



วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

ปีที่ 12 เล่มที่ 2

Volume 12 Number 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2561

July - December 2018

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 จิตมณัส 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 12 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม พ.ศ. 2561

ISSN 1905-7393

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมงเป็นวารสารวิชาการ
และเป็นลิขสิทธิ์ของคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

มีวัตถุประสงค์เพื่อ

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

ข้อคิดเห็นที่ปรากฏและแสดงในเนื้อหาบทความต่างๆ ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง
ถือเป็นความเห็นและความรับผิดชอบโดยตรงของผู้เขียนโดยเฉพาะ ไม่จำเป็นต้องสอดคล้อง
กับทฤษฎีของคณะผู้จัดทำ และมีใช้ความรับผิดชอบของคณะเทคโนโลยีการประมงและ
ทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ผู้ประสงค์จะนำข้อความใดๆ ไปพิมพ์เผยแพร่ต้องได้รับ
อนุญาตจากวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมงและผู้เขียนตามกฎหมายว่าด้วยลิขสิทธิ์

บทบรรณาธิการ

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

เนื้อหาในเล่มนี้ประกอบด้วยงานวิจัยการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดินน้ำจืด ซึ่งปัจจุบันสามารถทำได้ในหลายพื้นที่ ผู้อ่านควรพิจารณาต้นทุน ผลตอบแทน และอย่าลืมเรื่องการตลาดนำการผลิต เพื่อไม่ให้ปริมาณสัตว์น้ำที่ท่านผลิตจำหน่ายไม่ได้ราคาตามที่คาดหวัง เล่มนี้มีเนื้อหาเกี่ยวกับกบนา 2 เรื่อง ได้แก่ การศึกษาแคโรไฮโปและอิดิโอแกรมมาตรฐานของกบนาซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และอีกเรื่องเป็นการใช้สารกระตุ้นภูมิเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับกบนา การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิลเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ป้องกันโรคสัตว์น้ำ มีงานวิจัยเกี่ยวกับสูตรการผลิตสาหร่าย 2 ชนิด คือ คีโตเซอรอสและสาหร่ายไก่อ นอกจากนี้สาหร่ายยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำต่าง ๆ ปิดเล่มด้วยการเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

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 หรือเว็บไซต์ของศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทยที่ <http://tci/trf.or.th> นำไปสู่การส่งเสริมคุณภาพวารสารและเผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่ดีมีพหุในวารสาร ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าต่อการนำประโยชน์ต่อการศึกษาด้านวิชาการและวงการวิชาชีพด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำได้อย่างมั่นคงต่อไป

กองบรรณาธิการ

การเจริญเติบโต ผลผลิต ต้นทุนและผลตอบแทนของการเลี้ยงปลากะพงขาว ในบ่อดินน้ำจืดด้วยระบบต่างกัน

Growth, Productivity and Cost-Benefit of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) Rearing in Freshwater Earthen-Ponds with Different Systems

แจ่มจันทร์ เพชรศิริ^{1*} ทวีเดช ไชยนาพงษ์¹ ธัญญา พันธุ์ฤทธิธำ¹ และธนพล อยู่เย็น²

Jamjun Pechsiri^{1*} Thaweet Chainapong¹, Thanya Panritdam¹ and Thanapon Yooyen²

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

¹Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210

²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93200

²Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93200

*Corresponding author: jamjun2508@yahoo.com

บทคัดย่อ

ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นไปได้ทางเศรษฐกิจของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นสิ่งสำคัญสำหรับนักลงทุน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเจริญเติบโต ผลผลิต ต้นทุนและผลตอบแทนของการเลี้ยงปลากะพงขาว ในบ่อดินน้ำจืด ด้วยระบบต่างกัน 3 ชุดการทดลอง คือ 1) เลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยว ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล (โปรตีน 47.5%) โดยให้อาหารทุกวัน 2) และ 3) เลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิล ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาดุก (โปรตีน 32%) โดยให้อาหารวันเว้นวัน และทุกวัน ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่ระยะ 1 เดือนแรก ปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยระบบต่างกันมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) มีค่าระหว่าง 60.9 ± 6.0 - 70.0 ± 10.9 กรัมต่อตัว แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 6 เดือน พบว่าปลากะพงขาวที่เลี้ยงแบบเดี่ยว ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล มีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด และให้ผลผลิตปลากะพงขาวมากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 444.0 ± 16.6 กรัมต่อตัวและ 10.19 ± 0.6 กิโลกรัมต่อบ่อตามลำดับ ในทางกลับกันพบว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาดุกให้อาหารทุกวัน ให้ผลตอบแทนการลงทุนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 40.48% ดังนั้นการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลในช่วง 1 เดือนแรกควรให้อาหารวันเว้นวัน หลังจากนั้นควรให้อาหารทุกวัน เป็นวิธีการที่สามารถลดต้นทุน และเพิ่มผลตอบแทน ในการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดินน้ำจืดได้

คำสำคัญ: ผลผลิต ต้นทุนและผลตอบแทน ปลากะพงขาว บ่อดิน น้ำจืด

Abstract

Information on the economic viability of aquaculture is crucial for investors. The purpose of this study was to evaluate growth, productivity and cost - benefit of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) rearing in freshwater earthen-ponds with three different rearing systems. There were i) Monoculture of Asian Seabass and feeding daily with marine fish feed (47.5 % protein); ii) and iii) Polyculture of Asian Seabass with Nile tilapia and feeding with catfish feed (32 % protein) every other day and daily, respectively. It was found that there were no significant differences ($p > 0.05$) in body weight ($60.9 \pm 6.0 - 70.0 \pm 10.9$ g./fish) at the first month of the experiment. However, at the end of the 6-month experiment, monoculture of Asian Seabass and feeding daily with marine fish feed showed significantly ($p < 0.05$) higher body weight (444.0 ± 16.6 g./fish) and total weight (10.19 ± 0.6 kg./pond) than both polyculture rearing systems. On the other hand, polyculture of Asian Seabass with Nile tilapia and feeding daily with catfish feed showed significantly ($p < 0.05$) higher benefits (40.48%) than monoculture of Asian Seabass feeding daily with marine fish feed. These results suggested that polyculture of Asian Seabass with Nile tilapia and feeding every other day with catfish feed in the first month and then feeding daily with catfish feed until harvest produced the best benefit for polyculture of Asian Seabass with Nile tilapia.

Keywords: Productivity, Cost-Benefit, *Lates calcarifer*, earthen pond, freshwater

บทนำ

การเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดิน เป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาผลกระทบที่เกิดจากแหล่งเพาะเลี้ยงเสื่อมโทรม จากการพัฒนาอาหารเม็ด ชนิดจมน้ำ โปรตีน 48.86% และทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดิน น้ำกร่อย พบว่าการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยปลาสด ที่มีโปรตีน 64.39% อีกทั้งมีผลผลิตมากกว่าการเลี้ยงด้วยปลาสด (Plaipetch *et al.*, 2008) จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า โปรตีน 48.86% ในสูตรอาหาร เป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว ที่มีความต้องการโปรตีนระหว่าง 45 - 50% (Glencross, 2006) แต่จากการวิเคราะห์ต้นทุน และผลตอบแทนของการเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยว (mono culture) ในบ่อดิน ด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป พบว่ายังคงมีความเสี่ยงอยู่มากเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงด้านต้นทุน และผลประโยชน์ของการลงทุน (Wechakama *et al.*, 2012) การเลี้ยงสัตว์น้ำแบบรวม (poly culture) เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดความเสี่ยงเรื่องราคา (Lohalaksanadech *et al.*, 2009) และสร้างความยั่งยืนให้กับการเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย (Aghuzbeni *et al.*, 2016)

แม้ว่ามีการวิจัยเพื่อลดต้นทุนค่าอาหารโดยเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลเพื่อให้ปลากะพงขาวกินลูกปลานิลเป็นอาหารแต่ส่วนใหญ่จะเลี้ยงในบ่อดินน้ำกร่อยและยังประสบปัญหาเรื่องอัตราการเจริญเติบโตและปลามีขนาดไม่สม่ำเสมอ (Monwar *et al.*, 2013) เนื่องจากไม่มีการให้อาหาร ปริมาณลูกปลานิลมีไม่

เพียงพอ ทำให้การเจริญเติบโตช้า หากต้องการให้มีปริมาณลูกปลานิลเพียงพอ ต้องเลี้ยงปลานิลต่อปลากะพงขาวในอัตราที่สูงถึง 20:1 (Tesorero, 1995) ซึ่งทำให้ผลต่อปริมาณปลากะพงขาวที่จะผลิตได้ต่อบ่อลดลง

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นประกอบกับปลากะพงขาวสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม (Harpaza *et al.*, 2005) งานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาการเจริญเติบโต ผลผลิต ต้นทุน และผลตอบแทนการลงทุนของการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดินน้ำจืดที่เลี้ยงแบบเดี่ยวด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล และเลี้ยงร่วมกับปลานิลด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาจืด ให้อาหารวันเว้นวัน และให้อาหารทุกวัน เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพื้นที่การเลี้ยงปลากะพงขาวบริเวณน้ำจืด เพิ่มผลผลิต ลดต้นทุนค่าอาหาร และเพิ่มผลตอบแทนการลงทุน เป็นการเพิ่มรายได้ และสร้างความยั่งยืนให้กับเกษตรกร ตลอดจนเพิ่มรายได้รวมของประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

อุปกรณ์ และวิธีการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ประกอบด้วย 3 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ รายละเอียดดังแสดงใน Table 1 การดำเนินการทดลองแบ่งเป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 เตรียมบ่อดินขนาด 5X6 เมตร จำนวน 9 บ่อ โดยสูบน้ำออก เติมน้ำจืด 2.5 กิโลกรัมต่อบ่อ เพื่อฆ่าเชื้อโรค และปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ตากบ่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ปูขอบบ่อด้านในด้วยตาข่ายพรางแสง ชนิด 80 % สีดำ เพื่อป้องกันความขุ่นของน้ำในบ่อ หลังจากนั้น สูบน้ำจืดเข้าบ่อ ความลึกของน้ำประมาณ 40 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตร 16:20:0 และปุ๋ยยูเรียในปริมาณ 50 กรัมและ 17.5 กรัม ตามลำดับ เพื่อให้เกิดอาหารธรรมชาติสำหรับปลานิล และเติมน้ำในบ่อให้มีความลึก 1.2 เมตร นำปลานิลตัวเต็มวัยขนาดน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 160 กรัม ปลอยในบ่อๆ ละ 24 ตัว อัตราส่วนเพศเมียต่อเพศผู้ 3 : 1 จำนวน 6 บ่อ ให้ปลากินอาหารเม็ดสำเร็จรูป และอาหารธรรมชาติจากในบ่อ เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 2 เดือน จะได้ลูกปลานิลขนาดประมาณ 1 ถึง 1.5 นิ้ว เพื่อใช้เป็นอาหารปลากะพงขาว

ระยะที่ 2 เตรียมลูกปลากะพงขาว โดยซื้อลูกปลาขนาด 5 นิ้ว มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดตรัง ที่ปรับสภาพเลี้ยงในน้ำจืด และนำมาปรับสภาพก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในกระชังที่กางในบ่อซีเมนต์ขนาด 4 X 6 เมตร ด้วยอาหารสำเร็จรูปปลาทะเล วันละ 2 มื้อ เข้าและเย็น

ระยะที่ 3 ระยะทดลอง เปรียบเทียบการเจริญเติบโต ผลผลิต ต้นทุนและผลตอบแทน ของการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดินน้ำจืดด้วยระบบต่างๆ 3 ระบบ ดัง Table 1 โดยให้อาหารแบบให้กินจนอิ่ม (satiation) วันละ 1 มื้อ ในตอนเย็น สำหรับชุดการทดลองที่ 1 และ 3 และให้อาหารวันเว้นวัน 1 มื้อ ในตอนเย็น สำหรับชุดการทดลองที่ 2 ทดลองเป็นระยะเวลา 6 เดือน สุ่มชั่งน้ำหนัก วัดความยาวปลากะพงขาวบ่อละ 10 ตัว ทุกๆ 1 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลองชั่งน้ำหนักรวมของปลากะพงขาว น้ำหนักรวมของปลานิล และนับจำนวนปลาทดลองแต่ละบ่อ นำมาคำนวณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (daily weight gain, DWG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตรารอด ตามวิธีการของ Shapawi and Zamry (2016)

Table 1 Experimental design of different rearing strategies

Treatment	Seabass (fish)	Tilapia brood (fish)	Type of feed	Feeding strategies
1 (T1)	30	-	Marine fish feed (47.5 % protein)	Daily
2 (T2)	30	24	Catfish feed (32 % protein)	Every other day
3 (T3)	30	24	Catfish feed (32 % protein)	Daily

การวิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทน

วิเคราะห์ต้นทุน โดยพิจารณาโครงสร้างต้นทุน ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของการลงทุน และวิเคราะห์รายได้ กำไรสุทธิ และผลตอบแทน ตามวิธีการของ Chunsiripong (2010) สำหรับต้นทุนคงที่ในการวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยค่าเสื่อมราคาของตาข่ายพรางแสงสำหรับปูพื้นขอบบ่อ ต้นทุนผันแปรประกอบด้วยค่าต่าง ๆ ดังนี้

ค่าเตรียมบ่อ = (ปริมาณปูนขาว X ราคา) + (ปริมาณปุ๋ย X ราคา)

ค่าพันธุ์ปลา = จำนวนปลากะพงขาว (ตัว) X ราคาพันธุ์ปลากะพงขาว (บาท) + จำนวนปลานิล (ตัว) X ราคาพันธุ์ปลานิล (บาท)

ค่าอาหารปลา = ปริมาณอาหารสำหรับปลาทะเล (กก.) X ราคาอาหารสำหรับปลาทะเล (บาท) + ปริมาณอาหารสำหรับปลาดุก (กก.) X ราคาอาหารสำหรับปลาดุก (บาท)

ผลตอบแทนคำนวณดังต่อไปนี้

กำไรสุทธิ = รายได้ทั้งหมด - ต้นทุนทั้งหมด

รายได้ = จำนวนผลผลิตปลากะพงขาวทั้งหมด (กก.) X ราคาปลากะพงขาวที่ขายได้ (บาท) + จำนวนผลผลิตปลานิลทั้งหมด (กก.) X ราคาปลานิลที่ขายได้ (บาท)

ผลตอบแทนต่อการลงทุน = (กำไรสุทธิ/ต้นทุนทั้งหมด) x 100

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้สถิติพรรณนา (descriptive statistic) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และร้อยละ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Least Significant Difference ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิจัย

การเจริญเติบโตและผลผลิตของปลากะพงขาว

จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวขนาดน้ำหนักเฉลี่ย $33.6 \pm 1.7 - 34.1 \pm 0.2$ กรัม ในบ่อดินน้ำจืด ขนาด 30 ตารางเมตร ด้วยระบบต่างกัน 3 ระบบ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ปลากะพงขาวที่เลี้ยงระบบต่างกันในระยะ 1 เดือนแรกมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) มีค่าระหว่าง $60.9 \pm 6.0 - 70.0 \pm 10.9$ กรัมต่อตัว แต่ตั้งแต่เดือนที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 6 พบว่าปลากะพงขาวที่เลี้ยงระบบต่างกันมีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน (Figure 1) ปลากะพงขาวที่เลี้ยงแบบเดี่ยว ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล มีผลผลิต

สูงที่สุด มีน้ำหนักเฉลี่ย 444.0 ± 16.6 กรัมต่อตัว น้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.28 ± 0.1 กรัมต่อวัน ผลผลิตรวมเฉลี่ย 10.19 ± 0.6 กิโลกรัมต่อบ่อ มีอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 1.42 ± 0.2 และมีอัตราการรอดสูงที่สุด $76.7 \pm 6.7\%$ รองลงมาคือปลากะพงขาวที่เลี้ยงร่วมกับปลานิล ให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุกให้อาหารทุกวัน มีน้ำหนักเฉลี่ย 357.5 ± 20.7 กรัมต่อตัว น้ำหนักเพิ่มขึ้น 1.80 ± 0.2 กรัมต่อวัน ผลผลิตรวมเฉลี่ย 6.30 ± 0.4 กิโลกรัมต่อบ่อ และมีอัตราการรอด $58.9 \pm 5.1\%$ ในขณะที่ปลากะพงขาวที่เลี้ยงร่วมกับปลานิล ให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุกให้อาหารวันเว้นวัน มีผลผลิตต่ำที่สุด มีน้ำหนักเฉลี่ย 237.3 ± 41.3 กรัมต่อตัว น้ำหนักเพิ่มขึ้น 1.13 ± 0.1 กรัมต่อวัน ผลผลิตรวมเฉลี่ย 3.22 ± 0.6 กิโลกรัมต่อบ่อ และมีอัตราการรอดเพียง $45.6 \pm 5.1\%$ (Table 2)

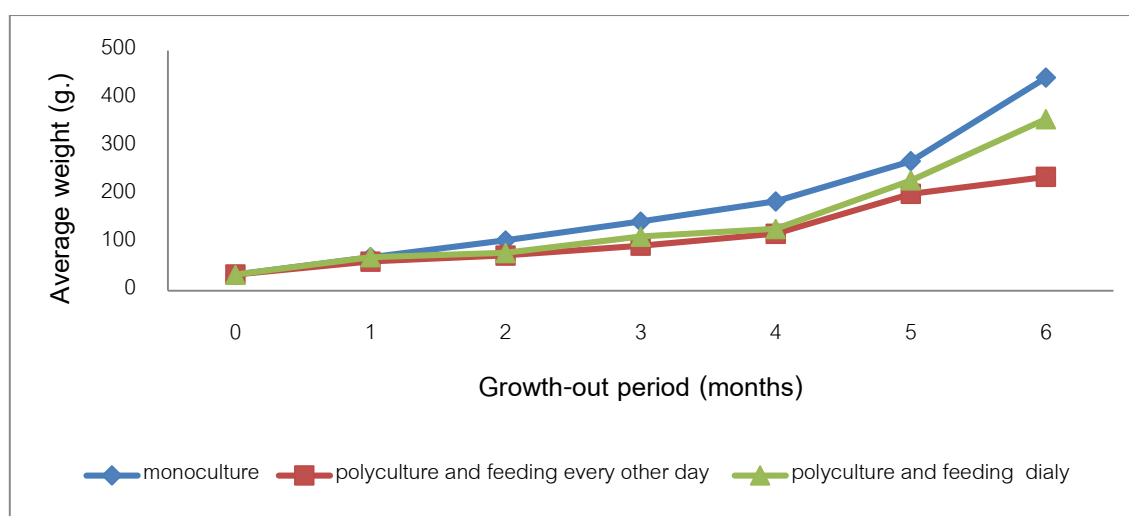


Figure 1 Growth trends of body weight for Asian Seabass during the growth-out period

Table 2 Growth and survival of Asian Seabass rearing in freshwater ponds with different systems

Treatment	Initial weight (g/fish)	Final weight (g/fish)	daily weight gain (g/day)	Total weight (kg/pond)	Survival rate (%)	FCR
T ₁	34.1±0.2 ^a	444.0±16.6 ^a	2.28±0.1 ^a	10.19±0.6 ^a	76.7±6.7 ^a	1.42±0.2
T ₂	33.8±1.3 ^a	237.3±41.3 ^c	1.13±0.2 ^c	3.22±0.5 ^c	45.6±5.1 ^c	-
T ₃	33.6±1.7 ^a	357.5±20.7 ^b	1.80±0.1 ^b	6.30±0.4 ^b	58.9±5.1 ^b	-

Data are presented as means $\pm$ SD and values in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

T₁ = Monoculture and feeding daily with marine fish feed; T₂ = Polyculture with Nile tilapia and feeding every other day with catfish feed; T₃ = Polyculture with Nile tilapia and feeding daily with catfish feed.

นอกจากนี้ยังพบว่า การเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยวให้ผลผลิตที่มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ (Figure 2A) ในขณะที่การเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลมีขนาดที่ค่อนข้างแตกต่างกัน (Figure 2B) โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดการทดลองที่ให้อาหารวันเว้นวัน (Figure 2C) แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลทั้งที่ให้อาหารวันเว้นวันและที่ให้อาหารทุกวัน ให้ผลผลิตปลานิลขนาด 187 – 328 กรัมต่อตัว (Figure 2D) เฉลี่ย 8.14 ± 1.1 และ 9.68 ± 3.0 กิโลกรัมต่อบ่อ ตามลำดับ (Table 3)

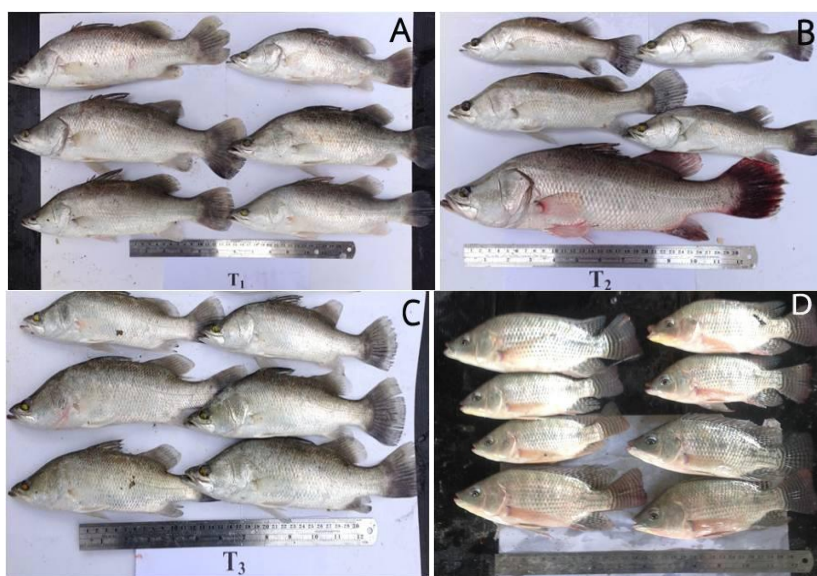


Figure 2 Size of harvested Asian Seabass (A-C) and Nile tilapia (D) at the end of growth-out period

ต้นทุนและผลตอบแทนการลงทุน

จากการศึกษาต้นทุนการผลิตและผลตอบแทนการลงทุนของการเลี้ยงปลากะพงขาวในบ่อดินน้ำจืด ด้วยระบบการเลี้ยงต่างกัน พบว่าต้นทุนการผลิตและกำไรสุทธิเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ การเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุก วันเว้นวัน มีต้นทุนการผลิต และกำไรสุทธิ เพียง $1,056.7 \pm 10.0$ และ 69.0 ± 26.3 บาทต่อบ่อ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยวด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล ที่ให้ทุกวัน และการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลและให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุก ทุกวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ $1,254.5 \pm 63.9$ บาท และ $1,234.3 \pm 61.3$ บาทต่อบ่อ ตามลำดับ และมีกำไรสุทธิ เท่ากับ 375.9 ± 29.9 และ 499.7 ± 113.9 บาทต่อบ่อ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่การเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุก ทุกวันมีผลตอบแทนการลงทุนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $40.48 \pm 7.13\%$ ในขณะที่การเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยวด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล ทุกวัน มีผลตอบแทนการลงทุนเพียง $29.96 \pm 0.9\%$ ส่วนการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลและให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุกวันเว้นวันมีผลตอบแทนการลงทุนเพียง $6.53 \pm 2.6\%$ (Table 3)

Table 3 Total input cost, income, net profit and investment return of Asian Seabass rearing in freshwater ponds with different systems

Parameters	Treatments		
	Monoculture	Polyculture and feeding every other day	Polyculture and feeding daily
Fixed cost (baht/pond)	137.5	137.5	137.5
Variable cost (baht/pond)			
Pond preparation cost (baht/pond)	5	6.60	6.60
Adult Nile tilapia cost (baht/pond)	-	240	240
Seabass seed cost (baht/pond)	375	375	375
Total feed (kg/pond)	13.40±1.2 ^b	10.63±0.4 ^b	16.97±2.2 ^a
Fish feed cost (baht/pond)	737.0±63.9 ^a	297.6±10.0 ^b	475.2±61.3 ^b
Variable cost total	1,117.0±63.9 ^a	919.2±10.0 ^b	1,096.8±61.3 ^a
Cost total	1,254.5±63.9 ^a	1,056.7±10.0 ^b	1,234.3±61.3 ^a
Yield of Seabass (kg/pond)	10.19±0.6 ^a	3.22±0.5 ^c	6.30±0.4 ^b
Yield of Nile tilapia (kg/pond)	-	8.14±1.1 ^a	9.68±3.0 ^a
Income from Seabass (baht/pond)	1,630.4±81.8 ^a	515.2±72.4 ^c	1008.0±59.1 ^b
Income from Tilapia (baht/pond)	-	610.5±87.7 ^a	726.0±225.4 ^a
Total income	1,630.4±93.6 ^a	1125.7±17.9 ^b	1734.0±175.1 ^a
Net profit (baht/pond)	375.9±29.9 ^a	69.0±26.3 ^b	499.7±113.9 ^a
Investment return (%)	29.96±0.9 ^c	6.53±2.6 ^b	40.48±7.13 ^a

Data are presented as means ± SD and values in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Note: 12.5 baht per Seabass juvenile, 10 baht per adult Tilapia, 55 baht per marine fish feed, 28 baht per catfish feed, 160 baht per kilogram Seabass, 75 baht per kilogram Tilapia

วิจารณ์ผล

จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาว ขนาด 33.6±1.7-34.1±0.2 กรัม หรือประมาณ 5 นิ้ว ในบ่อดิน น้ำจืดด้วยระบบต่างกันเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าเดือนแรกของการทดลอง ปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยระบบต่างกัน มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน แต่ตั้งแต่เดือนที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองพบว่าปลาแต่ละชุดการทดลองมีน้ำหนักที่แตกต่างกัน แสดงว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลให้อาหารวันเว้นวัน เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวในช่วงเดือนแรก ยืนยันกับเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่พบปริมาณปลานิลขนาดตัวโตเต็มวัย มากกว่าจำนวนที่ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อที่เลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลที่ให้อาหารทุกวัน แสดงว่าปลานิลดังกล่าวเป็นลูกปลาที่ปลากะพงขาวกินไม่หมดในช่วงเดือนแรก

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 6 เดือน พบว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยว ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล ให้ผลผลิตสูงที่สุดมีน้ำหนักเฉลี่ย 444.0 ± 16.5 กรัมต่อตัว มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.28 ± 0.1 กรัมต่อวัน มีอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเท่ากับ 1.42 ± 0.2 ซึ่งใกล้เคียงกับการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังที่กางในบ่อดินน้ำกร่อย ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล ที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 1.99 ± 0.16 กรัมต่อวัน อัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 1.30 ± 0.09 (Plaipetch *et al.*, 2008) นอกจากนี้ผลการศึกษาค้นคว้าพบว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยว ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล มีอัตราการรอดสูงถึง $76.7 \pm 6.7\%$ ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของ Hajirezaee *et al.* (2015) ที่ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวขนาด 31.4 ± 4.7 กรัม ในบ่อดิน บริเวณชายฝั่งทะเล ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาเทราต์ ที่มีอัตราการรอดเพียง 66% ผลการศึกษาค้นคว้านี้ชี้ให้เห็นว่าปลากะพงขาวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในบ่อดินน้ำจืด และการปล่อยปลาขนาด 5 นิ้ว ลงเลี้ยงในบ่อทำให้ปลาที่มีอัตราการรอดสูงขึ้น นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าปลากะพงขาวที่เลี้ยงแบบเดี่ยวมีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ แสดงว่าปลากะพงขาวได้รับอาหารอย่างเพียงพอ เนื่องจากการศึกษาค้นคว้านี้ให้ปลากินอาหารแบบกินจนอิ่ม อย่างไรก็ตามปลากะพงขาวที่เลี้ยงร่วมกับปลานิล ให้อาหารเม็ดสำหรับปลาทุกวันวันเว้นวัน มีอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณลูกปลานิลไม่เพียงพอ ประกอบกับอาหารเม็ดสำหรับปลาที่กินมีปริมาณโปรตีนเพียง 32% ซึ่งต่ำกว่าความต้องการของปลากะพงขาว ที่มีความต้องการโปรตีนสูงถึง 45 - 50% (Glencross, 2006) สอดคล้องกับที่พบปลาที่มีขนาดที่หลากหลาย และมีขนาดที่แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 120-541 กรัม คล้ายคลึงกับผลการศึกษาของ Monwar *et al.* (2013) ที่ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิล ในอัตรา 1:4, 1:5 และ 1:6 ในบ่อดินบริเวณชายฝั่ง และไม่ให้อาหาร พบว่าปลากะพงขาวมีขนาดที่หลากหลาย เนื่องมาจากปริมาณลูกปลานิลไม่เพียงพอสำหรับเป็นอาหารของปลากะพงขาว ส่วนชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับปลานิลและให้อาหารทุกวัน เหมือนกับปลากะพงขาวที่เลี้ยงแบบเดี่ยว แต่มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดน้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากปลากะพงขาวที่เลี้ยงแบบเดี่ยว ได้รับอาหารอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล มีโปรตีนสูงถึง 47.5 % ซึ่งตรงกับความต้องการของปลากะพงขาว จึงทำให้มีอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายสูงกว่า เนื่องจากคุณภาพของอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และการรอดตายของปลา (Wechakama *et al.*, 2012) อีกทั้งการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิล มีอัตราความหนาแน่น เท่ากับ 1.8 ตัวต่อตารางเมตร ซึ่งมีความมากกว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยว ที่มีอัตราความหนาแน่น เพียง 1 ตัวต่อตารางเมตร การเลี้ยงปลาในอัตราความหนาแน่นสูงเป็นการเพิ่มการแก่งแย่งอาหาร และแย่งพื้นที่ มีผลให้ปลา มีความเครียดเพิ่มขึ้น ใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้การเจริญเติบโตลดลง (Khatune-Jannat *et al.*, 2012) และมีขนาดที่แตกต่างกัน มีผลทำให้มีอัตราการรอดน้อยลง เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่กินเนื้อ หากปลาที่มีขนาดต่างกันหรือมีอาหารไม่เพียงพอ จะทำให้ปลาจะกินกันเอง (Singh *et al.*, 2001)

แต่เมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิตพบว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยว มีต้นทุนการผลิต เป็นค่าอาหารสูงถึง 58.75% ของต้นทุนทั้งหมด และมีผลตอบแทนการลงทุนเพียง 29.96% ดังนั้นการเลี้ยงปลากะพงขาว ในบ่อดิน ด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล ยังคงมีความเสี่ยงอยู่มาก เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงด้านต้นทุน และผลประโยชน์ของการลงทุน (Wechakama *et al.*, 2012) ในขณะที่การเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับ

ปลานิลและให้อาหารโปรตีน 32% ทุกวัน ซึ่งมีจุดประสงค์ให้ปลานิลกินอาหารดังกล่าวและให้ปลากะพงขาวกินลูกปลานิลเป็นอาหาร เพื่อลดต้นทุนค่าอาหาร พบว่ามีต้นทุนค่าอาหารเพียง 38.50% และมีผลตอบแทนการลงทุนสูงถึง 40.48% เนื่องจากมีลูกปลานิลเป็นอาหารของปลากะพงขาว อีกทั้งอาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 32% ราคาถูกกว่าอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล จึงทำให้ต้นทุนค่าอาหารลดลง มีผลตอบแทนการลงทุนที่สูงขึ้น แต่ถ้าเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล โปรตีน 47.5% ซึ่งสูงเกินความต้องการของปลานิล อีกทั้งอาหารดังกล่าวมีราคาแพงกว่าอาหารเม็ดโปรตีน 32% ถึงเท่าตัว ส่งผลให้ต้นทุนค่าอาหารสูงยิ่งขึ้น อาจไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน ถึงแม้ว่าอาจจะทำให้ปลากะพงขาวเจริญเติบโตดีและมีผลผลิตมากขึ้นก็ตาม

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิลด้วยอาหารเม็ด โปรตีน 32% ให้อาหารทุกวัน มีผลตอบแทนการลงทุนสูง แต่ได้ผลผลิตปลากะพงขาวน้อยกว่า การเลี้ยงปลากะพงขาวแบบเดี่ยวด้วยอาหารเม็ดสำหรับปลาทะเล และให้อาหารทุกวัน สำหรับแนวทางการเลี้ยงปลากะพงขาวร่วมกับปลานิล ควรให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลาทุก วันเว้นวันในช่วงเดือนแรก หลังจากนั้นควรให้อาหารทุกวัน และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาแนวทางการเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาวที่เลี้ยงร่วมกับปลานิลในช่วงหลังจากเดือนแรกจนถึงขนาดตลาด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี พ.ศ. 2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณ วั ฒ โสภาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- Aghuzbenia, S.H.H., Hajirezaee, S., Matinfar, A., Kharad, H. and Ghobadi, M. 2016. A preliminary study on polyculture of western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with mullet (*Mugil cephalus*): an assessment of water quality, growth parameters, feed intake efficiency and survival. Journal of Applied Animal Research. DOI: 10.1080/09712119.2016.1150845.
- Chunsiripong, C. 2010. An analysis of cost and return of Giant sea perch cage culture in Bang Pakong District, Chachoengsao Province. Journal of Humanities and Social Sciences 18 (29): 1-15. [in Thai].
- Glencross, B. 2006. The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer* - a review. Aquaculture Nutrition 12: 291-309.
- Hajirezaee, S., Ajdari, D., Matinfar, A., Aghuzbeni, S.H.H. and Rafiee, G.R. 2015. A preliminary study on marine culture of Asian sea bass, *Lates calcarifer* in the coastal earthen ponds of Gwadar region, Iran: an assessment of growth parameters, feed intake efficiency and survival rate. Journal of Applied Animal Research 43 (3): 309-313.

