริมาณร้อยละ 2 ของน้ำหนักตัว วันละ 3 ครั้ง เวลา 07.00 น. 12.00 น. และ 17.00 น. นาน 4 สัปดาห์ ตลอดการทดลองควบคุมคุณภาพน้ำในถังเลี้ยงปลานิลให้อยู่ในช่วงมาตรฐานการเลี้ยง ดังนี้ ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 5-7 ppm ค่าแอมโมเนีย น้อยกว่า 0.02 mg/l ค่าไนไตรท์ น้อยกว่า 0.1 mg/l และค่าไนเตรทให้อยู่ในช่วง 0.01 – 0.5 mg/l วิเคราะห์คุณภาพน้ำด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 วัน ตามวิธีการของ Longmutcha *et al.* (2015)

5. การเก็บข้อมูลปลานิลและทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ชั่งน้ำหนักปลานิลในทุกหน่วยการทดลอง ทุกๆ 7 วัน เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักสำหรับคำนวณอัตราการเจริญเติบโต และหลังจากปลาได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 4 สัปดาห์ แล้วทำการฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 CFU/ml โดยฉีดเข้าไปในช่องท้องของปลานิล บันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาไปนับจำนวนแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ต่อไป

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบแบคทีเรียจำนวน 121 โคโลนี เมื่อนำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยใช้คุณสมบัติการติดสีแกรม การสร้างสปอร์ การเคลื่อนที่ การสร้างก๊าซ และทดสอบการผลิตเอนไซม์ Catalase พบว่า มี 88 ไอโซเลต ที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างก๊าซ และทำปฏิกิริยา Catalase แล้วให้ผลเป็นลบ เมื่อนำไปทดสอบลักษณะทางสัณฐาน พบว่า แบคทีเรียมีรูปร่างท่อน (Rod) จำนวน 4 ไอโซเลต มีรูปไข่ (Medium rod) จำนวน 7 ไอโซเลต และมีทรงกลม (Cocci) จำนวน 77 ไอโซเลต



Figure 1. Colony appearance of Lactic acid bacteria in MRS agar plate from sample of gastrointestinal tract of Sea bass

สำหรับการศึกษาคั้งนี้ไอโซเลตที่ 1/69 (LAB25) มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลมมน และหลังจากการศึกษาลักษณะวิทยาพบการติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ Catalase ไม่สร้างก๊าซ และมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) เติมเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 21.00 ± 1.00 มิลลิเมตร และมีค่า Bacteriocin activity สูงสุดคือ 800 AU/ml. จึงใช้ไอโซเลตดังกล่าวผสมลงในอาหารเลี้ยงปลาเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของปลาต่อไป



Figure 2. Inhibitions zone effect of Lactic acid bacteria against *Streptococcus* sp. on MHA plate

2. การศึกษาผลจากแบคทีเรียกรดแลคติกเสริมอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

2.1 การเจริญเติบโตของปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองพบว่า มีโปรตีน (Crude protein) ร้อยละ 32.35, ไขมัน (Crude fat) ร้อยละ 12.51, ความชื้น (Moisture) ร้อยละ 9.4, เถ้า (Ash) ร้อยละ 13.19 และ คาร์โบไฮเดรตและกากใย (Carbohydrate) ร้อยละ 32.55 ตามลำดับ

จากการทดลองเลี้ยง พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 3 และ 5 ตามลำดับ มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ โดยชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด คือ 18.47 ± 0.42 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 0, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ 17.31 ± 0.55 , 17.04 ± 0.77 และ 17.25 ± 2.39 กรัม ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Weight of Nile tilapia fed with different levels of Lactic acid bacteria supplemental diets

Treatment	week 1	week 2	week 3	week 4
Control (T1)	9.14 ± 0.79^a	11.42 ± 0.39^a	14.83 ± 0.88^a	17.31 ± 0.55^a
LAB 1 g Kg ⁻¹ (T2)	9.39 ± 0.48^a	11.82 ± 0.37^a	15.20 ± 0.67^b	18.47 ± 0.42^b
LAB 3 g Kg ⁻¹ (T3)	9.13 ± 0.22^a	11.05 ± 0.97^a	14.30 ± 0.02^a	17.04 ± 0.77^a
LAB 5 g Kg ⁻¹ (T4)	8.78 ± 0.76^a	11.16 ± 1.18^a	14.65 ± 1.35^a	17.25 ± 2.39^a

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($p \leq 0.05$)

2.2 อัตราการรอดตายของปลานิลในที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก

เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์ ทำการฉีดสารละลาย *Streptococcus* sp. ปริมาณ 10^7 CFU/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าทางช่องท้องของปลานิล จากการทดลองพบว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายสูงสุดคือ ร้อยละ 100 รองลงมาเป็นชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ ร้อยละ 98.33 อัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และชุดที่ได้รับอาหารผสมกรดแลคติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายต่ำสุดคือ ร้อยละ 81.66 ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Survival rates of Nile tilapia with different levels of Lactic acid bacteria supplemental diets

Treatment	Survival rate (%)
Control (T1)	100±00 ^a
LAB 1 g Kg ⁻¹ (T2)	100±00 ^a
LAB 3 g Kg ⁻¹ (T3)	98.3±0.51 ^a
LAB 5 g Kg ⁻¹ (T4)	81.65± 5.51 ^b

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($p \leq 0.05$)

2.3 ปริมาณ *Streptococcus* sp. ในเลือดปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ในเลือดของปลานิลหลังได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 4 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ในเลือดมากที่สุด คือ $11.40 \pm 8.96 \times 10^4$ CFU/ml รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 0, 1 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ $9.23 \pm 6.35 \times 10^4$, $7.66 \pm 6.48 \times 10^4$ และ $4.13 \pm 1.51 \times 10^4$ CFU/ml ตามลำดับ (Table 3) โดยชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่ำสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับชุดการทดลองอื่น

Table 3 Average *Streptococcus* sp. of Nile tilapia with different levels of Lactic acid bacteria supplemental diets

Treatment	Average <i>Streptococcus</i> sp. (CFU/ml)
Control (T1)	$9.23 \pm 6.35^a \times 10^4$
LAB 1 g Kg ⁻¹ (T2)	$7.66 \pm 6.48^a \times 10^4$
LAB 3 g Kg ⁻¹ (T3)	$4.13 \pm 1.51^b \times 10^4$
LAB 5 g Kg ⁻¹ (T4)	$11.40 \pm 8.96^a \times 10^4$

Average values with different letters in the same column are statistically significantly different ($p \leq 0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงปลานิลโดยใช้อาหารปกติไม่ผสมแบคทีเรียแลคติก (ชุดควบคุม) เปรียบเทียบกับอาหารปลาที่ผสมแบคทีเรียแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 1, 3 และ 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่า ตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดที่ได้รับอาหารผสมกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดคือ 18.47 ± 0.42 กรัม และอัตราการรอดของปลานิลชุดที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก 1 และ 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Senasri (2015) ที่ได้ทดลองใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกผสมลงในอาหารเลี้ยงปลานิล และจากการทดลองพบว่า ปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดการทดลองที่ไม่ได้รับแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เช่นกัน และอัตราการรอดตายไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rumruairuen et al. (2011) พบว่าการเสริมโพรไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการรอดของปลานิล แต่โพรไบโอติกมีผลต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากโพรไบโอติกจะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็ก ทำให้มีการย่อยสลายกากอาหารและสร้างกรดแลคติกขึ้น ซึ่งกรดแลคติกจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้การเกาะติดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะกระจายทั่วทางเดินอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่มีพื้นที่สำหรับการเกาะติด ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารและมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ผนังทางเดินอาหาร โดยเพิ่มการสร้างสารอาหาร เช่น วิตามิน เพิ่มอัตราการหมัก สร้างเอนไซม์ เช่น ไลเปส โปรติเอส และอะไมเลส กระตุ้นการสร้างและการหลั่งเอนไซม์ย่อยอาหารช่วยการย่อยอาหาร และเพิ่มประสิทธิภาพในการนำอาหารไปใช้ ทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น (Rodmongkoldee, et al., 2017)

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียแลคติกที่ผสมลงในอาหารต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Streptococcus* sp. พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลานิลที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติกมีน้ำหนักเฉลี่ยที่สูงกว่าปลานิลที่ไม่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลคติก โดยแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ผสมอาหารที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ผสมอาหารที่ความเข้มข้น 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้ปลานิลมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะพัฒนาแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากปลากะพงขาวเป็นโพรไบโอติก เพื่อประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตปลานิลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่เอื้อเฟื้อในการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา และสาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวนาฬิกา วายะโยะ นางสาววีดา โต๊ะเจ๊ะ และนายไพฑอล หลียะลา นักศึกษาสาขา
ชีววิทยา รวมทั้งบุคคลากรและเจ้าหน้าที่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี
ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Gatesoupe, F. J. 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.
- Gomes-Gil, B., A. Roque. and J.F. Turnbull. 2000. The Use and Selection of Probiotic Bacteria for Use in the Culture of Larval Aquatic Organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
- Longmutcha, N., Phichai, K., Hanmoungjai, W. and Rojtinnakorn, J. 2015. Use of Yeast Supplemental Diet for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries Technology Research*. Vol.9 No.2: 1-11. [in Thai]
- Rodmongkoldee, M., Leelapat, W. and Thaimuangpon, W. 2017. Effect of Probiotics on Growth Performance and Survival rate in *Anabas testudineus*. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*. Vol.19 No1. [in Thai]
- Rumruairuen, W., Chalersantisaklu, S., Silarudee, S. and Kesronpikun, J. 2011. Effects of Q.P. Probiotics™ on Growth Performance in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Faculty of Animal Science and Agricultural Technology, Silpakorn University*. 2: 1-7. [in Thai]
- 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*. Vol. 8 No.2: 61-66. [in Thai]
- Siripoke, S., Aungpraphapornchai, P., Pothivejkul, K. and Pringsulaka, O. 2007. Screening and Identification of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods and Preliminary Characterization of the Bacteriocin. *Journal of Science and Technology*. Vol. 23 No. 2: 92-114. [in Thai]
- Suwan, C and Chitmanat, C. 2017. The Application of Probiotics for Tilapia Culture. *Chiang Mai Veterinary Journal*; 15(1): 15-24. [in Thai]

การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Escherichia coli* จากน้ำเสียของฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในเขตเมืองสกลนคร

Investigation of antibiotic resistance of *Escherichia coli* from aquaculture farming
wastewater in Muang District, Sakon Nakhon

นพรัตน์ พัทธินัย^{1*} ทรงทรัพย์ อรุณกมล¹ และ วิลัย เจียมไชยศรี²

Nopparat Patchanee^{1*} Songsub Arunkamol¹ and Wilai Chiemchaisri²

¹สาขาวิชาการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000

²ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

¹Department of Fisheries Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Muang, Sakon Nakhon, 47000.

²Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok, 10900.

*Corresponding author, e-mail: nopparat.p@snru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Escherichia coli* : *E. coli* โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด เก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 6 ฟาร์ม ในเขตเมืองสกลนคร จำนวน 200 โคโลนี เก็บตัวอย่าง 5 จุด จุดละ 40 โคโลนี คือ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลา และแหล่งน้ำธรรมชาติ ผลการศึกษาพบว่า *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะร้อยละ 100.0, 92.5, 80.0, 82.5 และ 65.0 ตามลำดับ และมีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 2.5, 10.0, 27.5, 22.5 และ 27.5 ตามลำดับ สำหรับการดื้อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 2-6 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 97.5, 82.5, 52.5, 60.0 และ 37.5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ยาปฏิชีวนะที่ *E. coli* ดื้อยามากที่สุดคือ Tetracycline 147 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 73.5 ตรงกันข้ามกับยาปฏิชีวนะ Amikacin ที่ *E. coli* ดื้อยาน้อยที่สุดคือ 26 โคโลนี หรือคิดเป็นร้อยละ 13.0 นอกจากนี้ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) ของน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.71 ± 0.15 มีค่าสูงที่สุด รองมาเป็น *E. coli* ที่แยกเชื้อจากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและปลา ตามลำดับ สรุปได้ว่า *E. coli* ที่แยกเชื้อจากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาหลายชนิดมากกว่า *E. coli* ในน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำธรรมชาติ

คำสำคัญ: ดื้อยาปฏิชีวนะ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ *Escherichia coli*

Abstract

The aim of this study was to investigate resistance of *Escherichia coli*: *E. coli* strains to 6 antibiotics. 200 colonies from 5 sites, 40 colonies each, were isolated from 6 aquaculture farms in Muang, Sakon Nakhon. The samples were frog/fish pond wastewater, frog/fish pond sludge including a natural water sources. The result showed that *E. coli* strains from frog pond wastewater, frog pond

sludge, fish pond wastewater, fish pond sludge and natural water sources resisted to antibiotics of 100.0, 92.5, 80.0, 82.5 and 65.0%, respectively, and resisted to a single antibiotic of 2.5, 10.0, 27.5, 22.5 and 27.5%, respectively. The multiple antibiotic resistance (2-6 MAR) were 97.5, 82.5, 52.5, 60.0 and 37.5%, respectively. Besides, 147 *E. coli* strains resisted highly to Tetracycline, (73.5%). It was contrary for Amikacin that only 26 *E. coli* strains (13.0 %) were resisted. The highest multiple antibiotic resistance index (MAR index) was the *E. coli* strains from frog pond wastewater (0.71 ± 0.15) and sludge from frog and fish pond, respectively. In conclusion, *E. coli* which isolate sludge from frog and fish pond, there were more various antibiotic resistance pattern than *E. coli* which isolate wastewater from frog pond, wastewater from fish pond and natural water resource.

Key word: Antibiotic resistance, Aquaculture, *Escherichia coli*

คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเขตเมืองสกลนครมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกบ และการเพาะเลี้ยงปลานิล เป็นต้น ทำให้ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อการรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากความหลากหลายของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำมากขึ้น การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อให้เกิดความกังวลในเรื่องสุขภาพของการบริโภคสัตว์น้ำ (Panpan, et al. 2012) โดยมีรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาของ *Escherichia coli* : *E. coli* ในแม่น้ำที่รับน้ำเสียชุมชนมีภาวะการดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น (Laroche, et al. 2010) ดังนั้นแหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งน้ำสาธารณะมักจะมีการปนเปื้อนของ *E. coli* ที่มาจากแหล่งน้ำเสียชุมชนมากขึ้น การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคและการใช้ยาปฏิชีวนะในการผลิตอาหารสัตว์ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* อันเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์เพิ่มมากขึ้น (Berge, 2003)

E. coli เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนอุจจาระ หากตรวจพบ *E. coli* ดื้อยาจากน้ำเสียของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ก็มีโอกาสมที่มนุษย์จะสัมผัสกับเชื้อ *E. coli* ได้ อย่างไรก็ตาม *E. coli* ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่สามารถก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์แต่มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ (Ponsin, 2013) ในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงในการเพาะเลี้ยงกบและปลาจำนวนมากและมีการชะล้างน้ำเสียลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปริมาณมาก จากน้ำเสียชุมชน น้ำทิ้งโรงพยาบาล และโรงบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะโรงบำบัดน้ำเสีย เป็นแหล่งที่มีปริมาณ *E. coli* จำนวนมาก และมีความสามารถดื้อยาได้หลายชนิดโดยเฉพาะเชื้อที่มาจากตะกอน เนื่องจากตะกอนจะถูกนำกลับไปบำบัดใหม่อีกครั้งทำให้ตะกอนอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียนานกว่าน้ำเสีย ถ้ามีการปล่อยน้ำที่มีการปนเปื้อนของ *E. coli* ดื้อยาลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะเป็นสาเหตุทำให้ *E. coli* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Patchanee, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะตามอำเภอใจมีผล

ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยยา 1 ชนิด Antibiotic resistance (AR) และทนต่อยาอย่างน้อย 2 ชนิด Multiple antibiotic resistance (MAR) (Servais and Passerat, 2009)

ดังนั้นการศึกษานี้เพื่อทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ในน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีปล่อยน้ำเสียสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ น่าจะเป็นอีกสาเหตุเหมือนน้ำเสียและตะกอนจากโรงบำบัดน้ำเสียที่ทำให้ *E. coli* อาจถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่เชื้อก่อโรคอื่นในสิ่งแวดล้อมได้ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางการควบคุมเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่ระบายจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับสัตว์น้ำให้เหมาะสมกับโรคที่เกิดขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะ ในเขตเมืองสกลนคร ประกอบด้วยฟาร์มเพาะเลี้ยงกบ 3 ฟาร์ม ฟาร์มเลี้ยงปลานิล 3 ฟาร์ม รวม 6 ฟาร์ม โดยเก็บตัวอย่าง 5 จุด คือ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ (Wastewater from frog pond : WFG) ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ (Sludge from frog pond : SFG) น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา (Wastewater from fish pond : WFH) ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลา (Sludge from fish pond : SFH) และแหล่งน้ำธรรมชาติ (Natural water sources : NWS) เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนเป็นระยะเวลา 3 เดือน เดือนละ 2 ครั้ง รวม 6 ครั้งต่อจุด จุดละ 40 โคโลนี รวม 200 โคโลนี ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-กันยายน พ.ศ. 2559

2. การแยกเชื้อ *Escherichia coli* : *E.coli*

การแยก *E. coli* จากตัวอย่าง ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหรือตะกอนด้วย Normal saline 0.85% ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำผลบวกใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ EC Broth จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำผลบวกมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB Agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่มีสี Metallic sheen นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี IMViC test (Andrews, 1997)

3. การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อ *E. coli* เลี้ยงในอาหาร Tryptone Soya Broth นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำไปเทียบมาตรฐานความขุ่น McFarland 0.5 นำไปเสียบยาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar ใช้ยาปฏิชีวนะ 6 กลุ่ม กลุ่มละ 1 ชนิด ได้แก่ กลุ่ม Beta-lactam คือ Cephalothin (KF) 30 µg กลุ่ม Aminoglycosides คือ Amikacin (AMK) 30 µg กลุ่ม Tetracycline คือ Tetracycline (TC) 30 µg กลุ่ม Chloramphenicol คือ Chloramphenicol (CP) 30 µg กลุ่ม Quinolones คือ Nalidixic acid (NA) 30 µg และ กลุ่ม Sulfonamides คือ Sulfamethoxazole /Trimethoprim (ST) 23.75 µg / 1.25 µg เนื่องจากเป็นตัวแทนจากยาปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มซึ่งจะมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการ

ดื้อยาปฏิชีวนะโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวง (clear zone) เทียบกับเกณฑ์มาตรฐานการตรวจสอบการดื้อยาปฏิชีวนะโดยมี *Escherichia coli* ATCC® 35218 สำหรับกลุ่ม Beta lactam และ *Escherichia coli* ATCC® 25922 สำหรับกลุ่มอื่นๆ เป็นมาตรฐานควบคุม โดยวิธี Disk diffusion (CLSI, 2011) แสดงใน (Table 1)

Table 1 Diameter of inhibition zone for *Escherichia coli*

Series	Antibiotics	Abb.	Diameter of inhibition zone (mm)			Dose (µg)
			Resistance	Intermediate	Sensitive	
Beta lactam	Cephalotrin	KF	≤14	15-17	≥18	30
Aminoglycoside	Amikacin	AMK	≤14	15-16	≥17	30
Tetracycline	Tetracycline	TC	≤11	12-14	≥15	30
Quinolone	Nalidixic acid	NA	≤13	14-18	≥19	30
Chloramphenicol	Chloramphenicol	CP	≤12	13-17	≥18	30
Sulfonamides	Sulfamethoxazole/	ST	≤10	11-15	≥16	23.75/
	Trimethoprim					1.25

Note : (CLSI, 2011)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 ตรวจวัดปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform : TC) ฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform : FC) และ *E. coli* ในน้ำ โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN method) ใช้ระบบ 3 หลอด (APHA *et al.*, 2005)

1.2 การคำนวณหา ร้อยละการดื้อยา การเริ่มพัฒนาการดื้อยา และความไวต่อการต้านการดื้อยา สมการที่ (1), (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\% \text{ การดื้อยา} = \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} (\% \text{ Resistance}) &= \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่เริ่มพัฒนาการดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \\ \% \text{ การเริ่มพัฒนาการดื้อยา} &= \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่เริ่มพัฒนาการดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} (\% \text{ Intermediate}) &= \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ไวต่อการต้านการดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \\ \% \text{ ความไวต่อการต้านการดื้อยา} &= \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ไวต่อการต้านการดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \end{aligned} \quad (3)$$

1.3 การคำนวณดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด Multiple antibiotic resistance Index (MAR index) สมการที่ (4)

$$\text{ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index)} = \frac{\text{จำนวนยาปฏิชีวนะที่ } E. coli \text{ ดื้อยา}}{\text{จำนวนยาปฏิชีวนะทั้งหมดที่ทดสอบ}} \quad (4)$$

1.4 การศึกษารูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ สมการที่ (5)

$$\% \text{ รูปแบบการดื้อยา} = \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ดื้อยาแต่ละรูปแบบ} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ดื้อยา}} \quad (5)$$

(% Pattern)

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 จากการวิเคราะห์ ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* ด้วยวิธี MPN method พบว่าน้ำเสียและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ มีค่าเฉลี่ยของปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* มากกว่า น้ำเสียและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลา รวมถึงแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ มีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด อยู่ในช่วง 4.3×10^5 - 2.4×10^7 MPN/100 ml ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ มีค่าอยู่ในช่วง 2.0×10^6 - 2.4×10^8 MPN/g น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลาและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลามีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.5×10^4 - 9.3×10^4 MPN/100 ml และ 7.0×10^4 - 4.6×10^6 MPN/g ตามลำดับ ในส่วนแหล่งน้ำธรรมชาติ มีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดอยู่ในช่วง 9.0×10^3 - 2.4×10^6 MPN/100 ml ผลการตรวจสอบปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มและปริมาณ *E. coli* เป็นไปทิศทางเดียวกับปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด แสดงใน (Table 2)

Table 2 Amount of total coliform (TC) fecal coliform (FC) and *Escherichia coli* from various samples

Type	Sample source (Range, MPN/100 ml)				
	WFG	SFG ^{1/2}	WFH	SFH ^{1/2}	NWS
TC	4.3×10^5 - 2.4×10^7	2.0×10^6 - 2.4×10^8	1.5×10^4 - 9.3×10^4	7.0×10^4 - 4.6×10^6	9.0×10^3 - 2.4×10^6
FC	9.3×10^4 - 2.4×10^7	1.4×10^6 - 2.4×10^8	1.5×10^4 - 4.3×10^4	7.0×10^4 - 4.6×10^6	9.0×10^3 - 2.4×10^6
<i>E.coli</i>	4.3×10^5 - 2.4×10^7	4.0×10^5 - 2.4×10^8	3.0×10^3 - 4.3×10^4	3.0×10^3 - 4.6×10^6	3.0×10^3 - 7.5×10^4

Remark : ^{1/} SFG and SFH (MPN/g), ^{2/} *E.coli* (MPN *E.coli*/g), WFG = Wastewater from frog pond; SFG = Sludge from frog pond; WFH = Wastewater from fish pond; SFH = Sludge from fish pond; NWS= Natural water sources; TC= Total coliform; FC = Fecal coliform.

1.2 การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ ทำการแยกเชื้อ *E. coli* จากน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งหมด 200 โคโลนี โดยแบ่งเป็น น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำธรรมชาติ จุดละ 40 โคโลนี ทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด พบว่ามี *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะร้อยละ 100.0, 92.5, 80.0, 82.5 และ 65.0 ตามลำดับ จากจำนวนเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 200 โคโลนี มีการดื้อยา Tetracycline มากที่สุด 147 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 73.5 รองลงมาเป็น Nalidixic acid มีการดื้อยา 95 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 47.5 ส่วนยาปฏิชีวนะที่ *E. coli* ดื้อยาน้อยที่สุดคือ Amikacin จากจำนวน

ทั้งหมด 200 โคโลนี มีการดื้อยา Amikacin 26 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 13.0 ผลการวิเคราะห์ ร้อยละการดื้อยา ร้อยละการพัฒนาการดื้อยา และร้อยละความไวต่อการดื้อยาโดยพิจารณาจากปฏิชีวนะแต่ละชนิดแสดงใน (Table 3)

1.3 การคำนวณดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) พบว่า *E. coli* ที่แยกเชื้อจากน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกบ ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกบ น้ำเสียของบ่อเลี้ยงปลา ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงปลา และ แหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่า *E. coli* ที่ไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ คิดเป็นร้อยละ 0.0, 7.5, 20.0, 17.5 และ 35.0 ตามลำดับ มีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด (AR) คิดเป็นร้อยละ 2.5, 10.0, 27.5, 22.5 และ 27.5 ตามลำดับ สำหรับการดื้อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 2-6 ชนิด (MAR) คิดเป็นร้อยละ 97.5, 82.5, 52.5, 60.0 และ 37.5 ตามลำดับ และพบว่า ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) ของน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.71 ± 0.15 มีค่าสูงที่สุด รองมาเป็น *E. coli* ที่แยกเชื้อจากตะกอนจากบ่อเลี้ยงกบและตะกอนจากบ่อเลี้ยงปลา แสดงใน Table 4

1.4 การศึกษารูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จากยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด มีผลดังนี้ ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจาก น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 8 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ KF- TC- CP-NA-ST มีจำนวน *E. coli* ที่ดื้อยาในรูปแบบนี้ ร้อยละ 40 และมีการรูปแบบการดื้อยา TC- CP-NA-ST ร้อยละ 37.5 แสดงใน Figure 1 (A) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจากตะกอนดินจากบ่อ เลี้ยงกบ มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 15 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC- CP-NA-ST คิดเป็นร้อยละ 27.5 และมีการรูปแบบการดื้อยา KF-TC- NA ร้อยละ 10.0 แสดงใน Figure 1 (B) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจาก น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 12 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC-NA คิดเป็นร้อยละ 25.5 และมีการรูปแบบการดื้อยา AMK และ TC คิดเป็นร้อยละ 10.0 แสดงใน Figure 1 (C) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจากตะกอนในบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 18 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC คิดเป็นร้อยละ 15.0 และมีการรูปแบบการดื้อยา KF- TC คิดเป็นร้อยละ 12.5 แสดงใน Figure 1 (D) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 13 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC คิดเป็นร้อยละ 17.0 และมีการรูปแบบการดื้อยา KF- TC คิดเป็นร้อยละ 10.0 แสดงใน Figure 1 (E)

Table 3 The percentage of antibiotic resistant *Escherichia coli* from various samples

Abb.	Percentage of sensitivity isolated of <i>E. coli</i> (% Resistance/% Intermediate/% Sensitivity)															
	% Resistance						% Intermediate					% Sensitivity				
	WFG	SFG	WFH	SFG	NWS	AVG	WFG	SFG	WFH	SFG	NWS	WFG	SFG	WFH	SFG	NWS
KF	42.5	47.5	20.0	40.0	35.0	37.0	57.5	50.0	60.0	57.5	62.5	0.0	2.5	20.0	2.5	2.5
AMK	12.5	15.0	20.0	12.5	5.0	13.0	7.5	25.0	17.5	15.0	7.5	80.0	60.0	62.5	72.5	87.5
TC	100.0	85.0	60.0	72.5	50.0	73.5	0.0	0.0	5.0	5.0	5.0	0.0	15.0	35.0	22.5	45.0
CP	90.0	50.0	7.5	12.5	17.5	35.5	2.5	0.0	0.0	15.0	5.0	7.5	50.0	92.5	72.5	77.5
NA	87.5	67.5	37.5	35.0	10.0	47.5	10.0	5.0	40.0	17.5	10.0	2.5	27.5	22.5	47.5	80.0
ST	95.0	67.5	15.0	30.0	10.0	43.5	0.0	0.0	12.5	10.0	2.5	5.0	32.5	72.5	60.0	87.5

Remark : WFG = Wastewater from frog pond; SFG = Sludge from frog pond; WFH = Wastewater from fish pond; SFH = Sludge from fish pond; NWS = Natural water sources;

AVG = Average; Ant= Antibiotic ; KF= Cephalothin; AMK = Amikacin; TC= Tetracycline; CP= Chloramphenicol; NA= Nalidixic acid; ST = Sulfamethoxazole / Trimethoprim.

