



วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

ปีที่ 13 เล่มที่ 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2562

Volume 13 Number 2

July - December 2019

วารสารวิชาการเผยแพร่ความรู้

เทคโนโลยีและส่งเสริมกิจกรรมทางการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

ทั้งเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อม

จัดทำโดย

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง
Journal of Fisheries Technology Research
ISSN 1905-7393

ผู้จัดทำ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ที่ปรึกษา อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

คณบดีคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

หัวหน้ากองบรรณาธิการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุญ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

กองบรรณาธิการ

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

เลขากองบรรณาธิการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกันต์ จิตมนัส มหาวิทยาลัยแม่โจ้

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

ติดต่อสำนักงานกองบรรณาธิการ

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

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

อีเมลล์: jfishtech.mju@gmail.com

เว็บไซต์: http://http://www.fishtech.mju.ac.th/WEB/Journal_FT/main/index.php

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง
Journal of Fisheries Technology Research

ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม พ.ศ. 2562

ISSN 1905-7393

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมงเป็นวารสารวิชาการ
และเป็นลิขสิทธิ์ของคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

มีวัตถุประสงค์เพื่อ

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

ข้อคิดเห็นที่ปรากฏและแสดงในเนื้อหาบทความต่างๆ ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง
ถือเป็นความเห็นและความรับผิดชอบโดยตรงของผู้เขียนโดยเฉพาะ 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 นักวิชาการกับผู้ใช้ประโยชน์ ทุกภาคส่วน เช่น เกษตรกร ภาคเอกชนและผู้สนใจ

วารสารฉบับนี้ประกอบด้วยเนื้อหาครอบคลุมอาหารที่เหมาะสมสำหรับการอนุบาลปลาเลี้ยง การลอกคราบของปูทะเลเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาปูใหม่ ผลของสีน้ำเทียมต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว ชีววิทยาบางประการของกุ้งก้ามกราม ปลากดเหลือง ปลาชิวทอง และปลาหลดจุด รวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลคติก

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

กองบรรณาธิการ

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมและต้นทุนในการอนุบาลลูกปลาเลียหินวัยรุ่น

Study of suitable feed and feed cost for nursing of Stonelapping minnow

(*Garra cambodgiensis* (Tirant, 1884)) juveniles

เกรียงไกร สีตะพันธุ์^{1*}, สิทธิศักดิ์ ปิ่นมณฑลกุล², เจนจิรา แก้วดี¹, อัฐสระม แสนสุภา¹
และจักรพันธ์ สุวานิจสรณ์¹

Kriengkrai Seetapan^{1*}, Sitthisak Pinmongkhogul², Janejira Kaewtip¹, Itsaram Saensupa¹,
and Jakkaphan Tanitsorn¹

¹ สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

¹ Department of Fishery, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

² Department of Biology, School of Science, University of Phayao, Phayao province 56000

* Corresponding author: kook82@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมและต้นทุนในการอนุบาลลูกปลาเลียหินวัยรุ่น ด้วยอาหารต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ ปลาป่น อาหารอนุบาลลูกปลาสำเร็จรูปไฮเกรท อาหารปลากินเนื้อ อาหารปลากินพืช และรำละเอียด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ใช้ลูกปลาความยาวเฉลี่ย 2.60 ± 0.31 เซนติเมตร (0.24 ± 0.09 กรัม) จำนวน 40 ตัว/ตู้ ทดลองในตู้กระจกขนาด $0.30 \times 0.50 \times 0.30$ เมตร เลี้ยงนาน 60 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ลูกปลาเลียหินที่อนุบาลด้วยปลาป่นมีความยาวที่เพิ่มขึ้น (1.45 ± 0.028 เซนติเมตร/ตัว) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (0.41 ± 0.005 กรัม/ตัว) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (1.69 ± 0.04 %/วัน) และอัตราการแลกเนื้อ (3.48 ± 0.51) ดีกว่าปลาเลียหินในกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนอัตราการรอดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามต้นทุนค่าอาหารมีค่าต่ำสุดเมื่ออนุบาลลูกปลาด้วยรำละเอียด เมื่อพิจารณาถึงผลตอบแทนต่อต้นทุน (B/C ratio) พบว่าการอนุบาลลูกปลาด้วยรำละเอียด มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงควรอนุบาลลูกปลาเลียหินวัยรุ่นด้วยรำละเอียด

คำสำคัญ: ปลาเลียหิน, อาหาร, อัตราการเจริญเติบโต

Abstract

Study of suitable feed and feed cost for nursing of Stonelapping minnow (*Garra cambodgiensis*) juveniles. Groups of fish were fed in 5 treatments, including: fish meal (FM), Hi-grade[®] commercial nursery feed (HG), carnivorous feed (CF), herbivores feed (HF) and fine rice bran (RBM). The experiments were a completely randomized design (CRD) in 3 replications. Initially the fish were an average length of 2.60 ± 0.31 cm (0.24 ± 0.09 g) in aquarium $0.30 \times 0.50 \times 0.30$ m in size. In total there were 40 fish per aquarium reared for 60 days. At the end of the experiment, a significant increasing of the growth performance in fish fed FM was better than other treatments

as length gain (1.45 ± 0.03 cm/fish), weight gain (0.41 ± 0.01 g/fish), specific growth rate (1.69 ± 0.04 %/day), and feed conversion ratio (3.48 ± 0.51). However, the lowest feed cost per fish was reared with RBM. Furthermore, B/C ratio was significantly highest in fish was reared with RBM ($p < 0.05$). Considering B/C ratio the RBM could be recommended for nursing *G. cambodgiensis* juveniles.

Keywords: *Garra cambodgiensis*, diet, growth performance

บทนำ

ปลาเลียหิน หรือปลามัน (*Garra cambodgiensis* (Tirant, 1884)) มีชื่อสามัญว่า Stonelapping minnow เมื่อโตเต็มที่มีขนาดตัว 8-15 เซนติเมตร เป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็กที่พบได้ในลำธารขนาดเล็กถึงขนาดกลางตั้งแต่เชิงเขาจนถึงพื้นที่สูง (Kottelat, 1998) ลักษณะที่อยู่อาศัยของปลาชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณน้ำไหล พื้นท้องน้ำเป็นก้อนหินขนาดปานกลาง และมีสาหร่ายเกาะติด ปลาเลียหินเป็นปลาที่มีรายงานว่ากินสาหร่ายเป็นอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะปากของปลาชนิดนี้ที่พบว่ามีปากขนาดเล็กคล้ายปากดูดอยู่ใต้จงอยปาก ริมฝีปากล่างมีแผ่นหนังกลม (circular mental disk) ช่วยให้สามารถกินสาหร่ายและอินทรีย์วัตถุตามก้อนหิน หรือพื้นท้องน้ำได้ดี (Rainboth 1996; Kottelat, 1998) นอกจากนี้ Mazlan *et al.* (2007) ยังรายงานเพิ่มเติมว่าปลาเลียหินเป็นปลากินพืช (herbivore) เป็นอาหาร โดยอาหารที่พบในกระเพาะปลาเลียหินในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายชนิดต่างๆ และส่วนต่างๆ ของพืชน้ำ

ปลาเลียหินเป็นปลาที่นิยมบริโภคโดยคนในพื้นที่สูงทางภาคเหนือตอนบน (Pornsopin *et al.*, 2011) เช่น เชียงใหม่ พะเยา และน่าน เป็นต้น เนื่องจากมีความอร่อย และหาได้ง่าย โดยเฉพาะช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นฤดูวางไข่ของปลา ช่วงเวลาดังกล่าวปลาจะมีไข่จำนวนมากในท้อง นอกจากนี้ยังพบว่า ในบางพื้นที่มีการรวบรวมปลาเลียหินเพื่อส่งขายเป็นปลาสวยงาม รวมถึงปลาชนิดนี้ยังถูกนำไปใช้ในธุรกิจสปาประเภทฟิชสปา (fish spa) หรือ มัจฉาบำบัด เพื่อทดแทนปลา *Garra rufa* ซึ่งเป็นปลาที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จากสาเหตุเหล่านี้ จึงอาจส่งผลกระทบต่อประชากรของปลาเลียหินในธรรมชาติอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ซึ่งปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง อันเป็นผลมาจากการขยายตัวของชุมชนเมือง การบุกรุกป่าต้นน้ำเพื่อทำการเกษตร และการเปลี่ยนแปลงของธรรมชาติในปัจจุบัน

สำหรับข้อมูลด้านการอนุบาลลูกปลาเลียหินวัยรุ่นยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะข้อมูลด้านชนิดอาหารที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และมีต้นทุนที่เหมาะสม ทั้งนี้ต้นทุนในส่วนของการถือเป็นตัวต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำที่สูง โดยพบว่าต้นทุนประมาณร้อยละ 55-80 ของต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำทั้งหมด (Sriphairoj *et al.*, 2015) ดังนั้นการหาชนิดอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงลูกปลาเลียหิน ควรคำนึงถึงต้นทุนการผลิตที่ต่ำรวมถึงหาได้ง่ายควบคู่ไปด้วย การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาประเภทของอาหารที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกปลาเลียหินขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิต และมีต้นทุนในการเลี้ยงปลาที่เหมาะสม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการเลี้ยงปลาเลียหินเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ทำการเพาะและอนุบาลลูกปลาเลียหิน ณ พื้นที่ปฏิบัติการสาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อนุบาลลูกปลาในบ่อพลาสติกวงกลมขนาด 1.20 เมตร ระดับน้ำลึก 0.30 เมตร ให้ไรแดงมีชีวิตเป็นอาหารวันละ 2 เวลา คือ 08:00 และ 16:00 น. ระหว่างอนุบาลลูกปลา มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 50 ของระดับน้ำที่เลี้ยงลูกปลาทุกสัปดาห์ และมีการให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดการอนุบาล เมื่อลูกปลาอายุครบ 1 เดือน หรือมีความยาวลำตัวทั้งหมดและน้ำหนัก 2.60 ± 0.31 เซนติเมตร และ 0.24 ± 0.09 กรัม ตามลำดับ ทำการแยกปลาใส่ตู้กระจกสำหรับทำการศึกษาคต่อไป

สภาวะทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด $0.30 \times 0.50 \times 0.30$ เมตร เต็มน้ำสูง 0.20 เมตร คิดเป็นปริมาตรน้ำประมาณ 30 ลิตร จำนวน 15 ตู้ แต่ละตู้มีการให้อากาศผ่านหัวทรายตู้ละ 1 ชุด ให้อาหารปริมาณ 5% ของน้ำหนักตัว โดยให้วันละ 2 เวลา คือเวลา 8.00 น. และ 16.00 น. ดูดตะกอนที่บริเวณก้นตู้ทดลองในช่วงเวลา 14.00 น. ของทุกวัน และเติมน้ำใหม่ให้ได้ระดับเดิม

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกปลาเลียหิน ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของลูกปลา วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design: CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (Treatments) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (Replications) แต่ละซ้ำมีลูกปลาซ้ำละ 40 ตัว ให้อาหารแตกต่างกันดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ปลาป่น (Fish meal: FM)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารอนุบาลลูกปลาส่งเกรดไฮเกรด (Hi-grade® commercial nursery feed: HG)

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารปลากินเนื้อ (Carnivorous feed: CF)

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารปลากินพืช (Herbivores feed: HF)

ชุดการทดลองที่ 5 รำละเอียด (Fine rice bran: RBM)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

สุ่มอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลองจำนวน 200 กรัม นำไปวิเคราะห์โภชนาการต่าง ๆ ในอาหาร ได้แก่ โปรตีน ไขมัน กาก ใย และความชื้น โดยใช้วิธี micro-kjeldahl, ether extraction, acid-alkali digestion, muffle furnace combustion และ oven drying ตามวิธีของ Proximate analysis (AOAC, 2000) พลังงานรวม (gross energy: GE) วิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (2000) ส่วนค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ (nitrogen free extract: NFE) และค่าพลังงานที่ย่อยได้ (Digestible energy: DE) คำนวณตามวิธีของ NRC (1993) แสดงใน Table 1

Table 1 Chemical composition of the experimental diets (Mean $\pm$ SD)

Percent	Treatments				
	FM	HG	CF	HF	RBM
Proximate composition by analysis (% on dry weight basis)					
Crude protein	54.97 $\pm$ 3.62	38.65 $\pm$ 2.14	28.39 $\pm$ 0.11	15.72 $\pm$ 0.13	12.32 $\pm$ 0.20
Crude lipid	10.07 $\pm$ 0.37	6.16 $\pm$ 0.13	4.91 $\pm$ 0.32	2.72 $\pm$ 0.33	17.68 $\pm$ 2.58
Crude fiber	1.89 $\pm$ 0.53	1.46 $\pm$ 0.37	1.26 $\pm$ 1.02	3.04 $\pm$ 0.65	0.34 $\pm$ 0.16
Total ash	24.04 $\pm$ 2.82	18.24 $\pm$ 1.48	12.41 $\pm$ 0.09	7.27 $\pm$ 0.32	15.24 $\pm$ 2.42
Chemical composition (Calculated values)					
GE (kcal/100 g)	422.62 $\pm$ 49.56	394.31 $\pm$ 17.69	396.27 $\pm$ 18.33	374.67 $\pm$ 6.41	430.02 $\pm$ 26.25
NEF (%)	4.26 $\pm$ 6.24	28.76 $\pm$ 1.07	46.19 $\pm$ 3.57	63.36 $\pm$ 0.62	47.12 $\pm$ 0.17
DE (kcal/100 g)	283.62 $\pm$ 31.22	256.43 $\pm$ 11.20	254.08 $\pm$ 11.89	235.13 $\pm$ 4.66	302.34 $\pm$ 21.81

Abbreviations FM: fish meal, HG: (HG) Hi-grade[®] commercial nursery feed, CF: carnivorous feed, HF: herbivores feed, RBM: rice bran meal, GE: gross energy = (%protein $\times$ 5.64) + (%lipid $\times$ 9.44) + (%NFE $\times$ 4.11) (AOAC, 2000), DE: digestible energy = (%protein $\times$ 3.5) + (%lipid $\times$ 8.0) + (%NFE $\times$ 2.5) (NRC, 1993), NFE = 100- %(Crude protein + Crude lipid + Crude fiber + total ash + moisture) (NRC, 1993)

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูลด้านน้ำหนัก และความยาวของปลาทุกชุดการทดลองทุก 15 วัน จนถึงสิ้นสุดการทดลอง การชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง และนับจำนวนลูกปลาที่รอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าต่างๆ ดังนี้

ก) ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Length gain (LG) : เซนติเมตร/ตัว)

= ความยาวปลาเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (เซนติเมตร) – ความยาวปลาเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง (เซนติเมตร)

ข) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Weight gain (WG) : กรัม/ตัว)

= น้ำหนักปลาเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) – น้ำหนักปลาเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม)

ค) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate (SGR) : เปอร์เซ็นต์/วัน)

= $100 \times \frac{\ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$

ง) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Rate (FCR))

= $\frac{\text{ปริมาณน้ำหนักเฉลี่ยของอาหารที่ปลาแต่ละตัวกินในแต่ละตู้เมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของปลาแต่ละตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละตู้เมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$

จ) อัตรารอด (Survival Rate : เปอร์เซ็นต์)

= $\frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือรอดในตู้เมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาที่ปล่อยในตู้เมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$



วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

ปีที่ 13 เล่มที่ 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2562

Volume 13 Number 2

July - December 2019

สารบัญวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2562

สารบัญ

บรรณาธิการ

บทความวิจัย

	หน้า
การศึกษาอาหารที่เหมาะสมและต้นทุนในการอนุบาลลูกปลาเลียงผา	1
เกรียงไกร สีตะพันธุ์ สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล เจนจิรา แก้วดีป อัฐธรรม แสนสุภา และจักรพันธ์ สุทธิจิตรณ์ ผลของสื่อน้ำเทียมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริบซิน ไคโมทริบซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโต ของปลากะพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน	11
วิญญู บุญประเสริฐ ประจวบ ฉายบุญ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน จงกล พรมยะ และชนกันต์ จิตมนัส การเจริญเติบโตของปูทะเล (<i>Scylla spp.</i>) หลังการลอกคราบ	25
ภัทราวดี ศรีมีเทียน และจิตติมา สุวรรณมาลา จุลกายวิภาคระบบย่อยอาหารของกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	37
สุวดี มะฮันนัต และจิราพร โรจน์ทินกร มิถุนวิทยาและสุขภาพของรังไข่ปลาเกล็ดเหลือง <i>Hemibagrus filamentus</i> (Fang and Chaux, 1949) จากแม่น้ำตาปีภาคใต้ ของประเทศไทย	46
ปิยากร บุญยัง ศิลปชัย เสนารัตน์ พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ เจษฎา เกษตระทัต วรณีย์ จิรอังกรสกุล พหล โกสียะจินดา และธีรภมร เพ็งสกุล พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาชิวทอง <i>Rasbora einthovenii</i> บริเวณป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส	58
นุรฮัน ยีแสม สิทธิศักดิ์ จันทรรัตน์ และพัน ยี่ล้น ลักษณะโครโมโซมเครื่องหมายและโคริโอไทป์ของปลาหลดจุด (<i>Macrognathus siamensis</i>) และปลาหลดคอก (M. <i>circumcinctus</i>)	69
กฤติมา เสาวกุล และสำเนา เสาวกุล การติดเชื้อปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>) ด้วย <i>Streptococcus agalactiae</i> โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก	81
ศยามล รักศรี รัชต์ ชัดติยะ ศุภรัตน์ บุญยยาตรา และภูริกร วงศ์เสถียร การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียกรดแลคติกและราเหมาเป็นหมักวัสดุเพาะเชื้อจากปลา	91
เกศินี จันทรโสมณ วรพล สุพัฒน์ และเสรี จันทรโสมณ	

ง) อัตราผลตอบแทนต่อต้นทุน (B/C ratio)

$$= \frac{\text{ราคาลูกปลา (บาท)}}{\text{ต้นทุนค่าอาหาร (บาท)}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ การเจริญเติบโตด้านน้ำหนักและความยาวเพิ่มเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการรอดและอัตราผลตอบแทนต่อต้นทุน ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย ระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS

ผลและวิจารณ์การศึกษา

การศึกษากาอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงลูกปลาเลียหินความยาวเฉลี่ย 2.60 ± 0.31 เซนติเมตร (0.24 ± 0.09 กรัม) ที่ได้รับอาหารต่างกัน 5 ชุดการทดลอง ประกอบด้วย ปลาป่น, อาหารอนุบาลลูกปลาสำเร็จรูปไฮเกรท, อาหารปลากินเนื้อ, อาหารปลากินพืช และรำละเอียด ทำการศึกษานาน 60 วัน พบว่า ที่ 15 วัน หลังจากเริ่มการทดลอง ความยาวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกปลาเลียหินในชุดการทดลองที่ได้รับปลาป่น, อาหารอนุบาลลูกปลาสำเร็จรูปไฮเกรท และอาหารปลากินเนื้อ เป็นอาหาร มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปลากินพืช และรำละเอียด อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และหลังจากนั้นที่ 30, 45 และ 60 วันหลังจากเริ่มการทดลอง พบว่า ความยาวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกปลาเลียหินมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ ชุดการทดลองที่ได้รับปลาป่นเป็นอาหาร ลูกปลามีความยาวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับอาหารอนุบาลลูกปลาสำเร็จรูปไฮเกรท และอาหารปลากินเนื้อ ตามลำดับ และสุดท้ายชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปลากินพืช และรำละเอียด มีความยาวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกปลาน้อยกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Figure 1)

เมื่อสิ้นสุดการศึกษา พบว่า อาหารต่างชนิดส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาเลียหินในแต่ละชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 2) โดยลูกปลาที่อนุบาลด้วยปลาป่นมีอัตราการเจริญเติบโต ได้แก่ ความยาวสุดท้าย, น้ำหนักสุดท้าย, ความยาวที่เพิ่มขึ้น, น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Imsilp *et al.* (2004) ที่พบว่า การอนุบาลลูกปลาจาก (*Hypsibarbus malcolmi*) อายุ 25 - 45 วัน ด้วยปลาป่นบดละเอียดมีการเจริญเติบโตดีกว่าลูกปลาที่อนุบาลด้วยรำละเอียด สาเหตุที่ปลาป่นส่งผลดีต่ออัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาเนื่องจากปลาป่นมีปริมาณโปรตีน (54.97 ± 3.62 %) สูงกว่าอาหารชนิดอื่นที่ศึกษาในครั้งนี้ (Table 1) สอดคล้องกับความต้องการโปรตีนของลูกปลาขนาดเล็ก รวมถึงมีความต้องการโปรตีน และพลังงานสูงเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต เพื่อตอบสนองกับอัตราการเจริญเติบโตที่สูงของลูกปลา รวมถึงปลาป่นยังเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ รวมถึงมีแร่ธาตุที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ แคลเซียม, ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุรองอื่น ๆ รวมทั้งวิตามินต่าง ๆ เพียงพอกับความต้องการของสัตว์น้ำ นอกจากความสมบูรณ์ทางโภชนาการแล้วปลาป่นยังมี

กลิ่นที่ดึงดูดให้ปลากินอาหารได้ดี (NRC, 1993; Cheeke, 2005) และที่สำคัญปลาป่นยังเป็นแหล่งกรดอะมิโน และกรดไขมันที่มีคุณภาพ ระดับโปรตีนที่สูงในปลาป่นสามารถถูกย่อยได้ง่าย (Pond *et al.*, 2005) รวมถึงปลาป่นยังเป็นวัตถุดิบที่ประหยัดได้พลังงานอย่างดี (El – Sayed *et al.*, 2007) ทั้งนี้ความต้องการโปรตีนจะมีค่าแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของลูกปลา เช่น ลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ขนาด 0.5, 0.5-10, 1-30 และ 30 กรัม ขึ้นไป มีความต้องการปริมาณโปรตีน 40-45, 35-40, 30-35 และ 25-30 % ตามลำดับ (Jauncey, 1998) ลูกปลาจากมีความต้องการปริมาณโปรตีน 55% (Imsilp *et al.*, 2004) และลูกปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) ระดับโปรตีนที่เหมาะสมอยู่ที่ 45% (Matthong *et al.*, 2015) นอกจากชนิดลูกปลาแล้วความต้องการโปรตีนของลูกปลายังขึ้นกับขนาด อายุ คุณภูมิ และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ (NRC, 1993) การศึกษานี้ช่วยยืนยันว่าการอนุบาลลูกปลาเลี้ยงยังจำเป็นต้องใช้อาหารที่มีโปรตีนจากสัตว์ในปริมาณที่เหมาะสม แม้ว่ารายงานก่อนหน้านี้จะระบุว่าปลาเลี้ยงเป็นปลากินพืชเป็นอาหาร (Mazlan *et al.*, 2007)

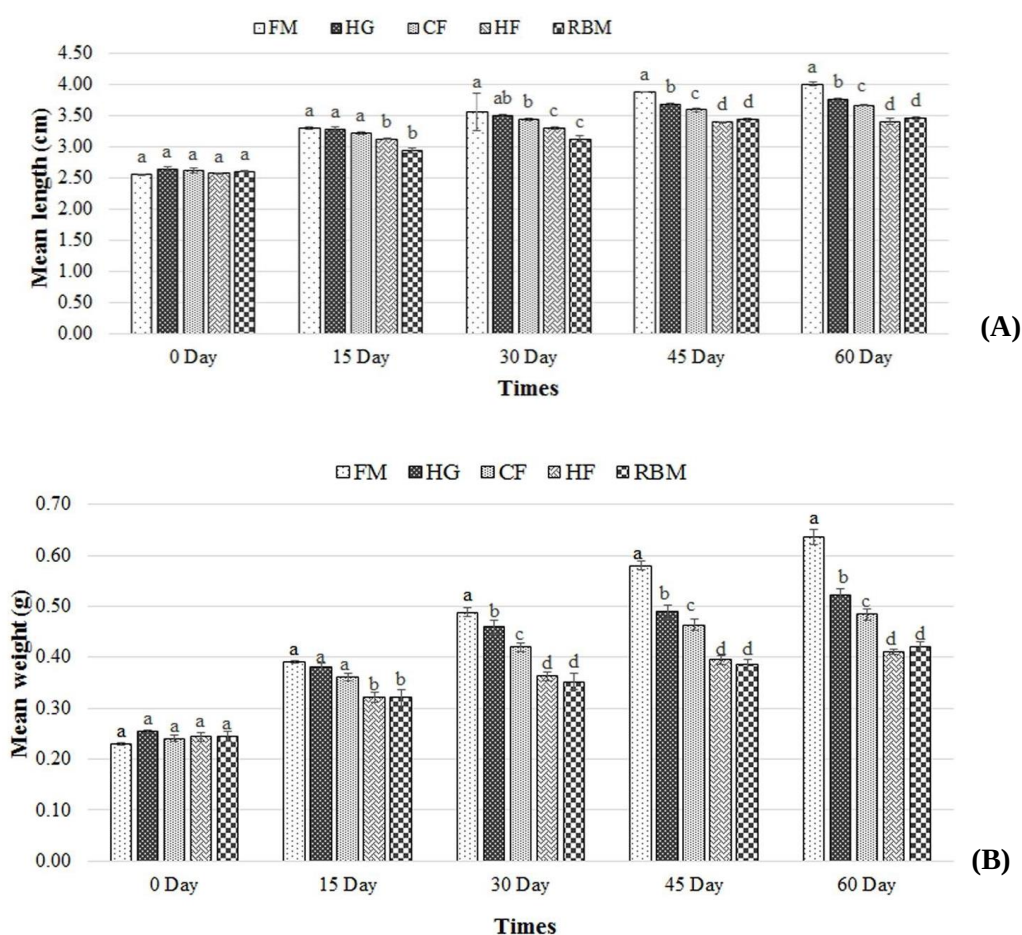


Figure 1 Average length-weight of *G. cambodgiensis* at nursed with different feeds after 60 days rearing; A) average length (mean $\pm$ SE) and B) average weight (mean $\pm$ SD). Groups with same letter index on the same day do not differ significantly statistically by Duncan's New Multiple Range Test ($p > 0.05$)

Table 2 Growth and survival rate of *G. cambodgiensis* at nursed with different feeds after 60 days rearing

Indicator	Treatments					P-Value
	FM	HG	CF	HF	RBM	
IL (cm/fish)	2.60±0.039	2.60±0.027	2.60±0.028	2.60±0.026	2.60±0.029	0.288
FL (cm/fish)	4.00±0.035 ^a	3.76±0.028 ^b	3.66±0.024 ^c	3.41±0.030 ^d	3.46±0.026 ^d	0.000
LG (cm/fish)	1.45±0.028 ^a	1.13±0.024 ^b	1.06±0.022 ^b	0.84±0.063 ^c	0.86±0.027 ^c	0.000
IW (g/fish)	0.20±0.010	0.30±0.008	0.20±0.008	0.20±0.008	0.20±0.008	0.437
FW (g/fish)	0.60±0.016 ^a	0.50±0.011 ^b	0.50±0.009 ^b	0.40±0.010 ^c	0.40±0.009 ^c	0.000
WG (g/fish)	0.41±0.005 ^a	0.27±0.020 ^b	0.24±0.020 ^b	0.17±0.024 ^c	0.18±0.008 ^c	0.000
SGR (%/day)	1.69±0.035 ^a	1.21±0.092 ^b	1.18±0.143 ^b	0.87±0.104 ^b	0.91±0.074 ^b	0.004
FCR	3.48±0.510 ^b	4.59±0.394 ^{ab}	4.75±0.587 ^{ab}	6.43±0.959 ^a	5.68±0.473 ^{ab}	0.050
SR (%)	90.00±7.50	93.33±2.21	96.67±0.83	92.50±5.00	95.83±3.01	0.764
B/C ratio	8.40±0.300 ^d	4.33±0.084 ^d	28.30±1.466 ^c	44.20±1.944 ^b	62.72±2.969 ^a	0.000

Abbreviations: Means followed by different letters in the same row are significantly different by Duncan's New Multiple Range Test ($p < 0.05$). IL: Initial length, FL:

Final length, LG: length gain, IW: Initial weight, FW: Final weight, WG: Mean weight gain, SGR: Specific growth rate, FCR: Feed conversion ratio, SR:

Survival rate. Feed costs were calculated on the following variable costs: costs of FM: fish meal = B 58/kg, HG: Hi-grade® commercial nursery feed =

B 120/kg, CF: carnivorous feed = B 19.5/kg, HF: herbivores feed = B 14/kg, RBM: rice bran meal = B 10/kg

การศึกษาค้นคว้าพบว่าอัตราการแลกเนื้อของลูกปลาเลียหินที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 5 ชนิด มีค่าค่อนข้างสูง (3.48 – 6.43) (Table 2) โดยชุดการทดลองที่ได้รับปลาป่นเป็นอาหารดีที่สุด (3.48±0.72) สาเหตุที่ทำให้อัตราการแลกเนื้อของการศึกษาค้นคว้านี้สูงอาจเกิดจากการให้อาหารในอัตรา 5% ของน้ำหนักตัว/วัน ซึ่งถือว่าค่อนข้างสูง สาเหตุที่การศึกษานี้ให้อาหารในปริมาณที่สูง เนื่องจากป้องกันลูกปลาได้รับอาหารไม่เพียงพอ และไม่ทั่วถึง ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของลูกปลา สอดคล้องกับ Webster *et al.* (2000) ที่แนะนำว่า ในการทดลองที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพของอาหาร ควรให้อาหารในปริมาณที่มากเกินความต้องการของปลา เนื่องจากหากให้อาหารในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของปลาอาจส่งผลให้ผลการศึกษาที่ได้เกิดความผิดพลาดได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาค้นคว้านี้ยังให้ผลดีกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Pomsopin *et al.* (2011) ที่ศึกษาการเลี้ยงปลาเลียหินด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลีนาในสัดส่วนที่ต่างกัน พบว่า มีอัตราการแลกเนื้อ อยู่ระหว่าง 4.99 – 5.39

อัตราอดจากการเลี้ยงลูกปลาเลียหินด้วยอาหารต่างกัน 5 ชนิด พบว่า มีอัตราอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 2) เนื่องจากปลาเลียหินจัดเป็นปลากินพืชเป็นอาหาร ซึ่งอาหารที่พบในกระเพาะปลาจากการสำรวจจากธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่าย ไดอะตอม และส่วนต่าง ๆ ของพืชน้ำ (Rainboth 1996; Kottelat, 1998; Ward-Campbell *et al.*, 2005; Mazlan *et al.*, 2007) อีกทั้งยังเป็นสัตว์ที่ไม่มีพฤติกรรมกินกันเอง (cannibalism) ดังนั้นชนิดของอาหารจึงไม่ส่งผลต่ออัตราอดของลูกปลาเลียหิน นอกจากนี้ตลอดการทดลองมีการให้อาหารอย่างเพียงพอต่อความต้องการของลูกปลา และมีการดูดตะกอน และเศษอาหารที่เหลือออก วันละครั้งแล้วเติมน้ำใหม่ให้ได้ระดับเดิม ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะช่วยทำให้คุณภาพน้ำตลอดการศึกษาเหมาะสมกับการดำรงชีวิตของลูกปลาเลียหิน

ต้นทุนค่าอาหารที่ใช้อนุบาลลูกปลาเลียหินมีค่าแตกต่างกัน โดยรำละเอียดมีค่าต่ำสุด และมีอัตราส่วนผลตอบแทนต่อต้นทุน (B/C ratio) สูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 2) แม้ว่ารำละเอียดจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด ($p<0.05$) ทั้งนี้การเลือกชนิดอาหารที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกปลาขึ้นกับวัตถุประสงค์ของผู้ผลิตว่าเพื่อรายได้ในการจำหน่ายลูกปลาหรือเพื่อต้องการให้ลูกปลาเจริญเติบโตดี (Ungsethaphan *et al.*, 2011) เนื่องจากการจำหน่ายลูกปลาเลียหินโดยเฉพาะตลาดปลาสวยงามนิยมจำหน่ายด้วยหน่วยนับเป็นตัว โดยไม่สนใจเรื่องขนาดตัวที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (1-2 เซนติเมตร) ดังนั้นการตัดสินใจอนุบาลลูกปลาเลียหินด้วยรำละเอียดจึงมีความเหมาะสมมากที่สุด ทั้งด้านอัตราอดของลูกปลาและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้รำละเอียดยังเป็นวัตถุดิบอาหารที่หาได้ง่ายโดยเฉพาะในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงลูกปลาเลียหินความยาวเฉลี่ย 2.60±0.31 เซนติเมตร (0.24±0.09 กรัม) ที่ได้รับอาหารต่างกัน 5 ชุดการทดลอง ประกอบด้วย ปลาป่น, อาหารอนุบาลลูกปลาสำเร็จรูปไฮเกรท, อาหารปลากินเนื้อ, อาหารปลากินพืช และรำละเอียด ทำการศึกษานาน 60 วัน พบว่า อาหารต่างชนิดส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตราอดของลูกปลาเลียหิน โดยลูกปลาเลียหินที่อนุบาลด้วยปลาป่น

มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าลูกปลาที่อนุบาลด้วยอาหารชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)) แต่อย่างไรก็ตามการอนุบาลลูกปลาเลียหินด้วยรำละเอียดมีต้นทุนค่าอาหารต่ำที่สุด และเมื่อพิจารณาถึงอัตราผลตอบแทนต่อต้นทุน (B/C ratio) พบว่าการอนุบาลลูกปลาด้วยรำละเอียด มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงควรอนุบาลลูกปลาเลียหินด้วยรำละเอียด ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางเพื่อพัฒนาวิธีการอนุบาล และผลิตลูกปลาเลียหินในเชิงธุรกิจต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยพะเยา ทางคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ สุดท้ายขอขอบคุณนิสิตทุกท่านของสาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนงานวิจัยนี้ผ่านไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 2000. Official Method of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland.
- Cheeke, P.R. 2005. Applied Animal Nutrition: Feed and Feeding. 3rd ed. Pearson Prentice Hall, Newjersey.
- El-Sayed, Y.S., T.T. Saad and El-Bahr, S.M. 2007. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. Environ. Toxicol. Pharmacol. 24: 212-217.
- Imsilp, U., W. Tinnangwattana and Saleetid. V. 2004. Suitable feed for nursing goldfin tinfoil barb, *Hypsibarbus malcolmi* (Smith, 1945) larva. Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok. Thailand. 21 p. [in Thai]
- Jauncey, K. 1998. Tilapia Feeds and Feeding. Pisces Press Ltd, Sterling, Scotland.
- Kottelat, M. 1998. Fishes of the Nam Theun and Xe Bangfai basin, Laos, with diagnoses of twenty-two new species (Teleostei : Cyprinidae, Balitoridae, Cobitidae, Coiidae and Odontobutidae). Ichthyol. Explor. Freshwater 9(1): 1-128.
- Matthong, A., B. Yuangsoi and Boonyoung, S. 2015. A Study of optimal dietary protein and energy level for nursing of climbing perch (*Anabas testudineus*). Prawarun Agricultural Journal 12(1): 17-24. [in Thai]
- Mazlan, A.G., A. Samat, A. Amirrudin and Anita, T. 2007. Aspects on the biology of *Garra cambodgiensis* and *Mystacoleucus marginatus* (Cyprinidae) from Ulu Dungun, Terengganu. Malaysian Applied Biology 36(1): 67-72.

- NRC. 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington D.C.
- Pond, W.G., D.C. Church, K.R. Pond and Schoknecht, P.A. 2005. Basic Animal Nutrition and Feeding. 5th ed. Wiley and Sons, Inc., New York.
- Pornsopin, S., P. Pornsopin and Kantiyawong, S. 2011. Rearing of stonelapping minnow, *Garra cambodgiensis* (Tirant, 1884) with different dietary spirulina ratio. Thai Fisheries Gazette 64(3): 230-240. [in Thai]
- Rainboth, W. J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 265 p.
- Sriphairoj, K., N. Kamolrat, W. Chaimongkon and Ingsrisawang, V. 2015. Cost-Benefit Production of Nile tilapia cage culture in Sakon Nakhon province. Khon Kaen Agr. J. 43 suppl. 1: 587-594. [in Thai]
- Ungsethaphan, T., T. Pimpimon and Worapussu, T. 2011. Study on diet and stocking density in net cage culture of Climbing perch (*Anabas testudineus*) fingerlings. Journal of Fisheries Technology Research 5(2): 1-11. [in Thai]
- Ward-Campbell, B.M.S, F.W.H. Beamish and Kongchaiya, C. 2005. Morphological characteristics in relation to diet in five co-existing Thai fish species. Journal of Fish Biology 67:1266–1279.
- Webster, C.D., R.T. Kenneth, A.M. Morgan, E.J. Grisby and Gannam, A.L. 2000. Use of hempseed meal, poultry by-product meal, and canola meal in practical diets without fish meal for sunshine bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). Aquaculture 188: 299-309.

**ผลของสีน้ำเทียมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซิน
ไคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่น
ที่เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน**

**Effect of Artificial Water Colors on Enzymes Activity, TC/ratio and Growth
Performance of Juveniles Asian Seabass (*Lates Calcarifer* Bloch, 1790) Rearing in
Recirculating Aquaculture System (RAS)**

**วิญญู บุญประเสริฐ^{1*}, ประจวบ ฉายบุ², เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน³, จงกล พรมยะ⁴
และชนกันต์ จิตมนัส⁵**

**Winyoo Boonprasert^{1*}, Prachaub Chaibu², Kriangsak Mengumphan³, Jongkol Promya⁴
and Chanagun Chitmanat⁵**

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

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

Corresponding author: lactasai@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ศึกษาผลของสีน้ำเทียมที่แตกต่างกัน 4 สีต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่น (*Lates Calcarifer*) โดยเลี้ยงในสีน้ำที่แตกต่างกัน คือ สีน้ำธรรมชาติ (ชุดควบคุม) สีน้ำตาล สีน้ำเงิน และสีเขียวอมน้ำเงิน เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 58.08 ± 2.72 กรัม และอัตราการรอด 83.11 ± 6.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อประเมินผลของสีน้ำที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารคือ ทริปซินและไคโมทริปซิน พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน รวมทั้งอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) ดีกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสีน้ำเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำชนิดนี้ และสามารถนำไปปรับปรุงระบบการเลี้ยง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปลากะพงขาวในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (RAS) ได้

คำสำคัญ: ปลากะพงขาววัยรุ่น สีน้ำเทียม กิจกรรมเอนไซม์ ทริปซิน ไคโมทริปซิน ระบบน้ำหมุนเวียน

Abstract

This study investigated the effects of four different artificial water colors on enzymes activity, TC/ratio and growth performance of juveniles Asian seabass (*Lates Calcarifer*). Asian seabass were reared for 10 weeks in four artificial water colors (natural water (control), brown, blue, blue-green). The result showed that juveniles Asian seabass in treatment 4 were significantly greater growth than those in control ($p < 0.05$) with an increased weight of 58.08 ± 2.72 gram. The survival rate was 83.11 ± 6.48 percent. For the effect of water colors on digestibility of trypsin and chymotrypsin,

treatment 4 showed the tendency of activity and the ratio of trypsin and chymotrypsin (T / C ratio) of fish was significantly greater quality than those of other treatments ($p < 0.05$). It was concluded that the water color is an important factor for this species survival and may benefit for improving culture system, particularly for optimizing performance of Asian seabass rearing in recirculating aquaculture system (RAS).