- Harpaza, S.T., Hakima. Y., Slosmana, T. and Eroldogana, O.T. 2005. Effects of adding salt to the diet of Asian seabass (*Lates calcarifer*) reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. *Aquaculture* 248: 315-324.
- Khatune-Jannat, M., Rahman, M.M., Bashar, M.A., Hasan, M.N., Ahamed, F. and Hossain, Y. 2012. Effects of stocking density on survival, growth and production of Thai Climbing Perch (*Anabas testudineus*) under fed ponds. *Sains Malaysiana* 41: 1205-1210.
- Lohalaksanadech, D., Phramchuaaim, K., Phinrub, W. and Machoo, N. 2009. Comparative studies on the monoculture and polyculture of seabass (*Lates Calcarifer*) for price risk reducing of fisherman group ,Thombol Bohin, Amphur Sikao, Trang Province. *In* Proceeding of the 19th Thaksin University Annual Conference, 24 – 25 September, 2009. p. 1-10. [in Thai].
- Monwar, M. M., Sarker, R.A. and Das, N.G. 2013. Polyculture of seabass with tilapia for the utilization of brown fields in the coastal areas of Cox's Bazar, Bangladesh. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 5(6): 104-109.
- Plaipetch, P., Jitrhlang, I., Tamtin, M., Chaikul , S.L., Kuekaew, J., Muengyao, P., Samranrat, N. and Thongrod, S. 2008. Growth Performance and Flesh Quality of Seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) Fed with Trash Fish and Pellets. *In* Proceeding of the 46th Kasetsart University Annual Conference, 29 January – 1 February, 2008. p.156-166. [in Thai].
- Shapawi,R. and Zamry, A.A. 2016. Response of Asian seabass, *Lates calcarifer* juvenile fed with different seaweed-based diets. *Journal of Applied Animal Research* 44(1): 121-125.
- Singh, R.K., Shingare, P.E., Chavan, J.B., Siddiqui, S.Q. and Belsare, S.G. 2001. Effect of *Lates calcarifer* seed stocking on the survival and production of Indian major carps reared in a fresh water coastal pond in Konkan region. *Journal of the Indian Fisheries Association* 28: 73-78.
- Tesorero, L.B. 1995. Effects of different seabass-tilapia ratios on fish yield and the efficiency of seabass as biological control of tilapia young in polyculture. *International Information System for the Agricultural Sciences and Technology (AGRIS)*. UP Research Digest. 2(1):376.
- Wechakama, T., Oniam, V., Arkronrat, W and Orachuno, R. 2012. Cost-benefit analysis of seabass culture: case study of seabass culture in Prachuap Khiri Khan Province. *Journal of Fisheries Technology Research* 6(1): 103-114. [in Thai].

ผลของการใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองในกบนา (*Rana rugulosa*)

Effect of using probiotic soybean kefir on common lowland frog (*Rana rugulosa*)

วาริรัตน์ แสนมานิช และเกศินี จันทรสโณ

Wareerat Sanmanoch and Kasinee Chantharasophon

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani, 34000

* Corresponding author: 045-352000, FAX 045-352070, E-mail: wareerat.s@ubru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษามผลของการใช้โพรไบโอติกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ในกบนา (*Rana rugulosa*) พบว่า การใช้คีเฟอร์เสริมในกบระยะลูกอ๊อดจนถึงระยะตัวเต็มวัยขนาดเล็กลงเป็นเวลา 60 วัน กลุ่ม T1 (Control) T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 10) และ T3 (คีเฟอร์ร้อยละ 20) มีอัตราการรอดคิดเป็นร้อยละ 64 ± 1.45 , 67 ± 2.40 และ 71 ± 1.76 ตามลำดับ ค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแบบผิดปกติวัดได้ร้อยละ 8.9 ± 6.78 , 0.66 ± 1.96 และ 6.17 ± 4.81 ตามลำดับ อัตราการรอดของกบหลังทดสอบการต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* มีค่าเป็นร้อยละ 50 ± 6.67 , 40 ± 8.82 และ 70 ± 5.77 ตามลำดับ เมื่อใช้คีเฟอร์เสริมในกบอายุ 6 เดือนเป็นเวลา 60 วัน พบว่า กลุ่ม T1 (Control) และกลุ่ม T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 7.5) มีอัตราการรอดร้อยละ 100 ± 0.0 ทั้งสองกลุ่ม อัตราการเจริญของกลุ่ม T1 กบเพศเมียและเพศผู้วัดได้ 1.46 ± 0.09 และ 0.88 ± 0.02 กรัมต่อวัน กลุ่ม T2 กบเพศเมียและเพศผู้เป็น 1.92 ± 0.10 และ 1.14 ± 0.05 กรัมต่อวัน ตามลำดับ ค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแบบผิดปกติของกลุ่ม T1 และ T2 วัดได้ร้อยละ 0.55 ± 0.11 และ 0.60 ± 0.07 ตามลำดับ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกบด้วยวิธี Microtiter plate agglutination technique พบว่า กลุ่ม T2 มีระดับแอนติบอดีไคเตอร์เท่ากับ 4 ในขณะที่กลุ่ม T1 ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ทุกระดับความเจือจางของซีรัม ดังนั้นการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองร้อยละ 20 เป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกสามารถเพิ่มอัตราการรอดในกบนาในระยะลูกอ๊อดและที่คีเฟอร์นมถั่วเหลืองร้อยละ 7.5 ส่งเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกบนาในระยะตัวเต็มวัย

คำสำคัญ: โพรไบโอติก คีเฟอร์นมถั่วเหลือง โรคที่เกิดในกบ อาหารเสริม

Abstract

The effect of soy milk kefir as probiotic supplemented on growth promoting and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* of frog (*Rana rugulosa*) was studied. The result found that tadpole stage to frog stage of rearing with kefir supplemented for 60 days, revealed survival rate of each treated groups, T1 (Control), T2 (10% kefir), and T3 (20% kefir) were 64 ± 1.45 , 67 ± 2.40 and $71 \pm 1.76\%$, respectively. Micronucleus and nuclear abnormalities were 8.9 ± 6.78 , 0.66 ± 1.96 and $6.17 \pm 4.81\%$, respectively. After challenge test with *A. hydrophila*, survival rate were 50 ± 6.67 ,

40±8.82 and 70±5.77%, respectively. The use of kefir as feed supplementation in 6 months frog was performed and it was found that survival rate of each treated groups, T1 (Control), and T2 (7.5% kefir) were 100±0.0% of both groups, survival rate in female and male frog of T1 and T2 were 1.46±0.09 and 0.88±0.02, and 1.92±0.10 and 1.14±0.05 g/d, respectively. Micronucleus and nuclear abnormalities were 0.55±0.11, and 0.60±0.07%, respectively. Immune response as antibody titers by Microtiter plate agglutination technique at days 3 post-challenged of T2 was 4.00±0.0 while there was no agglutination reaction in every dilution of control group serum. In conclusion, the probiotics in soy milk kefir at 20% concentration that increasing survival rate of tadpole and soy milk kefir at 7.5% concentration stimulate immune response of mature common lowland frog.

Key words: Probiotic, Soybean Kefir, Frog diseases, Feed supplement

บทนำ

กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่นิยมบริโภคเป็นอาหารทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่การจับกบในแหล่งธรรมชาติมีข้อจำกัด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่ทำให้แหล่งที่อยู่อาศัยเล็กลงตามธรรมชาติของกบลดลง ปริมาณกบในธรรมชาติจึงไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงกบแบบสัตว์เศรษฐกิจทั้งเพื่อจำหน่ายและบริโภคเองในครัวเรือนของเกษตรกร ทำให้แนวโน้มการเลี้ยงกบในลักษณะนี้มีการขยายตัวมากขึ้น สายพันธุ์กบที่เหมาะสมนำมาเพาะเลี้ยงในลักษณะนี้ได้แก่ กบนาซึ่งเป็นกบพื้นเมือง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rana rugulosa* เป็นกบที่มีการเจริญเติบโตเร็ว และนิยมนำไปประกอบอาหารบริโภคกันมากกว่ากบสายพันธุ์อื่น (Imsilp *et al.*, 2010) ในการเพาะเลี้ยงกบนั้นเกษตรกรมักประสบปัญหาด้านการดูแลรักษาสถานที่เพาะเลี้ยง การถ่ายเทแหล่งน้ำไม่ให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค การติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนใหญ่โรคที่พบได้บ่อยในกบเลี้ยง คือ โรคขาแดงที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อกลุ่ม *Aeromonas* อาการของกบที่ป่วยนั้นจะมีผิวหนังบริเวณท้องและหน้าขา ตกเลือดเป็นผื่นสีชมพูถึงแดงเข้ม บางตัวท้องบวมและมีน้ำเหลืองปนเลือดในช่องท้อง (Somsiri *et al.*, 1998; Boontha *et al.*, 2012) ซึ่งการรักษาโรคที่ติดเชื้อในกบส่วนใหญ่รักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างในตัวกบและอาจมีผลกระทบต่อผู้บริโภคต่อไป

การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในการเพาะเลี้ยงกบโดยใช้จุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคเป็นรูปแบบหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ในการทดแทนสารปฏิชีวนะ เรียกว่าชีววิธี (Biocontrol) ซึ่งเป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิตกลุ่มโพรไบโอติกในการควบคุมการติดเชื้อโรคระบาดจากแบคทีเรียในกบได้ ทั้งนี้การใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์ช่วยควบคุมและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เพิ่มความต้านทานโรค ความแข็งแรง การเจริญเติบโต และผลผลิตของสัตว์ นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์ได้ด้วย งานวิจัยของ Patel *et al.* (2015) ได้ศึกษาการใช้โพรไบโอติกที่ใช้

เสริมในอาหารสัตว์ต่อการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง และรายงานว่โปรไบโอติกมีส่วนช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับระบบเยื่อเมือกทางเดินหายใจของสัตว์ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดได้นอกจากนี้ Chantharasophon and Prawottana (2014) มีการศึกษาการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเพาะเลี้ยงปลา นิลที่เติมเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคคือ *A. hydrophila* พบว่าปลานิลมีอัตราการรอดในสภาวะที่มีเชื้อ และช่วยให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเป็น 1.09 กรัมต่อตัวต่อวัน ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติกคีเฟอร์นมถั่วเหลืองในกบสายพันธุ์ กบนา ซึ่งเป็นทางเลือกในการให้อาหารเสริม เพิ่มน้ำหนักตัว ตลอดจนสามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ลดความรุนแรงของโรคที่อาจติดต่อยาปฏิชีวนะเหล่านั้นในการกำจัดโรคของกบได้ อีกทั้งยังลดความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมีปนเปื้อนและตกค้างของทั้งผู้บริโภคและเกษตรกร

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สถานที่ทดลองเพาะเลี้ยงกบและเก็บตัวอย่างลูกอ๊อด

Site I สถานที่ทดลองเพาะเลี้ยงกบนา (*Rana rugulosa*) โตเต็มวัยและเก็บตัวอย่างลูกอ๊อด จากฟาร์ม นางสาวทองใบ มูลสิน บ้านเลขที่ 72 หมู่ 4 บ้านกระโสม อำเภอมะนัง จังหวัดอุบลราชธานี

Site II สถานที่ทดลองเพาะเลี้ยงลูกอ๊อดของกบนา (*Rana rugulosa*) ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี อำเภอมะนัง จังหวัดอุบลราชธานี

2. การเตรียมโปรไบโอติกคีเฟอร์

การผลิตคีเฟอร์นมถั่วเหลือง นำกล้าเชื้อคีเฟอร์นมถั่วเหลือง ซึ่งเป็นเชื้อผสมในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี มาเพาะเลี้ยงในอาหารนมถั่วเหลืองยูเอชทีรส Original classic จากบริษัทแลกตาซอย จำกัด โดยเติมกล้าเชื้อคีเฟอร์นมถั่วเหลืองน้ำหนัก 30 กรัม ลงไปในนมถั่วเหลืองยูเอชที 300 มิลลิลิตรแบบกึ่งปลอดเชื้อ ป่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Chantharasophon and Prawottana, 2014) ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dilution plate count ในอาหาร MRS แบบมีและไม่มี ออกาส กรอบคีเฟอร์โดยการแช่แข็งที่ -18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 และ 60 วัน และตรวจนับจุลินทรีย์ เช่นเดียวกัน

3. การเพาะเลี้ยงกบในระยะลูกอ๊อดโดยใช้โปรไบโอติกคีเฟอร์

3.1 การเตรียมสถานที่ เลี้ยงลูกอ๊อดในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ถังพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร น้ำเลี้ยงใช้น้ำประปาที่ระเหยคลอรีนแล้ว 4 ลิตรต่อถัง ทำความสะอาดถังและเปลี่ยนน้ำทุกวัน ส่วนด้านบนปากถังใช้ตาข่ายสีฟ้าคลุมป้องกันไม่ให้สัตว์อื่นรบกวนตลอดการทดลอง

3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง นำลูกอ๊อด อายุ 2 สัปดาห์ จากฟาร์ม (Site I) จำนวน 500 ตัว มาพักปรับสภาพ ในถังทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยความหนาแน่น 50 ตัวต่อถัง ปรับสภาพให้คุ้นเคยกับอาหารและสถานที่

3.3 การจัดการด้านอาหาร อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเม็ดสำหรับปลาอุกชนิดเม็ดลอยน้ำ ซึ่งแต่ละช่วงการเจริญของกบจะใช้อาหารขนาดแตกต่างกัน โดยลูกอ๊อดใช้อาหารปลาอุกเล็ก เบอร์ 9920 (ยี่ห้อฟิชเฟรช) เพื่อให้เหมาะต่อการกินอาหารของลูกอ๊อด โดยมีระดับโปรตีนในอาหารทดลองประมาณร้อยละ 30 ให้อาหารร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 1 ครั้งต่อวัน เลี้ยงให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน

3.4 การใช้โฟรไบโอติกคือเฟอร์เลี้ยงกบระยะลูกอ๊อด

แบ่งกลุ่มลูกอ๊อดออกเป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 50 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ดังนี้

กลุ่ม T1 ให้อาหารกบปกติ (Control)

กลุ่ม T2 ให้อาหารปกติ + คีเฟอร์ 100 g/1 kg Feed (ร้อยละ 10)

กลุ่ม T3 ให้อาหารปกติ + คีเฟอร์ 200 g/1 kg Feed (ร้อยละ 20) เมื่อครบ 60 วันตรวจวัดดังนี้

1) อัตราการรอดชีวิตของกบเล็ก (Survival rate; %)

Survival rate = (จำนวนกบที่เหลือรอดในแต่ละซ้ำ (ตัว) / จำนวนกบที่ใช้ทดลองในแต่ละซ้ำ (ตัว) × 100

2) การตรวจสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแบบอมัลลิติในเม็ดเลือดแดง โดยสุ่มกบจากกลุ่มการทดลองละ 10 ตัว (ดัดแปลงจาก Chantharasophon *et al.*, 2014 credited in Ali *et al.*, 2008)

เจาะเลือดกบเพื่อนำเลือดไปตรวจหาลักษณะของนิวเคลียสที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการย้อมเลือดแดงด้วยสี Wright-Giemsa stain ตรวจหาเม็ดเลือดแดงจำนวน 2,000 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x และคำนวณเป็นร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่เกิดไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแบบอมัลลิติ

3) การตรวจสอบความต้านทานโรคติดเชื้อ (Challenge test) ต่อเชื้อ *A. hydrophila* มีขั้นตอนดังนี้

สุ่มกบเล็กที่มีน้ำหนักประมาณ 60±5 กรัม กลุ่มการทดลองละ 10 ตัว และปรับความเข้มข้นของเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ให้เป็น 4.58×10^9 CFU/mL (กบตายมากกว่าร้อยละ 50) ฉีดเชื้อแบบ Intraperitoneal ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เลี้ยงกบเล็กต่ออีก 3 วัน เพื่อดูอัตราการรอดชีวิต เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophila* ปริมาณสูง ทำให้ใช้ระยะเวลาการติดตามผลสั้นลง ในช่วงเวลา 3-7 วัน

4. การเพาะเลี้ยงกบตัวเต็มวัยโดยใช้โฟรไบโอติกคือเฟอร์

4.1 สถานที่เลี้ยงกบ (Site I) การเตรียมอุปกรณ์ จัดเตรียมคอกดินขนาดกว้าง 80 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร น้ำเลี้ยงใช้น้ำประปาโดยเปลี่ยนน้ำร้อยละ 70 ทุกวัน ส่วนด้านข้างบ่อใช้ตาข่ายสีฟ้าสูง 1 เมตร ควบคุมการเจริญของกบภายใต้สภาวะแบบเปิดตามธรรมชาติ

4.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง กบตัวเต็มวัย คละเพศ อายุ 6 เดือน น้ำหนัก 80-100 กรัมต่อตัว โดยมีความหนาแน่นที่ 35 ตัวต่อบ่อ

4.3 การจัดการด้านอาหาร อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเม็ดสำหรับปลาอุก ชนิดเม็ดลอยน้ำ (เบอร์ 9921 และ 9922 ยี่ห้อฟิชเฟรช) เพื่อให้เหมาะต่อการกินอาหารของกบวัยนี้ โดยมีระดับโปรตีนในอาหารทดลองประมาณร้อยละ 25 ให้อาหารร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 2 ครั้งต่อวัน โดยปรับปริมาณอาหารที่ให้ทุกๆ 14 วัน ในแต่ละบ่อของแต่ละกลุ่มการทดลอง และทำความสะอาดเปลี่ยนน้ำเลี้ยงทุกวันตอนเย็น

4.4 การใช้โพรไบโอติกคือเฟอร์เลี้ยงกบ แบ่งกลุ่มกบออกเป็น 2 ชุดการทดลองๆ ละ 2 ซ้ำๆ ละ 35 ตัว เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ดังนี้ กลุ่ม T1 ให้อาหารปกติ (Control)

กลุ่ม T2 ให้อาหารปกติ + คีเฟอร์ร้อยละ 7.5 การใช้ปริมาณของคีเฟอร์ในอาหารเม็ด ลอยสำหรับกบใหญ่มีข้อจำกัด จากการทดลองนี้ถ้าใช้ปริมาณคีเฟอร์มากเกินไปร้อยละ 7.5 ทำให้อาหารกบและไม่สามารถลอยน้ำได้ ซึ่งกบจะกินเฉพาะอาหารที่ลอยบนผิวน้ำ เมื่อครบ 60 วันตรวจวัดดังนี้

1) อัตราการเจริญ และอัตราการรอดชีวิตของกบ โดยอัตราการเจริญเติบโตต่อวันมีหน่วยเป็นกรัมต่อวัน (Average daily growth; ADG; gram/days; g/d)

2) ร้อยละของค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแบนบนอมัลลิติในเม็ดเลือดแดง

3) ตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ (Kituncharoen, 2006; Mohanty *et al.*, 2007)

การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรัมของกบ โดยวิธี Microtiter plate agglutination technique เป็นการวัดระดับการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มเป็นแผ่นระหว่างแอนติเจน (*A. hydrophila*) กับแอนติบอดีในซีรัมของกบที่ทดลอง โดยการนำซีรัมมาเจือจางแบบ Twofold dilution ใน 96 Wells microtiter plate ซึ่งค่าแอนติบอดีไตเตอร์อ่านจากส่วนกลับของระดับความเจือจางสุดท้ายของซีรัมใน Microtiter plate ที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา (Minimal positive agglutinin)

ผลและวิจารณ์ผล

1. ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ของคีเฟอร์นมถั่วเหลือง

ผลการตรวจจำนวนจุลินทรีย์ในคีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่หมักอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และแช่แข็งเก็บรักษาไว้นาน 30 และ 60 วัน พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศเป็น $6.12 \pm 2.18 \times 10^5$, $3.61 \pm 1.47 \times 10^6$ และ $3.27 \pm 1.54 \times 10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่ให้อากาศมีจำนวนจุลินทรีย์เป็น $5.90 \pm 1.96 \times 10^5$, $2.34 \pm 0.73 \times 10^6$ และ $1.80 \pm 0.52 \times 10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al.* (2005) ที่ตรวจนับจุลินทรีย์ในคีเฟอร์แกนหมักนมแพะที่อุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส พบว่ามีจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 CFU เช่นเดียวกับ Chantharasophon and Mutthikul (2013) ที่พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในคีเฟอร์นมถั่วเหลืองที่หมักในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศอยู่ที่ 10^6 - 10^7 CFU/g คีเฟอร์มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในระดับ 10^5 - 10^8 CFU/ml จะเห็นได้ว่าผลการเก็บรักษาคีเฟอร์แบบแช่แข็งทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือรอดน้อยลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการแช่แข็งแบบ Slow freezing จะทำให้เกิดส่วนของน้ำทั้งภายในและภายนอกเซลล์เปลี่ยนเป็นเกล็ดน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งเมื่อทำการละลาย (Thawing) จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกทำลายไปด้วยส่วนหนึ่ง จึงทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาด้วย

2. ผลของการใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองต่อกบในระยะลูกอ๊อด

เมื่อเลี้ยงลูกอ๊อดเป็นเวลา 60 วัน ลูกอ๊อดเริ่มมีการเจริญงอกขาหลังและพัฒนาไปเป็นลูกกบ ในแต่ละชุดการทดลองมีระยะการเจริญที่เท่าๆ กัน อย่างไรก็ตามในช่วงการหดหางสั้นเพื่อพัฒนาเป็นลูกกบ การพัฒนารูปร่างในระยะนี้เป็นช่วงที่ลูกอ๊อดอ่อนแอมาก ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยพบว่า กบเล็กกลุ่ม T1 (Control) กลุ่ม T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 10) และกลุ่ม T3 (20% คีเฟอร์) มีอัตราการรอดชีวิตเป็นร้อยละ 64 ± 1.45 , 67 ± 2.40 และ 71 ± 1.76 ตามลำดับ (Table 1) จากผลการศึกษาที่พบว่า การเจริญเติบโตของลูกกบทั้ง 3 กลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกัน สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าอาจเนื่องมาจาก ระยะของการเจริญที่มีการเปลี่ยนผ่านรูปร่างของลูกอ๊อดเป็นกบนั้นเป็นระยะที่ไม่อาจนำมาคำนวณในเรื่องของอัตราการเจริญได้ แต่ควรศึกษาในเรื่องของการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่างหรือเปลี่ยนเพศของการเจริญมากกว่า ดังที่พบจากรายงานการทดลองของ Kaewtapee *et al.* (2011) ที่ศึกษาการกระตุ้นการเจริญเติบโตของลูกอ๊อดกบนาด้วยกวาวเครือขาวและกวาวเครือแดง และพบว่ากวาวเครือขาวและกวาวเครือแดงผสมในอาหารให้ผลการพัฒนาของลูกอ๊อดไปเป็นกบนาดีกว่ากลุ่มควบคุม

Table 1 Survival rate, Micronucleus and Nuclear abnormalities in red blood cells of tadpoles were feeding with probiotic kefir after 60 days and survival rate after challenge test

Treatment*	T1	T2	T3
Survival Rate (%); after 60 days of feeding	64 ± 1.45^a	67 ± 2.40^a	71 ± 1.76^a
Micronucleus & Nuclear abnormalities (%) ; after 60 days of feeding	8.9 ± 6.78^a	0.66 ± 1.96^b	6.17 ± 4.81^a
Survival Rate (%); after 3 days of challenged	50 ± 6.67^b	40 ± 8.82^b	70 ± 5.77^a

^{abc} Mean($\pm$ SD) in the same row with a different superscript letter are significantly different ($P < 0.05$)

*T1 = Control groups

T2 = 10% kefir supplemented groups

T3 = 20% kefir supplemented groups

ค่าไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแอนอมัลลิตีในเม็ดเลือดแดงของกบเล็ก ซึ่งค่าที่ได้จะบ่งชี้ความเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของอาหารเสริมต่อสัตว์ทดลอง ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม T1 มีค่าเป็นร้อยละ 8.9 ± 6.78 กลุ่ม T2 วัดได้ร้อยละ 0.66 ± 1.96 และกลุ่ม T3 วัดได้ร้อยละ 6.17 ± 4.81 ตามลำดับ (Table 1) จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมในกบนาระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบเล็กนั้น ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมกบ เนื่องจากพบว่าไมโครนิวเคลียสของกลุ่มการทดลองที่ได้รับคีเฟอร์ มีค่าจำนวนของไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแอนอมัลลิตีที่ให้ผลต่ำกว่าในกลุ่ม T2 และให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม T3 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (T1) การศึกษารั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chantharasophon *et al.*, (2017) ที่รายงานว่า การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโปรไบโอติกในปลาชนิด ไม่มีผล

เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมในเม็ดเลือดแดงของปลานิลที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่า คีเฟอร์ไม่เป็นพิษต่อกบในระยะลูกขี้ออดเปลี่ยนผ่านเป็นกบเล็กเช่นเดียวกับที่มีรายงานการศึกษาในปลานิล

ความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophilla* เพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานโรค ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ 2 เท่าของปริมาณเซลล์เริ่มต้นจำนวน 2.28×10^9 CFU/ml ทำให้กบแสดงอาการของโรคติดเชื้อ *A. hydrophilla* คือ ท้องบวม มีรอยจำแดงบริเวณท้องและขา และเมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของลูกกบหลังการทดสอบความต้านทานโรค เป็นเวลา 3 วัน พบว่า กลุ่ม T1 (Control) มีค่าเป็นร้อยละ 50 ± 6.67 กลุ่ม T2 (คีเฟอร์ร้อยละ 10) วัดได้ร้อยละ 40 ± 8.82 และกลุ่ม T3 (20% คีเฟอร์) วัดได้ร้อยละ 70 ± 5.77 ตามลำดับ (Table 1) จากผลการทดลองพบว่ากบเล็กที่ได้รับคีเฟอร์ร้อยละ 20 มีอัตราการรอดชีวิต สูงกว่าทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองนี้คาดว่าสารสำคัญที่มีอยู่ในคีเฟอร์และส่งผลต่ออัตราการรอดของกบเล็กนี้อาจเกิดเนื่องจากสารคีเพอแรน ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในคีเฟอร์ โดยจากรายงานของ Medrano *et al.* (2008) ที่ได้ศึกษาผลของคีเพอแรนต่อการยับยั้งการติดเชื้อ *Bacillus cereus* ในเซลล์มนุษย์แบบหลอดทดลอง คือ Caco-2 cell line และ Human erythrocytes พบว่าการใช้คีเพอแรนที่ระดับความเข้มข้น 300-1,000 mg/L สามารถยับยั้งการทำลายเซลล์ทั้งสองแบบของเชื้อดังกล่าวได้ จากผลการทดสอบความต้านทานโรคในการศึกษาครั้งนี้ สามารถกล่าวได้ว่า การใช้คีเฟอร์เป็นอาหารเสริมนั้นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านโรคของลูกขี้ออดจนถึงระยะตัวเต็มวัยได้สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าการใช้คีเฟอร์เป็นโปรไบโอติกในลูกขี้ออดกบน่าจะเป็นทางเลือกสำหรับใช้ลดการติดเชื้อก่อโรคของกบระยะนี้ได้

3. ผลของโปรไบโอติกคีเฟอร์ต่อกบในระยะตัวเต็มวัย

กบในระยะตัวเต็มวัย อายุ 6 เดือน เลี้ยงในบ่อดิน โดยแบ่งกบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม T1 ให้อาหารกบปกติ (Control) และกลุ่ม T2 ให้อาหารปกติเสริมคีเฟอร์ร้อยละ 7.5 เมื่อครบ 60 วัน พบว่า กบในระยะตัวเต็มวัยทั้งสองกลุ่มมีอัตราการรอดเท่ากัน วัดได้ร้อยละ 100 ± 0.0 ส่วนอัตราการเจริญของกบ พบว่ากบกลุ่ม T2 ที่ให้อาหารผสมกับคีเฟอร์ มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน (ADG) สูงกว่ากบกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยกบตัวเมียของกลุ่ม T2 มีอัตราการเจริญเป็น 1.92 ± 0.10 กรัมต่อวัน และกบตัวผู้เป็น 1.14 ± 0.05 กรัมต่อวัน สำหรับกลุ่ม T1 กบตัวเมียมีอัตราการเจริญเป็น 1.46 ± 0.09 กรัมต่อวัน กบตัวผู้วัดได้ 0.88 ± 0.02 กรัมต่อวัน (Table 2) ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่า คีเฟอร์สามารถส่งเสริมการเจริญต่อกบนาในระยะตัวเต็มวัยได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chantharasophon *et al.* (2017) ที่รายงานว่า การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นโปรไบโอติกในปลานิลช่วยให้ปลานิลมีอัตราการเจริญสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือสามารถใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมช่วยกระตุ้นการเจริญของกบนาตัวเต็มวัยที่ศึกษาได้ ในทำนองเดียวกันงานวิจัยของ Promnuan *et al.* (2015) ได้รายงานว่า โปรไบโอติกสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาตะป๋มได้ดี แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นกับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายด้วย

ผลการตรวจนับจำนวนไมโครนิวเคลียสและนิวเคลียสแอนโนมัลลิตีในเม็ดเลือดแดงของกบในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า มีผลที่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใน T1 และกลุ่ม T2 วัดได้ร้อยละ 0.55 ± 0.11 และ 0.60 ± 0.07 ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งเป็นผลที่ยืนยันให้เห็นว่า คีเฟอร์ไม่เป็นพิษต่อกบนาทั้งในระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบเล็กและระยะตัวเต็มวัย

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกบตรวจวัดโดยใช้วิธีวิเคราะห์ค่าแอนติบอดีไตเตอร์จากซีรัมของกบแบบ Microtiter plate agglutination technique พบว่า กบที่ให้อาหารผสมกับคีเฟอร์ (T2) มีระดับการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มที่ระดับความเจือจางสุดท้ายของซีรัม เท่ากับ 1: 4 หรือในซีรัมมีแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 4 (Table 2) ในขณะที่กบที่ให้อาหารปกติ (กลุ่มที่ 1) ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ทุกระดับความเจือจางของซีรัม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก คีเฟอร์ที่ใช้เสริมในอาหารมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันต้านทานร่างกายกบตัวเต็มวัยที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ โดยถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารแอนติบอดีออกมา ในขณะที่กบกลุ่มควบคุมไม่มีการหลั่งสารแอนติบอดีออกมา จากผลที่เกิดขึ้นเช่นนี้จะทำให้กบที่ได้รับคีเฟอร์เป็นอาหารเสริม มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคได้ดี ดังจะเห็นผลได้ในการทดลองการทดสอบความต้านทานโรคของกบในระยะลูกอ๊อดเปลี่ยนผ่านเป็นกบระยะตัวเต็มวัยขนาดเล็กที่มีอัตราการรอดหลังจากการทดสอบความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุม

Table 2 Survival Rate, Average daily growth, Micronucleus & Nuclear abnormalities in red blood cells and Antibody titer of mature frog groups treated with probiotic kefir for 60 days

Treatment*	T1	T2
Survival Rate (%); after 60 days of feeding	100 ± 0.0^a	100 ± 0.0^a
ADG of male (g/d)	0.88 ± 0.02^a	1.14 ± 0.05^b
ADG of female (g/d)	1.46 ± 0.09^a	1.92 ± 0.10^b
Micronucleus & Nuclear abnormalities (%)	7.48 ± 0.59^a	8.18 ± 2.47^a
Antibody titer; after 60 days of feeding	0.0	4.0 ± 0.0

^{abc} Mean($\pm$ SD) in the same row with a different superscript letter are significantly different ($P < 0.05$)

*T1 = Control groups

T2 = 7.5% kefir supplemented groups

สรุปผล

การใช้คีเฟอร์นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมในกบระยะลูกอ๊อด ในปริมาณของอาหารเสริมคีเฟอร์ร้อยละ 10 และ 20 เทียบกับการให้อาหารปกติ ระยะเวลาการทดลอง 60 วัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตในชุดการทดลองให้อาหารเสริมคีเฟอร์ร้อยละ 20 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 71 ± 1.76 ซึ่งการให้อาหารเสริมคีเฟอร์นมถั่วเหลืองไม่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ต่อกบนา และยังส่งเสริมความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ของ

ลูกกบได้ ในทำนองเดียวกันผลของไฟโรไบโอติกคือเฟอร์ตอกบในระยะตัวเต็มวัย อายุ 6 เดือน เลี้ยงในบ่อดินโดยแบ่งกบออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มให้อาหารกบปกติ และกลุ่มให้อาหารปกติผสมคีเฟอร์ร้อยละ 7.5 เมื่อครบ 60 วัน พบว่า กบมีอัตราการรอดชีวิตในระยะตัวเต็มวัยทั้งสองกลุ่มการทดลองโดยวัดได้ร้อยละ 100 ± 0.0 อีกทั้งส่งเสริมการเจริญของกบในระยะตัวเต็มวัย โดยกบกลุ่มที่ให้อาหารผสมกับคีเฟอร์ มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงกว่ากบกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคีเฟอร์นมถั่วเหลืองสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมจะมีปริมาณของจุลินทรีย์มีชีวิตในคีเฟอร์ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย สำหรับคณาจารย์และบุคลากรจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

- Boontha, T., Chitmanat, C., and Promya, J. 2012. Effects of *Spirulina platensis*, *Cladophora* sp. and *Allium sativum* supplementary diets on growth performance, reproductive maturity, and phagocytic activity in common lowland frog (*Rana rugulosa*). Journal of Fisheries Technology Research. 6(1): 23-35. [in Thai]
- Chantharasophon, K., Prawottana, S., and Chantharasophon, S. 2017. The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 and soy as probiotics in Nile tilapia. Journal of Fisheries Technology Research. 11(1): (inpress) [in Thai]
- Chantharasophon, K. and Mutthikul, R. 2013. The immobilization of microorganisms by carrageenan and resistant starch to produce soy milk kefir. Journal of Research and Development Buriram Rajabhat University. 12(2): 74-88. [in Thai]
- Chantharasophon, K. and Prawottana, S. 2014. Effects of *Bacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and immune responses. Journal of Fisheries Technology Research. 8(2) : 31-41. [in Thai]
- Chen, M.J., Liu, J.R., Lin, C.W., and Yeh, Y.T. 2005. Study of the microbial and chemical properties of goat milk kefir produced by inoculation with taiwanese kefir grains. Asian-Aust. Journal of Animal Science. 18(5): 711-715.
- Imsilp, U., Somsueb, P., and Imsilp, M. 2010. Replacing fish meal with soybean meal in common lowland frog, *Rana rugulosa* (Wiegmann) feed. Technical paper of Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 25(1): 16 p. [in Thai]

- Kaewtapee, V., Wadwijid, P., and Smitasiri, Y. 2011. Induction of frog tadpole development with *Pueraria mirifica* dried tuber and *Butea superba* root powder. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 39(1): 260-264. [in Thai]
- Kituncharoen, N., Hanjavanij, C., and Suwannapeng, N. 2006. Efficiency of vaccination with *Streptococcus agalactiae* bacteria on Streptococcosis prevention in Nile tilapia. *Khon Kaen University Research Journal*. 11(1): 53-61.
- Medrano, M., Pérez, P.F., and Abraham, A.G. 2008. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*. 122(1): 1-7.
- Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., Mahapatra, K.D., and Saha, J.N. 2007. Innate immunity response in families of Indian major carp, *Labeo rohita*, differing in their resistance to *Edwardsiella tarda* infection. *Current Science*. 92(9): 1270-1274.
- Patel, S., Shukla, R., and Goyal A. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of Functional Foods*. 14(1): 549–561.
- Promnuan, K., Klawech, W., and Kiriratnikom, S. 2015. Application of probiotics for increasing of growth performance, feed utilization and disease resistance in hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). *Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference*. Bangkok. 1595 p. [in Thai]
- Somsiri, T., Chinabut, S., Phanwichien, K., Soontornvit, S., and Damrongphol, Y. 1998. Virulence of *Aeromonas* spp. isolated from red leg disease frog. *Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference*. Bangkok. 297 p. [in Thai]

การใช้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิล
ต่อเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์

The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 from gastro-intestinal tract
of Nile tilapia on fish pathogens and canker disease

เกศินี จันทระโสภณ¹

Kesinee Chantharasophon

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani, 34000

¹ Corresponding author: 045-352000, FAX 045-352070, E-mail: kesineechan@gmail.com

บทคัดย่อ

การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิลยับยั้งเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำคือ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* KJ720207 และเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ คือ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 และ *X. campestris* UBRU1 ด้วยวิธี Spot on lawn พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สร้างวงใสยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ วัดรัศมีวงใสได้ 6.0 ± 1.0 , 9.33 ± 2.07 , 7.75 ± 1.71 และ 2.5 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ผสมในอาหารปลานิล โดยปลานิลกลุ่ม T1 ให้อาหารปกติ กลุ่ม T2 ให้อาหารผสม 10^9 CFU *B. amyloliquefaciens* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่ม T3 ให้อาหารผสม 0.05% Oxytetracycline เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของกลุ่ม T2 และ T3 สูงกว่ากลุ่ม T1 โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 4.97 ± 0.13 , 4.57 ± 0.14 และ 3.56 ± 0.10 กรัมต่อวัน ตามลำดับ ค่าทางโลหิตวิทยาและการเกิดไมโครนิวเคลียสของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ยกเว้นค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่ม T3 มีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบความต้านทานโรคจากเชื้อผสม *A. hydrophila* และ *F. columnare* ด้วยวิธี Challenge test พบว่า หลังจากฉีดเชื้อเข้าช่องท้องในวันที่ 7 ปลานิลกลุ่ม T2 มีอัตราการรอดที่ร้อยละ 64.92 ± 5.27 ขณะที่กลุ่ม T1 และ T3 มีค่าเป็นร้อยละ 0.0 และ 28.58 ± 9.53 ตามลำดับ ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ *X. campestris* UBRU1 ที่ปลูกบนผลและใบมะนาวแบบ Puncture inoculation เป็นเวลา 14 วัน พบว่า กลุ่มทดลองเกิดรอยโรคแคงเกอร์เฉพาะจุดที่ปลูกเชื้อ ขณะที่กลุ่มควบคุมเกิดรอยโรคทั้งจุดที่ปลูกและขยายไปบริเวณรอบจุดที่ปลูกเชื้อ กล่าวได้ว่า เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถใช้เป็นทางเลือกในการควบคุมเชื้อก่อโรคในปลา (*A. hydrophila* และ *F. columnare* KJ720207) และเชื้อก่อโรคแคงเกอร์แบบชีววิธีได้

คำสำคัญ : *A. hydrophila*, *F. columnare*, *X. campestris*, ปลานิล

Abstract

The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 from gastro-intestinal tract of Nile tilapia to inhibit fish pathogens which were *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* KJ720207 and the 2 strains of canker disease, *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* TISTR 2065 and *X. campestris* UBRU1. By spot on lawn method, *B. amyloliquefaciens* KJ720206 exhibited 6.0 ± 1.0 , 9.33 ± 2.07 , 7.75 ± 1.71 and 2.5 ± 0.58 mm. of clear zone radius to those 4 pathogenic strains, respectively. For rearing of Nile tilapia, T1, T2 and T3 that were control groups, mixed 10^9 CFU of *B. amyloliquefaciens* per 1 kg. feed groups and 0.05% Oxytetracycline mixed feed group, respectively, were studied for 30 days. The results showed that growth rate in average weight per fish of T2 and T3 were higher than T1 which were 4.97 ± 0.13 , 4.57 ± 0.14 and 3.56 ± 0.10 g/d, respectively. Hematological parameters and micronuclei in erythrocyte were not affected by all treatment groups with significantly ($P < 0.05$), except hematocrit value of T3 was significantly lower than the others. The disease resistance of Nile tilapia groups, T1, T2 and T3 was studied by challenge test with the mixed of *A. hydrophila* and *F. columnare* and at the day 7 post-challenged, survival rate of T2 was $64.92 \pm 5.27\%$ while T1 and T3 were 0.0% and $28.58 \pm 9.53\%$, respectively. The use of *B. amyloliquefaciens* KJ720206 to control the growth of *X. campestris* UBRU1 that was puncture inoculated on fruit and leaves of lime by covering inoculation was performed for 14 days. It was found that the treatment group was occurred the canker lesions only on the growing spotted, but in the control group, there was canker lesions on the growing spotted and progressed around. Therefore, *B. amyloliquefaciens* KJ720206 can be an alternative agent to use as biocontrol in fish pathogens; *A. hydrophila* and *F. columnare* KJ720207 and canker disease.

Keywords: *A. hydrophila*, *F. columnare*, *X. campestris*, Nile tilapia

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* และ *Flavobacterium* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นและสามารถก่อโรคในสัตว์น้ำได้ หากมีการเกิดโรคระบาดในแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลากระชังแล้ว เกษตรกรมักเชื่อว่าสาเหตุส่วนใหญ่มาจากแบคทีเรียก่อโรค (Das *et al.*, 2013, Chitmanat *et al.*, 2016) โดยทั่วไปในสภาวะปกติและช่วงที่น้ำหลากมักเกิดการระบาดของเชื้อก่อโรคในสกุล *Aeromonas* หากเป็นช่วงที่มีสภาวะอากาศแปรปรวนในช่วงวันจะเหมาะกับการระบาดของเชื้อในสกุล *Flavobacterium* แต่ในความเป็นจริงการระบาดของแบคทีเรียก่อโรคในปลากระชังเป็นผลจากการติดเชื้อแบบผสมหลายสายพันธุ์ ขึ้นกับสภาพของ

สิ่งแวดล้อมว่าเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อในสกุลใดมากกว่ากัน อาการที่แสดงออกว่าเกิดการติดเชื้อโรคระบาดจะมีลักษณะไปในทิศทางของเชื้อสายพันธุ์ที่มีปริมาณมากกว่า

ในจังหวัดอุบลราชธานีมีการเพาะเลี้ยงปลาในกระชังมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่น เมื่อเกษตรกรพบว่ามีการระบาดของโรคกับปลาในกระชังจะใช้สารปฏิชีวนะในการรักษา แต่การใช้ยาที่ไม่ตรงกับสายพันธุ์เชื้อก่อโรคนอกจากสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและการรักษาไม่ได้ผลแล้ว ยังอาจพบว่ามีสารปฏิชีวนะตกค้างในผลผลิตได้ (Chantharasophon and Prawitthana, 2015) วิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้ลดอัตราการตายของสัตว์น้ำทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ คือ การควบคุมแบบชีววิธี โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงมายับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้แต่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยง (Pal, 2015)

โรคแคงเกอร์จากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* เป็นโรคพืชที่สำคัญของมะนาว (Hussain et al., 2010) ในประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีความชื้นในอากาศต่ำเชื้อจะเจริญได้ดีและเข้าทำลายมะนาวในทุกส่วน ที่สุดทำให้ดอกหรือผลที่ติดแล้วร่วงทิ้งไปเป็นจำนวนมาก วิธีการรักษาโรคแคงเกอร์ที่ใช้กันคือการใช้สารเคมี อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียก่อโรคนี้อาจปรับตัวให้ทนต่อสารเคมีได้นอกจากจะรักษาโรคไม่ได้ผลแล้วยังทำให้มีสารตกค้างในผลผลิตและในธรรมชาติมากขึ้น (Sampath et al., 2011) เช่นเดียวกับการใช้สารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การควบคุมแบบชีววิธีจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจนำมาทดแทนการใช้สารเคมีทั้งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการเพาะปลูกพืช

เชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* พบครั้งแรกโดยชาวญี่ปุ่นชื่อ Fukumoto และเป็นผู้ให้ชื่อตามลักษณะเด่นของเชื้อคือ ผลิตสารเหลวที่เป็นเอนไซม์ไม่เลสที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Wang et al., 2017) เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคแต่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้หลายกลุ่ม (Gotor-Vila et al., 2017) เช่น สาร Difficidin และ Bacilysin ที่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Erwinia amylovora* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ (Chen et al., 2009) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยวเหี่ยวในมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อคือ *Fusarium solani* และ *Ralstonia solanacearum* ได้ (Ajilogba et al., 2013; Tan et al., 2013) ที่มาของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาในจังหวัดอุบลราชธานี (Chantharasophon, 2016) จึงจัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่น่าสนใจในการนำมาทดลองใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลานิลกระชัง และโรคแคงเกอร์มะนาวที่พบการระบาดในเขตจังหวัดอุบลราชธานี

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์: จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ดังนี้

2.1 เชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.2 เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 และเชื้อ *F. columnare* KJ720207

2.2 คัดแยกเชื้อก่อโรคแคงเกอร์จากมะนาว

เก็บตัวอย่างผลมะนาวที่จำหน่ายเป็นผักปลอดสารพิษ ณ ห้างสรรพสินค้าศูนย์ ทาวเวอร์ อุบลราชธานี ถนนชยางกูร อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เลือกผลที่มีรอยโรคแคงเกอร์สดใหม่ ให้เข็มเย็บเชื้อชุดเอาเชื้อที่จูดรอยโรคไปเพาะบนอาหาร Nutrient broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงถ่ายเชื้อแบบ Cross streak technique บนอาหาร Nutrient agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเชื้อที่สัณฐานวิทยามีลักษณะ โคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ผิวมัน เยิ้ม ไปคัดแยกซ้ำให้บริสุทธิ์มากขึ้นอีก 7 ครั้ง เลือกโคโลนีเดียวมาตรวจแกรมด้วย 3% KOH ตรวจรูปร่างเซลล์ ทดสอบการย่อยเจลาตินและการย่อยแป้ง และนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปทดสอบการก่อโรคบนผลและใบมะนาว

2.3 ศึกษาการเจริญต่อต้านเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคงเกอร์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* (ตามวิธีการของ Chantharasophon 2016; Chantharasophon and Prawitthana, 2015)

2.3.1 การเตรียมเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์

- 1) นำเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 ที่อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร Tryptic soy broth (37 องศาเซลเซียส) จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Tryptic soy agar
- 2) นำเชื้อ *F. columnare* ที่อายุ 7 วัน ในอาหาร Cytophaga broth (25 องศาเซลเซียส) จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Cytophaga agar
- 3) นำเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 หรือเชื้อ *X. campestris* UBRU1 ที่อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร Nutrient broth (37 องศาเซลเซียส) จำนวน 1 loop-full ขีดลากไขว้และทับกัน 3 ชั้นบนอาหาร Nutrient agar

2.3.2 วิธี Spot on lawn: ถ่ายเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ที่อายุ 24 ชั่วโมงในอาหาร Tryptic soy agar ทับลงบนรอยที่ขีดลากเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ๆ ละ 3 ซ้ำ แบบ Spot on lawn นำไปบ่มตามสภาวะของแต่ละเชื้อ ตรวจการสร้างบริเวณใส (Inhibition zone)

2.4 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ในปลานิลเพื่อทดสอบความต้านทานโรคติดเชื้อจากเชื้อผสม

A. hydrophila และ *F. columnare* (ดัดแปลงวิธีการของ Chantharasophon and Prawitthana, 2015)

นำปลานิลหมันที่มีน้ำหนัก 40-50 กรัม คัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว เลี้ยงปลาในถังเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 250 ลิตร ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลา โดยเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ให้ปลาปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน และให้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) อาหารปลา

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) อาหารปลา + 10^9 CFU *B. amyloliquefaciens* ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) ให้อาหารปลา + 0.05% Oxytetracycline

เลี้ยงปลาเป็นเวลา 30 วัน ตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิด ไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง จากนั้นจึงฉีดเชื้อผสมของเชื้อ *A. hydrophila* (10^7 CFU/

มิลลิลิตร) และเชื้อ *F. columnare* (10^7 CFU/มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 เข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection) จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เลี้ยงปลาต่ออีก 7 วัน ตรวจวัดค่าของแอนติบอดีไทเตอร์ (แบบ Direct agglutination โดยอ่านค่าจาก Minimal positive agglutinin และเปลี่ยนเป็น $\log_2 N$, เมื่อ N เป็นส่วนกลับของ Microtiter plate สุดท้ายที่แสดงการเกิดปฏิกิริยา) และอัตราการรอดของปลานิลทุกกลุ่มทุกตัว

2.5 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ควบคุมการเจริญของเชื้อ *X. campestris* UBRU1 บนมะนาว

ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* โดยทดลองบนผิวใบและผลของมะนาวที่ปลูกในกระถางแบบ Spray on lawn (ดัดแปลงวิธีการทดลองของ Huang *et al.*, 2012) เป็นเวลา 14 วัน ประเมินผลการยับยั้งเชื้อจากการเจริญของเชื้อ *X. campestris* ที่เพาะบนผิวใบและผลของมะนาว

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ: วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ One-way analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ Duncan's new multiple range test

ผลการทดลอง

3.1 คัดแยกเชื้อก่อโรคแคแคงเกอร์จากมะนาว

เชื้อที่คัดแยกได้จากรอยโรคแคแคงเกอร์มะนาวมีโคโลนีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมัน เยิ้ม บนอาหาร Nutrient agar เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สามารถย่อยเจลาตินและแบ่งได้ เมื่อปลูกเชื้อนี้ลงบนผลมะนาวพบว่าเกิดรอยแผลเป็นจุดนูน รอบขอบแผลเยิ้มเหมือนเป็นน้ำ จากนั้นเปลี่ยนเป็นสะเก็ดแผลนูนมีรอยบุ๋มลงไปตรงกลางซึ่งเป็นลักษณะของโรคแคแคงเกอร์ จึงให้เชื้อก่อโรคที่คัดแยกได้เป็น *X. campestris* UBRU1

3.2 ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ต่อด้านการเจริญของเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแคแคงเกอร์

การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำคือเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* KJ720207 และเชื้อก่อโรคแคแคงเกอร์ คือ *X. campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 และ *X. campestris* UBRU1 ด้วยวิธี Spot on lawn พบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ได้โดยมีวัดรัศมีวงใสเป็น 6.0 ± 1.0 , 9.33 ± 2.07 , 7.75 ± 1.71 และ 2.5 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ

3.3 ผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ในปลานิลเพื่อทดสอบความต้านทานโรคติดเชื้อจากเชื้อผสม *A. hydrophila* และ *F. columnare*

3.3.1 หลังจากเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 30 วัน ตรวจวัดค่า อัตราการรอด อัตราการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยา และการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง พบว่า T1, T2 และ T3 มีอัตราการรอดร้อยละ 66.66 ± 13.34 , 86.67 ± 6.66 และ 73.34 ± 6.66 ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตของกลุ่ม T2 และ T3 สูงกว่ากลุ่ม T1 โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันคือ 4.97 ± 0.13 , 4.57 ± 0.14 และ 3.56 ± 0.10 กรัมต่อวัน ตามลำดับ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อกลุ่ม T2 และ T3 น้อยกว่ากลุ่ม T1 คือ 1.22 ± 0.14 , 1.58 ± 0.02 และ 1.72 ± 0.14

ตามลำดับ ค่าทางโลหิตวิทยาและการเกิดไมโครนิวเคลียสของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและเกล็ดเลือดของกลุ่ม T3 (Table 1)

3.4.2 เมื่อฉีดเชื้อผสมของ *A. hydrophila* และ *F. columnare* เข้าช่องท้อง และเลี้ยงปลาต่ออีก 7 วัน พบว่า ค่าแอนติบอดีไทเทรตของปลานิล (ก่อนการฉีดเชื้อและหลังการฉีดเชื้อ 7 วัน) กลุ่ม T2 มีค่าสูงสุด (8.0 ± 0.0 และ 8.33 ± 0.58) รองลงมาคือ กลุ่ม T3 (5.0 ± 0.0 และ 6.33 ± 0.58) และกลุ่ม T1 (2.33 ± 0.67 และ ไม่ได้ตรวจวัดเนื่องจากตายหมด) เช่นเดียวกับอัตราการรอดที่ T2, T3 และ T1 มีค่าเป็น 64.92 ± 5.27 , 28.58 ± 9.53 และ 0 ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Survival rate, growth performance, hematology, micronuclei in erythrocyte expression and antibody titer of Nile tilapia after rearing for 30 days and challenging with pathogenic bacteria in three different treatments

Treatment*	T1	T2	T3
Survival rate (day 0 post-challenged; %)	66.66 ± 13.34^a	86.67 ± 6.66^b	73.34 ± 6.66^c
ADG (g/d)	3.56 ± 0.10^a	4.97 ± 0.13^b	4.57 ± 0.14^c
FCR	1.72 ± 0.14^a	1.22 ± 0.14^b	1.58 ± 0.02^c
Lymphocyte (%)	99.0 ± 0.50^a	99.33 ± 0.67^a	99.33 ± 0.67^a
WBC (K/Cu.mm)	595.85 ± 75.06^a	565.96 ± 31.13^a	463.56 ± 209.08^a
RBC (M/uL)	1.72 ± 0.12^a	1.49 ± 0.15^a	1.03 ± 0.76^a
HCT (%)	28.67 ± 2.72^a	25.82 ± 2.47^a	14.35 ± 10.25^b
Micronucleus (%)	0.52 ± 0.03^a	0.49 ± 0.03^a	0.51 ± 0.04^a
Antibody titer (day 0 post-challenged)	2.33 ± 0.67^a	8.0 ± 0.0^b	5.0 ± 0.0^c
Antibody titer (day 7 post-challenged)	ND**	8.33 ± 0.58	6.33 ± 0.58
Survival Rate (day 7 post-challenged; %)	0 ± 0.0^a	64.92 ± 5.27^b	28.58 ± 9.53^c

^{abc} Mean in the same row with a different superscript letter are significantly different ($P < 0.05$)

*T1 = Feed

T2 = Feed + 10^9 CFU *B. amyloliquefaciens* KJ720206 (per Kg. feed)

T3 = Feed + 0.05% Oxytetracycline

** ND = Not detected

3.4 การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ควบคุมการเจริญของเชื้อ *X. campestris* UBRU1 บนมะนาว

กลุ่มทดลองที่ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ปลุกทับเชื้อ *X. campestris* ทั้งบนผิวใบและผลของมะนาวแบบ Spray on lawn แสดงรอยของโรคแคงเกอร์เฉพาะจุดที่ปลุกเชื้อ ขณะที่กลุ่มควบคุมเกิดรอยโรคแคงเกอร์ทั้งจุดที่ปลุกและขยายไปบริเวณรอบจุดที่ปลุกเชื้อ จึงประเมินว่าผลการเกิดโรคแคงเกอร์ของกลุ่มทดลองต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ปลุกเฉพาะเชื้อโรคแคงเกอร์อย่างเดียว

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* F. columnare KJ720207 *X. campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 และเชื้อ *X. campestris* UBRU1 ในระดับหลอดทดลองได้โดยมีวัดรัศมีวงใส 6.0 ± 1.0 , 9.33 ± 2.07 , 7.75 ± 1.71 และ 2.5 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาในจังหวัดอุบลราชธานีสามารถผลิตสารสำคัญที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้งจากสัตว์น้ำและโรคแบคทีเรียมะนาวได้ และคาดว่าสารสำคัญดังกล่าวน่าจะประกอบด้วยสารหลายชนิดจึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันได้ถึง 4 สายพันธุ์ ซึ่งผลการศึกษารั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cao et al. (2011) ที่พบว่า สามารถใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ที่คัดแยกจากปลาได้ และผลการทดลองนี้ยังสนับสนุนงานของ Reda et al. (2016) ที่รายงานว่า สารประกอบที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* S514 สร้างขึ้นและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่มเชื้อดื้อยาที่นำมาศึกษาคือ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้นั้นประกอบด้วย กรด butanedioic, octadecyl 1(1carboxy1methylethyl) และ 4octyl ester และผลการศึกษาของ Gotor-Vila et al. (2017) ที่รายงานว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* CPA-8 ผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคในเขตรากคือเชื้อ *Monilinia laxa*, *M. fruticola* และ *Botrytis cinera* ได้ โดยพบว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นประกอบอินทรีย์ระเหยได้คือ 1,3 pentadiene, acetoin (3-hydroxy-2-butanone) และ thiophene โดยสารประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแต่ละสายพันธุ์อาจมีกลไกการสร้างที่แตกต่างกันและมีผลต่อเชื้อที่แตกต่างกันไป ดังนั้นจึงควรศึกษาสารชนิดใดจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* F. columnare KJ720207 *X. campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 และเชื้อ *X. campestris* UBRU1 ว่าสามารถใช้ส่วนใดจากเชื้อใดๆ ที่ศึกษาในการควบคุมเชื้อก่อโรคกลุ่มเป้าหมายเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์และสัมฤทธิ์ผลตามความต้องการ

อย่างไรก็ตาม การที่พบว่ารัศมีวงใสของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ต่อเชื้อโรคแบคทีเรีย *X. campestris* UBRU1 ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ครั้งนี้มีค่าต่ำที่สุดคือ 2.5 ± 0.58 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* TISTR 2065 มีค่าสูงถึง 7.75 ± 1.71 มิลลิเมตรซึ่งใกล้เคียงกับของเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำอีก 2 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จึงคาดว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจาก *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ครั้งนี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับใช้ยับยั้งเชื้อโรคแบคทีเรีย *X. campestris* UBRU1 ซึ่งยืนยันได้จากผลการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ยับยั้งเชื้อ *X. campestris* บนผิวใบและผลของมะนาว และพบว่า บนผิวใบและผลของมะนาวกลุ่มทดลองเกิดโรคแบคทีเรียแต่มีรอยโรคที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Huang et al. (2012) ที่ใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* ชีดพ่นบนผิวใบมะนาวสายพันธุ์ Mexican ก่อนที่จะเพาะเชื้อโรคแบคทีเรียลงบนใบมะนาว และพบว่าการเจริญของเชื้อโรคแบคทีเรียต่ำกว่าใบมะนาวกลุ่มควบคุม

การใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 ผสมในอาหารปลานิลที่พบว่า ทำให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้อาหารผสม Oxytetracycline แสดงว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens*

KJ720206 สามารถกระตุ้นการเจริญของปลานิลได้ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ แต่การศึกษานี้พบว่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสูงผิดปกติคือร้อยละ 99 ขึ้นไป ขณะที่ Sahan et al. (2015) รายงานว่าปลานิลกลุ่มควบคุมที่ใช้ศึกษามีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte อยู่ทีร้อยละ 79.67 ± 2.41 และกลุ่มการทดลองที่เสริมอาหารด้วยสาหร่ายพบ lymphocyte อยู่ที่ไม่เกินร้อยละ 85 สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าปลานิลที่นำมาใช้ในการศึกษาน่าจะเป็นปลาที่มีการติดเชื้อมาก่อน จึงพบ lymphocyte ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบเซลล์สูงมาก และยืนยันได้จากค่า Antibody titer (0 post-challenged) ของกลุ่มควบคุมที่มีค่า 2.33 ± 0.67 แทนที่จะเป็น 0.0 ทั้งนี้เนื่องจากปลานิลหมันที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มาจากบ่อปลาอนุบาลของเกษตรกรในพื้นที่ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการทดลองที่ไม่ได้ผลิตลูกปลาเอง จึงใช้ค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมเป็นตัวเปรียบเทียบ

เมื่อทดสอบความต้านทานโรคจากเชื้อ *A. hydrophila* ผสมกับเชื้อ *F. columnare* KJ720207 พบว่าปลานิลกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดเป็นร้อยละ 64.92 ± 5.27 ในขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้อาหารผสม Oxytetracycline มีอัตราการรอดเป็นร้อยละ 0.0 และ 28.58 ± 9.53 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ปลานิลกลุ่มทดลองสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานขึ้นมาต่อสู้กับเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะเป็นตัวกระตุ้นดังที่เกษตรกรนิยมใช้กัน ผลการทดลองนี้ให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโปรไบโอติกในปลานิลของ Chantharasophon and Prawitthana (2015) ซึ่งรายงานว่าการใช้เชื้อดังกล่าวให้ได้ผลดีเฉพาะการเจริญแต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานเชื้อก่อโรคได้ดีเท่ากับกลุ่มที่ใช้สารปฏิชีวนะ Oxytetracycline

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KJ720206 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำคือเชื้อ *A. hydrophila* และ *F. columnare* KJ720207 และเชื้อก่อโรคแคแวงเกอร์ คือ *X. campestris* UBRU1 ได้ทั้งในระดับหลอดทดลอง (In-Vitro) และในปลานิล รวมทั้งบนผลและใบมะนาว (In-Vivo) ซึ่งจะเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะกับปลานิลที่เพาะเลี้ยง และลดการใช้สารเคมีกับมะนาว ซึ่งนอกจากจะลดภาระค่าใช้จ่ายสารเคมีและสารปฏิชีวนะแล้ว ยังลดความเสี่ยงของเกษตรกรและผู้บริโภคไปพร้อมกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่สนับสนุนงบประมาณและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Ajilogba, CF., Babalola, OO., and Ahmad, F. 2013. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. *Ethno Medicine*. 7(3): 205-216.
- AlGhuri, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E.M., Chistyakov, V.A., Mazanko, M.S., Bren, A.B., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L. 2016. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*. 6: 432-452.
- Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M., and Lu, L. 2011. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A potential antagonistic bacterium against Eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Evidence-base Complementary and Alternative Medicine*. 2011: 1-7.
- Chantharasophon, K. 2016. Isolation of *Flavobacterium columnare* and *Bacillus* sp. from Nile tilapia and Catfish. *Journal of Fisheries Technology Research*. 10(1): 77-87.
- Chantharasophon, K., and Prawitthana, S. 2015. Effects of *Bacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and immune responses. *Journal of Fisheries Technology Research*. 6(1): 23-35. [in Thai]
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., and Borriss, R. 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotech*. 140(1-2): 38-44.
- Chitmanat, C, Lebel, P., Whangchai, N., Promya, J., and Lebel, L. 2016. Tilapia diseases and management in river-based cage aquaculture in Northern Thailand. *Journal of applied aquaculture*. 28(1): 1-8.
- Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, and S., Kamilya, D. 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish & Shellfish Immunology*. 35(5): 1547-1553.
- Gotor-Vila, A., Teixido, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., and Mari, M. 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*. 64: 219225.
- Huang, T.P., Tzeng, D.D.S., Wong, A.C.L., Chen, C.H., and Lu K.M. 2012. DNA Polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. *Plos One*. 7(7): e42124.

- Hussain, K, Nawaz, K., Majeed, A., Ikram-ul-Haq, Lin, F., Ali, K., Afghan, S., Khan, F., Ghani, A., and Raza, G. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathotypes. African Journal of Biotechnology. 9(54): 9092-9095.
- Pal, S. 2015. Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 8(9): 68-81.
- Reda, F.M., Shafi, S.A., and Ismail, M. 2016. Efficient inhibition of some multi-drug resistant pathogenic bacteria by bioactive metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* S5I4 isolated from archaeological soil in Egypt. Applied Biochemistry and Microbiology. 52.(6): 593–601.
- Şahan, A., AHAN, Tasbozan, O., Aydin, F., Özutok, S., Erbas, C., Duman, S., Uslu, L., and Özcan, F. 2015. Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research. 1(3): 133-139.
- Sampath, A., Vishwanatha, T., Sathishagouda, S., Jain, S.N., Divyashree, B.C., Reena, V., Siddhalingeswara, K.G., Venugopal, N., and Dayanad A. 2011. Bacteriophage: Novel biocontrol agent against citrus canker. Asiatic Journal of Biotechnology Resources. 2(6): 775-779.
- Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., and Xu, Y. 2013. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. Crop Protection. 43: 134-140.
- Wang, J., Zhang, Y., Zhang, C., Lu, J., Quan, C. 2017. Effect of the environmental factors on diketopiperazine cyclo (Pro-Phe) production and antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. Annals of Biological Sciences. 5(1): 47-53.