Table 4 The percentage of *Escherichia coli* strains which resisted to antibiotics in various patterns

Number of antibiotic resistance in each pattern (total = 6 antibiotics)	The percentage resistance of isolates (%)				
	WFG	SFG	WFH	SFH	NWS
No resistant (sensitive)	0	7.5	20.0	17.5	35.0
1	2.5	10.0	27.5	22.5	27.5
2	2.5	5.0	35.0	27.5	20.0
3	7.5	25.0	10.0	15.0	12.5
4	40.0	37.5	5.0	10.0	2.5
5	47.5	7.5	2.5	5.0	2.5
6	0.0	7.5	0.0	2.5	0.0
MAR Index ^{1/}	0.71±0.15	0.55±0.26	0.27±0.20	0.34±0.26	0.21±0.21

Remark : ^{1/} Average± SD (n=40), MAR Index = Multiple antibiotic resistance Index; WFG = Wastewater from frog pond; SFG = Sludge from frog pond; WFH = Wastewater from fish pond; SFH = Sludge from fish pond; NWS= Natural water sources.

สรุปและวิจารณ์

การศึกษานี้พบว่าตะกอนดินทั้งจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลาจะมีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* สูงกว่าตัวอย่างที่เก็บมาจากน้ำเสียบ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงปลา และ แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Roland *et al.* (1991) และ Schmidt *et al.* (2000) พบว่า แบคทีเรียจากตะกอนดินจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีปริมาณมากกว่าในน้ำเสียและแม่น้ำ ซึ่งมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งของประเทศไทย ไม่ระบุค่ามาตรฐานของปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* แต่ค่าที่ตรวจพบมีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานข้อกำหนด EPA Victoria (2003) กำหนดปริมาณ *E. coli* ที่ยอมรับได้ในการปล่อยน้ำเสียทิ้งลงสู่แหล่งน้ำน้อยกว่า 10,000 *E. coli*/100ml

จากการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิด พบว่า การดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* อยู่ในเกณฑ์น้อยถึงปานกลาง มีเพียง Tetracycline เท่านั้น มี *E. coli* ดื้อยาอยู่ในเกณฑ์ที่มาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Reinthaler *et al.* (2003), Patchanee (2011) พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกจากน้ำเสียมีการดื้อยา Tetracycline สูงสุด เนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้มานานทั้งในมนุษย์และสัตว์ ทำให้พบเชื้อ *E. coli* และแบคทีเรียที่ดื้อยา Tetracycline มากในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียเหล่านี้ได้สัมผัสกับยาปฏิชีวนะนั้นๆ แล้วต่อมาได้พัฒนาตัวเองเพื่อความอยู่รอด (Al-Bahry *et al.*, 2009) รวมถึงมีกลไกการดื้อยาที่ส่งผลไม่ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน เช่น การขับยาออก ลดการซึมผ่านของยาเข้าเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา จึงทำให้มีการดื้อยา Tetracycline สูงสุด และพบว่า มีการดื้อยา Amikacin น้อยที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patchanee (2011)

กล่าวว่าการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ใน 16 ชนิด โดยมียาเพียงชนิดเดียวที่ไม่พบการดื้อยา คือ Amikacin เนื่องจาก Amikacin อยู่ในกลุ่ม Aminoglycoside เป็นยาที่มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ออกฤทธิ์ที่ 30S บนไรโบโซมเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน แบคทีเรียจึงถูกฆ่า โดยขณะนี้ Amikacin เป็นยาที่ออกฤทธิ์กว้างสุดในยาในกลุ่มนี้ จากการศึกษาของ Roland *et al.* (1991) พบว่า แบคทีเรียจากตะกอนดินจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีรูปแบบของการดื้อยาหลายชนิดมากกว่าในน้ำเสียหรือแม่น้ำ เนื่องจากตะกอนดินจะอยู่ในบ่อนานกว่าน้ำ ทำให้แบคทีเรียได้รับการกระตุ้นจากยาปฏิชีวนะหลายรอบของการเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่งผลทำให้ได้รับการเหนี่ยวนำในการดื้อยาได้มากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ เชื้อ *E. coli* จากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาหลายชนิดมากกว่าเชื้อ *E. coli* ในน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำธรรมชาติ จากการวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า *E. coli* ที่ดื้อยา Tetracycline จะมีแนวโน้มการดื้อยา Nalidixic acid ร่วมด้วยเพราะยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้จะมีกลไกการดื้อยาคู่กันโดยมีผลไม่ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Ponsin, 2013) ทำให้มีแนวโน้มของการดื้อยาที่คล้ายกัน และ จากตัวอย่างทั้งหมด มีเพียงเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกบและตะกอนดินในเลี้ยงปลาเท่านั้นที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ ทั้ง 6 ชนิด ในส่วนรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จะเห็นได้ว่า ในแต่ละประเภทจะมีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะตัวอย่างที่เก็บจากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลาจะมีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลายมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากน้ำเสีย เนื่องจากตะกอนดินมีการทับถมเป็นเวลานาน ทำให้แบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับแบคทีเรียที่มาจากน้ำใหม่ ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยา สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Patchanee (2011) ตัวอย่างที่เก็บจากตะกอนดินจะมีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลายมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากน้ำเสีย ตะกอนดินและน้ำเสียจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงเป็นแหล่งที่สามารถช่วยในการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* และแพร่กระจายของยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (Zhang *et al.*, 2013) ดังนั้น เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะหากมีการสัมผัสกับมนุษย์อาจก่อให้เกิดผลกระทบและความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ งานวิจัยนี้ได้สำรวจในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงในการเพาะเลี้ยงกบและเลี้ยงปลาจำนวนมาก มีการชะล้างน้ำเสียชุมชนลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปริมาณมาก จึงควรศึกษาต่อเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับฤดูกาลอื่นๆ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางการควบคุมเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่ระบายจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการใช้ยาปฏิชีวนะให้เหมาะสมกับโรคที่เกิดขึ้น

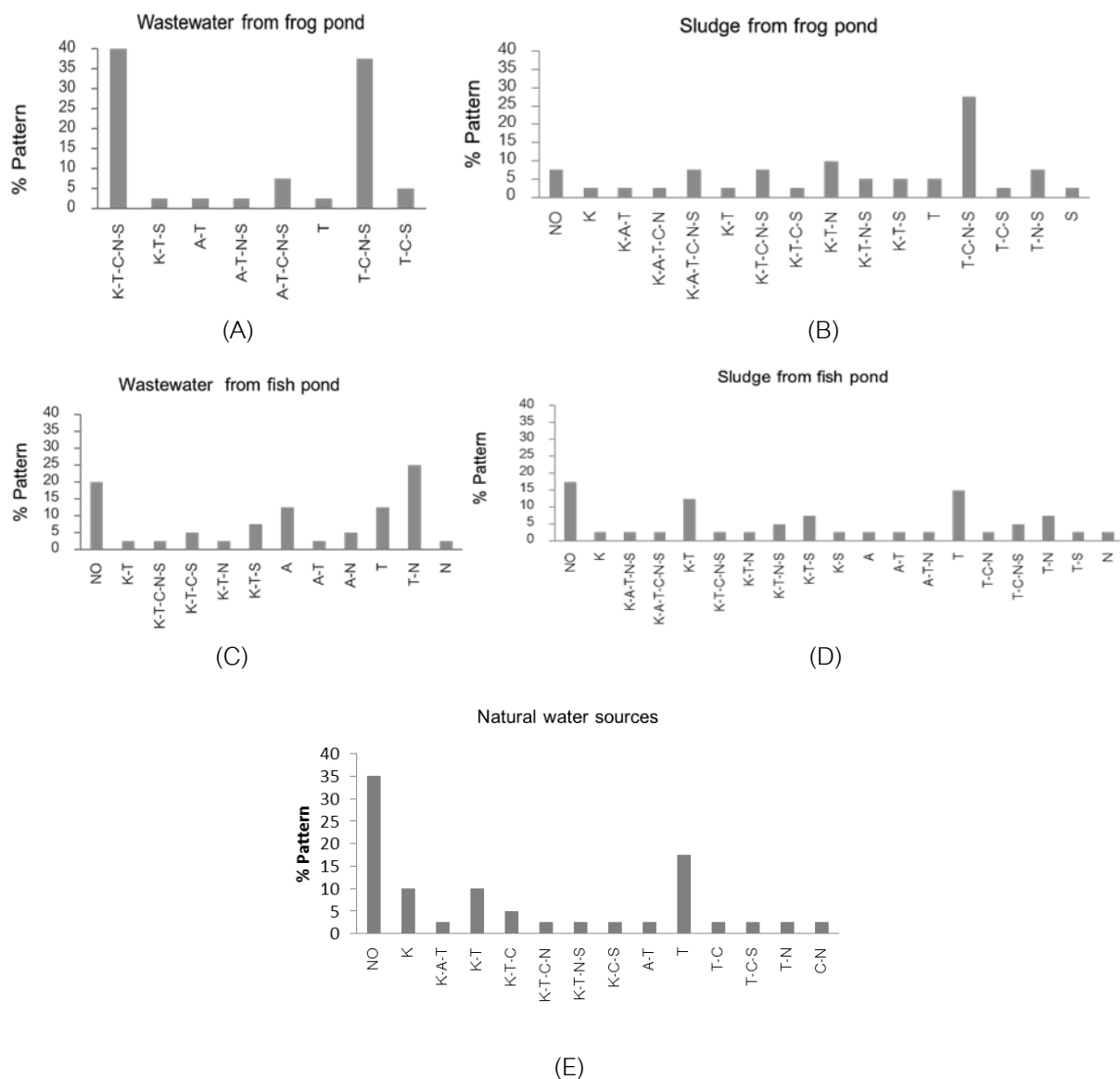


Figure 1 Pattern of Antibiotic resistant : (A) = Wastewater from frog pond; (B) = Sludge from frog pond; (C) = Wastewater from fish pond; (D) = Sludge from fish pond; (E) = Natural water sources. NO = No antibiotics resistance K= Cephalothin(KF) ; A = Amikacin (AMK) ; T= Tetracycline (TC) ; C= Chloramphenicol (CP) ; N= Nalidixic acid (NA) ; S = Sulfamethoxazole /Trimethoprim (ST)

คำขอบคุณ

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนครที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Al-Bahry, S.N., I.Y. Mahmoud, K.I.A. Al-Belushi, A.E. Elshafie, A. Al-Harthy, and C.K. Bakheit. 2009. Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere*. 77(11): 1534 – 1539.
- Andrews, W. 1997. Manuals of food quality control. FAO, Food and Nutrition paper. 14/4 (Rev.1): 13 - 23.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Berge, A.C.B., E.R. Atwill and W.M. Sischo. 2003. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. *Preventive Veterinary Medicine*. 61: 91–102.
- CLSI. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. USA. 168p.
- EPA Victoria. 2003. Guideline for Environmental Management use of Reclaimed Water. Publication 464.2, Southbank, Victoria, Australia. 101p.
- Laroche, E., F. Petit, M. Fournier, B. Pawlak. 2010. Transport of Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology*. 392(1): 12-21.
- Panpan, G., D. Mao, Y. Luo, L. Wang, B. Xu and L. Xu. 2012. Occurrence of Sulfonamide and Tetracycline-resistant bacteria and resistant genes in aquaculture environment. *Water Research*. 46(7): 2355-2364.
- Patchanee, N. 2011. Removals of Coliforms and Antibiotic Resistant *E.coli* in Activated Sludge Process for Treatment of Domestic Wastewater. Master degree thesis, Kasetsart University, Bangkok. 111 p. [in Thai]
- Ponsin, T. 2013. Comparison Patterns between Antibiotic Resistant *E.coli* in Sequencing Batch Reactor (SBR) and Sequencing Batch Membrane Bioreactor (SB-MBR). Master degree thesis, Kasetsart University, Bangkok. 127 p. [in Thai]
- Reinthal, F.F., J. Posch, G. Feierl, G. W. ust, D. Haas, G. Ruckebauer, F. Mascher, E. Marth. 2003. Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge. *Water Research*. 37: 1685–1690.

- Roland, M.M., A. De Paola, S. R. Zywno, M.L. Motes Jr. and A. M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*. 99: 203–211.
- Schmidt, A.S., M.S. Bruun, I. Dalsgaard, K. Pedersen, and J.L. Larsen. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol*. 66: 4908 – 4915.
- Servais, P. and P. Julien. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total. Environ*. 408: 365-372.
- Zhang, R.Q., G.G. Ying, H.C. Su, L.J. Zhou, Y.S. Liu. 2013. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China. *Journal Environ Sci Health B*. 48(11): 999-1013.

การใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้นที่การเก็บรักษาต่างกัน

Usage of Trehalose as Cryoprotectant Agent on Preservation of Marine Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) in Concentrate Form at Different Storage

วุฒิชัย อ่อนเอี่ยม¹ วาสนา อากรรณรัตน์¹ และประภาพร ดีมาก²

Vutthichai Oniam¹, Wasana Arkronrat¹ and Prapapron Deemark²

¹สถานีวิจัยประมงคลองวาฬ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตำบลคลองวาฬ อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77000

²กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กรุงเทพฯ 10900

¹Klongwan Fisheries Research Station, Faculty of Fisheries, Kasetsart University,
Klongwan Subdistrict, Muang District, Prachuap Khiri Khan 77000.

²Coastal Aquaculture Technology Research Group, Coastal Aquaculture Research and Development Division,
Department of Fisheries, Bangkok 10900.

* Corresponding author, e-mail address: toey.oniam@gmail.com

บทคัดย่อ

ศึกษาการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ในรูปแบบเข้มข้น เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย และคุณค่าทางโภชนาการระหว่างการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C โดยไม่ใช้ทรีฮาโลส (control) เก็บด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ใช้ทรีฮาโลส (T1) และใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% (T2), 1% (T3) และ 2% (T4) โดยปริมาตร (v/v) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และดีกว่าการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ที่ใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% ไม่ใช้ทรีฮาโลส และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C โดยไม่ใช้ทรีฮาโลส ตามลำดับ นอกจากนี้ การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร ไม่มีผลข้างเคียงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมไปถึงปริมาณกรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ระหว่างการเก็บรักษา

คำสำคัญ: โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) สารรักษาสภาพเซลล์ ทรีฮาโลส

Abstract

Usage of trehalose as cryoprotectant agent on the preservation of marine rotifer *Brachionus rotundiformis* in concentrated forms was investigated, and compared bacterial cell count and proximate composition between stored by refrigerating (4 °C) without trehalose (control), biomass-freezing (-20 °C) without trehalose (T1), with 0.5% (T2), 1% (T3) and 2% (T4) trehalose as cryoprotectant agents (v/v), at 2-12 weeks. The results showed that usage of 1% and 2% trehalose for preservation of rotifer in concentrate forms optimally stored by biomass-freezing at 12 weeks

rather than stored by biomass-freezing with 0.5% trehalose, without trehalose and stored by refrigerating, respectively. In addition, 1% and 2% trehalose as cryoprotectant agent did not affect the bacteria, protein, carbohydrate and lipid contents, including eicosapentaenoic acid (EPA) and decosahexaenoic acid (DHA) contents in rotifer during stored at 2 to 12 weeks.

Keywords: rotifer (*Brachionus rotundiformis*), cryoprotectant agent, trehalose

คำนำ

โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ ซึ่งนักเพาะพันธุ์สัตว์น้ำทั่วโลกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการเป็นอาหารเริ่มแรกของสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเหมาะสมกับการพัฒนาการของลูกสัตว์น้ำ นอกจากนี้ ยังเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ทำให้สามารถเลี้ยงในปริมาณมากได้ง่ายภายในระยะเวลาอันสั้น (Wongrat, 2000; Dhert *et al.*, 2001; Ajah, 2010) อย่างไรก็ตาม การผลิตโรติเฟอร์ปริมาณมากในระดับฟาร์มของเกษตรกรนั้น มีข้อจำกัดอยู่หลายประการทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ รวมทั้งมีต้นทุนการผลิตที่สูง โดยเฉพาะในช่วงที่สภาพภูมิอากาศแปรปรวน เกษตรกรมักประสบปัญหาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง โรติเฟอร์ คือ มีการปนเปื้อนสูงเมื่อเลี้ยงปริมาณมากในบ่อกลางแจ้ง ทำให้ไม่สะดวกในการจัดเตรียม และการนำไปใช้ประโยชน์ ก่อให้เกิดปัญหาโรติเฟอร์ไม่เพียงพอต่อการนำมาอนุบาลลูกสัตว์น้ำ จนส่งผลกระทบต่อพัฒนาการ และอัตราการตายของลูกสัตว์น้ำได้ ซึ่งการเก็บเกี่ยว และเก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วยการแช่เย็น (อุณหภูมิ 3 ถึง 4 °C) หรือการแช่แข็ง (อุณหภูมิ -18 ถึง -20 °C) ไว้ในช่วงที่ขาดแคลนก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว (Wongrat, 2000)

สารรักษาสภาพเซลล์หรือที่เรียกว่า antifreeze agent หรือ preservative agent หรือ cryoprotectant agent เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง และการทำให้ละลายเนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายใน และนอกเซลล์ ซึ่งในขบวนการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งนั้น เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุดโดยการแตกและฉีกขาด ดังนั้น การเติมสารรักษาสภาพเซลล์ก่อนนำไป แช่แข็งหรือเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นธรรมดาก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถรักษาสภาพของเซลล์แพลงก์ตอนได้ แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงของสารที่ใช้เก็บรักษาแพลงก์ตอนด้วย เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่ต่างกันไป ซึ่งสารรักษาสภาพเซลล์บางชนิดอาจทำให้องค์ประกอบของโปรตีนเปลี่ยนโครงสร้างไป บางชนิดเป็นสารละลายเข้มข้นที่ช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว หรือบางชนิดมีคุณสมบัติทำให้เซลล์แพลงก์ตอนรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนยากกับการนำมาใช้ประโยชน์ เป็นต้น (Linhart *et al.*, 1993; Conlon *et al.*, 1998; Wongrat, 2000; Brand and Diller, 2004)

ทรีฮาโลส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) เป็นสารรักษาสภาพเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็น non-reducing sugar มีความเสถียรสูง เชื้อต่อการทำปฏิกิริยากับสารอื่น ไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตและมีราคาถูก โดยมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมเวชภัณฑ์ เครื่องสำอาง รวมไปถึงอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนิยมใช้เป็นสารรักษาสภาพ

เซลล์ของโปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์จากการแช่เย็น การแช่แข็งและการละลาย (Conlon *et al.*, 1998; Khalili *et al.*, 2009) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว การนำทรีฮาโลสมาประยุกต์ใช้ในเก็บรักษาแพลงก์ตอนจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาวิจัย ด้วยเหตุนี้ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาไรติเฟอร์ ทั้งนี้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาไรติเฟอร์สำหรับอนุบาลลูกสัตว์น้ำในยามที่ขาดแคลน ซึ่งน่าจะช่วยแก้ไขปัญหาคเพาะเลี้ยงไรติเฟอร์ของเกษตรกรได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการวิจัย

ศึกษาการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาไรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น (น้ำหนักเปียก) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 เก็บรักษาที่ความเย็น 4 °C (Refrigerating) (control) ชุดการทดลองที่ 2 เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C (Biomass-freezing) (T1) ชุดการทดลองที่ 3 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 °C (T2) ชุดการทดลองที่ 4 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 °C (T3) และชุดการทดลองที่ 5 เก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20 °C (T4)

การเลี้ยง และเก็บเกี่ยวไรติเฟอร์

เพาะขยายแพลงก์ตอนพืชสกุลคลอเรลลา (*Chlorella* spp.) แบบปริมาณมาก (mass culture) โดยเริ่มจากถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ที่อัตราส่วนหัวเชื้อ : น้ำขยาย เท่ากับ 1:25 น้ำความเค็ม 15 ppt ใช้ปุ๋ยสำหรับการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียวน้ำเค็ม (Wongrat, 2000) เพาะขยายเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำคลอเรลลามาศูนย์ขยายต่อภายในบ่อคอนกรีตขนาด 1.5×2.0×1.2 เมตร ที่ปริมาตรน้ำ 3,000 ลิตร นานประมาณ 3 วัน หรือที่ความหนาแน่นเซลล์ของคลอเรลลาประมาณ 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงใส่หัวเชื้อไรติเฟอร์ลงไปในบ่อ เลี้ยงไรติเฟอร์นาน 3 วัน จึงเก็บเกี่ยวผลผลิตไรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้น จากนั้นแบ่งรักษาไรติเฟอร์เก็บไว้ในถุงซิปลิ้นที่ปริมาตรถุงละ 50 กรัม (น้ำหนักเปียก) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป (Figure 1)



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 1 Process of marine rotifer (*Brachionus rotundiformis*) production in concentrate form: (a) rotifer reared in 3,000 L concrete tanks, (b) characteristics of water in rotifer tank before harvest, (c) rotifer harvesting (about 3-4 days after cultured), (d) post-harvest, and (e-f) product of rotifer in concentrate forms.

การตรวจสอบคุณภาพของโรติเฟอร์

ตรวจสอบคุณภาพของโรติเฟอร์ระหว่างการเก็บรักษาของในแต่ละชุดการทดลองด้วยการ (I) ตรวจสอบสภาพเซลล์ (II) การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย และ (III) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

(I) การตรวจสอบสภาพเซลล์ โดยใช้หลักการประเมินสภาพเซลล์ (Cell Condition Index) ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ ตามวิธีของ Heasman *et al.* (2001) ดังนี้

ระดับที่ 1 หมายถึง แย่มาก สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) > 75%

ระดับที่ 2 หมายถึง ไม่ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) > 50%

ระดับที่ 3 หมายถึง น่าพอใจ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) < 50%

ระดับที่ 4 หมายถึง ดี สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (เซลล์แตก) < 10%

ระดับที่ 5 หมายถึง ดีมาก สภาพเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

(II) การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย โดยหาปริมาณแบคทีเรียโดยใช้อาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ บันทึกรูปผล หาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง (CFU/ml) ดังสมการ

$$b = c \times 10 \times 10^f \quad (1)$$

เมื่อ b = ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)

c = จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ (CFU)

f = จำนวนเท่าของความเจือจางที่นับจำนวนได้

(III) การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) ได้แก่ โปรตีนด้วยวิธี Kjeldal method, คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Nitrogen free extract (NFE) และไขมันด้วยวิธี Ether Extract รวมทั้งกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid ; PUFA) ได้แก่ eicosapentaenoic acid (20:5n3; EPA) และ docosahexaenoic acid (22:6n3; DHA) ด้วยวิธี Gas chromatography ตามหลักการของ Association of Official Analytical Chemists methods (Helrich, 1990)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเพื่อหาความแตกต่างของข้อมูลคุณภาพโรติเฟอร์ที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิเคราะห์ และประมวลผลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic for Windows (Version 21.0; IBM Corp., Armonk, NY. USA)

ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ในบ่อคอนกรีตขนาด $1.5 \times 2.0 \times 1.2$ เมตร โดยให้แพลงก์ตอนพืชสกุลคลอเรลลา เป็นอาหาร ที่ปริมาตรน้ำ 3,000 ลิตร พบว่า ที่ปริมาณความหนาแน่นของโรติเฟอร์เริ่มต้นเฉลี่ย 20.1 ± 6.5 ตัว/มิลลิลิตร โรติเฟอร์จะเพิ่มจำนวนสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยงเฉลี่ย 3.0 ± 1.2 วัน โดยมีปริมาณความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 113.7 ± 26.4 ตัว/มิลลิลิตร และได้ผลผลิตโรติเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นเฉลี่ย 348.3 ± 25.6 กรัม/บ่อ ซึ่งจากการใช้หลักการประเมินสภาพเซลล์ (cell condition index) พบว่า หลังการเก็บเกี่ยวสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดีมาก (ระดับ 5) คือ สภาพเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และหลังการเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ ของการเก็บรักษาที่ความเย็น 4°C (control) การเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษา สภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20°C (T3) และการเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20°C (T4) สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับดี (ระดับ 4) คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 10% ส่วน การเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20°C (T2) พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับน่าพอใจ (ระดับ 3) คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 50% แต่สำหรับการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C (T1) พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับไม่ดี (ระดับ 2) ถึงแย่มาก (ระดับ 1) คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก > 50% และ > 75% เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Cell condition index data of rotifer preservation in concentrated forms at different stored.

Storage time	Cell condition index value				
	Control	T1	T2	T3	T4
Week 0	5	5	5	5	5
Week 2	5	2	3	4	4
Week 4	4	2	3	4	4
Week 6	4	1	3	4	4
Week 8	4	1	3	4	4
Week 10	4	1	3	4	4
Week 12	4	1	3	4	4

Note: Control = stored at 4°C (Refrigerating) without trehalose, T1 = stored at -20°C (Biomass-freezing) without trehalose, T2 = stored at -20°C with 0.5% trehalose (v/v), T3 = stored at -20°C with 1% trehalose (v/v), and T4 = stored at -20°C with 2% trehalose (v/v). Cell condition scoring criteria, 1 = very high proportion of cell wall breakdown (>75%), 2 = high proportion of cell wall breakdown (>50%), 3 = moderate cell wall damage (<50%), 4 = minor cell wall breakdown (<10%) and 5 = perfect-normal.

การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเมื่อเทียบระหว่างโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตแบบเข้มข้น พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดก่อนการเก็บเกี่ยว ($9.5 \pm 1.6 \times 10^5$ CFU/ml) และหลังการเก็บเกี่ยว ($9.2 \pm 3.2 \times 10^5$ CFU/ml) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในโรติเฟอร์ที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน พบว่า ชุดควบคุมจะพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าชุดการทดลอง T1, T2, T3 และ T4 ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ ($P < 0.05$, ANOVA) ส่วนผลการเก็บรักษาโรติเฟอร์ตามชุดการทดลองที่ T1, T2, T3 และ T4 ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 4, 6, 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) (Table 2)

ส่วนการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตแบบเข้มข้น พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน ($36.3 \pm 3.7\%$) คาร์โบไฮเดรต ($11.0 \pm 1.1\%$) และไขมัน ($17.4 \pm 2.7\%$) รวมไปถึงกรดไขมัน EPA (1.5 ± 0.5 มิลลิกรัม/กรัม) และ DHA (0.6 ± 0.2 มิลลิกรัม/กรัม) ของโรติเฟอร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ($36.0 \pm 1.6\%$, $12.0 \pm 1.9\%$, $17.0 \pm 1.6\%$, 1.4 ± 0.2 มิลลิกรัม/กรัม และ 0.5 ± 0.1 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ที่วิธีการเก็บรักษาต่างกัน พบว่า ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน รวมไปถึงกรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ในแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) (Table 3-7)

Table 2 Comparison of total bacterial cell count in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Total bacteria content ($\times 10^5$ CFU/ml)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	9.2 ± 3.2^a	8.5 ± 1.3^a	11.6 ± 2.9^a	8.7 ± 2.8^a	12.4 ± 6.5^a	9.4 ± 2.9^a	13.1 ± 7.1^a
T1	9.2 ± 3.2^a	3.2 ± 3.1^b	1.56 ± 0.5^b	3.3 ± 0.6^b	2.7 ± 2.6^b	3.0 ± 1.9^{bc}	3.3 ± 2.3^b
T2	9.2 ± 3.2^a	2.4 ± 0.5^b	2.4 ± 0.6^b	3.1 ± 1.5^b	2.4 ± 1.3^b	2.3 ± 0.3^{bc}	4.2 ± 2.3^b
T3	9.2 ± 3.2^a	2.4 ± 1.5^b	1.7 ± 0.6^b	2.0 ± 1.7^b	2.1 ± 0.7^b	0.2 ± 0.3^c	2.0 ± 0.4^b
T4	9.2 ± 3.2^a	4.1 ± 0.6^b	2.6 ± 0.5^b	1.7 ± 1.1^b	1.7 ± 1.5^b	5.8 ± 3.6^{ab}	4.2 ± 2.8^b

Note: Means within the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3 Comparison of protein content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Protein content (% dry weight)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	36.0±1.6 ^a	37.2±3.3 ^a	38.0±1.5 ^a	38.1±3.6 ^a	32.0±3.8 ^a	34.4±0.3 ^a	34.4±1.6 ^a
T1	36.0±1.6 ^a	36.3±3.2 ^a	32.6±4.0 ^a	34.8±3.9 ^a	33.5±2.1 ^a	34.8±1.3 ^a	33.2±2.9 ^a
T2	36.0±1.6 ^a	36.7±3.1 ^a	34.4±3.2 ^a	34.5±1.8 ^a	31.2±3.8 ^a	32.0±2.0 ^a	33.2±2.0 ^a
T3	36.0±1.6 ^a	32.9±3.8 ^a	37.3±3.7 ^a	35.2±2.4 ^a	34.1±1.3 ^a	34.3±1.8 ^a	31.6±4.5 ^a
T4	36.0±1.6 ^a	34.3±3.6 ^a	36.5±3.7 ^a	34.4±4.2 ^a	33.4±3.0 ^a	34.4±2.0 ^a	34.5±0.8 ^a

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$).

Table 4 Comparison of carbohydrate content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Carbohydrate content (% dry weight)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	12.0±1.9 ^a	12.0±1.8 ^a	12.3±1.7 ^a	11.7±0.8 ^a	11.6±1.2 ^a	11.5±0.4 ^a	11.6±1.4 ^a
T1	12.0±1.9 ^a	12.1±0.4 ^a	11.7±0.7 ^a	11.2±0.8 ^a	11.8±0.5 ^a	11.2±0.4 ^a	11.2±0.6 ^a
T2	12.0±1.9 ^a	12.3±1.7 ^a	11.8±1.4 ^a	11.9±1.9 ^a	11.6±1.1 ^a	12.2±1.8 ^a	12.1±1.0 ^a
T3	12.0±1.9 ^a	11.3±1.4 ^a	11.0±1.7 ^a	11.6±1.6 ^a	11.7±1.5 ^a	11.6±1.6 ^a	11.5±2.0 ^a
T4	12.0±1.9 ^a	12.0±2.1 ^a	11.6±2.0 ^a	11.4±1.8 ^a	11.6±1.5 ^a	11.7±1.9 ^a	11.7±2.1 ^a

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$).

Table 5 Comparison of lipid content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Lipid content (% dry weight)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	17.0±1.6 ^a	14.7±2.4 ^a	14.5±1.7 ^a	14.1±2.4 ^a	14.4±1.3 ^a	13.0±2.2 ^a	13.1±2.5 ^a
T1	17.0±1.6 ^a	16.5±0.7 ^a	15.5±0.3 ^a	14.8±0.4 ^a	14.8±1.5 ^a	13.9±1.1 ^a	13.4±0.5 ^a
T2	17.0±1.6 ^a	16.4±1.2 ^a	15.7±1.6 ^a	14.0±1.6 ^a	13.0±2.2 ^a	12.6±2.8 ^a	11.9±2.3 ^a
T3	17.0±1.6 ^a	15.0±2.4 ^a	15.8±1.9 ^a	14.3±0.9 ^a	13.8±0.8 ^a	13.0±0.7 ^a	13.2±0.4 ^a
T4	17.0±1.6 ^a	15.1±1.0 ^a	14.7±1.7 ^a	13.8±1.1 ^a	13.0±1.0 ^a	13.1±0.5 ^a	12.4±0.6 ^a

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$).

Table 6 Comparison of eicosapentaenoic acid (EPA) content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Eicosapentaenoic acid content (mg/g)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	1.4±0.2 ^a	1.3±0.1 ^a	1.1±0.2 ^a	1.1±0.1 ^a	0.9±0.1 ^a	0.8±0.2 ^a	0.8±0.2 ^a
T1	1.4±0.2 ^a	1.4±0.5 ^a	1.3±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	0.9±0.2 ^a	0.7±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a
T2	1.4±0.2 ^a	1.3±0.2 ^a	1.2±0.3 ^a	0.9±0.2 ^a	0.9±0.1 ^a	0.9±0.2 ^a	0.8±0.1 ^a
T3	1.4±0.2 ^a	1.3±0.3 ^a	1.1±0.1 ^a	0.9±0.1 ^a	0.9±0.0 ^a	0.9±0.0 ^a	0.7±0.0 ^a
T4	1.4±0.2 ^a	1.3±0.1 ^a	1.1±0.1 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a	0.9±0.1 ^a	0.9±0.0 ^a

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$).

Table 7 Comparison of decosahexaenoic acid (DHA) content in rotifer (concentrate form) with and without trehalose as cryoprotectant agent at different storage times.

Treatments	Decosahexaenoic acid content (mg/g)						
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
Control	0.5±0.1 ^a	0.4±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
T1	0.5±0.1 ^a	0.4±0.3 ^a	0.3±0.1 ^a	0.2±0.2 ^a	0.0±0.1 ^a	0.0±0.0 ^a	0.1±0.1 ^a
T2	0.5±0.1 ^a	0.4±0.1 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
T3	0.5±0.1 ^a	0.3±0.0 ^a	0.3±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.0±0.0 ^a
T4	0.5±0.1 ^a	0.3±0.2 ^a	0.3±0.1 ^a	0.2±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.0±0.1 ^a	0.1±0.0 ^a

Note: Means within the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$).

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ในแต่ละช่วงเวลา (สัปดาห์) พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์จะมีปริมาณลดลง หรือน้อยกว่าช่วงแรกของการเก็บรักษา (ช่วง 2 สัปดาห์แรก) อย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระยะเวลาการเก็บรักษาประมาณ 4-6 สัปดาห์ขึ้นไป ($P<0.05$, ANOVA) ส่วนปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับช่วงแรกของการเก็บรักษา ($P>0.05$, ANOVA) (Figure 2)

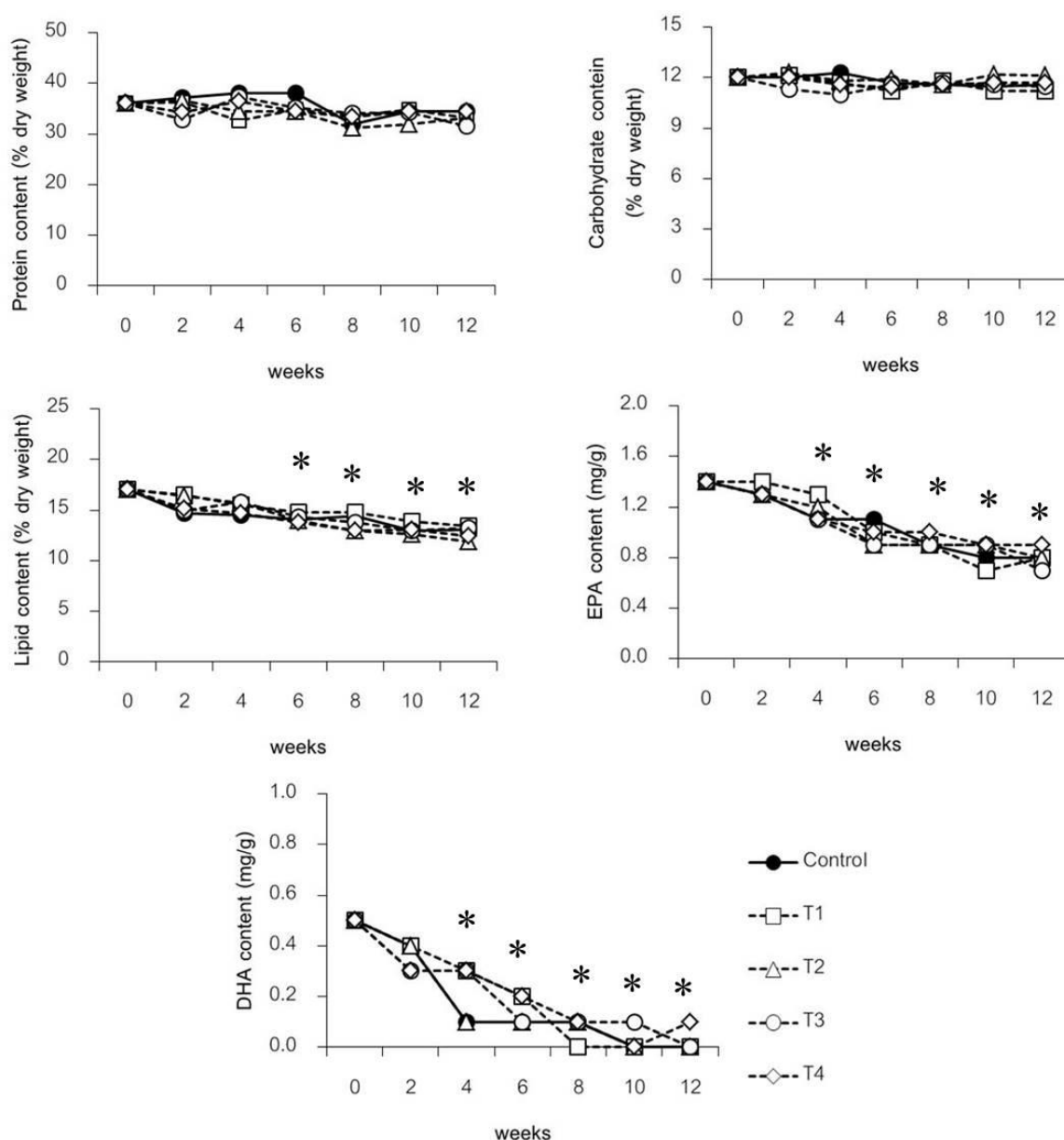


Figure 2 Changes of protein, carbohydrate, lipid, EPA and DHA contents in rotifer (concentrate form) at during storage time. An asterisk denotes statistical significance, $P < 0.05$.

วิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาการเก็บรักษาไรติเฟอร์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-12 สัปดาห์ พบว่า การเก็บรักษาโดยการเติมสารรักษาสภาพเซลล์ด้วยทรีฮาโลสเข้มข้น 1-2% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20°C สภาพเซลล์ของไรติเฟอร์อยู่ในระดับดี คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก $< 10\%$ ส่วนการเก็บรักษาโดยการเติมทรีฮาโลสเข้มข้น 0.5% โดยปริมาตรก่อนนำไปเก็บที่ความเย็น -20°C พบว่า สภาพเซลล์ของไรติเฟอร์อยู่ในระดับน่าพอใจ คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก $< 50\%$ ส่วนการเก็บรักษาด้วย

วิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่เติมสารรักษาสภาพเซลล์ พบว่า สภาพเซลล์ของโรติเฟอร์อยู่ในระดับไม่ดี ถึงแย่มาก คือ สภาพเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก > 50% และ >75% เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ตามลำดับ ดังนั้น การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1-2% โดยปริมาตรสามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งได้นานถึง 12 สัปดาห์ (เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง หรือเซลล์แตก < 10%) และดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% (เซลล์แตกมากกว่า 10%) ซึ่งการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5-2% โดยปริมาตร ไม่ส่งผลกระทบ หรือผลข้างเคียงต่อปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์ที่เก็บรักษา แต่ถึงอย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ของโรติเฟอร์มีแนวโน้มลดลงจากช่วงแรกของการเก็บรักษาอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระยะเวลาการเก็บรักษาประมาณ 4-6 สัปดาห์เป็นต้นไป ทั้งนี้สันนิษฐานได้ว่า การเปลี่ยนแปลงคุณค่าของสารอาหารที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้เกิดจากผลข้างเคียงของการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ เนื่องจากว่าปริมาณไขมัน กรดไขมัน EPA และ DHA ในชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมทรีฮาโลส (ชุดควบคุม) ก็ลดลงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า อาจเกิดจากการสูญเสียคุณค่าของสารอาหารในระหว่างการเก็บที่มาจากปัจจัยอื่น เช่น ออกซิเจน ความชื้น และระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บ เป็นต้น (Ward and Baj, 1988; Jiang, 2000) นอกจากนี้ การเก็บรักษาโรติเฟอร์ด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C โดยการใช้ทรีฮาโลสเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ระดับ 0.5-2% สามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง หรือเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ความเย็น 4 °C

โดยทั่วไปแล้วปริมาณการเติมสารรักษาสภาพเซลล์เพื่อใช้ในการเก็บรักษาแพลงก์ตอนจะอยู่ที่ 1-5% โดยปริมาตร แต่ทั้งนี้ปริมาณของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิด หรือองค์ประกอบทางเคมีของสารรักษาสภาพเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ของสารรักษาสภาพเซลล์ และผลข้างเคียงของสารรักษาสภาพเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแพลงก์ตอน เป็นต้น เนื่องจากสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ที่แตกต่างกัน (Linhart *et al.*, 1993; Conlon *et al.*, 1998; Wongrat, 2000; Brand and Diller, 2004 Arkonrat *et al.*, 2016) ตัวอย่างเช่น 2% กลูโคสมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์ไชรินน้ำจืด (*Chironomus fuscipes*) น้อยกว่า 1% ทรีฮาโลสเนื่องจากทรีฮาโลสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ส่วนกลูโคสเป็นกลุ่มของสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ โดยสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในจำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็ง และละลาย ในขณะที่กลุ่มสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งขณะแช่แข็งเยื่อหุ้มเซลล์จะเป็นส่วนที่ได้รับความเสียหายมากที่สุด ด้วยเหตุนี้ การใช้สารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์จึงใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า และจะมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเซลล์สูงกว่า (Thipkonglars, 2010)

ทรีฮาโลสเป็นหนึ่งในสารรักษาสภาพเซลล์ที่นิยมใช้ เนื่องจากเป็นสารรักษาสภาพเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ โดยมีกลไกในการทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ Conlon *et al.* (1998) รายงานไว้ว่า ประสิทธิภาพของสารรักษาสภาพเซลล์แต่ละชนิดขึ้นอยู่ความสามารถในการป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เช่น การเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ การเกิด

ความสมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโทรไลต์ และการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ Arkronrat *et al.* (2016) รายงานว่า การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5-2% โดยปริมาตร สามารถรักษาสภาพเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชสกุล *Chlorella* sp. ในรูปแบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ได้นานถึง 12 สัปดาห์ นอกจากนี้ Chuthong (2009) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของทรีฮาโลสที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาไรแดง หนอนแดง และอาร์ทีเมียแช่แข็ง คือ 10%, 15% และ 15% ของปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นาน 28 วัน โดยรูปร่างเสียสภาพไม่เกิน 30% แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสูญเสียคุณค่าของสารอาหารระหว่างการเก็บรักษาไรดิเฟอร์ในรูปแบบเข้มข้นด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C รวมไปถึงศึกษาการนำไรดิเฟอร์ที่เก็บรักษาไปใช้ประโยชน์ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป ทั้งนี้ เพื่อเป็นการต่อยอดองค์ความรู้ และเพื่อนำผลงานวิจัยมาใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม

สรุปผล

จากหลักการประเมินสภาพเซลล์การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 1% และ 2% โดยปริมาตร สามารถใช้รักษาสภาพเซลล์ของไรดิเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C ได้นานถึง 12 สัปดาห์ และดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสที่ระดับ 0.5% และไม่ใช้ทรีฮาโลส ตามลำดับ นอกจากนี้ การใช้ทรีฮาโลสที่ระดับความเข้มข้น 1% และ 2% โดยปริมาตร ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของปริมาณแบคทีเรีย รวมไปถึงไม่มีผลข้างเคียงต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของไรดิเฟอร์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ที่สนับสนุนทุนศึกษาวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

เอกสารอ้างอิง

- Ajah, P.O. 2010. Mass culture of Rotifer (*Brachionus quadridentatus* [Hermann, 1783]) using three different algal species. African Journal of Food Science 4 (3): 80-85.
- Arkronrat, W., Deemark, P., and Oniam, V. 2016. Usage of trehalose as cryoprotecting agent on preservation of marine microalgae (*Chlorella* sp. and *Chaetoceros calcitrans*) in concentrate form. In 6th International Fisheries Symposium (IFS 2016). Vietnam, October 30 – November 2, 2016. p. 521.
- Brand, J.J., and Diller, K.R. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. Nova Hedwigia 79 (1-2): 175-189.
- Chuthong, T. 2009. Using of trehalose for increasing efficiency in preservation of frozen natural feed for aquaculture. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. 101 p. [in Thai]

- Conlon, J.M., Yano, K., Chartrel, N., Vaudry, H., and Storey, K.B. 1998. Freeze tolerance in the wool frog *Rana sylvatica* is associated with unusual structural features in insulin but not in glucagon. *Journal of Molecular Endocrinology* 21: 153-159.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., and Sorgeloos, P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200: 129-146.
- Heasman, M.P., Sushames, T.M., Diemat, J.A., Connor, W.A.O., and Foulkes, L.A. 2001. Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture Part 2: Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology. NSW Fisheries. New South Wales. 149 p.
- Helrich, K. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Virginia. 1230 p.
- Jiang, S.T. 2000. Enzyme and their effects on seafood texture. In: *Seafood Enzyme Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality*, edited by Haard, N.F., and Simpson B.K. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 411-450.
- Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M.J., Rashidi, A., and Fazeli, P. 2009. Effects of sucrose and trehalose on the freezability of markhoz goat spermatozoa. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 22 (12): 1614-1619.
- Linhart, O., Billard, R., and Proteau, J.P. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. *Aquaculture* 115: 347-359.
- Thipkonglars, N. 2010. Developing some techniques for using chironomid larvulae (Diptera: Chironomidae) in Aquaculture. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. 234 p. [in Thai]
- Ward, D.R., and Baj, N.J. 1988. Factor affecting microbiological quality of seafoods. *Food Technol.* 42 (3): 85-89.
- Wongrat, L. 2000. Manual of Plankton Culture. Kasetsart University, Bangkok. 127 p. [in Thai]

การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในปลาตระกูลตะเพียน โดยวิธีการทดสอบพีซีอาร์ข้ามชนิด

Microsatellite markers investigation in Cyprinid species by cross-species PCR
วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์^{1*} อนงค์ นิมลมะย์² พนม กระจำพจน์ สอดสุข² คงภพ อำพลศักดิ์¹ และอุดม สารชาติ¹
Visarut Chailertit^{1*} Anong Nimlamai² Panom K. Sodsuk² Kongphop Ampolsak¹ and Udom Saracharti¹

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

¹Pathumthani Aquaculture Genetics Research and Development Center,
Aquaculture Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries.

²กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

²Aquaculture Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries.

*Corresponding author: ku_bcv@hotmail.com

บทคัดย่อ

ปลาตะกูลตะเพียนเป็นปลาน้ำจืดที่มีจำนวนชนิดและแพร่กระจายมากที่สุดในประเทศไทย และเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากต่อเศรษฐกิจและระบบนิเวศ สำหรับการศึกษาได้นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 50 ตำแหน่งที่พัฒนาจากปลา 5 ชนิด ได้แก่ ปลาตะเพียน ปลาน้ำ ปลาจืด ปลาปากดำ ปลาเยือก และปลาเยือกเทศ มาทดสอบข้ามชนิดกับปลาตะกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด พบว่าเครื่องหมายจำนวน 49 ตำแหน่งสามารถสร้างผลผลิตพีซีอาร์ได้จำนวน 14 – 32 ตำแหน่งต่อชนิดของปลา และพบเครื่องหมายที่ให้ผลเป็น polymorphic จำนวน 3 – 20 ตำแหน่งต่อชนิดของปลา นำผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์กับปลาจำนวน 16 ชนิด ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ประกอบด้วยจำนวนอัลลีลที่ปรากฏ (apparent alleles, A_a) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of alleles, A_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity, H_e) มีค่า $A_a = 2.33 - 5.00$, $A_e = 1.83 - 3.92$, $H_o = 0.18 - 0.67$ และ $H_e = 0.34 - 0.69$ จากผลการศึกษาที่ได้แสดงถึงศักยภาพในการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาจากแหล่งเพาะเลี้ยงและจากแหล่งธรรมชาติต่อไป

คำสำคัญ: พีซีอาร์ข้ามชนิด ไมโครแซทเทลไลต์ ปลาตะกูลตะเพียน

Abstract

Cyprinid species are the most abundant and largest species of freshwater fish in Thailand and these species are economic and ecological importance. In the present study, fifty microsatellite loci in *Barbodes gonionotus*, *Cyprinus carpio*, *Labeo chrysophekadion*, *Probarbus jullieni* and *Labeo rohita* were tested for cross-species amplification in sixteen cyprinid species in Thailand. The PCR products were recorded in 14 to 32 loci, depending on species. Three to twenty loci were found polymorphic. Genetic variation for 16 Cyprinid species was presented in four different

parameters (on average per loci), i.e., apparent alleles (A_a), effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). The results indicated that these four parameters differed, depending on species ($A_a = 2.33-5.00$, $A_e = 1.83-3.92$, $H_o = 0.18-0.67$ and $H_e = 0.34-0.69$). This study presents a potential result of cross-species amplification to establish genetic marker sets for genetic diversity research in hatchery and natural populations.

Keywords: cross-species PCR, microsatellites, Cyprinid species.

