

ความชุกชุมของปรสิตในปลาสดจากบ่อเลี้ยงปลาที่ธรรมชาติ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ
Prevalence of Parasites in *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910) from Semi Natural Pond
at Muang District, Samut Prakarn Province

ศุภมาส ศรีวงศ์พุก^{1*}, เกียรติศักดิ์ แก้วคำนวน¹ และเจนวิทย์ จตุทอง¹
Supamas Sriwongpuk^{1*}, Kiatisak Kawkumnuan¹ and Janwitth Chatuthong¹

¹คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12130

¹Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12130

*Corresponding author: supamas_s@rmutt.ac.th

ABSTRACT

This research aimed to study on prevalence of infection, identify and characterize of the parasites residing in *Trichogaster pectoralis* Regan, 1910 from the semi natural pond at Tumbol Bang Muang, Muang District, Samut Prakarn Province during June to October 2019 for a period of five months. It has been found that total of 50 investigating Pla Sa-Lid, forty-one of fishes were been found to be infected with the parasites (82% prevalence of parasites infection). Two phylum of ectoparasites were observed at the skin as following: Phylum Ciliophora (Ciliate Protozoa) was *Trichodina* sp. (14%) and Phylum Arthropoda (Branchiura) was *Argulus indicus* (2%) and two phylum of endoparasites were Phylum Acanthocephala was *Pallisentis nagpurensis* (22%) in liver and Phylum Platyhelminthes (Trematode) was *Clinostomum philippinensis* (44%) in stomach and intestine. The highest number of infected parasite was *C. philippinensis* (44%) and the least number was *A. indicus* (2%). These parasites destroyed the health of the fish and resulted a disease in fish and get the low productivity.

Keywords: prevalence, parasites, *Trichogaster pectoralis*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกชุม และการจำแนกชนิดของปรสิตที่พบในปลาสดจากบ่อเลี้ยงปลาที่ธรรมชาติ ตำบลบางเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2562 เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบปลาที่มีปรสิตจำนวน 41 ตัว จากตัวอย่างปลาทั้งหมด 50 ตัว คิดเป็นค่าความชุกชุมของปรสิต เท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ เป็นปรสิตภายนอกพบที่บริเวณผิวหนังปลา จำนวน 2 ไฟลัม คือ Phylum Ciliophora กลุ่มซิลิเอตโปรโทซัว ได้แก่ *Trichodina* sp. (14 เปอร์เซ็นต์) และ Phylum Arthropoda กลุ่มบรานชิยูรา ได้แก่ *Argulus indicus* (2 เปอร์เซ็นต์) และปรสิตภายใน จำนวน 2 ไฟลัม คือ Phylum Acanthocephala กลุ่มปรสิตหัวหนาม ได้แก่ *Pallisentis nagpurensis* (22 เปอร์เซ็นต์) พบอยู่ในเนื้อเยื่อตับ และ Phylum Platyhelminthes กลุ่มพยาธิใบไม้ ได้แก่ *Clinostomum philippinensis* (44 เปอร์เซ็นต์) พบในกระเพาะอาหารและลำไส้ ชนิดของปรสิตที่พบมากที่สุดจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ *C. philippinensis* (44 เปอร์เซ็นต์) ส่วนปรสิตที่พบน้อยที่สุด คือ *A. indicus* (2 เปอร์เซ็นต์) ปรสิตเหล่านี้จะทำลายสุขภาพของปลา เป็นสาเหตุทำให้ปลาป่วยเป็นโรคและส่งผลให้ผลผลิตต่ำ

คำสำคัญ: ความชุกชุม, ปรสิต, ปลาสด

บทนำ

จังหวัดสมุทรปราการหรือที่เรียกกันเป็นสามัญทั่วไปว่า “เมืองปากน้ำ” เพราะตั้งอยู่ปากน้ำเจ้าพระยา เป็นเมืองสำคัญทางประวัติศาสตร์มาตั้งแต่โบราณ เป็นเมืองหน้าด่านทางทะเลที่มีความสำคัญตลอดมาทุกยุคทุกสมัย (Jamchumrus, n.d.) อยู่ภายใต้อิทธิพลของลมมรสุมซึ่งพัดประจำเป็นฤดูกาล 2 ชนิด คือพัดจากทิศตะวันออกเฉียงเหนือในฤดูหนาวเรียกว่าลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ อิทธิพลของลมนี้ทำให้บริเวณจังหวัดสมุทรปราการมีอากาศหนาวเย็น และแห้งแล้ง กับมรสุมอีกชนิดหนึ่งคือมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ซึ่งพัดจากทางทิศใต้เป็นส่วนใหญ่ในฤดูฝน ทำให้อากาศชุ่มชื้น และมีฝนตกทั่วไป (Meteorological Department, 2017)