แคโรไทป์ อิดิโอแกรมมาตรฐาน และการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกบนา
(*Hoplobatrachus rugulosus*, Dicroglossidae) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา
Karyotype, Standardized Idiogram and Meiotic Cell Division of Rugose Frog
(*Hoplobatrachus rugulosus*, Dicroglossidae) by Conventional Staining

วันเพ็ญ กาคำผุย¹ และประวีร์ณ สุพรรณอ่วม^{2*}

Wanpen Kakampuy¹ and Praween Supanuam^{2*}

¹สาขาวิชาพื้นฐานอาชีวศึกษา คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000

²สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000

*Corresponding author, E-mail: supanuam@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาแคโรไทป์และอิดิโอแกรมมาตรฐานของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) จากการย้อมสีแบบธรรมดา ใช้ตัวอย่างกบเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว จากอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เตรียมโครโมโซมจากไขกระดูกและอัณฑะ ย้อมสีโครโมโซมด้วยสีจีมาซา ผลการศึกษาพบว่า กบนามีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 52 โครโมโซมประกอบด้วยเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 4 แท่ง และซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 12 แท่ง ไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศ การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสพบระยะเลปโททีน ไชโกทีน แพคโคทีน ไดโพลทีน ไดอะโคเนซิส เมทาเฟส 1 เมทาเฟส 2 สเปิร์มาทิด และสเปิร์มาโทซัว ระยะเมทาเฟส 1 พบ 13 ไบวาเลนด้วงแหวน ระยะเมทาเฟส 2 มีจำนวนโครโมโซมแฮพลอยด์เท่ากับ 13 แท่ง ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอนุกรมวิธาน พันธุศาสตร์ วิวัฒนาการ ชีววิทยาการเจริญ การปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์ได้

คำสำคัญ: กบนา แคโรไทป์ อิดิโอแกรม ไมโอซิส

Abstract

The study of standardized karyotype and idiogram of rugose frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) by conventional staining, five male and five female frogs of Maung district, Ubon Ratchathani province were used. Chromosomes were prepared from bone marrows and testis followed by Giemsa's staining. The results showed that $2n=26$ and the fundamental numbers (NF) was 52 in both males and females. The autosomes consist of 2 large metacentric, 6 large submetacentric, 4 medium metacentric, 4 small metacentric and 12 small submetacentric chromosomes. There was no significant difference in sex chromosomes. Meiotic cell division found leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, diakinesis, metaphase I, metaphase II, spermatid and

spermatozoa. Metaphase I showed 13 ring bivalents and metaphase II showed haploid number $n=13$. This information is useful for taxonomy, genetics, evolution, developmental biology, animal breeding and conservation.

Keywords: Rugose frog, Karyotype, Idiogram, Meiosis

Introduction

Rugose frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) is known as Chinese edible frog, East Asian bullfrog, or Taiwanese frog. The synonyms of this species are *Rana rugulosa*, *Rana tigrina* ssp. *rugulosa*, *Rana tigrina* ssp. *pantherina* and *H. chinensis*. It is found in Cambodia, China, Laos, Malaysia, Myanmar, Philippines, Thailand and Vietnam. Its natural habitats are freshwater marshes, intermittent freshwater marshes, arable land, pasture land, rural gardens, urban areas, ponds, aquaculture ponds, open excavations, irrigated land, seasonally flooded agricultural land, and canals and ditches. They are widely farmed in Thailand, China and Malaysia. In Thailand, these frogs have been consumed for long time. The rugose frogs are important economic animals, some strange skin frogs (albino or golden) are exotic pets. It is listed in Appendix II of CITES and LC (least concern) in IUCN (Kosuch *et al.*, 2001; Chan-ard, 2006; Yu *et al.*, 2015).

H. rugulosus is a species in the Dicroglossidae family. The molecular data suggested that this frog may be cryptic species complex including Thai and Chinese populations. The genus *Hoplobatrachus* has five described species, *H. crassus*, *H. occipitalis*, *H. rugulosus*, *H. tigerinus* and *H. litoralis*. The family Dicroglossidae contains more than 186 species in 15 genera in the world. In Thailand, there are 30 species, 7 genera, 2 subfamilies, namely subfamily Dicroglossidae (genera *Nanorana*, *Fejervarya*, *Limnonectes*, *Hoplobatrachus* and *Quasipaa*) and subfamily Occidozyginae (genera *Occidozyga* and *Ingerana*) (Chan-ard, 2006; Pymon and Wiens, 2011; Hasan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015).

There are several reports on publish cytogenetic studies of *H. rugulosus* including Chang *et al.* (1984), Supaprom and Baimai (2005), Donsakul (2009), Alam *et al.* (2012), Suttichaiya *et al.* (2016) and Tengjaroenkul *et al.* (2017). Previous reports were studied about diploid number, fundamental number (NF, number of chromosome arms), size and shape of chromosomes, karyotype by conventional staining, NOR-banded and C-banded metaphase and chromosome aberration. There are no report standardized karyotype formula, standardized idiogram and meiosis cell division. This research will report diploid number, NF, size and type of chromosomes, standardized karyotype, idiogram and karyotype formula, meiosis cell division, spermatogenesis and spermatozoa character.

Materials and Methods

The study of karyotype, standardized idiogram and meiotic cell division of rugose frog (*Hoplobatrachus rugulosus*, dicroglossidae) by conventional staining was divided into 4 steps including the frog chromosome preparation, chromosome counting, chromosome measuring and chromosome analysis.

1. Frog chromosome preparation: The rugose frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (five males and five females) were collected from natural area from Maung district, Ubon Ratchathani, Thailand. The samples were checked by identification key, Chan-ard (2006). Chromosome preparation was conducted by the colchicine-hypotonic-fixation-air drying technique, from bone marrows and testis. The chromosomes were stained with 20% Giemsa's for 30 min (Verma and Babu, 1995).

2. Chromosome counting: Many pictures of the chromosomes in metaphase cells were taken for counting the number of chromosomes. Twenty metaphase cells of each male and female were measured for length of short arm (Ls) and long arm (LI) chromosomes.

3. Chromosome measuring: The Ls and LI were measured and calculated for the length of total arm chromosomes (LT, $LT=Ls+LI$). Relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) were also calculated. The CI was also computed to classify the shape of chromosomes, respectively according to Chaiyasut (1989) and Tanomtong (2011). All parameters were used in standardized karyotyping and idiogramming.

4. Chromosome analysis: In karyotype formula, classify the size of chromosome, which the symbol "L, M and S" represent large, medium and small chromosomes, respectively. Classify the type of the chromosome, which the symbol "m, sm, a and t" represent metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric chromosomes, respectively. The NF was obtained by assigning a value of two to metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes and one to telocentric chromosome.

Results

The general character of *H. rugulosus* is showed on Figure 1. The dorsal body is olive-brown or gray with distinct ridges. Ventral is white, sometimes with dark spotting. Front legs have four fingers and hind legs have fully webbed five fingers. Males have a pair of gray subgular vocal sac on the underside of the jaw angle but females lack this vocal sac. The karyotype showed that the number of diploid chromosome of *H. rugulosus* was $2n=26$ consisting of metacentric and submetacentric chromosomes, the NF was 52 in both males and females (Figure 2). The chromosome types were

present as 2 large metacentric, 6 large submetacentric, 4 medium metacentric, 4 small metacentric and 12 small submetacentric chromosomes. No heteromorphic sex-chromosome was observed between male and female chromosomes. Twenty metaphase cells of each male and female were measured for Ls, Ll, LT, Cl, RL, SD, chromosome sizes and types were showed on Table 1. This is the first report of standardized idiogram of *H. rugulosus* (Figure 3). The karyotype formula can be deduced as: $2n (26) = L_2^m + L_6^{sm} + M_2^m + S_4^m + S_{12}^{sm}$

The first report of meiosis cell division and spermatogenesis *H. rugulosus* showed interphase, leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, diakinesis, metaphase I, metaphase II, spermatid and spermatozoa (Figure 4). The sperm head is very thin and narrow, ranging from about 15-20 μ m. During metaphase I (meiosis I, reductional division) the homologous chromosomes revealed synapsis, which can be defined as the 13 ring bivalents (4 ring bivalents of metacentric, 9 ring bivalents of submetacentric chromosomes) and $n=13$ haploid chromosomes on metaphase II (meiosis II, equational division) (Figure 5).

Discussion

The karyotype of *H. rugulosus* was $2n=26$, which accordance with previous report. The NF was 52 in both males and females, which agree with Chang *et al.* (1984), Supaprom and Baimai (2005), Donsakul (2009), Alam *et al.* (2012), Suttichaiya *et al.* (2016) and Tengjaroenkul *et al.* (2017). The autosomes of rugose frog from Maung district, Ubon Ratchathani province were 2 large metacentric, 6 large submetacentric, 4 medium metacentric, 4 small metacentric and 12 small submetacentric chromosomes. The types of autosome were not consistent with Chang *et al.* (1984), Supaprom and Baimai (2005), Donsakul (2009), Suttichaiya *et al.* (2016) and Tengjaroenkul *et al.* (2017). The cause of different type of chromosome may be genetic variation between populations. The frog karyotypes in this study are very similar to Supaprom and Baimai (2005) which studied the frog from Khong Chiam district, Ubon Ratchathani. Moreover, the other reports have investigated frogs from the following areas: Bangkok (Donsakul, 2009), Khon Kaen, more apart population may be more different karyotype (Suttichaiya *et al.*, 2016 and Tengjaroenkul *et al.*, 2017) and Zhejiang, China (Chang *et al.*, 1984) (Table 2).

No heteromorphic sex-chromosome was observed in this study. Some reports show the chromosomal sex determination ZZ/ZW of the Indian bullfrog (*H. tigerinus*) (Saba and Tripathi, 2014). In Thailand, the amphibian sex chromosome system was found in *Fejervarya limnocharis* which indicated that this frog was XY/XX system (Patawang *et al.*, 2014).

Karyotypic variation of genus *Hoplobatrachus* is showed on Table 2, namely *H. tigerinus* from India, *H. rugulosus* from China and Thailand and hybrid frog (*H. rugulosus* x *H. tigerinus*). The Indian bullfrogs (*H. tigerinus*) were $2n=26$, $NF=52$, the karyotypes comprised metacentric and submetacentric chromosome. The *H. rugulosus* were $2n=26$, $NF=52$, the karyotypes comprised metacentric and submetacentric chromosome too. Interestingly, the interspecific hybrid frog between male *H. rugulosus* and female *H. tigerinus* showed the triploid number $3n(3x)=39$ (Yadav and Pillai, 1975; Chakrabarti *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1984; Supaprom and Baimai, 2005, Donsakul, 2009, Alam *et al.*, 2012; Saba and Tripathi, 2014; Suttichaiya *et al.*, 2016 and Tengjaroenkul *et al.*, 2017). The other frog in genus *Hoplobatrachus*, *H. crassus*, *H. occipitalis*, and *H. litoralis* also has no cytogenetic report. This study is useful for taxonomy, genetics, evolution, developmental biology, animal breeding and conservation.

There are two reports of meiosis cell division and spermatogenesis of genus *Rana* in Thailand were studied by Chavadej *et al.* (2000) and Manochantr *et al.* (2003) which showed in the *R. catesbeiana* and *R. tigrina*, respectively. The results showed all stages of meiosis cell division and spermatozoa morphology. The sperm head was similar to *R. rugulosus* which has highly elongate and cylindrical shape, ranging from about 10-20 μm . However, the previous reports did not show meiotic configuration and haploid karyotype.

References

- Alam M.S., Islam, M.M., Khan, M.M.R., Hasan, M., Wanichanon, R. and Sumida, M. 2012. Postmating isolation in six species of three genera (*Hoplobatrachus*, *Euphlyctis* and *Fejervarya*) from family Dicroglossidae (Anura) with special reference to spontaneous production of allotriploids. *Zoological Science*. 29: 743-752.
- Chaiyasut, K. 1989. Cytogenetics and Cytotaxonomy of the Genus *Zephyranthes*. Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Bangkok. 260 pp. [in Thai]
- Chakrabarti, S., Banerjee, S.N., Neogi, L.N. and Roy-Choudhuri, S. 1983. C-band positive W chromosome in the female Indian frog. *Experientia*. 39: 321-322.
- Chang, C., Wang, A. and Guo, P. 1984. The karyotype of the frog (*Rana tigrina rugulosa*). *Zoological Research* 5: 33-38. [in Chinese]
- Chan-ard, T. 2003. A Field Guide to the Amphibians of Thailand. Se-education, Bangkok. 175 pp. [in Thai]

- Chavadej, J., Jerareungrattana, A., Sretarugsa, P. and Sobhon, P. 2000. Structure and development of the testis of bullfrog, *Rana catesbeiana*, and their changes during seasonal variation. *ScienceAsia* 26: 69-80.
- Donsakul, T. 2009. Karyotype from liver cells of seven amphibians (amphibian, Anura) from Thailand. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*. 28: 162-170.
- Green, D.M. and Sessions, S.K. 2012. *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press. San Diego. 456 pp.
- Hasan, M., Kuaramoto, M., Islam M.M., Alam, M.S., Khan, M.M.R., and Sumida, M. 2012. A new species of genus *Hoplobatrachus* (Anura, Dicroglossidae) from the coastal belt of Bangladesh. *Zootaxa*. 3312: 45-58.
- Khonsue, W. and Thirakhupt, K. 2001. A checklist of the amphibians in Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*. 1: 69-82.
- Kosuch, J., Vences, M., Dubois, A., Ohler, A. and Böhme, W. 2001. Out of Asia: mitochondrial DNA evidence for an oriental origin of tiger frogs, genus *Hoplobatrachus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21: 398-407.
- Manochantr, S., Sretarugsa, P., Wanichanon, C., Chavadej, J., and Sobhon, P. 2003. Classification of spermatogenic cells in *Rana tigerina* based on ultrastructure. *ScienceAsia* 29: 241-254.
- Patawang, I., Tanomtong, A., Phimphan, S., Chuaynkern, Y., Chuaynkern, C., Phaengphairee, P. and Nithikulworawong, N. 2014. The identification of sex-chromosomes and karyological analysis of rice frog, *Fejervarya limnocharis*, (Anura, Ranidae) from northeast Thailand. *Cytologia*. 79: 141-150.
- Pyron, R.A. and Wiens, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 543-583.
- Saba, N. and Tripathi, N.K. 2014. Preliminary cytogenetic study and report of ZZ/ZW sex chromosomes in the bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Anura, Amphibia) from high altitude area of Jammu and Kashmir, India. *Nucleus*. 57: 55-59.
- Suttichaiya, A., Khammanichanh, A., Patawang, I., Sriuttha, M., Tanamtong, A. and Neeratanaphan, L. 2016. Chromosome aberrations of East Asian bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) around a gold mine area with arsenic contamination. *Environment Asia*. 9: 67-76.
- Supaprom, T. and Baimai, A. 2005. Characterization of c-banded mitotic chromosomes in four species of anuran amphibians from Thailand. *Amphibia-Reptilia*. 26: 367-371.

- Tanomtong, A. 2011. Cytogenetics. Khon Kaen University Press. Khon Kaen. 387 pp. [in Thai]
- Tengjaroenkul, B., Intamat, S., Sriuttha, M., Tanomtong, A. and Neeratanaphan, L. 2017. Cytotoxicity evaluation of the East Asian bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) in an agricultural area affected by chlorpyrifos. *Cytologia*. 82: 175-181.
- Verma, R.S. and Babu, A. 1995. Human Chromosomes Principles and Techniques. 2nd ed. McGraw-Hill Inc. New York. 419 pp.
- Yadav, J.S. and Pillai, R.K. 1975. Somatic karyotypes of two species of Indian frogs (Anura, Amphibia). *Cytobios*. 13: 109-115.
- Yu, D., Zhang, J., Li, P., Zheng, R. and Shao, C. 2015. Do cryptic species exist in *Hoplobatrachus rugulosus*? An examination using four nuclear genes, the Cyt-b gene and the complete MT genome. *PLOS ONE*. 10: e0124825.

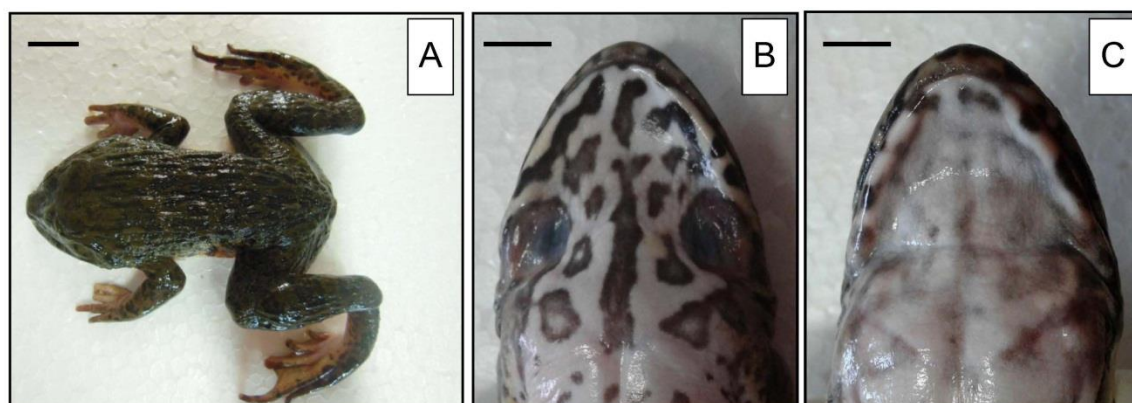


Figure 1 Dorsal view (A), ventral of male (B) and female (C) rugose frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Dicroglossidae, Anura) from Maung district, Ubon Ratchathani (Scale bars = 1 cm).

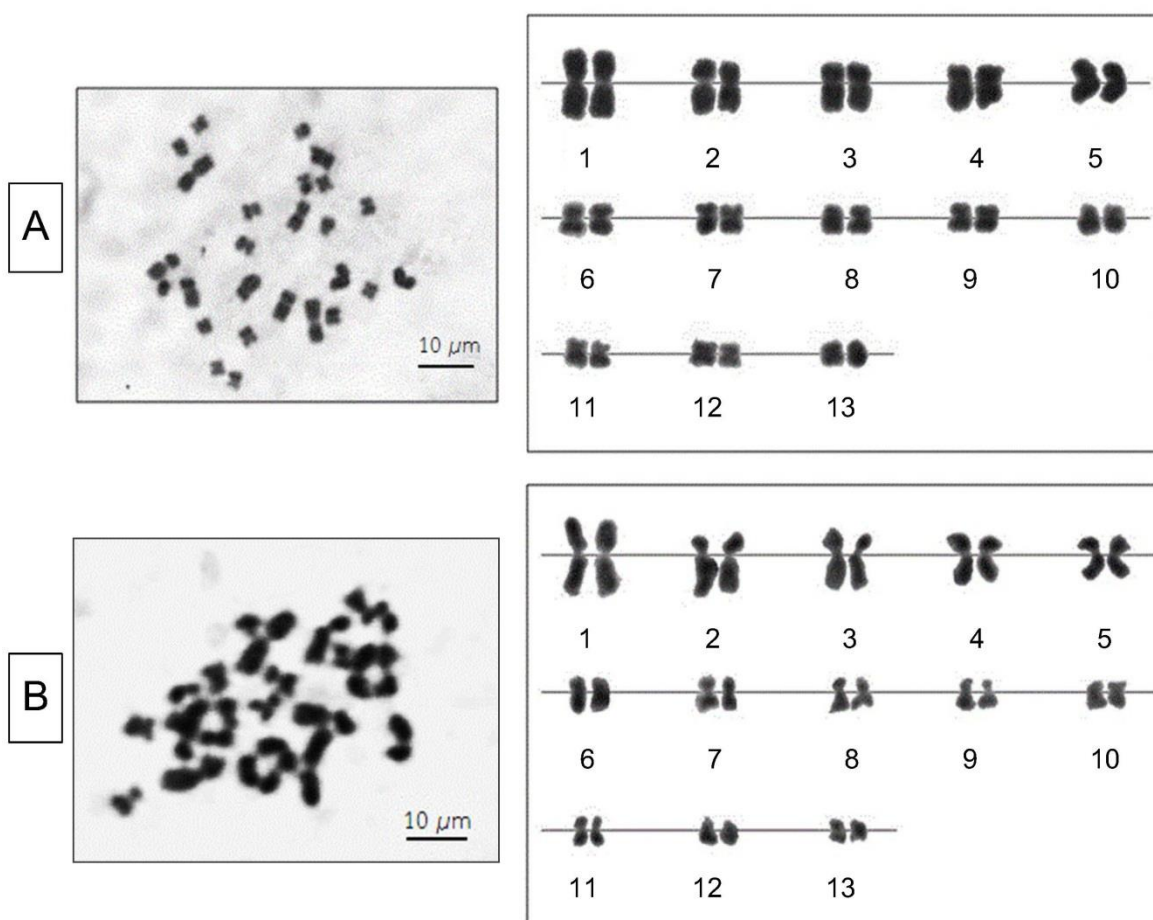


Figure 2 Metaphase plates and standardized karyotypes of male (A) and female (B) rugose frogs, (*Hoplobatrachus rugulosus*) $2n=26$ by conventional staining (Scale bars = 10 μ m).

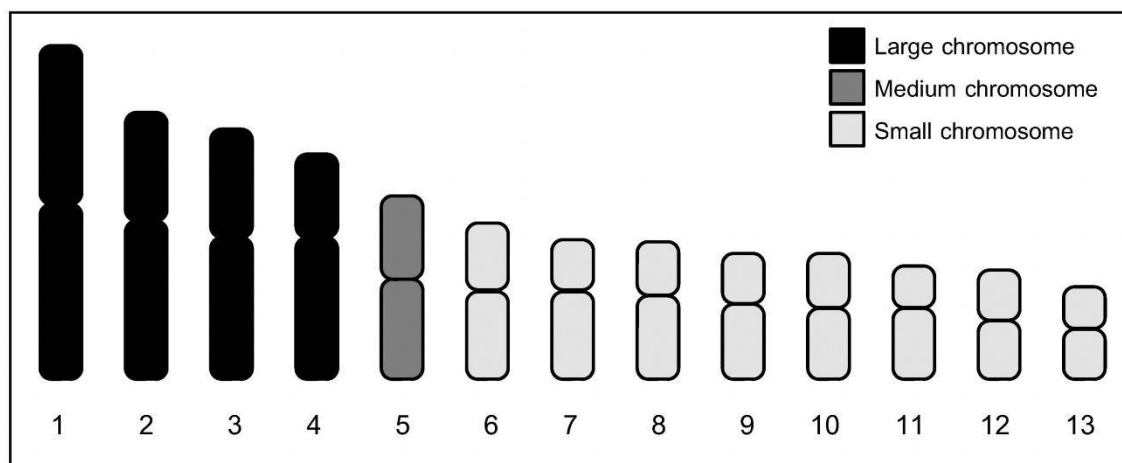


Figure 3 Standardized idiogram of the rugose frog, (*Hoplobatrachus rugulosus*) $2n=26$ by conventional staining.

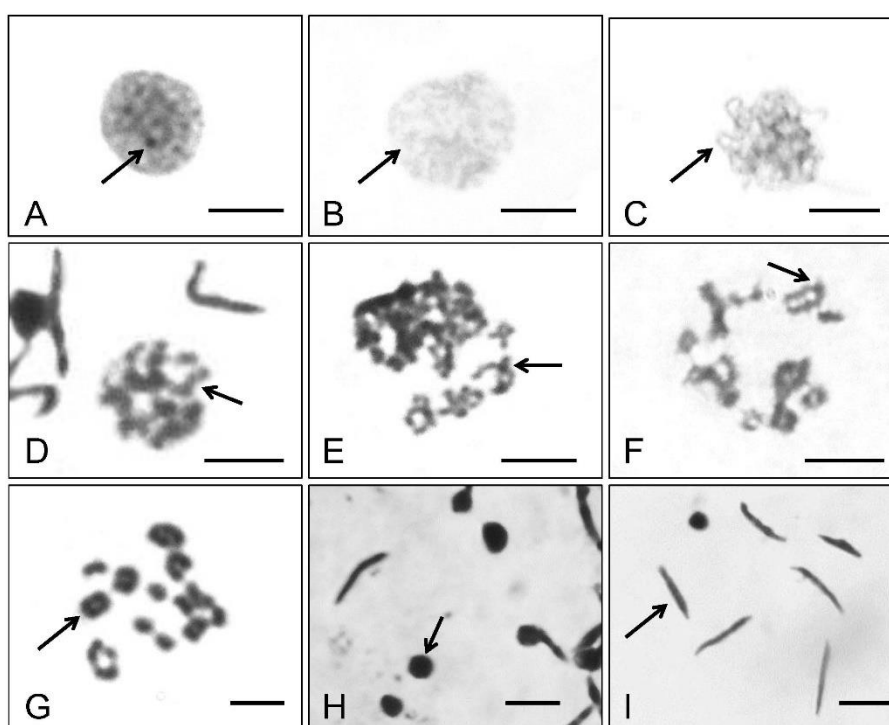


Figure 4 Meiotic cell division of the rugose frog, (*Hoplobatrachus rugulosus*) on interphase (A, arrow indicate nucleolus), leptotene (B, arrow indicate chromatin), zygotene (C, arrow indicate synapsis), pachytene (D, arrow indicate chromatin), diplotene (E, arrow indicate chiasma), diakinesis (F, arrow indicate terminalization), metaphase I (G, arrow indicate ring bivalent), spermatid (H, arrow) and spermatozoa (I, arrow) (Scale bars = 10 μm).

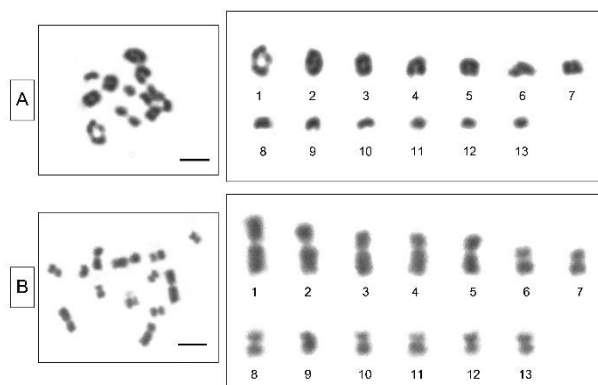


Figure 5 Metaphase I plate and karyotype, $2n=26$ (A), metaphase II plate and karyotype, $n=13$ (B) of rugose frog, (*Hoplobatrachus rugulosus*) by conventional staining (Scale bars = 10 μ m).

Table 1 Mean length of short arm chromosome (Ls), long arm chromosome (LI), total arm chromosome (LT), centromeric index (CI), relative length (RL) and standard deviation (SD) of CI, RL from 40 karyotypes of male and female rugose frog, (*Hoplobatrachus rugulosus*), $2n=26$.

Chromosome pair	Ls (μ m)	LI (μ m)	LT (μ m)	CI $\pm$ SD	RL $\pm$ SD	Chromosome size	Chromosome type
1	4.70	5.71	10.41	0.549 $\pm$ 0.021	0.148 $\pm$ 0.015	Large	Metacentric
2	3.28	5.01	8.28	0.605 $\pm$ 0.006	0.118 $\pm$ 0.006	Large	Submetacentric
3	3.05	4.74	7.79	0.608 $\pm$ 0.015	0.110 $\pm$ 0.010	Large	Submetacentric
4	2.74	4.31	7.04	0.612 $\pm$ 0.015	0.100 $\pm$ 0.008	Large	Submetacentric
5	2.56	3.40	5.95	0.571 $\pm$ 0.022	0.085 $\pm$ 0.005	Medium	Metacentric
6	1.92	2.86	4.78	0.602 $\pm$ 0.003	0.068 $\pm$ 0.005	Small	Submetacentric
7	1.79	2.75	4.54	0.606 $\pm$ 0.011	0.065 $\pm$ 0.004	Small	Submetacentric
8	1.66	2.56	4.22	0.607 $\pm$ 0.006	0.060 $\pm$ 0.005	Small	Submetacentric
9	1.55	2.40	3.94	0.609 $\pm$ 0.007	0.056 $\pm$ 0.005	Small	Submetacentric
10	1.46	2.26	3.72	0.608 $\pm$ 0.015	0.053 $\pm$ 0.006	Small	Submetacentric
11	1.35	2.10	3.45	0.609 $\pm$ 0.008	0.049 $\pm$ 0.005	Small	Submetacentric
12	1.38	1.83	3.21	0.570 $\pm$ 0.024	0.046 $\pm$ 0.005	Small	Metacentric
13	1.27	1.65	2.92	0.565 $\pm$ 0.021	0.042 $\pm$ 0.004	Small	Metacentric

Table 2 Cytogenetic publications of the genus *Hoplobatrachus*.

Species	Population	2n	NF	Chromosome type		Reference
				m	sm	
<i>H. tigerinus</i>	India	26	52	-	-	Yadav and Pillai (1975)
	India	26	52	-	-	Chakrabarti <i>et al.</i> (1983)
	India	26	52	16	10	Saba and Tripathi (2014)
	India	26	-	-	-	Alam <i>et al.</i> (2012)
<i>H. rugulosus</i>	China	26	52	18	8	Chang <i>et al.</i> (1984)
	Thailand	26	52	12	14	Supaprom and Baimai (2005)
	Thailand	26	52	20	6	Donsakul (2009)
	Thailand	26	-	-	-	Alam <i>et al.</i> (2012)
	Thailand	26	52	8	18	Suttichaiya <i>et al.</i> (2016)
	Thailand	26	52	8	18	Tengjaroenkul <i>et al.</i> (2017)
	Thailand	26	52	10	16	This study
Hybrid frog (<i>H. rugulosus</i> x <i>H. tigerinus</i>)	Thailand x India	39 (3n)	-	-	-	Alam <i>et al.</i> (2012)

Remarks: 2n = diploid chromosome, 3n = triploid number, NF = fundamental number, m = metacentric chromosome, sm = submetacentric chromosome, and - = not available.

ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและคุณค่าทางอาหารของคีโอเชอรัส

Effect of media on growth and nutritional composition of *Chaetoceros gracilis*

สุพัตรา ขุนเสนาะ, นพวรรณ จิมสังข์*, สถาพร ดิเรกบุษราคัม และสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี

Supattra Khoonsanoh, Noppawan Chimsung, Sataporn Direkbusarakom and Suwit Wuthisuthimethavee

ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

โทร/โทรสาร 0-7567-2390/0-7567-2302 อีเมลล์ sru@wu.ac.th

Research Center of Excellence in Shrimp, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand

Tel/Fax: 0-7567-2390/0-7567-2302 E-mail: sru@wu.ac.th

*Corresponding author: bee_rie@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางโภชนาการคีโอเชอรัส (*Chaetoceros gracilis*) โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตร F/2 ของ Guillard and Ryther (1962), ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) และชุดการทดลองที่ 3 อาหารสำเร็จรูปพร้อมใช้ผลิตโดยศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จากนั้นนำห้วเชื้อ *C.gracilis* จากห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเค็ม (25 ส่วนในพันส่วน) อุณหภูมิ (25 องศาเซลเซียส) และความเข้มแสง (5,000 ลักซ์) ทำการเก็บตัวอย่าง *C. gracilis* เมื่อเลี้ยงครบ 24, 48 และ 60 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์ และวิเคราะห์ค่าโปรตีน ไขมันและสังกะสี ผลการทดลองพบว่า อาหารสูตรที่ 2 มีความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ยอยู่ที่ 6.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณไขมันในเซลล์เฉลี่ยมีค่า 8.82 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ของ *C.gracilis* ซึ่งมีความมากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณค่าโปรตีน และสังกะสี ของ *C.gracilis* ทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สรุปได้ว่า อาหารสูตรที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณไขมันในเซลล์ของ *C.gracilis* มีค่ามากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ

คำสำคัญ: *Chaetoceros gracilis* สูตรอาหาร องค์ประกอบทางโภชนาการ

Abstract

This study aimed to investigate the effects of three different mediums on growth and cellular nutritional composition of *Chaetoceros gracilis*. *C.gracilis* from laboratory of Research Center of Excellence in Shrimp, Walailak University was cultured under control laboratory conditions; salinity (25 ppt), temperature (25 °C) and light intensity (5,000 lux). Three treatments were performed as treatment 1; F/2 of Guillard and Ryther (1962), treatment 2; modified F/2 of Guillard and Ryther (1962) and treatment 3; media from Research Center of Excellence in Shrimp, Walailak university. Algal cells were collected and counted at 24, 48 and 60 hr after culture using a hemacytometer. Ash, protein content, lipid content and zinc content were analyzed in each treatment. The result showed that treatment 2 has highly average cell density and lipid content (6.08×10^6 cell/ml, $8.82 \pm 0.41\%$ lipid per cell, respectively) and it has significantly different ($p < 0.05$) comparing with the others. However, the specific growth rate, ash, protein content and zinc content of *C.gracilis* were not significant difference in all treatments. Finally, treatment 2 modified F/2 of Guillard and Ryther (1962) can be increased cell density and lipid content than other treatments.