คำนำ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์น้ำ อีกทั้งยังนำมาใช้ในการศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมและใช้ในการแยกกลุ่มประชากรในสัตว์น้ำ ใช้ศึกษาติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรในโรงเพาะฟักที่อาจเกิดมาจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่เหมาะสม ซึ่งส่งผลกระทบต่อลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และการตรวจสอบการผสมเลือดชิด ทำให้ใช้ประโยชน์ในการวางแผนจัดการพ่อแม่พันธุ์ต่อไปได้ นอกจากนี้ เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายที่มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง จึงมักใช้ศึกษาหา linkage กับยีนที่สนใจได้ดี และในลักษณะปริมาณที่เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ถ้าทราบยีนที่มีผลต่อลักษณะดังกล่าว ก็สามารถทำ QTL (Quantitative trait loci) ได้ เพื่อใช้ติดตามยีนที่สนใจ (Poompuang, 2015)

ปัจจุบันการผลิตพันธุ์สัตว์น้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงได้เล็งเห็นปัญหาจากการจัดการพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่ถูกต้องตามหลักพันธุศาสตร์ โดยมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจากประชากรพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งสามารถนำผลที่ได้ไปใช้บริหารจัดการพ่อแม่พันธุ์เพื่อลดปัญหาการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม และผลของการผสมเลือดชิดที่จะเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้สำหรับการวางแผนงานในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ เพื่อเพิ่มความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ (Poompuang, 2015) อีกทั้งยังใช้สำหรับการผลิตพันธุ์สัตว์น้ำสำหรับปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อเพิ่มผลผลิตการประมงและฟื้นฟูทรัพยากรการประมงที่เสื่อมโทรมในแหล่งน้ำนั้นๆ โดยไม่ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหล่งน้ำเปลี่ยนแปลงไป

สำหรับพันธุ์สัตว์น้ำจัดที่หน่วยงานภายใต้กรมประมงได้ผลิตเพื่อการเพาะเลี้ยงและปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินั้นมีอยู่หลายชนิด สัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นปลาในวงศ์ Cyprinidae เช่น ปลาดุกเพียน ปลาดุกเพียนทอง ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์เทศ ปลาสลวยขาว ปลาบ้า เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกิจกรรมการจัดการพ่อแม่พันธุ์ และการผลิตพันธุ์สัตว์น้ำสำหรับปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติให้มากขึ้น จึงควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำเหล่านี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการพันธุ์สัตว์น้ำ แต่เนื่องด้วยปลาในวงศ์ Cyprinidae มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ไว้แล้วหลายชนิดเช่น ปลาดุกเพียน (McConnell *et al.*, 2001; Kamonrat *et al.*, 2002) ปลาไน (Crooijmans *et al.*, 1997) ปลากาดำ (Nguyen, in press) ปลายี่สก (Sukumasavin *et al.*, 2004) ปลายี่สกเทศ (Das *et al.*, 2005) เป็นต้น และมีรายงานว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้กับสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันได้ (Das *et al.*, 2005; Chailertit

et al., 2014) อีกทั้งยังพบว่ามีการศึกษาการทดสอบข้ามชนิดในปลาตระกูลตะเพียน (Cyprinid) ในยุโรปหลายชนิด (Holmen et al., 2009, Dubut et al., 2010) และในเอเชีย (Lal et al., 2004, Sukumasavin et al., 2004, Das et al., 2005) ดังนั้นจึงควรนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่มีรายงานเหล่านี้มาทดสอบในปลากลุ่มใกล้เคียงกัน เนื่องจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มีต้นทุนที่สูง และการนำเครื่องหมายที่พัฒนาได้จากปลาที่มีความใกล้เคียงกันมาทดสอบเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับใช้ศึกษาได้

การศึกษานี้จะทำการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาจากปลาตะเพียนขาว ปลาในปลากาดำ ปลาเยือก และปลาเยือกเทศ ซึ่งเป็นปลาในวงศ์ Cyprinidae รวมจำนวน 50 ตำแหน่ง โดยนำมาทดสอบพีซีอาร์กับปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด ซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน เพื่อนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเหล่านี้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างครีปลาจำนวน 16 ชนิดได้แก่ ปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*) ปลาตะเพียนทอง (*Barbonymus altus*) ปลาตะโกก (*Cyclocheilichthys enoplos*) ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus cirrhosus*) ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลากาดำ (*Labeo chrysophekadion*) ปลาเยือกไทย (*Probarbus jullieni*) ปลาเยือกเทศ (*Labeo rohita*) ปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) ปลาบ้า (*Leptobarbus hoevenii*) ปลากระแห (*Barbonymus schwanenfeldii*) ปลากระโห้ (*Catlocarpio siamensis*) ปลาลิ้น (*Hypophthalmichthys molitrix*) ปลาแก้มขี้ (*Systomus rubripinnis*) ปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchus bicolor*) และปลากระมัง (*Puntiplites proctozystron*) จำนวนชนิดละ 15 ตัวอย่าง (ยกเว้นปลากระโห้มีจำนวน 13 ตัวอย่าง) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุดรดิตถ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี สกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากวิธีการของ Boom et al. (1990), Höss and Pääbo (1993), Höss (1994) และ Kemp et al. (2006) วัดปริมาณดีเอ็นเอจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บนอะกาโรสเจล (agarose gel) เข้มข้น 1% เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เบื้องต้น

ทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 50 ตำแหน่ง (Table 1) ที่พัฒนาจากปลาตะเพียนจำนวน 10 ตำแหน่ง ปลาไน จำนวน 13 ตำแหน่ง ปลากาดำ จำนวน 9 ตำแหน่ง ปลาเยือก จำนวน 6 ตำแหน่ง และปลาเยือกเทศ จำนวน 12 ตำแหน่ง กับตัวอย่างปลาจำนวน 16 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง เพื่อค้นหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ในปลาแต่ละชนิด ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 10 μ l มีสารต่าง ๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, ไพรมเมอร์อย่างละ 0.5 μ M, 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs (Biotech rabbit, Hennigsdorf, Germany), 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega,

Madison, WI, USA) ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 denaturation 95 °C 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 denaturation 95 °C 30 วินาที annealing ที่ T_a °C (Table 1) 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3 extension 72 °C 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 6% denaturing polyacrylamide gel ในบัฟเฟอร์ TBE ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วยวิธี silver nitrate (Benbouza *et al.*, 2006) อ่านผลโดยเทียบขนาดกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 DNA ladders (Invitrogen, CA, USA) และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้มีความเหมาะสม จากนั้นคัดเลือกชนิดปลาที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

วิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด โดยให้ตำแหน่งที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มีค่าเท่ากับ 1 และไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ค่าเท่ากับ 0 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity for qualitative data) โดยวิธี Jaccard's coefficient จัดกลุ่มความสัมพันธ์ (clustering) ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) และแสดงผลในรูปแบบ dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.0 (Rohlf, 1998)

การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่คัดเลือกได้กับประชากรปลาแต่ละชนิด

นำชนิดของปลาที่คัดเลือกได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เบื้องต้นมาทดสอบกับปลาจำนวน 15 ตัวอย่างต่อชนิด โดยนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แยกแต่ละตัวอย่าง และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 6 % denaturing polyacrylamide gel นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลต่อไป การวิเคราะห์จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และความหลากหลายทางพันธุกรรมรายชนิด

นำผลที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสมาวิเคราะห์หาจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยจะต้องให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลง่ายในปลาแต่ละชนิด จากนั้นวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ได้แก่ จำนวนอัลลีลที่ปรากฏ (apparent alleles, A_a) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of alleles, A_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (observed heterozygosity, H_o) ค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity, H_e) และทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กด้วยวิธี Chi-square goodness-of-fit test (P_{HWE}) โดยใช้โปรแกรม Popgen v.1.31 (Yeh *et al.*, 1999)

Table 1 Fifty microsatellite makers used in this study: locus, sequence of primer, PCR product size, annealing temperature, species and reference

Locus	Primer (5'-3')	Size (bp)	T _a (C°)	Species/Reference
Bgon2	F: ATACACCCAAAGTATGTGTGCC R: AGAAGTTAAACAGGTGCATTGC	101 – 153	56	<i>Barbodes gonionotus</i> / McConnell <i>et al.</i> , 2001
Bgon8	F: GATAGATTCATTGAGCTGGCTG R: ACGTTTGTGTATGTGGATGTGC	120 – 148	60	
Bgon12	F: TATTGAATTGAAATTGCAAACTTTG R: TAGCTATACTGTATATATGTAACC	116 – 162	53	
Bgon13	F: CCCGTGCAATTCAATATG R: TAAGTAGCACAGATGTGAGG	108 – 254	53	
Bgon18	F: TCATTATGTCCTGCCAAGATG R: GGTAATCACTCACAACCTCACC	75 – 159	53	
<i>Bgon-17</i>	F: TTACAAGGGTTACATACTG R: CAGTCTCATATTTGAAAGCAG	108 – 182	49	<i>Barbodes gonionotus</i> / Kamonrat <i>et al.</i> , 2002
<i>Bgon-22</i>	F: TCTTGTTGATCACACGGACG R: GTGACTGTATCAATGAGTCTG	73 – 99	49	
<i>Bgon-69</i>	F: GCAAAGGTTCTGTCAAGG R: GTATCCAGAAACATGTTTCAAG	87 – 103	49	
<i>Bgon-75</i>	F: CTGGTAAAGACTTCAGATGC R: GCATGCAAAATGAGAAAGGCT	96 – 118	53	
<i>Bgon-79</i>	F: GCCAGACTGGAGCGAGG R: GTTCGGTGAAGCCATGAGG	101 – 137	53	
MFW1	F: GTCCAGACTGTCATCAGGAG R: GAGGTGTACACTGAGTCACGC	212	55	<i>Cyprinus carpio</i> / Crooijmans <i>et al.</i> , 1997
MFW2	F: CACACCGGGCTACTGCAGAG R: GTGCAGTGCAGGCAGTTTGC	200	55	
MFW7	F: TACTTTGCTCAGGACGGATGC R: ATCACCTGCACATGGCCACTC	186	55	
MFW9	F: GATCTGCAAGCATATCTGTCG R: ATCTGAACCTGCAGCTCCTC	117	55	
MFW11	F: GCATTGCCTTGATGGTTGTG R: TCGTCTGGTTTAGAGTGCTGC	202	55	
MFW13	F: ATGATGAGAACATTGTTTACAG R: TGAGAGAACAATGTGGATGAC	184	50	
MFW15	F: CTCCTGTTTTGTTTTGTGAAA R: GTTACAAGGTCATTTCCAGC	264	55	

Table 1 (continue)

Locus	Primer (5'-3')	Size (bp)	T _a (C°)	Species/Reference
MFW16	F: GTCCATTGTGTCAAGATAGAG R: TCTTCATTTCAAGGCTGCAAAG	171	55	<i>Cyprinus carpio</i> Crooijmans <i>et al.</i> , 1997
MFW17	F: CTCAACTACAGAGAAATTTTCATC R: GAAATGGTACATGACCTCAAG	315	55	
MFW20	F: CAGTGAGACGATTACCTTGG R: GTGAGCAGCCACATTGAAC	249	55	
MFW24	F: GCTCCAGATTGCACATTATAG R: CTACACACACGCAGAGCCTTTC	231	55	
MFW26	F: CCCTGAGATAGAAACCACTG R: CACCATGCTTGGATGCAAAAG	136	55	
MFW29	F: GTTGACCAAGAAACCAACATGC R: GAAGCTTTGCTCTAATCCACG	158	55	
LcB04	F: CGCGTGGACTAACAACACAT R: TGTGGCAGTTGTCACAGGT	284 – 294	57	<i>Labeo chrysophekadion</i> Nguyen, in press
LcB10	F: CCAGCAGGAGTTCATGTGTT R: CTCTGCCTGTGTTTTGCAG	223 – 227	57	
LcD11	F: GGCATAGGGGAAAGTCCATT R: GCATCATTCATGCTGCATTT	123 – 125	57	
LcF10	F: CCAGAGAGATGCACCAATCA R: CTCTATGCTGCAGGGGATTC	207 – 273	57	
LcF12	F: TGCGAGACATTTTGAAGGACT R: GGATGTCCCCAGTAGGGAGT	120 – 154	57	
LcG03	F: TGTGGGAGTGTGCGACTAAG R: ACGTCACAATGCACTTCACA	95 – 113	57	
LcG06	F: CTTGTTTCCACCCTGCACTT R: AAACACCCGTGGGTTTTACA	196 – 200	57	
LcG09	F: GCATGAATAGCGGGAGACAT R: CTGCTGATGAGATCCCTGGT	274 – 296	57	
LcH09	F: TTGGAGCTCTTTAGGCCTCTC R: TCAGCTAAAGCACTGCAGGA	283 – 287	57	
Proji-1	F: ATGGCTGAGACCAGCAAGACAG R: GAGTGGATGTTTGTGTGCATGAG	207 – 239	60	<i>Probarbus jullieni</i> Sukumasavin <i>et al.</i> , 2004
Proji-3	F: GGAATGATCTCTGGATGGAT R: GGAGCTCAAACCCAC AAA	114 – 138	53	

Table 1 (continue)

Locus	Primer (5'-3')	Size (bp)	T _a (C°)	Species/Reference
Proj-6	F: AGCAGGACGAGCCATCTTGA R: GGGTGGAGTAATGAGGCGGTATT	158 – 180	57	<i>Probarbus jullieni</i> Sukumasavin <i>et al.</i> , 2004
Proj-8	F: TCCCTCGGTAAACAAGCTTTCTC R: GAGCTTCATCCAGCCTCCATC	224 – 256	53	
Proj-9	F: GATGCGGCTCGGTCTAAGAG R: CTGTCAGTGGGTCAATTGTGAGG	188 – 208	57	
Proj-12	F: CTCTGTACAGTGACAGGCCGAAG R: ACCATTACGCCTATGGAGAGTCC	230 – 282	60	
Lr1	F: GACCCCTAACCCTTGACCTT R: TGGGATAATGCAGGGAAAAC	171	58	<i>Labeo rohita</i> Das <i>et al.</i> , 2005
Lr3	F: ATCTGGCTGCCTATTCACC R: CATCGGCGACTGCACTGGA	152	58	
Lr6	F: TATCCTGGCTGAAAACCTTG R: CCCCTACAGGAACAACCAT	160	56	
Lr10	F: GATCTTCAGCGCCAGCGTG R: GAGGACCTGCCCAGCATG	250	59	
Lr12	F: CACCGCTGCTGTCCATCA R: AGGTCGGCCAGATACACG	161	58	
Lr14a	F: GATCAACTGCTGCCACAC R: GGTGGTTGTTCCCATGTG	183	55	
Lr14b	F: TCACATGGGAACAACAAACC R: CCGCCGCTTACCCATCAC	172	58	
Lr20	F: GCCCGCTGCCGTCTGAC R: CAATAACTCAGCATGTGGAG	144	58	
Lr21	F: GATCAGAGGGTCAATGTGG R: CAGCAGAGTACTATGGAAGA	148	58	
Lr23	F: GGAAATTACAAATGTGCTGATG R: AGCGCTGCTGTCACTTCTGT	186	60	
Lr24	F: CAAGGCCAAAAGTGTCCAT R: AGGAAATTGGTAAAGTGTTC	170	56	
Lr26	F: CCAGGGAGCTGCTAAGAAT R: AGCGCTTCATGCAGTCTAC	151	56	

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างครีปลาในตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด นำมาสกัดดีเอ็นเอ เมื่อนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm พบว่าคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพที่ดี เนื่องจากมีค่าอัตราส่วน A260/A280 อยู่ระหว่าง 1.9 – 2.1 และมีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 100 – 1,200 ng/ μ l

การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้น

หากอนุมานว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 50 ตำแหน่ง สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ทั้งหมดในปลา 16 ชนิด จะได้ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็น 800 ตำแหน่ง (15 ตำแหน่ง x 16 ชนิด) การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ รวมจำนวน 471 ตำแหน่ง หรือคิดเป็น 58.88% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เบื้องต้นจำนวน 471 ตำแหน่งมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในแต่ละชนิดด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.0 (Rohlf, 1998) พบว่ามีความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันตามหลักอนุกรมวิธาน (Figure 1) คือ ปลาเยือกเทศ (*L. rohita*) และปลากาดำ (*L. chrysophekadion*) มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่ในสกุลเดียวกัน (*Labeo*) และเช่นเดียวกันในปลาตะเพียน (*B. gonionotus*) กับปลากะแห (*B. schwanenfeldii*) แต่เมื่อพิจารณาปลาตะเพียนทอง (*B. altus*) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกับปลาตะเพียนและปลากะแหพบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อยมาก ทั้งนี้ Yue *et al.* (2010) ได้กล่าวว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากการวิวัฒนาการ ในบริเวณตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งบริเวณขนบข้าง (flanking region) และบริเวณลำดับเบสซ้ำ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวทำให้การวิเคราะห์ผลได้ผลที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่สามารถทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับนิวคลีโอไทด์ อาจส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดในการศึกษา ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงระดับนิวคลีโอไทด์เพื่อนำไปสู่การศึกษาถึงความสัมพันธ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

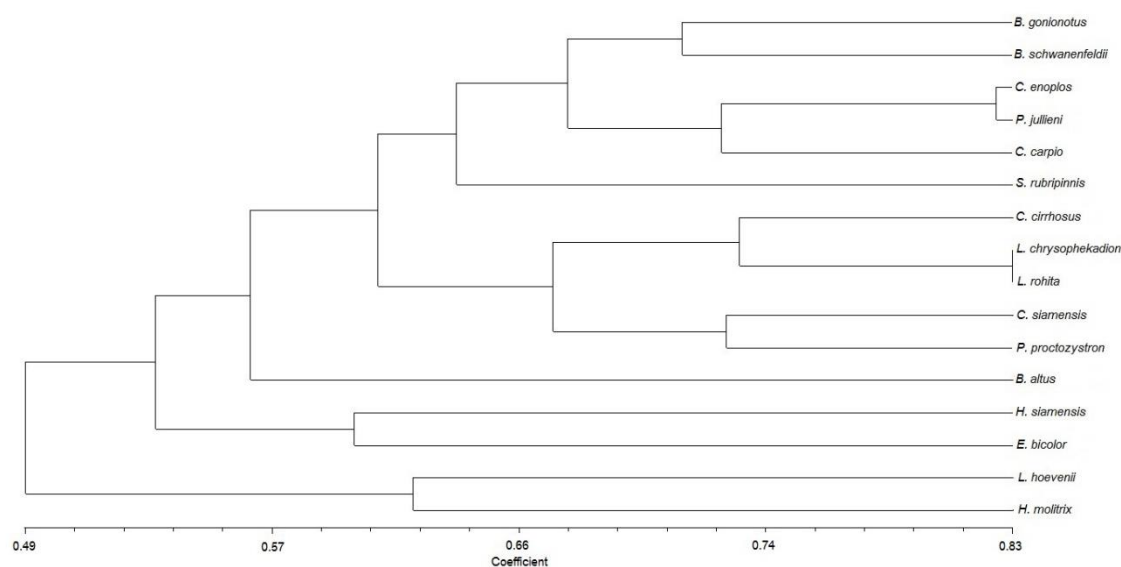


Figure 1 Phylogenetic relationship among the sixteen Cyprinid species with UPGMA method.

การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่คัดเลือกได้กับประชากรปลาแต่ละชนิด

นำชนิดของปลาที่คัดเลือกได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เบื้องต้นจำนวน 471 ตำแหน่ง ทดสอบประสิทธิภาพกับปลาจำนวน 15 ตัวอย่างต่อชนิด ยกเว้นปลากะโห้มีจำนวน 13 ตัวอย่าง พบว่ามีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลได้ง่ายจำนวน 346 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 43.25% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด แบ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ผลเป็น polymorphic จำนวน 165 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 20.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด และตำแหน่งที่ให้ผลเป็น monomorphic จำนวน 181 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 22.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด (Table 2 และ Table 3)

โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ 50 ตำแหน่ง สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้จากปลาตั้งแต่ 0 – 14 ชนิด และไม่มีเครื่องหมายใดสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากปลาทั้ง 16 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา (Table 2) เมื่อพิจารณารายตำแหน่ง พบว่าตำแหน่ง Bgon-17 ไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในปลาทุกชนิด รวมถึงปลาตะเพียนเอง ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาที่ใช้ในการศึกษานี้กับปลาที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมาย สำหรับบางตำแหน่งพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เฉพาะกับชนิดของปลาที่พัฒนามาเช่น ตำแหน่ง Bgon 2, Bgon 12, Bgon-79 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณที่ชนาบข้างลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโครแซทเทลไลต์ (flanking region) ในขั้นตอนการวิวัฒนาการ (Primmer *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นบริเวณที่ไพรเมอร์มาจับในการทำพีซีอาร์ ถ้าบริเวณดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายบางตำแหน่งสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้กับปลาหลายชนิดเช่น ตำแหน่ง LcG09 และตำแหน่ง Lr 12 สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ถึง 14 ชนิดจากจำนวนชนิดปลา 16 ชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากบริเวณชนาบข้าง (flanking region) ในตำแหน่งดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ซึ่งบริเวณดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ (Yue *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013)

การวิเคราะห์จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และความหลากหลายทางพันธุกรรมรายชนิด

เมื่อพิจารณารายชนิดของปลา พบว่ามีเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลง่ายในแต่ละชนิดตั้งแต่ 14 – 32 ตำแหน่ง ต่อชนิด หรือเท่ากับ 28 – 64% จากจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด ซึ่งในที่นี้ให้ผลเป็น polymorphic ตั้งแต่ 3 – 20 ตำแหน่งต่อชนิด และให้ผลเป็น monomorphic ตั้งแต่ 4 – 21 ตำแหน่งต่อชนิด (Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maduna *et al.* (2014) ที่ศึกษาการทดสอบข้ามชนิดในกลุ่มปลากะดุกออ่อน (Elasmobranch) ในแอฟริกาใต้จำนวน 16 ชนิด โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้จากปลาในกลุ่มเดียวกันจำนวน 5 ชนิด รวมจำนวน 35 ตำแหน่ง พบ 28.6 – 71.4% จากจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมดสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่งซึ่งประกอบด้วย จำนวนอัลลีลที่ปรากฏ (apparent alleles, A_u) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of alleles, A_e) ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี

(observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (expected heterozygosity, H_e) ให้ผลเท่ากับ $A_a = 2.33 - 5.00$, $A_e = 1.83 - 3.92$, $H_o = 0.18 - 0.67$ และ $H_e = 0.34 - 0.69$ (Table 3) ซึ่งความหลากหลายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในกลุ่มใกล้เคียงที่มีการศึกษาในประเทศไทย (Sodsuk *et al.*, 2013; Pannusa *et al.*, 2015; Sodsuk *et al.*, 2016) เมื่อพิจารณาค่าทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWE}) พบว่ามีปลา 2 ชนิดที่ไม่อยู่ในสมดุลได้แก่ปลาตะโกก (*C. enoplos*) และปลายี่สกไทย (*P. jullieni*) ทั้งนี้เนื่องจากมีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์บางตำแหน่งที่พบค่า H_o และ H_e แตกต่างกันมาก ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนที่น้อย หรืออีกสาเหตุอาจเกิดจากตัวอย่างเป็นประชากรเพาะเลี้ยงที่อาจมีการจัดการใด ๆ ที่ส่งผลให้ประชากรไม่อยู่ในสมดุล

จากการทดสอบพบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย (13 – 15 ตัวต่อชนิด) และแหล่งที่เก็บตัวอย่างเป็นแหล่งเดียวกันในแต่ละชนิด ทั้งนี้ในบางตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พบว่าให้ผลเป็น monomorphic อาจพบว่าเป็น polymorphic ได้ถ้านำไปใช้ทดสอบกับปลาในประชากรอื่น ๆ ต่อไป

Table 2 Results of fifty microsatellite loci showing the number of alleles per locus for the sixteen Cyprinid fish

Species	Bgon 2	Bgon 8	Bgon 12	Bgon 13	Bgon 18	Bgon- 17	Bgon- 22	Bgon- 69	Bgon- 75	Bgon- 79	MFW 1	MFW 2	MFW 7	MFW 9	MFW 11	MFW 13	MFW 15
<i>B. gonionotus</i>	6	3	4	7	2	.	2	4	6	4	1	.	1	3	.	3	3
<i>B. altus</i>	.	1	.	.	.	.	2	.	.	.	1	.	.	.	.	.	8
<i>C. enoplos</i>	.	2	.	.	.	.	2	.	1	.	1	.	2	2	.	1	1
<i>C. cirrhosus</i>	.	.	.	.	.	.	2	.	.	.	.	.	1	1	1	.	2
<i>C. carpio</i>	.	.	.	.	.	.	2	.	3	.	.	4	.	2	4	5	4
<i>L. chrysophekadion</i>	.	.	.	.	.	.	1	1	6	.	.	1	.	1	.	.	.
<i>P. jullieni</i>	.	.	.	.	.	.	2	1	1	.	2	.	3	.	.	1	1
<i>L. rohita</i>	.	1	.	.	.	.	1	.	1	.	.	1	.	1	1	.	3
<i>H. siamensis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	.	.	.	.	.	4
<i>L. hoevenii</i>	.	.	.	.	1	.	1	1	.	.	1	1	.	.	.	.	.
<i>B. schwanefeldii</i>	.	1	.	.	.	.	3	.	1	.	2	.	.	.	1	1	2
<i>C. siamensis</i>	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	1	.	.	1	.	.	.
<i>H. molitrix</i>	.	.	.	.	1	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2
<i>S. rubripinnis</i>	.	1	.	.	1	.	1	.	.	.	.	1	1	.	.	1	3
<i>E. bicolor</i>	.	1	.	.	.	.	1	.	.	.	.	1	.	1	.	.	1
<i>P. proctozystron</i>	.	1	.	3	.	.	5	.	3	.	1	.	.	.	.	.	4

Table 2 (continue)

Species	MFW 16	MFW 17	MFW 20	MFW 24	MFW 26	MFW 29	LcB 04	LcB 10	LcD 11	LcF 10	LcF 12	LcG 03	LcG 06	LcG 09	LcH 09	Proji- 1	Proji- 3
<i>B. gonionotus</i>	.	1	.	.	.	.	1	1	.	7	.	.	1	2	.	3	4
<i>B. altus</i>	.	.	.	.	.	.	.	1	.	4	.	.	.	4	.	1	3
<i>C. enoplos</i>	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	3	.	3	1
<i>C. cirrhosus</i>	.	1	.	.	.	.	.	1	1	7	.	1	.	1	1	1	3
<i>C. carpio</i>	2	.	1	4	4	.	1	1	.	6	.	.	.	1	.	.	4
<i>L. chrysophekadion</i>	.	3	1	.	4	.	1	1	1	5	3	2	1	4	1	1	1
<i>P. jullieni</i>	.	1	1	.	2	.	1	1	.	6	.	.	.	3	.	.	6
<i>L. rohita</i>	.	1	.	.	2	.	1	.	1	.	.	1	1	1	1	1	.
<i>H. siamensis</i>	.	1	.	5	.	.	.	1	5	5	.	.	.	1	.	.	3
<i>L. hoevenii</i>	.	1	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	.	1	.	.	.
<i>B. schwanefeldii</i>	.	.	.	.	.	.	.	1	.	3	.	.	.	3	.	3	3
<i>C. siamensis</i>	.	.	.	.	2	.	1	1	.	1	.	.	.	3	1	1	1
<i>H. molitrix</i>	.	1	.	3	.	1	1	1	2	.	.	.	1	.	.	1	.
<i>S. rubripinnis</i>	.	.	.	.	.	.	1	1	.	1	.	.	1	2	.	3	.
<i>E. bicolor</i>	.	1	.	.	.	.	.	1	1	7	.	.	.	.	.	1	1
<i>P. proctozystron</i>	.	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	9	.	3	3

Table 2 (continue)

Species	Proji- 6	Proji- 8	Proji- 9	Proji- 12	Lr1	Lr3	Lr6	Lr10	Lr12	Lr14a	Lr14b	Lr20	Lr21	Lr23	Lr24	Lr26
<i>B. gonionotus</i>	.	2	1	.	.	.	.	6	6	.	.	.	5	.	1	1
<i>B. altus</i>	.	4	1	.	.	3	.	3	5	.	.	.	5	.	.	.
<i>C. enoplos</i>	1	2	1	1	.	1	.	3	2	.	1	.	.	3	2	1
<i>C. cirrhosus</i>	1	.	2	.	.	1	2	2	4	.	.	1	1	1	2	1
<i>C. carpio</i>	2	2	.	.	.	.	.	4	.	.	.	.	.	2	.	1
<i>L. chrysophekadion</i>	.	.	1	3	1	2	2	1	1	3	1	.	2	1	2	1
<i>P. jullieni</i>	.	7	.	.	.	.	2	2	1	.	.	.	.	1	4	.
<i>L. rohita</i>	.	1	2	1	1	3	2	1	1	3	3	1	2	2	4	1
<i>H. siamensis</i>	.	4	3	.	.	4	.	.	.	.	.	.	5	1	.	.
<i>L. hoevenii</i>	.	.	1	.	.	1	1	.	2	.	.	.	3	.	.	2
<i>B. schwanefeldii</i>	.	1	1	.	.	1	2	2	2	.	.	.	3	2	.	1
<i>C. siamensis</i>	4	2	2	.	1	2	1	1	1	.	.	.	3	.	1	1
<i>H. molitrix</i>	.	.	.	2	.	3	1	.	1	.	.	.	.	.	.	1
<i>S. rubripinnis</i>	.	3	1	.	.	2	.	3	3	.	5	.	.	.	4	3
<i>E. bicolor</i>	.	1	1	.	.	3	.	1	1	.	1	.	.	.	1	5
<i>P. proctozystron</i>	1	2	1	.	.	2	.	5	4	.	2	.	.	5	.	1

Table 3 Results of cross-species amplification for sixteen Cyprinid species: number of loci were amplification (TT), number of loci were polymorphism (PM), number of loci were monomorphism, apparent alleles (A_a), effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and P-value of Hardy-Weinberg equilibrium (P_{HWE})