Keywords: Juveniles Asian seabass, Artificial water colors, Enzymes activity, T/C ratio, RAS

บทนำ

ปลากะพงขาว (*Lates Calcarifer* Bloch, 1790) เป็นปลาที่อาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำเค็ม น้ำกร่อยจนกระทั่งน้ำจืด และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีคุณค่าทางโภชนาการเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย นับวันความต้องการบริโภคปลากะพงขาวจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ประกอบกับผลผลิตทางทะเลเริ่มมีแนวโน้มในอัตราที่ลดลง สืบเนื่องจากความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำธรรมชาติ และการขยายเขตน่านน้ำของประเทศเพื่อนบ้านอื่นๆ จึงส่งผลให้ทรัพยากรสัตว์น้ำที่จับจากธรรมชาติมีปริมาณน้อยลง ดังนั้น การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวจึงเริ่มมีความสำคัญ และได้ขยายฐานการผลิตปลากะพงขาวเพิ่มมากขึ้น แต่ก็ไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค อีกทั้งปลากะพงขาวที่จำหน่ายในพื้นที่ภาคเหนือมีราคาที่สูงและมีคุณภาพความสดน้อย ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะพัฒนาการเลี้ยงปลากะพงขาวในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตโดยใช้วิธีการเรียนแบบสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติโดยการใช้สีน้ำเทียมมาช่วยในการจำลองสีของน้ำตามแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติของปลากะพงขาว เพื่อศึกษาระบบการกินอาหาร การเจริญเติบโตที่เหมาะสมโดยได้ใช้ดัชนีชี้วัดคือ คุณลักษณะและประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหาร คือ ทริปซิน และไคโมทริปซินในลำไส้ของปลากะพงขาว ซึ่งในสัตว์หลายชนิดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเจริญเติบโตจากการให้อาหารได้

การพัฒนาของระบบย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับการเติบโตของสัตว์น้ำเนื่องจากการเติบโตที่เพิ่มขึ้นต้องอาศัยการย่อยและดูดซึมสารอาหาร เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน การศึกษาด้านโภชนาการพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร (Digestive Enzymes) มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางสรีรวิทยา เมื่อสัตว์น้ำมีการเปลี่ยนแปลงสภาพทางโภชนาการ (Thongprajukaew, 2011 and Bolasina *et al.*, 2006) การวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยอาหารส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสารชีวโมเลกุลที่สำคัญได้แก่ อะไมเลส (ย่อยคาร์โบไฮเดรต) ไลเปส (ย่อยไขมัน) โปรติเอส ทริปซิน และไคโมทริปซิน (ย่อยโปรตีน) เพื่อให้ทราบเกี่ยวกับพฤติกรรมการกินอาหาร (Hidalgo *et al.*, 1999 and Hofer *et al.*, 1981) ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในท้องทางเดินอาหาร (Chan *et al.*, 2008 and Riche *et al.*, 2004) และประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ (Thongprajukaew, 2011 and Supannapong *et al.*, 2008)

ทริปซิน (EC 3.4.21.4) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการควบคุมการย่อยโปรตีน โดยทำหน้าที่กระตุ้นโปรเอนไซม์ (Proenzyme) หรือไซโมเจน (Zymogen) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด ได้แก่ ทริปซิโนเจน (Trypsinogen) ไคโมทริปซิโนเจน (Chymotrypsinogen) โปรคาร์บอกซีเปปติเดส

(Procarboxypeptidase) และโปรอีลาสเตส (Proelastase) ให้อยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Active Enzyme) ได้แก่ ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) และอีลาสเตส (Elastase) ตามลำดับ ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของทริปซินจึงมีบทบาทสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน (Thongprajukaew, 2011, Rungruangsak-Torrissen *et al.* 2002 and Supannapong *et al.*, 2008 อ้างโดย Thongprajukaew and Kovitvadhi, 2012)

ไคโมทริปซิน (EC 3.4.21.1) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีน ทริปโตเฟน และเฟนิลอะลานีน สารยับยั้งการทำงาน คือ tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) และ chymostatin ถูกห่อหุ้มออกจากตับไปยังลำไส้เล็กในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ เรียกว่า ไคโมทริปซินในเจน ถูกเปลี่ยนเป็นไคโมทริปซิน โดยเอนไซม์ทริปซิน (Nuchruk *et al.*, 2007) แม้ว่าการทดสอบเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสมจะมีนัยสำคัญในการกำหนดความถูกต้องของกิจกรรมเป็นอย่างมาก แต่มีรายงานการวิจัยน้อยมากในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ในปลากระพงขาววัยรุ่น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของพีเอช และอุณหภูมิ รวมทั้งประสิทธิภาพของเอนไซม์ในลำไส้ปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงด้วยสื่อน้ำที่แตกต่างกันในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด เพื่อเป็นความรู้เกี่ยวกับกิจกรรมและบทบาทของเอนไซม์ย่อยอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ และเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากระพงขาวอย่างมีคุณภาพต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกปลากระพงขาววัยรุ่น น้ำหนักเฉลี่ย 10.09 ± 1.09 กรัม และความยาวเฉลี่ย 8.06 ± 1.03 เซนติเมตร ที่ได้จากการอนุบาลและปรับสภาพน้ำจืดได้แล้ว ณ พื้นที่ปฏิบัติการคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้เชียงใหม่ โดยเลี้ยงปลากระพงขาวในบ่อซีเมนต์ขนาด $1 \times 1.5 \times 1$ เมตร ในอัตรา 153 ตัว/ลูกบาศก์เมตร (Nikhom *et al.*, 2011) เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ก่อนการทดลองมีการควบคุมดูแลพฤติกรรมและสภาพแวดล้อมของปลาก่อนเป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นจึงเริ่มการทดลอง โดยเก็บข้อมูลด้านคุณลักษณะและประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซิน การเจริญเติบโต อัตราการรอด รวมทั้งคุณภาพน้ำ จนเสร็จสิ้นการทดลอง

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าของสื่อน้ำเทียมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซิน ไคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโตของปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด โดยใช้สื่อน้ำเทียมหรือสื่อน้ำวิทยาศาสตร์ ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในฟาร์มเลี้ยงขนาดใหญ่ เช่น ปลา กุ้ง และสัตว์น้ำอื่นๆ ซึ่งมีคุณสมบัติละลายได้เร็ว ไม่มีพิษโลหะหนัก และย่อยสลายในธรรมชาติ โดยใช้ในอัตรา 0.19 กรัมต่อน้ำ 750 ลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design; CRD) โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง (Treatment) แต่ละชุดแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงในบ่อสีน้ำธรรมชาติ

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงในบ่อโดยใช้สีน้ำเทียมสีน้ำตาล

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงในบ่อโดยใช้สีน้ำเทียมสีน้ำเงิน

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงในบ่อโดยใช้สีน้ำเทียมสีเขียวอมน้ำเงิน

การให้อาหารสัตว์ทดลอง

ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 42 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 มื้อ คือ 8.00 น. และ 17.00 น. ทั้งนี้การให้อาหารจะให้กินจนอิ่มตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

การเตรียม crude enzyme extract

นำปลาแช่แข็งเพื่อให้สลบจากนั้นก็ทำการผ่าช่องท้องและตัดชิ้นส่วนลำไส้มาล้างและปั่นให้เป็นเนื้อเดียวด้วย homogenizer โดยแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 2-12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ นาน 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่เป็นชั้นไขมันที่ลอยอยู่ด้านบนออก แบ่งเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การศึกษาคุณลักษณะและประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหาร

1. ศึกษากิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในสภาพเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (1998) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของทริปซิน โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.2 ดูด crude enzyme extract ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวต เติมซับสเตรตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ที่เวลา 0-15 วินาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A410 กับเวลา(วินาที) เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Vi) จากความชัน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน p-nitroaniline

2. ศึกษากิจกรรมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสภาพเปลี่ยนแปลง pH 2-12 และอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสตามวิธีการของ Sunde *et al.* (2001) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (1998) ดังนี้

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของไคโมทริปซิน โดยเตรียมสารละลายซับสเตรต คือ สารละลาย N-succinyl-ala-ala-pro-phenylalanine-p-nitroanilide (SAPNA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย dimethylformamide เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.2 ดูด crude enzyme extract ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในคิวเวต เติมซับสเตรตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ที่เวลา 0-15 วินาที เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A410 กับเวลา (วินาที) เพื่อหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา (Vi)

จากความชันเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitroaniline แบลงค์ประกอบด้วยสารละลายซัสเตรต โดยไม่เติม crude enzyme extract

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme extract ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน โปรตีนวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

การจัดการระหว่างการเลี้ยงและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำ ก่อนทดลอง และระหว่างการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ, ความเป็นกรด-ด่าง, แอมโมเนีย-ไนโตรเจน, ไนไตรท์-ไนโตรเจน, ไนเตรท-ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสรวม โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

Table 1 The methods of analysis of different parameters of water quality

Parameters	Methods
pH	pH-meter (pH / Ion 510)
Dissolved Oxygen (mg./l)	Azide modification
Ammonia (mg./l)	Phenol method
Nitrite (mg./l)	Reddish purple azo dye
Nitrate (mg./l)	Phenoldisulphonic acid
Phosphorus (mg./l)	Stannous chloride
Temperature (°C)	Thermometer

การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโต

วัดความยาว ชั่งน้ำหนัก และนับจำนวนลูกปลาที่จะฟักวางไข่รายวันในแต่ละหน่วยการทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตลอดการทดลอง และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบค่าต่างๆ ดังนี้

Weight gain, WG (%)

= น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง

Average daily gain (g./body/day)

= $\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{ระยะเวลาในการทดลอง}}$

ระยะเวลาในการทดลอง

Feed conversion ratio, FCR = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$

Survival rate (%) = $\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$

Consumption rate (%) ตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการดังนี้
อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) =

$$\frac{F \times 100}{\frac{W_o + W_t}{2} \times \frac{N_o + N_t}{2} \times t}$$

โดย

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม) N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)
 W_o = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม) N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)
 W_t = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม) t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

อัตราส่วนระหว่างของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน (T/C ratio) ตามวิธีของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (1998) ดังนี้

$$\text{T/C ratio} = \frac{\text{เอนไซม์ทริปซิน}}{\text{เอนไซม์โคโมทริปซิน}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Tukey-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 22

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

คุณลักษณะและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินที่สกัดจากลำไส้ปลากะพงขาววัยรุ่นในสภาวะเปลี่ยนแปลง pH ตั้งแต่ 2-12 (Figure 1A) พบว่าเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ pH 8.0 และ 5.0 ตามลำดับ จากรายงานของ Erlanger, B.F. *et al.* (1961) และ Jantaro *et al.* (2000) พบว่า เอนไซม์ทริปซินในปลาทูน่าครีบน้ำเงินมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ pH 8.2 และ 8.0 ส่วนในปลา anchovy มีค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินสูงสุดอยู่ที่ 8.0-9.0 และ 7.5-8.5 (Krogdahl *et al.* 1994) ตามลำดับ

เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในสภาวะอุณหภูมิตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส ที่ pH 8.0 และ pH 5.0 (Figure 1B) พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินสูงสุด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ของทั้ง 2 เอนไซม์ ซึ่ง Krogdahl *et al.* (1994) ได้กล่าวไว้ว่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในปลากะพงขาวจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น แม้ว่าจะมีอุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส ส่วนในปลาอื่นๆ เช่น ปลากะตัก เอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และหยุดกิจกรรมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

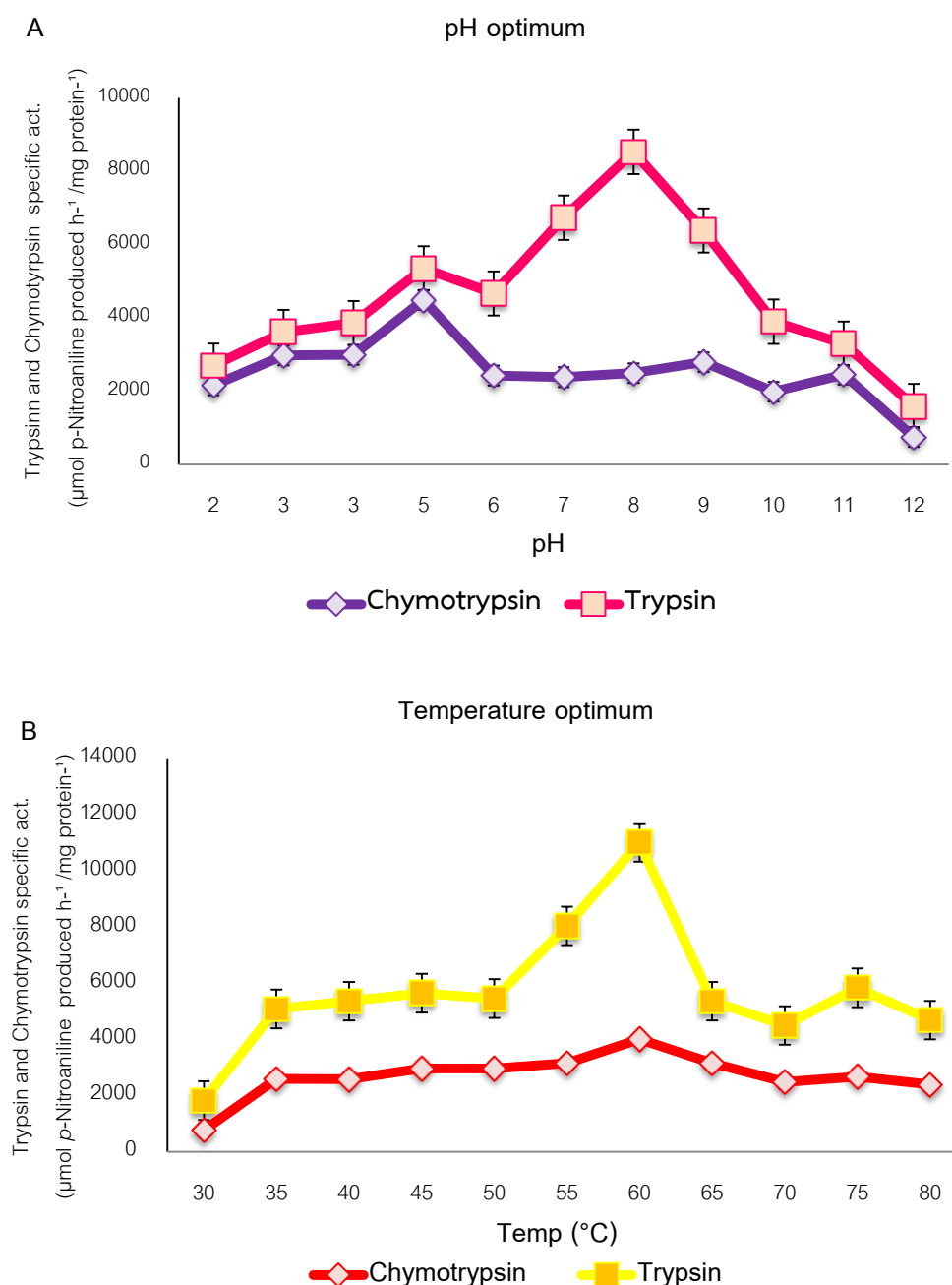


Figure 1 optimum pH and temperature of trypsin and chymotrypsin specific activity ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1} / \text{mg protein}^{-1}$)

ผลของสีน้ำที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

จากการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน พบว่าเอนไซม์ทริปซินในลำไส้ของปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุดคือ $63,237.81 \pm 0.01 \mu\text{mol } p\text{-Nitroaniline/h}^{-1} / \text{mg protein}^{-1}$ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 3 ($51,900.68 \pm 0.01$), 2 ($26,910.81 \pm 0.02$) และ 1 ($22,248.09 \pm 0.01$) ซึ่งมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Figure 2A) ส่วนไคโมทริปซินใน

ชุดการทดลองที่ 1 มีค่าสูงสุดคือ $84,801.45 \pm 0.02 \mu\text{mol } p\text{-Nitroaniline/h}^{-1}/\text{mg protein}^{-1}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ 3 ($69,445.08 \pm 0.02$), 2 ($68,866.42 \pm 0.01$) และชุดการทดลองที่ 4 ($66,380.57 \pm 0.01$) ตามลำดับ (Figure 2B)

การแสดงออกของเอนไซม์ทริปซินมีผลต่อการเติบโตในทิศทางตรงกันข้ามกับเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยกิจกรรมของไคโมทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สิ่งมีชีวิตเติบโตช้า ส่วนกิจกรรมของทริปซินจะมีค่าสูงในช่วงที่สัตว์น้ำมีการเติบโตสูง (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2006) การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถบอกระดับการเจริญเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำได้ โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินทำให้ T/C ratio มีการเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมา กล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้าง การสลายโปรตีน และอัตราการเจริญเติบโต

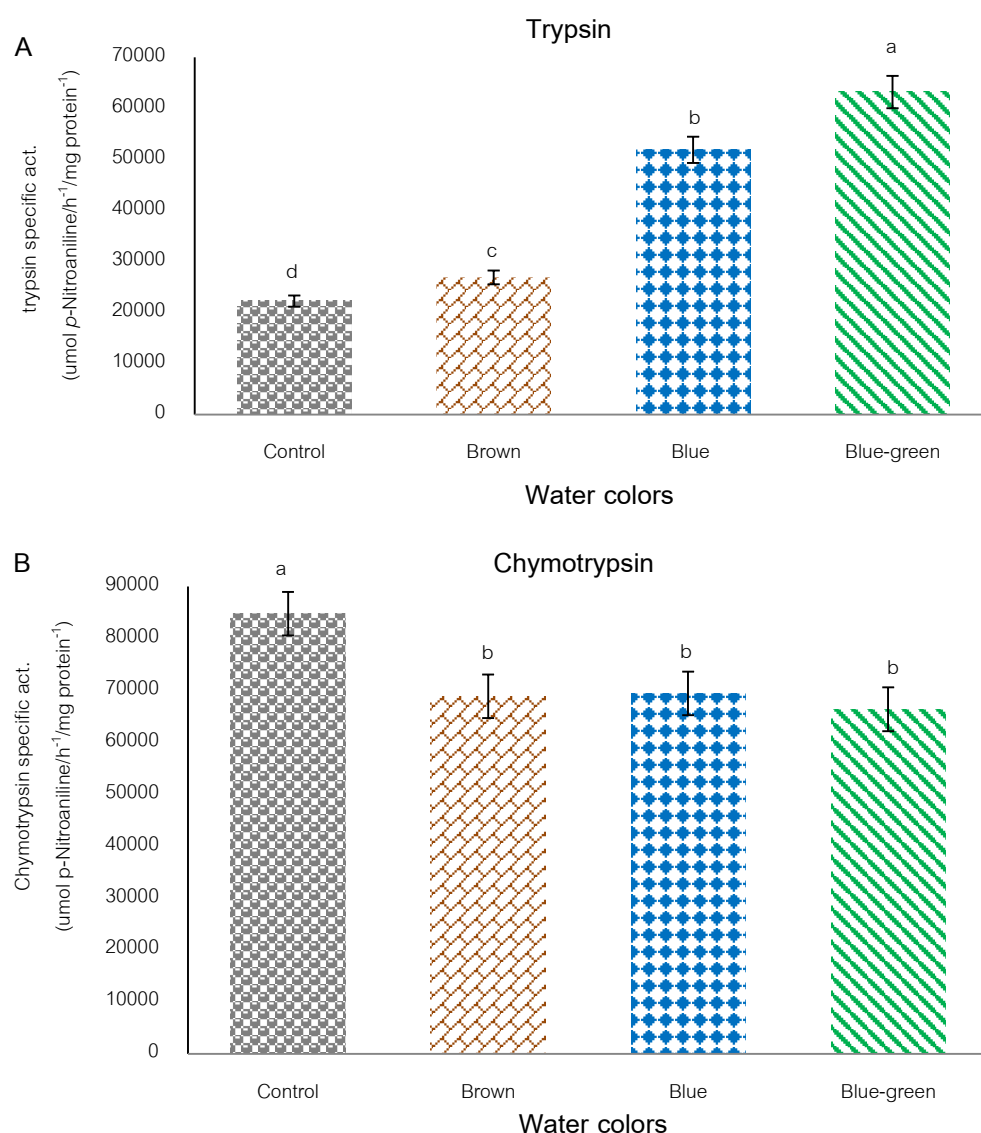


Figure 2 Trypsin and chymotrypsin specific activity ($\mu\text{mol } p\text{-nitroaniline produced h}^{-1}/\text{mg protein}^{-1}$)

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) พบว่า ในปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รองลงมาคือปลากระพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในชุดการทดลองที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 0.92 ± 0.2 และ 0.62 ± 0.1 ตามลำดับ ส่วนค่า T/C ratio ต่ำสุดคือชุดการทดลองที่ 2 เท่ากับ 0.33 ± 0.04 (Figure 3) ซึ่งค่า T/C ratio จะมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับอัตราการกินอาหาร คือ มีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ 4 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 3 2 และ 1 เท่ากับ 3.84, 3.70, 3.49 และ 3.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 4)

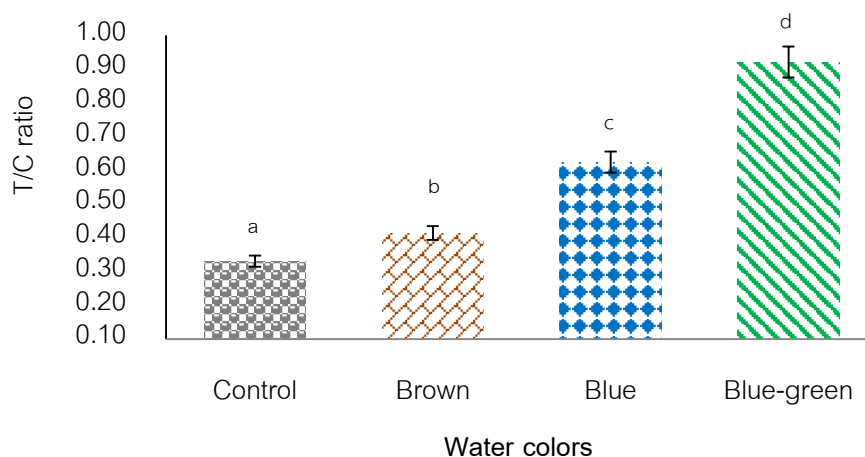


Figure 3 Trypsin and chymotrypsin ratio

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

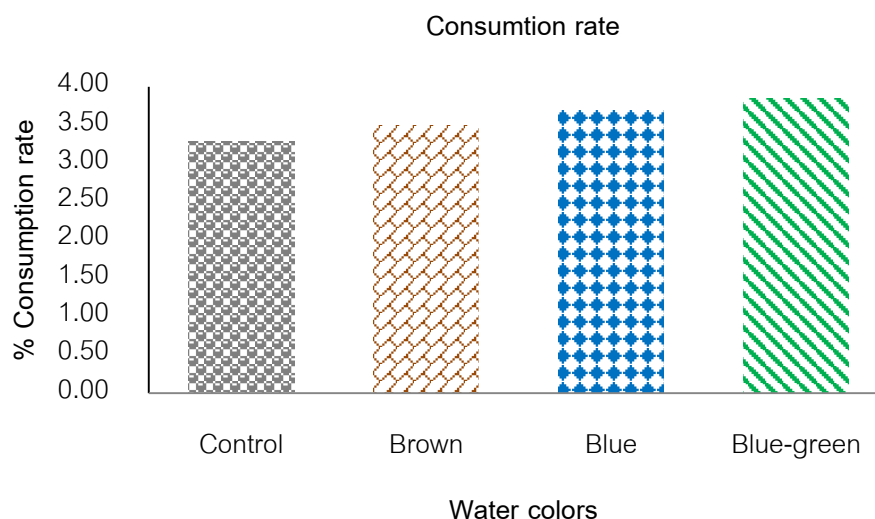


Figure 4 Consumption rate of juveniles Asian seabass

โดยการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารสามารถบอกถึงการเติบโตและพัฒนาการของสัตว์น้ำได้ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของทริปซินและโคโมทริปซินทำให้ T/C ratio มีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในพลาสมาและในกล้ามเนื้อ สมดุลของการสร้าง การสลายโปรตีน และอัตราการเติบโต (Rungruangsak-Torrissen *et al.*, 2000) ทั้งนี้ เนื่องจากอัตราการหลั่งของทริปซินและโคโมทริปซินมีความสัมพันธ์กับความอยากอาหารของปลา อัตราการดูดซึม การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน และระดับการหลั่งของพลาสมาอินซูลิน (Einarsson, 1996) ดังนั้น อัตราส่วนดังกล่าวจึงสัมพันธ์การเติบโต เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sunde *et al.* (2001) พบว่า T/C ratio ในปลาแอตแลนติกแซลมอน *Salmo salar* L. มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต นอกจากนี้ Hofer (1981) พบว่า การใช้ประโยชน์ของโปรตีนสามารถใช้ประเมินพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) ได้ศึกษาในปลาแอตแลนติกแซลมอน *Salmo salar* พบว่า T/C ratio มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของปลา โดยเมื่อปลาอยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโต T/C ratio จะมีค่าสูง และจะมีค่าต่ำลงเมื่ออัตราการเจริญเติบโตของปลาลดลง เนื่องจากทริปซินแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงและมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยอาหารในช่วงที่ปลามีการเจริญเติบโตสูง ตรงข้ามกับเอนไซม์โคโมทริปซินซึ่งแสดงกิจกรรมจำเพาะได้สูงขึ้น เมื่ออัตราการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้น T/C ratio จึงสามารถใช้เป็นดัชนีวัดคุณภาพการเจริญเติบโตของสัตว์แต่ละระยะได้

ผลของสีน้ำที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่น

การศึกษากาการเลี้ยงลูกปลากะพงขาววัยรุ่นน้ำหนักและความยาวเฉลี่ย 10.09 ± 1.09 กรัม 8.06 ± 1.03 เซนติเมตร ตามลำดับ ภายใต้สีน้ำที่แตกต่างกัน 4 ชุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการรอด ของลูกปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าแนวโน้มที่สูงกว่าทุกชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 58.08 ± 2.72 กรัมต่อตัว, 0.78 ± 0.40 กรัมต่อตัวต่อวัน และ 83.11 ± 6.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 3, 2 และ 1 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติของ ความยาว อัตราการรอด รวมทั้งอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของทุกชุดการทดลองนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2)

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 พบว่า น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ความยาวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ความยาวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอด มีแนวโน้มสูงกว่าของแต่ละชุดการทดลอง (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับการทดลองของ Ustundag and Rad. (2015) พบว่า ลูกปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) มีแนวโน้มของน้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้นในถังเลี้ยงปลาพลาสติกที่มีพื้นหลังสีเขียวเข้ม และเขียวสว่างคือ 69.44 ± 8.81 และ 68.87 ± 6.42 กรัม เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Luchiaro and Pirhonen. (2008) ได้กล่าวไว้ว่า สภาพแวดล้อมโทนสีเขียวเหมาะสมกับการเลี้ยงลูกปลา Rainbow trout วัยรุ่น เช่นเดียวกับ Sierra-Flores *et al.* 2016 ที่รายงานว่าลูกปลา Turbot (*Scophthalmus maximus*) ที่เลี้ยงด้วยความเข้มแสงสีเขียว (530 nm.) มีอัตราการรอดและมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าความเข้มแสงสีน้ำเงิน (455 nm.) สีแดง (640 nm.) และสีขาว ตามลำดับ ในการทดลองครั้งนี้แม้ว่าข้อมูลทางสถิติจะไม่แตกต่างกันมากระหว่างชุดการ

ทดลองที่ 3 และ 4 แต่ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ในชุดการทดลองที่ 4 (สีเขียมน้ำเงิน) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับค่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตกับชุดการทดลองที่ 3 (สีน้ำเงิน), 2 (สีน้ำตาล) และ 1 (สีน้ำธรรมชาติ)

Table 2. Growth performance of juveniles Asian seabass in recirculating aquaculture systems (RAS)

Parameter \ Treatment	Control	Brown	Blue	Blue-green
Weight gain (g.)	42.91±1.15 ^a	43.93±2.41 ^a	54.87±2.24 ^b	58.08±2.72 ^b
Average daily gain (g./body/day)	0.57±0.02 ^a	0.58±0.03 ^a	0.73±0.03 ^b	0.78±0.40 ^b
Survival rate (%)	79.33 ± 2.40 ^a	79.78 ± 7.78 ^a	80.89 ± 2.34 ^a	83.11 ± 6.48 ^a
Feed conversion ratio (FCR)	1.27 ± 0.35 ^a	1.25 ± 0.06 ^a	1.15 ± 0.04 ^a	1.07 ± 0.04 ^a

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

ส่วนค่าของคุณภาพน้ำ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า คุณภาพน้ำในชุดการทดลองที่ 1 และ 4 มีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย-ไนโตรเจน ไนไตรท์-ไนโตรเจน ไนเตรท-ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสรวม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3)

Table 3. Water quality in recirculating aquaculture systems (RAS)

Water quality	Treatment			
	Control	Brown	Blue	Blue-green
pH	8.52 ± 0.78 ^a	8.08 ± 0.02 ^a	8.1 ± 0.02 ^a	8.04 ± 0.04 ^a
Dissolved Oxygen (mg/l)	4.31 ± 2.16 ^a	5.29 ± 2.64 ^a	4.96 ± 2.48 ^a	4.36 ± 2.18 ^a
Ammonia (mg/l)	0.31 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.10 ^a	0.29 ± 0.11 ^a	0.32 ± 0.18 ^a
Nitrite (mg/l)	0.31 ± 0.30 ^a	0.28 ± 0.16 ^a	0.34 ± 0.28 ^a	0.26 ± 0.27 ^a
Nitrate (mg/l)	0.40 ± 0.27 ^a	0.42 ± 0.29 ^a	0.51 ± 0.33 ^a	0.39 ± 0.26 ^a
Phosphorus (mg/l)	0.35 ± 0.13 ^a	0.26 ± 0.10 ^a	0.32 ± 0.15 ^a	0.32 ± 0.13 ^a
Temperature (°C)	29.60 ± 0.00 ^b	28.63 ± 0.06 ^a	28.53 ± 0.06 ^a	29.53 ± 0.06 ^b

Note: different letters in the same row are statistically different. ($p < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

เมื่อประเมินผลของสื่อน้ำที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยอาหารคือ ทริปซินและไคโม-ทริปซิน พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีแนวโน้มของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน รวมทั้งอัตราส่วนระหว่าง ทริปซินและไคโมทริปซิน (T/C ratio) มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพอัตราการเจริญเติบโตของปลากะพงขาววัยรุ่นในชุดการทดลองที่ 4 เช่นเดียวกัน การทดลองครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสื่อน้ำสีเขียวอมฟ้าเงินมีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากะพงขาววัยรุ่นในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด recirculating aquaculture system (RAS) รวมทั้งการหาอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ก่อนการประเมินประสิทธิภาพนั้นมีความสำคัญต่อการแสดงกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ และเป็นปัจจัยชี้วัดการย่อยอาหารของสัตว์อย่างหนึ่ง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลี้ยงปลากะพงขาวเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปี 2560 และสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปี 2561 ทางคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ. ที่นี้ และขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนบุคลากรทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้การวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- Bolasina S. , Perez A. and Yamashita Y. , 2006. "Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*," Aquaculture, vol. 252, no. 2-4, 503–515 p,
- Chan C-R. , Lee D-L. , Cheng Y-H. , Hsieh D J-Y, and. Weng C-F. , 2008. "Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*," Zoological Studies, vol. 47, no. 2, 207-214 p,
- Erlanger B. F. , Kokowsky N. and Cohen W. , 1961, "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin". Arch. Biochem. Biophys., 95: 271-278 p.
- Einarsson S. , Spencer D. P. , and Talbot, C. , 1996. The effect of feeding on the secretion of trypsin, pepsin and chymotrypsin. Fish Physiology and Biochemistry. 15:5:439–446 p.
- Hidalgo M. C. , Urea E. , and Sanz A. , 1999. "Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities," Aquaculture, vol. 170, no. 3-4, 267-283 p,
- Hofer R. , Schiemer F. , 1981 "Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits," Oecologia, vol. 48, no.3, 342-345 p.

- Jantaro S., 2000. "Purification and Characterization of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) and Application", M. S. thesis, Prince of Songkla University. [in Thai]
- Kroghdahl A., Lea T.B., and Olli J.L., 1994. "Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Comp. Biochem. Physiol., 107: 215-219 p.
- Lowry, H.O., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 p.
- Luchiari A C., Pirhonen J. 2008. Effects of ambient colour on colour preference and growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Journal of Fish Biology 72: 1504-1514 p.
- Nikhom L., Lakana L., Patchara M., and Kom S. 2011. Culture of barramundi (*Lates calcarifer* BLOCH, 1790) size 4 to 6 inches in a recirculating system. Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries. 553 p. [in Thai]
- Nuchsuk, C. 2007. Feed Development Using Digestive Enzyme Technology for Culture of Shark Catfish, *Helicophagus leptorhynchus* Ng & Kottelat, 2000. Thesis. Science (Biochemistry). kasetsart university. 145 p. [in Thai]
- Riche M., Haley D.I., Oetker M., Garbrecht S., and Garling D. L., 2004. "Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)," Aquaculture, vol. 234, no. 1-4, 657-673 p.
- Rungruangsak-Torrissen, K., E. Lied and M. Espe. 1998. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. J. Fish Biol. 45: 1087-1104 p.
- Rungruangsak-Torrissen, K. and R. Male. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure, In N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. Seafood Enzymes, Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. Marcel Dekker, Inc., New York. 215-269 p.
- Rungruangsak-Torrissen K., A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, T.A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana, and G. Venturini, 2002. "In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials," Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 82, no. 6, 644-654 p.
- Rungruangsak-Torrissen, R. Moss, L. H. Andresen, A. Berg, and R. Waagbo. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish Physiology and Biochemistry. 32:1:7-23 p.

- Sierra-Flores R., Davie A., Grant B., Carboni S., Attack T., Migaud H. 2016. Effects of light spectrum and tank background colour on Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae performances. *Aquaculture*. 450: 6-13 p.
- Sunde, J., G.L. Taranger and K. Rungruangsak-Torrissen. 2001. Digestive protease activity and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 25: 335-345 p.
- Supannapong P. , Pimsalee T. , A- komo T. , Engkakul A. , Kovitvadh U. , Kovitvadh S. , and Rungruangsak-Torrissen K. , 2008. "Digestive enzymes and in vitro digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus*," *Aquaculture International*, vol. 16, no. 5, 437-453 p.
- Thongprajukaew K., 2011 "Feed Development using Digestive Enzyme Technology for Successive Growth in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910)," Ph.D. Thesis, Kasetsart University, [in Thai]
- Thongprajukaew K., Kovitvadh U., 2012. "Digestive Enzymes and Food Development for Aquaculture" *The Journal of KMUTNB.*, Vol. 22, No. 3. 710-720 p. [in Thai]
- Ustundag M., Rad F. 2015. Effect of Different Tank Colors on Growth Performance of Rainbow Trout Juvenile (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Journal of Agricultural Sciences* 21, 144-151 p.
- Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on Nutrition of red sea bream-XI Effect of 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. *Bull. Jap.Soc.sci Fish*, 41: 73-77 p.

การเจริญเติบโตของปูทะเล (*Scylla* spp.) หลังการลอกคราบ

Growth Rate of Mud Crabs (*Scylla* spp.) after Molting

ภัทราวดี ศรีมีเทียน^{1*} และจิตติมา สุวรรณมาลา²

Pattarawadee Srimeetian¹ and Jitima Suwanmala²

¹คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวราชนครินทร์ อ. เมือง จ. นราธิวาส 96000

¹Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University, Narathiwas 96000, Thailand

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. เมือง จ. ปัตตานี 94000

²Faculty of Sciences and Technology, Prince of Songkla University, Pattani 94000, Thailand

*Corresponding author: e-mail; srimeetian1212@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของปูทะเลหลังการลอกคราบ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ปูน้ำหนัก 50-79 กรัม และชุดการทดลองที่ 2 ปูน้ำหนัก 80-109 กรัม ผลการทดลองพบว่า น้ำหนัก ความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง และความหนาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปูกระดองนุ่ม และปูกระดองแข็งสมบุรณ์หลังการลอกคราบในชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใกล้ลอกคราบกระดองของปูกรอบ บาง และแตกหักง่าย ส่วนปูหลังการลอกคราบใหม่มีกระดองนุ่ม หลังจากนั้นเฉลี่ย 18 วัน ปูกลับมามีกระดองแข็งสมบุรณ์อีกครั้ง ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางด้านการเพาะเลี้ยงปูทะเล

คำสำคัญ: ปูทะเล การเจริญเติบโต การลอกคราบ กระดองนุ่ม กระดองแข็ง

Abstract

This research was aimed to study the growth rate of mud crab (*Scylla* spp.) after molting. The experiment was divided into two treatments: 1) the mud crab's weight was 50-79 grams and 2) the crab's weight was 80-109 grams. It was found that the increase of weight, carapace width, carapace length and thickness of soft shell crab and hard shell crab in both treatments were not significant ($p>0.05$). Moreover, it was found that the carapace of premolt mud crab was thin and easily broken. After molting, the new shell was soft and took 18 days to be fully harden again. This research provides useful information of mud crab culture.