Keywords: *Chaetoceros gracilis*, media, nutritional composition

คำนำ

คีโตเซอรอส (*Chaetoceros gracilis*) เป็นไดอะตอมที่มีคุณค่าทางอาหารสูงซึ่งประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA) (Tokushima *et al.*, 2016) วิตามิน (Brown *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1989) และสารสี เช่น Fucoxanthin, β -carotene, Chlorophyll (Foo *et al.*, 2015; Tokushima *et al.*, 2016) ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ *C.gracilis* เป็นอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างแพร่หลาย มีรายงานการเลี้ยงเป็นอาหารสำหรับแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น โรติเฟอร์ (Ortega-Salas and Reyes-Bustamante, 2013) อาร์ทีเมีย (Ahmadi *et al.*, 2017) ก่อนจะใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน หรือใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนโดยตรง (Khojasteh *et al.*, 2013) รวมทั้งเสริมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งวัยรุ่น (Ekawati *et al.*, 2013) ซึ่งส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Ekawati *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตและคุณค่าทางโภชนาการของ *C.gracilis* ขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยง โดยมีรายงานว่า อุณหภูมิสูงสุดที่เลี้ยง *C.gracilis* ไม่ควรเกิน 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญควรอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 17-25 ส่วนในพันส่วน ความเข้มแสง 500-10,000 ลักซ์ (Wongrat and Wongrat, 2003) อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการของ *C.gracilis* ซึ่งอาหารที่นิยมใช้เลี้ยง *C.gracilis* มีหลายสูตร สูตรที่นิยมคือ อาหาร F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) (Kutako *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยที่ปรับปรุงสูตรอาหารดังกล่าว เพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะการเลี้ยงในประเทศไทย ในงานวิจัยของ Pimolrat (2009) ได้ศึกษาการผลิต *C.gracilis* โดยใช้อาหาร 4 สูตรด้วยกัน คือ อาหารสูตรมาตรฐาน Guillard and Ryther (1962) F/2, สูตร F/2 m (เป็นสูตรจากศูนย์วิจัย

ความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์), อาหารทางการค้าชนิด A และ อาหารทางการค้าชนิด B โดยเซลล์ เริ่มต้นที่ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร F/2 m มีความหนาแน่น เซลล์ 1.2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสูงสุด อีกทั้งยังมีองค์ประกอบทางชีวเคมีในส่วนของโปรตีน 62.21 เปอร์เซ็นต์ ของวัตถุแห้ง และไขมันรวม 14.76 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง รวมทั้งมีอาหารสำเร็จพร้อมใช้ของศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อความสะดวกสำหรับการใช้งาน ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบอาหารเลี้ยง *C.gracilis* ที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการสะสมของ ไขมัน ใน *C.gracilis* โดยเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม และศึกษา ปริมาณของสังกะสีใน *C.gracilis* ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต โดยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ เอมไซม์ของกุ้งขาว รวมทั้งพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้งขาว ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการใช้ประโยชน์ *C. gracilis* เป็นแหล่งอาหารเสริมสำหรับกุ้งขาวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) โดยมีสูตรอาหาร 3 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 อาหาร F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) อาหารสูตรที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) และ อาหารสูตรที่ 3 สูตรอาหารพร้อมใช้จากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ทำการเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 5 ลิตร จำนวน 3 ซ้ำต่อสูตรอาหาร ภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนที่มีการควบคุมสภาวะ

การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารสูตรที่ 1 ตาม Guillard and Ryther (1962) และอาหารสูตรที่ 2 (ส่วนประกอบดังแสดงใน Table 1) ทำการเตรียมสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร ให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อโดยใส่ในขวดคูแรน (สีชา) ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไป autoclave เพื่อฆ่าเชื้อและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เพื่อบริการใช้งาน ส่วนสูตรอาหารที่ 3 เป็นสูตรอาหารเหลวพร้อมใช้สำหรับงานทดลอง

Table1 Composition of media (g/L)

Formula	media 1 of Guillard and Ryther (1962)	media F/2 of Guillard and Ryther (1962) modified
NaNO ₃	0.075	-
Urea	-	84.15
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	0.005	6.00
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15	2.90
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36	10.00
Vitamin B1	0.1	0.40
Vitamin B12	0.0005	0.002
Biotin	0.0005	0.10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	1.96
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022	4.40
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.006	1.26
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18	36.00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01	2.00
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.03	33.00

นำข้อมูลที่ได้จากตารางข้างต้นคำนวณอัตราส่วน N:P (Rasdi and Qin, 2002)

ดั่งสมการ หามวลโมเลกุลของสาร = มวลอะตอมของธาตุในโมเลกุลรวมกัน

ไนโตรเจน = (ปริมาณสารที่ใช้ x มวลโมเลกุลของไนโตรเจน) / มวลอะตอมของธาตุในโมเลกุลรวมกัน

ฟอสเฟอรัส = (ปริมาณสารที่ใช้ x มวลโมเลกุลของฟอสเฟอรัส) / มวลอะตอมของธาตุในโมเลกุลรวมกัน

หาอัตราส่วน ของ N:P

การเลี้ยง *C.gracilis*

หัวเชื้อ *C.gracilis* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นำมาเลี้ยงในขวดโหลแก้วขนาด 5 ลิตร เติมสูตรอาหาร โดยกำหนดความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Pimolrat, 2009) มีการควบคุมสภาวะการเลี้ยง ได้แก่ น้ำทะเลฆ่าเชื้อความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ที่ระดับความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ และให้อากาศต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง เติมอาหารทุก ๆ 12 ชั่วโมง (Pimolrat, 2009)

การเจริญเติบโตของ *C.gracilis*

ทำการเก็บตัวอย่าง *C.gracilis* เมื่อเลี้ยงครบ 24, 48 และ 60 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์ *C.gracilis* โดยใช้ hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่มีกำลังขยาย 40x (Wongrat and Wongrat, 2003) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: μ) ตามวิธีการของ Guillard and Ryther (1962) อ้างโดย Wongrat and Wongrat (2003)

$$\text{ดังสมการ} \quad \mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

X_1 = ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

X_2 = ความหนาแน่นเซลล์วันที่เก็บเกี่ยว (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t_1 = เวลาที่เริ่มเพาะเลี้ยงสำหรับ (ชั่วโมง)

t_2 = ระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์สำหรับ (ชั่วโมง)

การเตรียมตัวอย่าง *C.gracilis* สำหรับการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

นำ *C.gracilis* ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารในแต่ละสูตร มาใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการตกตะกอนเซลล์ โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Thermo Scientific รุ่น Sorvall Legend XTR Centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ของสาหร่ายมาใส่ในขวดกันกลม เพื่อให้เซลล์เคลือบอยู่ที่ผิวด้านในของขวดกันกลมแล้วนำไปกลิ้งในอ่างเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส (EYELA รุ่น FDU-1100) และนำไปแช่ที่ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) (EYELA รุ่น PFR-1000) ได้เซลล์แห้งของไดอะตอมเพื่อการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของ *C.gracilis*

เซลล์แห้งของ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารแต่ละสูตร นำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ เถ้า ตามวิธี AOAC (1990) โปรตีน โดยเครื่อง C/N combustion รุ่น TRU SPAC® Combustion ไขมัน ดัดแปลงจากวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) และวิเคราะห์แร่ธาตุสังกะสี (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบทางเดียว (One way analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Rang Test : DMRT)

ผลการวิจัย

1. จำนวนเซลล์ของ *C.gracilis*

ผลการเลี้ยง *C.gracilis* โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 อาหารสูตรปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther (1962) และสูตรอาหารที่ 3 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มีความหนาแน่นของเซลล์ *C.gracilis* เมื่อเลี้ยงไป 48 และ 60 ชั่วโมง สูงกว่าการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2)

Table 2 Density of *C.gracilis*

Treatment	Density of <i>C.gracilis</i> (10^6 cells/mL)			
	1 st sampling (24 hour)	2 nd sampling (48 hour)	3 rd sampling (60 hour)	3 timer Arerage
T1	2.10 ± 0.12^a	4.36 ± 0.14^a	6.84 ± 0.32^a	4.43 ± 2.4^a
T2	3.02 ± 0.08^a	6.07 ± 0.13^b	9.14 ± 0.15^b	6.08 ± 2.5^a
T3	2.52 ± 0.08^a	5.44 ± 0.2^b	8.35 ± 0.3^b	5.44 ± 2.4^a

Values with different superscript (a-b) differ significantly ($p > 0.05$)

¹ Values are means $\pm$ SD (n=3)

T 1 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962)

T 2 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962) modified

T 3 = media from the Center of Excellence in Shrimp Research Walailak University

2. อัตราการเจริญเติบโตของ *C.gracilis*

ผลการเลี้ยง *C.gracilis* โดยใช้สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 ชุดการทดลอง พบว่า *C. gracilis* ที่ได้รับสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (Table 3)

Table 3 Specific growth rate fo *C.gracilis*

Treatment	Specific growth rate of <i>C.gracilis</i> (10^{-2} /hour)			
	1 st sampling (24 hour)	2 nd sampling (48 hour)	3 rd sampling (60 hour)	3 timer Arerage
T1	0.59 ± 0.02^a	0.46 ± 0.01^a	0.44 ± 0.01^a	0.49 ± 0.01^a
T2	0.78 ± 0.01^a	0.51 ± 0.01^a	0.49 ± 0.01^a	0.59 ± 0.01^a
T3	0.68 ± 0.02^a	0.50 ± 0.01^a	0.47 ± 0.01^a	0.55 ± 0.01^a

Values with different superscript (a-b) differ significantly ($p > 0.05$)

¹ Values are means $\pm$ SD (n=3)

T 1 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962)

T 2 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962) modified

T 3 = media from the Center of Excellence in Shrimp Research Walailak University

3. คุณค่าทางโภชนาการของ *C. gracilis*

สูตรอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อคุณค่าทางอาหาร โดยพบว่า *C.gracilis* ที่ได้รับสูตรอาหารที่ 2 มีปริมาณไขมัน (8.82 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 และ 3 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีค่าสูงกว่า *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณเถ้าและสังกะสีของ *C.gracilis* ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) (Table 4)

Table 4 Nutritional composition of *C.gracilis*

Treatment	Protein ¹ (%)	Lipid ¹ (%)	Ash ¹ (%)	Zinc ¹ (mg/kg)
T1	14.53 ± 0.15 ^a	5.04 ± 0.51 ^a	57.86 ± 0.29 ^a	1074 ± 18.12 ^a
T2	17.23 ± 0.05 ^b	8.82 ± 0.41 ^b	58.61 ± 0.17 ^a	1053.8 ± 18.64 ^a
T3	16.01 ± 0.22 ^b	5.65 ± 0.24 ^a	57.74 ± 0.18 ^a	995.84 ± 16.27 ^a

Values with different superscript (a-b) differ significantly ($p > 0.05$)

¹ Values are means ± SD (n=3)

T 1 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962)

T 2 = media F/2 of Guillard and Ryther (1962) modified

T 3 = media from the Center of Excellence in Shrimp Research Walailak University

สรุปและวิจารณ์ผล

แหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *C.gracilis* โดยสูตรอาหารที่ 1 มีแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกับสูตรอาหาร 2 และ 3 (Table 1) โดยสูตรอาหารที่ 1 ใช้ โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) เป็นแหล่งไนโตรเจน (N=14) ในขณะที่สูตรอาหารที่ 2 และ 3 ใช้ ยูเรีย (NH_2CONH_2) เป็นแหล่งไนโตรเจน (N=28) ส่งผลให้ *C.gracilis* ที่ได้รับสูตรอาหารที่ 2 และ 3 มีปริมาณเซลล์สูงสุด สอดคล้องกับรายงานของ Pimolrat (2009) ที่ได้ทำการทดลองเลี้ยง *C.gracilis* โดยเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน พบว่า *C. gracilis* ที่ใช้ ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน มีจำนวนเซลล์สูงสุด เมื่อเทียบกับ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วย โซเดียมไนไตรท์ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานของ Tokushima *et al.* (2016) ที่สรุปผลการศึกษาว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะส่งผลให้จำนวนเซลล์ของ *C.gracilis* เพิ่มจำนวนมากกว่า การเลี้ยงโดยใช้โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) เป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้เนื่องจาก *C.gracilis* สามารถนำยูเรียไปใช้ได้โดยทันทีเมื่อเทียบกับไนไตรท์ที่ต้องอาศัยกระบวนการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ใช้งานได้ ทั้งนี้ Wongrat and Wongrat (2003) ได้อธิบายกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนในเซลล์แพลงก์ตอนไว้ว่า การใช้ไนไตรท์เป็นแหล่งไนโตรเจน แพลงก์ตอนไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันที จำเป็นต้องนำไปผ่านกระบวนการรีดักชันให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ได้ แต่ไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่มี

ความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ นอกจากนี้ในสูตรอาหารที่ 2 และ 3 มีปริมาณของซิลิกาสูงกว่าสูตรอาหารที่ 1 ถึง 2 เท่า ด้วยเหตุที่ซิลิกาเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเปลือกหรือ ฟรอสทูล ของไดอะตอม (Taguchi et al., 1987) จึงส่งผลให้ *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 และ 3 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่า *C. gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามปัจจัยข้างต้นไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *C.gracilis* เมื่อพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของซิลิกาซิลิกาที่มีในสูตรอาหารที่ 2 ไม่ส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างของเซลล์ *C.gracilis*

นอกจากนี้ อัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (N:P ratio) ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอน ซึ่งอัตราส่วนของ N:P ที่เหมาะสมสำหรับแพลงก์ตอนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Qingtian and Guikun, 2011) มีรายงานว่าอัตราส่วน N:P ที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 16:1 (Downing and McCauley, 1992) อย่างไรก็ตาม Qingtian and Guikun (2011) สรุปผลจากการทดลองเลี้ยง *C. gracilis* ในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารสูตร F/2 พบว่าอัตราส่วนของ N:P ขึ้นอยู่กับแหล่งของไนโตรเจน โดยเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ยูเรีย ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) และแหล่งของฟอสฟอรัสจาก NaH_2PO_4 ควรมีอัตราส่วนของ N:P เป็น 40:1 และ 60:1 ตามลำดับ ซึ่งในการทดลองนี้อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรมีอัตราส่วนของ N:P แตกต่างกัน โดยสูตรอาหารที่ 2 มีอัตราส่วนของ N:P สูงสุด (17:1) ในขณะที่สูตรที่ 1 และ 3 มีค่า 12:1 และ 15:1 ตามลำดับ ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้สัดส่วนของ N:P ของสูตรอาหารที่ 2 แม้จะมีค่าสูงใกล้เคียงกับค่าที่แนะนำ แต่ยังไม่ถึงระดับที่เหมาะสม จึงส่งผลที่ไม่ชัดเจนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของไดอะตอม

สภาวะการเลี้ยงและสูตรอาหารมีผลต่อคุณค่าทางอาหารของเซลล์ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าทางโภชนาการพบว่า *C.gracilis* ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ 2 มีค่าไขมันที่สูงกว่าไดอะตอมที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารอื่น เพราะอัตราส่วนของ N:P ในอาหารสูตร 2 ที่สูงกว่าสูตรอื่นส่งผลต่อการสะสมไขมันภายในเซลล์ของ *C. gracilis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rasdi and Qin (2002) ที่ทำการศึกษาในแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis oculata* และ *Isochrysis lutea* พบว่า อัตราส่วน N:P ในอาหารมีผลต่อปริมาณสารอาหารภายในเซลล์ โดยปริมาณของไขมันในเซลล์เพิ่มสูงสุดเมื่อระดับของ N:P อยู่ที่ 120:1 ทั้งนี้เนื่องจากฟอสฟอรัสที่น้อยเป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญเติบโตทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ไขมันมากขึ้น (Rasdi and Qin, 2002) ซึ่งปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์แพลงก์ตอนพืช มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกิ้ง เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนโปรสเตกาแลนดิน (Niu et al., 2012)

สังกะสีเป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของแพลงก์ตอน สังกะสีจะถูกใช้ในกระบวนการตรึงและส่งผ่านคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์คาร์บอนิก นอกจากนี้สังกะสียังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการทำงานของระบบเอนไซม์ต่างๆ อีกทั้งเป็นองค์ประกอบของเปลือกหรือโครงสร้างภายนอกของ *C. gracilis* (Morel et al., 1994) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่พบว่าปริมาณ *C.gracilis* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร 2 มีจำนวนเซลล์สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เพราะสูตรอาหาร 2 มีปริมาณสังกะสีมากกว่าสูตรอาหาร 1 ถึง 200 เท่า (Table 1) อย่างไรก็ตามปริมาณสังกะสีของ *C.gracilis* ในทุก

ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) (Table 4) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าการเพิ่มสังกะสีในสูตรอาหารจะช่วยให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการสะสมของสังกะสีภายในเซลล์ ทั้งนี้เพราะปริมาณสังกะสีที่สะสมในเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Shimei *et al.*, 2013) อีกทั้งสังกะสียังส่งผลในกระบวนการย่อยของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการใช้ประโยชน์จากสารอาหาร และเป็นองค์ประกอบของฮอร์โมนอินซูลินและเอนไซม์หลายชนิด เป็นโคแฟกเตอร์ในการสร้างกรดนิวคลีอิกและการสร้างโปรตีนกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนเพศผู้ และดึงวิตามินเอ ออกจากแหล่งเก็บคั่งในตับ (Jean *et al.*, 2002)

เมื่อพิจารณาถึงราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรอาหาร โดยคำนวณจากปริมาณของอาหารที่ใช้ต่อปริมาณน้ำสำหรับเพาะเลี้ยงไดอะตอม พบว่า สูตรอาหารที่ 3 มีราคาสูงสุด (0.35 บาท/ลิตร) ตามด้วย อาหารสูตร 2 (0.25 บาท/ลิตร) และอาหารสูตร 1 มีราคาถูกลง (0.2 บาท/ลิตร)

สรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงไดอะตอม *C. gracilis* ด้วยสูตรอาหารที่ 2 (สูตรอาหารอาหารปรับปรุง F/2 ของ Guillard and Ryther, 1962) ซึ่งใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เพิ่มอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสและเพิ่มซิลิเกต ส่งผลให้เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีปริมาณโปรตีนและไขมันภายในเซลล์มากขึ้นด้วย เหมาะสมในการนำไปใช้อบเลี้ยงลูกกุ้ง

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และทุนอุดหนุนจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศทางด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

อ้างอิง

- Adams, C. and Bugbee, B. 2013. Enhancing lipid production of the marine diatom *Chaetoceros gracilis*: synergistic interactions of sodium chloride and silicon. *Journal of Applied Phycology*. 26(3): 1351-1357.
- AOAC (Association of official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis the Association of official Analytical Chemists (15th ed.). VA: Chemists.
- Ahmadi, A., Mozanzadeh, M.T., Agh, N. and Bahabadi, M.B. 2017. Effects of enriched *Artemia* with *Saccharomyces cerevisiae* and *Chaetoceros gracilis* on growth performance *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 5(2): 669-673.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canada Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.

- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., Wilson, R.P. and Wee, K.L. 1997. Nutritional properties of microalgae for urine culture. *Aquaculture* .151: 315-331.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. and Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. CSIRO marine laboratories report. 29-44.
- Downing, J.A. and Mccauley, E. 1992. The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. *Limnol. Oceanography*. 37: 936-945.
- Ekawati, A.W., Nursyam, P., Widjayanto, E. and Marsoedi. 2013. *Chaetoceros ceratosporum* Diatomae in feed formula to Increase growth and Postlarvae Immunity of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fed) to *Vibrio harveyi* Infection. Indonesia: Brawijaya University. 3: 33-36.
- Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Chan, K.W., Khons, N.M.H. and Yau, S.K. 2015. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Algal Research*. 12: 26-30.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*. 8: 229-239.
- Jean, J., Blais, B., Darveav, A. and Fliss, I. 2002. Rapid detection of human rotavirus Using colorimetric nucleis and sequence based amplification (NASBA)-enzyme-linked immunosorbent assay in sewage treatment effluent. *FEMS Microbiology Letters*. 210: 143-147.
- Kutako, M., Khamtongdee, S., Setthamongkol, P., Jamkratoke M. and Yuvanatemiya, V. 2014. The effect of nutrients on growth of a marine diatom *Chaetoceros* sp. in Recycled diatom cultured water. *Journal of Fisheries Technology Research*. 74-83. [in Thai]
- Khojasteh, Z., Davoodi, R., Vaghei, R.G. and Nooryazdan, H. 2013. Department survival Development and Growth of Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Zoea Fed with Monoalgae (*Chaetoceros* and *Tetraselmis*) Diets. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 5(5): 553-55.
- Morel, F.M.M., Reinfelder, J.R., Roberts, S.B., Chamberlain, C.P., Lee, J.G. and Yee, D. 1994. Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton. *Nature*. 369: 740-42.
- Niu, J. P. F., Chen, L. X., Tian, Y. J., Liu, H. Z., Lin, H. J., Yang and G. Y., Liang. 2012. Excess dietary cholesterol may have an adverse effect on growth performance of early postlarval *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 3:19.
- Ortega-Salas, A.A. and Reyes-Bustamante, H. 2013. Cultivation of the microalgae *Chaetoceros gracilis* to feed the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of the Costa Rican Distance Education University*. 5(2): 553-555.

- Pimolrat, P. 2009. Production of high cell density *Chaetoceros gracilis* in laboratory for nursing marine shrimp larvae. Master degree. Agricultural Science. Walailak University, Nakhon Si Thammarat. 40-47. [in Thai].
- Qingtian, Z. and Guikun, H.U. 2011. Effect of nitrogen to phosphorus ratios on cell proliferation in marine micro algae. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 29(4): 739-745.
- Rasdi, N.W. and Qin, J.G. 2002. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis lutea*. Journal of Applied Phycology. 27: 2221–2230.
- Shimei, L., Xin, L., Yang, Y., Fajian, L. and Li, L. 2013. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 406–407: 79–84
- Taguchi, S., Hirata, J.A. and Laws, E.A., 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. Journal of Phycology. 23: 260–267.
- Tokushima, H., Inoue-Kashino, N., Nakazato, Y., Masuda, A., Ifuku, K. and Kashino, Y. 2016. Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer. Biotechnology for Biofuels. 9: 235.
- Wongrat, L., and Wongrat, P. 2003. Phytoplankton. Kasetsart University: Bangkok. 35:11-21[in Thai].

การเปรียบเทียบมวลชีวภาพ และคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก่อ ในการเพาะเลี้ยงระบบปิดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

Comparison of Biomass and Nutrition Values of Kai Algae Cultivation in Environmentally Closed System

ธัญญลักษณ์ มาลา^{1*} จงกล พรหมยะ¹ ดวงพร อมรเลิศพิศาล¹ และวิจิตรา แดงปรก²

Tanyaluk Mala^{1*} Jongkol Promya² Doungporn Amornlerdpison² and Wichittra Daengprok²

¹คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

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

²คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Faculty of Engineering and agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, 50290

*Corresponding author: tanyaluk.mala@gmail.com

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบมวลชีวภาพ และคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก่อ ในการเพาะเลี้ยงระบบปิดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษามวลชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และคุณภาพน้ำของสาหร่ายไก่อในสูตรอาหารที่ต่างกัน วางแผนการทดลองแบบ RCBD แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 6 ซ้ำ คือ ชุดการทดลองที่ 1 (T₁) น้ำประปา (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 (T₂) ใช้สารอาหาร N:P:K (16:16:16) 0.002 กรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่ 3 (T₃) ใช้สารอาหาร NaHCO₃ 2.13 กรัมต่อลิตร NaNO₃ 0.38 กรัมต่อลิตร และ K₂HPO₄ 0.13 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ระบบ raceway ponds เก็บข้อมูลทุกๆ 15 วัน ระยะเวลา 180 วัน พบว่า มวลชีวภาพในรูปสาหร่ายไก่อสด ใน T₂ มีค่าเท่ากับ 1,140 กรัมต่อตารางเมตร มากกว่า T₁ และ T₃ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อนำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่า T₃ มีค่าโปรตีน 32.03 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 18.82 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 28.42 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าชุดการทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชุดการทดลองที่ 3 มีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าชุดการทดลองอื่น และมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

คำสำคัญ: สาหร่ายไก่อ มวลชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการ

Abstract

Comparison of biomass and nutrition values of Kai algae cultivation in environment friendly closed system was investigated. The aim of this research was to determine biomass, nutrition values and water quality of Kai algae cultured in different formula. The RCBD experiments were divided into three treatments, with six replication each: T₁ Water Supply (Control), T₂ with N: P: K (16:16:16) 0.002 g/L and T₃ with NaHCO₃ 2.13 g/L, NaNO₃ 0.38 g/L and K₂HPO₄ 0.13 g/L. The experiment was set up in raceway ponds. The data was collected every 15 days over a 180 days

culture period. The results showed that: the biomass of raw Kai algae in T_2 was equal to 1140 g/m^2 , significantly higher than T_1 and T_3 , respectively ($p < 0.05$). The nutrition value analysis, it was revealed that T_3 had protein 32.03% , fat 18.82%, and fiber 28.42%, significantly higher than other treatments ($p < 0.05$). It can be concluded that: T_3 had higher nutrition values than the other treatments, so it was possible to further develop as a food product.

Keywords: Kai algae, biomass, nutrition values

คำนำ

สาหร่ายไค *Cladophora* และ *Rhizoclonium* เป็นสาหร่ายสีเขียวน้ำจืดขนาดใหญ่ อยู่ใน Division Chlorophyta เป็นสาหร่ายประเภทยึดเกาะขนาดใหญ่ที่เจริญทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม สาหร่ายไคจะเจริญในน้ำใส และกระแสน้ำไหลไม่แรงมาก จะเจริญโดยการยึดเกาะกับก้อนหินทั่วลำน้ำ Peerapornpisal *et al.* (2009) กล่าวว่าสาหร่ายไคมีมากในลำน้ำน่าน บริเวณอำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน และลำน้ำโขง บริเวณอำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย ในช่วงฤดูหนาวต่อกับฤดูร้อน ประชากร 2 ผังลำน้ำนี้จะนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นอาหาร มีโปรตีนสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 21 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 31 เปอร์เซ็นต์ วิตามินบี 1 บี 2 และแร่ธาตุต่างๆ มีซิลิเนียมมากที่สุดซึ่งเป็นสารป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายไค อนุมูลอิสระมีบทบาทในการเกิดการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อมีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่างๆ

Khuantrairong and Traichaiyaporn (2010) กล่าวว่าปัจจุบันมีปัญหาผลกระทบทางน้ำ ประกอบกับสภาพอากาศและฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะโลกร้อน ทำให้สาหร่ายไคเจริญเติบโตได้เพียงไม่กี่เดือนเท่านั้น โดยเฉพาะสาหร่ายไคในแม่น้ำโขงซึ่งได้รับผลกระทบอย่างมากจากการสร้างเขื่อนในประเทศจีน ส่งผลให้น้ำมีตะกอนมาก และบางช่วงเกิดภาวะน้ำในแม่น้ำเหือดแห้งจากการปิดเขื่อนในประเทศจีน ทำให้สาหร่ายไคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และสาหร่ายไคที่เก็บจากลำน้ำน่าน จังหวัดน่านอาจมีสารพิษปนเปื้อนจากสารเคมี ทำให้เมื่อนำมารับประทานอาจจะไม่ปลอดภัย (Posttoday, 2016: online) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยของ Traichaiyaporn *et al.* (2006) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไคโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงอาหารที่มีอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส เท่ากับ 4:1 มาทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไคในโหลแก้ว และเพาะเลี้ยงสาหร่ายไคในตู้กระจกที่มีระบบน้ำหมุนเวียน เพื่อทำให้สามารถเพาะเลี้ยงและเก็บผลผลิตสาหร่ายไคได้ตลอดทั้งปี และช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงอาหารให้มีคุณภาพดีขึ้น แต่การใช้น้ำทิ้งและสารอาหารบางชนิดมาเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักด้วย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการเพาะเลี้ยงเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว และเพื่อให้สามารถผลิตสาหร่ายไคได้ตลอดทั้งปีและทำเพาะเลี้ยงในระบบปิดจึงสามารถควบคุมสารพิษปนเปื้อนในน้ำที่อาจปนอยู่ในสาหร่ายนั้นได้ตลอดจนสารอาหารที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สาหร่ายไคปลอดภัยต่อผู้บริโภค แล้วยังสามารถถ่ายทอดความรู้ให้กับเกษตรกร และผู้ที่สนใจนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อประกอบอาชีพได้โดยไม่ต้องรอเก็บสาหร่ายไคจากธรรมชาติ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบเจริญของสาหร่ายไก่อในสูตรอาหารที่ต่างกัน คุณค่าทางโภชนาการ และคุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงของสาหร่ายไก่อ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพิ่มมูลค่าทรัพยากรทางน้ำให้เกิดการพัฒนาที่ยั่งยืนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. นำหัวเชื้อสาหร่ายไก่อจากฐานเรียนรู้สาหร่าย แพลงก์ตอน และพืชน้ำ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มาเพาะเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ระบบน้ำหมุนเวียนแบบ raceway ponds (ขนาด 1.5×3.4×0.6 เมตร) ให้สาหร่ายยึดเกาะกับตาข่ายพลาสติก ใช้หัวเชื้อสาหร่ายตั้งต้น 200 กรัม (น้ำหนักเปียก) (Figure 1)

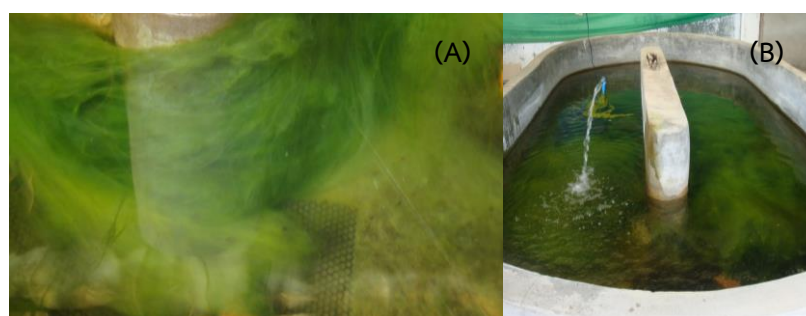


Figure 1 (A) Kai algae and (B) Cement pond

2. แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ๆ ละ 6 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 (T_1) ใช้น้ำประปา (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 (T_2) ใช้สารอาหาร N:P:K 0.002 กรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 (T_3) ใช้สารอาหาร NaHCO_3 2.13 กรัมต่อลิตร NaNO_3 0.38 กรัมต่อลิตร และ K_2HPO_4 0.13 กรัมต่อลิตร

3.เตรียมน้ำประปาลงในบ่อที่เตรียมไว้โดยมีระดับน้ำสูง 20 เซนติเมตร ละลายสารอาหารสูตรต่างๆ ในน้ำประปาที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นเปิดปั้มน้ำเพื่อให้สารอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นนำหัวเชื้อสาหร่ายไก่อที่ล้างน้ำสะอาดแล้วใช้กรรไกรตัดให้มีความยาวประมาณ 1 นิ้ว (จำนวน 200 กรัม/น้ำหนักสดต่อบ่อ) แล้วนำสาหร่ายไก่อที่ตัดแล้วมาใส่ในตะแกรงพลาสติก และลงเลี้ยงในบ่อซีเมนต์