ปลาสด หรือปลาใบไม้เป็นปลาน้ำจืดซึ่งเป็นปลาพื้นบ้านของประเทศไทย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในลุ่มน้ำภาคกลาง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichogaster pectoralis* มีลำตัวคล้ายปลากระดี่หม้อ แต่มีขนาดใหญ่กว่า ลำตัวมีลักษณะแบน มีส่วนหัวและหางเรียว และส่วนกลางลำตัวกว้าง ลำตัวมีสีเขียวอมเทา หรือมีสีคล้ำเป็นพื้น และมีสีเขียวเข้มทางด้านซ้าย มีแถบสีดำพาดขวางตามแนวยาวจากส่วนหัวถึงโคนหาง ข้างละ 1 แถบ และมีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดเฉียงบริเวณลำตัว (Wiwutanachaisate, n.d.) นิยมเลี้ยงกันมากบริเวณภาคกลาง ส่วนที่พบในประเทศไทยเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา และฟิลิปปินส์นั้น เป็นพันธุ์ปลาที่ส่งไปจากประเทศไทย สำหรับแหล่งปลาสดที่มีชื่อเสียงเป็นที่รู้จักว่ามีรสชาติดี เนื้ออร่อย คือ ปลาสดบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ แต่ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมได้ขยายตัวอย่างแพร่หลาย ทำให้น้ำธรรมชาติที่จะระบายลงสู่บ่อเลี้ยงปลาสดมีคุณสมบัติไม่เหมาะสม นอกจากนี้ พื้นที่ดินพรุทางภาคใต้ในเขตจังหวัดนราธิวาสซึ่งเป็นดินเปรี้ยวก็สามารถใช้เลี้ยงปลาสดได้ เพราะปลาสดเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย อดทนต่อความเป็นกรด และน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยได้ดี กินแพลงก์ตอนเป็นอาหาร ต้นทุนการผลิตต่ำ โดยจะเลี้ยงอยู่ในนา คนเลี้ยงปลาสดเรียกว่า ชาวนาปลาสด และบ่อเลี้ยงปลาสด เรียกว่า แปลงนาปลาสดหรือล้อมปลาสด กรมประมงจึงได้ส่งเสริมให้เลี้ยงปลาสดในพื้นที่จังหวัดอื่น เช่น จังหวัดสมุทรสาคร เพื่อเพิ่มผลผลิตปริมาณเพียงพอต่อการบริโภค และเป็นสินค้าส่งออกโรปลูกผลิตภัณฑ์ปลาสดเค็มตากแห้ง (Wiwutanachaisate, n.d.)

ปรสิตเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อสัตว์น้ำเป็นจำนวนมาก ทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติและภายในฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะปรสิตจะไปแย่งอาหาร ดูดเลือดหรือของเหลวในร่างกายของเจ้าบ้าน ทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ ตลอดจนไปขัดขวางการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ มีภูมิคุ้มกันโรคลดต่ำ ก่อให้เกิดการติดเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ ได้ง่าย (Sirikanchana, 2003) เนื่องจากปลาสดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของจังหวัดสมุทรปราการ และการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและการแพร่กระจายของปรสิตในปลาสดมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ขึ้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในด้านปรสิตวิทยาในปลาสดหรือสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ การป้องกันและแก้ไขปัญหาโรคปรสิตในปลาสดได้ และเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตปลาสดได้อีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างปลาสดด้วยวิธีการตกปลาจากบ่อเลี้ยงปลาถึงธรรมชาติ ตำบลบางเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ เดือนละ 10 ตัว ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม 2561 เป็นเวลา 5 เดือน รวมตัวอย่างปลาทั้งสิ้น 50 ตัว ทำให้ปลาหมดความรู้สึกรู้สึกโดยการแช่ปลาลงในกระบอกน้ำแข็ง นำตัวอย่างปลามาชั่งน้ำหนัก (กรัม) และวัดความยาวเหยียด (Total length, เซนติเมตร) แล้วนำมาตรวจหาปรสิตภายนอกบริเวณลำตัว ตา ปาก ช่องปาก ช่องจมูก ครีบต่าง ๆ ขูดเมือกบริเวณลำตัว ตัดซี่ เหยือกใส่จานแก้วที่มีน้ำสะอาดแล้วนำไปตรวจหาปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) และตรวจหาปรสิตภายในโดยผ่าช่องท้อง ตรวจดูอวัยวะภายใน เยื่อช่องท้อง กล้ามเนื้อ เมื่อพบปรสิตจะบันทึกภาพปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบ (compound microscope) ชนิดที่สามารถบันทึกภาพได้ (Carl ZEISS รุ่น Primo Star M. 415500-0001 6VDC 30W) ที่กำลังขยาย 4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ชนิดของปรสิตโดยจำแนกตามกลุ่มของปรสิต คือ ปรสิตกลุ่มโปรโตซัวใช้เอกสารของ Sirikanchana (2003) และ Purivirojkul (2013) ปรสิตตัวแบนกลุ่มโมโนจีเนีย กลุ่มไดจีเนียใช้เอกสารของ Sirikanchana (2003) Purivirojkul (2013) และ Kitagawa et al. (2003) ปรสิตกลุ่มพยาธิห้วยหนามใช้เอกสารของ Sriwongpuk (2013) และปรสิตกลุ่มอาร์โธพอดใช้เอกสารของ Hoffman (1977); Sirikanchana (2003) และ Purivirojkul (2013) นำข้อมูลปรสิตมาคำนวณหาค่าความชุกชุมหรือค่าร้อยละของปลาที่พบปรสิตแต่ละชนิด (prevalence of infection) และหาค่าความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิต (mean intensity) ตามวิธีการของ Margolis et al. (1982) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{prevalence of infection} &= \frac{\text{จำนวนปลาที่พบปรสิตแต่ละชนิด} \times 100}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \\ \text{mean intensity} &= \frac{\text{จำนวนปรสิตแต่ละชนิดที่พบทั้งหมด}}{\text{จำนวนปลาที่พบปรสิตแต่ละชนิด}} \end{aligned}$$