Keywords: mud crab, growth rate, molting, soft shell, hard shell

คำนำ

ปูทะเล (*Scylla* spp.) เป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ โดยประเทศไทยมีการส่งออกปูในรูปแบบต่าง ๆ ไปยังทั่วโลก เช่น มาเลเซีย ญี่ปุ่น ฝรั่งเศส และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น การส่งออกปูรวมใน พ.ศ. 2560 คิดเป็นมูลค่าทั้งหมดเท่ากับ 1,141.77 ล้านบาท (Department of Fisheries, 2018) เนื่องจากปูทะเลเป็นที่ต้องการของตลาดจึงส่งผลดีต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงปูทะเลเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ยังมี

อุตสาหกรรมจากการเลี้ยงปูทะเล เช่น อุตสาหกรรมการแปรรูป ได้แก่ ปูสดแช่เย็น ปูกระป๋อง และปูที่ปรุงแต่งหรือทำไว้ไม่ให้เสีย เป็นต้น และยังมีอุตสาหกรรมต่อเนื่องที่ได้จากการเลี้ยงปูทะเลอีกด้วย ได้แก่ อุตสาหกรรมไคติน-ไคโตซาน โดยการนำกระดองปูมาใช้ในการอุตสาหกรรมนี้ ซึ่งไคติน-ไคโตซานมีประโยชน์และถูกนำมาใช้ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ด้านการเกษตร อาหารเสริมสุขภาพ การแพทย์ และเภสัช เป็นต้น (Tien songrusmee, 2008) การเลี้ยงปูทะเลนั้นเกษตรกรจะนำปูเล็กจากธรรมชาติขนาดประมาณ 50-110 กรัม มาเลี้ยงจนได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ ซึ่งขนาดที่ตลาดต้องการนั้นขึ้นอยู่กับรูปแบบของปูทะเล เช่น ปูกระดองแข็งสมบูรณ์ (ปูเนื้อ) ตลาดมีความต้องการขนาดน้ำหนักประมาณ 100-600 กรัม/ตัว ส่วนปูกระดองนิ่มตลาดมีความต้องการขนาดประมาณ 70-250 กรัม/ตัว เช่นเดียวกับราคาปูที่จำหน่ายก็ขึ้นอยู่กับรูปแบบและขนาดของปูทะเลด้วย เช่น ปูกระดองแข็งสมบูรณ์ขนาด 10, 8, 5 และ 3 ตัว/กิโลกรัม ราคา 100, 250, 350 และ 500 บาท ตามลำดับ ส่วนปูกระดองนิ่มขนาด 14, 12, 10 และ 8 ตัว/กิโลกรัม ราคา 320, 350, 360 และ 400 บาท ตามลำดับ (Tien songrusmee, 2010)

การเพิ่มขนาดหรือการเจริญเติบโตของปูทะเลนั้นต้องอาศัยการลอกคราบ เนื่องจากกระดองของปูเป็นสารประกอบพวกหินปูนที่มีความแข็งมาก จึงไม่สามารถขยายเพิ่มขนาดตัวออกไปได้ ดังนั้นปูจะมีขนาดใหญ่ขึ้นได้ก็ต่อเมื่อได้สลัดเปลือกเก่าทิ้งและสร้างเปลือกใหม่ โดยปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ โครงร่างจะอ่อนนุ่มไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ซึ่งเรียกปูดังกล่าวว่าปูกระดองนิ่ม หลังจากนั้นกระดองจะเริ่มแข็งขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งปูมีกระดองแข็งอีกครั้งเรียกว่าปูกระดองแข็งสมบูรณ์ แล้วจากปูกระดองแข็งปูก็จะเข้าสู่กระบวนการลอกคราบเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบต่อไป ปูมีการลอกคราบตลอดทั้งปีและตลอดชีวิต (Srimetian, 2010) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการลอกคราบของปูนั้น ได้แก่ แสง อุณหภูมิ ความเค็มของน้ำ และอาหาร เป็นต้น โดย Theppanich *et al.* (2011) รายงานว่าปูชนิด *S. paramamosain* ที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปใช้ระยะเวลาในการลอกคราบเท่ากับ 39.58 วัน/ครั้ง ส่วนปูที่เลี้ยงเนื้อปลาหลังเขียวสดใช้ระยะเวลาในการลอกคราบ 32.08 วัน/ครั้ง นอกจากนี้การสูญเสียรังคังก็มีอิทธิพลต่อการลอกคราบของปูด้วยเช่นกัน ซึ่ง Tien songrusmee (2002) กล่าวว่า การสูญเสียรังคังของปูจะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการงอกใหม่ของรังคัง ทำให้ปูลอกคราบเร็วขึ้นเพื่อสร้างรังคังทดแทนส่วนที่สูญเสียไป โดย Singthaweesak (2003) รายงานว่าปูชนิด *S. serrata* ที่สูญเสียรังคังก้าม ขาเดิน เหลือไว้เฉพาะขาว่ายน้ำเพียง 1 คู่ ใช้ระยะเวลาในการลอกคราบ 22.15 วัน ส่วนปูที่มีรังคังครบสมบูรณ์ ใช้เวลาในการลอกคราบ 30.83 วัน นอกจากนี้ Tien songrusmee (2002) ยังกล่าวว่าปูที่มีขนาดเล็กใช้ระยะเวลาในการลอกคราบสั้นหรือเร็วกว่าปูที่มีขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับ Koedprang and Songrak (2011) ที่รายงานว่าปูชนิด *Thalamita crenata* ที่มีขนาดความกว้างกระดอง 4.60 และ 6.80 เซนติเมตร ใช้ระยะเวลาในการลอกคราบ 7 และ 28 วัน ตามลำดับ

การเพิ่มขนาดของปูทะเลหลังการลอกคราบนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของปูทะเล โดยปัจจุบันยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของขนาดปูทะเลหลังจากลอกคราบจนกระทั่งเป็นปูกระดองนิ่มและจากปูกระดองนิ่มไปเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาน้ำหนัก ความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง และความหนาของปูทะเลจากกระดองแข็งเริ่มต้นไปเป็นปูกระดองนิ่ม และ

ศึกษาน้ำหนัก ความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง และความหนาของปูทะเลจากปูกระดองนึ่งไปเป็นปูกระดองแข็งอีกครั้ง ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้จะใช้สำหรับเป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงปูทะเลต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง (treatments) ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ปูน้ำหนัก 50-79 กรัม และชุดการทดลองที่ 2 ปูน้ำหนัก 80-109 กรัม โดยแต่ละชุดการทดลองใช้ปูตัวอย่างจำนวน 25 ตัว

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การเตรียมปูทดลองโดยใช้ปูกระดองแข็งขนาด 50-109 กรัม นำมาวัดความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง ความหนา และชั่งน้ำหนัก ซึ่งทำการแบ่งปูทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองที่ 1 ปูน้ำหนัก 50-79 กรัม และชุดการทดลองที่ 2 ปูน้ำหนัก 80-109 กรัม) หลังจากนั้นนำปูลงเลี้ยงในตะกร้าพลาสติก 1 ตะกร้าต่อปู 1 ตัว แล้วนำกล่องวางบนแพลลายนํ้าในบ่อซีเมนต์ (Fig. 1A) โดยความเค็มน้ำที่ใช้เลี้ยงเท่ากับ 25-30 ส่วนในพันส่วน ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงปูทะเลเป็นเวลา 60 วัน ให้ปลาสดเป็นอาหารปูวันละ 1 ครั้ง ซึ่งปลาสดทำการตัดหัวและหางทิ้งใช้เฉพาะส่วนบริเวณของตัวปลา นำมาหั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 นิ้ว (Fig. 1B) ให้อาหารปลาสดร้อยละ 10 ของน้ำหนักตัวปู การคำนวณปริมาณอาหารที่ปูทดลองกิน ดังนี้

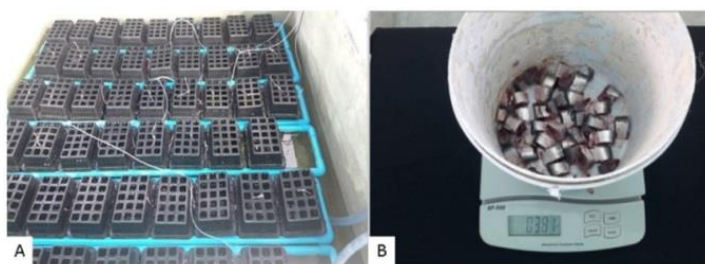
$$\text{ปริมาณอาหารทั้งหมด} = \text{น้ำหนักอาหารปลาสดที่ปูกิน (กรัม)} \times \text{จำนวนวันที่ทำการทดลอง}$$


Figure 1 The boxes were used to separate each crab in crab culture (A), using fish for crab feed (B).

การศึกษาปูกระดองนึ่งหลังการลอกคราบ

การศึกษาปูกระดองนึ่งโดยการตรวจสอบการลอกคราบปูทุก ๆ วัน เพื่อตรวจดูว่าปูมีการลอกคราบเป็นปูกระดองนึ่งหรือไม่ เมื่อปูลอกคราบเป็นปูกระดองนึ่งแล้วนำปูมาวัดความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง ความหนา และชั่งน้ำหนัก ทำการจดบันทึกระยะเวลาการลอกคราบของปูทดลอง

การศึกษาปูกระดองแข็งสมบูรณ์หลังการลอกคราบ

การศึกษาปูกระดองแข็งหลังการลอกคราบโดยการเลี้ยงปูกระดองนึ่งต่อจนกระทั่งปูมีกระดองแข็งสมบูรณ์ (ปูเนื้อแน่น) เมื่อปูมีกระดองแข็งแล้วนำปูมาวัดความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง ความหนา และชั่งน้ำหนัก จดบันทึกระยะเวลาจากปูกระดองนึ่งไปเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังทำการสังเกตการณ์การลอกคราบเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของปูทะเลและทำการจดบันทึก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ปุ๋ยมูลคอกหมูหลังการลอกคราบ

น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้น = น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมู - น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น (กรัม)

ความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้น = ความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมู - ความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น

(เซนติเมตร; ซม.)

ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้น = ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมู - ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น (ซม.)

ความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้น = ความหนาปุ๋ยมูลคอกหมู - ความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น (ซม.)

ปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งสมบูรณ์หลังการลอกคราบ

น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้น = น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งสุดท้าย - น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น (กรัม)

ความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้น = ความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งสุดท้าย - ความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น (ซม.)

ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้น = ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งสุดท้าย - ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น

(ซม.)

ความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้น = ความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งสุดท้าย - ความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งเริ่มต้น

(ซม.)

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

การศึกษาในครั้งนี้การใช้สัตว์ทดลองอยู่ภายใต้การกำกับดูแลของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของสถาบัน สำนักรักและพัฒนามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ 2561-11-012

ผลการวิจัย

การเจริญเติบโตของปูทะเลหลังการลอกคราบ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของปูทะเลหลังการลอกคราบ เพื่อเป็นปุ๋ยมูลคอกหมูและปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ชุดการทดลองที่ 1 ปูน้ำหนัก 50-79 กรัม และชุดการทดลองที่ 2 ปูน้ำหนัก 80-109 กรัม เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า น้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย และน้ำหนักปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 (Table 1) เช่นเดียวกับความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยและความกว้างปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 (Table 2) ขณะที่ความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยและความยาวปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 เช่นกัน (Table 3) สำหรับความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยและความหนาปุ๋ยมูลคอกหมูแห้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชุดการทดลองกลุ่มที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) จากชุดการทดลองที่ 2 (Table 4) นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าระยะเวลาในการลอกคราบ

เฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 ส่วนระยะเวลาเฉลี่ยจากปูกระดองนิ่มไปเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์ของชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 (Table 5) เช่นกัน

Table 1 Average body weight (g) of soft shell crab and hard shell crab within 60 days

Parameter	Treatment 1	Treatment 2
Initial body weight of crab	70.28±0.81	96.40±1.93
Body weight of soft shell crab	119.32±1.69	139.96±3.17
Increase in body weight of soft shell crab	49.04±1.52	43.56±2.43 ^{ns}
Body weight of hard shell crab	123.88±3.14	144.28±3.26
Increase in body weight of hard shell crab	53.60±3.07	47.88±2.74 ^{ns}

Note: Value in the same row, ns = not significant ($p>0.05$)

Table 2 Average carapace width (cm) of soft shell crab and hard shell crab within 60 days

Parameter	Treatment 1	Treatment 2
Initial carapace width of crab	6.86±0.07	7.56±0.04
Carapace width of soft shell crab	7.71±0.04	8.59±0.08
Increase in carapace width of soft shell crab	0.85±0.05	1.03±0.10 ^{ns}
Carapace width of hard shell crab	7.91±0.05	8.78±0.07
Increase in carapace width of hard shell crab	1.05±0.04	1.22±0.09 ^{ns}

Note: Value in the same row, ns = not significant ($p>0.05$)

Table 3 Average carapace length (cm) of soft shell crab and hard shell crab within 60 days

Parameter	Treatment 1	Treatment 2
Initial carapace length of crab	4.89±0.08	5.36±0.07
Carapace length of soft shell crab	5.47±0.04	6.04±0.06
Increase in carapace length of soft shell crab	0.58±0.05	0.68±0.03 ^{ns}
Carapace length of hard shell crab	5.57±0.05	6.17±0.06
Increase in carapace length of hard shell crab	0.68±0.05	0.81±0.04 ^{ns}

Note: Value in the same row, ns = not significant ($p>0.05$)

Table 4 Average carapace thickness (cm) of soft shell crab and hard shell crab within 60 days

Parameter	Treatment 1	Treatment 2
Initial carapace thickness of crab	3.05±0.15	3.27±0.06
Carapace thickness of soft shell crab	3.25±0.14	3.61±0.09
Increase in carapace thickness of soft shell crab	0.20±0.03	0.34±0.07 ^{ns}
Carapace thickness of hard shell crab	3.35±0.13	3.72±0.08
Increase in carapace thickness of hard shell crab	0.30±0.04	0.45±0.07 ^{ns}

Note: Value in the same row, ns = not significant (p>0.05)

Table 5 Average time interval in molting (days) and average time interval in hard shell crab (days) after molting of mud crabs

	Treatment 1	Treatment 2
Time interval in molting (days)	38.83±4.35	33.77±8.51 ^{ns}
Time interval in hard shell crab (days) after molting	18.16±1.16	17.55±1.33 ^{ns}

Note: Value in the same row, ns = not significant (p>0.05)

จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าปริมาณอาหารที่ปูกินในชุดการทดลองที่ 1 เฉลี่ยเท่ากับ 7.02 กรัม/ตัว/วัน และเมื่อเลี้ยงปูจนกระทั่งเป็นปูกระดองนึ่งใช้ระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 38.83 วัน ซึ่งปูกินอาหารจนกระทั่งเป็นปูกระดองนึ่งเฉลี่ยเท่ากับ 272.58 กรัม/ตัว ส่วนชุดการทดลองที่ 2 ปูตัวอย่างกินอาหารเฉลี่ยเท่ากับ 9.64 กรัม/ตัว/วัน เมื่อเลี้ยงปูจนกระทั่งเป็นปูกระดองนึ่งใช้ระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 33.77 วัน ซึ่งปูกินอาหารจนกระทั่งเป็นปูกระดองนึ่งเฉลี่ยเท่ากับ 325.54 กรัม/ตัว นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงปูกระดองนึ่งต่อเพื่อเป็นปูกระดองแข็ง สมบูรณ์พบว่าชุดการทดลองที่ 1 ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 18.16 วัน ซึ่งปูเริ่มกินอาหารหลังการลอกคราบ 2 วัน โดยอาหารที่ปูกินในชุดการทดลองที่ 1 เฉลี่ยเท่ากับ 11.93 กรัม/ตัว/วัน ซึ่งปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงปูกระดองนึ่งไปเป็นปูกระดองแข็งของชุดการทดลองที่ 1 เฉลี่ยเท่ากับ 192.78 กรัม/ตัว ขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงปูกระดองนึ่งไปเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์เฉลี่ยเท่ากับ 17.55 วัน ซึ่งปูเริ่มกินอาหารหลังการลอกคราบ 2 วัน โดยอาหารที่ปูกินในชุดการทดลองที่ 2 เฉลี่ยเท่ากับ 13.99 กรัม/ตัว/วัน ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงปูกระดองนึ่งไปเป็นปูกระดองแข็งของชุดการทดลองที่ 2 เฉลี่ยเท่ากับ 217.54 กรัม/ตัว

ปูตัวอย่างในชุดการทดลองที่ 1 หลังลอกคราบเป็นปูกระดองนึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 119.32 กรัม/ตัว ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 70 จากน้ำหนักเดิม โดยปูกินอาหารปลาสดเฉลี่ยเท่ากับ 272.58 กรัม/ตัว ส่วนปูกระดองแข็งสมบูรณ์หลังลอกคราบมีน้ำหนักเฉลี่ย 123.88 กรัม ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 76.26 จากน้ำหนักเดิม โดยปูกินอาหารปลาสดเฉลี่ยเท่ากับ 465.36 กรัม/ตัว ขณะที่ปูตัวอย่างในชุดการทดลองที่ 2 หลังลอกคราบเป็นปูกระดองนึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 139.96 กรัม ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 45.18 จากน้ำหนักเดิม ซึ่งปูกินอาหารปลาสดเฉลี่ยเท่ากับ 325.54 กรัม/ตัว สำหรับปูกระดองแข็งสมบูรณ์น้ำหนักเฉลี่ย 144.28

กรัม ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 49.66 จากน้ำหนักเดิม โดยปูกินอาหารพลาสติกเฉลี่ยเท่ากับ 543.08 กรัม/ตัว

ส่วนการศึกษาลดผลผลิตพบว่าชุดการทดลองที่ 1 ปูตัวอย่างมีน้ำหนักรวมเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 1,757 กรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ผลผลิตเป็นปูกระดองนิ่มหลังการลอกคราบเฉลี่ยเท่ากับ 2,983 กรัม เฉลี่ย 8 ตัว/กิโลกรัม ส่วนปูกระดองแข็งสมบูรณ์หลังการลอกคราบได้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3,097 กรัม เฉลี่ย 8 ตัว/กิโลกรัม ขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 น้ำหนักปูตัวอย่างรวมเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 2,410 กรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ผลผลิตเป็นปูกระดองนิ่มหลังการลอกคราบเฉลี่ยเท่ากับ 3,499 กรัม เฉลี่ย 7 ตัว/กิโลกรัม ส่วนปูกระดองแข็งสมบูรณ์หลังการลอกคราบได้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3,607 กรัม เฉลี่ย 7 ตัว/กิโลกรัม

นอกจากนี้จากการสังเกตและการจดบันทึกการลอกคราบของปูทะเล พบว่าบริเวณรอยต่อระหว่างกระดองและจับบี้งชิดติดกันแน่น (Fig. 2A) แต่เมื่อปูใกล้ลอกคราบสังเกตได้ว่าก่อนการลอกคราบ 1 สัปดาห์บริเวณรอยต่อดังกล่าวค่อย ๆ แยก และยืดออก (Fig. 2B) โดยก่อนการลอกคราบ 2 วัน บริเวณรอยต่อระหว่างกระดองยืดและปริออกอย่างชัดเจน (Fig. 2C) หลังจากนั้นบริเวณรอยต่อระหว่างกระดองแตกแยกออกจากกัน เผยให้เห็นคราบใหม่ (Fig. 2D-E) แล้วปูค่อย ๆ ถอยหลังออกจากส่วนท้ายบริเวณรอยต่อระหว่างกระดองกับจับบี้ง การสังเกตว่าปูลอกคราบเสร็จสมบูรณ์แล้วนั้น การสังเกตในตะกร้าเหมือนมีปู 2 ตัว (Fig. 2F) นั้นแสดงว่าปูสามารถถอดโครงร่างใหม่ออกจากโครงร่างเก่าเรียบร้อยแล้ว โดยโครงร่างใหม่เหมือนเดิมทุกประการซึ่งโครงร่างเก่ามีขนาดเล็กกว่าโครงร่างใหม่ (Fig. 3) อย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งโครงร่างเก่าเปราะบางและแตกหักง่าย ส่วนโครงร่างใหม่ของปูที่ลอกคราบใหม่ ๆ นั้นจะอ่อนนิ่ม ไม่มีแรง ไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ ขาไม่สามารถพยุงร่างกายให้อยู่ในน้ำได้ เคลื่อนที่และเคลื่อนไหวไม่ได้ นอกจากนี้ปูหลังลอกคราบใหม่ ๆ จะไม่กินอาหาร ซึ่งหลังจากการลอกคราบแล้ว 6 ชั่วโมง กระดองของปูจะเริ่มแข็งขึ้นซึ่งมีลักษณะคล้ายกระดากไม่สามารถจำหน่ายเป็นปูนิ่มได้ หลังการลอกคราบ 1 วัน พบว่าโครงร่างแข็งขึ้นเล็กน้อยแต่ปูก็ยังไม่มีการเคลื่อนที่ เคลื่อนไหวและไม่กินอาหาร เมื่อเข้าสู่วันที่ 2 ขาเริ่มขยับและเคลื่อนที่ได้เล็กน้อยแต่ไม่สามารถยกก้ามขึ้นได้ และยังคงไม่กินอาหาร ขณะที่วันที่ 3 พบว่าปูเริ่มมีการเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นและเริ่มกินอาหารแต่กินอาหารไม่หมด และยังคงไม่สามารถใช้ก้ามในการหยิบจับอาหาร ส่วนวันที่ 4 ปูสามารถยกก้ามขึ้นได้แล้วและกินอาหารหมด สำหรับวันที่ 5 หลังการลอกคราบพบว่าปูสามารถใช้ก้ามในการหยิบจับอาหารใส่ปากได้ มีการกินอาหารได้อย่างปกติ สำหรับวันที่ 6 กระดองยังไม่แข็งเต็มที่เนื่องจากเมื่อใช้มือกดลงไปที่กระดองของปูทะเลพบว่ากระดองนุ่มลงและปูใช้ก้ามในการต่อสู้ คุ้ยคล้ายคลึงกับปูปกติ จนกระทั่งถึงวันที่ 10 ปูมีโครงร่างแข็งแต่ยังเรียกว่าปูโพรก ซึ่งปูโพรกคือปูหลังลอกคราบที่ยังไม่มีความสมบูรณ์เต็มที่หรือที่เรียกว่าปูเนื้อยังไม่แน่นนั่นเอง ซึ่งหลังจากปูลอกคราบเฉลี่ย 18 วัน พบว่าปูมีกระดองแข็งสมบูรณ์หรือที่เรียกว่าปูเนื้อแน่น ซึ่งสามารถสังเกตได้ที่จับบี้งของปูทะเลจะแข็งไม่สามารถใช้มือกดลงได้

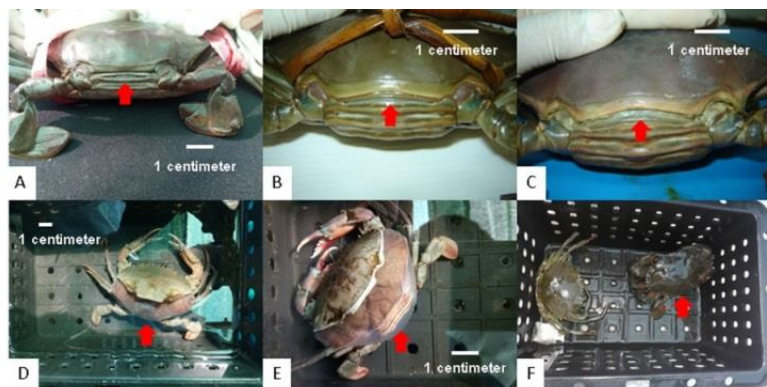


Figure 2 The molting progress of mud crab, intermolt (A), 1-week premolt (B), 2-day premolt (C), molting (D-E), after molting (F).



Figure 3 The body size of crab was increased after molting, old shell and new shell.

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของปูทะเลหลังการลอกคราบ โดยทำการศึกษาน้ำหนัก ความกว้าง ความยาว และความหนาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปูกระดองนิ่มและปูกระดองแข็งสมบูรณ์ จาก 2 ชุดการทดลองด้วยกัน ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 คือ ปูน้ำหนัก 50-79 กรัม และชุดการทดลองที่ 2 คือ ปูน้ำหนัก 80-109 กรัม ผลการทดลองพบว่าน้ำหนัก ความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง และความหนาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปูกระดองนิ่มและปูกระดองแข็ง ในชุดการทดลองที่ 1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 แสดงว่าการเจริญเติบโตของปูในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีการเจริญเติบโตหลังการลอกคราบทั้งแบบปูกระดองนิ่มและปูกระดองแข็งที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากทั้ง 2 ชุดการทดลอง ปูตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นจัดอยู่ในกลุ่มปูขนาดเล็ก โดย Tunvilai (2006) ได้แบ่งกลุ่มขนาดของปูชนิด *Scylla* spp. ตามความกว้างของกระดองไว้ดังนี้ ความกว้างน้อยกว่า 0.65 ซม. จัดเป็นกลุ่มปูขนาดเล็ก ความกว้าง 6.50-7.99 ซม. จัดเป็นกลุ่มปูขนาดเล็ก ความกว้าง 8.00-9.99 ซม. จัดเป็นกลุ่มปูขนาดกลาง ความกว้าง 10.00-12.99 ซม. จัดเป็นกลุ่มปูขนาดใหญ่ และความกว้าง 13.00 ซม. ขึ้นไปจัดเป็นกลุ่มปูขนาดใหญ่พิเศษ โดยจากการทดลองในครั้งนี้ปูตัวอย่างในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีความกว้างกระดองเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 6.86 และ 7.56 ซม. ตามลำดับ โดยจัดอยู่ในกลุ่มปูขนาดเล็กเหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ปูทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันนั่นเอง

นอกจากนี้จากการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าความกว้างเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปูกระดองนิ่มของชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เท่ากับ 0.85 และ 1.03 ซม. ตามลำดับ ขณะที่ความกว้างเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปูกระดองแข็งสมบูรณ์ของชุดการทดลองที่ 1 และ 2 คือ 1.05 และ 1.22 ซม. ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ Haemasaton and Pisuttharacha (2017) ที่รายงานว่ปูชนิด *S. serrata* มีความกว้างของกระดองเพิ่มขึ้น 2.70-2.74 ซม. หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน สำหรับน้ำหนักของปูกระดองนิ่มที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยในครั้งนี้พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เท่ากับ 49.04 และ 43.56 กรัม ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักปูกระดองแข็งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เท่ากับ 53.6 และ 47.88 กรัม ตามลำดับ ภายในเวลา 60 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับ Marichamy (1996) ที่รายงานว่ปูชนิด *S. oceanica* มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 58 กรัม เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 76 วัน ขณะที่ David and Abdhallah (2009) รายงานว่ปูชนิด *S. serrata* มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 85.9 กรัม เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน

สำหรับการศึกษาระยะเวลาที่ปูใช้ในการลอกคราบของชุดการทดลองที่ 1 พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งอาจเนื่องมาจากปูทั้ง 2 ชุดการทดลองจัดอยู่ในกลุ่มปูขนาดเล็ก ดังนั้นระยะเวลาที่ปูใช้ในการลอกคราบจึงใกล้เคียงกัน โดยระยะเวลาในการลอกคราบของปูทะเลนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาดของปู โดยปูที่มีขนาดเล็กจะใช้ระยะเวลาในการลอกคราบสั้นกว่าปูที่มีขนาดใหญ่ หรืออาจกล่าวได้ว่าปูที่มีขนาดเล็กจะลอกคราบเร็วกว่าปูที่มีขนาดใหญ่นั้นเอง การที่ปูใช้ระยะเวลาในการลอกคราบสั้นนั้นส่งผลดีกับเกษตรกร เนื่องจากสามารถเก็บผลผลิตได้เร็วขึ้นและลดค่าใช้จ่ายเรื่องอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปูทะเล การทำให้ปูลอกคราบในระยะเวลาสั้นลงนั้นอาจทำได้โดยการเสริมอาหารหรือสารชีวภาพ เช่น โคโคซาน โดย Koedprang and Songrak (2011) รายงานว่โคโคซานสามารถกระตุ้นการลอกคราบของปูชนิด *T. crenata* ได้ หรืออาจทำการหยักรยางค์ เช่น ก้าม ขาเดิน หรือขาว่ายน้ำ ซึ่งการสูญเสียรยางค์สามารถกระตุ้นให้ปูลอกคราบได้เร็วขึ้น (Singthaweesak, 2003) เช่นกัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าผลผลิตของปูกระดองนิ่มจากชุดการทดลองที่ 2 เฉลี่ยเท่ากับ 3,499 กรัม ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ 1 ที่ได้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 2,983 กรัม ส่วนปูกระดองแข็งสมบูรณ์หลังลอกคราบเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ 2 ได้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3,607 กรัม ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ 1 ที่ได้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3,097 กรัม โดยปูกระดองนิ่มของชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนปูกระดองแข็งสมบูรณ์ของชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่ง Tien songrusmee (2010) รายงานว่ปูกระดองนิ่มชนิด *Portunus pelagicus* ขนาด 8 ตัว/กิโลกรัม จัดเป็นปูที่มีขนาดใหญ่พิเศษสามารถจำหน่ายได้กิโลกรัมละ 400 บาท ส่วนปูกระดองแข็ง (ปูเนื้อ) ขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม มีราคา กิโลกรัมละ 250 และ 280 บาท ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปูกระดองนิ่มขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม มีราคาที่สูงกว่าปูกระดองแข็งที่มีขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้ถ้านำปูกลุ่มขนาดเล็กมาเลี้ยงเป็นปูกระดองนิ่มจะทำให้ได้ราคาที่สูงกว่าการเลี้ยงเป็นปูกระดองแข็ง ภายในระยะเวลา 60 วัน

จากการศึกษาการลอกคราบของปูทะเลพบว่าปูกระดองแข็งจะมีรอยต่อระหว่างกระดองติดแน่นกับจับปั้ง แต่เมื่อใกล้ลอกคราบพบว่ารอยต่อดังกล่าวยืด แยก และแตกออกจากกัน เรียกว่าปูสองดอง ซึ่งอาจเป็น

การเตรียมความพร้อมสำหรับการลอกคราบ โดยการลอกคราบของปูทะเลนั้นมีกระบวนการต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น กระบวนการสลายและดึงกลับแคลเซียม นอกจากนี้ยังมีกระบวนการย่อยและดึงสารที่เป็นอนุพันธ์ของไคตินจากกระดองเก่าไปสะสมไว้เพื่อใช้ในการสร้างกระดองใหม่ (Sugumaran, 1996) จึงทำให้กระดองของปูที่ใกล้ลอกคราบแตกและแยกออกจากกัน โดย Mangum *et al.* (1985) พบว่าปูก่อนการลอกคราบ บริเวณเนื้อเยื่อใต้กระดองจะมีปฏิกิริยาของการย่อยสลายโครงสร้างเดิมและการสร้างกระดองใหม่เกิดขึ้น นอกจากนี้จากการทดลองในครั้งนี้ยังพบว่าในระหว่างการลอกคราบปูจะค่อย ๆ ถอยหลังออกมาทางบริเวณรอยต่อที่แตกออก จนสามารถลอกคราบเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งจะมีโครงร่างอ่อนนุ่ม จากนั้น 6 ชั่วโมง โครงร่างของปูจะเริ่มแข็งขึ้น เรียกว่าปูกระดาก แล้วหลังจากนั้นกระดองของปูจะแข็งขึ้นเรื่อย ๆ กระทั่ง 10 วัน ปูจะกลับมามีโครงร่างแข็งอีกครั้ง และมีโครงร่างแข็งสมบูรณ์วันที่ 18 หลังจากการลอกคราบหรือที่เรียกว่าปูเนื้อแน่นนั่นเอง ซึ่งปูหลังการลอกคราบจะมีกระบวนการสะสมแคลเซียมและสร้างไคตินในกระดองใหม่ เพื่อให้โครงร่างใหม่มีความแข็งแรงขึ้น โดยมีกระบวนการสร้างไคตินที่ชั้น cuticle ในเนื้อเยื่อใต้กระดอง โดยเนื้อเยื่อใต้กระดองประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ หลายชั้น เช่น basement membrane เป็นชั้นในสุดของเนื้อเยื่อใต้กระดอง ชั้น epidermis เป็นชั้นที่ทำหน้าที่ในการขับสารต่าง ๆ เพื่อที่ชั้น cuticle จะนำสารต่าง ๆ เหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการสร้างโครงร่างให้แข็งแรงขึ้น ซึ่งในชั้น cuticle นั้นประกอบด้วย ไขมัน โปรตีน calcium salt แคลเซียม และไคติน ซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้กระดองแข็งนั่นเอง (Rosomero and Stoffolano, 1998) ซึ่งเป็นข้อมูลทางด้านการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของปูทะเลหลังการลอกคราบ จากการศึกษาในครั้งนี้ถ้าต้องการผลผลิตเป็นปูกระดองนิ่มต้องเก็บปูภายใน 6 ชั่วโมง หลังจากปูได้มีการลอกคราบ และถ้าต้องการผลผลิตเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์ (ปูเนื้อแน่น) ต้องเก็บปูหลังการลอกคราบ 18 วัน

สรุปผล

การเจริญเติบโตของปูทะเลหลังการลอกคราบ จากการศึกษาน้ำหนัก ความกว้างกระดอง ความยาวกระดอง และความหนาเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปูกระดองนิ่มและปูกระดองแข็งของชุดการทดลองที่ 1 (ปูน้ำหนัก 50-79 กรัม) ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 2 (ปูน้ำหนัก 80-109 กรัม) ขณะที่ระยะเวลาในการลอกคราบจากปูกระดองแข็งเริ่มต้นเป็นปูกระดองนิ่ม และจากปูกระดองนิ่มไปเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์ของชุดการทดลองที่ 1 ก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 2 เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าปูตัวอย่างจากทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน ส่วนขนาดของปูหลังการลอกคราบพบว่าปูกระดองนิ่มมีขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม ในชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 ตามลำดับ เช่นเดียวกับปูกระดองแข็งสมบูรณ์มีขนาด 8 และ 7 ตัว/กิโลกรัม ในชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 ตามลำดับ โดยปูกระดองนิ่มขนาด 7-8 ตัว/กิโลกรัม จะถูกจำหน่ายในราคาที่สูงกว่าปูกระดองแข็งที่มีขนาด 7-8 ตัว/กิโลกรัม ดังนั้นถ้านำขนาดปูจากทั้ง 2 ชุดการทดลองมาเลี้ยงเป็นปูกระดองนิ่มจะทำให้ได้ราคาที่สูงกว่าการเลี้ยงเป็นปูกระดองแข็งสมบูรณ์ ซึ่งอาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับต้นทุนและผลตอบแทนของการเลี้ยงปูทะเลเพื่อเป็นปูกระดองนิ่มหรือปูกระดองแข็งสมบูรณ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝายชุมชนและสังคม ประเพณีทุนพัฒนานักวิจัยสู่ตำแหน่งวิชาการเพื่อชุมชนและสังคม เลขที่สัญญา RDG5940004-S11 และมูลนิธิ โทรเพื่อการพัฒนาวิทยาศาสตร์ ประเทศไทย (TSF; Toray Science Foundation, Japan) ประเพณีทุนช่วยเหลือทางด้านวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 23

เอกสารอ้างอิง

- David, M. O. and Abdhalla, M. 2009. A preliminary study on the response of mangrove mud crab (*Scylla serrata*) to different feed types under drive in cage culture system. Journal of Ecology and Natural Environment 1(1): 7-14.
- Department of Fisheries. 2018. Fisheries foreign affairs division.
<https://www4.fisheries.go.th/index.php/dof/main> [in Thai]
- Haemasaton, T. and Pisuttharachai, D. 2017. Productivity improvement of mud crabs *Scylla serrata* (Forsk.) in cage-pond using different sheltering materials. Thaksin University Journal 20 (3): 1-7. [in Thai]
- Koedprang, W. and Songrak, A. 2011. Soft-shell spiny rock crab (*Thalamita crenata*) production by molt inducing methods. Journal of Fisheries Technology Research 5(1): 66-75. [in Thai]
- Mangum, C. P., Defur, P. L., Fields, J. H. A., Henry, R. P., Kormanik, G. A., McMahon, B. R., Ricci, J., Towle, D. W. and Wheatly, M. G. 1985. Physiology of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) during a molt. pp. 1-12. In H. M. Perry and R. F. Malone, eds. Proceedings of the national symposium on the soft-shelled blue crab fishery. Mississippi-Alabama Sea Grant Consortium and Louisiana Sea Grant College Program.
- Marichamy, R. 1996. Crab farming potential in India. Proceedings of the Seminar on Fisheries-a Multibillion Dollar Industry, Madras pp 115-112.
- Rosomer, W. S. and Stoffolano, J. G. 1998. The Science of Entomology 4th ed. McGraw-Hill Inc., New York.
- Singthaweesak, W. 2003. Soft-shell cultured of mud crab, *Scylla serrata* (Forsk.) in cement tanks. Fisheries research, technical paper no. 1/2003. Coastal Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Bangkok. [in Thai]
- Primeetian, P. 2010. Antioxidant and lipid peroxidation in molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forsk.) 1775). Master of Marine Science Program in Marine Science Faculty of Fisheries, Kasetsart University. [in Thai]

- Sugumaran, M. 1996. Role of the insect cuticle in host defense reactions, pp 355-374. *In* Soderhall, K., Iwanaga, S. and Vasata, G. R. eds. New Directions in Invertebrates Immunology. SOS Publications, Fair Heaven, New Jersey.
- Theppanich, A., Tamtin, M. and Nooseng, S. 2011. Culture of mud crab (*Scylla paramamosain* Estampador, 1949) using artificial diet. Fisheries research, technical paper no. 19/ 2011. Coastal Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Bangkok. [in Thai]
- Tiensongrusmee, B. 2002. Mud crab. The Thailand Research Fund (TRF). Bangkok. [in Thai]
- Tiensongrusmee, B. 2008. Blue swimming crab. The Thailand Research Fund (TRF). Bangkok. [in Thai]
- Tiensongrusmee, B. 2010. Soft-Shell crab (*Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758). The report no. RDG520075. The Thailand Research Fund (TRF). Bangkok. [in Thai]
- Tunvilai, D. 2006. Muddy crab fisheries around the eastern coast of the Gulf of Thailand. Fisheries research, technical paper no. 24/2006. Marine Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Bangkok. [in Thai]

จุลกายวิภาคระบบย่อยอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) Digestive system histology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

สุวาลี มะอุนันต์ และ จิราพร โรจน์ทินกร*

Suwalee Ma-anun and Jiraporn Rojtinnakorn*

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

Corresponding author: jiraroj@mju.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะต่างๆ ในกุ้งก้ามกราม เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ทำการตัดชิ้นเนื้อและย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin & eosin พบว่าเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อประกอบด้วยเซลล์รูปร่างยาวๆ เรียงขนานกัน ด้วยโครงสร้างของ mucus cells และ epithelial cells มีลักษณะประสานกันอย่างเห็นได้ชัด ในส่วนเนื้อเยื่อของเหงือกเป็นแบบ branching form มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและยึดกันแน่น สำหรับเนื้อเยื่อของกระเพาะ ประกอบด้วยผนัง 4 ชั้น คือ mucosa, submucosa, muscularis และ serosa โดยแต่ละชั้นประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อเกี่ยวพันที่เรียงตัวอย่างหลวมๆ ส่วนเนื้อเยื่อของลำไส้มีลักษณะการจัดเรียงตัวเป็นเส้นตรง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ในชั้น mucosa เรียงตัวซ้อนพับและประสาน ถัดมาเป็นชั้น muscularis ประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบ เรียงตัวกันเป็นวงกลมและตามยาว และชั้น serosa มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบางๆ ในส่วนเนื้อเยื่อดับและตับอ่อนประกอบด้วยท่อ hepatopancreatic tubularis ซึ่งแยกออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน reserve inclusion cells อย่างชัดเจน ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ประโยชน์ในงานวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจุลกายวิภาคต่อไป

คำสำคัญ จุลกายวิภาค, กุ้งก้ามกราม, ระบบทางเดินอาหาร, *Macrobrachium rosenbergii*

Abstract

This study of histology of various organs in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) aimed to be reference for its histopathology determination. Tissues were section and stained with hematoxylin & eosin. For muscle tissue, it consisted of long cells obviously aligning parallel with mucus cells and epithelial cells. For gill tissue, it showed branching form and arranged neatly and tightly. For stomach tissue, it consisted of 4 layers of mucosa, submucosa, muscularis and serosa, which each layer consisting of smooth muscle and loose connective tissue. While intestine tissue consisted of straight mucosa tissue with 3 layers; folding and coordinating mucosa, next layer of muscularis arranging in circular and longitudinal, and thin tissue of serosa layer. For hepatopancreatic tissue, it consisted of hepatopancreatic tubularis, which clearly separating from connective reserve inclusion cells.