4. เปิดระบบหมุนเวียนน้ำ เพื่อให้มีกระแสไหลเวียนตลอดเวลา

5. ระหว่างการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญโดยวัดจากความยาวของเส้นสาย และคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพและเคมี ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ วัดโดยเทอร์โมมิเตอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง วัดโดย pH meter ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ วิเคราะห์โดย Winkler's method แบบ Azide modification แอมโมเนีย วิเคราะห์โดย Phenate method ออร์โธฟอสเฟต วิเคราะห์โดย Stannous chloride ไนไตรท์ วิเคราะห์โดย Reddish purple azo dye method และไนเตรท วิเคราะห์โดย Hydrazine วิเคราะห์ทุก 15 วัน

6. หลังการเพาะเลี้ยง 180 วัน เก็บมวลชีวภาพของสาหร่ายไก่อนำไปอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าสาหร่ายจะแห้ง และนำมาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เยื่อใย ความชื้น และเถ้า โดยวิธีของ AOAC (1984)

7. นำข้อมูลการเจริญ คุณค่าทางโภชนาการ และคุณภาพน้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิเคราะห์ ค่าความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่าง Treatment โดยวิธี Duncan's Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ผลผลิตสาหร่ายไกสด

สาหร่ายไก่อทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีความยาวเริ่มต้นเท่ากับ 1 นิ้ว (หัวเชื้อตั้งต้น 200 กรัม น้ำหนักเปียก ต่อป๋อ) และความยาวจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง และเริ่มมีความแตกต่างกันชัดเจนตั้งแต่เดือนที่ 2 เป็นต้นไป (Figure 2A) และมวลชีวภาพของสาหร่ายไก่อทั้ง 3 ชุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ 1 มีค่า 340 กรัมต่อตารางเมตร ชุดการทดลองที่ 2 มีค่า 1,140 กรัมต่อตารางเมตร และชุดการทดลองที่ 3 มีค่า 160 กรัมต่อตารางเมตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชุดการทดลองที่ 2 มีค่ามากกว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 3 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Figure 2B)

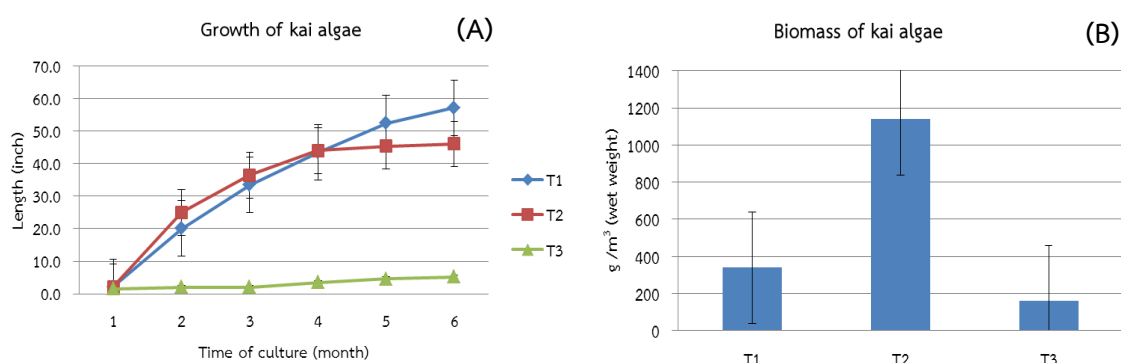


Figure 2 (A) Length of Kai algae and (B) Wet production of Kai algae

2. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก่อที่เพาะเลี้ยงในชุดการทดลองที่ 3 มีค่าโปรตีน 32.03 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1.82 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 28.42 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 7.61 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 มีค่าเถ้า 32.56 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 1 มีค่าคาร์โบไฮเดรต 27.82 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Figure 3)

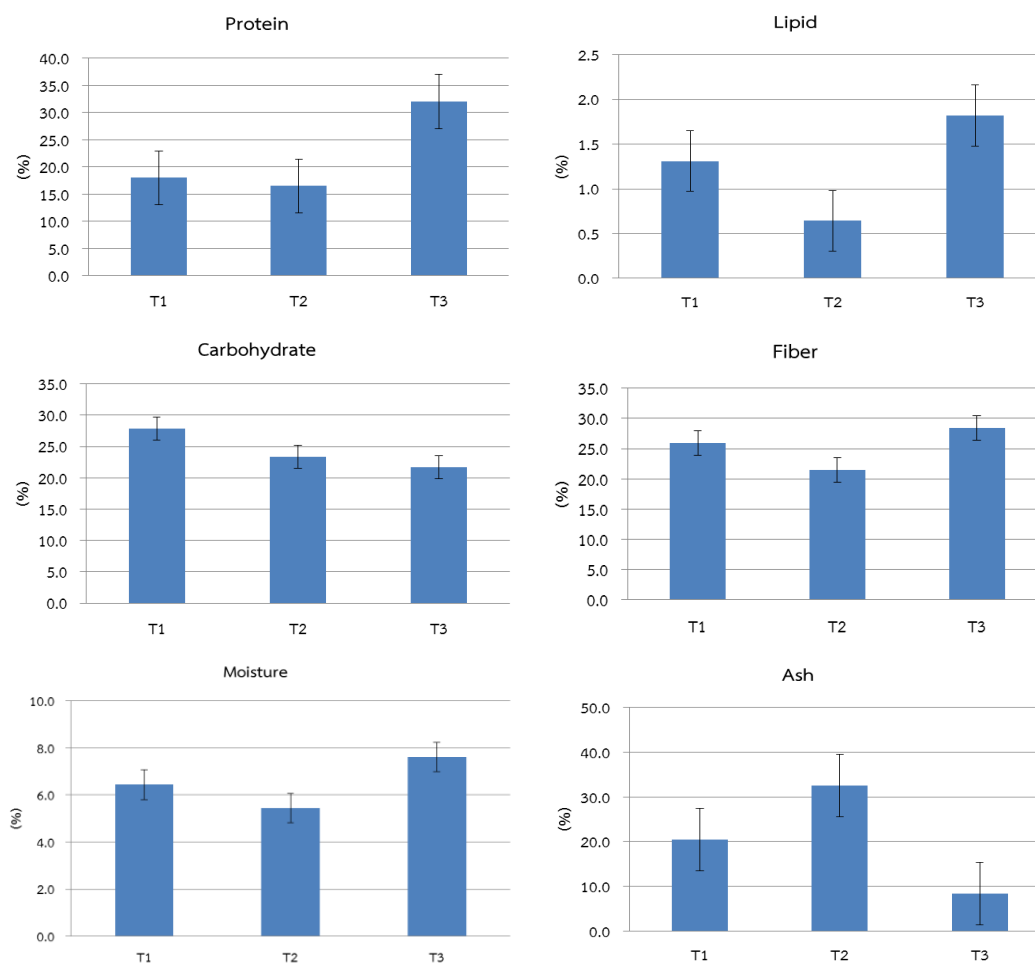


Figure 3 Nutritional values of Kai algae

3. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไคในทุกชุดการทดลอง มีค่าอุณหภูมิอากาศ (Air temperature) ระหว่าง 27.5-37.5 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิน้ำ (Water temperature) ระหว่าง 22.0-28.5 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 8.40-9.55, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) ระหว่าง 5.8-9.9 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนีย (NH_3) ระหว่าง 0.00-0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าอุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และแอมโมเนีย ทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ออร์โธฟอสเฟต (PO_4) ระหว่าง 1.72-81.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ (NO_2) ระหว่าง 6.37-10.32 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนเตรท (NO_3) ระหว่าง 8.90-191.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าออร์โธฟอสเฟต ไนไตรท์ และไนเตรท ชุดการทดลองที่ 3 มากกว่า ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 อย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) (Figure 4)

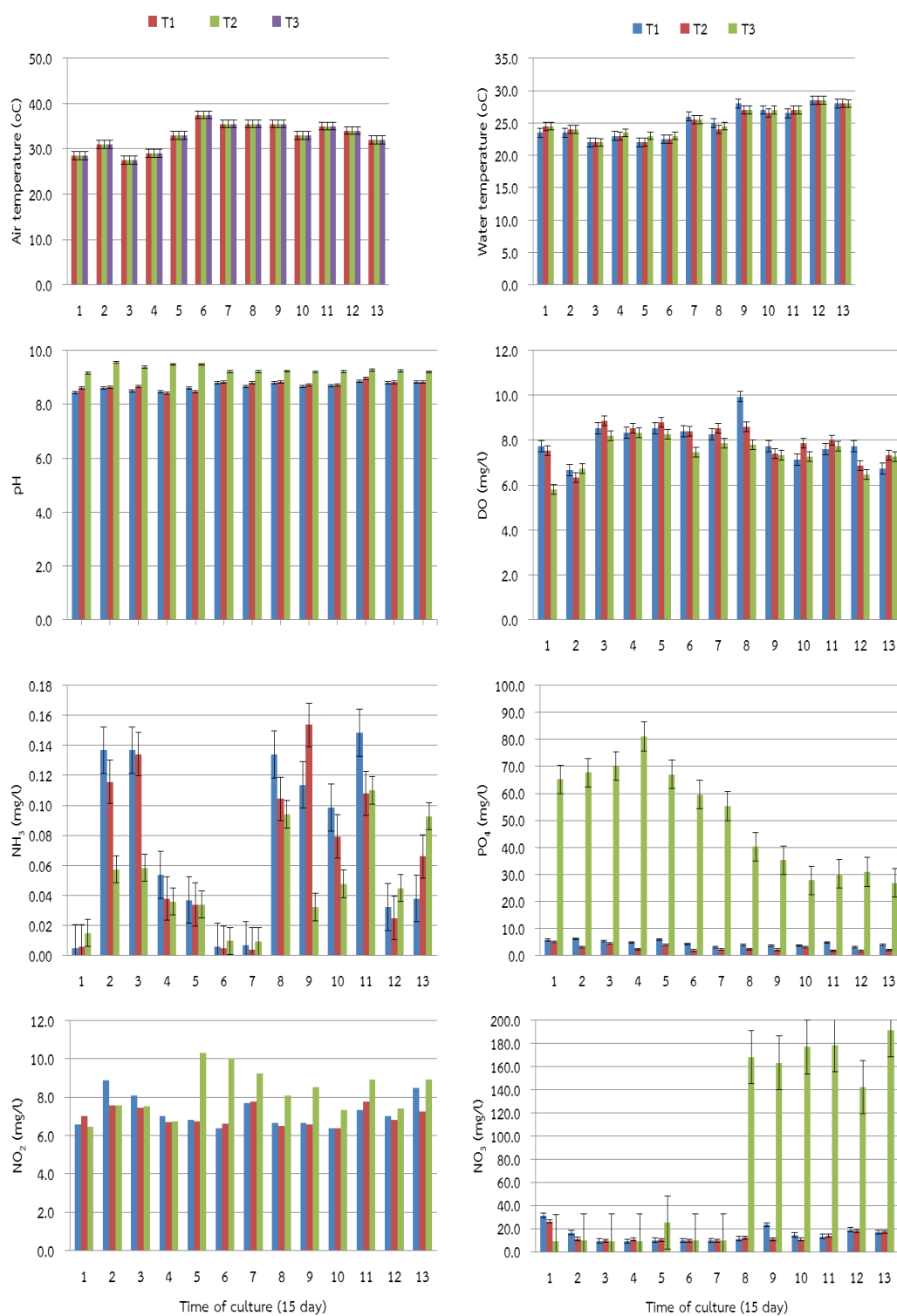


Figure 4 Water quality of Kai algae culture

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไก่อโดยใช้สูตรอาหารต่างกัน พบว่าชุดการทดลองที่ 2 สาหร่ายไก่อมีผลผลิตโดยน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 1,140 กรัมต่อตารางเมตร (น้ำหนักเปียก) รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่ 1 คือ 340 กรัมต่อตารางเมตร (น้ำหนักเปียก) และชุดการทดลองที่ 3 คือ 160 กรัมต่อตารางเมตร (น้ำหนักเปียก) ซึ่งมากกว่างานวิจัยของ Traichaiyaporn *et al.* (2006) ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงอาหารทั้ง 3 รูปแบบ โดยกล่าวว่าผลผลิตสาหร่ายไก่อในรูปน้ำหนักสด มีค่าอยู่ระหว่าง 118.89 - 179.99 กรัมต่อตารางเมตรจากงานวิจัยสาหร่ายไก่อมีมวลชีวภาพสูงอาจเป็นเพราะมีสารอาหารที่เพียงพอต่อความต้องการและมีคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไก่อจึงทำให้มีการเจริญเติบโตดี และมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Khuantrairong and Traichaiyaporn (2010) ซึ่งมีมวลชีวภาพ 870-1,705 กรัมต่อตารางเมตร (น้ำหนักเปียก) ซึ่ง Traichaiyaporn *et al.* (2010) กล่าวว่าสาหร่ายไก่อสามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งน้ำที่มีสารอาหารต่ำมาก (Ultraoligotrophic) จนถึงแหล่งน้ำที่มีสารอาหารสูง (Eutrophic) ปริมาณของแข็งที่แขวนลอยในน้ำที่สูงขึ้นมีผลต่อการลดมวลชีวภาพ และทำให้ความยาวของเซลล์สาหร่าย *Cladophora* ลดลงแต่จะมีผลทำให้ความกว้างของเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น และ *Cladophora* ที่เจริญในแหล่งน้ำที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงจะเพิ่มการกักเก็บฟอสฟอรัสไว้ในเซลล์และทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นโดย *Cladophora* ที่เก็บสะสมฟอสฟอรัสในเซลล์ระหว่าง 1 ถึง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะระหว่าง 0.01 ถึง 0.25 ต่อวัน

ต้นทุนการผลิตสาหร่ายไก่อพบว่าชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 มีค่าเท่ากับ 49.67 บาทต่อเดือนและชุดการทดลองที่ 3 มีค่าเท่ากับ 120.50 บาทต่อเดือน จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าชุดการทดลองที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงมวลชีวภาพ ชุดการทดลองที่ 2 และชุดการทดลองที่ 1 ก็ให้ผลผลิตมากกว่าชุดการทดลองที่ 3

คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก่อที่เพาะเลี้ยงมีโปรตีน 16.52-32.03 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.64 -1.82 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 21.69 - 27.82 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 21.46 - 28.42 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 7.61 ± 0.01 และเถ้า 8.43 - 32.56 เปอร์เซ็นต์ โดยคุณค่าทางโภชนาการทุกปัจจัยของสาหร่ายไก่อที่เพาะเลี้ยงในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสาหร่ายไก่อที่เพาะเลี้ยงครั้งนี้พบว่าชุดการทดลองที่ 3 มีโปรตีนสูงถึง 32.03 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายไก่อในธรรมชาติที่มีโปรตีน 19.3 เปอร์เซ็นต์ Peerapompisal *et al.* (2005) และสูงกว่าสาหร่ายไก่อจากการเพาะเลี้ยงของ Khuantrairong and Traichaiyaporn (2010) ซึ่งมีโปรตีน 10.05-17.58 เปอร์เซ็นต์ และยังสูงกว่าของ Traichaiyaporn *et al.* (2010) ที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำทิ้งจากโรงอาหารและน้ำจากบ่อปลาบึก ซึ่งมีโปรตีน 10.05-17.58 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่าไขมันและคาร์โบไฮเดรต มีน้อยกว่าสาหร่ายไก่อในธรรมชาติซึ่งมี 3.12 และ 30.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Peerapompisal *et al.* (2005) น้อยกว่าของ Khuantrairong and Traichaiyaporn (2010) ซึ่งมี 1.82-2.45 และ 42.44-53.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และน้อยกว่าของ Traichaiyaporn *et al.* (2010) ซึ่งมี 1.84-6.02 และ 30.07-49.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ 2 มีมวลชีวภาพสูง และชุดการทดลองที่ 3 มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ดังนั้น

จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำสูตรอาหารทั้งชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ในอัตราส่วนที่เหมาะสมมาทำการเพาะเลี้ยงร่วมกัน เพื่อให้ได้สาหร่ายไก่อที่มีมวลชีวภาพ และคุณค่าทางโภชนาการสูง

คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไก่อในทุกชุดการทดลองมีค่าอุณหภูมิอากาศ ระหว่าง 27.5 - 37.5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิน้ำ ระหว่าง 22.0 - 28.5 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 8.40 - 9.55 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ระหว่าง 5.8 - 9.9 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนีย ระหว่าง 0.00 - 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ออร์โทฟอสเฟต ระหว่าง 1.72 - 81.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจน ระหว่าง 6.37 - 10.32 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนเตรท ระหว่าง 8.90 - 191.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Chaisuk and Waiyaka (2001) กล่าวว่าจากการศึกษาระบบนิเวศของสาหร่ายไก่อ อาจกล่าวได้ว่าปัจจัยทางด้านกายภาพเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายไก่อในแม่น้ำโขง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็ว โดยปัจจัยทางด้านกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายไก่อได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ ความเร็วของกระแสน้ำ และความขุ่น ส่วนปัจจัยทางด้านเคมี เช่น ปริมาณสารอาหาร ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ หรือค่าความเป็นด่าง เป็นปัจจัยรองที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายไก่อ เพราะในแม่น้ำโขงมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญและสภาพทางด้านเคมีเหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด และพบว่าอุณหภูมิของแหล่งน้ำตลอดระยะเวลาการทำการวิจัยอยู่ในช่วง 21.1 - 28.3 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่า อยู่ในช่วง 7.53 - 8.40 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ มีค่าอยู่ในช่วง 7.20 - 9.20 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนีย-ไนโตรเจน มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 - 1.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนเตรท-ไนโตรเจน มีค่าอยู่ในช่วง 0.2 - 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจกล่าวได้ว่าคุณภาพน้ำมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายไก่อได้ Taweesak and Siripen (2012) กล่าวว่าฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการผลิตสาหร่ายน้ำจืด *Cladophora* แต่ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูงกว่า (0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตชีวมวลของสาหร่าย *Cladophora* การผลิตชีวมวลของสาหร่าย *Cladophora* จะขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอุณหภูมิ และความเข้มแสง ซึ่งสอดคล้องกับ Siripen (2012) กล่าวว่า การศึกษานิเวศวิทยาของสาหร่าย พบว่า มีหลายปัจจัยที่เป็นตัวควบคุมการเจริญ การผลิตมวลชีวภาพ (Biomass production) และสัณฐานวิทยา (Morphology) ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิ น้ำ ความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วของกระแสน้ำ ปริมาณของแข็งที่แขวนลอยในน้ำ และปริมาณสารอาหาร แต่จากรายงานต่างๆ ที่ผ่านมา พบว่าฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเจริญ และผลผลิตเบื้องต้นของสาหร่ายสกุล *Cladophora* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Raghavan *et al.* (2008) กล่าวว่าสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้นปัจจัยต่างๆ เช่น ธาตุอาหาร อุณหภูมิ ความเค็ม แสง เป็นต้น มีผลต่อการเจริญและคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Baldia *et al.* (1994) กล่าวว่า การขาดฟอสฟอรัสของสาหร่ายมีผลใกล้เคียงกับการขาดไนโตรเจนคือ ทำให้ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์เอ และอาร์เอ็นเอ (RNA) ของสาหร่ายลดลง แต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น

จากงานวิจัยนี้ทำการเพาะเลี้ยงในระบบปิดจึงสามารถควบคุมสารพิษปนเปื้อนในน้ำที่อาจปนอยู่ในสาหร่ายนั้นได้ ตลอดจนสารอาหารที่มีความเหมาะสม เพื่อให้ได้สาหร่ายไก่อปลอดภัยต่อผู้บริโภค และยัง

สามารถถ่ายทอดความรู้ให้กับเกษตรกร และผู้ที่สนใจนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อประกอบอาชีพได้โดยไม่ต้องรอเก็บสาหร่ายไคจากธรรมชาติ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพิ่มมูลค่าทรัพยากรทางน้ำให้เกิดการพัฒนาที่ยั่งยืนต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการเจริญ และคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไค ในการเพาะเลี้ยงระบบปิดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไค สำหรับการทดลองนี้คือ ชุดการทดลองที่ 2 คือ N : P : K (16:16:16) 0.002 กรัมต่อลิตร เนื่องจากทำให้สาหร่ายไคมีมวลชีวภาพมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ

คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไค พบว่า ชุดการทดลองที่ 3 มีค่าโปรตีน ไขมัน เยื่อใย และความชื้นสูงที่สุด ชุดการทดลองที่ 2 มีค่าเถ้าสูงที่สุด และชุดการทดลองที่ 1 มีค่าคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ 3 มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือและความร่วมมือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ซึ่งทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ “ทุนศิษย์ก้นกุฏิ” ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ช่วยเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงคอยให้คำแนะนำ วิธีการดำเนินการวิจัย รวมทั้งอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัย และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยตลอดระยะเวลาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- AOAC (Association of official Analytical Chemists). 1984. Methods of analysis. 14th ed. Arlington, Virginia. 1298 p.
- Baldia S. F, Fukami K, Nishijima T, and Hata Y. 1994. Growth responses of *Spirulina platensis* to some physio – chemical factors and the kinetics of phosphorus utilization. Fisheries science 61(2): 331 – 335.
- Chaisuk S. and Waiyaka P. 2001. The study of Kai (Green algae) in Ecosystems. Final report submitted to Thailand Research Fund (TRF). [in Thai]
- Khuantrairong T. and Traichaiyaporn S. 2010. Efficiency of carotenoid and nutrition values production of an Algae Kai (*Cladophora* sp.) for economic utilization (I). Journal of Fisheries Technology. 4(1): 54-64. [in Thai]

- Khuantrairong T. and Traichaiyaporn S. 2012. Enhancement of carotenoid and chlorophyll content of an edible freshwater alga (Kai: *Cladophora* sp.) by supplementary inorganic phosphate and investigation of its biomass production. Maejo International Journal of Science and Technology. 6(01): 1-11.
- Peerapornpisal Y, Makomkeawkeyoon S, Pongsirkul I, Khumklang A, Lertleelakijja N, Boonsintha B, Awakirt S, Preangkam S, Sutjaritvongsanond K, Kanjanapothi D, Rujjanawate C, Theeranupattana S, Sanphet K, Pekkoh J, Amornlerdpison D, Chaiubon C, Tongsi S, Ruangrit K, Mungmai L. 2005. Potential of Freshwater Macroalgae as Food and Medicine. Final report submitted to Thailand Research Fund (TRF). [in Thai]
- Peerapornpisal Y, Amornlerdpison D, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Pongpaibul Y, and Tongsi S. 2009. Potential of Freshwater Macroalgae as Nuraceutical and Cosmeceutical Products. Final report submitted to NRCT. [in Thai]
- Posttoday. 2016. Hazardous contaminants are found in city water at Nan. [Online]. Available from <http://www.posttoday.com/local/north/442692> [2017, February 16] [in Thai]
- Raghavan G, Haridevi C. K and Gopinathan C. P. 2008. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. Aquaculture Research, 39, 1053-1058.
- Traichaiyaporn S, Waraegsiri B and Promya J. 2006. Culture of a Green Algae *Cladophora* (Kai) as Feed for the Mae-Kong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey). Final report submitted to Thailand Research Fund (TRF). [in Thai]
- Traichaiyaporn S, Waraegsiri B and Promya J. 2010. Culture of a Green Algae *Cladophora* (Kai) as Feed for the Mae-Kong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey) (Phase 2). Final report submitted to Thailand Research Fund (TRF). [in Thai]
- Traichaiyaporn S. 2012. Kai algae: Natural heritage and sustainable culture. Chiang Mai University. Chiang Mai. 72 p. [in Thai]

ความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช ดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำในฝายราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ

Diversity of Phytoplankton as Bioindicator in Rasi Salai Dam, Si Sa Ket Province

ปริญญา มุลสิน^{1*} จันทรเพ็ญ ปิยะวงษ์¹ มณฑิชา รักศิลป์² และรมณียกร มุลสิน²

Parinya Moonsin^{1*}, Chanpen Piyawong¹, Monthicha Ruksil² and Rommaneeyakorn Moonsin²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

²คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

¹Program of Biology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University 34000, Thailand

¹Faculty of Public Health, Ubon Ratchathani Rajabhat University 34000, Thailand

*Corresponding author : parinyamoonsin@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชและคุณภาพน้ำในฝายราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ ระหว่างเดือนเมษายน 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557 ใน 3 ฤดูกาล 10 จุดๆ ละ 3 ซ้ำ ผลการวิจัยพบแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นคือ *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen รองลงมาคือ *Ulnaria ulna* (Nitzsch) P. Compère, *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg, *Cocconeis acutata* Rabenhorst, *Coenococcus planctonicus* Korshikov, *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg, *Trachelomonas superba* Swirenko emend. Deflander, *Tetraedron incus* Smith, และ *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำมีค่าเฉลี่ยดังนี้ อุณหภูมิอากาศ 30 °C อุณหภูมิ น้ำ 30 °C ค่าความเป็นด่าง 19.70 mg/l ค่า pH 7.46 ค่า DO 7.09 mg/l ค่า BOD 3.39 mg/l ค่าการนำไฟฟ้า 269.44 µs/cm ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ 1.48 µg/l ขอร์โธฟอสเฟต 0.09 mg/l ไนเตรต 0.29 mg/l โคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด 334.10 MPN/100 ml และฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย 10.42 MPN/100 ml เมื่อนำมาคำนวณ AARL-PC Score ได้ค่า 1.9 และ AARL-PP Score 7.2 สามารถจัดเป็นแหล่งน้ำที่มีสารอาหารปานกลาง และเป็นแหล่งน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้ PCA พบว่า *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ อุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิ น้ำ ความลึกที่แสงส่องถึง pH, DO, BOD ค่าการนำไฟฟ้า ความเป็นด่าง คลอโรฟิลล์ เอ โคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด ฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และไนเตรต ซึ่งมีแนวโน้มที่ใช้บ่งชี้คุณภาพน้ำที่มีสารอาหารปานกลางถึงสูงได้

คำสำคัญ : แพลงก์ตอนพืช สหราชอาณาจักร ความหลากหลาย ฝายราษีไศล

Abstract

This research was to study of phytoplankton diversity and some water quality parameters in Rasi Salai Dam, Si Sa Ket Province. The samples were conducted from April 2013 to September 2014 in 3 seasons with 10 sampling sites by triplicates, analysis of some water quality parameters. The dominant species was *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, followed by *Ulnaria ulna* (Nitzsch) P. Compère, *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg, *Cocconeis acutata* Rabenhorst, *Coenococcus planctonicus* Korshikov, *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg, *Trachelomonas superba* Swirenko emend. Deflander, *Tetraedron incus* Smith and *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz, respectively. The average water qualities; air temperature of 30°C, water temperature 30°C, alkalinity 19.70 mg/l, pH 7.46, DO 7.09 mg/l, BOD 3.39 mg/l, conductivity 269.44 µs/cm, chlorophyll a 1.48 µg/l, orthophosphate 0.09 mg/l, nitrate 0.29 mg/l, total coliform bacteria 334.10 MPN/100 ml and fecal coliform bacteria 10.42 MPN/100 ml. The results of AARL-PC was 1.9, the score of AARL-PP was 7.2. The water quality in Rasi Salai Dam was classified as mesotrophic and category 3 of standard surface water. The result of PCA found that *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz had a positively correlated with air temperature, water temperature, Secchi depth, pH, DO, BOD, conductivity, alkalinity, chlorophyll a, total coliform bacteria, fecal coliform bacteria, nitrate and orthophosphate, trend to be used as bioindicator for meso-eutrophic status.