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดข้อมูลความชุกชุมของปรสิตโดยใช้สถิติทดสอบแบบพารามิเตอร์ด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาความชุกชุมของปรสิตในปลาสด จากบ่อเลี้ยงปลากุ้งธรรมชาติ ตำบลบาง อำเภอมือง จังหวัดสมุทรปราการ ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 จากตัวอย่างปลาสดขนาด 15.29 ± 1.31 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 73.02 ± 19.37 กรัม รวมทั้งสิ้น 50 ตัว นำมาตรวจหาปรสิตที่อวัยวะต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกตัวปลา พบปรสิตทั้งหมด 4 ไฟลัม 4 ชนิด ได้แก่ Phylum Ciliophora, Phylum Platyhelminthes, Phylum Acanthocephala และ Phylum Arthropoda (Table 1-2)

1. *Trichodina* sp. หรือเห็บระฆัง เป็นปรสิตพวกซีลิเอตโพรโทซัว พบที่บริเวณผิวหนัง ลำตัว และซีเหงือกของปลา ซึ่งทำให้เกิดโรค Trichinosis พบได้ทั้งในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม (Sirikanchana, 2003) เช่น บริเวณซีเหงือก และผิวหนังของลูกปลาปัก หรือในปลากัดจืดจากตลาดปลาสดงามในเขตกรุงเทพฯ (Purivirojku, 2013)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบ *Trichodina* sp. ที่บริเวณผิวหนังลำตัว และซีเหงือกของปลาสดจำนวน 7 ตัว จากตัวอย่างปลาสดทั้งหมด 50 ตัว คิดเป็นร้อยละของปรสิตที่พบ (Prevalence) เท่ากับ 14 ปรสิตที่พบมีจำนวน 155 ตัว มีค่า Mean Intensity เท่ากับ 22.14 (Table 1) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปรสิตดังกล่าวที่ทำการสำรวจทั้ง 5 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 2) ปรสิตดังกล่าวสามารถทำลายเนื้อเยื่อบริเวณที่เกาะ เช่น ทำให้เกิดบาดแผลบริเวณผิวหนัง ครีบ ทำให้เกล็ดหลุด หรือถ้าเข้าเกาะที่ซีเหงือกจะทำให้เกิดบาดแผลมีเลือดซึมออกจากเหงือก และไปกีดขวางการหายใจ ทำให้ปลาอ่อนเพลีย เฉื่อยชา เป็นช่องทางให้เชื้อโรคชนิดอื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือไวรัส เข้าติดเชื้อต่อไปได้ (Purivirojku, 2013)

2. *Clinostomum philippinensis* เป็นปรสิตตัวแบนใน Phylum Platyhelminthes กลุ่มทรีมาโทด (Trematode) มีรูปร่างแบนคล้ายใบไม้ จึงมีชื่อเรียกทั่ว ๆ ไปว่าพยาธิใบไม้ เป็นพยาธิใบไม้ขนาดกลาง จากการศึกษาศพปรสิต *C. philippinensis* เฉพาะที่บริเวณลำไส้ของปลาสดจำนวน 22 ตัว จากตัวอย่างปลาทั้งหมด 50 ตัว คิดเป็นร้อยละของปลาที่พบปรสิตเท่ากับ 44 ปรสิตที่พบมีจำนวน 185 ตัว คิดเป็นความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิตที่พบเท่ากับ 8.41 (Table 1) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปรสิตที่สำรวจพบในเดือนมิถุนายน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับที่พบในเดือนกรกฎาคม สิงหาคม และตุลาคม แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับเดือนกันยายน (Table 2) ซึ่งเป็นช่วงที่พบปรสิตเป็นจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับฤดูที่พบปรสิต พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Khamboonruang (2006) ซึ่งรายงานว่า พบปรสิตชนิดดังกล่าวในช่วงเดือนมิถุนายน และสิงหาคมถึงตุลาคม และจากการศึกษาครั้งนี้พบ *C. philippinensis* เฉพาะที่บริเวณในลำไส้ของปลาสดเท่านั้น ปรสิตที่พบในปลาแต่ละตัวมีจำนวนค่อนข้างสูง และพบมากเป็นอันดับ 1 ของปรสิตที่พบทั้งหมด (Table 1) นอกจากนี้ Kitagawa *et al.* (2003) ยังได้รายงานว่าปรสิตในสกุล *Clinostomum* บางครั้งอาจติดต่อมาสู่คน โดยคนอาจเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ (accidental host) ซึ่งพบผู้ป่วยที่ประเทศอินเดีย และประเทศญี่ปุ่นที่ได้รับปรสิตนี้เข้าไป จะเกิดอาการเป็นแผลบริเวณคอหอย มีอาการไอ มีเสมหะเป็นเลือด และระคายเคืองในคอ ดังนั้น ผู้บริโภคปลาควรนำปลาสดมาทำให้สุกด้วยความร้อน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของปรสิตเข้าสู่ร่างกายขณะรับประทานปลาดังกล่าว

3. *Pallisentis nagpurensis* เป็นปรสิตหัวหนามในไฟลัมอะแคนโทเซฟาเลา (Acanthocephala) จากการศึกษานี้พบปรสิต *P. nagpurensis* ในปลาสดจำนวน 11 ตัว จากตัวอย่างปลาสดทั้งหมด 50 ตัว คิดเป็นร้อยละของปลาที่พบปรสิต เท่ากับ 22 ปรสิตที่พบมีจำนวน 29 ตัว คิดเป็นความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิตที่พบ เท่ากับ 2.64 (Table 1) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปรสิตดังกล่าวที่สำรวจทั้ง 5 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 2) ปรสิตดังกล่าวพบเป็นปรสิตภายในตัวปลา มักพบได้ในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลาทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเลในยุโรป และเอเชีย (Sirikanchana, 2003) จากการศึกษานี้พบปรสิตดังกล่าวเป็นซิสต์ (cyst) ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อ