Keywords: histology, giant freshwater prawn, digestive system, *Macrobrachium rosenbergii*

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2562

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ โดยรู้จักกันทั่วไป คือ กุ้งนาง กุ้งหลวง ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยนั้น เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ มีราคาสูง ได้รับความสนใจจากผู้บริโภค เป็นที่ต้องการของตลาด การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในปัจจุบันมีผลผลิตจากพื้นที่ภาคกลาง เป็นส่วนใหญ่ (FAO, 2011)

การศึกษาทางจุลกายวิภาคสามารถใช้ประโยชน์ในการยืนยันโครงสร้างระดับเนื้อเยื่อและเซลล์ ได้อย่างถูกต้อง และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประยุกต์ใช้ในการศึกษาสรีรวิทยา ตลอดจนใช้เปรียบเทียบกับ การศึกษาจุลกายวิภาคของตัวกุ้ง กลไกการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในระดับเนื้อเยื่อเมื่อเกิดโรคหรือสัมผัสกับสิ่ง กระตุ้นอื่นๆ นำมาใช้ในการประกอบการวินิจฉัยโรค การจัดการด้านสุขภาพ สิ่งแวดล้อม และวิธีการเลี้ยงได้ (Supattra, 2001) อย่างไรก็ตาม รายงานเกี่ยวกับจุลกายวิภาคของกุ้งก้ามกรามยังมีจำนวนจำกัด ในงานนี้ได้ ศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและลักษณะจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อสำคัญต่างๆ ของกุ้งก้ามกราม โดยเฉพาะ ระบบการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกายที่ก่อให้เกิดโรคจะสามารถเข้าสู่ร่างกายของกุ้งได้ ได้แก่ เหงือก กล้ามเนื้อ และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหาร (Seehabutr et al., 2013) เพื่อใช้ประโยชน์ในงานวิจัย ที่ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจุลกายวิภาคต่อไป

วิธีการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะภายในกุ้งก้ามกราม ขนาดตัวละ 450 กรัม จำนวน 3 ตัว จากการ ตรวจสอบสุขภาพโดยรวมพบว่า เป็นกุ้งที่แข็งแรงดี ไม่มีความผิดปกติ โดยแช่กุ้งในน้ำเย็น เมื่อกุ้งสลบดีแล้ว ผ่าตัดแยกเนื้อเยื่อจากตัวกุ้งก้ามกราม ถ่ายภาพลักษณะทางกายภาพของชิ้นเนื้อส่วนต่างๆ แล้วเก็บไว้ใน Davidson's fixative นาน 24 - 72 ชม. จากนั้นเก็บไว้ใน 70% ethanol นำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ตามวิธีของ Bell and Lightner (1988) โดยเข้ากระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อและฝังชิ้นเนื้อใน paraffin ตัดชิ้นเนื้อ ที่ความหนา 5 μm ย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ กำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. โครงสร้างทางกายวิภาคของกุ้งก้ามกราม

ลักษณะทางกายวิภาคของกุ้งก้ามกรามมีลักษณะลำตัวแบนข้างแนวสันหลังโค้งงอ มีเปลือกเป็น สารประกอบจำพวกไคติน (chitin) (Sawika, 2011) ห่อหุ้มตัว เปลือกหุ้มแยกออกเป็น 2 ตอน คือ ตอนหน้าหุ้ม หัวและอก และส่วนร่างกายของกุ้ง ซึ่งแบ่งออกเป็นปล้องๆ มีทั้งหมด 19 ปล้อง แบ่งออกเป็นส่วนหัว 5 ปล้อง ส่วนอก 8 ปล้อง และส่วนท้อง 6 ปล้อง แต่ละปล้องมีรยางค์ 1 คู่ อวัยวะต่างๆ ที่สำคัญของกุ้ง มีดังนี้ รยางค์ บริเวณหัว 6 คู่ ทำหน้าที่ในการกินอาหาร รยางค์ที่ปากกุ้ง คือกรามของกุ้ง ใช้บดเคี้ยวอาหาร กุ้งมีขา 5 คู่ (Figure 1) ทำหน้าที่เป็นก้ามหนีบและขาเดินอยู่บริเวณส่วนอกส่วนท้องมีรยางค์ว่ายน้ำ 5 คู่ ในกุ้งตัวเมียส่วนนี้ ใช้ทำหน้าที่ยึดเกาะไข่ที่ได้รับการผสมน้ำเชื้อแล้วและเป็นที่ฟักไข่ด้วย ปล้องสุดท้ายเป็นส่วนของหางทำหน้าที่

คล้ายหางเสือเรือ นัยน์ตาของกุ้ง เป็นนัยน์ตาธรรม มีก้านตาที่โยกคลอนได้ หนวด มี 2 คู่ หนวดคู่แรกแต่ละเส้นที่ปลายแยกออกเป็นหนวดเส้นเล็กๆ ข้างละหนึ่งคู่ หนวดคู่ที่สองค่อนข้างยาว ทำหน้าที่รับความรู้สึก (Bell and Lightner, 1988)

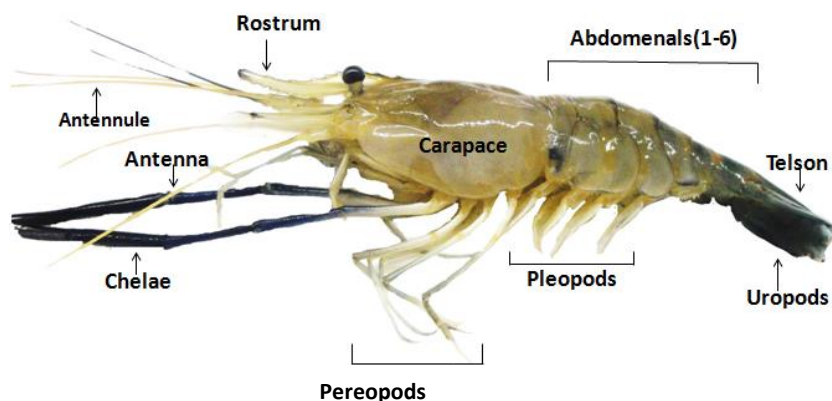


Figure 1 External anatomy of giant freshwater prawn

อวัยวะภายในของกุ้งส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณหัว (Figure 2-3) ประกอบด้วยหัวใจ กระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อน ระบบประสาท และอวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนอวัยวะหายใจของกุ้ง คือ เหงือก ซึ่งอยู่ด้านข้างของกระดองหัวและเกาะติดกับบรยางค์หัวตัวเหงือก เป็นเยื่อบางๆ ซ้อนกันหลายๆ ชั้น หล่อเลี้ยงด้วยเลือดที่ไม่มีสี เม็ดเลือดกุ้ง ประกอบด้วย ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ เซมิกรานูลลาร์ (semigranular hemocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่พบลักษณะของเม็ดกรานูลล์ขนาดเล็กอยู่ในเซลล์ กรานูลลาร์ (large granular hemocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (Sinchaipanit, 2012)

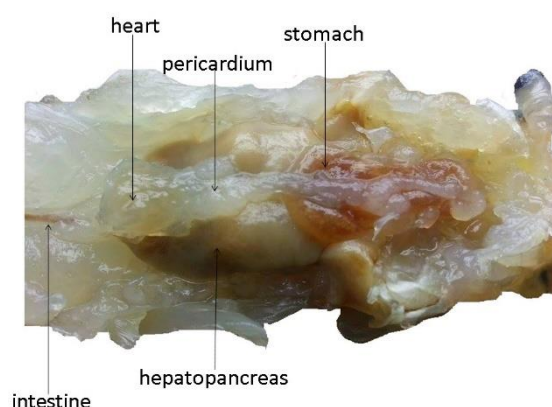


Figure 2 Abdominal anatomy of giant freshwater prawn

2. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะของกุ้งก้ามกราม

ในโครงสร้างกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกราม พบว่าประกอบด้วยเซลล์รูปร่างยาวๆ เรียงขนานกัน มีเส้นใยประสาน หรือเกาะกันอย่างเหนียวแน่นและแข็งแรง การพัฒนาของ mucus cells และ epithelial cells มีลักษณะประสานกันอย่างเห็นได้ชัด มีการยึดหดสลับกันตามการโค้งงอของลำตัว (Sinhaipanit, 2012) โดยมีลักษณะตรงกับเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของกุ้งฝอยปกติ ซึ่งมีการเรียงตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fibers) อย่างเป็นระเบียบ (Viyada *et al.*, 2013) และในกุ้งล็อบสเตอร์ (*Homarus americanus*) มี hemal sinuses ตามแนวโครงสร้างของกล้ามเนื้อ skeletal muscle (Shields and Boyd, 2014) (Figure 4)

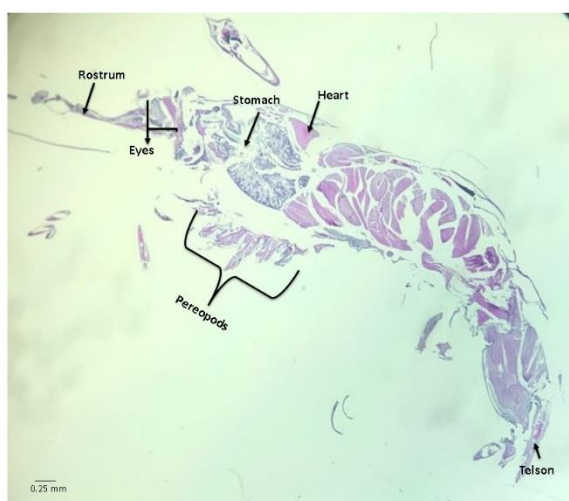


Figure 3 Anatomy structure of giant freshwater prawn with 10x magnification

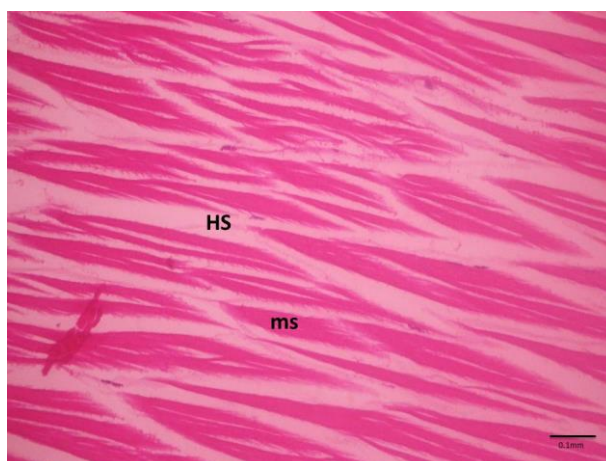


Figure 4 Muscle tissue of giant freshwater prawn with 40x magnification

HS = hemal sinus, ms = skeletal muscle fibers

เนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งก้ามกราม พบว่ามีรูปร่างเป็นแบบ branching form มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและยึดกันแน่น (Seehabutr *et al.*, 2013) ซึ่งเหงือกหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจน (O_2) ที่ละลายอยู่ในน้ำโดยการไหลผ่านเข้าทางเหงือก และขับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) (Viyada *et al.*, 2013; Lodhi *et al.*, 2006; Sharma and Subba, 2005) (Figure 5)

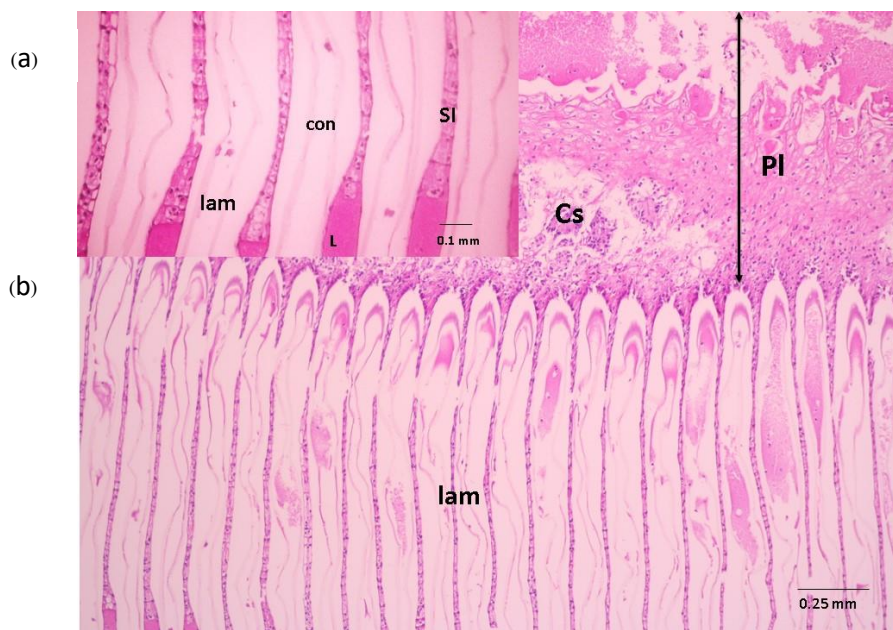


Figure 5 Gill tissue of giant freshwater prawn with (a)10x and (b)40x magnification

PI = primary lamella, CS = central sinus, lam = lamellae,

L= acuna (capillary lumen), con = connective tissue, SI = secondary lamella

ส่วนเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของกุ้งก้ามกราม (Figure 6) พบว่าเนื้อเยื่อของกระเพาะประกอบด้วยผนัง 4 ชั้น คือ mucosa, submucosa, muscularis และ serosa โดยแต่ละชั้นประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อเกี่ยวพันที่เรียงตัวอย่างหลวมๆ (loose connective tissue) มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของกุ้งฝอย (*Palaemonetes argentine*) โดยมีเนื้อเยื่อ cylindrical epithelium ซึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ ล้อมรอบด้วยเส้นใยที่เรียงตัวกันในลักษณะวงกลมและแนวยาว นอกจากนั้น nuclei ยังมีความยาวที่แตกต่างกันภายในเซลล์ (Sousa and Petriella, 2006)

ในส่วนของขนาดความกว้างของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารกุ้งก้ามกราม พบว่ามีขนาดความกว้างของกระเพาะที่ใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อกระเพาะของกุ้งฝอย (*P. argentine*) ซึ่งมีความกว้างของช่องกระเพาะที่แคบ แตกต่างตามขนาดของลำตัว (Icely and Nott, 1992) นอกจากนั้นลักษณะโครงสร้างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารคล้ายคลึงกับกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งตะกาด (*Melapenaeus ensis*) (Lin, 2000) และกุ้งน้ำจืดกลุ่มอื่นๆ อีกด้วย (Icely and Nott, 1992)

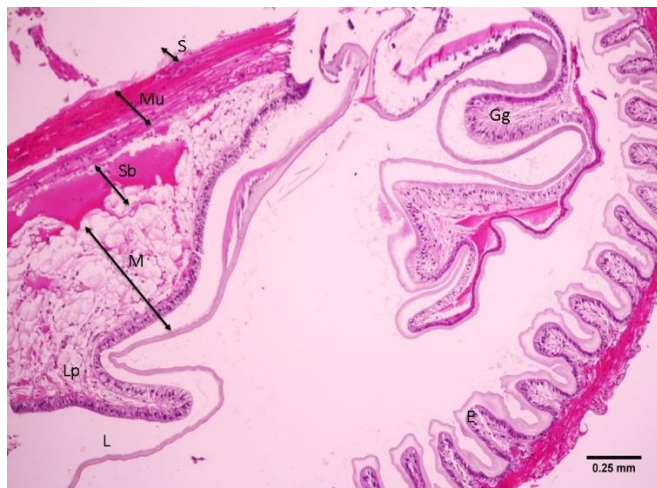


Figure 6 Stomach tissue of giant freshwater prawn with 10x and 40x magnification

M = mucosa, S = serosa, Sb = submucosa, Mu = muscularis, L = lumen,
Lp = lamina propria, Gg = gastric gland

ส่วนเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งก้ามกราม (Figure 7) พบว่าเนื้อเยื่อของลำไส้มีลักษณะของการจัดเรียงตัวเป็นเส้นตรง โดยชั้น mucosa เป็นแบบพับซ้อนและเนื้อเยื่อประสานกัน ถัดมาชั้น muscularis ประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อเรียบเรียงตัวกัน โดยมีทั้งที่เรียงตัวเป็นวงกลมและเรียงตัวตามยาว ในชั้น serosa พบว่ามีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบางๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่าโดยปกติเนื้อเยื่อลำไส้ของสัตว์น้ำมี mucosa folding และ branching ซึ่งพบมากในหลอดอาหารและในส่วนของลำไส้ ลักษณะเนื้อเยื่อของลำไส้ของกุ้งก้ามกรามนั้นคล้ายคลึงกับกุ้งขาว (*Penaeus setiferus*) โดยในส่วนของชั้นเนื้อเยื่อ epithelium ประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อเรียบเรียงตัวกัน ทั้งเรียงตัวเป็นวงกลมและเรียงตัวตามยาว ในหนึ่งเซลล์มีบทบาทที่สำคัญในการขยายจากฐาน basal lamina ไปถึง lumen โดยภายในเซลล์มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง และมีการพัฒนาไปเป็น brush border ซึ่งมี lamina propria อยู่ภายใน (Lovett and Felder, 1990)

สำหรับเนื้อเยื่อดับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม (Figure 8) พบว่าเนื้อเยื่อดับและตับอ่อนพบท่อ hepatopancreatic tubularis (H) ซึ่งถูกแยกออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน reserve inclusion cells โดยมีลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อดับและตับอ่อนคล้ายคลึงกับตับอ่อนในกุ้งฝอย (*P. argenteus*) พบว่าใน tubular gland แต่ละ tubule ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อชนิด epithelium และเซลล์ 4 cellular types ได้แก่ embryonalzellen cells (E), fibrillenzellen cells (F) ช่วยสังเคราะห์โปรตีน, restzellen cells (R) ช่วยดูดซึมสารอาหารและขจัดสารพิษ และ blasenzellen cells (B) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการคัดหลั่ง (Sousa and Petriella, 2007) นอกจากนั้นยังพบ metacercarial cysts เคลื่อนที่ที่อยู่ใน hepatopancreatic tubules โดยลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับตับและตับอ่อนของ brown shrimp (*Crangon crangon*) (Stentiford and Feist, 2005)

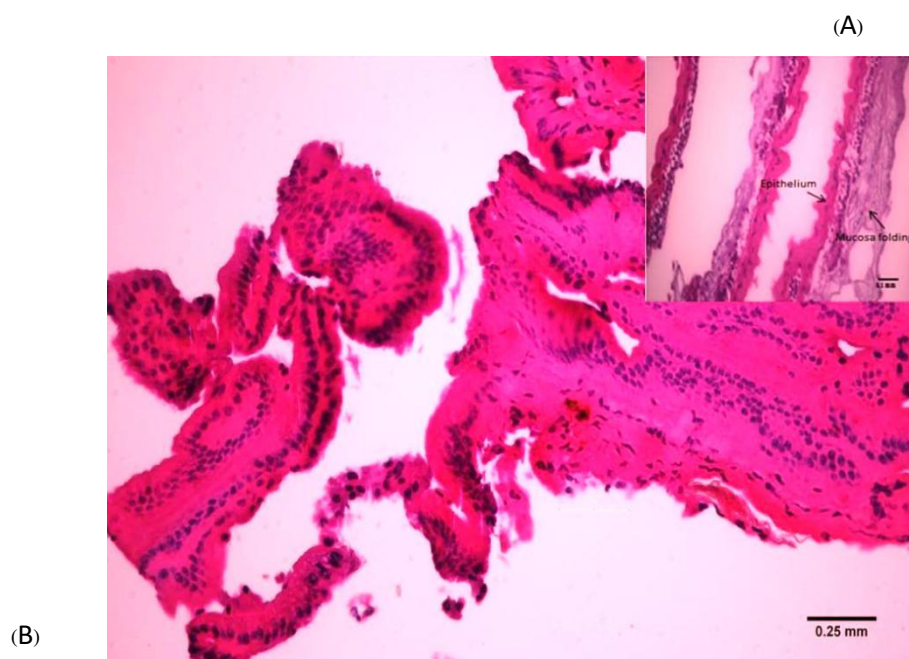


Figure 7 Gut tissue of giant freshwater prawn with 10x (A) and 40x(B) magnification

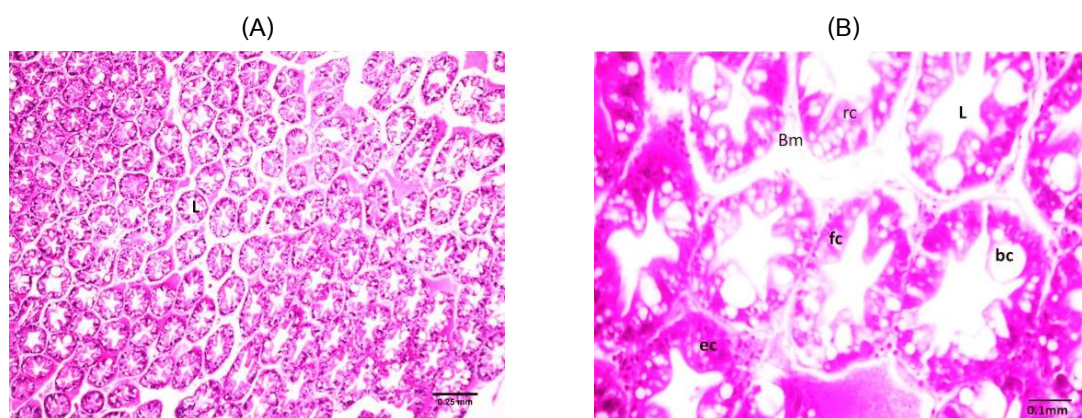


Figure 8 Hepatopancreatic tissue of giant freshwater prawn with 10x (A) and 40x (B) magnification

L = lumen, rc = R cells, ec = E cells, fc = F cells, bc = B cells, Bm = basement membrane

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะต่างๆ ในกุ้งก้ามกราม พบว่าลักษณะของเซลล์เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับกุ้งชนิดอื่นๆ มีความคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันในกุ้งทะเล กุ้งลอบสเตอร์ และกุ้งฝอย โดยแตกต่างกันที่ขนาดและความกว้างของช่องว่างในเนื้อเยื่อ ตามขนาดลำตัวที่แตกต่างกันและตามอายุของกุ้ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ได้รับทุนโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- Bell, T.A. and Lightner, D.V. 1988. A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 114 p.
- FAO. 2011. The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) - Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations/Earthscan. Rome/ London. 105 p
- Icely, J. D. and Nott, J. A. 1992. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod, Crustacea. 147-201 p.
- Lin, F. Y. 2000. Scanning electron microscopic observations on the gland filters of the pyloric stomach of *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* (Decapoda, Penaeidae). Journal of Crustacean Biology. 73(2):163-174.
- Lodhi, H. S., Khan M. A., Verma R. S. and Shama U. D. 2006. Acute toxicity of copper sulfate to freshwater prawns. Journal of Environmental Biology 27(3):585-588.
- Lovett, D. L. and Felder, D. L. 1990. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Journal of Biological Bulletin 178(2):160-174.
- Sawika K. 2011. Chaitosan in aquaculture. Veridian e journal, Silpakorn University. 6(2): 984 -993. [in Thai]
- Seehabutr, V., Sroysongwan, W. and Satsrisakul, P. 2013. Effect of Copper Sulfate on Gill and Muscle of *Macrobrachium lanchesteri* (De Man, 1911). Journal of Science and Technology. 2(1):21-26. [in Thai]
- Sharma, A. and Subba, B. R. 2005. General biology of freshwater prawn, *Macrobrachium lamarrei* (H. Milne-Edwards) of Biratnagar. Journal of Our Nature 3(1):31-41.
- Shields, J. D. and Boyd, R. A. 2014. Atlas of lobster anatomy and histology. [Online] Available from http://www.vims.edu/~jeff/biology/Atlas_of_lobster_histology.pdf [2016, April 20]
- Sinchaipanit, P. 2012. Physical and biochemical changes in the muscle of giant fresh water- prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, during frozen storage and freeze-thaw cycles. Thesis (Ph.D.) Chulalongkorn University. Thailand. 254 p
- Sousa, L. G. and Petriella, A. M. 2006. Morphology and histology of *P. argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) digestive tract. Journal of Biocell 30(2):287-294.

- Sousa, L. G. and Petriella, A. M. 2007. Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): influence of environmental pollution. *Journal of Revista de biologia tropical* 55(1):79-86.
- Stentiford, G. D. and Feist, S. W. 2005. A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. *Journal of invertebrate pathology* 88(2):136-146.
- Supattra S, 2001. Acquired defense of *Penaeus monodon* following bacterin, 1,3- glucan and probiotics administration. Thesis (Ph.D.) Mahidol University. Thailand. 294 p.
- Sawika K. 2011. Chaitosan in aquaculture. *Veridian e journal*, Silpakorn University. 6(2): 984 - 993. [in Thai]
- Viyada S, Watthana S, and Pakthida S. 2013. Effect of copper sulfate on gill and muscle of *Macrobrachium lanchesteri* (De Man, 1911). *Journal of Science and Technology* Vol. 2, No. 1, 2013. [in Thai]

มิถุนวิทยาและสุขภาพของรังไข่ปลาเกล็ดเหลือง *Hemibagrus filamentus*
(Fang and Chaux, 1949) จากแม่น้ำตาปี ภาคใต้ของประเทศไทย

Ovarian histology and its health of *Hemibagrus filamentus*
(Fang and Chaux, 1949), from the Tapee River of southern Thailand

ปิยากร บุญยัง¹, ศิลปชัย เสนารัตน์^{2,*}, พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ³, เจษฎ์ เกษตระทัด^{2,*}

วรรณีย์ จิรวงศ์กุล⁴, พหล โกสียะจินดา⁵ อธิกรมล เพ็งสกุล⁶

Piyakorn Boonyoung¹, Sinlapachai Senarat^{2,*}, Pisit Poolprasert³, Jes Kettratad^{2,*},

Wannee Jiraungkoorskul⁴, Pahol Kosiyachinda⁵ Theerakamol Pengsakul⁶

¹ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

¹Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

²Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathum Wan, Bangkok, 10330

Corresponding author, e-mail; *Senarat,S@hotmail.com, **Jes,K@chula.ac.th

³สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

³Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Mueang, Phitsanulok, 65000, Thailand

⁴ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

⁴Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Ratchathewi, Bangkok, 10400, Thailand

⁵ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

⁵Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Ratchathewi, Bangkok, 10400, Thailand

⁶คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

⁶Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษามิถุนวิทยาและสุขภาพของรังไข่ปลาเกล็ดเหลืองจากแม่น้ำตาปี ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน และนำตัวอย่างมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางด้านมิถุนวิทยา พบว่ารังไข่ของปลาเกล็ดเหลืองมี 1 คู่ และจัดเป็นแบบ asynchronous development oocyte มีการพัฒนาของเซลล์ไข่เป็น 3 ระยะ คือ ระยะการพัฒนาของโอโอโกเนียม ระยะปฐมภูมิ และระยะทุติยภูมิ โดยที่โอโอโกเนียมถูกพัฒนาขึ้นในเจมินอลคอมพาร์ทเมนต์ ส่วนระยะปฐมภูมิ และระยะทุติยภูมิถูกพัฒนาในสตรอมอลคอมพาร์ทเมนต์ ทั้งนี้พบว่าระยะปฐมภูมิแบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย ได้แก่ ระยะนิวคลีโอลัสหนึ่งอัน ระยะเพอร์นิวคลีโอลัส และระยะออยล์ดรอปลเลทส์และคอร์ติคัลแอลวีโอไล และระยะทุติยภูมิแบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย ได้แก่ ระยะต้นของการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ ระยะท้ายของการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ ส่วนระยะการเจริญเต็มที่ของเซลล์ไข่ สำหรับการประเมินสุขภาพของรังไข่โดยใช้จุลกายพยาธิวิทยาเป็นดัชนีบ่งชี้ และคำนวณความชุกของรอยโรคที่เกิดขึ้น ผลการศึกษาพบว่า 2 ฤดูมีการฝ่อของเซลล์ไข่ ทั้งในระยะปฐมภูมิและระยะทุติยภูมิคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของความชุกชุม ซึ่งให้เห็นว่าระบบสืบพันธุ์ของปลาเกล็ดเหลืองมีความเสี่ยงต่อการลดลงของเซลล์ไข่ และเชื่อมโยงกับการลดลงของประชากรปลาได้

คำสำคัญ: การสร้างเซลล์ไข่, ฤดูไข่, วงศ์ปลากริด, นครศรีธรรมราช

วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2562

Abstract

The aim of this study was to observe the ovarian histological structure and its health of the yellow mystus, *Hemibagrus filamentus*, collected from the Tapee River in dry and rainy seasons. Samples were then carried out using standard histological technique. The results revealed that the ovarian morphology of *H. filamentus* had a paired organ. It was considered as an asynchronous development oocyte, which is divided into three main distinguish stages i.e. oogonial proliferation (OP), primary growth phase (PGP) and secondary growth phase (SGP). The development of the OP was observed in the germinal compartment, whereas the PGP and SGP were found in stromal compartment. As to details, three sub-stages including one nucleolus, perinucleolar and oil droplets and cortical alveolus were observed in the PGP. Whereas, the SGP was classified into three sub-stages, early secondary growth, late secondary growth and full-grown oocyte stages. To observe the ovarian health, it was assessed using histopathological biomarker. Prevalence of all lesions were present as a percentage. The atretic follicles appeared during two seasons in both PGP and SGP (100 percent prevalence). This observation indicated that the reproductive system of *H. filamentus* associated to decrease of ovary that reduced of ovary in *H. filamentus* relating to decrease of fish population.

Keywords: Oogenesis, Follicle, Bagridae, Nakorn Si Thammarat

บทนำ

แม่น้ำตาปีจัดเป็นแม่น้ำสายหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทางภาคใต้ของประเทศไทย มีความยาวประมาณ 230 กิโลเมตร โดยเฉพาะช่วงไหลผ่านอำเภอดงหลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช มีการทำประมงและเกษตรกรรมมานาน (Senarat et al., 2015a) การพัฒนาแหล่งเกษตรกรรมมักควบคู่ไปกับการใช้สารฆ่าศัตรูพืชเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งการใช้สารเคมีเหล่านี้อาจมีการตกค้างของสารเหล่านั้นในดิน และปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำตาปี จึงอาจส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ปลาสดเหลืองมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hemibagrus filamentus* สามารถพบได้ทั่วไปและมีจำนวนมากในบริเวณแม่น้ำตาปี (Senarat et al., 2015a) เนื่องจากปลาชนิดนี้มักถูกจับอยู่ในพื้นที่บริเวณแหล่งเกษตรกรรมที่มีการปลูกยางพารา ข้าวโพด และพืชเศรษฐกิจต่างๆ เหตุนี้ผู้วิจัยจึงเลือกปลาสดเหลืองมาเป็นสัตว์น้ำเฝ้าระวัง (sentinel species) ของสารเคมีที่มีการปนเปื้อนในแม่น้ำตาปี โดยใช้จุดกายพยาธิของรังไข่มาเป็นตัววัดทางชีวภาพ เพราะการเปลี่ยนแปลงของรังไข่เชื่อมโยงถึงการปนเปื้อนของสารเคมีหรือมลพิษ ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) และแบบเรื้อรัง (chronic toxicity) (e.g., Spanò et al., 2004; Tillitt et al., 2010; Barnhoorn et al., 2004; Iwanowicz et al., 2009; Feist et al., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับ OECD (2009) ที่รายงานว่าพบการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นในรังไข่ของปลาชีวหัวโต *Pimephales promelas*, ปลาชีวข้าวสารญี่ปุ่น *Oryzias latipes* และ ปลาม้าลาย *Danio rerio* เชื่อมโยงกับผลกระทบจากมลพิษ นอกจากนี้ยังมีรายงานในปลาชีวหัวโตที่ได้รับสารอะทราซีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5,

5.0 และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลา 14 และ 30 วัน ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ปลาเพศเมียที่ได้รับอะทราซีนที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน มีผลทำให้จำนวนเซลล์ไข่ลดลงและเกิดการฝ่อของเซลล์ไข่ (atretic follicle) (Tillitt *et al.*, 2010) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษามิณูวิทยาและสภาวะของรังไข่ ปลากดเหลืองในแหล่งน้ำธรรมชาติ ข้อมูลที่ได้นอกจากทำให้ทราบถึงชีววิทยาการสืบพันธุ์ ยังช่วยให้เข้าใจความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นกับปลากดเหลือง และสิ่งแวดล้อมในแม่น้ำตาปีของประเทศไทย

วิธีการศึกษา

สุ่มเก็บตัวอย่างปลากดเหลืองเพศเมียระยะตัวเต็มวัยจำนวน 20 ตัว ในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม พ.ศ. 2556 และฤดูฝน เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 (ฤดูกลางละ 10 ตัว) ที่มีความยาวเหยียด (total length) ระหว่าง 16-20 เซนติเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ชาวประมงมีการจับปลากดเหลือง จึงง่ายต่อการเก็บอย่างจากแม่น้ำตาปีใกล้แหล่งเกษตรกรรมและชุมชนเมืองในช่วงที่ไหลผ่านอำเภอดง จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 3 จุด (8°28'10" N, 99°29'45" E) แต่ละจุดห่างกันประมาณ 6 กิโลเมตร ด้วยวิธีการลากอวน

ตัวอย่างทั้งหมดนำมาสลับด้วยวิธีการแช่ในน้ำแข็งเย็นจัด (rapid cooling shock) ตามวิธีการของ Wilson *et al.* (2009) หลังจากนั้นนำมาผ่าเปิดช่องท้องและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่มารักษาสภาพในน้ำยารักษาสภาพเดวิดสัน (Davidson's fixative) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดผ่านกระบวนการมาตรฐานของวิธีทางพยาธิวิทยา (Bancroft and Gamble, 2002) ตัดบางด้วยความหนา 4 ไมโครเมตร และย้อมสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (Harris's hematoxylin and eosin; H&E) และ เพอร์ไออดิก ซีฟ รีเจนต์ (periodic acid-schiff; PAS) นำสไลด์ทั้งหมดมาศึกษาโครงสร้างและรูปแบบของเนื้อเยื่อ ตามวิธีของ Uribe *et al.* (2012) ตลอดจนศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้นของรังไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) ตามการบรรยายของ Blazer (2002) และ Dietrich and Krieger (2009) ในแต่ละความผิดปกติที่เกิดขึ้นในรังไข่ยังทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชุกชุม (percent prevalence)

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

มิณูวิทยาของรังไข่

ปลากดเหลืองมีรังไข่ขนาดใหญ่ 2 พู ทอดไปตามความยาวของช่องท้อง (Figure 1A) โดยที่รังไข่ถูกยึดด้วยเนื้อเยื่อมีเซนเทอรี (mesentery) ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างปลากดเหลืองทั้งหมดเป็นระยะไข่สุกมีสีส้มอ่อนและเห็นเม็ดเซลล์ไข่ได้อย่างชัดเจน เมื่อนำเนื้อเยื่อรังไข่มาด้วยย้อมสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน พบว่ารังไข่ถูกห่อหุ้มด้วยชั้นทูนิกา อัลบูจิเนีย (tunica albuginea) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (loose connective tissue) (Figures 1B, 1D) บางบริเวณของชั้นทูนิกา อัลบูจิเนีย ยังพบการแทรกตัวของหลอดเลือด (blood vessel) อีกด้วย (Figure 1D) รังไข่ของปลากดเหลืองจัดเป็นแบบ asynchronous development oocyte เนื่องจากพบการพัฒนาของเซลล์ไข่ได้หลายระยะ (Figure 1B) เช่นเดียวกับการรายงานในปลาหมากลาย *Danio rerio* (Koc *et al.*, 2008) ปลาซาร์ดีนยุโรป *Sardina pilchardus* (Nejedli *et al.*, 2004) และปลาทูน่า *Thunnus thynnus* (Abascal and Medina, 2005) ภายในโครงสร้างมิณูวิทยาของรังไข่สามารถแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ เจอมี

นออลคอมพาร์ตเมนต์ (germinal compartment) และ สโตรมอลคอมพาร์ตเมนต์ (stromal compartment) ส่วนของเจมินอลคอมพาร์ตเมนต์ สามารถพบเซลล์บุผิวเจมินอล (germinal epithelium) (Figure 1C) และการพัฒนาของโอโอโกเนีย (oogonial proliferation) ที่ถูกบรรจุภายในถุง หรือ oogonial cysts ซึ่งอยู่ร่วมกัน 4-6 เซลล์ แต่ละโอโอโกเนีย (oogonium) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ติดสีชมพูของอีโอซิน (Data not Shown)

ส่วนของสโตรมอล คอมพาร์ตเมนต์ถูกแยกจากเจมินอลคอมพาร์ตเมนต์ ด้วยชั้นเบสเมมเบรน (basement membrane) (Figure 1E) และสามารถแบ่งกระบวนการพัฒนาของเซลล์ไข่ ออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะการพัฒนาเซลล์ไข่อ่อนปฐมภูมิ (primary oocyte growth) และระยะการพัฒนาเซลล์ไข่อ่อนทุติยภูมิ (secondary oocyte growth) (Figure 1-3)

ระยะการพัฒนาเซลล์ไข่อ่อนปฐมภูมิประกอบด้วย 3 ระยะย่อย คือ

1. **ระยะนิวคลีโอลัสหนึ่งอัน (One nucleolus stage)** ในระยะนี้เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น (ประมาณ 50-60 μm) นิวเคลียสขนาดใหญ่ (ประมาณ 10-15 μm) อยู่กลางเซลล์ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึม และมีลักษณะเด่นคือ มีนิวคลีโอลัส (nucleolus) หนึ่งอัน ติดสีม่วงเข้ม (Figure 1C) และล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมที่ติดสีม่วงเข้มมากขึ้น (basophilic cytoplasm) เมื่อเทียบกับระยะโอโอโกเนีย ลักษณะของเซลล์ไข่นี้คล้ายคลึงกับการศึกษาเซลล์ไข่ในปลาตกเหลือง *Hemibagrus nemurus* (Adebisi et al., 2011) ปลาแป้นแก้ว *Parambassis siamensis* (Okutsu et al., 2011) และปลาตะเพียนทอง *Barbonymus altus* (Senarat et al., 2013) อย่างไรก็ตามชั้นฟอลลิเคิลไม่พบปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2. **ระยะเพอรินิวคลีโอลัส (Perinucleolar stage)** ในระยะนี้ขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นเล็กน้อย (ประมาณ 80-90 μm) นิวเคลียสรูปร่างกลมขนาดใหญ่ (ประมาณ 20-25 μm) ภายในมีนิวคลีโอลัสหลายขนาดเรียงแบบชิดกับผนังนิวเคลียส (Figures 1D, 1E) ไซโตพลาสซึมติดสีม่วงเข้มน้อยกว่าระยะก่อนหน้า ลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกับการศึกษาเซลล์ไข่ในปลาปลากดเหลือง *H. nemurus* (Adebisi et al., 2011) ปลาน้ำ *Tridentiger trigonocephalus* (Hwang and Baek, 2013) และปลากระดุกแข็งทั่วไป (Senarat et al., 2011; Boonyoung et al., 2016) ระยะนี้เริ่มสังเกตเห็นชั้นฟอลลิเคิล ล้อมรอบเซลล์ไข่ (Figures 1D, 1E)