Species	TT	PM	MM	A_a^*	A_e^*	H_o^*	H_e^*	P_{HWE}
<i>B. gonionotus</i>	29	20	9	4.05 ± 1.731	2.70 ± 0.947	0.49 ± 0.219	0.59 ± 0.187	0.5626
<i>B. altus</i>	15	10	5	4.10 ± 1.663	2.85 ± 1.340	0.55 ± 0.172	0.63 ± 0.1022	0.9196
<i>C. enoplos</i>	23	11	12	2.36 ± 0.505	1.85 ± 0.426	0.33 ± 0.266	0.45 ± 0.117	0.0064
<i>C. cirrhosus</i>	25	9	16	3.00 ± 1.658	2.32 ± 1.376	0.36 ± 0.258	0.51 ± 0.153	0.2079
<i>C. carpio</i>	21	16	5	3.44 ± 1.209	2.53 ± 1.043	0.49 ± 0.286	0.55 ± 0.208	0.1966
<i>L. chrysophekadion</i>	32	13	19	2.92 ± 1.038	2.28 ± 0.701	0.45 ± 0.195	0.54 ± 0.145	0.4107
<i>P. jullieni</i>	21	11	10	3.64 ± 1.859	2.73 ± 1.371	0.49 ± 0.254	0.56 ± 0.220	0.0494
<i>L. rohita</i>	31	10	21	2.60 ± 0.699	1.79 ± 0.511	0.40 ± 0.171	0.41 ± 0.174	0.9387
<i>H. siamensis</i>	14	10	4	4.20 ± 1.229	2.70 ± 0.876	0.41 ± 0.188	0.61 ± 0.155	0.4749
<i>L. hoevenii</i>	15	3	12	2.33 ± 0.577	1.86 ± 0.409	0.18 ± 0.188	0.46 ± 0.111	0.0633
<i>B. schwanenfeldii</i>	21	12	9	2.50 ± 0.522	1.83 ± 0.258	0.38 ± 0.194	0.46 ± 0.076	0.1783
<i>C. siamensis</i>	23	7	16	2.57 ± 0.787	2.42 ± 0.762	0.38 ± 0.267	0.57 ± 0.133	0.3033
<i>H. molitrix</i>	16	5	11	2.60 ± 0.894	1.60 ± 0.530	0.35 ± 0.239	0.34 ± 0.186	0.3959
<i>S. rubripinnis</i>	21	10	11	3.10 ± 0.876	2.08 ± 0.910	0.44 ± 0.243	0.47 ± 0.205	0.8467
<i>E. bicolor</i>	19	3	16	5.00 ± 2.000	3.92 ± 2.096	0.67 ± 0.145	0.69 ± 0.239	0.8527
<i>P. proctozystron</i>	20	15	5	3.80 ± 1.859	2.75 ± 1.594	0.41 ± 0.263	0.57 ± 0.188	0.2005
Total	346	165	181	-	-	-	-	-

* Mean ± SD

สรุปผลการศึกษา

ผลการสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เบื้องต้นพบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ รวมจำนวน 471 ตำแหน่ง จากจำนวน 800 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 58.88% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด และนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับปลาจำนวน 15 ตัวอย่างต่อชนิด (ยกเว้นปลากะโห้มีจำนวน 13 ตัวอย่าง) พบว่ามีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลได้ง่ายจำนวน 346 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 43.25% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด แบ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ผลเป็น polymorphic จำนวน 165 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 20.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด และตำแหน่งที่ให้ผลเป็น monomorphic จำนวน 181 ตำแหน่ง หรือเท่ากับ 22.63% จากจำนวนตำแหน่งที่คาดว่าจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมดทั้งหมด เมื่อพิจารณารายชนิด พบว่ามีเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และอ่านผลง่ายในแต่ละชนิดตั้งแต่ 14 – 32 ตำแหน่งต่อชนิดหรือเท่ากับ 28 – 64% จาก

จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด ซึ่งในที่นี้ให้ผลเป็น polymorphic ตั้งแต่ 3 – 20 ตำแหน่งต่อชนิด และให้ผลเป็น monomorphic ตั้งแต่ 4 – 21 ตำแหน่งต่อชนิด

ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อตำแหน่ง $A_u = 2.33 - 5.00$, $A_e = 1.83 - 3.92$, $H_u = 0.18 - 0.67$ และ $H_e = 0.34 - 0.69$ ซึ่งความหลากหลายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในกลุ่มใกล้เคียงที่มีการศึกษาในประเทศไทย จากการทดสอบพบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่มีจำนวนน้อย (13 – 15 ตัวต่อชนิด) และแหล่งที่เก็บตัวอย่างเป็นแหล่งเดียวกันในแต่ละชนิด ในบางตำแหน่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พบว่าให้ผลเป็น monomorphic อาจพบว่าเป็น polymorphic ได้ถ้านำไปใช้ทดสอบกับปลาในประชากรอื่น ๆ ต่อไป

ดังนั้นผลการทดสอบพีซีอาร์ข้ามชนิดกับปลาตระกูลตะเพียนที่ได้สามารถนำไปใช้ได้กับปลาตระกูลตะเพียนจำนวน 16 ชนิด ซึ่งเป็นปลาในวงศ์เดียวกัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาเหล่านี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณว่าที่ร้อยตรีสมนึก คงทรัพย์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ อุดรดิตถ์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์ฯ สำหรับการสนับสนุนตัวอย่างปลาในงานวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำกองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ และศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี ทุกท่านที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudin, J.P. and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 10: 77–81.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E. and Van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495–503.
- Chailertit, V., Swatdipong, A., Peyachoknagul, S., Salaenoi, J. and Srikulnath, K. 2014. Isolation and characterization of novel microsatellite markers from Siamese fighting fish (*Betta splendens*, Osphronemidae, Anabantoidae) and their transferability to related species, *B. smaragdina* and *B. imbellis*. *Genet. Mol. Res.* 13: 7157–7162.
- Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der Poel, J.J. and Groenen, M.A.M. 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics* 28: 129–134.

- Das, P., Barat, A., Meher, P.K., Ray, P.P. and Majumdar, D. 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in *Labeo rohita* and their cross-species amplification in related species. *Mol. Ecol. Notes*. 5: 231–233.
- Dubut, V., Sinama, M., Martin, J.F., Meglecz, E., Fernandez, J., Chappaz, R., Gilles, A. and Costedoat, C. 2010. Cross-species amplification of 41 microsatellite in European cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. *BMC Research Notes*. 3: 135.
- Holmen, J., Volestad, L.A., Jakobsen, K.S. and Primmer, C.R. 2009. Cross-species amplification of 36 cyprinid microsatellite loci in *Phoxinus phoxinus* (L.) and *Scardinius erythrophthalmus* (L.). *BMC Research Notes*. 2: 248.
- Höss, M. 1994. More about the silica method. *Ancient DNA Newsl.* 2: 10–12.
- Höss, M. and Pääbo, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucl. Acids Res.* 21: 3913–3914.
- Kamonrat, W., McConnell, S.K.J. and Cook, D.I. 2002. Polymorphic microsatellite loci from the Southeast Asian cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). *Mol. Ecol. Notes*. 2: 89–90.
- Kemp, B.M., Monroe, C. and Smith, D.G. 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J. Archaeol. Sci.* 33: 1680–1689.
- Lal, K.K., Chauhan, T., Mandal, A., Singh, R.K., Khulbe, L., Ponniah, A.G. and Mohindra, V. 2004. Identification of microsatellite DNA markers for population structure analysis in Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton-Buchanan, 1882). *J. Appl. Ichthyol.* 20: 87–91.
- Maduna, S.N., Rossouw, C., Roodt-Wilding, R. and Merwe, A.E.B. 2014. Microsatellite cross-species amplification and utility in southern African elasmobranch: A valuable resource for fisheries management and conservation. *BMC Research Notes* 7: 352.
- McConnell, S.K.J., Skibinski, D.O.F. and Mair, G.C. 2001. Microsatellite markers from a commercially important South-east Asian cyprinid, the silver barb (*Barbodes gonionotus* Bleeker). *Mol. Ecol. Notes*. 1: 135–136.
- Nguyen, T.T.T. in press. Characterization of microsatellite DNA markers for the black shark minnow, *Labeo chrysophekadion* (Cyprinidae). *Molecular Ecology Resources*. in press.
- Oliveira, G.A.F., Padua, J.G., Costa, J.L., Jesus, O.N., Carvalho, F.M. and Oliveira, E.J. 2013. Cross-species Amplification of Microsatellite Loci Developed for *Passiflora edulis* Sims. In *Related Passiflora Species*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56(5): 785–792.

- Pannusa, S., Poompuang, S. and Kamonrat, W. 2015. Genetic and morphological variation among hatchery stocks of Thai silver barb *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1850). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 49: 856–867.
- Poompuang, S. 2015. Genomics for improvement of aquaculture species. Magic Publication co., Ltd., Bangkok. Thailand. 236 p. [in Thai]
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U. and Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. Journal of Avian Biology. 36(4): 348–360.
- Rohlf, F.J. (1998) NTSYS-p.c. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0). Exeter Software Publishers Ltd., Setauket.
- Sodsuk, P.K., Khemklad, S., Rattanatriwong, W., Sodsuk, S., Pewnain, P. and Utlert, T. 2013. Genetic variation among cultured, selectively bred and natural populations of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822), in Thailand. Thai J. Genet. 6(2): 150–167.
- Sodsuk, P.K., Chailertit, V., Ampholsak, K. and Sodsuk, S. 2016. Genetic diversity in redbellied sharkminnow, *Epalzeorhynchus bicolor* (Smith, 1931), from Ratchaburi province hatchery stocks. Thai Fisheries Gazette. 69 (2): 167–177. [in Thai]
- Sukumasavin, N., Nakajima, M. and Taniguchi, N. 2004. Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in an endangered cyprinid of the Mekong River, the seven-line barb (*Probarbus jullieni* Suavage, 1880). Mol. Ecol. Notes. 4: 465–467.
- Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).
- Yue, G.H., Kovacs, B. and Orban, L. 2010. A New Problem with Cross-Species Amplification of Microsatellites: Generation of Non-Homologous Products. Zoological Research 31(2): 131–140.

สภาพการเลี้ยงกบและโรคที่พบในเขตจังหวัดสกลนครและนครพนม

Frog raising condition and diseases finding in Sakon Nakhon

and Nakhon Phanom Provinces

ทาริกา ทิพอุเทน^{1,*} ทรงทรัพย์ อรุณกมล¹ สาริณี บุตรดาวงค์¹ และสุวิทย์ ทิพอุเทน²

Tarika Thip-uten^{1,*} Songsub Arungamol¹, Sarinee Butdawong¹, and Suwit Thip-uten²

¹สาขาวิชาการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร จังหวัดสกลนคร 47000

Department of Fisheries, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon 47000

²สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร สกลนคร 47000

Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon Nakhon 47000

*Corresponding author: tarika.t968@gmail.com; suwit@snru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาสภาพการเลี้ยงกบและโรคที่พบในเขตจังหวัดสกลนครและนครพนม ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 ถึงกันยายน 2557 โดยศึกษาสภาพการเลี้ยงจากฟาร์มเกษตรกร และสุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษา สภาพการเลี้ยงจากฟาร์มเกษตรกร พบว่าผู้เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นวัยผู้ใหญ่ที่มีอายุระหว่าง 41 - 50 ปี จบการศึกษาระดับประถมศึกษาชั้นปีที่ 6 พื้นที่ถือครองอยู่ระหว่าง 1-10 ไร่ มีรายได้เฉลี่ย 10,000 – 50,000 บาทต่อครอบครัวต่อปี ผู้เลี้ยงกบทั้ง 2 จังหวัด ใช้พ่อแม่พันธุ์ส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์กบนา (*Rana tigerina*) รองลงมาเป็นพันธุ์บูลฟร็อก (*Lithobates catesbeianus*) ซึ่งมากกว่าร้อยละ 60 ของผู้เลี้ยง ได้รับองค์ความรู้ในการเลี้ยงกบจากเพื่อนบ้านเป็นหลัก ตลาดในการจำหน่ายกบและลูกออดกบ พบว่า ส่วนมากจะมีพ่อค้าคนกลางจากตลาดเข้ามาซื้อที่ฟาร์ม สถานที่เลี้ยงหรือที่ตั้งบ่อเลี้ยง ส่วนใหญ่ ร้อยละ 90 เลี้ยงในบ่อดิน รองลงมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ และกระชังคิดเป็นร้อยละ 5 ตามลำดับ อาหารที่เกษตรกรใช้พบว่าใช้อาหารสำเร็จรูปเป็นหลัก ทำให้มีต้นทุนค่าอาหารอยู่ระหว่าง 3,000 – 20,000 บาทต่อรอบการเลี้ยง ในด้านเทคโนโลยีการจัดการเลี้ยง มากกว่าร้อยละ 60 มีการจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง แต่ไม่ค่อยมีการรักษาโรค สาเหตุการตายของกบในรอบปีที่ผ่านมา ผู้เลี้ยงพบว่ากบท้องบวม ขาแดง ขาบวม วายน้ำคางส่ว้น ตาโปน

ผลการตรวจในห้องปฏิบัติการพบว่า ในจังหวัดสกลนคร พบโรคแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* มากที่สุด รองลงมาคือ *Flavobacterium meningosepticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ ส่วนเชื้อราตรวจไม่พบ ขณะที่ในจังหวัดนครพนม พบปรสิตมากที่สุดชนิดที่พบ *Opalina* sp. *Balantidium* sp. และ *Trichodina* sp. ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียพบส่วนน้อย คุณภาพน้ำของทั้งสองจังหวัด พบว่าปริมาณแอมโมเนีย และออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่าไม่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกบ เนื่องจากมีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งส่งผลให้สัตว์น้ำอ่อนแอเกิดความเครียดและติดโรคได้ง่าย

คำสำคัญ: นครพนม สกลนคร โรคกบ

Abstract

This research was conducted to study the frog raising condition and disease of frog in Sakon Nakhon and Nakhon Phanom provinces. This study was started from October 2013 to September 2014. This research was survey at farm frog culture and work at laboratory.

The survey at frog farm found that the farmer were 41 – 50 years old and graduated at Pathom 6. The owner has area for culture about 1 to 10 rai per family and average income per households range from 10,000 to 50,000 baht/year. The most of farmers use frog (*Rana tigerina*) and Bulfrog (*Lithobates catesbeianus*). About 60% of farmers received that knowledge from the neighborhood. When they raised finish they sold to middleman at farm. The patterns of frog culture were in earth pond, tank and cage about 90%, 5% and 5% respectively. One hundred percentage of feed they were used commercial feed inducing to high cost of production about 3,000 – 20,000 baht/crop. The management for frog raising found that 60% were control water quality, but not therapeutic. The farmers found that the frog death with swelling red-leg, abnormal swimming and exophthalmia.

The result at laboratory showed that there were 3 species of bacteria isolated: *Aeromonas hydrophila* was the most and *Flavobacterium meningosepticum*, and *Pseudomonas aeruginosa* respectively at Sakon Nakhon. Whereas, there were 3 species of parasitic infection found: *Opalina* sp., *Balantidium* sp., and *Trichodina* sp. respectively at Nakhon Phanom. According to the quality of the water, the ongoing analyses showed that ammonia and dissolved oxygen were unsuitable for frog that causes frog stress and infection.

Keywords: Nakhon Phanom, Sakon Nakhon, Frog disease

คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างการเลี้ยงปลา การเลี้ยงกุ้ง และการเลี้ยงกบ นับเป็นอาชีพที่สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงได้อย่างดี นอกจากนั้น สัตว์น้ำเหล่านี้ยังมีบทบาทที่สำคัญในแง่ของการเป็นอาหารแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูง และเป็นที่ยอมรับโรคของคนทั่วไป จังหวัดสกลนคร และนครพนม เป็นจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีหลายหมู่บ้านประกอบอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเลี้ยงกบและลูกอ๊อด เพราะสามารถขายได้ราคาค่อนข้างสูง ซึ่งลูกอ๊อดหรือฮวกขายได้ราคา กิโลกรัมละ 200 - 250 บาท ขณะที่กบรุ่นถึงช่วงกบโตเต็มวัยขายได้ราคา กิโลกรัมละ 80 – 120 บาท ตามลำดับ สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงเฉลี่ยปีละหลายแสนบาท เนื่องจากความต้องการบริโภคกบมีแนวโน้มสูงขึ้น และการลงทุนยังต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการทำนา

อย่างไรก็ตาม จากการลงพื้นที่พบปะกับเกษตรกรผู้เลี้ยงกบได้ให้ข้อมูลว่า ในช่วงปีแรกที่เลี้ยงนั้นได้ผลผลิตดี แต่ในปีต่อมามีปัญหาโรคขึ้น ส่งผลให้กบและลูกอ๊อดกบตายเป็นจำนวนมากก่อนที่จะจับ

ชาย ทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงต้องขาดทุนถึงขั้นที่ต้องเลิกทำการเพาะเลี้ยงไป แม้จะหาทางแก้ไขหลายวิธีแล้ว ยังไม่เกิดผล เนื่องจากโรคที่เกิดขึ้นนั้นมีอาการไม่แน่นอน และไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค เพราะปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำมีหลายปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องว่าเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงจะรู้ว่าสัตว์น้ำป่วย บางครั้งก็สายเกินไป เพราะสัตว์น้ำตายเป็นจำนวนมาก หรือเลี้ยงแล้วแคะแกระนไม่เจริญเติบโตทำให้ผลผลิตลดลงขายไม่ได้ราคา ดังนั้น จึงต้องศึกษาค้นคว้าหาสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค เพื่อหาแนวทางในการป้องกันรักษาให้เกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงกบ และลูกขี้ออดกบอย่างมีประสิทธิภาพต่อไปอย่างยั่งยืนได้

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเพื่อให้ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคที่พบในกบที่เลี้ยงในฟาร์มจังหวัดสกลนคร และนครพนม เพื่อจะหาแนวทางป้องกันและแก้ไขปัญหาเรื่องโรคในกบที่เกิดขึ้นกับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเริ่มต้นศึกษาตั้งแต่การออกสำรวจเก็บรวบรวมข้อมูลจากฟาร์มของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงในช่วงฤดูของการเลี้ยง และเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำทั้งปกติและที่ป่วย มาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อสรุปหาสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค และหาแนวทางในการป้องกันและรักษา แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

- 1) ลงพื้นที่สำรวจเก็บรวบรวมข้อมูลพร้อมสุ่มเก็บตัวอย่างกบและน้ำในบ่อเลี้ยงของเกษตรกร

เริ่มจากสำรวจข้อมูลผู้ทำฟาร์มเพาะเลี้ยงกบ จากหน่วยงานสารสนเทศของกรมประมง แล้ววางแผนลงพื้นที่เก็บข้อมูลเกี่ยวกับสภาพการเลี้ยงโดยใช้แบบสอบถาม และเก็บตัวอย่างกบจากฟาร์มของเกษตรกรในจังหวัดสกลนคร และนครพนม เพื่อหาสาเหตุของการเกิดโรค เช่น แบคทีเรีย และปรสิตต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างกบและลูกขี้ออดกบ ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 จนถึงเดือนกันยายน 2557 รวมทั้งสิ้น 151 ฟาร์ม (อำเภอเมืองและอำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร จำนวน 101 ฟาร์ม และอำเภอเรณูนคร และ อำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม จำนวน 50 ฟาร์ม) การเก็บตัวอย่างกบป่วยจำนวนฟาร์มละ 3 ตัว จากทั้งหมด 151 ฟาร์ม รวมจำนวนกบตัวอย่างทั้งสิ้น 453 ตัว นำไปตรวจหาสาเหตุของการเกิดโรคในห้องปฏิบัติการต่อไป

- 2) การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำตัวอย่างกบที่มีอาการป่วย โดยเก็บจากตัวอย่างกบ จำนวน 453 ตัว มาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจวินิจฉัยทั้งภายนอกและภายใน ตามวิธีของ Phadee (2006)

การตรวจภายนอก

ทำได้โดยใช้แผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover glass) ขูดเมือกแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตปรสิตชนิดต่างๆ ที่เกาะอยู่ รวมทั้งสังเกตความผิดปกติต่างๆ ได้แก่ การเป็นแผล รอยขีดเลือด ลักษณะทางพยาธิวิทยาต่างๆ การตรวจหาเชื้อรา (fungi) สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าโดยพบกระจุกสีขาวคล้ายปุยฝ้ายเกาะที่ลำตัวปลา หรือหากเชื้อราฝังตัวในเนื้อเยื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกผล และการตรวจภายในเพื่อหาปรสิตภายใน (endoparasite) โดยทำการศึกษาในอวัยวะดังนี้ ได้แก่ ลำไส้ กระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี ตับ ไต เลือด และกล้ามเนื้อ นำปรสิตที่ตรวจพบไปเกลี่ยลงบนสไลด์ แล้วปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง หรือดองเก็บในน้ำยาฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 % จำแนกชนิดของปรสิตจากรูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจภายใน

เพื่อหาเชื้อแบคทีเรีย โดยการผ่าตัดท้องของสัตว์ป่วยแล้วใช้เข็มเชี่ยเชื้อ (streak) จากบริเวณอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม ไต นำมาเชี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบันทึกผล แล้วนำ Single colony ที่เกิดขึ้นมาย้อมแกรมดูว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มใด หลังจากนั้นให้เก็บเชื้อดังกล่าวใน Slant Agar เพื่อเตรียม Stock solution สำหรับทดสอบหาชนิดของเชื้อโรค โดยการใช้ API20E และส่งทดสอบเพื่อยืนยันผลอีกครั้งที่สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง โดยใช้วิธีทางชีวเคมี (biochem-test) และ API20E

การศึกษาคุณภาพน้ำ

ทำการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับพารามิเตอร์จากตัวอย่างน้ำในบ่อเลี้ยงกบในช่วงเวลา 8.00 น. โดยวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen) และอุณหภูมิด้วยเครื่อง pH Meter รุ่น CT-6020A ตรวจวัดความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) แอมโมเนียทั้งหมด (total ammonia) ตามวิธี Kjeldahl method ตรวจวัดความกระด้าง (hardness) ด้วยวิธี Titration method ตรวจวัดไนไตรท์ (nitrite) ไนเตรท (nitrate) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) ด้วยวิธี Colorimetric method

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ สรุปผลและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนาด้วยสถิติค่าเฉลี่ยและร้อยละ

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

สภาพและปัญหาการเลี้ยงกบและลูกออดคอบของเกษตรกร

สภาพเศรษฐกิจและสังคมบางประการของเกษตรกร จากการลงพื้นที่สำรวจและสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงกบจังหวัดสกลนคร อำเภอเมืองสกลนคร จำนวน 72 ราย และอำเภอฟังโคน จำนวน 29 ราย และจังหวัดนครพนมคือ อำเภอธาตุพนม จำนวน 14 ราย อำเภอเรณูนคร จำนวน 36 ราย พบว่า มิติทางสังคมนั้นเกี่ยวกับด้านเพศ ผู้เลี้ยงกบส่วนใหญ่เป็นเพศชาย มากกว่าเพศหญิง ชี้ให้เห็นถึงวิถีชีวิตตามเพศสภาพตามสังคมสมัยเก่า ที่เพศชายคือเพศที่แข็งแรงและเป็นกำลังหลักในการทำงานเลี้ยงครอบครัว ซึ่งจะเป็นวัยผู้ใหญ่ที่มีอายุระหว่าง 41 - 50 ปี ทางด้านการศึกษาผู้เลี้ยงกบยังคงเป็นเกษตรกรระดับรากหญ้าเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจบการศึกษาขั้นพื้นฐาน ในระดับประถมศึกษาชั้นปีที่ 6 (ป.6) เป็นส่วนใหญ่ ลักษณะทางครอบครัวเป็นครอบครัวขนาดกลาง มีจำนวนสมาชิกในครัวเรือนอยู่ระหว่าง 1-5 คน พื้นที่ถือครองของครอบครัวอยู่ระหว่าง 1-10 ไร่ มีรายได้เฉลี่ย 10,000 – 50,000 บาทต่อครอบครัวต่อปี ส่วนใหญ่มาจากกิจกรรมการเลี้ยงปลาสุสัตว์ และการปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยอาศัยแหล่งเงินทุนหลักจาก ธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์ (ธกส.) รองลงมาคือ จากนอกระบบ (ยืมเพื่อนบ้าน หรือญาติสนิท) และทุนส่วนตัว ตามลำดับ

สภาพการเลี้ยงกบของเกษตรกร

ผู้เลี้ยงกบส่วนใหญ่ของทั้ง 2 จังหวัด มีการคัดเลือกพันธุ์กบรวมทั้งพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งคัดเลือกโดยใช้เกณฑ์จากการสังเกตลักษณะภายนอกของกบ เลือกกบที่ขนาดตัวโต แข็งแรง เป็นพ่อแม่พันธุ์ และส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์กบนา (*Rana tigerina*) เพราะเป็นที่นิยมของผู้บริโภค รองลงมาเลี้ยงพันธุ์บูลฟร็อก (*Lithobates catesbeianus*) พ่อแม่พันธุ์กบได้มาจากการขอซื้อจากเพื่อนบ้าน (คนที่เลี้ยงมาก่อน) เป็นส่วนใหญ่ อาจเนื่องจากได้มีโอกาสได้เข้าไปศึกษาข้อมูล รวมทั้งการไปขอคำแนะนำวิธีการเลี้ยง ซึ่งก็ตรงกับการสัมภาษณ์

พบว่ามากกว่าร้อยละ 60 ของผู้เลี้ยงจะได้รับองค์ความรู้ในการเลี้ยงกบจากเพื่อนบ้านเป็นหลัก รองลงมาได้จากหน่วยงานภาครัฐ สื่อวารสารสิ่งพิมพ์ วิทยุ โทรทัศน์ และจากการถ่ายทอดจากพ่อแม่ ตามลำดับ ประเด็นนี้สะท้อนให้ว่าหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะกรมประมง ควรมีมาตรการกระตุ้นเจ้าหน้าที่ในเขตรับผิดชอบ (นักวิชาการประมง เกษตรอำเภอและเกษตรตำบล) ให้ทำงานเชิงรุก โดยเป็นฝ่ายที่ลงพื้นที่ไปสำรวจและพบปะเกษตรกรให้ถี่มากขึ้นเพื่อรับทราบปัญหาและให้คำแนะนำทางวิชาการต่างๆ เพราะความเป็นจริงแล้วเกษตรกรเองมีข้อจำกัดหลายอย่างในการเดินทางไปพบเจ้าหน้าที่เช่น ค่าใช้จ่ายในการเดินทาง และภารกิจในครัวเรือนที่ต้องรับผิดชอบในชีวิตประจำวัน

อย่างไรก็ตาม พบว่าประสบการณ์ในการเลี้ยงกบของเกษตรกรผู้เลี้ยงส่วนมากทำอาชีพนี้มานานมากกว่า 3 ปีขึ้นไป ในบางรายทำมากถึง 10 กว่าปี สาเหตุที่เลี้ยงมานาน อาจเพราะมีวัตถุประสงค์หลักของการเลี้ยงไว้บริโภคภายในครัวเรือน เพราะกบใช้พื้นที่น้อยและระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น (สามารถบริโภคได้ทุกช่วงวัยของกบด้วย) แต่โดยภาพรวมจากลงพื้นที่สำรวจพบว่า เกษตรกรมีวัตถุประสงค์การเลี้ยงเพื่อการจำหน่ายและเพื่อบริโภคในครัวเรือนเป็นหลัก หรือแจกจ่ายญาติและขายให้กับเพื่อนบ้าน (กึ่งธุรกิจ) โดยจะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ไว้ในฟาร์มของตนเองเพื่อใช้เพาะพันธุ์ลูกอีอด กบรุ่น และพ่อแม่พันธุ์ไว้จำหน่าย ตามลำดับ