Keywords: Phytoplankton, Algae, Diversity, Rasi Salai Dam

บทนำ

ฝายราษีไศล หรือเขื่อนราษีไศล เป็นเขื่อนคอนกรีต มีบานประตูระบายน้ำ 7 บาน สร้างกันแม่น้ำมูลที่บ้านห้วย-บ้านดอน อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ โดยเริ่มมีการเก็บกักน้ำในปี พ.ศ. 2536 เป็นเขื่อนในกลุ่มโครงการผันน้ำโขง-ชี-มูล ซึ่งอยู่ภายใต้ความรับผิดชอบของกรมพัฒนาและส่งเสริมพลังงาน กระทรวงพลังงาน เพื่อทำการผันน้ำจากแม่น้ำโขง แม่น้ำชี แม่น้ำมูล มาแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำในพื้นที่ 4.98 ล้านไร่ ในเขตภาคอีสาน อ่างเก็บน้ำมีพื้นที่ 18.11 km² ปัจจุบันประชากรในพื้นที่โดยรอบมีกิจกรรมที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำมากขึ้นกว่าในอดีต จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำ ทั้งนี้เพื่อการใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำได้อย่างยั่งยืนในอนาคต

แพลงก์ตอนพืชเป็นสาหร่ายกลุ่มหนึ่งที่ยิมนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำในแหล่งน้ำ อาทิเช่น Peerapompisal *et al.* (2004) ได้พัฒนาและประยุกต์ใช้ ค่าคะแนน AARL-PC Score และ Peerapompisal *et al.* (2007) ได้พัฒนาและประยุกต์ใช้ ค่าคะแนน AARL-PP Score เพื่อใช้สำหรับและคุณภาพน้ำบางประการเพื่อการติดตามเฝ้าระวังและเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำ Kamwachirapitak and Wongrat (2005) ศึกษาในเวศวิทยา การจำแนกชนิดของไดโนแฟลกเจลเลตน้ำจืดจากอ่างเก็บน้ำพาน ระหว่างเดือนมกราคม

พ.ศ. 2544 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2545 จำแนกชนิดไดโนแฟลกเจลเลตได้ทั้งหมด 7 ชนิด (หรือ 3.59% จากจำนวนแพลงก์ตอนทั้งหมด 197 ชนิด) ชนิดของไดโนแฟลกเจลเลตที่พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทยมี 5 ชนิด ได้แก่ *Peridinium africanum*, *P. baliense*, *P. gutwinski*, *P. volzii* และ *P. wisconsinense* มีความหนาแน่นสูงสุดในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2544 พบ 17,116 cells/l (5.88%) ชนิดที่มีการแพร่กระจายกว้างขวาง ได้แก่ *Ceratium furcoides*, *Peridinium baliense* และ *P. volzii* ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแพร่กระจายและความหนาแน่นของไดโนแฟลกเจลเลตคือค่า pH ของแหล่งน้ำ Phadee (2007) ศึกษาการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนในอ่างเก็บน้ำหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 ถึงมิถุนายน พ.ศ. 2543 พบว่าความหนาแน่นของแพลงก์ตอน $15.0-39.8 \times 10^4$ cells/m³ พบแพลงก์ตอนทั้งหมด 90 ชนิด ประกอบด้วยแพลงก์ตอนพืช 64 ชนิด และแพลงก์ตอนสัตว์ 26 ชนิด แพลงก์ตอนพืชที่พบมากที่สุดคือ *Oscillatoria* sp. รองลงมาคือ *Euglena* spp. และแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดอะตอม ตามลำดับ น้ำมีความเค็มค่อนข้างต่ำทำให้สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แพลงก์ตอน สัตว์หน้าดิน พืชน้ำ และสัตว์น้ำชนิดต่างๆ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ส่วนคุณภาพน้ำอื่นๆ อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ สำหรับฝ่ายราษฎร์ไศลนั้นเป็นแหล่งน้ำที่ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช ดังนั้นงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชและคุณภาพน้ำของฝ่ายราษฎร์ไศล เพื่อประโยชน์ในการวางแผนบริหารจัดการพื้นที่ฝ่ายราษฎร์ไศลได้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจ และกำหนดจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 จุด (Figure 1) โดยแบ่ง 3 โซน ได้แก่ โซนที่ 1 บริเวณก่อนน้ำไหลเข้าสู่ฝ่ายราษฎร์ไศล (แม่น้ำมูล) โซนที่ 2 บริเวณฝ่ายราษฎร์ไศล โซนที่ 3 จุดเก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลออกจากตัวเขื่อน (แม่น้ำมูล) เก็บตัวอย่างระหว่าง เดือนเมษายน 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557 โดยเก็บตัวอย่าง 3 ฤดูกาล ในจุดเก็บตัวอย่างและสภาพแวดล้อมโดยรอบเป็นดังนี้

จุดที่ 1 บริเวณลำน้ำห้วยเสียว เป็นลำน้ำสาขาของแม่น้ำมูล ตั้งอยู่ในตำบลหนองแค อำเภอรราษฎร์ไศล มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่เจริญมาก

จุดที่ 2 บริเวณชุมชนบ้านฝ้าง ตำบลหนองแค อำเภอรราษฎร์ไศล มีเรือประมง มีกระชังปลา อยู่ใกล้พื้นที่เกษตรกรรม มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่เจริญมาก

จุดที่ 3 บริเวณหมู่บ้านเศรษฐกิจพอเพียง ตำบลหนองแค อำเภอรราษฎร์ไศล มีชุมชนอยู่อาศัย มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่เจริญเล็กน้อย

จุดที่ 4 บริเวณหน้าฝ่ายราษฎร์ไศล ตำบลหนองแค อำเภอรราษฎร์ไศล ห่างจากหน้าฝาย 200 เมตร มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่เจริญมาก

จุดที่ 5 บริเวณทางท้ายฝ่ายราษฎร์ไศล ตำบลหนองแค อำเภอรราษฎร์ไศล ห่างจากประตูระบายน้ำ 100 เมตร มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่มีการเจริญได้เล็กน้อย

จุดที่ 6 บริเวณหลังโรงพยาบาลราษฎร์ไศล ตำบลหนองอ้อ อำเภอรราษฎร์ไศล มีชุมชนอาศัยอยู่รอบๆ อย่างหนาแน่น มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่มีการเจริญได้เล็กน้อย

จุดที่ 7 บริเวณหลังที่ว่าการอำเภอราษีไศล ตำบลหนองอี อำเภอรามาศัยอยู่อย่างหนาแน่น มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่มีการเจริญได้เล็กน้อย

จุดที่ 8 บริเวณหลังตลาดสดราษีไศล ตำบลหนองอี อำเภอรามาศัยอยู่อย่างหนาแน่น มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่มีการเจริญได้เล็กน้อย

จุดที่ 9 บริเวณหลังองค์การบริหารเทศบาลเมืองคง ตำบลเมืองคง อำเภอรามาศัยอยู่ปานกลาง มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่มีการเจริญได้ปานกลาง

จุดที่ 10 บริเวณชุมชนบ้านกลาง ตำบลเมืองคง อำเภอรามาศัยอยู่น้อย มีพืชน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่มีการเจริญได้มาก



Figure 1 Sampling sites in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si Sa Ket Province

2. ศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช โดยการกรองน้ำตัวอย่าง 50 l ผ่านตาข่ายแพลงก์ตอนพืช ความถี่ 10 μ กรองน้ำให้เหลือ 100 ml และรักษาสภาพด้วย lugol's solution 1 ml นำมาวินิจฉัยจัดจำแนกชนิดโดยใช้รูปพรรณ เช่น Ladda (1999), Desikachary (1959), Entwisle (1989), Barber and Haworth (1981), Kelly and Haworth (2002), Krammer and Lange-Bertalot (1986), Komarek (1998) เป็นต้น และตรวจนับจำนวนแพลงก์ตอนพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีของ Wongrat and Boonyapiwat (2003)

3. ศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพบางประการ ทำการตรวจวัดและวิเคราะห์ ณ จุดเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิ น้ำ ค่าการนำไฟฟ้า และค่าความลึกที่แสงส่องถึง pH ด้วยเครื่องมือภาคสนาม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดพลาสติก และขวด bottom blue และเก็บรักษาในถังน้ำแข็ง นำตัวอย่างน้ำกลับมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านเคมี และชีวภาพบางประการต่อไปในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

ค่าความเป็นต่าง DO, BOD₅ ออร์โธฟอสเฟต และ ไนเตรต โดยวิธีมาตรฐาน (Greenberg *et al.*, 2005) วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยวิธีของ Nusch (1980) ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมดและฟีคัล โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Chokewinyou, 1987)

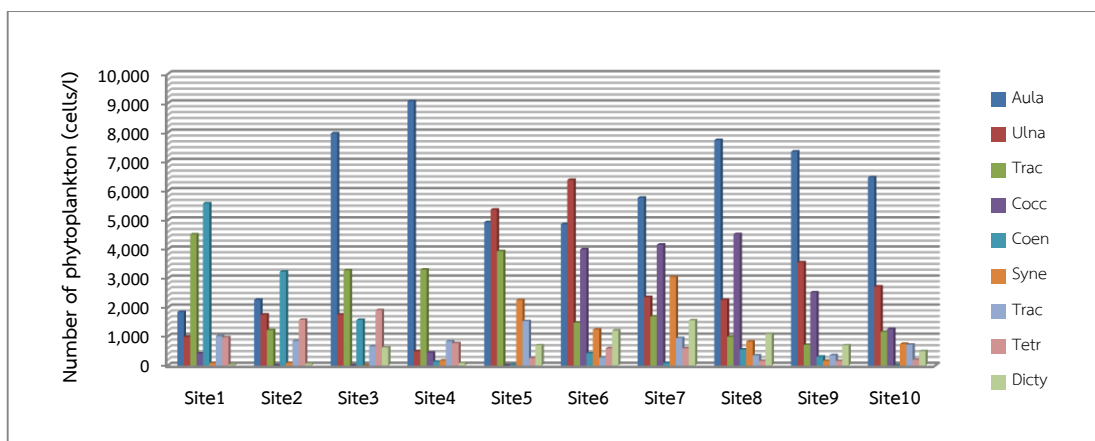
4. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของแพลงก์ตอนพืชและคุณภาพน้ำเพื่อใช้เป็นดัชนีทางชีวภาพ

นำข้อมูลคุณภาพน้ำ และความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ Lorraine and Vollenweider (1981), Wetzel (2001), Rott *et al.* (1997) การให้คะแนนตามหลักเกณฑ์ AARL-PC Score (Peerapornpisal *et al.*, 2004) และ AARL-PP Score (Peerapornpisal *et al.*, 2007) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่น และคุณภาพน้ำใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Multivariate Statistic Package (MVSP) และ Principal Component Analysis (PCA) จัดกลุ่มจุดเก็บตัวอย่างโดยพิจารณาจากแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นที่พบและคุณภาพน้ำที่พบโดยใช้วิธี Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average (UPGMA)

ผลการวิจัย

ความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช

จากการศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช และคุณภาพน้ำในบริเวณฝายราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ ตั้งแต่เดือนเมษายน 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 ในฤดูร้อน ฝน และหนาว พบแพลงก์ตอนพืช 7 ดิวิชัน 191 ชนิด ดิวิชัน ที่พบมากที่สุดคือ Division Bacillariophyta รองลงมาคือ Division Euglenophyta, Division Chlorophyta, Division Cyanophyta, Division Xanthophyta, Division Chrysophyta และ Division Pyrrophyta ตามลำดับ แพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นคือ *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen รองลงมาคือ *Ulnaria ulna* (Nitzsch) P. Compère, *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg, *Cocconeis acutata* Rabenhorst, *Coenococcus planctonicus* Korshikov, *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg, *Trachelomonas superba* Swirenko emend. Deflander, *Tetraedron incus* Smith, และ *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz ตามลำดับ โดยพบว่าในจุดหน้าเขื่อน (จุดที่ 3 และจุดที่ 4) และจุดที่อยู่ใกล้ชุมชน (จุดที่ 8, 9 และ 10) จะพบ *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen จำนวนมากว่าชนิดอื่นๆ (Figure 2-3)



Aula = *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen

Ulna = *Ulnaria ulna* (Nitzsch) P. Compère

Trac = *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg

Cocc = *Cocconeis acutata* Rabenhorst

Coen = *Coenococcus planctonicus* Korshikov

Syne = *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg

Trac = *Trachelomonas superba* Swirenko emend. Deflander

Tetr = *Tetraedron incus* Smith

Dict = *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz

Figure 2 Dominant phytoplankton in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si Sa Ket Province during April 2013 to September 2014

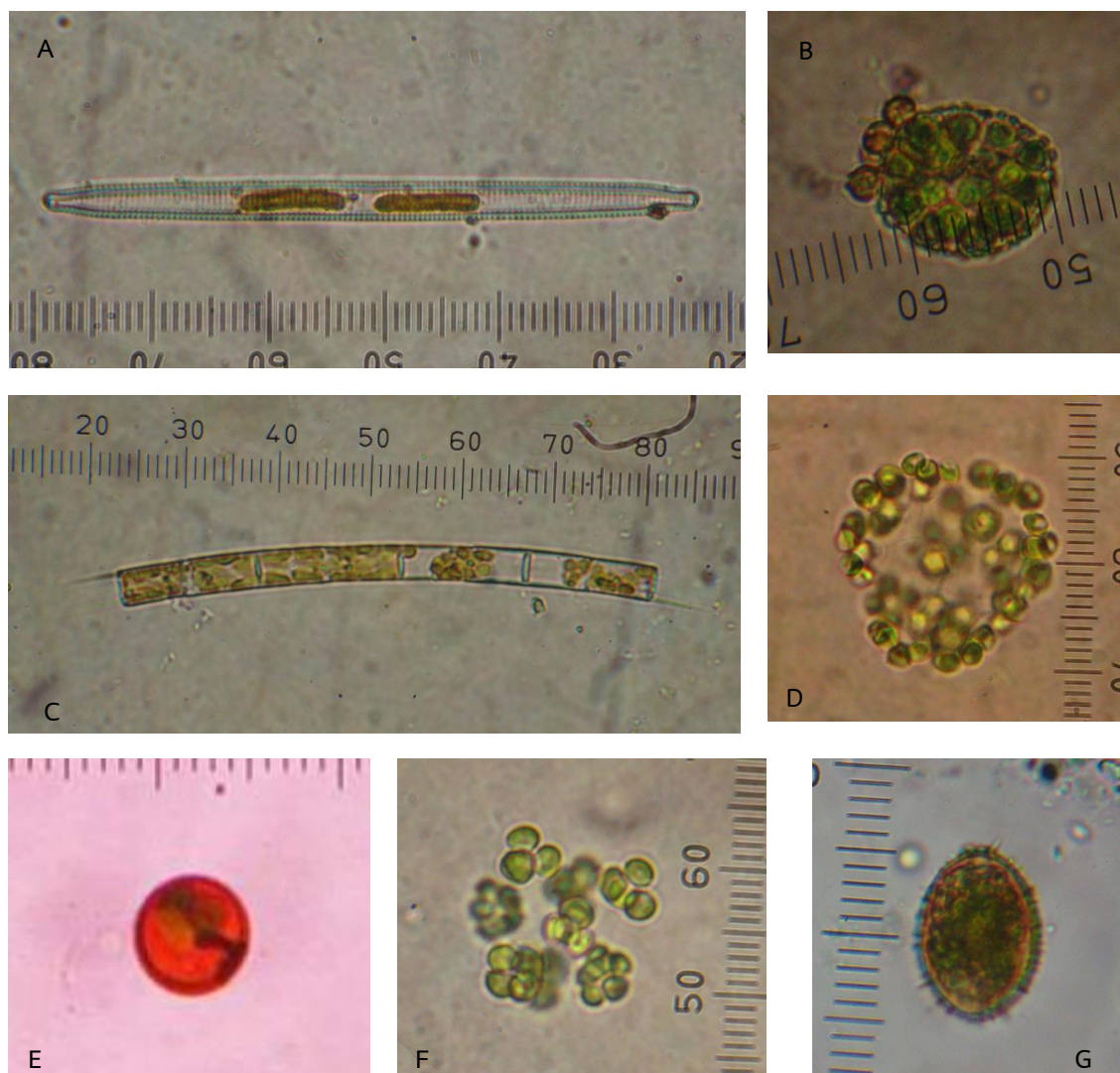


Figure 3 Dominant phytoplankton in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si Sa Ket Province (40X)
 A) *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg B) *Coelastrum cf. verrucosum* (Reinsch) Reinsch C)
Aulacoseira granulata (Ehrenberg) Simonsen D) *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz E)
Trachelomonas volvocina (Ehrenberg) Ehrenberg F) *Coenococcus planctonicus* Korshikov G)
Trachelomonas superba Swirenko emend. Deflander

ผลการวิเคราะห์หาดัชนีความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช พบว่าดัชนีความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช ในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 ถึงจุดที่ 10 มีค่า 3.346, 3.233, 3.226, 3.220, 3.132, 3.126, 3.043, 3.043, 2.820 และ 2.724 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจุดเก็บตัวอย่างที่ 1 มีค่าดัชนีความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชมากที่สุด รองลงมาก็คือจุดที่ 7 และจุดที่ 2 ตามลำดับ (Table 1) ค่าดัชนีความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชในแต่ละฤดู มีค่าดังนี้ ฤดูร้อน 2.534 ฤดูฝน 2.997 และฤดูหนาว 3.404 โดยมีค่าสูงสุดในฤดูหนาวมี รองลงมาก็คือฤดูฝน และฤดูร้อน ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 Shannon-Weiner Diversity index of phytoplankton in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si SA Ket Province in 10 sampling sites during April 2013 to September 2014

Sampling sites	Diversity index	Evenness	Number of phytoplankton (cells/l)
Site 1	3.346	0.733	27,746.33
Site 2	3.226	0.776	23,822.33
Site 3	3.126	0.695	28,095.00
Site 4	2.820	0.638	23,511.67
Site 5	3.043	0.696	28,918.33
Site 6	3.220	0.723	33,516.67
Site 7	3.233	0.724	31,305.00
Site 8	2.724	0.641	24,638.33
Site 9	3.043	0.671	24,685.00
Site 10	3.132	0.693	21,466.67

Table 2 Shannon-Weiner Diversity index of phytoplankton in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si SA Ket Province in 3 season during April 2013 to September 2014

Seasons	Diversity index	Evenness	Number of phytoplankton (cells/l)
Summer	2.534	0.575	92,891.67
Rainy	2.997	0.654	81,223.33
Winter	3.404	0.682	90,856.67

คุณภาพน้ำบางประการ

ผลการศึกษาคูณภาพน้ำพบว่ามีความเจือปนดังแสดงใน Table 3 เมื่อประเมินคุณภาพน้ำโดยวิธี AARL-PC Score พบว่ามีค่า 1.9 ซึ่งบ่งชี้แหล่งน้ำที่มีสารอาหารน้อยถึงปานกลาง (Oligo-Mesotrophic status) หรือคุณภาพน้ำปานกลางถึงดี และผลการประเมินด้วย AARL-PP Score มีค่า 7.2 บ่งชี้แหล่งน้ำที่มีสารอาหารปานกลางถึงสูง (Meso-eutrophic) หรือคุณภาพน้ำปานกลางถึงเสีย เมื่อประเมินคุณภาพน้ำร่วมกับแฟลงก์ตอนพืชชนิดเด่นที่พบ สามารถจัดได้ว่าฝ่ายราชิไคลเป็นแหล่งน้ำที่มีสารอาหารปานกลาง (Mesotrophic status) หรือแหล่งน้ำที่มีคุณภาพน้ำปานกลาง และจัดเป็นแหล่งน้ำประเภทที่ 3 ตามมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดินตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2537 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ระหว่างแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นกับคุณภาพน้ำในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างในฝ่ายราชสีไศล โดยใช้โปรแกรม MVSP ด้วยวิธี PCA พบว่า *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าอุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิ น้ำ ค่าความลึกที่แสงส่องถึง pH, DO, BOD₅ ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเป็นด่าง ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด ฟิคัลแบคทีเรีย และปริมาณไนเตรต (Figure 6)

Table 3 Some physical, chemical and biological water quality in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si Sa Ket Province during April 2013 to September 2014

Parameters	Standard	Average of each parameters		
		Summer	Rainy	Winter
Air Temperature (°C)	Natural variation	28.7	28.2	33.0
Water Temperature (°C)	Natural variation	31.7	28.2	30.4
Secchi depth (cm)	40-80 cm	33.5	29.2	33.8
pH	5-9	7.25	8.08	7.05
DO (mg/l)	4-6 mg/l	7.32	8.06	5.90
BOD ₅ (mg/l)	1.5-4.5 mg/l	1.10	6.31	4.39
Conductivity (µs/cm)	< 300 µs/cm	447.35	118.56	242.4
Alkalinity (mg/l)	< 50 mg/l	16.90	24.73	17.46
Chlorophyll a (µg/l)	4.7 µg/l	1.07	1.26	2.12
Total Coliform bacteria (MPN/100ml)	20,000 MPN/100ml	235.96	115.04	651.31
Fecal Coliform bacteria (MPN/100ml)	4,000 MPN/100ml	14.09	13.16	4.00
Nitrate (mg/l)	5 mg/l	0.736	0.120	0.020
SRP (mg/l)	0.6 mg/l	0.111	0.126	0.030

Note : Surface water standard of Thailand, Lorraine and Vollenweider (1981), Wetzel (2001)

การประเมินความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำบางประการ และแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่น

ผลการจัดกลุ่มโดยวิธี cluster analysis พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มจุดเก็บตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่มตามความคล้ายคลึงกันของคุณภาพน้ำ และแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่น โดยที่พบว่าคุณภาพน้ำในจุดที่ 1 และ 2 ซึ่งอยู่ห่างชุมชนมีคุณภาพน้ำดีที่สุด รองลงมาคือจุดที่ 3, 4 ซึ่งเป็นจุดหน้าฝายที่อยู่ใกล้ประตูระบายน้ำ เมื่อพิจารณาจุดท้ายเขื่อนพบว่าบริเวณจุดที่ 5 ซึ่งเป็นจุดที่มีการปล่อยน้ำออกจากตัวฝาย มีความแตกต่างจากจุดอื่นๆ โดยมีคุณภาพน้ำดีกว่าจุดท้ายฝายอื่นๆ รองลงมาคือ จุดที่ 6, 7, 8 และ 9 ส่วนจุดที่ 10 คุณภาพน้ำจะเริ่มกลับมามีขึ้นอีกครั้ง ทั้งนี้เพราะเป็นจุดชุมชนอาศัยอยู่ไม่หนาแน่นในบริเวณรอบแหล่งน้ำ (Figure 4)

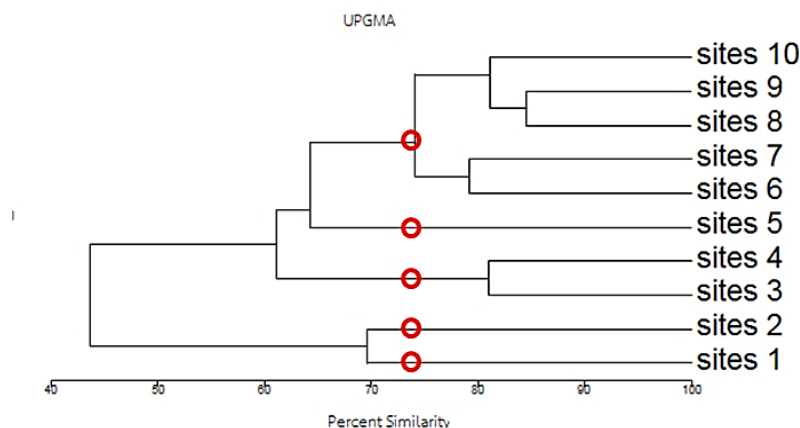


Figure 4 Grouping of sampling sites based on dominant phytoplankton and some physical, chemical and biological water qualities in Rasi Salai Dam, Rasi Salai District, Si Sa Ket Province during April 2013 to September 2014

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฟลกก์ตอนพืชชนิดเด่นและคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ พบว่า อุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิน้ำ ความลึกที่แสงส่องถึง pH DO BOD ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเป็นด่าง ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โคลิฟอร์มแบคทีเรียทั้งหมด ฟิคัลแบคทีเรีย และปริมาณไนเตรต มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz (Figure 5)

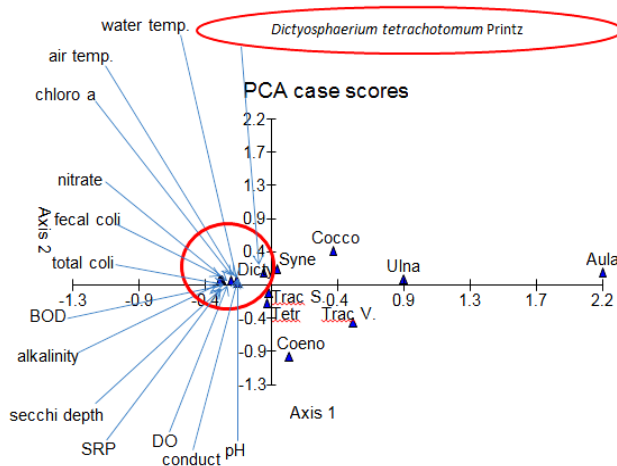


Figure 5 Dominant phytoplankton correlated with some physical, chemical and biological water quality in Rasi Salai Dam, Rasi Salai Dam Si Sa Ket Province during April 2013 to September 2014

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช ในบริเวณฝายราชสีไศล ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2557 พบว่าแพลงก์ตอนพืช 7 ดิวิชัน 191 ชนิด ดิวิชัน ที่พบมากที่สุด คือ Division Bacillariophyta รองลงมาคือ Division Euglenophyta, Division Chlorophyta, Division Cyanophyta, Division Xanthophyta, Division Chrysophyta และ Division Pyrrophyta ตามลำดับ แพลงก์ตอนพืช ชนิดเด่นที่พบคือ *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen รองลงมาคือ *Ulnaria ulna* (Nitzsch) P. Compère, *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg, *Cocconeis acutata* Rabenhorst, *Coenococcus planctonicus* Korshikov, *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg, *Trachelomonas superba* Swirenko emend. Deflander, *Tetraedron incus* Smith และ *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz ตามลำดับ การประเมินคุณภาพน้ำโดยวิธี AARL PP Score (Peerapornpisal et al., 2004) มีค่า 7.2 บ่งชี้ได้ว่าเป็นแหล่งน้ำที่มีสารอาหารปานกลางถึงสูง (meso-eutrophic status) และสอดคล้องกับ Seekaw (2003) ที่พบ *Oscillatoria* spp., *Trachelomonas* spp. และ *Planktolyngbya limnetica* Lemmermann เป็นแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นในอ่างเก็บน้ำดอยเต่า นอกจากนี้ Dhitisudh (2006) ยังพบ *Aphanizomenon gracile* Lemmermann, *Aulacoseira granulata* (Ralfs) Erhenberg และ *Aulacoseira muzzanensis* (Meister) Krammer กระจายตัวในแนวดิ่งของอ่างเก็บน้ำดอยเต่า และเมื่อประเมินคุณภาพน้ำโดยใช้ AARL-PP score จัดได้ว่าคุณภาพน้ำปานกลางถึงค่อนข้างไม่ดี และจัดเป็นแหล่งน้ำผิวดินประเภทที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้ PCA พบว่า *Dictyosphaerium tetrachotomum* Printz มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิน้ำ ความลึกที่แสงส่องถึง ความเป็นกรด-ด่าง ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ การนำไฟฟ้า ความเป็นด่าง คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟอร์ม แบคทีเรียทั้งหมด ฟิคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และไนเตรต ซึ่งมีแนวโน้มที่ชี้บ่งชี้คุณภาพน้ำที่มีสารอาหารปานกลางถึงสูงได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานีที่ได้ให้การสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ในการวิจัย ขอขอบคุณนางสาวสุสิพร ยางงาม และนักศึกษาห้องวิจัยสาหร่าย มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานีที่ได้ให้การสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ในการวิจัยด้วยดีตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

- Barber, H.G. and Haworth, E.Y. 1981. A Guide to the Morphology of the Diatom Frustule. Scientific Publications of the Freshwater Biological Association. UK. Vol. 44. 112 p.
- Chokewinyou, C. 1987. Analytical Technique for Bacterial Determination. Odiant Store Publishing, Bangkok. [In Thai]

- Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi. 686 p.
- Dhitisudh, L. 2006. Diversity, Vertical Distribution and Population Ecology Planktons for Water Quality Monitoring in Doi Tao Reservoir, Chiang Mai Province. Thesis of the Mater degree, Chiang Mai University. [In Thai]
- Entwisle, T.J. 1989. Phenology of the Cladophora - Stigeoclonium community in two urban creeks of Melbourne. Australia Journal of Freshwater Research. (40): 236-248.
- Greenberg, A.E., Clesceri, L.S. and Eaton, A.D. 2005. Standard Method for Examination of Water and Waste Water. 20th ed. American : Public Health Association (APHA). Washington DC.
- Kamwachirapitak, P. and Wongrat, L. 2005. Ecology, Species Identification of Freshwater Dinoflagellates from the Pan Reservoir, Udon Thani Province and Laboratory Culture. Proceeding of The 2nd National Conference on Algae and Plankton (NCAP2005), Biodiversity Research and Training Program (BRT), Chiang Mai. 12p. [In Thai]
- Kelly, M.G. and Haworth, E.Y. 2002. Bacillariophyta – the Diatoms. in D. John, B.A. Whitton and A.J. Brook (Eds.). The freshwater Algal Flora of the British Isles. Cambridge University Press. 273-277p.
- Komárek J. and Anagnostidis K. 1998. Cyanoprokaryota 1.Teil: Chroococcales. – In: Ettl, H., Gärtner G., Heynig H. and Mollenhauer D. eds., Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm. 548 p.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. 1986. Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae” Süßwasser flora van Mitteleuropa, Bd 2, berg. VonA, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Lorraine, L.J. and Vollenweider, R.A. 1981. Summary report, the OECD cooperative programme on eutrophication. Nation Water Research Institute. Burlington. U.S.A.
- Nusch, W.A.E. 1980. Comparision of Different Method for Chlorophyll and pheopigment determination. Arch. Hydrobiol. Ergeen. Immol.
- Peerapornpisal, Y., Chaiubol, C., Pekkoh, J., Kraibut, H. et al. 2004. AARL-PC Monitoring of water quality in Ang Kaew reservoir of Chiang Mai University using phytoplankton as bioindicator from 1995-2002. Chiang Mai Journal of Science. 31(1): 85-94p.
- Peerapornpisal, Y., Pekkoh, J., Powangprasit, D., Tonkhamdee, T. et al. 2007. Assessment of Water Quality in Standing Water by Using Dominant Phytoplankton (AARL-PP Score). Journal of Fisheries Technology Research. 1(1): 71-81p.
- Phadee, P. 2007. Studies on Plankton Distribtion in Nong - Bor Reservoir, Borabu District, Maha Sarakham Province: Rajabhat Maha Sarakhan University Journal 2(1):121-132 p. [In Thai]

- Rott, E., Pfister, P. and Pipp, E. 1997. Use of Diatom for Environmental monitoring. Austria: Institute für Botanik der Universität Innsbruck.
- Seekaw, I. 2003. Diversity of Phytoplankton and Zooplankton in Doi Tao Reservoir, Doi Tao District, Chiang Mai Province, Special Problem of the Master degree, Chiang Mai University. [In Thai]
- Wetzel, R.G. 1983. Limnology. Saunders Collage Publishing. Philadelphia.
- Wongrat, L. and Boonyapiwat, S. 2003. Instruction of Collecting and Analytical Method of Phytoplankton. Kasetsart University Publishing. Bangkok. [In Thai]
- Wongrat, L. 1999. Phytoplankton. Faculty of Fisheries, Kasetsart University Publishing. Bangkok. [In Thai]

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวาย เป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Adding Value to Collagen from Fish Scale of Nile Tilapia and Skin of Striped Catfish as Part of a Cosmeceutical Product

พัชรพงษ์ พานิช¹ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน¹ มธุรส ชัยหาญ² และดวงพร อมรเลิศพิศาล^{1*}

Phanich, P.¹ Mangumphan, K.¹ Chaihar, M.² and Amornlerdpison, D.^{1*}

¹ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹ Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University Chiangmai 50290

² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

² Faculty of Science, Maejo University Chiangmai 50290

*Corresponding author: dounpornfishtech@gmail.com

บทคัดย่อ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาน้ำจืดที่ได้รับความนิยมในการบริโภค และพบมีผลพลอยได้ที่เหลือเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะส่วนเหลือบริเวณหนังที่สามารถนำไปเพิ่มมูลค่าโดยสกัดเป็นคอลลาเจนได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงประเมินร้อยละของผลผลิตคอลลาเจนที่สกัดได้จากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวาย แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ชีวภาพที่สนับสนุนการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ผลจากการศึกษาพบว่า ผลผลิตคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายเท่ากับ $21.67 \pm 2.19\%$ และ $17.00 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้กับคอลลาเจนในท้องตลาด พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่าสูงที่สุดพบในคอลลาเจนในท้องตลาด (0.0706 ± 0.0001 mg of Trolox) ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ช่วยป้องกันการเพิ่มเม็ดสีผิว พบว่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลมีฤทธิ์การยับยั้งสูงที่สุด (0.0713 ± 0.0010 g of Kojic acid) นอกจากนี้ในส่วนต้นทุนการผลิต คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด จึงได้นำคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลไปพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวหน้า และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C สลับกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ พบว่า มีความหนืดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ลักษณะสีของครีม ค่าพีเอช และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลง และเมื่อนำไปทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัครจำนวน 30 คน พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับดีมาก และมีความต้องการซื้อผลิตภัณฑ์สูงเมื่อมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด

คำสำคัญ: เกล็ดปลานิล หนังปลาสวาย คอลลาเจน ฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Abstract

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) are freshwater fish which are becoming increasingly popular in the food industry. Following processing there are many left over by-products, particularly the left over skin. These byproducts can add value particularly by the production of fish collagen. This study was performed to evaluate the percentage yield of collagen from Nile tilapia scale and Striped catfish skin, and then to analyze the biological properties which could possibly support the development of cosmeceutical products. The results showed that the percentage yield of collagen from the Nile tilapia and Striped catfish skin were $21.67 \pm 2.19\%$ and $17.00 \pm 1.15\%$ respectively. The analyses of biological activity, comparing three collagen samples, from both types of fish and a commercial preparation, showed that the commercial collagen had the highest effect on antioxidant activity (0.0706 ± 0.0001 mg of Trolox), whereas collagen from the Nile tilapia scale had the highest anti-tyrosinase activity, measured by its effect on anti-hyperpigment (0.0713 ± 0.0010 mg of Kojic acid). In addition to the production cost of the Nile tilapia scale was the cheapest. A cosmeceutical product, a face serum, has been developed using collagen extracted from Nile tilapia scale. The stability of the preparation was tested by subjecting samples to heating-cooling cycles, at 45°C and 4°C , at intervals of 24 hours over 6 cycles. The pH, colour and texture of the product remained unchanged but there was a slight increase in viscosity. Product satisfaction was estimated using 30 volunteers. Overall the results showed satisfaction levels to be very high, with a high probability of product demand if it becomes commercially available.