3. **ระยะออยล์ดรอปเลตและคอร์ติคัลแอลวีโอล (Oil droplets and cortical alveoli stage)** เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น (ประมาณ 120 μm) กว่าระยะที่ผ่านมาอย่างเห็นได้ชัด นิวเคลียสขนาดเล็ก (ประมาณ 40-45 μm) และมีรูปร่างไม่แน่นอน ยังคงพบนิวคลีโอลัสรอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Figures 1F, 1G) เริ่มพบถุงแวคิวโอลกระจายตัวอยู่ในไซโตพลาสซึม (Figures 1F, 1G) เชื่อว่าถุงใสเหล่านี้เป็นหยดไขมันและถุงคอร์ติคัลแอลวีโอลขนาดเล็ก (Figure 1B) เนื่องจากการใช้การย้อมสีอีมาทอกซีลินและอีโอซิน และ เพอร์ไอดิคซีฟรีเจนต์ ไม่สามารถแยกได้องค์ประกอบทั้งสองชนิดได้ จากการทบทวนเอกสารตามพบว่า ความสำคัญของหยดไขมันคือ เป็นอาหารสำหรับปลาในระยะตัวอ่อน (embryo) (Wiegand, 1996) สำหรับคอร์ติคัลแอลวีโอลมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเข้ามาของสเปิร์มหลังจากการปฏิสนธิ หรือที่เรียกว่าการปฏิสนธิซ้อน (polyspermy) ภายใต้กลไกของปฏิกิริยาคอร์ติคัล (cortical reaction) (Nagahama, 1983) ระยะนี้เริ่มพบชั้นโซนารเดียตา (zona radiata) มีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ ที่มีปฏิกิริยากับฟิเอเอส (PAS reaction) อย่างชัดเจน (Figure 1G) และชั้นฟอลลิเคิล

คุณารักยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อย คือ ด้านในเป็นชั้นเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) และด้านนอกเป็นชั้นเซลล์ทีคา (theca cell) (Figure 1G) หน้าที่ของชั้นเซลล์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนเพศหรือเป็นเซลล์ที่สร้างสารสเตียรอยด์ (steroid producing cells) (Nagahama, 1983)

สำหรับระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ชั้นทุติยภูมิ สามารถแบ่งเป็น 3 ระยะย่อย คือ

1. **ระยะแรกของการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ (Early secondary growth stage)** ขนาดนิวเคลียสเล็กลง และมีรูปร่างกลม (Figure 2A) ตรงกันข้ามกับขนาดเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (ประมาณ 300-320 μm) เนื่องจากเริ่มมีการสะสมโกลบูลิน แกรนูล (yolk granule) ที่มีปฏิกริยากับฟิโอะเซซ พบในบริเวณใกล้ผนังของเซลล์ไข่ (Figure 2A) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับการรายงานในปลาเกล็ดเหลือง (Adebiyi *et al.*, 2011) และปลาชนิดอื่นๆ ได้แก่ ปลาแมคเคอเรลเซอราสแปนิช *Scomberomorus brasiliensis* (Chellappa *et al.*, 2010) และปลาตีกิลแบคสามหนาม *Gasterosteus aculeatus* (Selman and Wallace, 1989) หน้าที่ของไข่แดง คือ เป็นสารอาหารและเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของปลาในระยะตัวอ่อน นอกจากนี้ภายในไซโตพลาสซึมยังคงพบถุงแวคิวโอลกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อเข้าสู่ระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ระยะทุติยภูมิ ชั้นโซนาเรดิเอตาชั้นและพอลลิเคิลคูลาร์ขยายกว้างและปรากฏชัดเจนมากขึ้น เพื่อว่าลักษณะเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการขนส่งไข่แดงเข้าสู่เซลล์ไข่ ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเพศ (Selman and Wallace, 1989; Senarat *et al.*, 2017)

2. **ระยะท้ายของการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ (Late secondary growth stage)** เซลล์ไข่ในระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ประมาณ 600 μm) และสามารถแบ่งได้อีก 3 ระยะย่อย โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส ระยะแรกพบว่านิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ (germinal vesicle center (GVC)) และมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) (Figure 2B) ชั้นโซนาเรดิเอตาชั้นและพอลลิเคิลคูลาร์ยังคงปรากฏชัดเจน (Figures 2C, 2D) ระยะที่สองรูปร่างของนิวเคลียสเปลี่ยนรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณแอนิมัลโพล (animal pole) มักเรียกระยะนี้ว่า germinal vesicle migration (GVM) ซึ่งเป็นด้านบนของไข่ที่มีไมโครไพร (micropyle) ภายในไซโตพลาสซึมมีการสะสมโกลบูลินมากขึ้น (Figures 2E, 2F) สำหรับถุงแวคิวโอลพบได้กระจายและแทรกอยู่ระหว่างไข่แดง คล้ายคลึงกับการศึกษาในปลาเกล็ดเหลือง *Hemibagrus nemurus* (Adebiyi *et al.*, 2011) ปลากระทุง *Hemiramphus brasiliensis* และ *Hemiramphus balao* (McBride and Thurman, 2003) ระยะท้ายสุดของระยะนี้นิวเคลียสยังคงมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว แต่มีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด (Figure 2G)

3. **ระยะการเจริญเซลล์ไข่เต็มที่ (Full-grown oocyte stage)** มีขนาดใหญ่ที่สุด (ประมาณ 650 μm) และขั้นสุดท้ายของการพัฒนาของเซลล์ไข่ ไม่พบนิวเคลียส (Figures 3A, 3B) เนื่องจากการสลายของผนังนิวเคลียส (germinal vesicle breakdown (GVBD)) เป็นดัชนีหนึ่งที่บ่งบอกว่าการพัฒนาของเซลล์ไข่เสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์ระยะโปรเฟส วัน (prophase I) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เซลล์ไข่มีการเจริญเต็มที่ พร้อมจะมีการตกไข่ (ovulation) ไข่แดงและถุงคอร์ติคัลแอลวูโล ยังคงอยู่ในบริเวณขอบของเซลล์ไข่เช่นเดิม นอกจากนี้ชั้นโซนาเรดิเอตาชั้นและพอลลิเคิลคูลาร์แคบลงและแยกระหว่างสองชั้นนี้ได้ยาก (Figure 3C)

จุลกายพยาธิของรังไข่

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองฤดูมีการฝ่อของของเซลล์ไข่ (atretic follicle) ทั้งระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ขั้นปฐมภูมิ (Figure 3E) พบลักษณะการเสื่อมของชั้นไซนาเรติเคตาและชั้นฟอลลิคูลาร์ (Figure 3D) และระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ ที่แสดงการเสื่อมของชั้นไซนาเรติเคตาและชั้นฟอลลิคูลาร์ ตลอดจนการเสื่อมของโยลด์แกรนูล (Figure 4F) คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ความชุกชม (จากจำนวน = 20 ตัวอย่าง) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นระยะที่ 1 และ 2 ตามมาตรฐานการแบ่งระยะการฝ่อของเซลล์ไข่ Senarat *et al.* (2015b) ลักษณะอาการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการขาดแคลนสารอาหาร อุดหนุน และการปนเปื้อนมลพิษในสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ (Blazer, 2002; Cross and Hose, 1988; Dietrich and Krieger, 2009; Johnson *et al.*, 1988) Blazer (2002) ยังอธิบายอีกว่า การฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะขั้นปฐมภูมิมักเป็นอาการที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม สอดคล้องกับการศึกษาของ Senarat (2011) พบว่าการฝ่อของเซลล์ไข่ของปลากะมัง *Puntioplites proctozystron* ในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน เพิ่มขึ้น เมื่อตรวจพบปริมาณของอะทราซีนในเนื้อเยื่อรังไข่เพิ่มขึ้น

สรุป

โครงสร้างของรังไข่และกระบวนการพัฒนาของเซลล์ไข่ปลากดเหลืองที่สามารถแบ่งเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะการพัฒนาของโอโอโกเนีย ระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ปฐมภูมิ (ระยะนิวคลีโอลัสหนึ่งอัน ระยะเพอรินิวคลีโอลัส และระยะฮอยล์ดรอพเลทส์และคอร์ติคัลแอลวีโอไล) และระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ (ระยะแรกของการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ ระยะท้ายของการพัฒนาเซลล์ไข่ทุติยภูมิ และระยะการเจริญเต็มที่ของเซลล์ไข่) สำหรับการเกิดจุลกายพยาธิพบการฝ่อของเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ เกิดขึ้นอย่างชัดเจน ถึงแม้ว่าอาการเหล่านี้อาจไม่รุนแรง แต่หากปลากดเหลืองดำรงชีวิตยังคงอยู่ในแม่น้ำตาปี ย่อมมีปัญหาด้านสุขภาพของรังไข่โดยเฉพาะเรื่องการลดลงของจำนวนไข่ที่สมบูรณ์

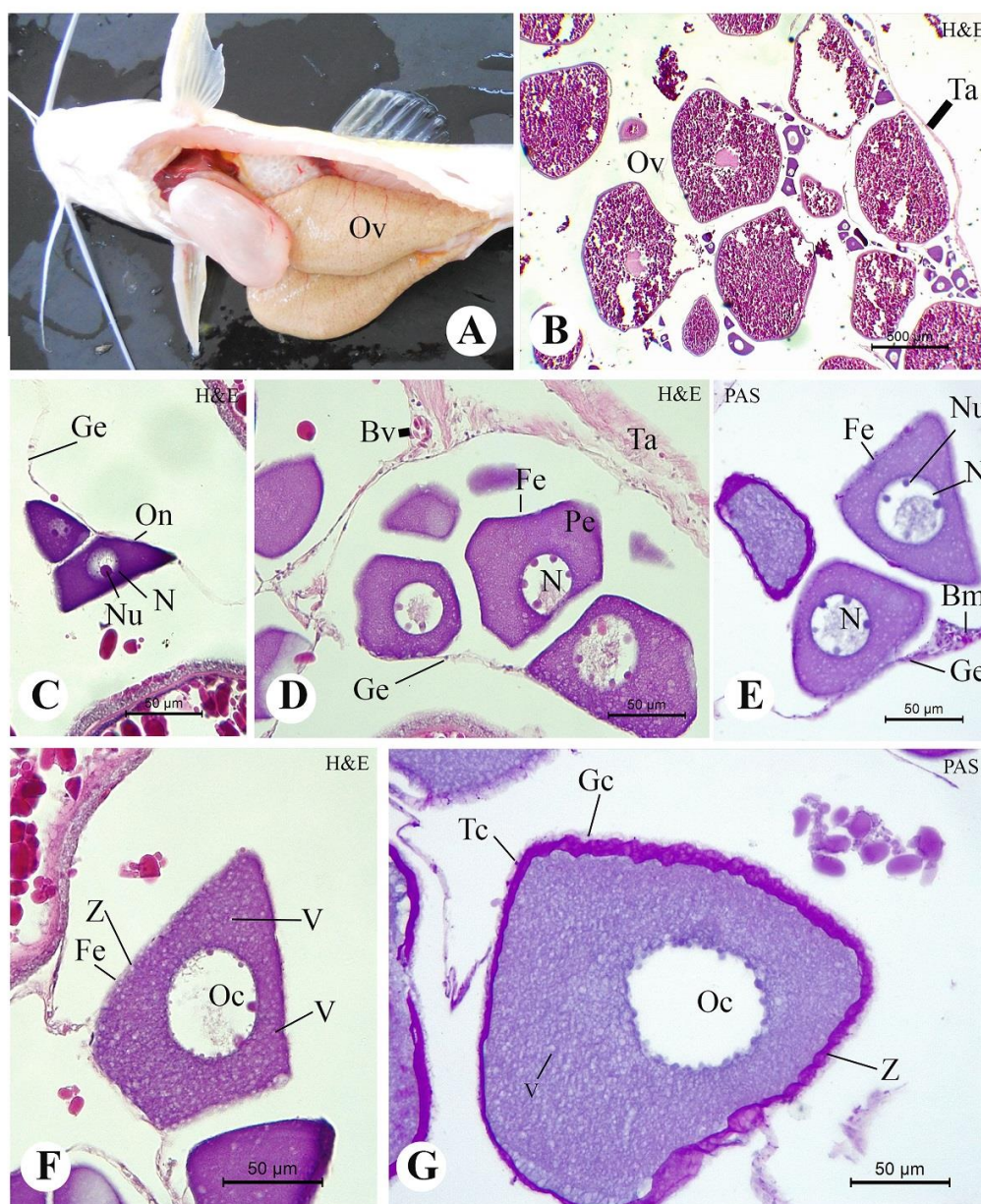


Figure 1 Morphology and light photomicrograph of the ovarian structure (Ov) and oogenesis in *Hemibagrus filamentus* (A-G) (Bv = blood vessel, Fc = follicular cell, Gc= granulosa cells, Ge = germinal epithelium, , N= Nucleus, Nu = nucleolus, , Oc = Oil droplets and cortical alveoli stages, On = One nucleolus stage Ov= Ovigerous fold, Pe= Perinucleolar stage oocytes, Ta= Tunica albuginea, Tc= Theca cells, V = vacuoles, Z= Zona radiate. (Harris's hematoxylin and eosin; H&E, Periodic shift reagent; PAS)

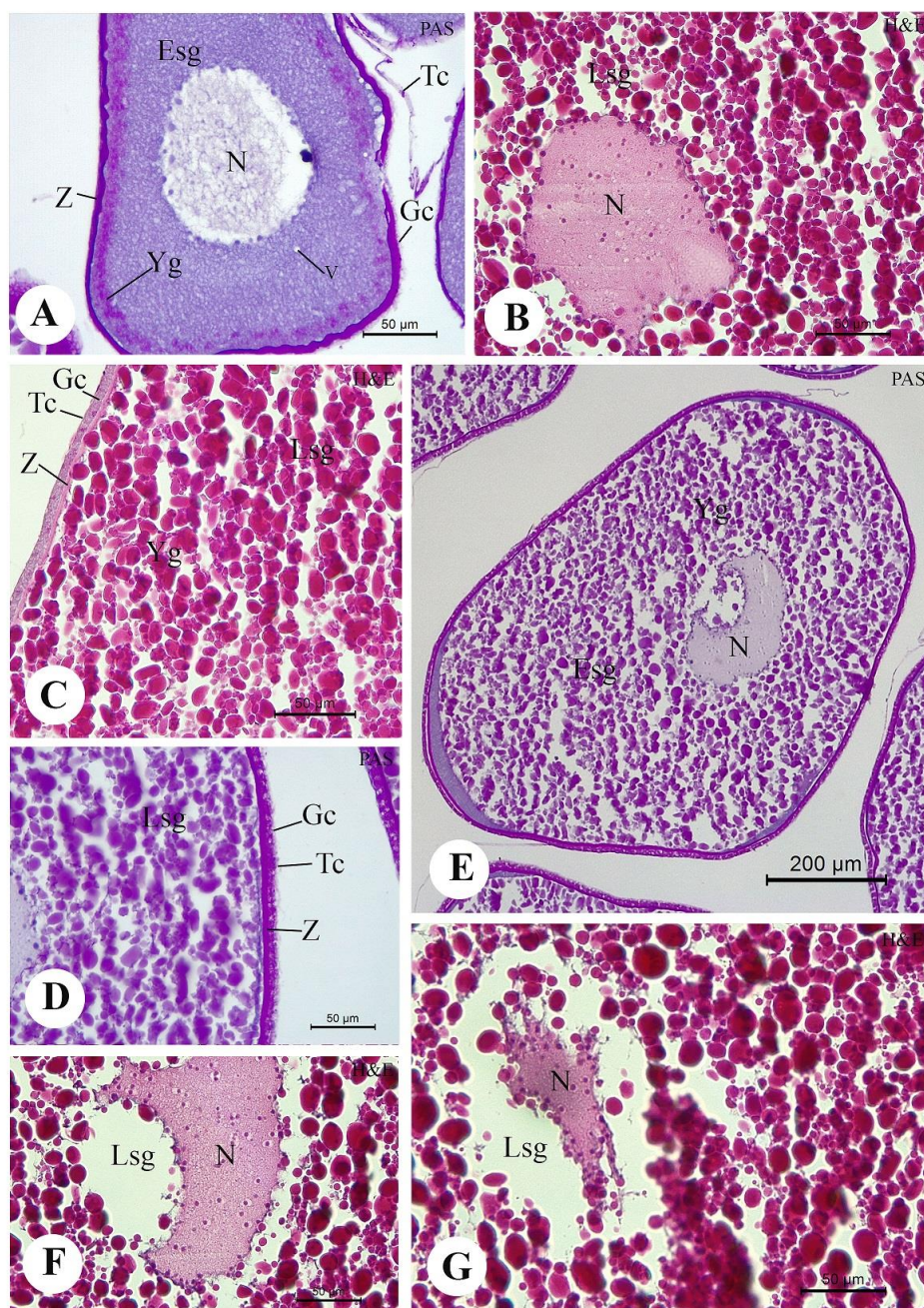


Figure 2 Light photomicrograph of the oogenesis during secondary growth oocyte in *Hemibagrus filamentus* (A-G) (Esg = early secondary growth stage, Gc= granulosa cells, Ge = germinal epithelium, N= Nucleus, Lsg = Late secondary growth stages, Tc= Theca cells, Yg= Yolk granules, V = vacuole, Z= Zona radiata. (Harris's hematoxylin and eosin; H&E, Periodic shift reagent; PAS.

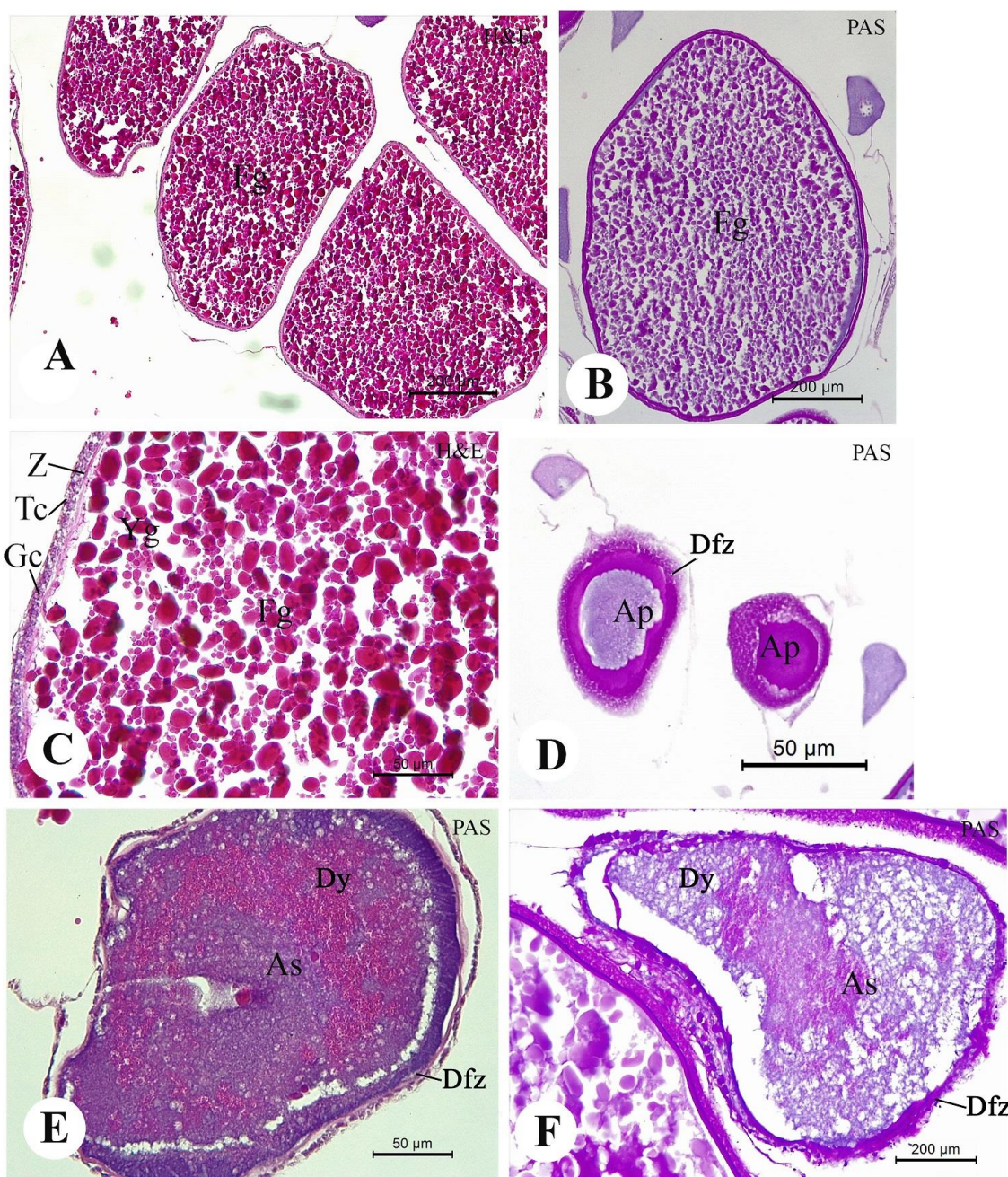


Figure 3 Light photomicrograph of oogenesis in *Hemibagrus filamentus* (A-F) (Ap = atretic follicle of primary oocyte growths, As = Atretic follicle of secondary oocyte growths, Dfz = degeneration of the follicular layer and zona radiate, Dy = degeneration of yolk granules, Fg = full-grown oocyte stages, Gc= granulosa cell, Tc= Theca cell, Yg= Yolk granule, Z= Zona radiate. (Harris's hematoxylin and eosin; H&E, Periodic shift reagent; PAS)

เอกสารอ้างอิง

- Abascal, F. and Medina, A. 2005. Ultrastructure of oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. J. Morpho. 264: 149-160.
- Adebiyi, F..A., Siraj, S.S., Harmin, S.A. and Christianus, A. 2011. Ovarian development of a river catfish *Hemibagrus nemurus* (Valenciennes, 1840) in captivity. J. Exp. Zool. 315: 536–543.
- Barnhoorn, I.E.J., Bornman, M.S., Pieterse, G.M. and Van Vuren, J.H.J. 2004. Histological evidence of intersex in feral sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) from an estrogen-polluted water source in Gauteng, South Africa. Environ. Toxicol. 19: 603-608.
- Bancroft, J. D. and Gamble, M. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. London: Churchill Livingstone.
- Blazer, V.S. 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiol. Biochem. 26: 85-101.
- Boonyoung, P., Senarat, S., Kettratad, J., Poolprasert, P., Yenchum, W. and Angsirijinda, W. 2016. Histological organization of the female queen *Devario regina* (Fowler, 1934) during its juvenile stage. Songklanakarin J. Sci.Technol. 38: 67-72.
- Chellappa, S., Lima, J.T.A.X., Araújo, A. and Chellappa, N.T. 2010. Ovarian development and spawning of Serra Spanish mackerel in coastal waters of Northeastern Brazil. Braz. J.of Biol. 70: 451-456.
- Cross, J.N. and Hose, J.E. 1988. Evidence for impaired reproduction in white croaker *Genyonemus lineatus* from contaminated areas of southern California. Mar. Environ. Res. 24: 185-188.
- Dietrich, D.R. and Krieger, H.O. 2009. Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Feist, S.W., Stentiford, G.D., Kent, M.L., Santos, A.R. and Lorange, P. 2015. Histopathological assessment of liver and gonad pathology in continental slope fish from the northeast Atlantic Ocean. Mar. Environ. Res. 106: 42-50.
- Hwang, I.J. and Baek, H.J. 2013. Reproductive cycle of chameleon goby, *Tridentiger trigonocephalus* in the Southern Coastal Waters of Korea. Dev. Reprod. 17: 353-361.
- Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., Guy, C.P., Pinkney, A., Mullican, J. and Alvarez, D. A. 2009. Reproductive health of bass in the potomac drainage: 1) Biological effects of wastewater treatment plant effluent. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1072-1083.
- Johnson, L.L., Casillas, E., Collier, T.K., McCain, B.B. and Varanasi, U. 1988. Contaminant effects on ovarian development in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 2133-2146.

- Koc, N.D., Aytekin, Y. and Yuce, R. 2008. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the zebrafish (*Danio rerio*). Braz. Arch. Biol. Technol. 51: 513-522.
- Mayer, I., Shackley, S.E. and Ryland, J.S. 1986. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. A histological and histochemical study of oocyte development. J. Fish Biol. 33: 609-622.
- McBride, R.S. and Thurman, P.E. 2003. Reproductive biology of *Hemiramphus brasiliensis* and *H. balao* (Hemiramphidae): Maturation, spawning frequency and fecundity. Biol. Bull. 204: 57-67.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Fish Physiology. 9Ath ed., edited by Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M.. New York & Academic Press.
- Nejedli, S., Petrinc, Z., Kuzir, S. and Srebocan, E. 2004. Annual oscillation of ovarian morphology in European pilchard (*Sardina pilchardus*, Walbaum) in the Northern Adriatic Sea. Vet Arhiv 74:97-106.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2009. OECD guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads. [Online] Available from <http://www.oecd.org/dataoecd/33/27/42140701.pdf> [2017, April 23].
- Okutsu, T., Morioka, S., Shinji, J. and Chanthasone, P. 2011. Growth and reproduction of the glassperch *Parambassis siamensis* (Teleostei: Ambassidae) in Central Laos. Ichthyol. Explor. Freshw. 22: 97-106.
- Selman, K. and Wallace, R.A. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleost. Zool. Sci. 6: 211-231.
- Senarat, S. 2011. Correlation between herbicide contamination and effects on reproductive system of cyprinid fish, *Puntius proctozysron* in Nan River, Wiang Sa Dist, Nan Province. M.Sc. Thesis in Zoology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
- Senarat, S., Kitana, N., Varanusupakul, P. and Kitana, J. 2011. A histological study of the gonads of Smith's barb *Puntius proctozysron* (Teleostei: Cyprinidae). Proceeding of the 37th Congress on Science and Technology of Thailand, October 10-12, 2011.
- Senarat, S., Poolprasert, P. and Yenchum, W. 2013. Histological changes of gonadal tissues in Red-tailed Tinfoil, *Barbonymus altus* from Tapee River, Nakhon Sri Thammarat Province Sci & Tech of Ubonratchathane University. 15: 10-20. [in Thai]
- Senarat, S., Kettratad, J., Poolprasert, P., Jiraungkoorskul, W. and Yenchum, W. 2015a. Histopathological findings of liver and kidney tissues of the yellow mystus, *Hemibagrus filamentus* (Fang and Chaux, 1949), from the Tapee River, Thailand. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 37: 1-5.

- Senarat, S., Kettretad, J. and Jiraungkoorskul, W. 2015b. Classification stages of novel atretic structure in short mackerel *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) from the Upper Gulf of Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 37: 569-573.
- Senarat, S., Kettretad, J. and Jiraungkoorskul, W. 2017. Ultrastructure of oogenesis in oceanodromous, *Rastrelliger brachysoma*, from the Upper Gulf of Thailand, as new candidate species for aquaculture. J. Morphol. Sci. 34: 23-30
- Spanò, L., Tyler, C.R, van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N., Silvestre, F., Thomé, J.P. and Kestemont, P. 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). Aquat. Toxicol. 66: 369-379.
- Tillitt, D.E., Papoulias, D.M., Whyte, J.J. and Richter, C.A. 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 99: 149-159.
- Uribe, M.C., Grier, H.J. and Parenti, L.R. (2012) Ovarian Structure and Oogenesis of the oviparous Goodeids *Crenichthys baileyi* (Gilbert, 1893) and *Empetrichthys latos* Miller, 1948 (Teleostei, Cyprinodontiformes). J. Morphol. 273: 371-387.
- Wiegand, M.D. 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. Rev. Fish Biol. Fish. 6: 259-286.
- Wilson, J.M., Bunte, R.M. and Carty, A.J. 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 48: 785-789.

**พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาชิวทอง *Rasbora einthovenii* บริเวณป่าพรุสิรินธร
จังหวัดนราธิวาส**

**Cytogenetic Characterization of *Rasbora einthovenii* in Sirindhorn Peat Swamp
Forest, Narathiwat Province**

นุรฮีน ยีแสม¹ สิทธิศักดิ์ จันทรรัตน์^{1*} พัน ยีสิน²

Nur-eeen Yeesaem¹, Sitthisak Jantarat^{1*} Pun Yeesin²

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จังหวัดปัตตานี 94000

²ภาควิชาเทคโนโลยีและอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี 94000

¹Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus,
Muang, Pattani, 94000

²Department of Technology and Industry, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University,
Pattani Campus, Muang, Pattani, 94000

*Corresponding author: sitthisak.j@psu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาชิวทอง จากบริเวณป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส โดยการเตรียมโครโมโซมจากไต ย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาโดยใช้สีจีมาซ่า และแบบนอร์ ผลการศึกษาพบว่า ปลาชิวทองมีโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 100 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง และอะโครเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง จากการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบนอร์ พบตำแหน่งของนอร์ (NOR) จำนวน 1 คู่ บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่คู่ที่ 4 ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านเซลล์อนุกรมวิธาน และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาต่อไปได้ สูตรแคริโอไทป์ของปลาชิวทอง คือ $2n (50) = L^m_8 + L^{sm}_{10} + L^a_4 + M^m_8 + M^{sm}_8 + M^a_{12}$

คำสำคัญ: โครโมโซม แคริโอไทป์ ปลาชิวทอง

Abstract

Cytogenetic analysis of *Rasbora einthovenii* in Sirindhorn Peat Swamp Forest, Narathiwat Province was studied. Chromosomes were prepared from kidney cells. The staining techniques were Giemsa's staining and NOR banding. The results in this study showed that diploid chromosome number of *R. einthovenii* was $2n=50$, fundamental numbers (NF) was 100 in both male and female. The karyotype is comprised of 8 large metacentrics, 10 large submetacentrics, 4 large acrocentrics, 8 medium metacentrics, 8 medium submetacentrics and 12 medium acrocentrics chromosomes. NOR banding techniques demonstrated that there was 1 pair of NOR exists on the

short arm of the large metacentric chromosome pairs 4. These cytogenetic data could be used for further studies of cytotaxonomy and evolutionary relationship of fishes. The karyotype formula of *R. einthovenii* was as follows: $2n(50) = L^m_8 + L^{sm}_{10} + L^a_4 + M^m_8 + M^{sm}_8 + M^a_{12}$

Keywords: Chromosome, Karyotype, *Rasbora einthovenii*

คำนำ

ปลาซิวทอง (*Rasbora einthovenii* ; *R. einthovenii*) จัดอยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Cryprinidae) ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดในปลาน้ำจืด และอยู่ในสกุล *Rasbora* เป็นปลาน้ำจืดที่พบชุกชุมและรู้จักกันทั่วไป มีความสำคัญในแง่เป็นอาหารของคนในชนบท และมีคุณค่าสำคัญในแง่ห่วงโซ่อาหารตามธรรมชาติ (Ukkatawewat, 2004) ปลาซิวทองเป็นปลาที่มีขนาดเล็ก ลักษณะลำตัวเรียวยาวทรงกระบอกและแบนข้างเล็กน้อย ลำตัวสีส้มอมทอง มีแถบสีดำพาดยาวจากปากไปถึงขอบครีบทหาง (Figure 1) (Vidthayanon, 2004) จัดเป็นปลาซิวที่มีความสวยงามมากชนิดหนึ่งของไทย มีถิ่นอาศัยอยู่ที่ป่าพรุสิรินธร

ป่าพรุสิรินธรหรือป่าพรุโต๊ะแดง เป็นป่าพรุที่อุดมสมบูรณ์มากที่สุดในประเทศไทย เป็นแหล่งพันธุกรรมของปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ (Vidthayanon, 1997) ปลาหลายชนิดเป็นปลาเฉพาะถิ่นที่พบได้เฉพาะที่ป่าพรุสิรินธรเท่านั้น รวมถึงปลาซิวทอง การเกิดไฟไหม้ป่าและกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในป่าพรุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ สูญหายไปอย่างรวดเร็วและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Posa et al., 2011; Dudgeon, 2005) สำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาซิวสกุล *Rasbora* ในต่างประเทศมีการศึกษาในปลาซิวหางกรไกร (*Rasbora trilineata*) ปลาซิวข้างขวานใหญ่ (*R. heteromorpha*) (Post, 1965) ปลาซิวควายพม่า (*R. daniconius*) (Khuda-Bukhsh, 1979) และปลาซิว (*R. buechanani*) (Manna and Khuda-Bukhsh, 1977) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม $2n=48, 50$ และ 50 ตามลำดับ ส่วนในประเทศไทยมีรายงานในปลาซิวควายสุมาตรา (*R. sumatrana*) (Donsakul and Magtoon, 1995) ปลาซิวหางดอก (*R. caudimaculata*) ปลาซิว (*R. myersi*) ปลาซิวควาย (*R. retrodorsalis*) ปลาซิวควายแถบดำ (*R. paviei*) (Donsakul and Magtoon, 2002) ปลาซิวควาย (Seetapan and Moeikum, 2004) ปลาซิวควายพม่า ปลาซิวหางแดง (*R. borapetensis*) ปลาซิวหางกรไกร ปลาซิวทอง (*R. einthovenii*) ปลาซิวข้างขวานใหญ่ (Donsakul et al., 2005) ปลาซิวผอม (*R. agilis*) ปลาซิวหลังจุด (*R. dorsicellata*) และปลาซิวหลังแดง (*R. rubrodorsalis*) (Donsakul et al., 2009) ซึ่งพบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n=50$ เท่ากันทุกชนิด แต่พบว่าแคโรไไโทป์แตกต่างกัน

เนื่องจากปลาซิวมีทั้งหมดหลายชนิด บางชนิดมีลักษณะภายนอกที่มีความคล้ายคลึงกันมาก การใช้ลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวอาจทำให้มีอุปสรรคในการจัดจำแนก ปัจจุบันได้มีการนำวิธีการทางเซลล์อนุกรมวิธาน (Cytotaxonomy) โดยใช้ความรู้เกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเซลล์มาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกชนิดปลา (Esmaeili et al., 2008) การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาลักษณะของโครโมโซม และตรวจสอบเครื่องหมายโครโมโซม (Chromosome marker) ด้วยวิธีการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา และแบนนอร์เพื่อดูตำแหน่ง

ยีนที่สร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานและการประยุกต์ใช้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำตัวอย่างปลาชีวทอง บริเวณป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส จำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว) มาเตรียมโครโมโซมโดยการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือการเตรียมโครโมโซม การย้อมสีโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซม และการจัดทำแคโรไทป์และอิดิโอแกรม โดยมีขั้นตอนการดำเนินการวิจัยดังนี้

1. การเตรียมโครโมโซม

ชั่งน้ำหนักปลา จากนั้นจึงฉีดโคลชิซิน (Colchicine) ความเข้มข้น 0.05% เข้าบริเวณช่องท้องของปลา (ปริมาณของโคลชิซิน 1 มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักตัวปลา) วิธีดำเนินการวิจัยดัดแปลงจากวิธีของ Campiranon (2003) และ Chen and Ebeling (1968) แล้วทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำปลามาทำให้สลบด้วยน้ำแข็ง และผ่าตัดเอาไตมาแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ (M) ทำการสับให้ละเอียด แล้วย้ายลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิกรัม บ่มทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,250 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 8 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป แล้วเติมน้ำยาคงสภาพ (Canoy's fixative) ที่ละน้อยจนครบ 7 มิลลิกรัม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิม อีก 3-4 ครั้ง จนได้ตะกอนขาวที่ก้นหลอด หยดเซลล์ลงบนสไลด์ที่แห้ง และสะอาดจากนั้นฝังสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง



Figure 1 General characteristics of *Brilliant rasbora* (*R. einthovenii*), scale bar indicates 1 cm.

2. การย้อมสีโครโมโซม

1) การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา โดยนำสไลด์มาแช่ในสีจิมซ่าความเข้มข้น 20% ที่เตรียมจาก stock Giemsa's solution ใน Sorensen's buffer เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ฝังสไลด์ให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2) การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบบอร์ ดัดแปลงจากวิธีการของ Howell and Black (1980) โดยนำสไลด์มาหยดเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 2 ลงบนสไลด์ 2 หยด แล้วหยดซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 50 (50% AgNO_3) ลงบนสไลด์ 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10

นาที่ หรือจนกว่าสไลด์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ล้างซิลเวอร์ในเตรทส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา ผึ่งสไลด์ให้เกือบแห้ง นำไปตรวจสอบโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. การตรวจสอบโครโมโซม

นำสไลด์ที่ย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบบอร์ มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ตรวจสอบเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีความชัดเจน การกระจายของเซลล์ที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมให้ครบ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยาย 100X โดยที่ภาพมีกำลังขยาย 1,000 เท่า

4. การจัดทำแคโรไทป์ และอิดิโอแกรม

เลือกโครโมโซมจากระยะเมทาเฟส 10 เซลล์ วัดความยาวโครโมโซมแขนรวม (LT, $LT = Ls + Li$) คำนวณค่าความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซม (RL) คำนวณค่า centromeric index (CI) จำแนกขนาดของโครโมโซมโดยให้สัญลักษณ์ L, M และ S แสดงถึงโครโมโซมขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ตามลำดับ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ RL และ CI โดยในการจัดทำแคโรไทป์ อิดิโอแกรมและการเขียนสูตรแคโรไทป์ดัดแปลงจากวิธีการของ Turpin and Lejeune (1965)

ผลการวิจัย

ปลาชิวทองมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 100 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย แคโรไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เมทาเซนตริกขนาดกลาง 8 แท่ง ซับเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง ซับเมทาเซนตริกขนาดกลาง 8 แท่ง อะโครเซนตริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง และอะโครเซนตริกขนาดกลาง 12 แท่ง (Figure 2, Table 1) จากการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบบอร์พบว่าปลาชิวทองมีตำแหน่งของนอร์ (NOR) จำนวน 1 คู่ อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริกขนาดใหญ่คู่ที่ 4 (Figure 3) และแสดงอิดิโอแกรมของปลาชิวทองจากการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา และแบบบอร์ (Figure 4) ปลาชิวทองมีสูตรแคโรไทป์ดังนี้

$$2n (50) = L_8^m + L_{10}^{sm} + L_4^a + M_8^m + M_8^{sm} + M_{12}^a$$

Table 1 Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (LI), length of total arm chromosome (LT), relative length (RL), centromeric index (CI), standard deviation (SD) of RL, CI Size and chromosomes type from means of 10 metaphase chromosomes of *R. einthovenii* ; $2n$ (diploid) = 50

Chromosome pair	Ls	LI	Lt	CI±SD	RL±SD	Chromosome size	Chromosome Type
1	1.22	1.46	2.68	0.547±0.056	0.025±0.003	Large	Metacentric
2	1.13	1.33	2.46	0.538±0.061	0.023±0.003	Large	Metacentric
3	1.08	1.28	2.36	0.542±0.056	0.022±0.003	Large	Metacentric
*4	1.04	1.25	2.29	0.546±0.040	0.021±0.002	Large	Metacentric
5	0.98	1.21	2.19	0.553±0.047	0.020±0.003	Medium	Metacentric
6	0.94	1.17	2.11	0.556±0.039	0.019±0.002	Medium	Metacentric
7	0.86	1.07	1.93	0.549±0.048	0.018±0.003	Medium	Metacentric
8	0.76	0.93	1.70	0.548±0.046	0.015±0.003	Medium	Metacentric
9	0.99	1.83	2.83	0.648±0.034	0.026±0.003	Large	Submetacentric
10	0.92	1.74	2.66	0.652±0.048	0.024±0.003	Large	Submetacentric
11	0.91	1.62	2.53	0.639±0.036	0.023±0.002	Large	Submetacentric
12	0.88	1.53	2.40	0.634±0.034	0.022±0.002	Large	Submetacentric
13	0.83	1.48	2.31	0.638±0.046	0.021±0.002	Large	Submetacentric
14	0.81	1.41	2.22	0.638±0.039	0.020±0.002	Medium	Submetacentric
15	0.80	1.34	2.14	0.627±0.038	0.020±0.002	Medium	Submetacentric
16	0.74	1.31	2.05	0.638±0.042	0.019±0.002	Medium	Submetacentric
17	0.70	1.20	1.90	0.632±0.041	0.017±0.003	Medium	Submetacentric
18	0.64	1.83	2.47	0.737±0.036	0.022±0.002	Large	Acrocentric
19	0.58	1.65	2.24	0.740±0.051	0.020±0.001	Large	Acrocentric
20	0.56	1.57	2.13	0.739±0.044	0.019±0.002	Medium	Acrocentric
21	0.52	1.50	2.02	0.743±0.053	0.018±0.002	Medium	Acrocentric
22	0.52	1.41	1.94	0.728±0.052	0.018±0.003	Medium	Acrocentric
23	0.51	1.35	1.86	0.725±0.038	0.017±0.002	Medium	Acrocentric
24	0.46	1.31	1.77	0.737±0.045	0.016±0.002	Medium	Acrocentric
25	0.45	1.19	1.64	0.729±0.055	0.015±0.001	Medium	Acrocentric

* NORs bearing chromosomes.