ของปลาสด ซึ่งถือว่าเป็นระยะตัวอ่อนของพยาธิหัวหนาม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถพบปรสิตดังกล่าวในปลาชนิดอื่น ๆ อีก เช่น ในปลาไส้ปลาช่อน *Ophicephalus striatus* จากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณลำแม่ลาการ้อง จังหวัดสิงห์บุรี (Sirikanchana, 2003) ในกระเพาะอาหารปลาสด จากอ่างเก็บน้ำห้วยจระเข้มาก ตำบลบ้านบัว อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งจะพบทั้งปรสิตเพศผู้และเพศเมียซึ่งมีไข่อยู่ในท้องด้วย (Sriwongpuk, 2013) แต่ Sirikanchana (2003) รายงานว่า ในช่วงเดือนกรกฎาคมเป็นฤดูแพร่พันธุ์ของปรสิตดังกล่าวในปลาช่อนจากลำแม่ลาการ้อง ซึ่งปรสิตตัวเมียจะมีไข่แก่มากที่สุด และจากการศึกษาในครั้งนี้พบปรสิตดังกล่าวในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม ลักษณะปรสิตที่พบเป็นตัวอ่อนอยู่ในซิสต์ ไม่พบระยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าปรสิตชนิด *P. nagpurensis* สามารถแพร่กระจายได้ในปลาหลากหลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มปลากินเนื้อ ผู้บริโภคเมื่อรับประทานปลาควรทำให้สุกด้วยความร้อนจึงจะปลอดภัยต่อสุขภาพ

4. *Argulus indicus* เป็นปรสิตในกลุ่ม Arthropoda พบที่บริเวณลำตัวของปลาสด ปรสิตชนิดนี้จะรบกวนทำความเดือดร้อนให้กับปลาเจ้าบ้าน ทำให้เกิดความระคายเคือง และมักจะว่ายน้ำเอาตัวบริเวณที่มีปรสิตเกาะไปอยู่กับข้างบ่อหรือวัตถุในน้ำ เพื่อให้ปรสิตหลุดออกจากตัว จึงทำให้เกิดเป็นบาดแผล และเป็นสาเหตุให้เชื้อราเข้าแทรก เกิดโรครະบาดได้ นอกจากนี้พวกที่เกาะตามซี่เหงือกจะทำให้เกิดเหงือกอักเสบ ซี่เหงือกเชื่อมติดกัน เหงือกเสื่อม ทำให้บริเวณแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนลดน้อยลง ปลาหายใจไม่สะดวก ในที่สุดปลาจะตายเพราะขาดออกซิเจน (Sirikanchana, 2003)

จากการศึกษาพบปรสิต *A. indicus* ในปลาสดจำนวน 1 ตัว จากตัวอย่างปลาสดทั้งหมด 50 ตัว คิดเป็นร้อยละของปลาที่พบปรสิต เท่ากับ 2 ปรสิตที่พบมีจำนวน 1 ตัว คิดเป็นความหนาแน่นเฉลี่ยของปรสิตที่พบ เท่ากับ 1 (Table 1) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปรสิตดังกล่าวที่สำรวจทั้ง 5 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 2) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบ *A. indicus* ที่บริเวณผิวของลำตัวปลาสดเพียงเดือนเดียว คือ ในเดือนสิงหาคม จากปลาสดเพียงตัวเดียว และพบปรสิตแค่ 1 ตัวเท่านั้น จากรายงานพบปรสิตสกุล *Argulus* เพียง 4 ชนิด ในประเทศไทย คือ *A. foliaceous*, *A. indicus*, *A. siamensis* และ *A. alosae* (Sirikanchana, 2003) สามารถพบได้ทั้งในปลาน้ำจืด และปลาทะเล มีรายงานว่าพบ *A. foliaceous* ในปลานิล *A. siamensis* ในปลาชะโด ปลานวลจันทร์ (Purivirojkul, 2013) ส่วนที่พบในปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาตะเพียน ปลาทอง ปลาไน ปลาหมอ (Sirikanchana, 2003) หรือปลาอื่น ๆ มักจะยังไม่มียางานการจำแนกถึงระดับชนิด ซึ่งปรสิตทั้ง 4 ชนิดนี้ จะมีลักษณะและส่วนประกอบของอวัยวะในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (respiratory area) และอวัยวะในการเกาะดูด (suction cup) ที่แตกต่างกัน

สรุป

การศึกษาความชุกชุมปรสิตในปลาสด จากบ่อเลี้ยงปลากุ้งธรรมชาติ ตำบลบางเมือง อำเภอเมืองจังหวัดสมุทรปราการ ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบปลาที่มีปรสิตจำนวน 41 ตัว จากตัวอย่างปลาสดทั้งหมด 50 ตัว พบเป็นปรสิตภายนอก จำนวน 2 ไฟลัม คือ Phylum Ciliophora กลุ่มซีเลียโตโพโซซัวพบบริเวณผิวตัวปลาได้แก่ *Trichodina* sp. และ Phylum Arthropoda พวกลำตัวเป็นข้อปล้อง ได้แก่ *Argulus indicus* และปรสิตภายใน จำนวน 2 ไฟลัม คือ Phylum Acanthocephala ได้แก่ *Pallisentis nagpurensis* อยู่ในเนื้อเยื่อตับ และ Phylum Platyhelminthes ได้แก่ *Clinostomum philippinensis* พบในกระเพาะอาหารกับลำไส้ ชนิดของปรสิตที่พบมากที่สุดจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือ *C. philippinensis* คิดเป็นค่าร้อยละของปลาที่พบปรสิต หรือค่าความชุกชุม (prevalence) เท่ากับ 44 ส่วนปรสิตที่พบน้อยที่สุด คือ *A. indicus* คิดเป็นค่าร้อยละของปลาที่พบปรสิตแต่ละชนิดเท่ากับ 2