Keywords: Nile tilapia scale, Striped catfish skin, collagen, cosmeceutical products

บทนำ

สัตว์น้ำถือเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตคอลลาเจน เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปสัตว์น้ำทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการต่างๆ เหล่านี้ตามมา (Morrissey *et al.*, 2000) โดยเฉพาะเกล็ดปลาและหนังปลา มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ปลานิลและปลาสวายเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมาจนถึงปัจจุบัน โดยรายงานของสถิติการประมงล่าสุด ปลานิลและปลาสวายมีปริมาณการจับรวมกัน (รวมเพาะเลี้ยง) ประมาณ 238 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,841 ล้านบาท หรือ 33.88% ของมูลค่าสัตว์น้ำจืดทั้งหมดของประเทศไทย (Fisheries, 2016) จากการแล่ ขำแหละ และแปรรูปเพื่อการส่งออกปลาของไทย ทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการเหล่านี้ เช่น ส่วนหัว ครีบ ลำไส้ ก้าง เกล็ดปลาและหนัง ที่ควรนำไปแปรรูปเพิ่มมูลค่าเป็นคอลลาเจนได้ เนื่องจากคอลลาเจนสามารถพบได้ทั้งในผิวหนัง เอ็น และกระดูกของสิ่งมีชีวิต โดยเป็นโปรตีนที่มีมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ประมาณ 30% และมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม และมีการนำมาเป็นส่วนประกอบในอาหารเสริมสุขภาพและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Ikoma *et al.*, 2003)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลพบว่าให้ปริมาณผลผลิต 22 – 29% (Qiang *et al.*, 2015) การสกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*) ให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนเท่ากับ 0.89% (Kutako *et al.*, 2015) นอกจากนี้คอลลาเจนที่สกัดได้จากส่วนของหนังปลานิลให้ปริมาณผลผลิตคอลลาเจน 39.23% (Inthuserdha and Chiradetprapai, 2015) ส่วนคอลลาเจนจากหนังปลาสดได้ผลผลิต 38.25% (Thahom and Sompongse, 2016) ทั้งนี้ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดได้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดปลา กระบวนการสกัด และองค์ประกอบหรือส่วนที่นำมาสกัด เป็นต้น

คอลลาเจนที่สกัดได้จากสัตว์น้ำมีข้อจำกัดของการเสื่อมสภาพจากความร้อนได้มากกว่าสัตว์บก ทั้งนี้เนื่องจากมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน โดยเฉพาะกรดอะมิโนชนิดโพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีนที่ต่ำกว่าสัตว์บก (Gauza-Wlodarczyk *et al.*, 2017) มีการนำคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลานิลสดความเข้มข้น 1% มาพัฒนาในตำรับครีมบำรุงผิวพบว่ามีความคงตัวทางกายภาพดี แต่ยังไม่มีการประเมินประสิทธิภาพและความพึงพอใจในอาสาสมัคร (Potaros *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามพบว่าคอลลาเจนที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นคอลลาเจนที่สกัดมาจากเกล็ดและหนังปลา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังของ คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวาย และเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวหน้าที่มีมูลค่าสูงพร้อมกับประเมินความพึงพอใจในอาสาสมัคร

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

จัดหาหนังปลาสวายและเกล็ดปลานิล จากฐานเรียนรู้ปลาบึกเชิงบูรณาการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ นำมาล้างทำความสะอาด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการทดลอง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลาและหนังปลา

นำเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 2000) ดังนี้ วิเคราะห์ความชื้นโดยใช้วิธีการทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 105°C วิเคราะห์โปรตีนโดยการนำไปย่อยในกรดเข้มข้นต่อด้วยการกลั่น และขั้นตอนสุดท้ายนำไปไทเทรต จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์ crude protein วิเคราะห์ไขมันโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายไขมัน organic โดยใช้ hexane จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้อุปกรณ์ Soxhlet extract เมื่อสกัดไขมันเสร็จสิ้นแล้วนำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน และวิเคราะห์เถ้าโดยการหาปริมาณสารอนินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร โดยใช้ความร้อนเผาผลาญสารอินทรีย์ หลังจากนั้นนำเถ้าที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและคำนวณปริมาณเถ้า

การสกัดคอลลาเจน

กำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและเม็ดสีออกจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวาย ดัดแปลงวิธีจาก Pipatcharoenwong (2008) ดังนี้ แช่หนังปลาสวายในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ด้วยอัตราส่วนเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายต่อสารละลาย NaOH เท่ากับ 1:5 โดยทำการกวนตลอดและเปลี่ยน

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นประจำทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง จากนั้นล้างเกล็ดปลาและหนังปลาด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 จึงนำไปสกัดคอลลาเจน ตามวิธีดัดแปลง Thahom and Sompongse (2016) โดยแช่ด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้พีเอชเป็นกลาง ต่อด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย NaCl และทำให้พีเอชเป็นกลาง สุดท้ายทำแห้งโดยวิธี Freeze drier จากนั้นคำนวณหาปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนที่สกัดได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณผลผลิตของคอลลาเจน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังจากการทำแห้ง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักหนังหรือเกล็ดปลาผ่านการกำจัดโปรตีน (กรัม)}}$$

ทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตคอลลาเจนที่สกัดได้กับคอลลาเจนจากท้องตลาดซึ่งนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น และวิเคราะห์ปริมาณของคอลลาเจนจากปริมาณ hydroxyl proline ที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่ โดยวิธีการ AOAC official method 990.26 (2000) ด้วย GC-MS with factor 8.0

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

โดยวิธี disc diffusion Inhibition ด้วยการวัดค่าบริเวณใส (clear zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยซึ่งคอลลาเจนผงมาละลายกับน้ำกลั่น ใช้ paper disc จุ่มสารละลายคอลลาเจน แล้วนำมาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes*) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดคอลลาเจนในการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration : MIC)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนในท้องตลาด โดยใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ABTS scavenging activity ตามวิธีการของ Re et al. (1999) ดังนี้ ผสมน้ำ ยา ABTS ลงในหลอดที่มีสารทดสอบ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาทีวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร วัดจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีโดยแสดงผลเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ต่อปริมาณสารสกัด 1 กรัม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734} \text{ control} - A_{734} \text{ test sample}) / A_{734} \text{ control}] \times 100$$

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Pomerantz (1963) ดังนี้ เตรียม 1-tyrosine substrate โดยมี 25 ไมโครลิตร (ul) ของ 0.5 mM L-DOPA, 25 ul ของ 10 mM 1-tyrosine, 875 ul ของ 50 mM ของ phosphate buffer (pH 6.5) และ 25 ul ของสารสกัดที่จะทดสอบที่ยังไม่เติมเอนไซม์ลงไป เตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-well microplate ผสมสารสกัดและสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C และเติม 50 ul ของ mushroom tyrosinase (1600 u/ml) บ่มต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเปอร์เซ็นต์ และใช้ kojic acid เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบฤทธิ์คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนึ่งปลาสดวัย กับคอลลาเจนในห้องตลาด

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า

นำคอลลาเจนที่สกัดได้ไปพัฒนาตำรับเครื่องสำอาง โดยตั้งตำรับครีมเบสที่มีส่วนประกอบของ carbopol, cetyl alcohol, glycerine, butylene glycol, polysorbate 20, ethylene diamine tetra acetic acid และ triethanolamine เป็นสูตรพื้นฐาน เตรียมซังสารทั้งในส่วน of oil phase และ water phase ตามตำรับเป็นสูตรมาตรฐาน และสูตรทดสอบเติมสารสกัดคอลลาเจนลงไป ที่ความเข้มข้น 1% ผสมส่วนประกอบใน oil phase ให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C และผสมส่วนประกอบใน water phase ที่อุณหภูมิ 70°C เมื่อส่วนผสมของทั้ง 2 phase ละลายเข้ากันดีแล้ว เทส่วนผสม water phase ลงในส่วนผสม oil phase คนตลอดเวลาให้เนื้อครีมกระจายเข้ากันประมาณ 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและบรรจุใส่ภาชนะ ทำการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ตามวิธีการของ Chantree (2015) โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพจากสี ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ 3 สภาวะคือ ที่อุณหภูมิ 4°C, 45°C และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 วัน และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งโดยเก็บไว้ที่ความร้อนสลับเย็น (heating-cooling cycle) จำนวน 6 รอบ ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสลับกับที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1 รอบ โดยมีเกณฑ์ประเมินระดับความหนืด (viscosity score) 4 ระดับ ดังนี้ ++++= เนื้อครีมเหนียวข้นมาก (extremely) +++= เนื้อครีมหนืดมาก (very much) ++= เนื้อครีมหนืดปานกลาง (medium) += เนื้อครีมหนืดน้อย (slightly)

การทดสอบความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์

ทดสอบความพึงพอใจและการยอมรับหลังการใช้ผลิตภัณฑ์ในอาสาสมัคร เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยใช้แบบสอบถามในอาสาสมัครจำนวน 30 คน แบบสอบถามประกอบด้วย ข้อมูลส่วนตัว ความคิดเห็น ความตั้งใจซื้อ ความพึงพอใจ และการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ โดยมีเกณฑ์ระดับความพึงพอใจ 5 ระดับ ดังนี้ 1 = ไม่ชอบ(dislike), 2 = ชอบน้อย (slight), 3= ชอบปานกลาง (moderate), 4 = ชอบมาก (good) และ 5 = ชอบมากที่สุด (excellent) และแสดงความพึงพอใจในแต่ละระดับเป็นเปอร์เซ็นต์ (%satisfaction) โดยได้ชี้แจงให้อาสาสมัครทราบก่อนการทดสอบว่า หากมีอาการแพ้เช่น อาการแดง (erythema) และอาการบวม (edema) ให้หยุดใช้ทันที

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทดสอบค่าความแตกต่างของฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนจากในท้องตลาด โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Independent Samples T-Test ในการทดสอบองค์ประกอบทางเคมี และ ANOVA ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นนำไปทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range Test แสดงผลการทดลองในรูปแบบของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมี

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเกล็ดปลานิลและหนังปลาสร้อย พบว่ามีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ดังแสดงใน Table 1 จะเห็นว่าองค์ประกอบหลักของเกล็ดปลานิลคือ โปรตีน และเถ้า ส่วนหนังปลาสร้อยองค์ประกอบหลักคือ โปรตีน และไขมัน โดยเกล็ดปลานิลจะมีปริมาณโปรตีน และปริมาณเถ้ามากกว่าหนังปลาสร้อย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนหนังปลาสร้อยจะมีไขมันมากกว่าเกล็ดปลานิล ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า องค์ประกอบทางเคมีเป็นโปรตีนมีค่ามากที่สุดคือ 48.27 และ 41.56 ในเกล็ดปลานิลและหนังปลาสร้อยตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pipatcharoenwong (2008) และ Thahom and Sompongse (2015) ที่พบว่า องค์ประกอบหลักทางเคมีของเกล็ดปลานิลและหนังปลาสร้อย คือ โปรตีนซึ่งมีค่าเท่ากับ 60.01%, 34.19% ตามลำดับ โดยปริมาณของโปรตีนที่ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอวัยวะหรือส่วนที่นำมาวิเคราะห์ สายพันธุ์ และอาหารที่ปลาได้รับ

ปริมาณร้อยละของผลผลิตคอลลาเจน

จากการทดลองพบว่า ปริมาณร้อยละของผลผลิตคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลมีปริมาณสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสร้อย เนื่องจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า ในเกล็ดปลานิลมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าหนังปลาสร้อย แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลแสดงใน Table 2 ซึ่งคอลลาเจนคือโปรตีนชนิดหนึ่งที่เกิดจากการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนด้วยพันธะเปปไทด์ แสดงปริมาณคอลลาเจนและจากการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน ด้วยการคำนวณจากร้อยละของกรดอะมิโน hydroxyproline พบว่าคอลลาเจนที่สกัดมาจากเกล็ดปลานิลมีปริมาณสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสร้อย ดังแสดงใน Table 3 ทั้งนี้ปริมาณคอลลาเจนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เนื้อเยื่อ และอายุของสัตว์ (Friess, 1998) รวมทั้งวิธีการสกัดด้วย

Table 1 Chemical composition of scale Nile tilapia and skin Striped catfish

Chemical composition	% dry weight	
	Scale Nile tilapia	Skin Striped catfish
Moisture	21.29±0.57 ^a	19.70±0.14 ^a
Protein	48.27±0.15 ^a	41.56±1.26 ^a
Fat	0.037±0.015 ^a	25.83±0.79 ^b
Ash	30.40±0.93 ^a	12.90±0.81 ^a

Data expressed as mean ± SD (n=3)

a, b, c Means with different superscript in same row are significantly different ($p < 0.05$)**Table 2** Percent yield of collagen from scale Nile tilapia and skin Striped catfish

Samples	% yield collagen (g)
Scale Nile tilapia	21.67±2.19
Skin Striped catfish	17.00±1.15

* Data expressed as mean ± SD (n=3)

Table 3 Percent hydroxyproline of collagen from scale Nile tilapia and skin Striped catfish

Samples	Hydroxyproline of collagen (g/100)
Scale Nile tilapia	20.971
Skin Striped catfish	14.105

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนจากในท้องตลาด พบว่า คอลลาเจนจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนในท้องตลาดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* ทั้ง 3 ชนิดได้ จากการรายงานของ Wieprecht *et al.* (1997) พบว่า คอลลาเจนสามารถต้านแบคทีเรียที่เกิดจากกรดอะมิโนที่ขอบน้ำจะปล่อยเปปไทด์เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่เป็นประจุบวก แล้วเกิดปฏิกิริยากับเปปไทด์ที่อยู่บนพื้นผิวแบคทีเรียที่เป็นประจุลบ และยังขึ้นอยู่กับความแตกต่างที่มีอยู่บนองค์ประกอบเมมเบรนทำให้มีผลต่อการยับยั้งและความจำเพาะต่อสารต้านเชื้อแบคทีเรีย (Floris *et al.*, 2003) นอกจากนี้ Patrzykat and Douglas (2005) พบว่า ความเข้มข้นของเปปไทด์ในคอลลาเจนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมีผลต่อความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มนิวเคลียสของแบคทีเรีย ดังนั้นจากการทดสอบคอลลาเจนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้นั้น อาจเนื่องมาจากในกระบวนการสกัดทำให้เปปไทด์สำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูญเสียไปหรือมีปริมาณน้อยเกินไปที่จะต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Inhibition) ของคอลลาเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด พบว่าปริมาณความเข้มข้นที่ 25 – 50 mg/ml คอลลาเจนที่จำหน่ายในท้องตลาดสกัดจากปลาทะเล มี % Inhibition ระหว่าง 93.74 – 98.87% ส่วนคอลลาเจนที่สกัดมาจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายที่ความเข้มข้น 25 – 100 mg/ml ให้ % Inhibition ระหว่าง 34.06 – 51.30% และ 8.01 – 25.31% ตามลำดับ แสดงผลการทดลองใน Figure 1 โดย คอลลาเจนจากในท้องตลาด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับวิตามินอีหรือ trolox มากที่สุด รองลงมาคือ คอลลาเจนที่มาจากเกล็ดปลานิล และคอลลาเจนจากหนังปลาสวาย มีค่าเท่ากับ 0.0706, 0.0374 และ 0.0192 mM (TEAC) ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) โดยค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อยหมายถึง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนในท้องตลาดดีที่สุดที่สุด เนื่องจากแหล่งที่อยู่อาศัย สายพันธุ์ และอาหารที่ปลาได้รับแตกต่างกัน ซึ่งคอลลาเจนในท้องตลาดสกัดมาจากปลาทะเล ส่วนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายสกัดมาจากปลาน้ำจืด แสดงผลการทดลองใน Table 4 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Morimura *et al.* (2002) ได้สกัด hydrolysates collagen จากหนัง และกระดูกปลา yellowtail โดยใช้เอนไซม์ hydrolysates พบว่าคอลลาเจนที่สกัดได้มีคุณสมบัติต้านการเกิดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ Zhuang *et al.* (2009a) พบว่าคอลลาเจนเปปไทด์จากแมงกะพรุน (*Rhopilema esculentum*) มีปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระต่อกรดไขมันลิโนเลอิกและ Wang *et al.* (2013) ยังพบว่าคอลลาเจนเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยคอลลาเจนจากเกล็ดปลาจวด (*Pseudosciaena crocea*) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งจะเห็นว่าแหล่งที่มาทั้งหมดของคอลลาเจนมาจากสัตว์น้ำในทะเล

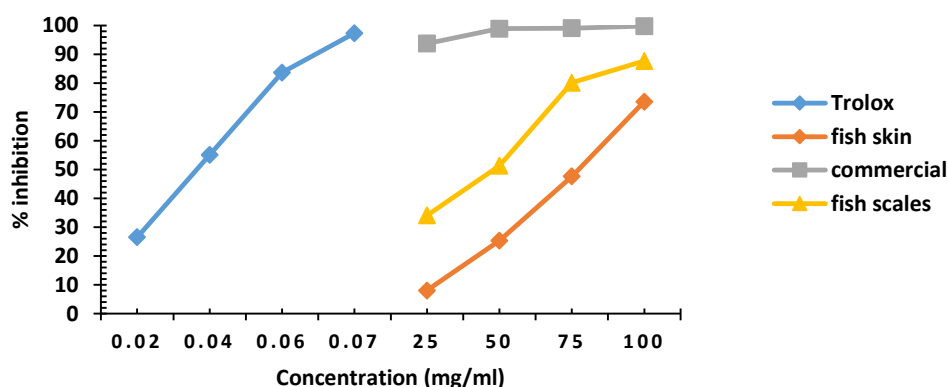


Figure 1 Effect of collagen from three sources and trolox on ABTS scavenging activity

Table 4 Comparison of antioxidant activity of collagen from three sources

Samples	mM TEAC/g extract*	IC ₅₀ (mg/ml)
Scale Nile tilapia	0.0374±0.0015 ^b	48.11
Skin Striped catfish	0.0192±0.0014 ^c	85.68
Commercial	0.0706±0.0001 ^a	24.99

* Data expressed as mean ± SD (n=3)

a, b, c Values with different superscript annotations show significantly different ($p < 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อยและคอลลาเจนจากในท้องตลาด ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนที่ได้จากแหล่งที่มาแตกต่างกัน 3 ชนิด โดยพบว่าปริมาณความเข้มข้นคอลลาเจนของทั้ง 3 ชนิด ที่ 50 – 100 mg/ml คอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลให้ % Inhibition ระหว่าง 8.22 – 24.82%, คอลลาเจนในท้องตลาด ให้ % Inhibition ระหว่าง 12.76 – 21.98% และ คอลลาเจนที่มาจากหนังปลาสร้อย ให้ % Inhibition ระหว่าง 4.38 – 14.40% แสดงผลการทดลองใน Figure 2 และพบว่าคอลลาเจนที่มาจากเกล็ดปลานิล มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบกับ kojic acid มากที่สุด รองลงมาคือคอลลาเจนที่มาจากในท้องตลาด และคอลลาเจนจากหนังปลาสร้อย มีค่าเท่ากับ 0.0713 ± 0.0010 , 0.0673 ± 0.0053 และ 0.0566 ± 0.0034 ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 50% (IC₅₀) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลสูงที่สุด และค่า IC₅₀ ที่มีค่าน้อยหมายถึงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง แสดงผลการทดลองใน Table 5 ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลสูงนั้น อาจมาจากความสามารถการไปจับกับโลหะทองแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าคอลลาเจนจากหนังปลาสร้อยและในท้องตลาด ตามการรายงานของ Zhuang *et al.* (2009a) พบว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ได้จากแมงกะพรุนมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพราะมีความสามารถไปจับกับโลหะทองแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ และ Abdillah *et al.* (2017) ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลิงทะเล sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลิงทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase

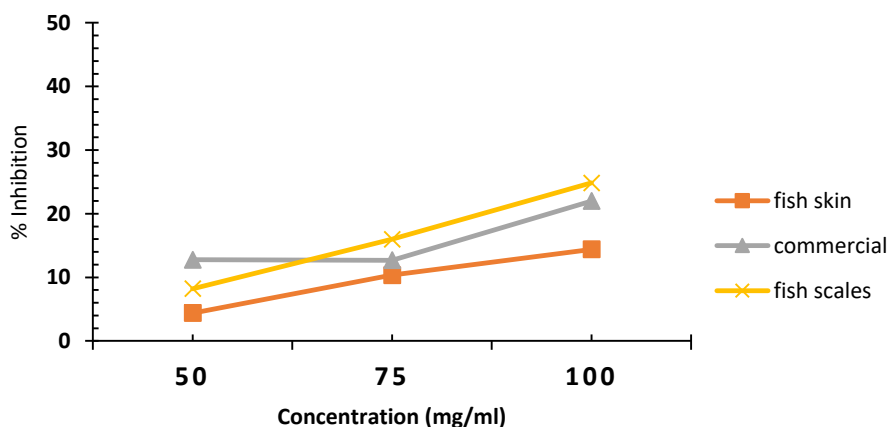


Figure 2 Anti-tyrosinase activity of collagen from three sources

Table 5 Comparison of anti-tyrosinase activity of collagen from three sources

Samples	mg Kojic acid /g extract	IC ₅₀ (mg/ml)
Scale Nile tilapia	0.0713±0.0010 ^a	171.29
Skin Striped catfish	0.0566±0.0034 ^b	318.77
Commercial	0.0673±0.0053 ^a	175.37

* Data shows as mean ± SD (n=3)

a, b, c Values with different superscript annotations show significantly different ($p < 0.05$)

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า

จากการนำคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลนำไปพัฒนาตำรับเครื่องสำอาง ได้แก่ เซรั่มบำรุงผิวหน้า และทำการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์โดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่า ค่าพีเอช สี และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพเดิม แสดงใน table 6 และการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่ง (ร้อนสลับเย็นที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ) พบว่า ค่าพีเอช สีและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ยังคงสภาพเหมือนเดิม ไม่มีการแยกชั้น ส่วนความหนืดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จาก 3.444 Pa.s เปลี่ยนเป็น 3.694 Pa.s ดังแสดงใน table 7 เนื่องจากเนื้อเซรั่มเป็นเนื้อเจล มีส่วนผสมน้ำเป็นหลัก เมื่อเวลาผ่านไปทำให้น้ำระเหยออกบางส่วน ทำให้ความหนืดของเซรั่มเพิ่มขึ้น

ผลการทดสอบความพึงพอใจผลิตภัณฑ์

ผลการทดสอบความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ เซรั่มบำรุงผิวหน้าผสมคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล ในอาสาสมัครจำนวน 30 ท่าน ทั้งเพศหญิงและเพศชาย ในอายุระหว่าง 20 – 49 ปี พบว่า จากการประเมินโดยรวมของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อของผลิตภัณฑ์ เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ความหนืดของผลิตภัณฑ์ การซึมเข้าสู่ผิว ความพึงพอใจโดยรวมและการตัดสินใจซื้อเมื่อวางจำหน่าย อยู่ในระดับดีมาก 57.50% อยู่ในระดับดี 41.67% และระดับปานกลาง 0.82% ดังแสดงใน Figure 3

Table 6 Stability test of cosmetic product at room temperature (RT) and 45 °C for 45 days

Condition	pH	Colour	Texture	Feel on skin	Viscosity score
Control	5.68	White	soft	Soft & smooth	+++
RT	5.69	White	soft	Soft & smooth	+++
4 °C	5.57	White	soft	Soft & smooth	+++
45 °C	5.61	White	soft	Soft & smooth	+++

Viscosity score : +++=Very much, ++=Medium, += Slightly

Table 7 Stability test by heating – cooling for 6 cycles

Condition	pH	Colour	Texture	Feel on skin	Viscosity (Pa.s)	Viscosity score
1	5.61	white	soft	Soft & smooth	3.444	+++
2	5.62	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
3	5.59	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
4	5.60	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
5	5.62	white	soft	Soft & smooth	NA	+++
6	5.58	white	soft	Soft & smooth	3.694	+++

NA = Not available, Viscosity score : +++=Very much, ++=Medium, += Slightly

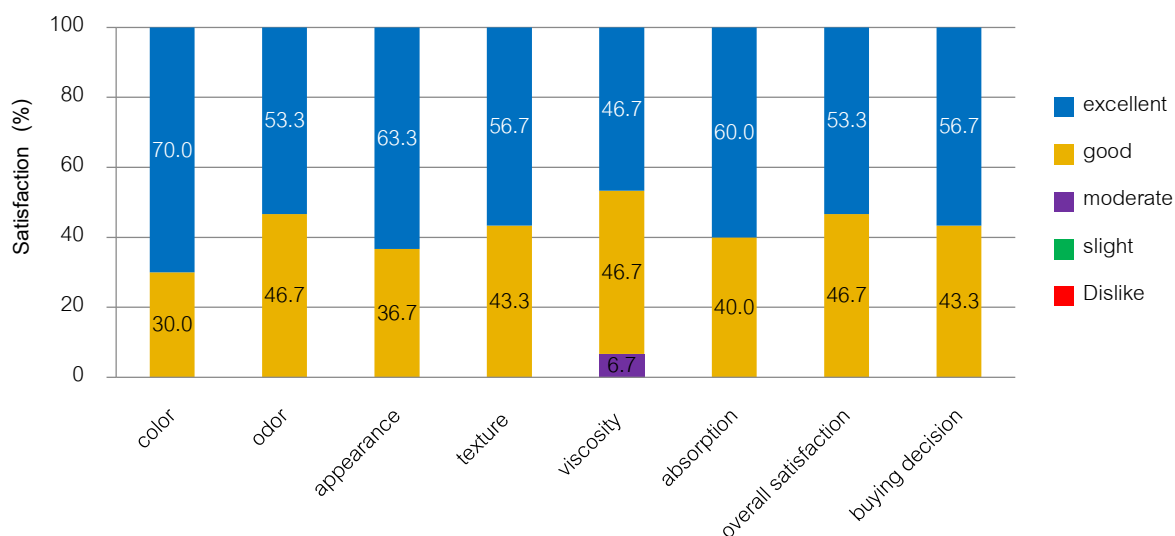


Figure 3 Evaluation of satisfaction of collagen facial serum

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดคอลลาเจนที่มาจากสัตว์น้ำจืด (เกล็ดปลานิลและหนังปลาสร้อย) ให้ผลผลิตคอลลาเจน (yield) เท่ากับ 22% และ 17% และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของคอลลาเจนที่สกัดจากวัตถุดิบแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เกล็ดปลานิล หนังปลาสร้อย และคอลลาเจนในท้องตลาด พบว่า คอลลาเจนในท้องตลาดและคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิล ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสร้อย ส่วนต้นทุนการผลิต พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลาสร้อย และเมื่อเลือกคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลานิลนำไปพัฒนาเป็นตำรับผลิตภัณฑ์เวชสำอาง (เซรั่มบำรุงผิวหน้า) ไปทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เมื่อครบระยะเวลาทดสอบพบว่า มีความหนืดเพิ่มขึ้น แต่ลักษณะสีของเซรั่ม ค่าพีเอช เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดเปลี่ยนแปลง เมื่อนำไปทดสอบความพึงพอใจในอาสาสมัคร พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับดีมาก และมีความต้องการซื้อผลิตภัณฑ์สูงเมื่อมีการวางจำหน่ายในท้องตลาด

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้นำคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางในรูปแบบเซรั่มบำรุงหน้า เพียงผลิตภัณฑ์เดียวเท่านั้น ยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้อีก เช่น ครีมบำรุงผิวกาย หรือพัฒนาในรูปแบบแคปซูลสำหรับบริโภคคอลลาเจนโดยตรง และดำเนินการทดสอบทางคลินิกในมนุษย์เพิ่มเติม เพื่อประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนการวิจัยส่วนหนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ และฐานเรียนรู้ปลาปักเชิงบูรณาการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำที่อนุเคราะห์สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Abdillah, S., Wijiyanti, G., Setiawan, M., Umrohnoor, S. and Nurilmala, M. 2017. In vitro anti-tyrosinase and anti-elastase activity of collagen from sea cucumber (*Holothuria leucospilota*). African Journal of Biotechnology. Vol. 16(15): 771-776.
- AOAC. 2000. American society of analytical chemistry and preparation method. 999.10.
- AOAC Official Method 990.26. 2000. Hydroxyproline in meat and meat products. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition. Gaithersburg, MD, Chapter 39.
- Chantree, K. 2015. Formulation of whitening cosmetics from Lakoocha extract. Suan Dusit Rajabhat University Research Journal 8 (1): Jan-April. 24 p. [in Thai]
- Fisheries. 2016. Fisheries statistics of Thailand. Information and communication technology center. Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Floris, R., Recio, I., Berkhout, B., Visser, S. 2003. Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. Current Pharmaceutical Design, 9, 1257-1273.
- Friess, W. 1998. Collagen – biomaterial for drug delivery. Eur. J. Phar. and Biophar 45: 113-136.
- Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.E. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. Journal of Food Science, 43(2): 556 -559.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D. and Mann, S. 2003. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. J. Struct. Biol. 142: 327– 333.
- Inthuserdha, P., and Chiradetprapai, N. 2016. Extraction of acid-soluble collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skins. Fishery Technological Division, Department of Fisheries. 32 p. [in Thai]
- Kutako, M., Tocharoen, T., Sonthi, M., Hiransuchalert, R. and Watanachote, J. 2016. Yield and protein pattern of collagen extracted from Greenback mullet (*Liza subviridis*) scale by different pepsin concentrations. Khon Kaen AGR. J. 43 SUPPL. 1: 562 – 567. [in Thai]
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., Mielcarek, S., and Włodarczyk, D. 2017. Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298–670. Materials Science and Engineering C 80 (2017) 468–471

- Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T. and Kida, K. 2002. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochemistry* 37: 1403–1412
- Morrissey, M.T., and Park, J.W. 2000. *Surimi and surimi seafood*. Newyork: Marcel Dekker. 127 – 166.
- Pellegrini, N., Pannala, Y. and RiceEvan, C. 1999. Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 9/10(6):1231-1237.
- Patrzykat, A., and Douglas, S. E. 2005. Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protein. *Protein and Peptide Letters*, 12, 19-25.
- Pipatcharoenwong, C. 2008. Fish scale collagen: extraction and partial characterization. Thesis Master of Science. Department of Food Science and Technology, Kasetsart University Bangkok. 131 p. [in Thai]
- Potaros, T., Watthanachaiyingcharoen, R., and Potaros, T. 2011. Preparation and physical stability of Nile tilapia fish skin collagen creams. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal* 2011;6(4): 260-264
- Qiang, Z., Wang, Q., Shun, Lv., Lu, J., Jiang, S., Regenstien, J.M. and Lin, L. 2015. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Bioscience* 13: 2041–2048.
- Thahom, N., and Sompongse, W. 2016. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of Grey featherback (*Notopterus notopterus*). *Journal of Science and Technology*. 23(2):257–267. [in Thai]
- Wang, B., Wang, YM., Chi, CF., Luo, HY., Deng, SG., and Ma, JY. 2013. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scale of croceine croker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs*, 11(11) ,4641-4661
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., and Maloy, W. L. 1997. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, 36, 12869-12880
- Zhuang, Y., Zhuang, Y., Sun, L., Zhao, X., Wang, J., Hou, H., and Li, B. 2009a. Antioxidant and melanogenesis –inhibitory activities of collagen peptide from jelly fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1722-1727

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 อังสุภาณิช
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.ธนัชฐา 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.อัษฎารัตน์ เปี่ยมสมบูรณ์
๓๒. รองศาสตราจารย์ ดร.อลงกลด แทนออมทอง
๓๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา พยู่หะ
๓๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญญาณัฐ สุนทรประสิทธิ์
๓๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลยา ลีมรุ่งเรืองรัตน์
๓๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ครุฑ ศรีกุลนาถ
๓๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จกมล 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.ปัญญ์ดี 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 12 เล่มที่ 2

Volume 12 Number 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2561

July - December 2018

สารบัญวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2561

สารบัญ

บรรณาธิการ

บทความวิจัย

หน้า

ผลของอาหารเสริมวิตามินซีต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาช่อนวัยอ่อน

1

แจ่มจันทร์ เพชรศิริ ทวีเดช ไชยนาพงษ์ ัญญา พันธุ์ฤทธิ์ดำ และธนพล อยู่เย็น

ผลของการใช้โพรไบโอติกฟีโอฟอร์มมัลท์เหลืองในกบนา (*Rana rugulosa*)

11

วารรัตน์ แสนมานิช และเกศินี จันทโรสภณ

การใช้เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 จากทางเดินอาหารปลานิลต่อเชื้อก่อโรคสัตว์น้ำและโรคแดงเกอร์

21

เกศินี จันทโรสภณ

แคโรไฮไทป์ อิติโอแกรมมาตรฐาน และการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*, Dicroglossidae)

31

ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา

วันเพ็ญ กาคำผุย และประวีร์ณ์ สุพรรณอ่วม

ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและคุณค่าทางอาหารของคัสโตรออส

42

สุพัตรา ขุนเสนาะ นพวรรณ จิมสังข์ สถาพร ดิเรกนุชราคม และสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี

การเปรียบเทียบมวลชีวภาพ และคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก่อในการเพาะเลี้ยงระบบปิดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

53

ัญญาลักษณ มาลา จงกล พรมยะ ดวงพร อมรเลิศพิศาล และวิจิตรา แดงปรก

ความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช ดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำในฝายราษฎร์ไศล จังหวัดศรีสะเกษ

63

ปริญญ์ มุลลิน จันทร์เพ็ญ ปิยะวงษ์ มณฑิชา รักศิลป์ และรมณียกร มุลลิน

การเพิ่มมูลค่าคอลลาเจนจากเกล็ดปลานิลและหนังปลาสวายเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

76

พัชรพงษ์ พานิช เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน มรุส ชัยหาญ และดวงพร อมรเลิศพิศาล