ตลาดในการจำหน่ายกบและลูกอีอดกบ พบว่า ส่วนมากจะมีพ่อค้าคนกลาง หรือแม่ค้าจากตลาดเข้ามารับซื้อถึงฟาร์มเพื่อนำไปขายต่อ รองลงมาจำหน่ายให้กับเพื่อนบ้านและหมู่บ้านใกล้เคียง และนำไปขายเองที่ตลาด ตามลำดับ ส่วนในด้านราคานั้น หลักๆ ผู้เลี้ยงจะเป็นกำหนดราคาขายเอง รองลงมาเป็นพ่อค้ากำหนดให้ และดูจากราคาตลาดและที่เพื่อนบ้านขาย ตามลำดับ จุดนี้แสดงให้เห็นว่าอาชีพการเลี้ยงกบเป็นอีกหนึ่งอาชีพที่น่าสนใจ ถึงแม้ว่ากลุ่มบริโภคอาจไม่กว้างขวางเท่ากับสัตว์เศรษฐกิจอื่น ถือเป็นโอกาสอันดีของผู้เลี้ยงกบเนื่องจากจำนวนผู้เลี้ยงอาจยังไม่มากนัก ขณะที่จำนวนผู้บริโภคมิเพิ่มขึ้น (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ) ซึ่งเป็นจำนวนประชากรมากกว่าครึ่งของประเทศ ที่ยังนิยมและต้องการบริโภคอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกบหรือเจ้าของฟาร์มสามารถกำหนดราคาขายได้เอง รวมทั้งกบเองก็อาจมีจำหน่ายเพียงบางฤดูกาลเท่านั้น ช่วงฤดูฝน-ต้นฤดูหนาว ซึ่งจะแพงมากในช่วงต้นๆ ฝน และต้นฤดูหนาวราคาปกติกรัมละ 100-150 บาทและราคาลูกอีอดกบปกติกรัมละ 150-200 บาท และจึงเป็นช่วงที่สร้างรายได้สำหรับผู้เลี้ยงอย่างมาก และสิ่งหนึ่งที่ท้าทายนักวิชาการ ทำอย่างไรจึงจะมีกบออกจำหน่ายได้ตลอดฤดูกาล

สถานที่เลี้ยงหรือที่ตั้งบ่อเลี้ยง โดยส่วนใหญ่จะเลี้ยงในที่นา สวนหลังบ้าน โดยประมาณร้อยละ 90 จะเลี้ยงในบ่อดิน รองลงมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ และกระชัง ตามลำดับ เหตุผลเพราะว่าบ่อดินจะให้ความใกล้เคียงกับสภาพตามธรรมชาติที่กบชอบอยู่อาศัยมากกว่า บ่อซีเมนต์ และกระชัง รวมถึงง่ายในการสร้าง และต้นทุนอาจไม่สูงเท่าการใช้บ่อซีเมนต์ กบไม่เกิดบาดแผลถลอกจากการกระโดดชนขอบบ่อซีเมนต์ และขอบของกระชัง ซึ่งหากเกิดบาดแผลก็ทำให้มีโอกาสติดเชื้อจากแบคทีเรียจากน้ำเสียหรือปรสิตอื่นๆ ได้ง่าย จึงเป็นเหตุผลหลักที่เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้ เพราะทำให้ผลผลิตกบที่เลี้ยงในบ่อดินดีกว่านั่นเอง และพบว่าส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรมากกว่าร้อยละ 60 มีการเลือกทำเลที่ตั้งในการเลี้ยง มีการวางผังบ่อสำหรับการเลี้ยงกบแต่ละช่วงวัย ซึ่งให้เห็นว่าประสบการณ์ในการเลี้ยงมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกษตรกรสามารถมีทักษะสูง เข้าใจและเรียนรู้จากประสบการณ์มาประยุกต์ใช้ให้เหมาะกับพื้นที่ของตน

อาหารที่เกษตรกรใช้ ผลการสำรวจพบว่าร้อยละร้อย (100%) เกษตรกรผู้เลี้ยงใช้อาหารสำเร็จรูปทางการค้าเป็นหลัก มีการเสริมด้วยรำบ้างบางครั้ง และแมลงที่มากับฟัลล์ในตอนกลางคืน ทำให้ต้นทุนการเลี้ยงของเกษตรกรเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่สำรวจ พบว่าต้นทุนค่าอาหารอยู่ระหว่าง 3,000 – 20,000 บาทต่อรอบการเลี้ยง (กบเล็ก-จับขาย) (ขึ้นกับจำนวนกบที่เกษตรกรเลี้ยงแต่ละฟาร์ม) เพราะกบเป็นสัตว์กินเนื้อ (carnivore) ต้องการโปรตีนต่อวันค่อนข้างสูง (โปรตีน 40 - 35%CP) (กบเล็ก-กบโตเต็มวัย) วัตถุดิบแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารส่วนใหญ่จะได้จากปลาป่นเพราะให้โปรตีนสูง รวมทั้งมีราคาสูงด้วยเช่นกัน จึงทำให้ราคาอาหารกบสำเร็จรูปแพงด้วย (กระสอบบรรจุขนาด 25 กิโลกรัม ราคาอยู่ที่ 580 - 600 บาท) กิโลกรัมละ 23 – 24 บาท ซึ่งให้เห็นว่า ปัญหาด้านต้นทุนค่าอาหารกบยังคงต้องการ ความช่วยเหลือจากนักวิชาการประมง หรือนักโภชนศาสตร์สัตว์ ที่จะหาแนวทางการนำวัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพ ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกบได้ และราคาไม่แพง เพื่อลดต้นทุนค่าอาหารให้กับเกษตรกร ช่วยให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น รวมทั้งผู้ประกอบการก็ได้ประโยชน์ในแง่ของการที่จะได้ซื้อกบในราคาที่ถูกลง

ในด้านเทคโนโลยีการจัดการเลี้ยง ส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 60 มีการจัดการเปลี่ยนถ่ายน้ำกบ สังเกตการเกิดโรคระบาด คัดแยกกบป่วยหรือตายออกไปจากบ่อ มีการทำลายซากกบตาย แต่ไม่ค่อยมีการรักษาโรค ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะไม่มีความรู้ มีการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น ปูนขาว dolomite เป็นหลัก รองลงมาเป็นยาเหลือง (accliflavin) เกลือแกง ด่างทับทิม และฟอร์มาลีน ตามลำดับ

สาเหตุการตายของกบในรอบปีที่ผ่านมา จากการสัมภาษณ์ผู้เลี้ยง ให้ข้อมูลว่า จะพบกบที่บวมอืดท้องบวม (swelling) ขาแดง (red leg lesion) ผิวหนังเป็นแผล (ulceration cutaneous) (Figure 1.) ซึ่งเมื่อตรวจในท้องปฏิบัติการพบว่าเกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และอาการว่ายน้ำควงส่ว้น ตีลังกา (abdominal movement) ตาขาวโปน (exophthalmia) เป็นอัมพาต (paralysis) (Figure 2.) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Flavobacterium meningosepticum* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย ที่เกิดจากการสะสมของเศษอาหารที่ตกค้างเน่าเสียในน้ำ

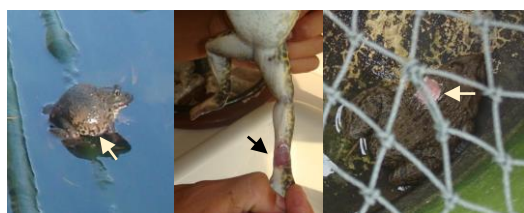


Figure 1. clinical presentation may include swelling, red leg lesion and ulceration cutaneous (infected *Aeromonas hydrophila*)



Figure 2. clinical presentation may include exophthalmia, abdominal movement and paralysis (infected *Flavobacterium meningosepticum*)

ชี้ให้เห็นว่าเกษตรกรยังขาดความรู้เกี่ยวกับโรคกบ ซึ่งแหล่งข้อมูลที่ทำให้ความรู้เกี่ยวกับโรคกบ เกษตรกรส่วนใหญ่ให้ข้อมูลว่าจะมีนักวิชาการประมงมาให้คำแนะนำบ้างซึ่งไม่บ่อยนัก รองลงมาได้จากเพื่อนบ้าน และสื่อสิ่งพิมพ์และวิทยุหรือโทรทัศน์ ตามลำดับ ประเด็นนี้ก็จะสะท้อนให้เห็นว่า หน่วยงานที่เกี่ยวข้องอาจต้องมีการ

จัดอบรมเกี่ยวกับโรคและการป้องกันโรคกบ หรือโรคสัตว์สำคัญๆ ให้กับเกษตรกรอย่างต่อเนื่อง เพื่อจะทำให้เกษตรกรเกิดความรู้ และทักษะในการป้องกันโรค เพื่อลดความเสียหาย

ปัญหาและความต้องการของเกษตรกร

ข้อมูลจากผู้เลี้ยงสะท้อนให้กับทีมวิจัย ถึงปัญหาและความต้องการของเกษตรกร มี 3 ประเด็นหลัก คือ

1) ด้านการตลาด ส่วนมากจะมีปัญหาช่วงที่กบออกสู่ตลาดพร้อมกันในช่วงกลางฤดูฝน ซึ่งจะมีทั้งกับจากธรรมชาติ หรือมีเกษตรกรผู้เลี้ยงรายใหม่เพิ่มเข้ามา ทำให้ราคากบลดลงและขายได้ยากจึงอยากให้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องช่วยแก้ปัญหาจุดนี้

2) การจัดการเลี้ยง ส่วนใหญ่จะเป็นในเรื่องของต้นทุนอาหารกบ ที่มีราคาแพง รองลงมาคือ เรื่องโรคกบ และการจัดการสภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกบ

3) ในด้านแหล่งของเงินทุน อาจไม่สำคัญเร่งด่วนมากนัก เนื่องจากว่า การลงทุนเลี้ยงกบเริ่มต้นอาจใช้ทุนไม่สูง หากเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น เพราะอาจใช้การเพาะพันธุ์เอง ลดต้นทุนค่าพันธุ์กบลง ที่เหลือก็จะเป็นค่าวัสดุอุปกรณ์ที่เป็นต้นทุนคงที่ อาจขอกู้จากแหล่งทุนได้ แต่ที่ต้องรับภาระหนักคือ ค่าอาหาร ซึ่งเป็นต้นทุนผันแปร ที่ต้องใช้จ่ายตลอดวงจรการเลี้ยง หากมีหน่วยงานหรือสถาบันการเงินให้สินเชื่อดอกเบี้ยต่ำก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้เกษตรกรลดภาระลงได้ จึงขอฝากถึงผู้มีส่วนเกี่ยวข้องพิจารณาด้วย

ผลการตรวจโรคกบทางห้องปฏิบัติการ

จากการสุ่มตัวอย่างกบจากแต่ละฟาร์ม เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาสาเหตุของการตายในห้องปฏิบัติการ พบว่ากบบนที่เลี้ยงในอำเภอเมืองและอำเภอฟังโคน จังหวัดสกลนคร ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium meningosepticum* ส่วนอำเภอเรณูนคร และอำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium meningosepticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Types of bacteria found in Sakon Nakhon and Nakhon Phanom

Province	Types of bacteria			No. of isolate
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Sakon nakhon				
Muang District	+	+	-	2
Pang Khon District	+	+	-	2
Nakhon Phanom				
Renu Nakhon District	+	+	+	3
That Phanom District	+	+	+	3

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ทำให้พบเชื้อแบคทีเรียจากฟาร์มต่างๆ ทุกฟาร์มในจังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครพนม คิดเป็นร้อยละ 100 ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด (อำเภอเมือง สกลนคร จำนวน 72 ฟาร์ม อำเภอพังโคน สกลนคร จำนวน 29 ฟาร์ม อำเภอเรณูนคร จำนวน 36 ฟาร์ม อำเภอธาตุพนม จำนวน 14 ฟาร์ม)

โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium meningosepticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยตรวจพบเชื้อ *Aeromonas hydrophila* มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 66.88 รองลงมาคือเชื้อ *Flavobacterium meningosepticum* คิดเป็นร้อยละ 27.15 และสุดท้ายคือ *Pseudomonas aeruginosa* คิดเป็นร้อยละ 5.96 ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Types of bacteria found in Sakon Nakhon and Nakhon Phanom (151 farms)

Province	No. of farm	Types of bacteria			total	percentage
		<i>Aeromonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>		
		<i>hydrophila</i>	<i>meningosepticum</i>	<i>aeruginosa</i>		
Sakon nakhon						
Muang District	72	50	18	4	72	100
Pang Khon District	29	18	9	2	29	100
Nakhon Phanom						
Renu Nakhon District	36	24	10	2	36	100
That Phanom District	14	9	4	1	14	100
total (farm)	151	101	41	9	-	-
percentage	-	66.89	27.15	5.96	-	-

ชนิดของปรสิต จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่า กบนาที่เลี้ยงใน อำเภอเมือง และอำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร มีการตรวจพบปรสิตจำนวน 2 ชนิด คือ *Opalina* sp. และ *Bilantidium* sp. ขณะที่อำเภอเรณูนคร และอำเภอราทูพนม จังหวัดนครพนม ผลการตรวจพบปรสิตที่ก่อโรค 3 ชนิด คือ *Opalina* sp., *Bilantidium* sp. และ *Trichodina* sp. (ดังแสดงใน Table 3) โดย *Bilantidium* sp. และ *Opalina* sp. พบในลำไส้ ซึ่งการติดเชื่อปรสิตเหล่านี้แม้จะไม่ทำให้กบเกิดโรคโดยตรง แต่ก็มีผลทำให้กบมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง มีภูมิคุ้มกันต่ำลง และอาจทำให้กบตายได้ ขณะที่ *Trichodina* sp. หรือเห็บกระมัง จะใช้ denticles เกาะที่ผิวหนังกบทำให้เกิดบาดแผลและการระคายเคืองผิวหนังกบ ทำให้กบสุขภาพอ่อนแอ

Table 3 Types of parasite was found from frog at Sakon nakhon and Nakhon phanom farm

Province	Type of parasite			No. of parasite
	<i>Opalina</i> sp.	<i>Balantidium</i> sp.	<i>Trichodina</i> sp.	
Sakon nakhon				
Muang District	+	+	-	2
Pang Khon District	+	+	-	2
Nakhon Phanom				
Renu Nakhon District	+	+	+	3
That Phanom District	+	+	+	3

ข้อมูลปรสิตในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าตรวจพบปรสิตจากฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงกบ คิดเป็นร้อยละ 84.1 จากฟาร์มทั้งหมด (151 ฟาร์ม) โดยในจังหวัดสกลนครอำเภอเมือง ตรวจพบปรสิตจำนวน 64 ฟาร์ม คิด

เป็นร้อยละ 88.89 จากทั้งหมด 72 ฟาร์ม อำเภอพังโคน ตรวจพบปรสิตจำนวน 23 ฟาร์ม คิดเป็นร้อยละ 79.31 จากทั้งหมด 29 ฟาร์ม ส่วนจังหวัดนครพนม ที่อำเภอเรณูนคร ตรวจพบปรสิต จำนวน 32 ฟาร์ม คิดเป็นร้อยละ 88.88 จากทั้งหมด จำนวน 36 ฟาร์ม และอำเภอธาตุพนม ตรวจพบปรสิต จำนวน 8 ฟาร์ม คิดเป็นร้อยละ 57.14 จากทั้งหมด 14 ฟาร์ม โดยปรสิตที่พบได้แก่ *Opalina* sp., *Balantidium* sp. และ *Trichodina* sp. โดยตรวจพบเชื้อ *Opalina* sp มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 73.10 รองลงมาคือเชื้อ *Balantidium* sp. คิดเป็นร้อยละ 19.69 และ *Trichodina* sp. คิดเป็นร้อยละ 7.09 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 4

อวัยวะที่ตรวจพบปรสิต ได้แก่ ลำไส้เล็ก พบปรสิตจำนวน 3 ชนิด ที่พบมากที่สุดได้แก่ *Opalina* sp. สูงสุด รองลงมาคือ *Balantidium* sp. และน้อยที่สุดคือ *Trichodina* sp. ตามลำดับ รองลงมาคือ ลำไส้ใหญ่ พบ 1 ชนิด คือ *Opalina* sp. ในกระเพาะไม่พบปรสิตชนิดใดเลย ส่วนในตับ ไต เลือด กล้ามเนื้อ และถุงน้ำดี ตรวจไม่พบปรสิต

สาเหตุของการก่อโรคที่พบในกบตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรีย และปรสิต ส่วนเชื้อราตรวจไม่พบในตัวอย่างกบ โดยเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในตับเท่านั้นมี 3 ชนิด ส่วนในอวัยวะส่วนอื่นไม่พบ แบคทีเรียชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Aeromonas hydrophila* รองลงมาคือ *Flavobacterium meningosepticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสอดคล้องกับ Sririkanonda (2009) ที่ศึกษาโรคที่พบในกบในเขตภาคใต้โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตับเท่านั้น ในขณะที่แตกต่างจาก Yang et.al (2006) ที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากกบได้ในปริมาณสูงจากเลือด ตับ ลำไส้ ตา และแผลถลอก

Table 4 Parasites found from frog at Sakon nakhon and Nakhon phanom farm (151 farms)

Province	Quantity of farm	No. of farms found parasite			total	percentage
		<i>Opalina</i> sp.	<i>Balantidium</i> sp.	<i>Trichodina</i> sp.		
Sakon nakhon						
Muang District	72	48	12	4	64	88.89
Pang Khon District	29	15	6	2	23	79.31
Nakhon Phanom						
Renu Nakhon District	36	24	6	2	32	88.88
That Phanom District	14	6	1	1	8	57.14
Total	151	93	25	9	127	-
percentage	-	73.10	19.69	7.09	84.11	-

และพบว่าจังหวัดที่พบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่สุดคือจังหวัดนครพนม ในเขตอำเภอเรณูนครและธาตุพนม นอกจากนี้ยังตรวจพบปรสิตอีก 3 ชนิด ดังนี้ *Opalina* sp., *Balantidium* sp. และ *Trichodina* sp. โดยตรวจพบในลำไส้เล็กมากที่สุด รองลงมาคือในลำไส้ใหญ่ ส่วนในตับ ไต เลือด กล้ามเนื้อตรวจไม่พบปรสิต และพบว่าจังหวัดนครพนมมีจำนวนชนิดของแบคทีเรียมากที่สุด ผลการศึกษาชนิดปรสิตในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับ Sririkanonda (2009)

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกบของเกษตรกร

จากตัวอย่างน้ำในบ่อเลี้ยงกบที่สุ่มเก็บ ผลการตรวจ (Table 5) พบว่า น้ำในฟาร์มเลี้ยงกบนา มีค่าแอมโมเนียทั้งหมด (Total ammonia) สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน และออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen) ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเกณฑ์มาตรฐานของกรมประมง รายงานว่าในน้ำควรมีค่าแอมโมเนีย (Total ammonia) ไม่ควรเกิน 0.02 mg/l ส่วนออกซิเจนที่ละลายน้ำ ไม่ควรต่ำกว่า 3 mg/l ส่วนค่าอื่นๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกบมีผลต่อการเกิดโรค ซึ่งพบว่าค่าแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงทั้งในจังหวัดสกลนคร และนครพนมล้วนสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดคือมีค่าสูงกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (Duangsawat and Somsiri, 1992) ทำให้สัตว์น้ำเกิดความเครียด อ่อนแอ และเกิดการติดเชื้อก่อโรคได้ง่าย ส่วนค่าออกซิเจนก็ต่ำกว่าค่ามาตรฐานคือน้อยกว่า 3 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ในกบเป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำที่สามารถหายใจได้หลายทาง เช่น ผิวหนัง และปอด จึงทำให้ปริมาณออกซิเจนไม่มีผลเท่าแอมโมเนีย

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาโรคที่พบในเขตจังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครพนม พบว่ามีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิด เชื้อก่อโรคมามากที่สุดคือ *Aeromonas hydrophila*, รองลงมาคือ *Flavobacterium meningosepticum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ปริมาณ 3 ชนิด ที่ก่อโรคมามากที่สุด คือ *Opalina* sp. รองลงมาคือ *Balantidium* sp. และ *Trichodina* sp. ตามลำดับ

Table 5 Water quality of frog farm in Sakon nakhon and Nakhon phanom

Water quality	Sakon Nakhon	Nakhon Phanom	The optimum of water quality for aquaculture	References
pH	6.9±0.018	6.8±0.120	6.5-8.5	Boyd (1982)
Temperature, °C	29.5±0.012	30.5±0.041	≤ 40	Lohaluksanadech <i>et.al</i> (2018)
Alkalinity, mg/l	190±0.034	188±0.021	50-300	Asawasemanee (2018; Online)
Hardness, mg/l	69±0.121	72±0.098	> 20	Boyd (1982)
Total ammonia, mg/l	0.09±0.110	0.15±0.021	≤ 0.02	Duangswat and Somsiri (1992)
Dissolved oxygen, mg/l	2.70±0.102	2.82±0.201	> 3	Tontoonwat and Pornprapa (2001)
Nitrite, mg/l	0.25±0.051	0.19±0.032	<0.017	Lohaluksanadech <i>et.al.</i> (2018)
Nitrate, mg/l	0.42±0.075	0.38±0.034	≤ 10	Sangrungruang (2008)
Hydrogen sulfide, mg/l	0.20±0.014	0.25±0.091	< 0.002	Duangswat and Somsiri (1992)

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกบ พบว่า ค่าแอมโมเนีย ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ มีค่าเกินมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งส่งผลให้สัตว์น้ำอ่อนแอ เกิดความเครียด และเกิดการติดเชื้อได้ง่าย

แนวทางที่ดีที่สุดที่ไม่ให้กบเป็นโรคคือ การป้องกันตั้งแต่แรกเริ่มได้แก่ การควบคุมคุณภาพน้ำให้ดีขึ้นเสมอ การฆ่าเชื้อในน้ำก่อนนำมาใช้ มีการถ่ายเทน้ำอย่างสม่ำเสมอ ไม่เลี้ยงหนาแน่นเกินไป และให้อาหาร

อย่างเหมาะสม สำหรับการรักษานั้นเมื่อเกิดโรคแล้ว จะทำได้ค่อนข้างยากจะทำได้เมื่อมีอาการยังไม่หนักมาก แต่ถ้าป่วยมากแล้วการรักษาอาจจะไม่ได้ผล

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาวิเคราะห์หาแนวทางการจัดการระบบการเลี้ยง ต้นทุนการผลิต ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ รวมถึงศึกษาข้อมูลที่เป็นประโยชน์จากเกษตรกรและผู้เกี่ยวข้องต่าง ๆ เช่นเจ้าหน้าที่ภาครัฐที่จะมีส่วนช่วยในการพัฒนาการเลี้ยงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนงบประมาณวิจัยครั้งนี้ จนสามารถดำเนินการโครงการสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณสาขาวิชาการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ที่ให้ความสะดวกในการวิจัย ขอขอบคุณนักศึกษาสาขาวิชาการประมงทุกคนที่มีส่วนช่วยในงาน และขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกบในจังหวัดสกลนคร และนครพนมเป็นอย่างยิ่ง ที่เสียสละเวลาและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Asawasemanee, N. Water quality suitable for freshwater fish. [Online; 2018] Available from <http://oservice.skru.ac.th/ebookft/354/chapter4.pdf> [2018, January 18] [in Thai]
- Boyd, C.E. 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture. Elsevier Scientific Publishing Co., New York. p317.
- Duangawat, M., and Somsiri J. 1992. Water quality and analytical methods for fisheries research. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. [in Thai]
- Lohaluksanadech, D., Somboon K., and Sawatprom T. Analysis of water quality on coastal area of Rajamangala beach. Trang province. [Online; 2018] Available from http://kukr.lib.ku.ac.th/proceedings/KUCON2/search_detail/result/11162, 25 January 2018. [in Thai]
- Phadee, P. 2006. Disease and disease diagnosis of fish, Faculty of Agricultural Technology Mahasarakham. [in Thai]
- Sangrungruang, C. 2008. Water quality for marine culture. [Online; 2017] Available from <http://www.fisheries.go.th/shrimp/km/QualityWater.pdf>, 5 January 2018. [2017, October 11] [in Thai]
- Sirikanonda, S. 2009. Diseases of Cultured Frog (*Rana tigerina*) in Southern Part of Thailand, Princess of Naradhiwas University Journal. 1 (3) 102-117. [Online; 2018] Available from <http://infofile.pcd.go.th/water/estimate54.pdf?CFID=2113272&CFTOKEN=66988081>, 5 January 2018. [2018, January 18] [in Thai]

- Tontoonwat, M. and Pornprapa, P. 2001. Water quality management and waste water treatment in fish pond and another animals. Department of Environmental engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University. 319. [in Thai]
- Yang, H., Baek, H., Speare, R., Webb, R., Park, S., Kim, T., Lasater, K. C., Shin, S., Son, S., Park, J., Min, M., Kim, Y., Na, K., Lee, H. and Park S. 2009. First detection of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-ranging populations of amphibians on mainland Asia: survey in South Korea. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org. Vol. 86: 9–13, 2009 doi: 10.3354/dao02098

**การใช้การตอบสนองของปลาไนล์ (*Oreochromis niloticus*) เป็นดัชนีทางชีวภาพ
เพื่อประเมินผลกระทบและความเสี่ยงทางนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อมของมลพิษ
ต่อระบบนิเวศทางน้ำในบริเวณลุ่มน้ำห้วยหลวง จังหวัดอุดรธานี**

**The use of Biological Responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* as
Biomarkers for Ecological Risk Assessment of Contaminants on
Aquatic Ecosystem in Huai Laung Basin, Udon Thani Province**

อัจฉราพร สมภาร¹ ณัฐสิมา โทษณ์² และนันทิยา สมภาร^{3*}

Atcharaporn Somparn¹, Natsima Tokun² and Nuntiya Somparn^{3*}

¹Office of General Education, Udon Thani Rajabhat University, UdonThani, Thailand, 41000

²Environment Science Division, Faculty of Science and Technology, Valay Alongkorn Rajabhat University

³Division of Pharmacology, Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University.