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ในการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Hoffman G.L. 1977. *Argulus*, a Branchiuran Parasite of Freshwater Fishes. U.S. Fish and Wildlife Service. Fish Disease Leaflet 49, 9 pp.
- Jamchumrus, R. n.d. History of Samut Prakan Province. Available source: [https:// sites.google.com/site/prakancity/prawati-phu-cad-tha](https://sites.google.com/site/prakancity/prawati-phu-cad-tha), July 12, 2019. (in Thai)
- Khamboonruang, P., P. Karnasuta, W. Purivirojkul and P. Sirikanchana. 2006. Parasite of Pla Kae *Bagarius bagarius* (Hamilton-Buchanan) from Mekong River at Amphoe Chiang Khong Chiang Rai province. Available source: <http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4404045.pdf>, July 12, 2019. (in Thai)
- Kitagawa, N., M. Oda, T. Totolei, S. Washizaki, M. oda and T. Kifune. 2003. Lidocaine Spray Used to Capture a Live Clinostomum Parasite Causing Human Laryngitis. American Journal of Otolaryngology. 24(5): 341-343.
- Margolis, L., G.W. Esch, J.C. Holmes, A.M. Kuris and G.A. Schad. 1982. The use of ecological term in parasitology (report of an Ad Hoc committee of the American Society of Parasitologists). J. Parasitol. 68(1): 131-133.
- Meteorological Department. 2017. Samut Prakan Province Climate. Available source: http://climate.tmd.go.th/data/province/central/climate_samutprakarn.pdf, July 12, 2019. (in Thai)
- Purivirojkul, W. 2013. Parasitology of Aquatic Animals. Kasetsart University Press, Bangkok. 655 pp. (in Thai)
- Sirikanchana, P. 2003. Parasites of Aquatic Animal. 6th edition. Sky Word Advertising Partnership, Bangkok. 270 pp. (in Thai)
- Sriwongpuk, S. 2013. Parasites of knife fish (*Notopterus notopterus*, Pallas) from the Huajarake Mark Reservoir in Buriram province. Khon Kaen Agr. J. 41 Suppl. 1: 446-452. (in Thai)
- Wiwutanachaisate, U. n.d. Snake-skin gourami culture. Available source: http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/fish/f_salid.pdf, July 12, 2019. (in Thai)

Table 1 Species and Mean intensity of parasites in Snake Skin Guarami (*Trichogaster pectoralis*) from Semi natural pond in Samut Prakarn Province.

Parasite Species	Infected Location	No. of fish Infected	Total parasites	Prevalence (%)	Mean intensity
<i>Trichodina</i> sp.	skin, gill filament	7	155	14	22.14
<i>Clinostomum philippinensis</i>	stomach, intestine	22	185	44	8.41
<i>Pallisentis nagpurensis</i>	liver	11	29	22	2.64
<i>Argulus indicus</i>	skin	1	1	2	1.00

Table 2 Prevalence of parasites in Snake Skin Guarami (*Trichogaster pectoralis*) from Semi natural pond in Samut Prakarn Province.

Time	<i>Trichodina</i> sp.	<i>C. philippinensis</i>	<i>P. nagpurensis</i>	<i>A. indicus</i>
June	0 ^a	0.000±0.0000 ^a	1.000±1.3333 ^a	0.100±0.3162 ^a
July	0 ^a	4.700±7.2426 ^{ab}	0.600±1.12649 ^a	0 ^a
August	4.600±9.9800 ^a	4.100±6.2441 ^{ab}	0.300±0.9487 ^a	0 ^a
September	6.800±10.7992 ^a	5.300±5.2926 ^b	0.700±1.4944 ^a	0 ^a
October	0.100±10.0161 ^a	4.400±4.2740 ^{ab}	0.300±0.948 ^a	0 ^a

Different letters within a column indicate value differences determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) at the 95 percent level of significance.

ผลของอาหารต่างชนิดต่อการเจริญเติบโตและสีในการเลี้ยงปลาการ์ตูนแดง
Effect of Different Diets on Growth Performance and Coloration of Spinecheeked
Clownfish (*Premnas biaculeatus* Bloch, 1790) Culture

กิตติมา วานิชกุล^{1*}, ธนวัตร แก้วบริบูรณ์², ชมพูนุท สามห้วย² และโสภณ คุรุรักษา¹

Kittima Vanichkul¹, Thanawat Kaewboribut², Chompunut Samhuay², and Soporn Kururaksa¹

¹สาขาประมง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 2 (สมุทรสาคร) กรมประมง

*ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: kittima_v@mutt.ac.th หรือ kittima_v@exchange.rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการเลี้ยงปลาการ์ตูนแดงด้วยอาหารต่างกัน ดำเนินการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งเลี้ยงปลาการ์ตูนแดงออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ แต่ละชุดเลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 และอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* ปลาการ์ตูนแดงมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.14 ± 0.003 0.13 ± 0.03 และ 0.13 ± 0.01 กรัม ตามลำดับ และความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 14.69 ± 0.32 14.47 ± 0.65 และ 14.54 ± 0.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($P > 0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน พบว่า ปลาการ์ตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 0.64 ± 0.06 กรัม ความยาวสุดท้ายเฉลี่ย 23.12 ± 1.08 มิลลิเมตร อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน 0.009 ± 0.0005 กรัม และมีค่าสี 4.84 ± 0.27 สูงกว่าปลาการ์ตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$) โดยในแต่ละชุดทดลองมีอัตราการรอดไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) คุณภาพน้ำเฉลี่ยตลอดการทดลองอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการเลี้ยงสัตว์น้ำ

คำสำคัญ: ปลาการ์ตูนแดง อาหาร ปลาสวยงาม

Abstract

The study on effect of spinecheeked clownfish (*Premnas biaculeatus* Bloch, 1790) culture with different diets was assigned on completely randomized design with 3 treatments and 3 replications. The hatchery diets of NRD 5/8, aquarium fish diet no. 1 and NURSING-MPL mixed *Haematococcus pluvialis* were applied to clownfish. The average initial weight of fish were 0.14 ± 0.003 0.13 ± 0.03 and 0.13 ± 0.06 grams and average initial length were 14.69 ± 0.32 14.47 ± 0.65 and 14.54 ± 0.23 millimeters respectively ($P > 0.05$). For 60 days of experiment, fish fed NURSING-MPL mixed *Haematococcus pluvialis* had average final weight 0.64 ± 0.06 grams, average final length 23.12 ± 1.08 millimeters, average daily growth rate 0.009 ± 0.0005 grams and average color value 4.84 ± 0.27 were significantly higher ($p < 0.05$) than other treatments. Survival rate was not significantly with differences ($p > 0.05$). Also the water quality value in experiment showed standard datas.

Keywords: Spinecheeked Clownfish, Feed, Oramental fish

บทนำ

ปลาการ์ตูนแดง หรือ ปลาการ์ตูนแก้มหนาม (อังกฤษ: Maroon clownfish, Spinecheeked clownfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Premnas biaculeatus* Bloch, 1790 อยู่ในวงศ์ปลา สลิดหิน (Pomacentridae) วงศ์ย่อยปลาการ์ตูน (Amphiprioninae) จัดเป็นปลาการ์ตูนชนิดเดียวที่อยู่ในสกุล *Premnas* เนื่องจากมีความแตกต่างจากปลาการ์ตูนชนิดอื่น ๆ คือ บริเวณแก้มหรือแผ่นปิดเหงือกมีหนามยื่นออกมาจากตรงกลาง อยู่เหนือริมฝีปากเล็กน้อยขึ้นไปจนถึงบริเวณใต้ดวงตา มีโครงสร้างที่ค่อนข้างใหญ่กว่าปลาการ์ตูนชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะปลาเพศเมียที่โดยปกติจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้แล้ว และมีสีที่คล้ายว่า ครีบอกมีขนาดใหญ่ ลำตัวมีสีแดงดำ บริเวณแผ่นปิดเหงือก กึ่งกลางลำตัว และโคนหาง มีแถบสีขาวพาด สีของปลาการ์ตูนแดงค่อนข้างหลากหลาย ในปลานขนาดเล็กจะมีตั้งแต่สีแดงสดจนถึงแดงดำ และจะค่อย ๆ เข้มขึ้นจนปลาเจริญเติบโตเต็มที่ ขณะที่บางตัวในขนาดเล็กจะมีแต้มสีดำบริเวณตามครีบต่าง ๆ และจะจางหายไปเมื่อปลาโตขึ้น มีอุปนิสัยก้าวร้าวหวงถิ่นค่อนข้างมาก จัดเป็นปลาการ์ตูนที่มีขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง มีความยาวเต็มที่ประมาณ 17 เซนติเมตร ปลาการ์ตูนแดงพบแพร่กระจายในทะเลเขตรินโดแปซิฟิก เช่น เกาะสุมาตราในอินโดนีเซีย และ เกาะแบร์รีเออร์รี่ ในออสเตรเลีย โดยอาศัยอยู่กับดอกไม้ทะเลชนิด *Entacmaea quadricolor* เพียงชนิดเดียว⁽¹⁾

การเพาะเลี้ยงปลาการ์ตูนในประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จนสามารถผลิตปลาจำนวนมากได้อย่างสม่ำเสมอ แม้ว่าจะมีข้อได้เปรียบกว่าปลาจากธรรมชาติในด้านความแข็งแรง อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลาจึงมีส่วนสำคัญในการส่งเสริมให้ปลา มีความสมบูรณ์มีคุณภาพ เจริญเติบโตได้ตามตลาดต้องการ นอกจากนี้ความสวยงามของสีจากผิวหนังปลาเป็นสำคัญที่ส่งผลต่อความต้องการของตลาด แต่คุณภาพด้านสีของปลาการ์ตูนจากการเพาะเลี้ยงยังเป็นปัญหาหลักของการผลิตในปัจจุบัน เนื่องจากสีของปลาที่ผลิตได้ไม่สวยเหมือนปลาจากธรรมชาติไม่ตรงตามความต้องการของตลาด ทำให้ผู้เลี้ยงปลาการ์ตูนบางส่วนยังคงนิยมซื้อปลาที่จับจากธรรมชาติเพราะสีสดใสกว่า⁽²⁾ ด้วยเหตุนี้อาหารที่เลี้ยงนอกจากมีความจำเป็นเพื่อการเจริญเติบโต ยังเป็นแหล่งของสารสีที่ทำให้สีของปลาสวยงามส่งผลต่อราคาและการตลาด⁽³⁾