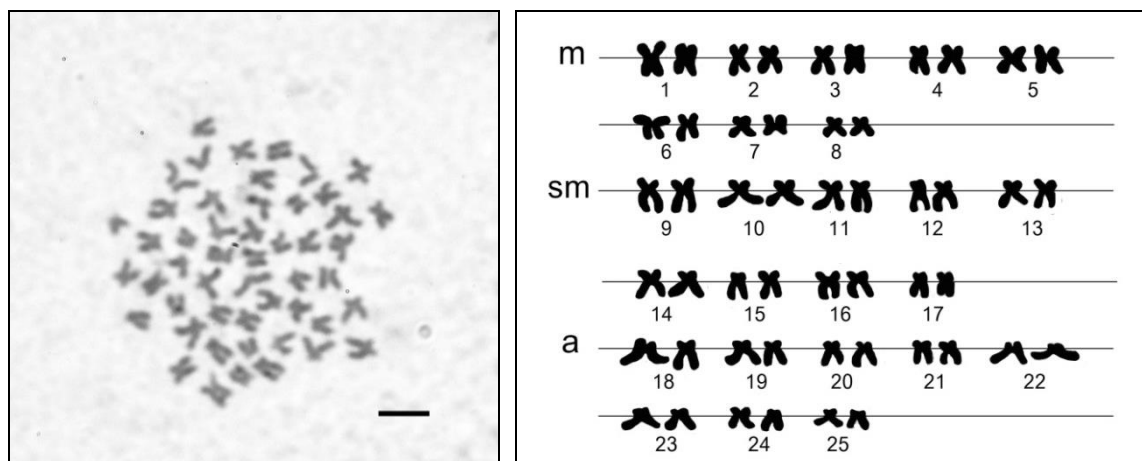


Figure 2 Metaphase chromosome plates (left) and karyotype (right) of *R. einthovenii* $2n=50$ by conventional staining technique (Scale bars = 5 μ m).

สรุปผลและวิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาค้นคว้าพบว่าปลาชิวทอง (*R. einthovenii*) มีจำนวนโครโมโซม $2n=50$ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาในปลาชิวสกุล *Rasbora* (Table 2) ยกเว้นจากรายงานการศึกษาของ Post (1965) ในปลาชิวหางกรรไกร (*R. trilineata*) และปลาชิวข้างขวานใหญ่ (*R. heteromorpha*) ที่รายงานว่ามีความจำนวนโครโมโซม $2n=48$ จำนวนโครโมโซมพื้นฐานของปลาชิวทองเท่ากับ 100 สอดคล้องกับปลาชิวผอม (*R. agillius*) (Donsakul *et al.*, 2009) แต่แตกต่างจากปลาชิวทองตามรายงานของ Donsakul *et al.* (2005) ที่รายงานจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 86 อีกทั้งจากการศึกษานี้พบว่าปลาชิวทองมีแคโรไทป์ประกอบด้วย $16m+18sm+16a$ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาในปลาชิวทอง (Donsakul *et al.*, 2005) และปลาชิวอื่นๆ ในสกุล *Rasbora* พบว่ารูปแบบแคโรไทป์มีความแตกต่างกัน (Table 2) ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากปลาที่นำมาศึกษาต่างกลุ่มประชากรกัน รวมถึงเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดโครโมโซมแตกต่างกัน อย่างที่มีการศึกษาในปลาสกุลอื่นๆ ในวงศ์ Cyprinidae เช่น การศึกษาแคโรไทป์ของปลาชิวไบไฟ (*Danio aequipinnatus*) จากแม่น้ำ Assam, Lockchau และ Gadana ในประเทศอินเดีย พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ($2n=50$) แต่มีแคโรไทป์ต่างกันคือ $14m+32sm+4a$ (Khuda-Bukhsh *et al.*, 1986), $8m+42sm$, $6m+34sm+6st+4t$ (Sukham *et al.*, 2013) และ $14m+11sm+15st+10t$ (Shanthipreya *et al.*, 2015) ส่วนในประเทศไทยมีการศึกษาแคโรไทป์ในปลาชิวไบไฟเช่นกัน พบว่าแคโรไทป์ประกอบด้วย $8m+28sm+10st+4t$ (Magtoon and Arai, 1994) และ $8m+42sm$ (Seetapan and Moeikum, 2004) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของรูปแบบแคโรไทป์ แต่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันในปลาชนิดเดียวกันที่มีรายงานในประเทศไทยอีก เช่น ปลาตะเพียนทราย (*Puntius brevis*) ซึ่งมีแคโรไทป์คือ $2m+2sm+44st+2t$ (Piyapong, 1999), $2m+2sm+44st+2t$ (Donsakul and Magtoon, 2008) และ $4m+4sm+4st+38t$ (Nitikulwopawong and Khruenat, 2014) จากการเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมที่มีการศึกษามาแล้วในสกุลเดียวกันพบว่าปลาบางชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน แต่มีรูปแบบโครโมโซมที่ต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากการวิวัฒนาการของปลา เช่น เกิดการต่อสลับแบบใช้เซนโทรเมียร์ร่วมกัน (Pericentric inversion) เป็นต้น ทำ

ให้รูปแบบโครโมโซมแตกต่างกัน และเกิดจากสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย ซึ่งอาจเกิดความแปรผันของจำนวนโครโมโซมได้ (Tanomtong, 2010)

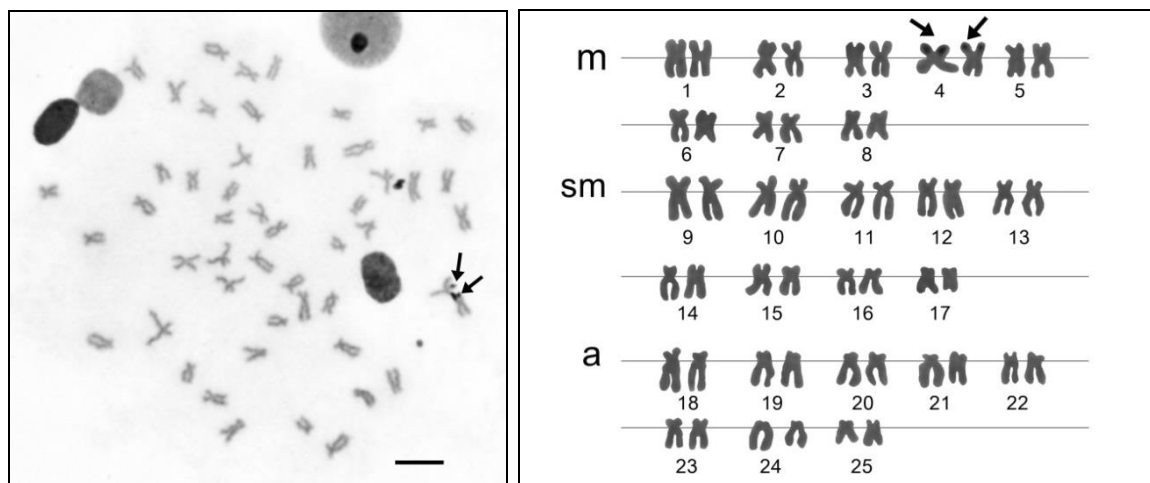


Figure 3 Metaphase chromosome plates (left) and karyotype (right) of *R. einthovenii* $2n=50$ by NOR banding technique (Scale bars = 5 μm). The showed clearly observable nucleolar organizer regions/NORs (arrows).

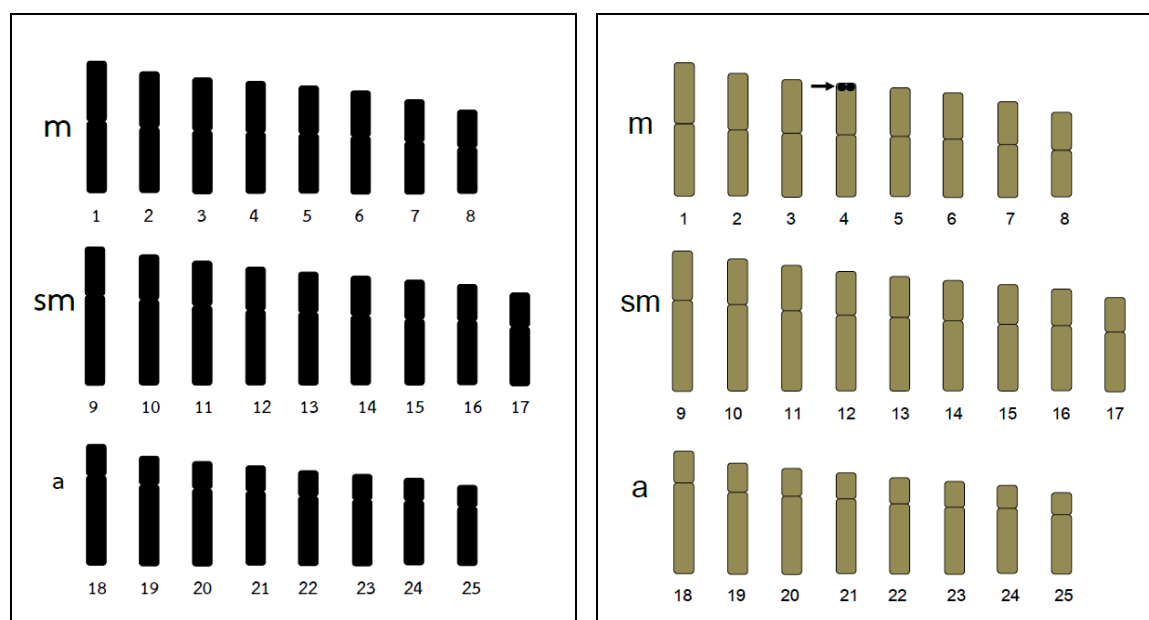


Figure 4 Idiograms showing length and shape of chromosome of *R. einthovenii* demonstrated the haploid set ($n=25$) by conventional staining (left) and Ag-NORs staining techniques (right). Arrow indicates NORs location.

เมื่อย้อมแถบสีโครโมโซมแบบนอร์โมไลโซโซมเพื่อหาตำแหน่งของ nucleolar organizer regions (NORs) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ พบตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 4 ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานการศึกษาแรกที่พบตำแหน่งนอร์

ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ที่ได้นี้ถือเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญ สำหรับการประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานประกอบการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต และเชื่อมโยงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการกับปลาชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เพื่อช่วยอนุรักษ์และขยายพันธุ์ รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้าต่อไป

Table 2 Cytogenetic publications of the genus *Rasbora*

Species	2n	NF	Karyotype formula	References
<i>Rasbora trilineata</i>	48	-	-	Post (1965)
<i>R. trilineata</i>	50	92	26m+16sm+2st+6t	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>R. heteromorpha</i>	48	-	-	Post (1965)
<i>R. heteromorpha</i>	50	74	14m+10sm+2st+22t	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>R. sumatrana</i>	50	92	26m+16sm+2st+6a	Donsakul and Magtoon (1995)
<i>R. buechanani</i>	50	-	30+m+18sm+2st	Manna and Khuda-Bukhs (1977)
<i>R. daniconius</i>	50	-	18m+6sm+6st+20t	Khuda-Bukhs <i>et al.</i> (1979)
<i>R. daniconius</i>	50	90	16m+4sm+1st+4t	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>R. caudimaculata</i>	50	-	20m+26sm+5st+2a	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>R. myersi</i>	50	-	20m+14sm+6st+10a	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>R. paviei</i>	50	-	10m+24sm+16st	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>R. retrodorsalis</i>	50	-	26m+10sm+2st+12a	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>R. aurotaenia</i>	50	-	14m+26sm+2st+8a	Seetapan and Moeikum (2004)
<i>R. borapetensis</i>	50	88	24m+14sm+12t	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>R. agilis</i>	50	100	24m+26sm	Donsakul <i>et al.</i> (2009)
<i>R. dorsicellata</i>	50	92	18m+24sm+8t	Donsakul <i>et al.</i> (2009)
<i>R. rubrodorsalis</i>	50	82	16m+16sm+18t	Donsakul <i>et al.</i> (2009)
<i>R. einthovenii</i>	50	86	6m+30sm+8st+6t	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>R. einthovenii</i>	50	100	16m+18sm+16a	This study

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาในระดับปริญญาโท กองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี และทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป (SAT6203002S) กองทุนวิจัยวิทยาเขตปัตตานี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ที่สนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Campiranon, A. 2003. Cytogenetics. Kasetsart University Press. Bangkok. 277 pp. [in Thai]
- Chaiyasut, K. 1989. Cytogenetics and cytotaxonomy of the genus *Zephyranthes*. Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Bangkok. 260 pp. [in Thai]
- Chen, T.R. and Ebeling, A.W. 1968. Karyological evidence of female heterogamety in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. 1(1): 70-75.
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 1995. Karyotypes of four Cyprinid fishes, *Osteochilus melanopleura*, *Puntius proctozysron*, *Paralaubuca riveroi* and *Rasbora sumatrana* from Thailand. In: 33rd Conference of Kasetsart University. Fisheries. 128-138. [in Thai]
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 2002. Karyotype of *Rasbora Caudimaculata*, *R. myersi*, *R. retrodorsalis*, *R. paviei* from Thailand. Academic conference seminar for research papers of Srinakharinwirot University. Bangkok. 1-7. [in Thai]
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 2008 Karyotypes of Seven Cyprinid Fishes: *Systemus binotatus*, *Puntius brevis*, *Poropuntius laoensis*, *Labiobarbus siamensis*, *Catlocarpio siamensis*, *Tor tambroides* and *Probarbus jullieni* from Thailand. Srinakharinwirot Science Journal. 24(2): 80-89. [in Thai]
- Donsakul, T. Magtoon, W. and Rangsiruji, W. 2005. Karyotype of five species of fish (Pla siew) in subfamily Rasboranae. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima Province Thailand.
- Donsakul, T., Rangsiruji, A. and Magtoon, W. 2009. Karyotypes of five cyprinid fishes (Cyprinidae, Danioninae-Danionini): *Rasbora agilis*, *R. dorsiocellata*, *R. rubrodorsalis*, *Boraras maculata* and *B. urophthalmoides* from Thailand. In Proceedings of the 47th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart. Bangkok, Thailand. 320-327.
- Dudgeon, D. 2005. River Rehabilitation for Conservation of Fish Biodiversity in Monsoonal Asia. Ecology and Society. 10(2): 15.
- Esmaeili, H. R. , Ebrahimi, M. and Saifali, M. 2008. Karyological analysis of five tooth-carps (Actinopterygii: Cyprinodontidae) from Iran. Micron. 39: 95-100.

- Howell, W.M. and Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 36(8): 1014-1015.
- Khuda-Bukhsh, A.R. 1979. Karyology of two species of hillstream fishes, *Barilius bendelisis* and *Rasbora daniconius* (Fam. Cyprinidae). *Current Sci.* 48(17): 793-794.
- Khuda-Bukhsh, A.R., Chanda, T. and Barat, A. 1986. Karyomorphology and evolution in some Indian hillstream fishes with particular reference to polyploidy in some species. In: *Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes* (Eds., T. Uyeno, A. Ryoichi, T. Taniuchi and K. Matsuura), Ichthyological Society of Japan. Tokyo. 886–898.
- Magtoon, W. and Arai, R. 1994. Karyotypes of five *Rasbora* species and one *Danio* species (Cyprinidae) from Thailand. In: *Proceedings of the Fourth Indo-Pacific Fish Conference* (Eds., T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura). Bangkok, Thailand. 484–496 pp.
- Manna, G.K. and Khuda-Bukhsh, A.R. 1977. Karyomorphology of cyprinid fishes and cytological evaluation of the family. *Nucleus*. 20: 119-127.
- Nitikulwopawong, N. and Khrueanet, V. 2014. Karyotypic of Golden Little Barb, *Puntius brevis* Bleeker, 1850 (Pisces: Cyprinidae) from Khon Kaen Province. *Khon Kean University Journal of Science*. 42(1): 106-118. [in Thai]
- Piyapong. J. 1999. Karyotypes and distribution of nucleolus organizer regions in four cyprinid species from Thailand. Thesis (MSc) Chulalongkorn University Bangkok. 85. [in Thai]
- Posa, M.R.C., Wijedasa, L.S. and Corlett, R.T. 2011. Biodiversity and conservation of tropical peat swamp forests. *BioScience*. 61(1): 49-57.
- Post, A. 1965. Vergleichende Untersuchungen der chromosomenzahlen bei Susswasser-Teleosteen. In: *Gyldenholm, A.O. and Scheel, J.J. Chromosome number of fishes I. Journal of Fish Biology*. 3: 47-93.
- Seetapan, K. and Moeikum, T. 2004. Karyotypes of ten Cyprinid fishes (Family Cyprinidae). *Journal of Agricultural Research and Extension*. 22(Special Issue): 92-101. [in Thai]
- Shanthipreya, N., Arunachalam, M., Sukumaran, P., Sivakumar, P. and Esakkiammal, B. 2016. Karyotypic analysis of *Devario aequipinnatus* (McClelland, 1839) from Gadana River south India with NOR banding and C-banding. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 18(1): 185-188.
- Sukham, S., Chingakhom, B., Thoidingjam, L. and Waikhom, G. 2013. Cytogenetic characterization of *Devario aequipinnatus* (McClelland, 1839) and *Devario yuensis* (Arunkumar and Tombi, 1998) (Cypriniformes: Cyprinidae) from Manipur, northeast India. *Turkish Journal of Zoology*. 37(6): 706-712.

- Tanomtong, A. 2011. Cytogenetics. Khon Kaen University Press. Khon Kaen. 387 pp. [in Thai]
- Turpin, R. and Lejeune, J. 1965. Les Chromosomes humains. Cornell University: Gauthier-Villars.
- Uk-katawewat, S. 2004. Knowledge of Thai Freshwater Fishes. Kurusapa Printing Ladphrao. Bangkok. 64 pp. [in Thai]
- Vidthayanon, C. 1997. To Daeng Peat Swamp Forest. New Thammada Press. Bangkok. 80 pp. [in Thai]
- Vidthayanon, C. 2004. Freshwater Fishes Handbook. Sarakadee. Bangkok. 232 pp. [in Thai]

ลักษณะโครโมโซมเครื่องหมายและแคริโอไทป์ของปลาหลดจุด

(*Macrogathus siamensis*) และปลาหลดกู่เขา (*M. circumcinctus*)

Characteristics of Chromosome Marker and Karyotype of Mastacembelid fishes,

Macrogathus siamensis and *M. circumcinctus* (Synbranchiformes,

Mastacembelidae)

กฤติมา เสาวกุล และสำเนา เสาวกุล

Krittima Saowakoon^{1*} and Samnao Saowakoon¹

คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสุรินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000

¹Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology, Surin Campus, Muang Surin 32000

*Corresponding author, E-mail: saowakoon1970@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาโครโมโซมเครื่องหมายและแคริโอไทป์ของปลาหลดจุด (*Macrogathus siamensis*) และปลาหลดกู่เขา (*M. circumcinctus*) ของตัวอย่างปลาเพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 5 ตัว จากคณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ ซึ่งเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรงจากไตด้วยวิธีการสับให้ละเอียด ย้อมโครโมโซมแบบธรรมดาด้วย สีกิมซาและย้อมแถบแบบบอร์ (NORs) ผลการศึกษาพบว่าปลาหลดจุดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 50 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 66 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 10 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 18 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 4 แท่ง พบตำแหน่งนอร์บนปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 8 และ 24 เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย สำหรับปลาหลดกู่เขามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 62 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 12 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 14 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 20 แท่ง พบตำแหน่งนอร์บริเวณปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 8 ปลาทั้งสองชนิดตรวจไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศ ระหว่างปลาเพศผู้และเพศเมีย ปลาหลดจุดมีสูตรแคริโอไทป์ $2n (50) = L^m_{10} + L^a_6 + L^t_{18} + M^t_{12} + S^t_4$ และ ปลาหลดกู่เขามีสูตรแคริโอไทป์ $2n (48) = L^m_{12} + M^m_2 + L^t_{14} + M^t_{20}$

คำสำคัญ: ปลาหลดจุด ปลาหลดกู่เขา โครโมโซม แคริโอไทป์

Abstract

Chromosomal characteristics of nucleolar organizer region (NORs) and karyological analyses of mastacembelid fishes, *Macrogathus siamensis* and *M. circumcinctus* were studied. Kidney cell samples were taken from 5 males and 5 females fish, nourished at the Faculty of Agriculture and Technology Rajamangala University of Technology Isan Surin campus, Thailand. Mitotic chromosome preparations were prepared directly from the kidneys sampled. Metaphase

spreads were performed on microscopic slides and, thereafter were air-dried. Conventional and Ag-NORs banding techniques were applied to stain the chromosomes. Experimental results showed that *M. siamensis* had the diploid chromosome of $2n=50$ and the fundamental number (NF) were 66 in both males and females. The karyotype comprised with 10 large metacentric, 6 large acrocentric, 18 large telocentric, 12 medium telocentric and 4 small telocentric. The NORs were found on the short arm of the chromosome pairs, i.e. 8 and 24, which were determined to be chromosome markers for this species. Meanwhile *M. circumcinctus* had the diploid chromosome of $2n=48$ and the fundamental number were 62 in both sexes. The karyotype comprise with 12 large metacentric, 2 medium metacentric, 14 large telocentric and 20 medium telocentric. The NORs were observed on the short arm of the chromosome pair 8. Sex chromosomes were cytologically indistinguishable for both species. The karyotype formula of *M. siamensis* was designated as: $2n (50) = L_{10}^m + L_6^a + L_{18}^t + M_{12}^t + S_4^t$ and *M. circumcinctus* is $2n (48) = L_{12}^m + M_2^m + L_{14}^t + M_{20}^t$

Keywords: *M. siamensis*, *M. circumcinctus*, chromosome, karyotype

Introduction

Mastacembelids are called “spiny eels” apparently due to its series of detached, depressible spines preceding the soft dorsal fin. The Mastacembelids were belong to perhaps the most highly modified percomorph family, but their relationship to other percomorphs were yet unknown (Plamoottil and Abraham, 2014). Serajddin and Ali (2005) studied and classified the Mastacembelids, and put the thirty-three nominals of freshwater spiny eels under four genera into two subfamilies, namely Mastacembelinae and Afromastacembelinae. These which were belong to the subfamily Mastacembelinae were confined exclusively to Asia while the genera of subfamily Afromastacembelinae were restricted only to Africa. The *Macrognathus siamensis* and *M. circumcinctus* were a genus of Mastacembelid fishes belonging to subfamily Mastacembelinae, family Mastacembelidae suborder Mastacembeloidei and order Perciformes (Tyson, 1986).

Nowadays, *Macrognathus* has been breeding between species. The chromosome studies are considered very important for cytotaxonomy. The study on fish chromosomes is the basic knowledge which can be applied for the several fields such as classification, evolution, heredity, systematic (Gold et al. 1990; Ueda et al. 2001; Barat et al. 2002; Barat and Sahoo 2007), breeding, rapid production of inbred lines and cytotaxonomy (Kirpichnikov, 1981. In genus *Macrognathus*, cytogenetic studies have been performed in 3 species, including *M. aculeatus* (Khuda-Bukhsh and Manna, 1978; Donsakul and Magtoon, 1992), *M. siamensis* and *M. circumcinctus* (Donsakul and Magtoon, 1992) (Table 1). All of these species had $2n=48$ chromosomes consisting of metacentric, acrocentric and

telocentric chromosomes and no morphologically distinguished sex chromosomes. The structure, number and morphology of nucleolar organizer region (NOR) on chromosome are possibly specific to populations, species and subspecies. NOR has been frequently used to compare between variations, as well as to identify and explain specifications.

In this study, the chromosome marker of *M. siamensis* and *M. circumcinctus* for the first time purposely were investigated. The basic knowledge on cytogenetics can be applied to fish breeding and also used for future studies on taxonomy and evolutionary of Mastacembelid group.

Materials and methods

Sample collection, Chromosome preparation and Chromosome staining

Five male and five female specimens of *M. siamensis* and *M. circumcinctus* individually were obtained from the Faculty of Agriculture and Technology Rajamangala University of Technology Isan Surin campus, Thailand. Mitotic chromosomes were directly prepared *in vivo* following Supiwong et al. (2013, 2017). Conventional staining was performed using 20% Giemsa's solution for 30 min (Rooney, 2001) and Ag-NOR banding was carried out following the techniques reported by Howell and Black (1980).

Chromosomal checks, Karyotyping and Idiogramming

Chromosome counting was carried out on mitotic metaphase cells under the light microscope for 30 cells per specimen to determine the diploid number ($2n$). Twenty clearly observable and well-spread metaphase cells from each male and female were selected and photographed. The short arm length (Ls) and the long arm length (LI) of individual chromosomes were measured to calculate total length of the chromosome for 20 well-spread metaphase cells. The chromosome types were classified from the methods reported by Turpin and Lejeune (1965) i.e. metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric chromosomes. The karyotyping and idiogramming methods were conducted according to Turpin and Lejeune (1965) and Chaiyasut (1989).

Results and discussion

Experimental results showed that *M. siamensis* had diploid chromosome number of $2n=50$ and had fundamental number (NF)=66 (Fig. 1A-D). The karyotypes of *M. siamensis* comprised with five large metacentric (pairs 1-5), three large acrocentric (pairs 6-8), nine large telocentric (pairs 9-17), six medium telocentric (pairs 18-23) and two small telocentric chromosomes (pairs 24-25). The mean values calculated from twenty mitotic metaphases indicating relative lengths of chromosomes complement ranging from 0.052 ± 0.002 to 0.023 ± 0.004 (Table 2). The NOR was found on the short

arm of chromosome pairs 8 and 24 (Fig. 1E-H). Their respective idiograms of this species from conventional staining and Ag-NOR banding techniques were shown in Fig. 3A. The karyotype formula of *M. siamensis* could be deduced as: $2n (50) = L_{10}^m + L_6^a + L_{18}^t + M_{12}^t + S_4^t$. The numbers of diploid chromosome and NF in this species studied herein are disagree with previous literature (Donsakul and Magtoon, 1992) of which the diploid number reportedly was $2n=48$ and $NF=58$. The differences may be attributed to the specimens utilized in the present work, i.e. collected from local aquarium dealer, which were different from those utilized by the literature and may be due to different criteria used for the chromosome classification. Intra-specific variations of the $2n$ and NF in *M. siamensis* in some ways suggest processes of pericentric inversions between chromosomes during chromosomal evolution (Supiwong, 2012). Furthermore the differences may be attributed to different criteria used for the chromosome classification and inter-population variation in this genus (Kirpichnikov, 1981).

Table 1. Cytogenetic reviews of fishes in genus *Macrogathus*.

Species	2n	NF	Karyotype	Ag-NORs	Locality	Reference
<i>M. aculeatus</i>	48	58	8m+2a+38t	-	-	Manna and Khuda-Bukhsh (1978)
	48	62	14m+4a+30t	-	Thailand	Donsakul and Magtoon (1992)
<i>M. siamensis</i>	48	58	8m+2a+38t	-	Thailand	Donsakul and Magtoon (1992)
	50	66	10m+6a+34t	4	Thailand	Present study
<i>M. circumcinctus</i>	48	64	14m+2a+32t	-	Thailand	Donsakul and Magtoon (1992)
	48	62	14m+34t	2	Thailand	Present study

Remarks: $2n$ = diploid chromosome number, NF = fundamental number (number of chromosome arm), m = metacentric, a = acrocentric, t = telocentric chromosome, NORs = nucleolar organizer regions.

Typical diploid metaphase chromosome which was complement in both male and female of *M. circumcinctus* was 48 and NF=62 (Fig. 2A-D). The chromosome complement consisted of six large metacentric (pairs 1-6), one medium metacentric (pair 7), seven large telocentric (pair 8-14)

and ten medium telocentric chromosomes (pairs 15 and 24). Categorization of chromosomes with karyometric data was shown in Table 3. The mean value of relative length was in a range from 0.051 ± 0.003 to 0.030 ± 0.001 . The NOR was presented at subtelomeric regions on the short arms of chromosome pair 8 (Fig. 2E-H). The idiogram are shown in Fig 3B. The proposed karyotype of *M. circumcinctus* was $2n (48) = L_{12}^m + M_2^m + L_{14}^t + M_{20}^t$. The number of chromosomes and NF of *M. circumcinctus* herein coincide with those previously reported by Donsakul and Magtoon (1992) (Table 1).

For both fish species, no cytologically distinguishable sex-chromosome was observed. Such research finding was consistent with previous studies reported by Donsakul and Magtoon (1992). It may be possible that the fish's sex-chromosomes were at the initiation of differentiation and hence these chromosomes containing the sex determination gene could not be detected by the cytogenetic analyses undertaken. The origin and development of sex-chromosomes had been reported for Neotropical fish in Brazil (Bertollo et al., 2004).

The objective of Ag-NOR banding technique is to reach out the nucleolar organizer region which is the representative location of genes (loci) that function in ribosome synthesis (18S and 28S ribosomal RNA) (Sharma et al., 2002). If these regions were active during the interphase prior to mitosis, they could be detected by silver nitrate staining (Howell and Black, 1980) because of its specific stains which were a set of acidic protein related to ribosomal synthesis process. The technique actually revealed active NORs (Ag-NORs), excluding the rDNA associated to NORs (Jordan, 1987). Furthermore, our present study was considered the pioneer reporting NORs bearing chromosome which has been characterized for *M. siamensis* and *M. circumcinctus* that were found on two pair of large acrocentric and small telocentric, and one pairs of large telocentric chromosomes, respectively (Fig. 1E-H and 2E-H). The NOR-bearing pairs represented an efficient cytotaxonomic marker for most of the analyzed species. The research findings importantly highlighted that chromosome morphology and the NOR location are considerably useful cytological characters for taxonomic and evolutionary studies in the Mastacembelid fishes.

Acknowledgments

This work was supported by Faculty of Agriculture and Technology Rajamangala University of Technology Isan Surin campus, Thailand.

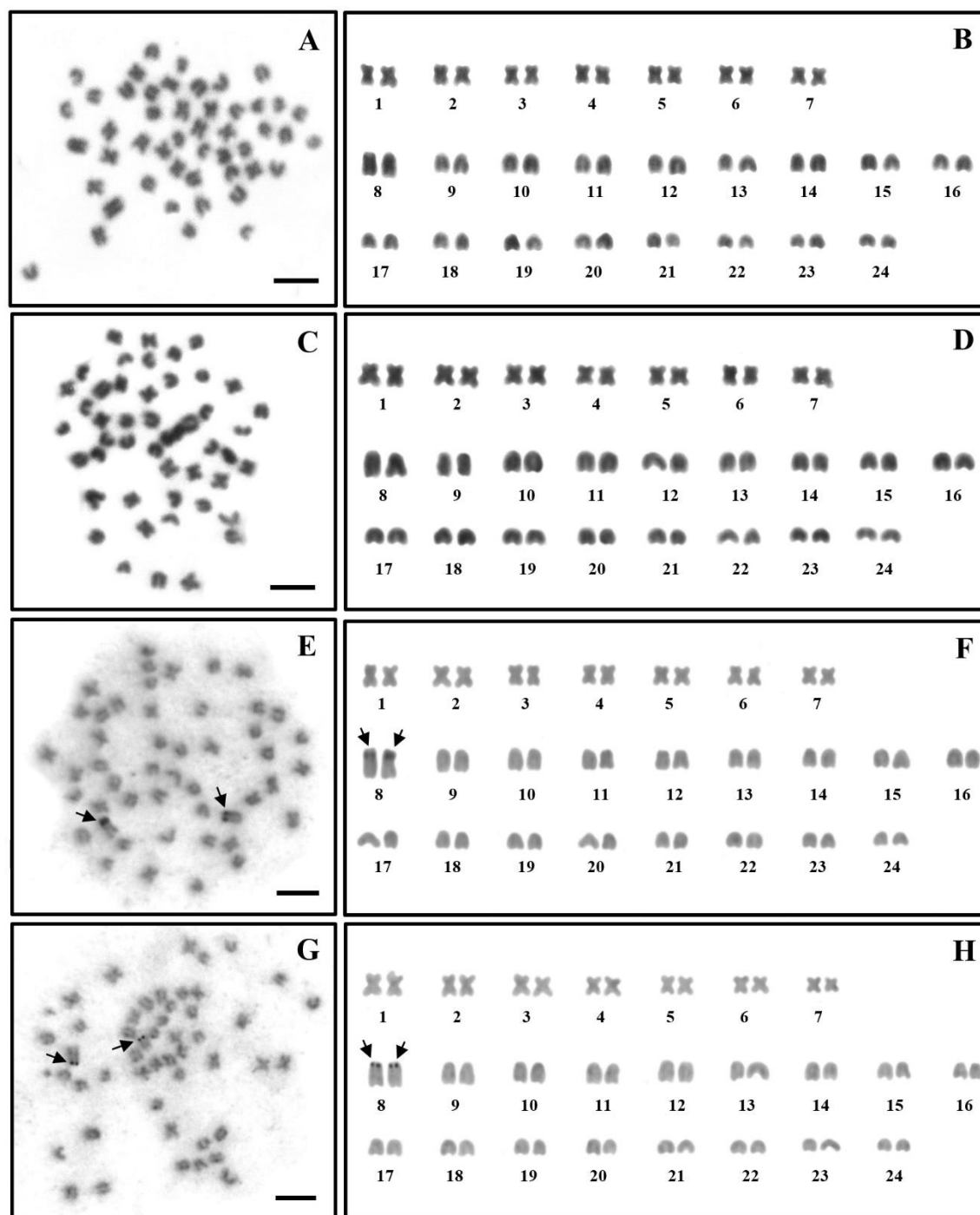


Figure 1 Metaphase chromosome plates and karyotypes of *Macrognathus siamensis* male (A, B, E and F), female (C, D, G and H) $2n=50$ by conventional staining and Ag-NOR banding techniques. Arrow indicates nucleolar organizer regions/NORs (scale bars indicate 5 micrometers).

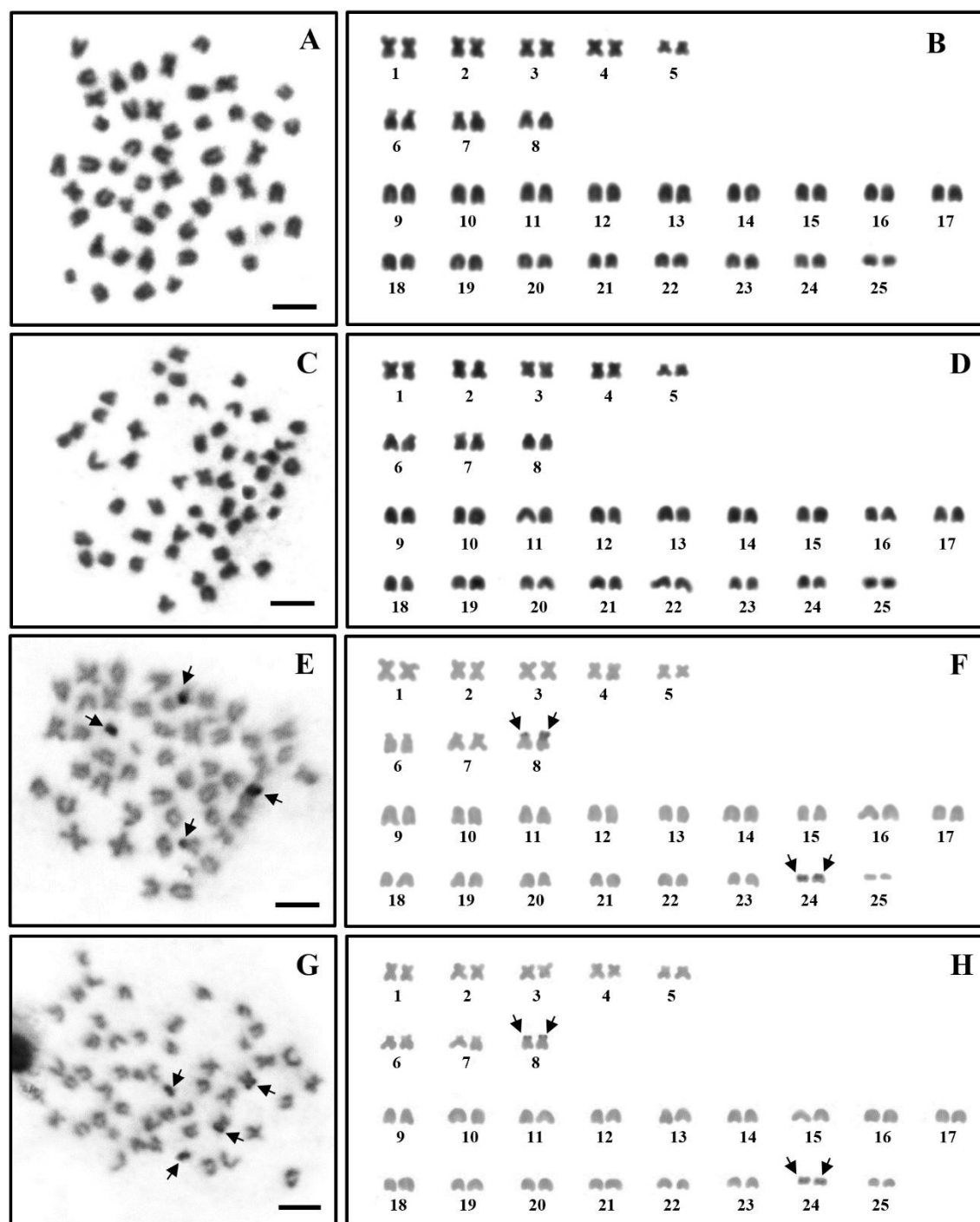


Figure 2 Metaphase chromosome plates and karyotypes of *Macrognathus circumcinctus* male (A, B, E and F), female (C, D, G and H) $2n=48$ by conventional staining and Ag-NOR banding techniques. Arrow indicates nucleolar organizer regions/NORs (scale bars indicate 5 micrometers).