*Corresponding author. Email:Nuntiya_tom@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ใช้การตอบสนองทางชีวภาพของปลาไนล์มาใช้ในการประเมินผลกระทบและความเสี่ยงทางด้านนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อมของมลพิษทางน้ำที่เกิดจากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวง จังหวัดอุดรธานีโดยเก็บตัวอย่างน้ำจาก 3 พื้นที่ คือพื้นที่อ้างอิงพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่อุตสาหกรรมในฤดูน้ำน้อย (กุมภาพันธ์-เมษายน 2560) และฤดูน้ำหลาก(พฤษภาคม-กรกฎาคม 2560) ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพน้ำโดยรวมของลุ่มน้ำห้วยหลวงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำผิวดินประเภทที่ 3 แต่อย่างไรก็ตามพบปริมาณโลหะหนักในน้ำ (Zn, Cr, Cd, Cu, Pb, Mn และFe) ในพื้นที่อุตสาหกรรมและเกษตรกรรมมีปริมาณสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำ ส่วนผลการศึกษาทางพิษวิทยา(การรอดชีวิตและการทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) จากผลการศึกษาพบว่าน้ำจากพื้นที่อุตสาหกรรมมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลาไนล์มากที่สุดโดยพบการรอดชีวิตของปลาไนล์ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ($51.00 \pm 1.20 - 76.67 \pm 0.58$ %) รองลงมาพื้นที่เกษตรกรรม ($73.33 \pm 3.20 - 86.67 \pm 2.85$ %) และพื้นที่อ้างอิง ($76.67 \pm 1.50 - 86.70 \pm 1.58$ %) ตามลำดับ ($P < 0.05$) และผลการศึกษาพบว่าน้ำจากพื้นที่อุตสาหกรรมมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ GST ในตับปลาไนล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับจุดเก็บตัวอย่างอื่น ($P < 0.05$) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ประโยชน์ที่ดินในลุ่มน้ำห้วยหลวงมีผลต่อคุณภาพน้ำและมีผลทำให้ปลาไนล์ในกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่าชุดควบคุม และส่งผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ GST ในปลาไนล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการตอบสนองทางชีวภาพของปลาไนล์โดยเฉพาะการทำงานของ GST ควรนำมาใช้ในการประเมินความเสี่ยงและผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมควบคู่กับการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการคาดการณ์ผลกระทบของมลพิษทางน้ำลุ่มน้ำห้วยหลวงและประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานสเฟอเรส การตอบสนองทางชีวภาพ

Abstract

This study aimed to investigate the potential use of biological responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* as biomarkers for ecological risk assessment of water pollution caused by different land uses in Huai Luang Basin areas (reference, industrial and agricultural area), Udon Thani province. The specimens from each areas were taken during the dry season (February - April 2017) and wet season (May -July 2017). The results of this study revealed that the overall water quality of Huai Luang Basin was in the standard value. However, heavy metals (Zn, Cr, Cd, Cu, Pb, Mn and Fe) in the water industrial and agricultural areas were higher than the water quality standard. For the ecotoxicity test (survival and glutathione *S-transferase* (GST) activity) on Nile tilapia, the study found that water from industrial areas had higher acute toxicity (96hr) effect on % survival of Nile tilapia ($51.00 \pm 1.20 - 76.67 \pm 0.58\%$) than agricultural areas ($73.33 \pm 3.20 - 86.67 \pm 2.85\%$) and reference area ($73.33 \pm 3.20 - 86.67 \pm 2.85\%$), respectively ($P < 0.05$). In addition, significant induction of GST activity was found in Nile tilapia exposed to water (48hr) from industrial areas compared with those exposed to water from others areas ($P < 0.05$). This study demonstrated that different land uses affected the water quality resulted in lower survival rate of treatment group compared with control and resulted in induction of GST activity. Therefore, the biological responses of Nile tilapia, especially GST activity could serve as potential biomarkers for ecological risk assessment of pollutant in concurrently with chemical analysis. These biomarkers may be used to predict contamination in Huai Luang Basin and freshwater ecosystems of Thailand.

Keywords: glutathione-*S-transferase*, biological response

คำนำ

ลุ่มน้ำห้วยหลวงเป็นลุ่มน้ำที่มีความสำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเนื้อที่ประมาณ 2,588,724 ไร่ ก่อนไหลไปรวมกับแม่น้ำโขง และถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั้งการผลิตน้ำประปาเพื่ออุปโภคบริโภค การประมง และการเกษตรกรรม แต่เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรการขยายตัวของภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่เพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบันส่งผลให้คุณภาพน้ำลุ่มน้ำห้วยหลวงเสื่อมโทรมลงและเกิดการสะสมของสารมลพิษในแหล่งน้ำซึ่งส่งผลทำให้สัตว์น้ำได้รับอันตราย (Regional environmental office 9, 2015) โดยเฉพาะปลาที่เป็นอาหารหลักที่สำคัญของมนุษย์หากมีการสะสมของมลพิษก็มีศักยภาพที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคลำดับสุดท้ายในระบบห่วงโซ่อาหารได้ (Kim *et al.*, 2015) ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงและผลกระทบของมลพิษในลุ่มน้ำห้วยหลวงจึงมีความสำคัญโดยการทดสอบทางนิเวศพิษวิทยา (Ecotoxicology test) เป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยงและผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน โดยทำการศึกษผลกระทบของสารมลพิษลักษณะทางกายภาพและเคมี การแพร่กระจายของสารมลพิษ รวมถึงความสัมพันธ์ของสารมลพิษกับระบบนิเวศโดยวิธีการนำสารเหล่านั้นมาทดสอบความเป็นพิษต่อ

สัตว์ทดลองซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ประเมินระดับสารมลพิษที่สิ่งมีชีวิตได้รับแล้วนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้และเป็นเครื่องมือที่ใช้เป็นวัดการปนเปื้อนของมลพิษในระบบนิเวศ (Bae and Park, 2014) โดยปัจจุบันปลานิล (Nile tilapia) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการประเมินผลกระทบในระบบนิเวศทางน้ำ เนื่องจากพบได้แพร่หลาย เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ตอบสนองต่อสารมลพิษได้ดีและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจและเป็นแหล่งอาหารหลักของมนุษย์ (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007) ซึ่ง Lasheen *et al.* (2012) รายงานว่า ปลานิลสามารถตอบสนองต่อสารมลพิษได้ดีในระดับที่แตกต่างกันตามชนิดและระดับความเข้มข้นของสารที่ได้รับจึงสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพในการติดตามผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษามลพิษทางน้ำในประเทศไทยส่วนใหญ่ศึกษาข้อมูลเฉพาะทางด้านกายภาพและทางเคมี ส่วนข้อมูลทางชีวภาพมีการศึกษาอยู่น้อย โดยเฉพาะข้อมูลด้านนิเวศพิษวิทยากับสิ่งมีชีวิตทำให้ข้อมูลและวิธีการที่อ้างอิงส่วนใหญ่เป็นข้อมูลที่ได้ต่างประเทศและเมื่อนำข้อมูลมาปรับใช้อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากสภาพแวดล้อมรวมถึงชนิดสิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำปลานิลที่เป็นสัตว์น้ำในท้องถิ่นมาใช้ในการประเมินผลกระทบของมลพิษทางน้ำในลุ่มน้ำห้วยหลวงควบคู่กับการศึกษาทางด้านกายภาพและเคมีซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการกำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำและใช้เป็นเครื่องมือในการค้นหาคาดการณ์ผลกระทบของมลพิษในน้ำรวมถึงใช้ในการติดตามเฝ้าระวัง และจัดการคุณภาพน้ำในลุ่มน้ำห้วยหลวงและระบบนิเวศทางน้ำของประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินผลที่เกิดจากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวง จังหวัดอุดรธานี ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำและการสะสมของโลหะหนักในระบบนิเวศทางน้ำ
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของมลพิษทางน้ำที่เกิดจากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวง จังหวัดอุดรธานี ที่ส่งผลต่อพิษต่อการรอดชีวิต และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ glutathione S- transferase (GST)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พื้นที่ศึกษา สถานีเก็บตัวอย่างและช่วงเวลาเก็บข้อมูล

พื้นที่ศึกษาคือพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวง จ.อุดรธานี โดยแบ่งพื้นที่เก็บตัวอย่างตามกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันซึ่งแบ่งออกเป็น 3 พื้นที่ คือพื้นที่อ้างอิง พื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่อุตสาหกรรมโดยเก็บตัวอย่าง 2 ฤดูกาล คือ ในช่วงฤดูน้ำน้อย (กุมภาพันธ์ - เมษายน 2560) และในฤดูน้ำหลาก (พฤษภาคม - กรกฎาคม 2560) ทำการเก็บตัวอย่างฤดูกาลละ 3 ครั้งดังต่อไปนี้

1.1 สถานีที่ 1 (พื้นที่อ้างอิง) ตั้งอยู่บริเวณ $17^{\circ}22'30''N$ $102^{\circ}36'3''E$ ในพื้นที่ต้นน้ำลุ่มน้ำห้วยหลวง จ. อุดรธานี ซึ่งเป็นเขื่อนสร้างเพื่อการชลประทาน และเป็นแหล่งน้ำสำหรับใช้ผลิตน้ำประปาในจังหวัดอุดรธานี

1.2 สถานีที่ 2 (เกษตรกรรม) ตั้งอยู่บริเวณ $17^{\circ}22'54''N$ $102^{\circ}35'41''E$ มีเนื้อที่ประมาณ 30 ไร่ โดยมีการปลูกพืช เช่น ทำนา ปลูกอ้อย ถั่วฝักยาวมะนาว พริก ทำนา และมีฟาร์มเลี้ยงหมูและไก่

1.3 พื้นที่เก็บตัวอย่างที่ 3 (อุตสาหกรรม) ตั้งอยู่บริเวณ $17^{\circ}25'19''\text{N}$ $102^{\circ}36'54''\text{E}$ เป็นบริเวณ จุจรรวมรับน้ำจากโรงงานผลิตและแปรรูปยางพาราและโรงเลื่อยไม้ ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวง

2. การเก็บและวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำแบบจ้วง (Grab Sampling) พร้อมกับวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการตามวิธี ของ APHA (1996) ได้แก่ ค่าของแข็งทั้งหมด (Total solid) ของแข็งที่ละลายน้ำ (Total dissolved solid) ของแข็งแขวนลอยในน้ำ (Suspended solids) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ (BOD) ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ในน้ำ (COD) ออร์โธฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส ไนเตรท-ไนโตรเจน ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity) ค่า ความเป็นด่าง (Alkalinity) ความกระด้าง (Hardness) และโลหะหนัก (Zn, Cu, Cr, Cd, Pb, Mn และ Fe)

3. การทดสอบทางนิเวศพิษวิทยาของน้ำเกิดจากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันในพื้นที่ ลุ่มน้ำห้วยหลวง จ. อุตรดิตถ์ ที่มีผลต่อการรอดชีวิต และการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับปลานิล

สิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบ คือปลานิล *Oreochromis niloticus* โดยนำปลานิลอายุ 10 วัน จากศูนย์วิจัย และพัฒนาการเพาะเลี้ยงประมงน้ำจืด จ.อุตรดิตถ์ มาเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย ราชภัฏอุตรดิตถ์ และเมื่ออายุครบ 1 เดือน ซึ่งมีขนาดลำตัวยาว 3 - 5 เซนติเมตรจึงนำมาทดสอบทางพิษวิทยา ซึ่งทดสอบโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบน้ำนิ่งไม่เปลี่ยนน้ำ (static bioassay) ตามวิธีของ US EPA (2002) แบ่งการ ทดสอบออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม คือ น้ำจาก พื้นที่อ้างอิงและกลุ่มทดลอง ได้แก่ ตัวอย่างน้ำที่ได้จากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่ต่างกัน 2 พื้นที่ ที่ระดับ ความเข้มข้น 100 % และใช้ปลานิลจำนวน 10 ตัวต่อซ้ำและทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ โดยชุดการทดลองที่ 1 ทดสอบการรอดชีวิตของปลานิลด้วยการสังเกตการตอบสนองของปลานิลและจดบันทึกการตายที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พร้อมวัดคุณภาพน้ำบางประการจนถึงสิ้นสุดการทำการทดลอง (APHA, 1996) จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณอัตราการรอดชีวิตของปลานิลที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการวิเคราะห์การทำงานของ GST ในปลานิลที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดสอบทำการคัดแยกปลานิลที่รอดชีวิตมา แยกเฉพาะส่วนตับและนำไปชั่งน้ำหนักสดหลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวัดการทำงานของเอนไซม์ GST ซึ่ง ดัดแปลงตามวิธี Habig *et al.* (1974) โดยใช้ reduce GSH และ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) เป็น substrate หลังทำปฏิกิริยานำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 340 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader จากนั้นนำไป คำนวณการทำงานของ GST ($\Delta\text{OD}/\text{min}/\text{mg}$ protein) ส่วนการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้จากตับปลานิล ดัดแปลงตามวิธี Bradford (1976) และนำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 595 nm

4. สถิติที่ใช้ในการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลคุณภาพน้ำปริมาณโลหะหนักในน้ำ รวมถึงข้อมูลทางนิเวศพิษวิทยาเพื่อเปรียบเทียบ ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มการทดลอง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองจะทำการวิเคราะห์โดยใช้ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม Statistical 8 software

ผลและวิจารณ์การศึกษา

1. สถานการณ์คุณภาพน้ำบางประการในกลุ่มน้ำห้วยหลวง จ. อุดรธานี โดยรวมยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ทั้งสามพื้นที่ยกเว้นบางพารามิเตอร์ ได้แก่ สารอินทรีย์ และปริมาณโลหะหนักในน้ำจากพื้นที่อุตสาหกรรมและเกษตรกรรมมีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐานน้ำผิวดินประเภทที่ 3 (Pollution Control Department, 1994) และพบว่าพื้นที่อุตสาหกรรมมีคุณภาพน้ำค่อนข้างเสียและมีปริมาณโลหะหนักในน้ำค่อนข้างสูงกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่น รองลงมา คือ พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่อ้างอิงตามลำดับ (Table 1) ซึ่งการที่พื้นที่อุตสาหกรรมมีปริมาณสารอินทรีย์ และโลหะหนักในน้ำสูงกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่น อาจเนื่องจากเป็นจุดที่รับน้ำจากโรงงานที่มีการแปรรูปยางพาราซึ่งในกระบวนการผลิตมีการนำวัตถุดิบในการผลิต เช่น น้ำยางพาราและโลหะหนักเข้ามาใช้ในกระบวนการผลิต ซึ่งอาจทำให้น้ำเสียที่เกิดขึ้นมีความสกปรกในรูปสารอินทรีย์ และโลหะหนักน้ำสูงกว่าจุดอื่น (Massoudinejad *et al.*, 2015) (Table 1) ส่วนในพื้นที่เกษตรกรรมที่วัดค่า BOD ได้สูงอาจเนื่องจากมีฟาร์มเลี้ยงสัตว์บริเวณใกล้เคียงซึ่งอาจส่งผลทำให้วัดค่า BOD ได้สูงเกินมาตรฐานคุณภาพน้ำ ส่วนปริมาณโลหะหนักที่มีสูงอาจเนื่องจากมีการนำเอาสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์รวมถึงปุ๋ยเคมีเข้ามาใช้ซึ่งองค์ประกอบของทั้งสองอย่างอาจมีโลหะหนักปนเปื้อนอยู่ด้วย โดย Wu and Zhang (2010) รายงานว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์โดยทั่วไปจะมีองค์ประกอบของ Cd, Hg และ Pb โดยเฉพาะ Cu และ Zn ที่พบมากในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งจะพบว่า Cu เป็นองค์ประกอบของยาฆ่าหญ้าและสารกำจัดหอยหรือสาหร่าย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zarcinas *et al.* (2004) ที่อธิบายว่าปุ๋ยฟอสเฟตเป็นแหล่งหลักที่มีการปนเปื้อนของ Cd มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบ Cu, As และ Zn สูงด้วย ดังนั้นจึงอาจส่งผลทำให้พบโลหะหนักได้สูงในพื้นที่ทำเกษตรกรรม ส่วนผลของฤดูกาลที่แตกต่างกันพบว่าพารามิเตอร์น้ำที่ตรวจวัดส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกันยกเว้น COD ในฤดูน้ำน้อยมีค่าสูงในจุดพื้นที่อุตสาหกรรมและ EC ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นในฤดูกาลน้ำหลากเช่นเดียวกับโลหะหนักในน้ำที่มีเข้มข้นสูงในฤดูน้ำหลากมากกว่าฤดูน้ำน้อย ซึ่งอาจเกิดจากช่วงฤดูกาลน้ำหลากเป็นช่วงที่มีฝนตกส่งผลทำให้น้ำฝนชะล้างสารต่าง ๆ ลงสู่แหล่งน้ำได้ง่าย จึงอาจส่งผลทำให้คุณภาพน้ำในฤดูน้ำหลากมีแนวโน้มต่ำและมีความเข้มข้นของโลหะหนักสูงกว่าในช่วงฤดูน้ำน้อย ซึ่งสอดคล้องกับ Offem *et al.* (2011) อธิบายว่าฝนที่ตกมีผลต่อการละลายและเคลื่อนย้ายโลหะหนักลงสู่แหล่งน้ำสูงขึ้น

Table1 Water quality and concentration of heavy metal in water in Huai Luang Basin, Udon Thani Province in dry and wet seasons

Parameters	Reference area		Agricultural area		Industrial area	
	Dry	Wet	Dry	Wet	Dry	Wet
pH	6.40±0.20	6.59±0.12	6.26±0.12	6.35±0.01	6.60±0.04	7.86±0.21
EC (μ S/cm)	67.62±0.14 ^d	70.36±2.25 ^d	74.78±2.12 ^d	118.10±0.17 ^c	240.70±0.10 ^b	405.10±0.61 ^a
DO (mg/L)	6.52± 1.75	8.25±1.10	7.25±1.80	7.57±1.20	3.45± 1.27 ^a	5.92±1.51
BOD (mg/L)	3.34±2.11 ^d	5.33±1.88 ^d	6.67±1.35 ^d	10.21±2.67 ^c	95.66±9.24 ^a	17.45 ±4.56 ^b
COD (mg/L)	21.33±9.24 ^d	21.33±9.24 ^d	26.67±1.48 ^d	42.67±9.24 ^c	386.67±9.24 ^a	69.87±1.63 ^b
Hardness						
(mg/L as CaCO ₃)	55.33±3.06 ^c	65.33±3.06 ^b	65.33±5.77 ^b	70.00±4.00 ^b	69.33±10.37 ^b	150.67±3.06 ^a
Alkalinity (mg/L)	82.00±5.30 ^{cd}	76.00± 2.00 ^d	73.33±4.16 ^d	91.33±4.16 ^c	150.00±2.46 ^b	560.00±1.73 ^a
NO ₃ ⁻ (mg/L)	0.09±0.04	0.12 ±0.10	0.10±0.25	0.14 ±0.01	0.18±0.10	0.22 ±0.10
PO ₄ ⁻ (mg/L)	0.05±0.13	0.04± 0.15	0.03±0.22	0.03± 0.07	0.06±0.04 ^a	0.03±0.00
Zn (mg/L)	0.17 ±0.04 ^c	1.81±0.20 ^b	0.29±0.08 ^c	4.65±0.04 ^a	1.84±0.04 ^b	2.07±0.04 ^b
Cr (mg/L)	<0.005±0.04 ^b	<0.005±0.04 ^b	0.30±0.020 ^a	<0.005±0.03 ^b	0.36±0.08 ^a	0.31±0.02 ^a
Cd (mg/L)	0.02±0.01 ^a	0.02± 0.00 ^a	0.24±0.10	0.20±0.03	0.22 ±0.00	0.22 ±0.00
Cu (mg/L)	0.01±0.01 ^b	0.51±0.01	0.56 ±0.00	0.74±0.01 ^a	0.51± 0.01	0.56 ±0.02
Pb (mg/L)	<0.001±0.07 ^f	0.28 ±0.01 ^c	0.15±0.02 ^e	0.51±0.02 ^b	0.24 ±0.00 ^d	6.97±0.28 ^a
Mn (mg/L)	1.52±0.04 ^d	1.11 ±0.10 ^e	7.73 ±1.50 ^b	12.18±1.56 ^a	2.03 ±0.20 ^c	1.90±0.01 ^c
Fe (mg/L)	10.54±0.04	10.05±0.86	12.17± 0.08	52.53±0.84 ^a	49.63±0.08 ^a	13.80±1.42

Values are mean±SD in the same row followed by the same letter are not significantly different at (P>0.05) and different letters in superscript indicate significant difference at (P<0.05)

2. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของน้ำจากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวง จ.อุดรธานี ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของปลานิลพบว่าปลานิลมีการรอดชีวิตลดลงเมื่อเวลาผ่านไปและเมื่อครบระยะเวลา 96 ชั่วโมง ปลานิลที่ได้รับน้ำจากพื้นที่อ่างอิงเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 76.67±1.50 - 86.67±1.58 % ส่วนในฤดูแล้งน้ำจากความเป็นปลานิลมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 51±1.20 - 76.67±1.50 % โดยพบว่าน้ำจากพื้นที่อุตสาหกรรมมีความเป็นพิษเฉียบพลันที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลานิลมากที่สุดรองลงมาคือพื้นที่เกษตรกรรมและอ่างอิงตามลำดับ ซึ่งการที่พื้นที่อุตสาหกรรมมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลานิลมากที่สุดอาจเกิดจากคุณภาพน้ำในพื้นที่มีปริมาณของโลหะหนักในน้ำสูงรวมถึงพารามิเตอร์น้ำโดยเฉพาะความสกปรกในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่มีค่าสูงกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่นซึ่งสอดคล้องกับ Eissa *et al.* (2013) และ Massoudinejad

et al. (2015) ที่อธิบายว่าน้ำเสียที่เกิดจากพื้นที่อุตสาหกรรมโดยเฉพาะจากการผลิตยางพาราจะมีพวกรวมสารอาหารรวมทั้งของเสียที่เป็นของแข็งและโลหะหนักสูงซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดหลักที่ทำให้โลหะหนักปนเปื้อนในระบบนิเวศทางน้ำและเป็นอันตรายต่อพวกลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นจากผลดังกล่าวจึงอาจทำให้น้ำที่มาจากพื้นที่อุตสาหกรรมมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลานิลมากกว่าจุดเก็บตัวอย่างอื่นส่วนพื้นที่อ้างอิงแม้ว่าคุณภาพน้ำและปริมาณโลหะหนักอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำผิวดิน แต่จากผลการวิจัยนี้ยังพบการตายของปลานิลในระยะเฉียบพลันมากกว่า 10 % (US EPA, 2002) อาจเกิดเนื่องจากมีสารมลพิษกลุ่มอื่นปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เช่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ เพราะจากผลการวิจัยนี้พบการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับปลานิลเพิ่มสูงขึ้นหลังสัมผัสน้ำในพื้นที่อ้างอิง (Table 2) ซึ่ง GST เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัดสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย และตอบสนองได้ดีกับสารกลุ่มโลหะหนักและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ปลานิลที่ใช้ทดสอบตาย (Farombi et al., 2017) ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยจะทำการตรวจวัดสารมลพิษตัวอื่นเพิ่มเติมเพื่อที่สามารถวิเคราะห์คุณภาพน้ำครอบคลุมยิ่งขึ้น ส่วนปัจจัยของฤดูกาลพบว่าคุณภาพน้ำใน ฤดูแล้งมีแนวโน้มที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลานิลสูงกว่าในฤดูน้ำน้อยซึ่งอาจเกิดจากในฤดูแล้งการตรวจวัดปริมาณโลหะหนักรวมถึงความสกปรกในรูปของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ได้สูงกว่าในฤดูน้ำน้อยซึ่งอาจส่งผลทำให้ ปลานิลมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำซึ่งสอดคล้องกับ Offem et al. (2011) และ El-Azim et al. (2017) ที่รายงานว่าในฤดูแล้งน้ำผิวน้ำมีการชะล้างสารมลพิษลงสู่แหล่งน้ำได้สูงกว่าฤดูน้ำน้อยซึ่งทำให้ทั้งปริมาณและคุณภาพน้ำลดลง

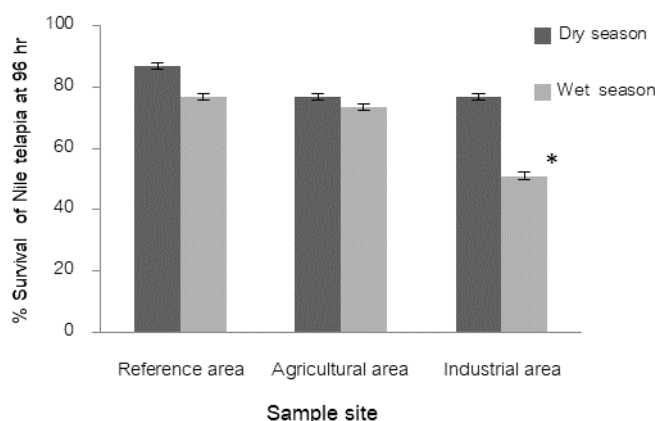


Figure 1 Acute effect of polluted water in Huai Luang Basin, Udon Thani Province on % survival of Nile tilapia at 96 hr, *indicate significant difference among different value as each area (LSD, <0.05).

3. ส่วนผลการศึกษาจากกิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินที่แตกต่างกันในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยหลวงที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับปลานิล ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (Table 2) พบว่าในฤดูแล้งและฤดูน้ำหลากการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับปลานิลอยู่ในช่วง 0.018 ± 0.01 - 0.038 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}$ และ 0.021 ± 0.03 - 0.045 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}$ ตามลำดับ โดยพบว่าปลานิลที่ได้รับน้ำจากพื้นที่อุตสาหกรรมจะพบการทำงานของ GST ในตับสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับจุดเก็บ

ตัวอย่างอื่น ($P < 0.05$) รองลงมาคือพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่อ้างอิงตามลำดับ ซึ่งการที่ปลานิลที่สัมผัสน้ำจากพื้นที่อุตสาหกรรมมีการทำงานของเอนไซม์ GST ในตับสูงกว่าพื้นที่อื่น อาจเนื่องจากปลานิลสร้างเอนไซม์ GST ซึ่งเป็น detoxification enzyme ซึ่งมีกลไกการทำงานป้องกันและกำจัดสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิต โดย GST จะทำปฏิกิริยาเคมีในการกำจัดขจัดสารแปลกปลอมออกจากสิ่งมีชีวิตซึ่งจะตอบสนองได้ดีกับโลหะหนัก และสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (Farombi *et al.*, 2017) ดังนั้นเมื่อปลานิลสัมผัสน้ำในพื้นที่อุตสาหกรรมซึ่งมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์อนินทรีย์และโลหะหนักในน้ำสูงสุดจึงตรวจวัดการทำงานของ GST ในตับปลานิลสูงเช่นกัน อีกทั้งจากการศึกษา ยังพบว่าการทำงานของ GST https://apds.mju.ac.th/Login_Check_Academic.aspx ยังเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่สัมผัสน้ำนานขึ้นเช่นกันซึ่งสอดคล้องกับ Joseph and Kafilat (2012) ที่อธิบายว่าปลา *Clarias gariepinus* สัมผัสกับน้ำที่มี Zn และ Pbปนเปื้อนจะพบ GST เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่สัมผัสน้ำที่เพิ่มขึ้น ส่วนผลของฤดูกาลพบว่าไม่มีผลต่อการทำงานของ GST ในตับปลานิล (Table 2) โดยจากการศึกษานี้พบว่าแม้ว่าคุณภาพน้ำลุ่มน้ำห้วยหลวงอยู่ในเกณฑ์คุณภาพน้ำผิวดินแต่ระดับความเข้มข้นสารมลพิษพิชดังกล่าวยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของ GST ในตับปลานิลได้ตั้งแต่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อเนื่องถึงการทำงานทางด้านสรีระหรือชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตได้

Table 2 Effect of polluted water in Huai Luang Basin, Udon Thani Province on GST activity in liver of Nile tilapia at 24 and 48hr

Site sample	GST activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}$)			
	24 hr		48 hr	
	Dry	wet	Dry	wet
Reference area	0.014 $\pm$ 0.01 ^b	0.021 $\pm$ 0.03 ^a	0.018 $\pm$ 0.14 ^{ab}	0.021 $\pm$ 0.07 ^{ac}
Agricultural area	0.021 $\pm$ 0.02 ^a	0.021 $\pm$ 0.04 ^a	0.031 $\pm$ 0.07 ^{ac}	0.034 $\pm$ 0.04 ^{bc}
Industrial area	0.025 $\pm$ 0.08 ^a	0.025 $\pm$ 0.07 ^a	0.038 $\pm$ 0.02 ^a	0.045 $\pm$ 0.02 ^b

Note: Value are mean of six replication $\pm$ SD; different letters in superscript indicate significant difference among different value as each exposure ($P < 0.05$).

สรุปและข้อเสนอแนะ

กิจกรรมการใช้ประโยชน์ที่ดินแต่ละประเภทในลุ่มน้ำห้วยหลวงก่อให้เกิดของเสียที่มีคุณสมบัติที่ต่างกันซึ่งของเสียที่เกิดจากการใช้ประโยชน์ในแต่ละกิจกรรมจะมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำและและปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบ นอกจากนี้ฤดูกาลและสภาพที่ตั้งของพื้นที่ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพน้ำและการสะสมของสารมลพิษ ดังนั้นในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำจึงจำเป็นต้องนำปัจจัยของสภาพแวดล้อมมาประกอบพิจารณาด้วย อีกทั้งในการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางเคมีอย่างเดียวยังไม่สามารถสะท้อนถึงผลกระทบของมลพิษในพื้นที่ได้ดีเพราะถึงแม้ว่าระดับคุณภาพน้ำโดยรวมของห้วยหลวงอยู่ในเกณฑ์

มาตรฐานคุณภาพน้ำ อย่างไรก็ตามคุณภาพน้ำดังกล่าวยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ GST ตั้งแต่ระยะ 24 ชั่วโมง ดังนั้นการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้กิจกรรมทางด้านชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะการทำงานของเอนไซม์ GST ถือว่าเป็น biomarker ที่สำคัญที่สามารถใช้ประเมินการปนเปื้อนของสารมลพิษในแหล่งน้ำได้ดีเนื่องจากเป็นกลไกในการตอบสนองได้ไวตั้งแต่ปริมาณสารมลพิษระดับต่ำๆ ซึ่งดีกว่าการวิเคราะห์ทางเคมีเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ปลาไนล์เป็นสิ่งมีชีวิตในท้องถิ่นอีกชนิดหนึ่ง que ควรพัฒนาและนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดผลกระทบสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสัตว์ทดลอง มีความไวต่อสารมลพิษ และและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ จึงเหมาะสมที่ใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพในการติดตามและประเมินความเสี่ยงของมลพิษในระบบนิเวศทางน้ำในลุ่มน้ำห้วยหลวงและระบบนิเวศทางน้ำของประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- American Public Health Association (APHA). 1996. American Water Works Association and Federal Water Pollution Control Administration. Standard method for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Bae, M.J., and Park, Y.S. 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review. *Science of the Total Environment*. 1(466-467): 635-49.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Eissa, A.E., Tharwat, N.A., and Zaki, M.M. 2013. Field assessment of the mid-winter mass kills of trophic fishes at Mariotteya stream, Egypt: chemical and biological pollution synergistic model. *Chemosphere*. 90: 1061-1068.
- El-Azim, H.A., Mehanna, S.F., and Belal, A.A. 2017. Impacts of water quality, fishing mortality and food availability on the striped piggy *Pomadasys stridens* production in Bitter lakes, Egypt. *Annals Marine Science*. 1(1): 019-027.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., and Ajimoko, Y.R. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 4:158-165.
- Figueiredo - Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, SM., Carrola, J., and Matos, P. 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27(3): 103-109.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione-S-transferase: The fish enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139.

- Joseph, K. S., and Kafilat, A.B.A. 2012. Toxicological effects of lead and zinc on the antioxidant enzyme activities of Juvenile *Clarias gariepinus*. Resources and Environment. 2(1): 21-26.
- Kim, H.J., Koedrith, P., and Seo, Y. R. 2015. Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. International Journal of Molecular Sciences. 29:16(6): 12261-12287.
- Lasheen, MR., Abdel-Gawad, FK, .Alaneny, AA., and Hassan, M.H.2012. Fish as bio indicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Abu-Rawash area, Egypt. World Applied Sciences Journal.19 (2): 265-275.
- Massoudinejad, M., Mehdipour-Rabori, M., and Dehghani, M.H. 2015. Treatment of natural rubber industry wastewater through a combination of physicochemical and ozonation processes. Journal of Advances in Environmental Health Research. 3(4): 243-249.
- Offem, B.O., Ayotunde, E.O., Ikpi, G.U., Ochang, S.N., and Ada,F.B. 2011.Influence of seasons on water quality, abundance of fish and plankton species of Ikwori lake, South-Eastern Nigeria. Fisheries and Aquaculture Journal.FAJ-13.
- Regional environmental office 9. 2015. Full report water quality. 2015. The Mekong Basin (Udon Thani, Nong Khai, Sakon Nakhon, Nakhon Phanom Province). Ministry of Natural resources and Environment [in Thai].
- US.EPA.2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Document EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Washington, DC.
- Pollution control Department.1994. Water quality standard:Notification of the National Environmental Board, No. 8, B.E. Ministry of Natural Resources and Environment[in Thai]
- Wu, C.,and Zhang, L. 2010. Heavy metal concentrations and their possible sources in paddy soils of a modern agricultural zone, south eastern China. Environmental Earth Science. 60: 45-56.
- Zarcinas, B. A., Pongsakul, P., McLaughlin, M.J., and Cozens, G. 2004. Heavy metals in oils and crops in south-east Asia. Peninsular Malaysia. Environmental Geochemistry and Health. 26: 343-357.

การเตรียมต้นฉบับ

เรื่องเต็มวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

1. **ต้นฉบับ** พิมพ์ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรมไมโครซอฟเวิร์ด (Microsoft word) และส่งต้นฉบับ พร้อมสำเนา 1 ชุด และแผ่นบันทึกข้อมูล (CD) 1 แผ่น มาที่บรรณาธิการวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290 (หรือส่งไฟล์ Word และ PDF มาที่อีเมล jfishtech.mju.ac.th ; ซึ่งจะได้อีเมลยืนยันการได้รับเอกสารผลงานจากกองบรรณาธิการแล้วเท่านั้น)

1.1 **บทคัดย่อ** มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 1 หน้ากระดาษ A4 หรือไม่เกิน 250 คำ

1.2 **เรื่องเต็ม** ความยาวไม่เกิน 10 หน้ากระดาษ A4 (รวมบทคัดย่อภาษาไทย ภาษาอังกฤษ รูปภาพ ตารางและอื่น ๆ)

2. รูปแบบ

2.1 **ตัวอักษร** ใช้ตัวอักษร Cordia New

2.2 **ชื่อเรื่อง** มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พิมพ์ตัวหนาขนาด 18 pt จัดให้อยู่กึ่งกลางหน้า

2.3 **ชื่อผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัย** ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พิมพ์ตัวอักษรหนาขนาด 14 pt จัดให้อยู่กึ่งกลางหน้า

2.4 **หมายเหตุข้างท้าย (footnote)** ใช้ตัวอักษรขนาด 12 pt

2.5 **หัวข้อเรื่อง** (บทคัดย่อ Abstract คำนำ อุปกรณ์ และวิธีการ ฯลฯ) ใช้ตัวอักษรหนาขนาด 16 pt จัดให้อยู่กึ่งกลางหน้า

2.6 **เนื้อหาในบทคัดย่อและเรื่องเต็ม** ให้ใช้ตัวอักษรขนาด 15 pt

2.7 **เนื้อหาในเรื่องเต็ม**

- ชื่อเรื่อง ต้องมีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ
- ชื่อ – ที่อยู่ ผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัย ให้บอกรายละเอียด (footnote) โดยใช้หมายเลขกำกับ
- บทคัดย่อ เป็นการเขียนสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผลการวิจัย
- คำนำ อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ของการวิจัย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ โดยรวมการตรวจเอกสาร (Literature review) ถึงผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องผู้อื่นได้ทำไว้ด้วย
- อุปกรณ์และวิธีการ ควรจะประกอบด้วยคำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง และคำอธิบายถึงขอบเขตของการวิจัย วิธีการที่ใช้ในการทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่เป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป

- ผลการวิจัย ควรเขียนให้กระชับและเป็นขั้นตอนที่เหมาะสม ถ้าเป็นไปได้ควรเสนอในรูปแบบของ ตาราง กราฟ หรือรูปภาพ

- **กราฟ รูปภาพและตาราง ให้เขียนคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด**

- **วิจารณ์ผล** ควรประกอบด้วยหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลองที่อาจสนับสนุนหรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน ควรเน้นถึงปัญหาหรือโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่วิจัยตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์

- **สรุปผล** อาจรวมกับวิจารณ์ผล โดยสรุปสาระสำคัญของเนื้อหาเพียงสั้น ๆ

- คำขอบคุณ/กิตติกรรมประกาศ อาจมีหรือไม่มีก็ได้

- เอกสารอ้างอิง: วิธีเขียนดูตามตัวอย่าง 2.9

2.8 การตั้งค่าขอบกระดาษ ขอบบน (top) 3.0 ซม. ขอบล่าง (bottom) 2 ซม. ขอบซ้าย (left) 3.0 ซม. ขอบขวา (right) 2.5 ซม.

2.9 เอกสารอ้างอิง ซึ่งได้อ้างอิงในเนื้อเรื่องและบรรณานุกรม ให้เขียนเป็น**ภาษาอังกฤษทั้งหมด** ดังนี้

2.9.1 การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง ใช้ระบบ ชื่อสกุลเป็นภาษาอังกฤษ และตามด้วยปี ค.ศ. เช่น Chitmanat (2010) รายงานว่า.....หรือ (Thomas and James, 1999) ในกรณีที่มีผู้วิจัยตั้งแต่สามคนขึ้นไปให้ใช้ *et al.* ต่อท้ายผู้แต่งคนแรก แต่ในบรรณานุกรมให้ใส่ชื่อหมดทุกคน

- **การอ้างอิงเอกสารที่อ้างอิงถึงในเอกสารอื่น** ระบุนามผู้แต่งและปีพิมพ์ของเอกสารแรก ตามด้วย “cited in” และนามผู้แต่งและปีพิมพ์ของเอกสารอันดับรอง เช่น (Choi *et al.*, 2004 cited in Kaewipitoon *et al.*, 2008)

- **ระบบออนไลน์** เช่น (Singh, 2002: online)

2.9.2 การอ้างอิงในบรรณานุกรม

- **ไม่ต้องใส่เลขที่ หากเป็นเอกสารภาษาไทยให้พิมพ์คำว่า [in Thai] ต่อท้าย**

Peerapornpisal, Y. 2008. Edible freshwater Macroalgae in Northern Thailand. Journal of Fisheries Technology Research (2)178 – 189. [in Thai]

- **เรียงลำดับตัวอักษรและสระ** ตามด้วยจำนวนผู้วิจัย/ผู้เขียน กรณีเป็นคนเดียวกันให้เรียงตามปี

- **วารสาร (Journal)** ควรเรียงลำดับดังนี้ ชื่อ-สกุล ผู้เขียน. ปี. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสาร. ปีที่.(ฉบับที่):หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

- **ตำรา (text books)** หรือหนังสือที่ออกไม่เป็นวารสาร ควรเรียงลำดับดังนี้ ชื่อ-สกุล ผู้เขียน. ปี. ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์หรือหน่วยงานที่พิมพ์. เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้า.

- เอกสารวิชาการอื่น ๆ ชื่อ-สกุล ผู้เขียน. ปี. ชื่อหนังสือหรือชื่อเรื่อง. ประเภทของเอกสาร. หน่วยงานหรือสถาบันที่จัดพิมพ์. เมืองที่พิมพ์. หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

- ปัญหาพิเศษ/วิทยานิพนธ์ ชื่อ-สกุล ผู้เขียน. ปี. ชื่อเรื่อง. ปัญหาพิเศษ/วิทยานิพนธ์ (ตรี, โท, เอก) ชื่อมหาวิทยาลัย เมืองที่มหาวิทยาลัยตั้งอยู่. จำนวนหน้า.

- เอกสารที่อ้างถึงในเอกสารอื่น ให้ระบุข้อมูลของเอกสารทั้ง 2 รายการ โดยระบุข้อมูลของเอกสารอันดับแรก ตามด้วยคำว่า “cited in” แล้วระบุข้อมูลของเอกสารอันดับรอง เช่น

Wallis, O.A. 1997. Introduction to Aquaculture. Berfley, Calif.: Adam Osborne&Assoc.

198 p. cited in Morris, M. 1991. Aquaculture in Asian. White Plains, NY: Lndustry Publications.

144 p.

- สื่ออิเล็กทรอนิกส์ ชื่อผู้รับผิดชอบหลัก. ชื่อแฟ้มข้อมูล. [Online] ปีที่จัดทำ (ถ้ามี). แหล่งที่มา: ชื่อของแหล่งที่มา [ปี, วัน เดือน ที่เข้าถึงข้อมูล]. เช่น Bangkokhealth.com. Omega-3 in freshwater fish. [Online] Available from <http://www.oknation.net/blog/print.php?id=278133> [2011, February 28]

2.10 **ต้นฉบับที่ไม่ได้จัดเตรียมตามคำแนะนำจะถูกส่งคืนกลับเพื่อให้แก้ไขทันที**

3. งานเขียนที่จะได้รับการตีพิมพ์ต้องผ่านการกลั่นกรองและประเมินคุณภาพจากกองบรรณาธิการและผู้ทรงคุณวุฒิ

4. งานเขียนที่เสนอเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ต้องไม่อยู่ในระหว่างการเสนอเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารอื่น หรือตีพิมพ์ที่ใดมาก่อนแล้ว

Guide for Authors

The Journal of Fisheries Technology Research (J. Fish. Tech. Res.) Welcomes the submission of manuscripts that meet the general criteria of significance and scientific excellence.

Preparation and Submission of Manuscripts

Authors submitting manuscripts for publication must follow the following guidelines.

1. Manuscript texts must be written using high-quality language in Microsoft Word. The cover letter and two copies of manuscript with CD will be sent to the editorial office, The Journal of Fisheries Technology Research, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiangmai, 50290 THAILAND

1.1 The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the author(s)'s full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and e-mail information. Present address of authors should appear as a footnote.

1.2 Abstracts should not exceed than 250 words. The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. No literature should be cited. About 5 keywords should also be provided.

1.3 Manuscript texts should not exceed than 10 pages including abstract, figures, and tables.

2. Format

2.1 Cordia New font must be applied.

18 pt Cordia New Bold fonts must be used for title and set in the middle of the page.

14 pt Cordia New Bold fonts must be used for authors and set in the middle of the page.

16 pt Cordia New Bold fonts must be used for all headings including Abstract, Introduction, Materials and Methods, etc.

15 pt Cordia New fonts should be used throughout manuscript and all pages numbered consecutively.

12 pt Cordia New Bold fonts must be used for footnote.

2.2 Manuscript texts should be prepared single column, with margins (right = 2.5 cm; left = 3.0 cm; top = 3.0 cm; bottom = 2 cm).

2.3 The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

2.4 Materials and Methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

2.5 Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the results but should be put into the discussion section.

2.6 The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper.

2.7 Acknowledgment is optional and should be as brief as possible.

2.8 Tables, figures, and references must be written in English.

2.9 Citations of published literature in the text and at the end of the manuscript must be written in English.

2.9.1 **Citations in the text** should be given in the form of author and year in parentheses; (James *et al.*, 2011), or, if the name forms part of a sentence, it should be followed by the year in parenthesis; Tomas and James (2010).

Citing two or more documents by multiple authors; List authors' names by alphabetical order, followed by year of publication, link each document with “;”(Keiser and Utzinger, 2005; McCarthy and Moore, 2000; Nawa, *et al.*, 2005)

Citing documents cited in other documents; Put author's name and year of original document's publication, followed by "cited in" and secondary document's author's name and year of publication; (Choi *et al.*, 2004 cited in Kaewipitoon *et al.*, 2008) Online materials; (Yu and Mott, 1994: online)

2.9.2 Citation in reference list;

All references mentioned in the reference list must be cited in the text, and vice versa. The references section at the end of the manuscript should list all. For papers printed in a language other than English, indicate the language in parentheses at the end of that reference. The following are examples of reference writing.

Reference to a journal article:

Khuantrairong, T., and Traichaiyaporn, S. 2010. Efficiency of carotenoid and nutritional values of an alga Kai (*Cladophora* sp.) for economic utilization. J. Fish. Tech. Res. 4: 54 – 64. [in Thai]

Reference to article or abstract in conference proceedings:

Cliche, G., Hébert, D., and Bourgeois, M. 2007. Evaluation of different parameters to optimize the collection strategy of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) in commercial operations. Proceedings of the 16th International Scallop Aquaculture Workshop. Canada, May 11 – 18, 2007. 24 – 28.

Reference to a book:

Boyd, C.E., and Tucker, C.S. 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts. USA. 700 p.

Reference to an edited book:

Shotts, E.B. 1994. Flow chart for the presumptive identification of selected bacteria from fish. In: Bacterial Diseases of Fish. 4th ed., edited by Thoesen, J.C. Chapman & Hall, London. pp. 131 -135 .

Reference to an electronic data source):

Yi, Y., Yang, Z., and Zhang, S. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. Environmental Pollution [Online]. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/S029911100337X>[2011, December 12].

2.10 Manuscript must be followed the guidelines of manuscript preparation, otherwise they will be sent back or even rejected.

3. All manuscripts considered for publication will be peer-reviewed by qualified editors and independent referees.

4. The submitted manuscripts are not already published or are not currently under consideration for publication elsewhere. Manuscripts, parts of which have been previously published in conference proceedings, may be accepted if they contain additional material not previously published.



ประกาศมหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิเพื่ออ่านผลงานทางวิชาการ

อนึ่งตามที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ลงวันที่ ๔ กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๘ ได้แต่งตั้ง
คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิเพื่ออ่านผลงานทางวิชาการ ไปแล้ว นั้น

เพื่อให้การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการสำหรับลงพิมพ์ในวารสารวิจัยเทคโนโลยี
การประมงเป็นไปด้วยความเรียบร้อย จึงให้ยกเลิกประกาศมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ลงวันที่ ๔ กันยายน
พ.ศ. ๒๕๕๘ และแต่งตั้งคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิเพื่ออ่านผลงานทางวิชาการ ดังต่อไปนี้

๑. ศาสตราจารย์ ดร.ทวนทอง จุฑาเกตุ
๒. ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต
๓. ศาสตราจารย์ ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล
๔. ศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี จุลละคร
๕. ศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา อังสุภานิช
๖. ศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ลำยอง
๗. ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร
๘. รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน
๙. รองศาสตราจารย์ ดร.คเชนทร เณลิมวัฒน์
๑๐. รองศาสตราจารย์จำเนียร บุญมาก
๑๑. รองศาสตราจารย์ ดร.จารุมาศ เมฆสัมพันธ์
๑๒. รองศาสตราจารย์ ดร.ชโลบล วงศ์สวัสดิ์
๑๓. รองศาสตราจารย์ณัฐวรรตน์ ปภาวสิทธิ์
๑๔. รองศาสตราจารย์ ดร.ธำรงค์ อมรสกุล
๑๕. รองศาสตราจารย์ ดร.ธนัญญา ทรรพนันท์ ใจดี
๑๖. รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ
๑๗. รองศาสตราจารย์ ดร.นิวุฒิ หวังชัย

๑๘. รองศาสตราจารย์...

๑๘. รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณีต งามเสน่ห์
๑๙. รองศาสตราจารย์ ดร.เฟดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์
๒๐. รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญพรรณ ครีสกุลเดียว
๒๑. รองศาสตราจารย์ ดร.พรศิลป์ ผลพันธุ์ทิน
๒๒. รองศาสตราจารย์ ดร.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์
๒๓. รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี ไพรรพพิศาล
๒๔. รองศาสตราจารย์ ดร.วิญญัติ มั่นพะจิตร
๒๕. รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง
๒๖. รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก
๒๗. รองศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ หวังเจริญ
๒๘. รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย ชูโชติ
๒๙. รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภมิตร เมฆฉาย
๓๐. รองศาสตราจารย์ ดร.สมพงษ์ คุณจินดาชาพร
๓๑. รองศาสตราจารย์ ดร.อัษฎารามรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์
๓๒. รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกลด แทนออมทอง
๓๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา พยู่หะ
๓๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญญาณัฐ สุนทรประสิทธิ์
๓๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยา ลีมรุ่งเรืองรัตน์
๓๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ครุศร ศรีกุลนาถ
๓๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงบกล พรหมยะ
๓๘. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราพร โรจน์ทินกร
๓๙. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรพงษ์ สุขเกื้อ
๔๐. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชล ผลารักษ์
๔๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส
๔๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชยากร ภูมาศ
๔๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยยง รุจจนเวท
๔๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์
๔๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล
๔๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทพรัตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์
๔๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรวุฒิ เลิศสุทธิขวาล

๔๘. ผู้ช่วยศาสตราจารย์...

๔๘. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นเรศ ช้วนยุก
๔๙. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัญญัติ มนเทียรอาสน์
๕๐. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ
๕๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุ
๕๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ
๕๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ศักดิ์ เหล่าดี
๕๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธี แก้วเนิน
๕๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รัชต์ ชัดติยะ
๕๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล
๕๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย วรวัฒนเมธีกุล
๕๘. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ เจ๊ะโละ
๕๙. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ
๖๐. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติวัฒน์ พิทักษ์พล
๖๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี
๖๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา เดวิดสัน
๖๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม
๖๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สำเนาวิ เสาวกุล
๖๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ จันทร์ดำ
๖๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภินันท์ สุวรรณรักษ์
๖๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ สงรักษ์
๖๘. ดร.พุทท ส่องแสงจินดา
๖๙. ดร.ทัตพร คุณประดิษฐ์
๗๐. ดร.สุดาพร ตงศิริ
๗๑. ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์

ประกาศ ณ วันที่ ๙ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๐


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ยศราช)
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

(J. Fish. Tech. Res.)

ISSN 1905-7393

Honorable Consultants:

Maejo University President

Maejo University Vice President for Research

Dean of the Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources

Editor-in Chief: Asst. Prof. Dr. Prachuab Chaibu Maejo University

Editorial Board:

Prof. Dr. Piamsak Menasveta	Chulalongkorn University
Prof. Dr. Tuanthong Jutagate	Ubonratchatani university
Assoc. Prof. Dr. Vipoosit Manthachitra	Burapha University
Assoc. Prof. Dr. Kriangsak Meng-umphan	Maejo University
Assoc. Prof. Dr. Niwooti Wangchai	Maejo University
Asst. Prof. Dr. Samnao Saowakoon	Rajamangala University of Technology Isan
Asst.Prof.Dr. Pongsak Luadee	Prince of Songkla University
Asst. Prof. Dr. Chayakorn Pumas	Chiangmai University

Editorial Secretary: Asst. Prof. Dr. Chanagun Chitmanat Maejo University

Journal of Fisheries Technology Research is a publication of the Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University and is intended to make available the results of technical work in the fisheries, aquaculture, aquatic resources and related biological sciences. It is published twice a year. Contact with the Journal should be addressed

TO.....The Editor,

Journal of Fisheries Technology Research, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources,
Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290, Thailand

Tel: +66-53-87-5100 – 2 Fax: +66-53-87-5103 – 2

E-mail: jfishtech.mju@gmail.com

Web site: http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/Journal_FT



วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

ปีที่ 13 เล่มที่ 1

มกราคม - มิถุนายน 2562

Volume 13 Number 1

January - June 2019

สารบัญวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 มกราคม - มิถุนายน พ.ศ. 2562

สารบัญ

บรรณาธิการ

บทความวิจัย

	หน้า
ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลาดุกอัฟริกกัน <i>Clarias gariepinus</i> ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้ silage จากการหมักได้ไก่ เป็นองค์ประกอบหลัก	1
เทพรตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์ จงกล พรหมยะ ประจวบ ฉายบุญ และนวรรตน์ สังเต็ม	
ผลของการเสริมอินูลินในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในลำไส้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ของปลาดุกลูกผสม	14
ณัฐนันท์ เทียงธรรม และพูลทรัพย์ ศิริสานต์	
อัตราการเพาะฟัก ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของไขหอยเชอร์ (<i>Pomacea canaliculata</i>) หลังสัมผัสกับ สารเคมีทางการเกษตร	24
ชุตติมา ถนอมสิทธิ์ ลัดดาวรรณ บุญปก ธนพงศ์ เปรียบเสนาดี อำนวย วัฒนกรศิริ หยาดเพชร โอเจริญ	
จักรพันธ์ นาน่วม วิชชุดา ประสาทแก้ว และพอลิต นันทนาวัฒน์	
เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ aromatizable androgen, non aromatizable androgen และ aromatase inhibitor ต่อการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเพศแม่พันธุ์ปลาไหลนา (<i>Monopterus albus</i>)	41
ขจรเกียรติ ศรีนวลสม และรักพงษ์ เพชรคำ	
ผลของการใช้แบคทีเรียแลคติกต่อความต้านทานเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp. ในปลานิล	54
วิณา จิรศิริวสุตม์กุล ชัยสาร และดอกกรัก ชัยสาร	
การดื้อยาปฏิชีวนะของ <i>Escherichia coli</i> จากน้ำเสียของฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเขตเมืองสกลนคร	63
นพรัตน์ พันธ์นิยั ทรงทรัพย์ อรุณกมล และวิไล เจียมไชยศรี	
การใช้ทริฮาโลสเป็นสารรักษาสุขภาพเซลล์ต่อการเก็บรักษาไรติเฟอร์ (<i>Brachionus rotundiformis</i>) ในรูปแบบเข้มข้น ที่เก็บรักษาต่างกัน	75
วุฒิชัย อ่อนเอี่ยม วาสนา อากรรตน์ และประภาพร ดีมาก	
การสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในปลาตะเพียนโดยวิธีการทดสอบพีซีอาร์ข้ามชนิด	88
วิศรุต ชัยเลิศฤทธิ์ อนงค์ นิมละมัย พนม กระจำจ พจน์ สอดสุข คงภพ อำพลศักดิ์ และอุดม สารชาติ	
สภาพการเลี้ยงกบและโรคที่พบในเขตจังหวัดสกลนครและนครพนม	105
ทาริกา ทิพอุเทน ทรงทรัพย์ อรุณกมล สาริณี บุตรดาวงค์ และสุวิทย์ ทิพอุเทน	
การใช้การตอบสนองของปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>) เป็นดัชนีทางชีวภาพเพื่อประเมินผลกระทบและความเสี่ยง ทางนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อมของมลพิษต่อระบบนิเวศทางน้ำในบริเวณลุ่มน้ำห้วยหลวง จังหวัดอุดรธานี	117
อัจฉราพร สมการ ณัฐสิมา ไทพันธ์ และนันทิยา สมการ	