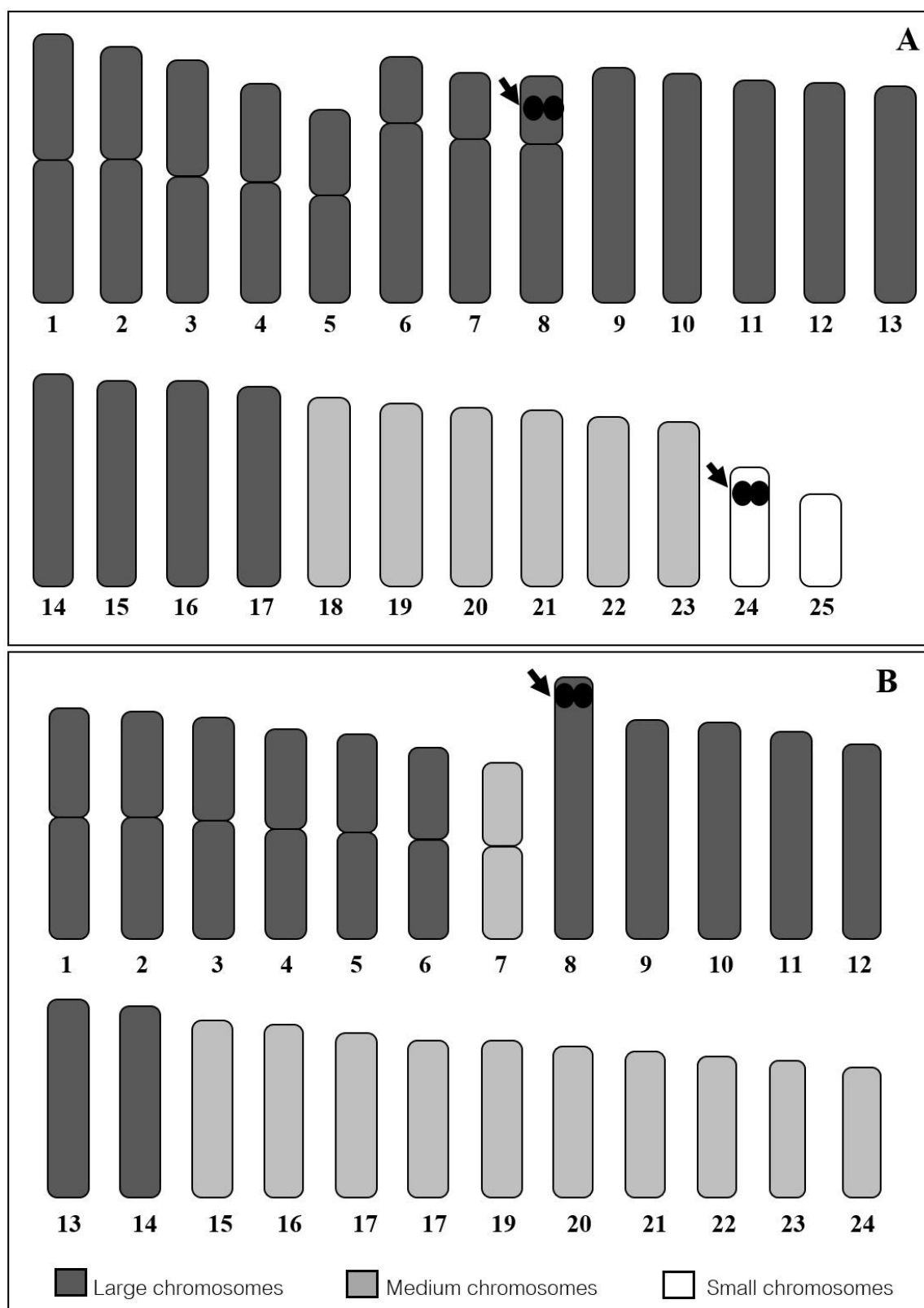


Figure 3 Idiograms of showing lengths and shape of chromosomes of the *Macrognathus siamensis* (A) and *M. circumcinctus* (B). Arrow indicates nucleolar organizer regions/NORs.

Table 2 Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (LI), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from 20 metaphases of male and female *Macrogathus siamensis*, $2n = 50$.

Chromosome pair	Ls (μm)	LI (μm)	LT (μm)	RL $\pm$ SD	CI $\pm$ SD	Chromosome size	Chromosome type
1	1.678	1.910	3.588	0.052 $\pm$ 0.002	0.533 $\pm$ 0.039	Large	Metacentric
2	1.515	1.908	3.423	0.050 $\pm$ 0.002	0.558 $\pm$ 0.026	Large	Metacentric
3	1.540	1.681	3.221	0.047 $\pm$ 0.002	0.523 $\pm$ 0.033	Large	Metacentric
4	1.308	1.601	2.909	0.042 $\pm$ 0.001	0.549 $\pm$ 0.018	Large	Metacentric
5	1.151	1.435	2.587	0.038 $\pm$ 0.005	0.555 $\pm$ 0.018	Large	Metacentric
6	0.887	2.400	3.286	0.048 $\pm$ 0.003	0.730 $\pm$ 0.032	Large	Acrocentric
7	0.884	2.204	3.088	0.045 $\pm$ 0.002	0.714 $\pm$ 0.005	Large	Acrocentric
8*	0.900	2.117	3.017	0.044 $\pm$ 0.001	0.702 $\pm$ 0.046	Large	Acrocentric
9	0.000	3.132	3.132	0.045 $\pm$ 0.003	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
10	0.000	3.057	3.057	0.045 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
11	0.000	2.962	2.962	0.043 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
12	0.000	2.928	2.928	0.043 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
13	0.000	2.885	2.885	0.042 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
14	0.000	2.836	2.836	0.041 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
15	0.000	2.749	2.749	0.040 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
16	0.000	2.744	2.744	0.040 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
17	0.000	2.668	2.668	0.039 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000	Large	Telocentric
18	0.000	2.517	2.517	0.037 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	Telocentric
19	0.000	2.438	2.438	0.036 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	Telocentric
20	0.000	2.378	2.378	0.035 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	Telocentric
21	0.000	2.350	2.350	0.034 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	Telocentric
22	0.000	2.264	2.264	0.033 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	Telocentric
23	0.000	2.193	2.193	0.032 $\pm$ 0.007	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	Telocentric
24*	0.000	1.745	1.745	0.026 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Small	Telocentric
25	0.000	1.583	1.583	0.023 $\pm$ 0.004	1.000 $\pm$ 0.000	Small	Telocentric

Remark: * = NORs bearing chromosomes (satellite chromosome)

Table 3 Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (LI), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from 20 metaphases of male and female *Macrognathus circumcinctus*, $2n = 48$.

Chromosome pair	Ls (μm)	LI (μm)	LT (μm)	RL $\pm$ SD	CI $\pm$ SD	Chromosome size	Chromosome type
1	1.614	1.801	3.416	0.051 $\pm$ 0.003	0.538 $\pm$ 0.024	Large	metacentric
2	1.563	1.804	3.367	0.051 $\pm$ 0.001	0.540 $\pm$ 0.009	Large	metacentric
3	1.527	1.757	3.284	0.049 $\pm$ 0.003	0.539 $\pm$ 0.007	Large	metacentric
4	1.468	1.636	3.104	0.046 $\pm$ 0.001	0.535 $\pm$ 0.017	Large	metacentric
5	1.465	1.573	3.038	0.045 $\pm$ 0.001	0.517 $\pm$ 0.010	Large	metacentric
6	1.366	1.472	2.838	0.043 $\pm$ 0.001	0.526 $\pm$ 0.023	Large	metacentric
7	1.306	1.378	2.684	0.040 $\pm$ 0.002	0.525 $\pm$ 0.019	Medium	metacentric
8*	0.000	3.890	3.890	0.058 $\pm$ 0.004	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
9	0.000	3.249	3.249	0.049 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
10	0.000	3.215	3.215	0.048 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
11	0.000	3.068	3.068	0.046 $\pm$ 0.004	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
12	0.000	2.887	2.887	0.043 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
13	0.000	2.832	2.832	0.042 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
14	0.000	2.713	2.713	0.041 $\pm$ 0.003	1.000 $\pm$ 0.000	Large	telocentric
15	0.000	2.633	2.633	0.039 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
16	0.000	2.648	2.648	0.040 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
17	0.000	2.365	2.365	0.036 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
18	0.000	2.404	2.404	0.036 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
19	0.000	2.408	2.408	0.036 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
20	0.000	2.313	2.313	0.035 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
21	0.000	2.228	2.228	0.033 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
22	0.000	2.163	2.163	0.032 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
23	0.000	2.088	2.088	0.031 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric
24	0.000	1.997	1.997	0.030 $\pm$ 0.001	1.000 $\pm$ 0.000	Medium	telocentric

Remark: * = NORs bearing chromosomes (satellite chromosome)

References

- Barat, A., Sahoo, P. K. and Ponniah, A. G. 2002. Karyotype and Nucleolar Organizer Regions (NORs) in a few hill stream fishes. In: Ayyappan, S., Jena, J. K. and Joseph, M. M. (Eds.), The Fifth Indian Fisheries Forum Proceedings, AFSIB, Mangalore and AoA, Bhubaneswar, pp.111–114.
- Barat, A., and Sahoo, P. K. 2007. Karyotype analysis of *Channa punctatus* (Pisces) using restriction endonucleases. *Cytologia* 72: 471–473.
- Bertollo, L. A. C., Oliveira, C., Molina, W. F., Margarido, V. P., Fontes, M. S. M., Pastori, C., Falcão, J. N. and Fenocchio, A. S. 2004. Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity* 93: 228–233.
- Chaiyasut, K. 1989. Cytogenetics and cytotaxonomy of the family Zephyranthes. Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (in Thai)
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 1992. A chromosome study on four species of Mastacembelid fishes, *Macrognathus siamensis*, *M. circumcinctus*, *M. aculeatus* and *Mastacembelus armatus* from Thailand. Agricultural Research & Technology. Srinakharinwirot University, Thailand.
- Gold, J. R., Li, Y. C., Shipley, N. S. and Powers, P. K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology* 37: 563–575.
- Howell, W. M. and Black, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. *Experientia* 36: 1014–1015.
- Jordan, G. 1987. At the heart of the nucleolus. *Nature* 329: 489–490.
- Kirpichnikov, V. S. 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Manna, G.K. and Khuda-Bukhsh, A.R. 1978. Karyomorphological Studies in Three Species of Teleostean Fishes. *Cytologia* 43: 69–73,
- Plamoottil, M. and Abraham, P.N. 2014. *Macrognathus albus* (Order: Synbranchiformes; Family: Mastacembelidae), A new fish species from Kerala, India. *International Journal of Pure and Applied Zoology* 2(2): 100–105.
- Rooney, D. E. 2001. Human Cytogenetics: Constitutional Analysis, A Practical Approach. Oxford, Oxford University Press.
- Serajuddin, M and Ali, R. 2005. Food and feeding habits of striped spiny eel, *Macrognathus pancalus* (Hamilton). *Indian Journal Fish.* 52(1): 81–86.

- Sharma, O. P., Tripathi, N. K. and Sharma, K. K. 2002. A review of chromosome banding in fishes. In: Sobti, R. C. and Obe, G. (eds.). Some Aspects of Chromosome Structure and Functions. Narosa Publishing House, New Delhi. pp. 109–122
- Supiwong, W., Tanomtong, A., Supanuam, P., Jantararat, S., Khakhong, S. and Sanoamuang, S. 2012. A discovery of nucleolar organizer regions (NORs) polymorphism and karyological analysis of Smith's barb, *Puntioplites proctozysron* (Cypriniformes, Cyprinidae) in Thailand. *Cytologia* 77: 35–42.
- _____, Boonsuk, J., Jantararat, S., Suvarnaraksha, A., Pengseng, P. and Tanomtong, A. 2017. The first chromosomal characteristics of nucleolar organizer regions and karyological analysis of two chaetodontid fishes (Perciformes, Chaetodontidae). *Cytologia* 82: 33–39.
- _____, Tanomtong, A., Chaveerach, A., Tanee, T., Khakhong, S. and Sanoamuang, L. 2013. Interpopulational variation of NOR positions and karyotypic analysis of Siamese catfish (*Pseudomystus siamensis*) in Thailand. *Cytologia* 78: 25–34.
- Turpin, R. and Lejeune, J. 1965. Les Chromosomes Humains. Gauthier-Pillars, Paris.
- Tyson, R.R. 1986. "Systematic Review of the Mastacembelidae or Spiny Eels of Burma and Thailand, with Description of two new species of *Macrogathus*." *Japanese Journal of Ichthyology*. 33(2): 95–109.
- Ueda, T., Naoi, H. and Arai, R. 2001. Flexibility on the karyotype evolution in bitterlings (Pisces, Cyprinidae). *Genetica* 111: 423–432.

การติดเชื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ด้วย *Streptococcus agalactiae*

โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก

Infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*

by Nares and Gills Inoculation

ศยามล รักศรี¹ รัชต์ ชัดติยะ² ศุกลรัตน์ บุญยยาตรา² และ ฎิลก วงศ์เสถียร^{2*}

Sayamon Raksri¹ Rutch Khattiya² Sukolrat Boonyayatra² and Dilok Wongsathein^{2*}

¹หลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

²ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50100

¹Graduate Program in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50100

²Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50100

*Corresponding author: dilok.w@cmu.ac.th

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลาสามารถเกิดขึ้นได้จากการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำเข้าสู่รูปร่างปลาส่งผลให้ปลาเกิดการป่วยและตายได้ การศึกษานี้เพื่อหาความเป็นไปได้ของการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลโดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก ปลานิลที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 30 ตัว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ในแต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มการทดลอง จำนวนปลา 10 ตัว/ตู้ และกลุ่มควบคุม จำนวนปลา 5 ตัว/ตู้ โดยทำการให้เชื้อด้วยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 3.5×10^7 CFU/ml เป็นเวลา 1 นาที ส่วนกลุ่มควบคุมทำการให้สารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl ด้วยวิธีการเดียวกัน สังเกตอาการ รอยโรคและอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างจากไตส่วนหน้า ม้าม ตาและสมองของปลาที่ตายและรอดชีวิตทั้งหมด เพื่อยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา และเทคนิคพีซีอาร์ จากผลการทดลองพบอัตราการตายในวิธีการให้ทางจมูก 10% แต่ไม่พบอัตราการตายในวิธีการให้ทางเหงือก พบการติดเชื้อของปลาที่รอดชีวิตด้วยวิธีการให้ทางจมูก 44.4% และวิธีการให้ทางเหงือก 100% ซึ่งปลาป่วยเริ่มแสดงอาการวันที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ คือ สีผิวเข้ม ลอยตัวผิวน้ำ และ/หรือม้ามโต การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าจมูกและเหงือกอาจเป็นช่องทางหนึ่งที่สามารถทำให้ปลานิลเกิดการติดเชื้อ *S. agalactiae* ได้

คำสำคัญ: การติดเชื้อ วิธีการให้ทางจมูก วิธีการให้ทางเหงือก *Streptococcus agalactiae* ปลานิล

Abstract

Streptococcus agalactiae has been identified as a fish pathogen and could be transmitted through the water causing the morbidity and mortality. This study was conducted to demonstrate the potential *S. agalactiae* infection in Nile tilapia by nares and gills inoculation. Nile tilapia (n=30) were divided into 2 groups. The individual group (10 fish in each group) were inoculated into the nares or gills of each fish with 0.1 ml of bacterial concentration of 3.5×10^7 CFU/ml for 1 min. Five control fish

in each group were inoculated with sterile 0.9% normal saline solution in a similar manner. Clinical signs, lesions and mortality were monitored daily for 14 days post-inoculation. Samples from anterior kidney, spleen, eye and brain of all dead and surviving fish were confirmed by bacteriological and PCR techniques. The results showed the mortality of 10% and 0% in nares and gills inoculations, respectively. The percent infection was 44.4% and 100% in nares and gills inoculations, respectively. Moribund fish showed darkening skin, surface swimming and/or splenomegaly at day 2 post-inoculation. The results of this study demonstrated that the nares and gills may be a potential route of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia.

Keywords: Infection, Nares inoculation, Gills inoculation, *Streptococcus agalactiae*, Nile tilapia

คำนำ

ปัจจุบันโรค Streptococcosis ในปลาเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นโรคระบาดที่พบได้ทั้งแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม (Evans *et al.*, 2002) และมักพบในปลาหลายชนิดที่อยู่ในเขตอบอุ่นและร้อนชื้น (Evans *et al.*, 2006) ในประเทศไทยพบการติดเชื้อครั้งแรกในปลานู๋ทราย (*Oxyeleotris marmorata*) (Kasornchan *et al.*, 1986) และมีรายงานการระบาดหนักทั่วภูมิภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะฤดูร้อน ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Streptococcus iniae* และ *Streptococcus agalactiae* ที่พบในปลานิล ปลานิลแดง ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (Kayansamruaj *et al.*, 2014; Suanyuk *et al.*, 2010) ซึ่งก่อความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ปลาเจริญเติบโตช้า คุณภาพผลผลิตลดลง และมีอัตราการตายสูงถึง 75% (Maisak *et al.*, 2008) โดยปลาที่ติดเชื้อจะแสดงอาการและรอยโรคคือ วายน้ำผิดปกติ สูญเสียการทรงตัว ลำตัวสีเข้ม ตาขุ่น/โปน มีของเหลวในช่องท้อง ม้ามโตและตับซีด (Ingils *et al.*, 1993; Plumb, 1999; Austin and Austin, 2007)

การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคนั้นจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ การจัดการฟาร์ม ความหนาแน่นในการเลี้ยง คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม รวมไปถึงการเข้าก่อโรคของเชื้อในช่องทางต่างๆ และยังมีความเป็นไปได้ว่าช่องทางการเข้าก่อโรคของเชื้อเข้าสู่ปลาส่งผลให้ปลาเกิดการติดเชื้อ ป่วยและตายได้ ซึ่งการติดเชื้อในธรรมชาติเกิดจากการปนเปื้อนในน้ำและแพร่ผ่านเข้าสู่ร่างกายทางช่องทางต่างๆ ของปลาได้โดยตรง Evans และคณะ (2000) รายงานว่ามีการติดเชื้อ *S. iniae* โดยวิธีการให้เชื้อทางจมูกในปลากะพงและปลานิล มีอัตราการตายถึง 98.3% และ 28.3% ตามลำดับ ซึ่งการติดเชื้อ *S. iniae* ยังสามารถพบในปลากะพงมีอัตราการตายสูงถึง 100% จากการให้เชื้อเข้าทางเหงือก (McNulty *et al.*, 2003) นอกจากนี้มีการศึกษาการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่ในปลานิล พบอัตราการตาย 10% (Soto *et al.*, 2016) และวิธีการผสมเชื้อกับอาหารให้ทางปากในปลาหมอทะเล พบการติดเชื้อได้ถึง 100% (Delamare-Deboutteville *et al.*, 2015) จากการศึกษาดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจจะเข้าก่อโรคสู่ปลาในช่องทางต่างๆ ได้เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษากการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยและการติดเชื้ออาจมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเชื้อ ชนิดของปลา สิ่งแวดล้อมหรือช่องทางการเข้าก่อโรคของเชื้อ ด้วย

เหตุนี้ทางผู้วิจัยเห็นถึงความสำคัญของการศึกษาหาความเป็นไปได้ของการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก เพื่อเข้าใจถึงช่องทางการติดเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวและสามารถเป็นแนวในการศึกษาการติดเชื้อ *S. agalactiae* ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*) เพศผู้ สายพันธุ์ จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ย 18.3 ± 2.13 กรัม ความยาวเฉลี่ย 7.94 ± 0.32 เซนติเมตร จำนวนปลาทั้งหมด 30 ตัว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก ในแต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มการทดลอง จำนวนปลา 10 ตัว/ตู้ และกลุ่มควบคุม จำนวนปลา 5 ตัว/ตู้ ทำการสุ่มปลาตรวจเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา โดยปลาเลี้ยงในตู้กระจก ขนาด $43.7 \times 38.8 \times 45$ เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 44 ลิตร เลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ความหนาแน่นในการเลี้ยง 4.16 กรัม/ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำโดยการวัดอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำทุกวัน ทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 14 วัน

การเตรียมเชื้อ *S. agalactiae*

เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซีโรไทป์ III ที่แยกได้จากปลานิลแดงป่วยด้วยโรค Streptococcosis ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผ่านการจำแนกลักษณะพื้นฐานทางจุลชีววิทยา จำแนกกลุ่มของเชื้อด้วยชุดทดสอบ Lancefield serogrouping test ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20 STREP และยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ (bacterial passage) และทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ตาย 50% (LD_{50}) โดยการฉีดเข้าช่องท้องปลา (intraperitoneal injection) จากนั้นเตรียมเชื้อ *S. agalactiae* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ป่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เจือจางด้วยสารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Miles & Misra method (Miles et al., 1938) ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 3.5×10^7 CFU/ml

การศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

การให้เชื้อโดยวิธีทางจมูก

สลบปลาโดยใช้น้ำมันกานพลูความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นให้เชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 3.5×10^7 CFU/ml ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร หยอดเข้าจมูกด้วย syringe กับ catheter ขนาด $24 \times 3/4$ " ทั้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีกด้าน (ปริมาตรและระยะเวลาทั้งหมดเป็น 0.1 มิลลิลิตร, 1 นาที) ส่วนกลุ่มควบคุมให้สารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl ด้วยวิธีการเดียวกัน

การให้เชื้อโดยวิธีทางเหงือก

สลับปลาและเปิดแผ่นปิดเหงือก จากนั้นให้เชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 3.5×10^7 CFU/ml ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร โดยการหยดเชื้อลงเหงือกด้วย auto pipette ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที และทำซ้ำอีก ด้าน (ปริมาตรและระยะเวลาทั้งหมดเป็น 0.1 มิลลิลิตร, 1 นาที) ส่วนกลุ่มควบคุมให้สารละลายปราศจากเชื้อ 0.9% NaCl ด้วยวิธีการเดียวกัน

สังเกตอาการ รอยโรคและบันทึกข้อมูลปลาตาย จากนั้นเก็บตัวอย่างจากไตส่วนหน้า ม้าม ตา และสมองของปลาที่ตายและรอดชีวิตทั้งหมด ยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาในแต่ละอวัยวะ และเทคนิคพีซีอาร์ด้วยการรวมตัวอย่าง (pool sample) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะของเชื้อ *S. agalactiae* คือ V1 (5'-TTTGGTGTTCACACTAGACTG-3') และ V2 (5'-TGTGTTAATTACTCTTATGCG-3') ขั้นที่ 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ขั้นที่ 2 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ตามลำดับ (ทำขั้นที่ 2 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Meiri-Bendek *et al.*, 2002)

การศึกษานี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยภาพการใชสัตว์ทดลองเพื่องานวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ใบอนุญาตที่ S20/2560 และ ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับส่วนงาน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่รับ CMUIBC0560004

ผลการวิจัย

การติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูก

ผลทดลองพบอาการและรอยโรค คือ ลำตัวสีเข้ม ลอยตัวผิวน้ำ และ/หรือม้ามโต (Figure 1) ปลาเริ่มแสดงอาการป่วยในวันที่ 2 และตายในวันที่ 5 หลังได้รับเชื้อ จำนวน 1 ตัว จากการเก็บตัวอย่างจากของปลาทาย พบเชื้อที่ไตส่วนหน้า ม้าม ตา และสมอง จากการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและเทคนิคพีซีอาร์ มีอัตราการตาย 10% ส่วนการเก็บตัวอย่างจากปลาที่รอดชีวิตพบการติดเชื้อจากการเก็บตัวอย่างได้จากสมอง คิดเป็น 33.3% จากการยืนยันเชื้อด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและ 44.4% จากเทคนิคพีซีอาร์ (Table 1, Figure 2) ส่วนกลุ่มควบคุมไม่พบอัตราการตาย อาการ รอยโรค และการติดเชื้อ ภายในระยะเวลาการทดลอง 14 วัน



Figure 1 Splenomegaly of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia for 14 post inoculation

Table 1 Bacteriology and PCR results from sampled fish of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia by nares inoculation

Technique	Nares inoculation			
	No. of positively dead fish/total fish	% Mortality	No. of positively surviving fish/total survival fish	% Infection
Bacteriology	1/10	10	3/9	33.3
PCR	1/10	10	4/9	44.4

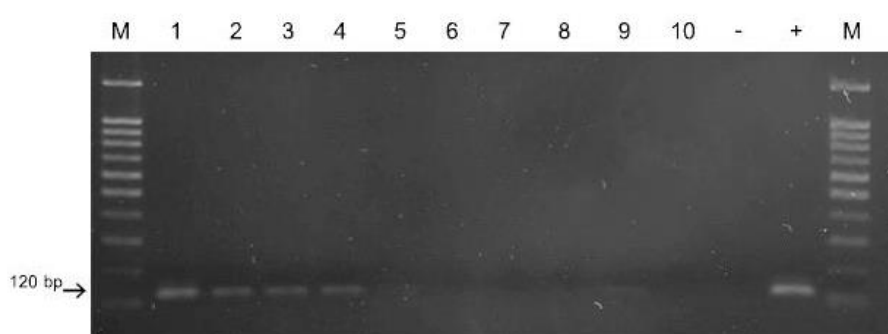


Figure 2 PCR product of *S. agalactiae* detection in Nile tilapia tissue by nares inoculation (M: 100 bp marker, Lane 1: organs of dead fish, Lane 2-10: organs of survival fish, - : negative control, + : positive control), The results of positively *S. agalactiae* yielded a single 120-bp product (Lane 1-4 and 9)

การติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางเหงือก

อาการและรอยโรคที่พบมีลักษณะคล้ายคลึงกับการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูก ปลาเริ่มแสดงอาการป่วยในวันที่ 2 แต่ไม่พบอัตราการตาย (0%) จากการเก็บตัวอย่างจากปลาที่รอดชีวิตไม่สามารถยืนยันเชื้อได้ด้วยวิธีจุลชีววิทยาแต่พบการติดเชื้อ 100% จากการยืนยันเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Table 2, Figure 3) ส่วนปลาในกลุ่มควบคุมไม่พบอัตราการตาย อาการ รอยโรค และการติดเชื้อ ภายในระยะเวลาการทดลอง 14 วันเช่นกัน

Table 2 Bacteriology and PCR results from sampled fish of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia by gills inoculation

Technique	Gills inoculation			
	No. of positively dead fish/total fish	% Mortality	No. of positively surviving fish/total survival fish	% Infection
Bacteriology	0/10	0	0/10	0
PCR	0/10	0	10/10	100

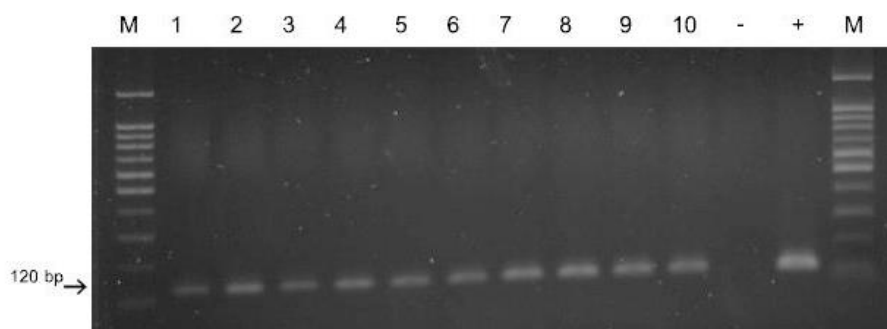


Figure 3 PCR product of *S. agalactiae* detection in Nile tilapia tissue by gills inoculation (M: 100 bp marker, Lane 1-10: organs of survival fish, - : negative control, + : positive control), The results of positively *S. agalactiae* yielded a single 120-bp product (Lane 1-10)

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้ง 2 การทดลอง พบว่าอุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 28 ± 1 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ 4.61 ± 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ย 7.80 ± 0.2 แอมโมเนียเฉลี่ย 0.020 ± 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร และไนโตรเจนเฉลี่ย 0.020 ± 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร

วิจารณ์ผล

การศึกษานี้พบว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูกสามารถทำให้เกิดการตายและการติดเชื้อได้ โดยปกติตามธรรมชาติในการเคลื่อนที่ของปลาจะส่งผลให้น้ำผ่านเข้าทางจมูกเป็นไปได้อย่างต่อเนื่องเข้าสู่อวัยวะรับกลิ่น olfactory organ ที่เชื่อมต่อกับเส้นประสาทสมอง และเชื้อมีคุณสมบัติสามารถเพิ่มจำนวนและกระจายสู่กระแสเลือด (septicemia) ได้ ซึ่งมีรายงานในวิธีการให้ทางจมูกในปลากะพง พบอัตราการตายถึง 98.3% ของการติดเชื้อ *S. iniae* และสามารถพบเชื้อที่ olfactory lobe ได้ที่ 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ (Evans *et al.*, 2000, 2001) จึงมีแนวโน้มว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* สามารถแพร่จาก olfactory organ ไปยังสมองได้ นอกจากนี้ผลการติดเชื้อของวิธีการให้ทางจมูก ยังมีปลารอดชีวิตที่ไม่พบการติดเชื้อ อาจเกิดจากการที่เชื้อถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของปลา ซึ่งการตอบสนองต่อการติดเชื้อเกิดขึ้นจากขบวนการอักเสบที่มีเม็ดเลือดขาวเข้าทำลายและป้องกันการแทรกผ่านของเชื้อ รวมไปถึงปริมาณของเชื้อที่ปลาได้รับในแต่ละตัวอาจไม่เท่ากัน จึงส่งผลให้มีอัตราการตายและการติดเชื้อน้อย ส่วนผลการศึกษาโดยวิธีการให้เชื้อทางเหงือกไม่พบอัตราการตาย อาจเนื่องมาจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่ปลาและความเข้มข้นที่ใช้ไม่สามารถทำให้ปลาตายได้ แต่สามารถพบการติดเชื้อจากปลารอดชีวิต โดยจากการให้เชื้อเข้าทางเหงือกเชื้อสามารถแพร่เข้าสู่เหงือกที่มีเส้นเลือดฝอยได้โดยตรง เนื่องจากเหงือกของปลามีเยื่อบุชั้นในที่มีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งเชื้อสามารถเข้าผ่านช่องว่างขนาดเล็กระหว่างเซลล์เยื่อบุเหงือกและสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายทั่วร่างกาย โดยมีรายงานพบอัตราการตายถึง 33% ของการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล และ 13-100% ของการติดเชื้อ *S. iniae* ในปลากะพง (McNulty *et al.*, 2003; Mian *et al.*, 2009)

มีรายงานการศึกษาโดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือกของการติดเชื้อ *S. iniae* ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ในปลากะพง สามารถทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 98.3% (Evans *et al.*, 2000) และ 13% (McNulty *et al.*, 2003) จากรายงานดังกล่าวจะให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เท่ากันของเชื้อและปลาชนิดเดียวกัน อาจมีแนวโน้มหรือเป็นไปได้ว่าวิธีการให้ทางจมูกสามารถทำให้เชื้อเข้าก่อโรคและสามารถพบอัตราการตายได้มากกว่าวิธีการให้ทางเหงือก นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ตาย 50% โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องของการศึกษานี้คือ ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ซึ่งต่างจากรายงานการศึกษา LD_{50} ของเชื้อ *S. agalactiae* อื่นๆ ที่ได้ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปลานิลแดง (Abuseliana *et al.*, 2011) และความเข้มข้นที่ 10^2 CFU/ml โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปลาม้าลาย (Patterson *et al.*, 2012) จะเห็นได้ว่าค่า LD_{50} มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ รวมไปถึงชนิดของปลาด้วย

โดยทั่วไปการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลามักแสดงอาการและรอยโรคคือ วายน้ำผิดปกติ สูญเสียการทรงตัว ลำตัวสีเข้ม ตาขุ่น-โปน ม้ามโต มีช่องเหลวในช่องท้องและตับซีด (Abuseliana *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014) แต่ในการศึกษานี้พบอาการและรอยโรคเพียง ลำตัวมีสีเข้ม ลอยตัวผิวน้ำ และ/หรือม้ามโต อาจเนื่องมาจากความเข้มข้น ปริมาตร ความจำเพาะของเชื้อ ชนิดของปลา สิ่งแวดล้อม ช่องทางการเข้าก่อโรค และเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้ที่พบอัตราการตายเพียง 10% อาจเนื่องมาจากความรุนแรงของเชื้อต่อสายพันธุ์ปลา ซึ่งแหล่งที่มาของเชื้อแยกได้จากปลานิลแดง สอดคล้องกับรายงานของ Evans และคณะ (2000) รายงานว่าความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้จากปลากะพงอาจจะส่งผลให้มีอัตราการตายในปลากะพงสูงกว่าในปลานิล

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเห็บสามารถเป็นช่องทางการเข้าของเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลได้ นอกจากนี้ยังจะทำการศึกษาความแตกต่างของปัจจัยอื่นๆเพิ่มเติม เช่น ความเข้มข้น ปริมาตรของเชื้อ ความหนาแน่น อุณหภูมิของน้ำ ช่องทางการติดเชื้อเลียนแบบธรรมชาติอื่นๆ หรือศึกษาทางพยาธิกำเนิด เพื่อเข้าใจถึงกระบวนการก่อโรคของเชื้อ *S. agalactiae* โดยช่องทางการติดเชืวดังกล่าวในปลานิลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนทุนในครั้งนี้อย่างดียิ่ง ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสัตว์น้ำและห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Abuseliana, A. F., Daud, H. H. M., Aziz, S. A., Bejo, S. K., and Alsaied, M. 2011. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(7), 914-919.
- Austin, B., and Austin, D. 2007. Characteristics of the diseases. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 15-46.
- Delamare Deboutteville, J., Bowater, R., Condon, K., Reynolds, A., Fisk, A., Aviles, F., and Barnes, A. 2015. Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes. Journal of Fish Diseases, 38(12), 1021-1035.
- Evans, J. J., Shoemaker, C. A., and Klesius, P. H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. Aquaculture, 189(3-4), 197-210.
- Evans, J. J., Shoemaker, C. A., and Klesius, P. H. 2001. Distribution of *Streptococcus iniae* in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following nares inoculation. Aquaculture, 194(3-4), 233-243.
- Evans, J., Klesius, P., Gilbert, P., Shoemaker, C., Al Sarawi, M., Landsberg, J., and Al Zenki, S. 2002. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. Journal of Fish Diseases, 25(9), 505-513.
- Evans, J., Klesius, P., and Shoemaker, C. 2006. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. Aquaculture Health International, 7, 10-14.

- Inglis, V., Roberts, R. J., and Bromage, N. R. 1993. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 312p.
- Kasornchan, J., Boonyaratpalin, S., and Supamataya, K. 1986. *Streptococcus* sp. the pathogenic bacteria of sand goby, *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker). Songklanakarin J Sci Technol, 8, 329-332. [in Thai]
- Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Katagiri, T., Hirano, I., and Rodkhum, C. 2014. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 26(4), 488-495.
- Li, Y., Liu, L., Huang, P., Fang, W., Luo, Z., Peng, H., and Li, A. 2014. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. Journal of Fish Diseases, 37(8), 757-763.
- Maisak, H., Patamalai, B., Amonsin, A., and Wongtavatchai, J. 2008. Streptococcosis in Thai cultured tilapia *Oreochromis nilotica*. Proceedings of the 7th Chulalongkorn University Veterinary Science Annual Conference. Bangkok, Thailand. 85-86.
- McNulty, S. T., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., and Evans, J. J. 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture, 220(1-4), 165-173.
- Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S., and Kashi, Y. 2002. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. Journal of Dairy Science, 85(7), 1717-1723.
- Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G., and Figueiredo, H. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Veterinary microbiology, 136(1-2), 180-183.
- Miles, A. A., Misra, S., and Irwin, J. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene, 38(6), 732-749.
- Patterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., and R  met, M. 2012. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. Developmental & Comparative Immunology, 38(3), 447-455.
- Plumb, J. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press. Ames, USA. 328p.

- Soto, E. , Zayas, M. , Tobar, J. , Illanes, O. , Yount, S. , Francis, S. , and Dennis, M. 2016. Laboratory-controlled challenges of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: comparisons between immersion, oral, intracoelomic and intramuscular routes of infection. *Journal of comparative pathology*, 155(4), 339-345.
- Suanyuk, N., Sukkasame, N., Tanmark, N., Yoshida, T., Itami, T., Thune, R. L., and Supamattaya, K. 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 32(4).

การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียกรดแลคติกและราเทมเป้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลา

Selection and utilization of lactic acid bacteria and tempe mold for fermentation of fish by-product

เกศินี จันทรโสภณ¹ วรพล สุรพัฒน์² เสรี จันทรโสภณ²

Kesinee Chantharasophon¹ Worapon Surapat² Seree Chantharasophon²

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

^{1,2} 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

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาสดและเชื้อราเทมเป้จากตัวอย่างแป้งเชื้อเทมเป้เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาสด ผลการศึกษาพบว่า คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ 3 ไอโซเลตคือ L1, L2 และ P1 ผลการจัดจำแนกเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตในระดับจีโนม พบว่ามีสมบัติเป็น *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus* sp., และ *Pediococcus* sp. ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อราเทมเป้ที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินจากแป้งเชื้อเทมเป้ พบว่าคัดเลือกได้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เมื่อใช้ก้ำเชื้อที่คัดเลือกได้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาสดพบว่า เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เป็นก้ำเชื้อที่ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในปลาสดจากวัสดุเศษเหลือของปลาสูงกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสมของไอโซเลต L1, L2 และ P1 โดยปลาสดอบแห้งที่ได้มีค่า pH เป็น 5.30 ± 0.01 ค่าปริมาณความชื้น กรด โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด และค่า degree of protein hydrolysis เป็นร้อยละ 5.94 ± 1.19 , 1.83 ± 0.08 , 8.90 ± 0.01 , 17.35 ± 0.23 และ 51.31 ± 0.70 ตามลำดับ

คำสำคัญ : วัสดุเศษเหลือจากปลา, ปลาสด, แบคทีเรียกรดแลคติก, แป้งเชื้อเทมเป้

Abstract

The objectives of this research were to select lactic acid bacteria from Plaa-som samples and tempe mold from Ragi tempe samples and use as inoculum in fermented fish by-product like Plaa-som. The results revealed that 3 isolates of lactic acid bacteria, L1, L1, and P1 which were isolated from Plaa-som samples showed anti-pathogenic bacterial effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. These 3 isolated were classified into genus level and their properties were expressed as *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus* sp., and *Pediococcus* sp., respectively. Isolation of non-aflatoxin producing mold from Ragi tempe samples was studied. It was found that *Rhizopus oligosporus* VA1 was selected. Utilization of the selected microorganisms to produce Plaa-som from fish by-products was performed and the results revealed that the use of *Rhizopus oligosporus* VA1 as inoculum exhibited higher protein digestion of Plaa-som fermentation from fish

by-products than the use of mixed lactic acid bacteria, L1, L2 and P1. The pH value, moisture, acidity, soluble protein, total protein, and degree of protein hydrolysis of this dried product were 5.30 ± 0.01 , $5.94 \pm 1.19\%$, $1.83 \pm 0.08\%$, $8.90 \pm 0.01\%$, $17.35 \pm 0.23\%$ and $51.31 \pm 0.70\%$, respectively.

Keywords: Fish by products, Plaa-som, Lactic acid bacteria, Ragi tempe

บทนำ

การผลิตปลาซมในพื้นที่ของภาคอีสานนั้น มีตัวเลขรายงานการผลิตปีละประมาณ 1,170-1,352 ตัน (Chompuming *et al.*, 2009) รูปแบบของปลาซมที่ผลิตมีแบบปลาซมตัวทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ปลาซมปัก และปลาซมชิ้น ซึ่งปัจจุบันนิยมผลิตปลาซมชิ้นมากขึ้นเนื่องจากสะดวกต่อการบริโภคและขายได้ราคาดีกว่า ส่งผลให้มีวัสดุเศษเหลือจากการผลิตปลาซมมากขึ้น มีรายงานว่าสารสกัดจากโครง กระดูก หนัง ครีบ และเกล็ดปลาเป็นสารอาหารที่มีมูลค่าสูง เช่น ช่วยการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกและการสะสมแคลเซียม สารสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากหนัง ครีบ และเกล็ดปลานั้นนิยมใช้ในการรักษาผู้ที่มีอาการข้อเสื่อมจากการขาดคอลลาเจน นอกจากนี้ยังมีส่วนของเครื่องในปลาที่ให้น้ำมันปลาและน้ำมันตับปลา สารต้านเชื้อราและสารต้านแบคทีเรียที่ผิวหนัง (Zhang *et al.*, 2011; Jodnak, 2013; Kutako *et al.*, 2015; Phuc, 2016) ในการผลิตสารมูลค่าสูงจากเศษเหลือปลามักใช้วิธีการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยความร้อน สารเคมี และเอนไซม์ โดยต้องอาศัยการปฏิบัติงานที่แม่นยำและมีขั้นตอนในการควบคุมปฏิกิริยาที่ซับซ้อน หากมีข้อผิดพลาดอาจมีความเสี่ยงต่อการได้สารพิษหรือมีความเสียหายในกระบวนการผลิต

สำหรับการผลิตอาหารหมักแบบพื้นบ้านนั้นใช้เทคโนโลยีอย่างง่ายไม่ซับซ้อน ใช้ภูมิปัญญาแบบดั้งเดิมคืออาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติร่วมกับการจัดสภาวะการหมักที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ ต่อมา มีการเรียนรู้วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นกล้าเชื้อผสมและพัฒนาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักจะผลิตเอนไซม์ออกมาเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นสารอาหารที่ดูดซึมไปใช้ได้สูง จากการศึกษาของ Giri *et al.* (2012) ที่ใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นกล้าเชื้อหมักวัสดุเศษเหลือจากปลา และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโปรตีนสายสั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 80 และการศึกษาของ Wu *et al.* (2017) ที่ใช้แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแซลมอน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีไฮโดรไลเซตเปปไทด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 74.06 แสดงว่ากล้าเชื้อราและกล้าเชื้อแบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อที่มีศักยภาพในการใช้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาได้ จากรายงานของ Rubina *et al.* (2018) พบว่าการใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ML-10 หมักเทมเป้ข้าวบาร์เลย์นั้น ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ร่างกายนำไปใช้ได้สูงขึ้นถึงร้อยละ 64.3 นอกจากนี้ Prasetyo *et al.* (2018) พบว่าการหมักแป้งมันด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* สามารถลดปริมาณไซยาไนด์และเปลี่ยนให้เป็นโปรตีนเพิ่มขึ้นได้ แต่เชื้อราเทมเป้ที่ใช้จะต้องไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* หมักวัสดุเศษเหลือจากปลา

วัตถุดิบที่เป็นเศษเหลือจากปลานั้นมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคสูง (Srisakultiew *et al.*, 2014) จึงต้องหาวิธีที่ลดหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ติดมากับวัตถุดิบ Hongsachart (2016) ได้ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาซมในจังหวัดหนองคาย พบว่าไอโซเลท L8-16 และ

L7-1 ให้ผลต่อต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก สำหรับเชื้อราเทียมเป็น Noviana *et al.*, (2018) รายงานว่าสารสกัดของเทมเป้กากถั่วเหลืองแบบไฮโดรไลเสตนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Streptococcus mutans* ได้ จึงสนใจศึกษาการใช้เชื้อราเทียมที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นก้ำเชื้อผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือจากปลาเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์: ดังนี้

2.1.1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี และเชื้อ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.1.2 เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.2 การคัดเลือกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากปลาส้ม

2.2.1 เก็บตัวอย่างปลาส้ม โดยเป็นปลาส้มที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดยโสธรในระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน พ.ศ. 2560 จำนวน 10 ตัวอย่าง

2.2.2 การคัดเลือกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก (ดัดแปลงวิธีการของ Chantharasophon *et al.*, 2011; Chantharasophon *et al.*, 2017)

คัดเลือกเชื้อจากตัวอย่างปลาส้มด้วยวิธีซิดลากเชื้อแบบไข่บนอาหารวุ้น De Man Rogosa and Sharpe (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เลือกแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งจะมีโคโลนีขนาดเล็กสีเหลืองโดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันไปซิดลากเชื้อซ้ำอีก 7-10 ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบสมบัติการทนเกลือ กิจกรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* นำเชื้อที่คัดเลือกได้มาจัดจำแนกเชื้อในระดับจีโนมโดยนำสมบัติตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับการจัดจำแนกเชื้อของ Bergy's Manual of Determinative Bacteriology (Vos *et al.*, 2009)

2.3 การคัดเลือกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จากแป้งเชื้อเทมเป้

2.3.1 เก็บตัวอย่างแป้งเชื้อเทมเป้ โดยเป็นแป้งเชื้อเทมเป้จากศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 1 ตัวอย่าง และแป้งเชื้อจากเตมเป้ปัตตานี (146/85 ถนนหลังมอ อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี) 1 ตัวอย่าง

2.3.2 การคัดเลือกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus oligosporus* (ดัดแปลงวิธีการของ Chantharasophon *et al.*, 2015)

ใช้วิธีการเพาะเชื้อแบบ Spread plate บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เลือกขยุ่มเส้นใยเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาเพาะเชื้อซ้ำอีก 7-10 ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เลือก

เชื้อที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 โดยการเจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เชื้อเจริญเติบโตเร็ว ฟู และอัดแน่นเต็มจานเพาะเชื้อ และบนอาหาร Coconut agar ที่อุณหภูมิห้องเชื้อไม่มีสีเหลืองส้ม และไม่มีการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.4 การผลิตปลาส้มโดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้

2.4.1 เตรียมกล้าเชื้อสำหรับใช้ผลิตปลาส้ม

1) เพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้บนอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ถ่ายเชื้อ 15 มิลลิลิตร ลงบนอาหารข้าวสุก (ข้าวต่อน้ำกลั่นเป็น 10:7) 50 กรัมในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วันก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อ

2) เพาะเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ที่คัดเลือกได้บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ถ่ายเชื้อโดยตัดชิ้นอาหารที่เพาะเชื้อเป็นชิ้นขนาด 1 ตารางเซนติเมตร 3 ชิ้นนำไปคลุกผสมกับอาหารข้าวสุก 50 กรัมในขวดแก้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วันก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.4.2 ผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือของปลา (ดัดแปลงวิธีการของ Chompuming *et al.*, 2009; Giri *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017) โดยมีส่วนผสมของหัวและโครงปลาสด 1,000 กรัม กระเทียมบด 100 กรัม เกลือ 100 กรัม ข้าวเหนียวหนึ่งสุก 150 กรัม และเติมกล้าเชื้อต่างกัน 3 สูตรๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

สูตร 1 เติมน้ำข้าวสุกปลอดเชื้อ 50 กรัม (กลุ่มควบคุม)

สูตร 2 เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะบนอาหารข้าวสุก 50 กรัม

สูตร 3 เติมกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ที่เพาะบนอาหารข้าวสุก 50 กรัม

คลุกส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากันทั่วถึงดีบรรจุส่วนผสมลงในภาชนะขวดแก้ว อัดให้เต็มและปิดฝาให้สนิท หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน ตรวจการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และลักษณะปรากฏที่ผิวหน้าของปลาส้มในภาชนะหมัก

2.5 ตรวจคุณภาพปลาส้มทางจุลินทรีย์ ทางกายภาพ และทางเคมี

2.5.1 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแบบ Standard plate count และแบคทีเรียกรดแลกติกตามวิธีการของ Chantharasophon *et al.* (2011) ตรวจแบคทีเรียก่อโรคประกอบด้วย *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, Coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Prachasitthisak *et al.*, 2009: online)

2.5.2 ตรวจโครงสร้างแข็งของปลาส้ม โดยนำปลาส้มปริมาณ 1,000 กรัมใส่หม้อ Pressure cooker เติมน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนมีไอน้ำผ่านวาล์วแรงดันออกมาปรับให้ไอน้ำพ่นอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 30 นาที กรองแยกส่วนของโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่มาล้างทำความสะอาด สะเด็ดน้ำนาน 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่ได้เพื่อคำนวณหาร้อยละของโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่เทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น

2.5.3 นำปลาส้มอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนแห้งสนิท วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ประกอบด้วย pH ปริมาณความชื้น กรด (เทียบกับกรดแลกติก) โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด

(Jodnak, 2013) และคำนวณหา degree of protein hydrolysis เป็นร้อยละของอัตราส่วนของโปรตีนละลายต่อโปรตีนทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Raikate *et al.*, 2011)

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ: วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยคุณภาพทางทางเคมีระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาสด 3 สูตรแบบ One-way analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ Duncan's new multiple range tests

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างปลาสด

3.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างปลาสดในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดยโสธรจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อที่มีรูปร่างเชื้อเป็น Cocci จำนวน 5 ไอโซเลต Tetracocci จำนวน 4 ไอโซเลต และ Lactobacilli จำนวน 9 ไอโซเลต รวม 18 ไอโซเลต

3.1.2 ผลการศึกษาสมบัติการทนเกลือ โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้จำนวน 18 ไอโซเลตไปเพาะในอาหาร MRS broth ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้เจริญในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 7 จำนวน 3 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อที่จัดเรียงเซลล์แบบ Lactobacilli จำนวน 2 ไอโซเลต โดยให้รหัสเชื้อเป็น L1 และ L2 และเชื้อที่จัดเรียงเซลล์แบบ Tetracocci จำนวน 1 ไอโซเลต ให้รหัสเชื้อเป็น P1

3.1.3 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยนำเชื้อรหัส L1, L2 และ P2 ที่คัดแยกได้ไปเพาะเชื้อแบบ Point inoculation บนอาหาร MRS agar ที่เติม Skimmed milk ร้อยละ 1 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน พบว่า แบคทีเรีย L1, L2 และ P1 สร้างโซนใสที่บ่งชี้ว่ามีกิจกรรมการย่อยโปรตีน โดยวัดขนาดรัศมีโซนใสได้ 2.0 ± 0.5 , 1.5 ± 0.5 และ 2.0 ± 0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

3.1.4 ผลการศึกษากิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า

1) แบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 สร้างโซนใสที่บ่งชี้ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยมีขนาดรัศมีโซนใสเป็น 2.0 ± 0.5 , 1.0 ± 0.5 และ 2.5 ± 0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และของ Disc drug ที่เป็น Streptomycin 30 ไมโครกรัมวัดได้ 5.5 ± 0.5 มิลลิเมตร

2) แบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 สร้างโซนใสที่บ่งชี้ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ได้ โดยมีขนาดรัศมีโซนใสเป็น 1.0 ± 0.5 , 1.0 ± 0.5 และ 2.0 ± 0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และของ Disc drug ที่เป็น Kanamycin 30 ไมโครกรัมวัดได้ 4.5 ± 0.5 มิลลิเมตร

3) แบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และของ Disc drug ที่เป็น Kanamycin 30 ไมโครกรัมวัดได้ 5.0 ± 0.2 มิลลิเมตร

3.1.5 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับจีโนม โดยใช้สมบัติตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี พบว่าเชื้อไอโซเลต L1 และ L2 มีสมบัติเป็นแบบเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Table 1) และ P1 มีสมบัติเป็นแบบเชื้อ *Pediococcus* sp. (Table 2)

Table 1 Comparison of cell shape, cell arrangement and biochemical properties of the selected isolates, L1 and L2 with *Lactobacillus* spp.

Properties test	<i>Lactobacillus</i> spp.	L1	L2
Cell shape	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Cell arrangement	Streptobacilli	Streptobacilli	Streptobacilli
Gram	Positive	Positive	Positive
Motility	Negative	Negative	Negative
Catalase	Negative	Negative	Negative
Casein hydrolysis	Positive	Positive	Positive
Growth in 7% NaCl	Positive/negative	Positive	Positive
Growth at 10°C	Positive/negative	Positive	Positive
Growth at 45°C	Positive/negative	Negative	Negative
Growth at pH 4.4	Positive/negative	Positive	Positive
Growth at pH 9.6	Negative	Negative	Negative

Table 2 Comparison of cell shape, cell arrangement and biochemical properties of the selected isolates, P1 with *Pediococcus* spp.

Properties test	<i>Pediococcus</i> spp.	P1
Cell shape	Cocci	Cocci
Cell arrangement	Tetrad	Tetrad
Gram	Positive	Positive
Motility	Negative	Negative
Catalase	Negative	Negative
Casein hydrolysis	Positive	Positive
Growth in 7% NaCl	Positive/negative	Positive
Growth at 10°C	Positive/negative	Positive
Growth at 45°C	Positive/negative	negative
Growth at pH 4.4	Positive	Positive
Growth at pH 9.6	Negative	Negative

ผลการศึกษานี้คล้ายกับผลการศึกษาของ Thongruek *et al.* (2017) ที่ได้คัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกที่เป็นเชื้อเด่นจากตัวอย่างกุ้งส้ม และพบว่าในกุ้งส้มมีแบคทีเรียเด่นจัดจำแนกได้เป็นเชื้อ *Pediococcus argentinicus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* และ *Lact. Plantarum* ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มาจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิต และช่วยให้ผลิตภัณฑ์กุ้งส้มมีลักษณะที่ต้องการและไม่เน่าเสียจากแบคทีเรียก่อโรค ผลที่ได้ครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Hongsachart (2016) ที่คัดแยกได้แบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างปลาส้ม 37 ไอโซเลท แบ่งเป็นรูปร่างกลม 8 ไอโซเลท และรูปร่างแท่ง 29 ไอโซเลท แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลทหมายเลข L8-16 ที่คัดแยกจากปลาส้มแสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp. *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhi*

3.2 ผลการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จากตัวอย่างแป้งเชื้อเหมาแป๊ะ

ผลการคัดเลือกเชื้อจากตัวอย่างแป้งเชื้อเหมาแป๊ะ พบว่าแป้งเชื้อจากเหมาแป๊ะเตาเผาให้เชื้อที่มีลักษณะเป็น *Rhizopus oligosporus* ที่มีการเจริญเติบโตเร็ว เชื้อฟู อัดแน่นเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ในเวลา 2 วัน และบนอาหาร Coconut พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อไม่มีสีเหลืองส้ม และไม่มีการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งแสดงว่าไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chantharasophon *et al.*, (2015) ที่รายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เป็นเชื้อที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อที่คัดแยกได้ครั้งนี้มาจากกล้าเชื้อของเหมาแป๊ะเตาเผา ซึ่งเป็นกล้าเชื้อผงของประเทศอินโดนีเซียแต่เป็นกล้าเชื้อแบบเชื้อผสม การศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้เร็วและสร้างเส้นใยโปร่งฟูและอัดแน่นในจานเพาะเชื้อ ซึ่งคาดว่าจะเป็กล้าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพโดยเฉพาะมีการย่อยโปรตีนได้ดี ซึ่งจะช่วยหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้เร็วขึ้น

3.3 ผลการผลิตปลาส้มโดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้

ผลิตปลาส้ม โดยมีส่วนผสมของหัวและโครงปลาสด 1,000 กรัม กระเทียม 100 กรัม เกลือ 100 กรัม ข้าวเหนียวหนึ่งสุก 150 กรัม และเติมกล้าเชื้อต่างกันโดย สูตร 1 ไม่เติมกล้าเชื้อ สูตร 2 เติมกล้าเชื้อแบบผสมของแบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 และสูตร 3 เติมกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* พบว่าสีและกลิ่นของปลาสดสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีสีปกติ มีกลิ่นหอมของปลาหมักแบบกลิ่นปลาสด ไม่มีกลิ่นเน่าเสีย ลักษณะปรากฏที่ผิวหน้าของปลาสดในภาชนะหมักเป็นปกติ ไม่มีฟอง ไม่มีเส้นใยเชื้อรา ผลที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาของ Giri *et al.* (2012) และ Wu *et al.* (2017) ที่ใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* และใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกล้าเชื้อหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาได้ ซึ่งบ่งชี้ว่าทั้งกล้าเชื้อราและกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้สามารถใช้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาสดได้โดยไม่ทำให้ปลาเน่าเสีย

3.3 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ กายภาพ และทางเคมีของปลาต้ม

3.3.1 หลังจากหมักปลาต้ม 3 สูตรเป็นเวลา 60 วัน ตรวจไม่พบเชื้อทั้งจากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก และแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Coliforms*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

การที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์ครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongruck *et al.* (2017) และ Hongsachart (2016) แต่ผลการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่พบในปลาต้มที่หมักจากวัสดุเศษเหลือของปลาเป็นเวลา 60 วันครั้งนี้ต่างจากการหมักกะปิเป็นเวลา 2-6 เดือนในรายงานของ Kleekayai *et al.* (2014) ที่ยังคงพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติก จึงคาดว่าผลที่ได้ น่าจะเป็นผลลบปลอม (Negative false) เนื่องจากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาแบบปลาต้มครั้งนี้ไม่ได้ผลิตแบบปลอดเชื้อ แต่ในการหมักอาจมีสารบางอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไว้ทำให้ตรวจไม่พบ ดังเช่นในรายงานของ Armin and Marzieh (2018) ที่พบว่าสารสกัดโปรตีนจากวัสดุเศษเหลือจากปลานั้นเป็น เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

3.3.2 ผลการตรวจโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่ของปลาต้ม พบว่าปลาต้มสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่ร้อยละ 8.33 ± 0.01 , 6.67 ± 2.89 และ 0.0 ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่า ปลาต้มสูตร 3 ที่ใช้กล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ในการผลิตไม่มีโครงสร้างแข็งเหลืออยู่หลังจากการต้มอัดไอน้ำ 30 นาที ขณะที่สูตร 2 ที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแบบผสมของ L1, L2 และ P1 ยังคงพบโครงสร้างแข็งเหลืออยู่เช่นเดียวกับสูตร 1 ที่ไม่ได้ใช้กล้าเชื้อ แสดงว่าปลาต้มสูตร 3 มีกิจกรรมการย่อยสลายสูงที่สุด ดังเช่นผลการศึกษาของ Fukuda *et al.* (2014) ที่หมักน้ำปลาด้วยโคจิเชื้อรา และพบว่าน้ำปลาหมักมีการย่อยสลายได้สูงกว่าทำให้น้ำปลาเร็วกว่าและมีกลิ่นรสเฉพาะตัวที่แตกต่างจากการหมักที่ไม่ใช้กล้าเชื้อ นอกจากนี้ยังคาดว่ากระบวนการย่อยสลายกระดูกปลาที่เกิดขึ้นจะทำให้แคลเซียมเปลี่ยนฟอร์มไปอยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่ายขึ้น (Jodnak, 2013)

3.3.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาต้มหลังจากอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่า pH, ปริมาณความชื้น กรด โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด และค่า degree of protein hydrolysis ของปลาต้มสูตร 1 มีค่าเป็น 4.94 ± 0.01 และร้อยละ 5.57 ± 0.51 , 1.72 ± 0.12 , 1.63 ± 0.16 , 16.28 ± 0.73 และ 10.02 ± 1.08 ตามลำดับ ปลาต้มสูตร 2 มีค่าเป็น 4.63 ± 0.14 และร้อยละ 5.71 ± 0.44 , 1.71 ± 0.03 , 2.12 ± 0.03 , 17.03 ± 0.18 และ 12.43 ± 0.23 ตามลำดับ และปลาต้มสูตร 3 มีค่าเป็น 5.30 ± 0.01 และร้อยละ 5.94 ± 1.19 , 1.83 ± 0.08 , 8.90 ± 0.01 , 17.35 ± 0.23 และ 51.31 ± 0.70 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 pH value, moisture, acidity, soluble protein, total protein, and degree of protein hydrolysis of Plaa-som (Formula 1: control; Formula 2: L1+L2+P1 inoculum; and Formula 3: *Rhizopus oligosporus* inoculum) which were fermented for 60 days and dried at 60°C for 48 h

Parameters	Formula 1	Formula 2	Formula 3
pH	4.94±0.01 ^a	4.63±0.14 ^b	5.30±0.01 ^c
Moisture content (%)	5.57±0.51 ^a	5.71±0.44 ^a	5.94±1.19 ^a
Acidity (%)	1.72±0.12 ^a	1.71±0.03 ^a	1.83±0.08 ^a
Soluble protein (%)	1.63±0.16 ^a	2.12±0.03 ^b	8.90±0.01 ^c
Total protein (%)	16.28±0.73 ^a	17.03±0.18 ^{ab}	17.35±0.23 ^b
Degree of protein hydrolysis (%)	10.02±1.08 ^a	12.43±0.23 ^b	51.31±0.70 ^c

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

ผลของค่า pH บ่งชี้ว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกล้าเชื้อผลิตปลาซั่มนั้นจะทำให้มีค่า pH ต่ำลง ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเปรี้ยวเร็วมากขึ้น แต่จะสังเกตได้ว่าการใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เป็นกล้าเชื้อทำให้ค่า pH ต่ำลงน้อยกว่าทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติก แต่ปริมาณกรดที่ได้กลับสูงกว่าแบบไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กันซึ่งทำให้มีกลิ่นและรสเปรี้ยวน้อยกว่า สิ่งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ชัดเจนคือปริมาณโปรตีนละลายและค่า degree of protein hydrolysis ที่พบว่าปลาซั่มสูตร 3 มีค่าสูงกว่าปลาซั่มสูตร 2 และสูตร 1 ตามลำดับ ซึ่งคาดว่ากล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 ในปลาซั่มสูตร 3 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายในกระบวนการหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาสูงกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกและแบบไม่ใช้กล้าเชื้อในปลาซั่มสูตร 2 และสูตร 1 ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับ Chantharasophon *et al.*, (2015) ที่รายงานว่าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส กลูโคอะไมเลส โปรตีเอส และไลเปสได้สูง นอกจากประสิทธิภาพของเอนไซม์จากกล้าเชื้อแล้วคาดว่าจะส่งผลถึงปริมาณสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางเภสัชที่ได้ในผลิตภัณฑ์ด้วย ซึ่งจากการรายงานของ Promchote (2017) พบว่า ถ้าระดับการย่อยของโปรตีนสูงขึ้นแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH เพิ่มขึ้นด้วย จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เป็นกล้าเชื้อที่มีศักยภาพสำหรับผลิตปลาซั่มจากปลาเหลือทิ้งมากกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสมของไอโซเลต L1, L2 และ P1 และแบบไม่ใช้กล้าเชื้อโดยปลาซั่มที่ได้มีค่า pH เป็น 5.30±0.01 ร้อยละของปริมาณความชื้น กรด โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด และ degree of protein hydrolysis เป็น 5.94±1.19, 1.83±0.08, 8.90±0.01, 17.35±0.23 และ 51.31±0.70 ตามลำดับ และควรศึกษาถึงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชที่ได้จากผลิตภัณฑ์ด้วยจะได้ส่งเสริมให้มีการนำไปใช้พัฒนาเป็นอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

- Chantharasophon, K., Prawitthana, S., and Chantarasophon, S. 2017. The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 and soy milk kefir as probiotics in Nile tilapia. Journal of Fisheries Technology Research. 11(1): 46-54. [in Thai]
- Chantharasophon, K., Warong, T., Mapatsa, P., and Leelavatcharamas, V. 2011. High potential probiotic *Bacillus* species from gastrointestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biotechnology. 4(6): 498-505.
- Chantharasophon, K., Wongklom, A., and Chantarasophon, S. 2015. Product development of health food from germinated brown rice by high GABA producing of aromatic yeast from ripe palmyra palm pulp and *Rhizopus oligosporus*. Complete Research Report, Ubon Ratchathani Rajabhat University. 129 p. [in Thai]
- Chompuming, U., Chatsungnoen, T., and Chaithawatwithi, T. 2009. The quality improvement of Plaasom products by biotechnological processes: A case study of Phrae and Pha Yao province. Complete Research Report, Maejo University Phrae Campus. 112 p. [in Thai]
- Fukuda, T., Furushita, M., Shiba, T., and Harada, K. 2014. Fish fermented technology by filamentous fungi. Journal of National Fisheries University. 62(4): 163-168.
- Ghorai, T., Dora, K.C., Sarkar, S., Chowdhury, S., and Bordoloi, R. 2016. Efficacy of biofermenter on shrimp head waste using *Lactobacillus brevis* (MTCC1750). Asian Journal Animal Science. 11(1): 19-23.
- Giri, A., Nasu, M., and Ohshima, T. 2012. Bioactive properties of Japanese fermented fish paste, fish miso, using Koji inoculated with *Aspergillus oryzae*. International Journal of Nutrition and Food Sciences. 1(1): 13-22.
- Hongsachart, P. 2016. Isolation and determination of antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented fish product, Pla-som. KKU Science Journal. 44(2): 318-330.
- Jodnak, S. 2013. Biological activity of Tilapia bone protein hydrolysate and its effect on osteoblasts. Master Nutraceuticals and Functional Foods, Prince of Songkla University. 76 p. [in Thai]
- Kleekayai, T., Saetae, D., Wattanachaiyingyong, O., Tachibana, S., Yasuda, M., and Suntornsuk, W. 2014. Characterization and in vitro biological activities of Thai traditional fermented shrimp pastes. Journal of food science and technology. 52(3): 1839-1848.
- Kongkiattikajorn, J. 2015. Potential of starter culture to reduce biogenic amines accumulation in som-fug, a Thai traditional fermented fish sausage. Journal of Ethnic Foods. 2: 186-194.

- Kutako, M., Tocharoen, T., Sonthi, M., Hiransuchalert, R., and Watanachote, J. 2015. Yield and protein pattern of collagen extracted from Greenback mullet (*Liza subviridis*) scale by different pepsin concentrations. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 43(SUPPL.1): 562-567. [in Thai]
- Noviana, A., Dieny, F.F., Rustanti N., Anjani, G., and Afifah, D.N. 2018. Antimicrobial activity of tempeh gembus hydrolyzate. [Online] Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/116/1/012044> [2018, July 11]
- Phuc, L.H. 2016. Evaluation of the quantities, value and proposal of utilization of fish by-product from fish processing industry in Vietnam. *Journal of Fisheries science and Technology*. 3: 28-37.
- Prachasitthisak, Y., Eamsiri, J., Sajjabut, S., Rojekittikhun, W., and Pubumpen, S. 2009. Hygienic quality improvement of fermented fish (Pla-som). The 11st Nuclear Science and Technology Conference. [Online] Available from http://www.nst.or.th/nstconf/nst/nst11/BA/BA10_%20Yuthapong_%20Prachasitthisak.pdf. [2017, June 12] [in Thai]
- Prasetyo, T., Ardianto, F., Pawitra, M., and Sumardiono, S. 2018. Improvement the chemical properties of cassava through microbial fermentation using *Rhizopus oligosporus*. [Online] Available from: https://www.mateconferences.org/articles/.../abs/.../mateconf_rsce2018_01025.html [2018, July 15]
- Promchote, P.T. 2017. Chemical compositions and antioxidant properties of Pla-ra, Thai indigenous fermented fish product. *Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University*. 19(2): 159-172. [in Thai]
- Raikate, P., Rugchat, O., Singanusong, R., and Noitup, P. 2011. Protein hydrolysate from fish waste: Conditions for red tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera hydrolysis with papain. *NU Science Journal*. 8(1): 101-108.
- Rubina, N., Muhammad, N., Muhammad, I., and Quratulain, S. 2018. Nutritional enhancement of barley in solid state fermentation by *Rhizopus oligosporus* ML-10. [Online] Available from: <https://juniperpublishers.com/nfsij/pdf/NFSIJ.MS.ID.555700.pdf> [2018, July 11]
- Srisakultiew, P., Kawborisut, S., and Srisathaporn, A. 2014. Preliminary data of low cost fish feed from tilapia culture industries. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 42(1): 773-777. [in Thai]

- Thongruek, K., Saelao, S., Sumpavapol, P., Benjakul, and S., Maneerat, S. 2017. Monitoring of changes in lactic acid bacteria during production of Thai traditional fermented shrimp (Kung-som) by culturing method and PCR-DGGE technique. *Songklanakarin Journal Science and Technology*. 39(1): 41-47. [in Thai]
- Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K., and Whitman, W.B., editors. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume three, The Firmicutes. Dordrecht; New York: Springer.
- Wu, R., Chen, L., Liu, D., Huang, J., Zhang, H., Xiao, X., Lei, M., Chen, Y., and He, H. 2017. Preparation of antioxidant peptides from salmon by-products with bacterial extracellular proteases. *Marine drugs*. 15(4): 1-19.
- Zhang, F., Wang, A., Li, Z., He, S., and Shao, L. 2011. Preparation and characterization of collagen from freshwater fish scales. *Food and Nutrition Sciences*. 2: 818-823.

การเตรียมต้นฉบับ

เรื่องเต็มวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

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

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

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

2. รูปแบบ

2.1 **ตัวอักษร** ใช้ตัวอักษร Cordia New

2.2 **ชื่อเรื่อง** มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พิมพ์ตัวหนาขนาด 18 pt จัดให้อยู่กึ่งกลางหน้า

2.3 **ชื่อผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัย** ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ พิมพ์ตัวอักษรหนาขนาด 14 pt จัดให้อยู่กึ่งกลางหน้า

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

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

2.6 **เนื้อหาในบทคัดย่อและเรื่องเต็ม** ให้ใช้ตัวอักษรขนาด 15 pt

2.7 **เนื้อหาในเรื่องเต็ม**

- ชื่อเรื่อง ต้องมีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ
- ชื่อ – ที่อยู่ ผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัย ให้บอกรายละเอียด (footnote) โดยใช้หมายเลขกำกับ
- บทคัดย่อ เป็นการเขียนสรุปสาระสำคัญของเรื่อง โดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผลการวิจัย

- คำนำ อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์ของการวิจัย ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ โดยรวมการตรวจเอกสาร (Literature review) ถึงผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องผู้อื่นได้ทำไว้ด้วย

- อุปกรณ์และวิธีการ ควรจะประกอบด้วยคำอธิบายเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง และคำอธิบายถึงขอบเขตของการวิจัย วิธีการที่ใช้ในการทดลอง แต่ไม่จำเป็นต้องอธิบายวิธีการที่เป็นแบบฉบับซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป

- ผลการวิจัย ควรเขียนให้กระชับและเป็นขั้นตอนที่เหมาะสม ถ้าเป็นไปได้ควรเสนอในรูปแบบของ ตาราง กราฟ หรือรูปภาพ

- **กราฟ รูปภาพและตาราง ให้เขียนคำอธิบายเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด**

- **วิจารณ์ผล** ควรประกอบด้วยหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลองที่อาจสนับสนุนหรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน ควรเน้นถึงปัญหาหรือโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่วิจัยตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคต และแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์

- **สรุปผล** อาจรวมกับวิจารณ์ผล โดยสรุปสาระสำคัญของเนื้อหาเพียงสั้น ๆ

- คำขอบคุณ/กิตติกรรมประกาศ อาจมีหรือไม่มีก็ได้

- เอกสารอ้างอิง: วิธีเขียนดูตามตัวอย่าง 2.9

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

2.9 เอกสารอ้างอิง ซึ่งได้อ้างอิงในเนื้อเรื่องและบรรณานุกรม ให้เขียนเป็น**ภาษาอังกฤษทั้งหมด** ดังนี้

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

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

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

2.9.2 การอ้างอิงในบรรณานุกรม

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

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

- **เรียงลำดับตัวอักษรและสระ** ตามด้วยจำนวนผู้วิจัย/ผู้เขียน กรณีเป็นคนเดียวกันให้เรียงตามปี

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

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

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

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

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

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

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

144 p.

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

2.10 **ต้นฉบับที่ไม่ได้จัดเตรียมตามคำแนะนำจะถูกส่งคืนกลับเพื่อให้แก้ไขทันที**

3. งานเขียนที่จะได้รับการตีพิมพ์ต้องผ่านการกลั่นกรองและประเมินคุณภาพจากกองบรรณาธิการและผู้ทรงคุณวุฒิ

4. งานเขียนที่เสนอเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ต้องไม่อยู่ในระหว่างการเสนอเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารอื่น หรือตีพิมพ์ที่ใดมาก่อนแล้ว

Guide for Authors

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

Preparation and Submission of Manuscripts

Authors submitting manuscripts for publication must follow the following guidelines.

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

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

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

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

2. Format

2.1 Cordia New font must be applied.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.9.2 Citation in reference list;

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

Reference to a journal article:

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

Reference to article or abstract in conference proceedings:

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

Reference to a book:

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

Reference to an edited book:

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

Reference to an electronic data source):

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

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

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

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



ประกาศมหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิเพื่ออ่านผลงานทางวิชาการ

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

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

๑. ศาสตราจารย์ ดร.ทวนทอง จุฑาเกตุ
๒. ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต
๓. ศาสตราจารย์ ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล
๔. ศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี จุลละคร
๕. ศาสตราจารย์ ดร.เสาวภา อังสุภานิช
๖. ศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ลำยอง
๗. ศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร
๘. รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน
๙. รองศาสตราจารย์ ดร.คเชนทร เณิมวัฒน์
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 มั่นทะจิตร
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.บัญญัติ มนเทียรอาสน์
๕๐. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ
๕๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประจวบ ฉายบุ
๕๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ
๕๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ศักดิ์ เหล่าดี
๕๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธี แก้วเนิน
๕๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รัชต์ ชัดติยะ
๕๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล
๕๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย วรวัฒนเมธีกุล
๕๘. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ เจ๊ะโละ
๕๙. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ
๖๐. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติวัฒน์ พิทักษ์พล
๖๑. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี
๖๒. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา เดวิดสัน
๖๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม
๖๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สำเนาวิ เสาวกุล
๖๕. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ จันทร์ดำ
๖๖. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภินันท์ สุวรรณรักษ์
๖๗. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ สงรักษ์
๖๘. ดร.พุทธ 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://http://www.fishtech.mju.ac.th/WEB/Journal_FT/main/index.php



วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง

JOURNAL OF FISHERIES TECHNOLOGY RESEARCH

ปีที่ 13 เล่มที่ 2

กรกฎาคม - ธันวาคม 2562

Volume 13 Number 2

July - December 2019

สารบัญวารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2562

สารบัญ

บรรณาธิการ

บทความวิจัย

	หน้า
การศึกษาอาหารที่เหมาะสมและต้นทุนในการอนุบาลลูกปลาเลียหินวัยรุ่น	1
เกรียงไกร สีตะพันธุ์ สิทธิศักดิ์ ปิ่นมงคลกุล เจนจิรา แก้วตีบ อัฐสระรวม แสนสุภา และจักรพันธ์ สุวานิจสรณ์ ผลของสื่อน้ำเทียมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างทริปซิน ไคโมทริปซิน (T/C ratio) และการเจริญเติบโต ของปลากะพงขาววัยรุ่นที่เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน	11
วิญญู บุญประเสริฐ ประจวบ ฉายบุญ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน จงกล พรมยะ และชนกันต์ จิตมนัส การเจริญเติบโตของปูทะเล (<i>Scylla spp.</i>) หลังการลอกคราบ	25
ภัทราวดี ศรีมีเทียน และจิตติมา สุวรรณมาลา จุลกายวิภาคระบบย่อยอาหารของกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	37
สุวลี มะอนันต์ และจิราพร โรจน์ทินกร มิถุนวิทยาและสุขภาพของรังไข่ปลาเกล็ดเหลือง <i>Hemibagrus filamentus</i> (Fang and Chaux, 1949) จากแม่น้ำตาปีภาคใต้ ของประเทศไทย	46
ปิยากร บุญยัง ศิลปชัย เสนารัตน์ พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ เจษฎา เกษตระทัต วรณีย์ จิรอังกรสกุล พหล โกสียะจินดา และธีรภมร เพ็งสกุล พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาชิวทอง <i>Rasbora einthovenii</i> บริเวณป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส	58
นุรฮัน ยีแสม สิทธิศักดิ์ จันทรรัตน์ และพัน ยี่ล้น ลักษณะโครโมโซมเครื่องหมายและแคโรไทป์ของปลาหลดจุด (<i>Macrognathus siamensis</i>) และปลาหลดมุกเขา (<i>M. circumcinctus</i>)	69
กฤติมา เสาวกุล และสำเนา เสาวกุล การติดเชื้อปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>) ด้วย <i>Streptococcus agalactiae</i> โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก	81
ศยามล รักศรี รัชต์ ชัดติยะ ศุภรัตน์ บุญยยาตรา และภูริกร วงศ์เสถียร การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียกรดแลคติกและราเหมาเป็นหมักวัสดุเพาะเชื้อจากปลา	91
เกศินี จันทรโสมณ วรพล สุพัฒน์ และเสรี จันทรโสมณ	