ดังนั้นในการศึกษาผลของการเลี้ยงปลาการ์ตูนแดงด้วยอาหารต่างกัน โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ทราบข้อมูลของอาหารที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตด้านน้ำหนัก ความยาว อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการรอดตาย และสี จะเป็นแนวทางให้ผู้สนใจเลี้ยง และผู้ผลิตปลาการ์ตูนแดงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมการทดลอง

เตรียมระบบกรองชีวภาพโดยนำถังขนาด 200 ลิตร จำนวน 9 ใบ มาล้างทำความสะอาด วางอิฐบล็อกในแต่ละถังถึงจำนวน 3-4 ก้อนตามแนวตั้ง และเรียงท่อพีวีซีปิดอิฐบล็อกเพื่อเป็นฐานสำหรับรองรับวัสดุกรองน้ำ ใช้awnมุ้งฟ้าปิดทับบนท่อพีวีซีอีกชั้นเพื่อวางเปลือกหอยนางรมสูงประมาณ 15-20 เซนติเมตร แล้วใช้อawnมุ้งฟ้าปิดทับอีกชั้นเพื่อใส่ทรายหยาบสูงประมาณ 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นต่อท่อพีวีซีเป็นท่อน้ำจากกันถังขึ้นมาข้างบน ทำการเจาะต่อสายอากาศต่อกับท่อพีวีซีในส่วนชั้นทรายหยาบ โดยใช้แรงอัดอากาศดันน้ำจากกันถังขึ้นมาเพื่อให้มีน้ำในระบบหมุนเวียนอย่างต่อเนื่อง⁽⁴⁾ โดยก่อนเริ่มทำการทดลองจะใส่น้ำทะเลและเปิดการทำงานของระบบกรองในถังเป็นเวลา 20 วัน

นำปลาการ์ตูนแดงที่มีความยาวเฉลี่ย 15 ± 0.50 มิลลิเมตร มาพักไว้ในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน สุ่มปลาการ์ตูนแดงจำนวน 20 ตัวจากถังไฟเบอร์มาใส่ในถังระบบกรองชีวภาพแต่ละถัง และฝึกให้ปลาการ์ตูนแดงกินอาหารเม็ดเป็นเวลา 14 วันก่อนทำการทดลอง

การดำเนินการทดลอง

การทดลองจะดำเนินการตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized desing; CRD) โดยทำการเลี้ยงปลาการ์ตูนแดงด้วยอาหาร 3 ชนิด (ชุดทดลอง) ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลาการ์ตูนโดยทั่วไป ชนิดละ 3 ซ้ำ

ประกอบไปด้วย อาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 และอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* (ปริมาณ 10 ซีซีต่อลิตรกรัม) ในระหว่างการทดลองทำการให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลา 10.00 น. และ 15.00 น. แบบให้อาหารอิ่ม โดยทำการบดอาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 และ อาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* ให้มีขนาดเล็กลงด้วยโกรบดยาก่อนนำไปเลี้ยงปลาการตูนแดง

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการเก็บบันทึกข้อมูลด้านน้ำหนัก ความยาว (ทำการชั่งวัดทั้งหมด) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการรอดตาย และวัดสีโดยใช้แผ่นเทียบสี (ดัดแปลงจาก salmon fan) ในช่วงเริ่มต้น 30 และ 60 วัน และบันทึกค่าคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม ความเป็นกรดเป็นด่าง(pH) ไนโตรเจน และแอมโมเนีย โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำ สัปดาห์ละครั้งในช่วงทำการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance และ เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์⁽⁵⁾

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในการทดลองเลี้ยงปลาการตูนแดงด้วยอาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 และอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* พบว่า เมื่อเริ่มการทดลองปลาการตูนแดงมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 0.14 ± 0.003 0.13 ± 0.03 และ 0.13 ± 0.01 กรัม ตามลำดับ ($P > 0.05$) โดยเมื่อให้อาหารทดลองครบ 30 วัน ปลาการตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารในแต่ละชุดทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.22 ± 0.004 0.19 ± 0.006 และ 0.22 ± 0.011 กรัม ตามลำดับ โดยปลาการตูนแดงชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.22 ± 0.004 กรัม และชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.22 ± 0.011 กรัม สูงกว่าปลาการตูนชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาการตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 0.59 ± 0.03 กรัม และชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 0.64 ± 0.06 กรัม ซึ่งสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 ($P < 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในด้านความยาวเฉลี่ยปลาการตูนแดงมีความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 14.69 ± 0.32 14.47 ± 0.65 และ 14.54 ± 0.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($P > 0.05$) พบว่า เมื่อให้อาหารทดลองครบ 30 วัน ปลาการตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีความยาวเฉลี่ย 16.85 ± 0.08 มิลลิเมตร มีขนาดยาวกว่าปลาการตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 (16.44 ± 0.12 มิลลิเมตร) ($P < 0.05$) แต่มีความยาวเฉลี่ยไม่แตกต่างกับปลาการตูนชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารปลาทะเล NRD 5/8 (16.65 ± 0.10 มิลลิเมตร) ($P > 0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาการตูนแดงชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีความยาวสุดท้ายเฉลี่ย 23.12 ± 1.08 มิลลิเมตร มีความยาวมากกว่าปลาการตูนชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 ที่มีความยาวสุดท้ายเฉลี่ย 21.02 ± 0.61 มิลลิเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาการตูนที่เลี้ยงด้วยอาหารปลาทะเล NRD 5/8 ที่มีความยาวสุดท้ายเฉลี่ย 21.99 ± 0.83 มิลลิเมตร ($P > 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความยาว น้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการรอดตายของปลาการ์ตูนที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน

ค่าพารามิเตอร์	ชุดการทดลอง		
	อาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8	อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1	อาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม <i>Haematococcus pluvialis</i>
น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย (กรัม)	0.14±0.003 ^a	0.13±0.03 ^a	0.13±0.01 ^a
น้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย (กรัม)	0.59±0.03 ^b	0.46±0.07 ^a	0.64±0.06 ^b
ความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย (เซนติเมตร)	14.69±0.32 ^a	14.47±0.65 ^a	14.54±0.23 ^a
ความยาวสุดท้ายเฉลี่ย (เซนติเมตร)	21.99±0.83 ^{ab}	21.02±0.61 ^a	23.12±1.08 ^b
อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กรัม)	0.008±0.0003 ^{ab}	0.006±0.0009 ^a	0.009±0.0005 ^b
อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)	93.33±11.55 ^a	85.00±5.00 ^a	78.33±2.89 ^a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแถวตามแนวนอนมีตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ค่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของปลาการ์ตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่า มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 0.0014±0.0001 0.0009±0.0002 และ 0.0014±0.0003 กรัมต่อวัน ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05) แต่เมื่อเลี้ยงจนสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน พบว่า ปลาการ์ตูนแดงชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 0.009±0.0005 กรัมต่อวัน สูงกว่าปลาการ์ตูนชุดที่ได้อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 ที่มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 0.006±0.0009 กรัมต่อวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 1) โดยในการดำรงชีวิต การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ จำเป็นต้องใช้พลังงานจากสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนที่มีในอาหาร ซึ่งปริมาณความต้องการสารอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ โดยอาหารที่นำมาทดลองทั้ง 3 ชนิด นิยมนำมาใช้เลี้ยงปลาการ์ตูนเนื่องจากมีสารอาหารครบถ้วน มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่น้อยกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยไม่มากกว่า 1.8 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นไม่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ปลาการ์ตูนมีการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนัก ความยาว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเลี้ยงจนสิ้นสุดการทดลองปลาการ์ตูนแดงที่ได้รับอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีการเจริญเติบโตโดยภาพรวมดีที่สุด อาจเนื่องมาจากอาหารในชุดทดลองนี้มีส่วนผสมของ *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่เป็นแหล่งของแอสตาแซนทีนธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และต้านทานการอักเสบ⁽⁶⁾ ช่วยให้มีประสิทธิภาพการนำอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ดี โดยแหล่งสารสี (แอสตาแซนทีน) และกรดไขมันชนิดจำเป็นในอาหารเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมอาหาร⁽⁷⁾ เป็นส่วนสนับสนุนให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี

ในส่วนอัตราการรอดตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ปลาการ์ตูนแดงมีอัตราการรอดตายที่สูงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ทุกชุดการทดลอง โดยมีอัตราการรอดตายที่ 93.33±11.55 85.00±5.00 และ 78.33±2.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลอง สอดคล้องกับการศึกษาการเลี้ยงปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ด้วยอาหารที่มีปริมาณของโปรตีนต่างกัน 3 ระดับ คือ 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) เช่นกัน⁽⁸⁾

ทางด้านสีของปลาการ์ตูนแดง พบว่า ในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงค่าสีที่วัดได้โดยใช้แผ่นเทียบสีที่ตัดแปลงจาก salmon fan นั้น มีค่าเฉลี่ย 1.13±0.052 1.07±0.064 และ 1.12±0.026 ตามลำดับ ซึ่งไม่แสดงความแตกต่างกันของสีในแต่ละชุดการทดลอง (P>0.05) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาการ์ตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีค่าสี 4.84±0.27 สูงกว่าปลาการ์ตูนที่ได้รับอาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 ที่มีค่าสี 2.26±0.94 และอาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 ที่มีค่าสี 2.78±0.63 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 2) ซึ่งผลที่ได้มานี้จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ

Haematococcus pluvialis ที่ผสมในอาหารที่เลี้ยงปลาการ์ตูนแดงสามารถผลิตแอสตาแซนทินธรรมชาติที่มีปริมาณสูงและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยแอสตาแซนทินถือเป็นแหล่งของสารสีกลุ่มที่ให้สีชมพูถึงสีแดง และสามารถสะสมได้ในผิวหนังของปลา⁽⁹⁾ ส่งผลให้ปลาการ์ตูนกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดนี้มีค่าสีสูงกว่าชุดอื่นๆ สอดคล้องกับการทดลองให้กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดแอสตาแซนทินจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าเฉลี่ยความเข้มสีแดงสูงกว่าชุดที่ได้รับอาหารควบคุม (ปกติ)⁽¹⁰⁾ โดย *Haematococcus pluvialis* ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และกลุ่มสุขภาพความงามอย่างมาก⁽¹¹⁾ ความเข้มข้น และแหล่งของสารสี รวมถึงระยะเวลาการสะสมสารสีเพื่อให้เกิดสีเป็นส่วนช่วยให้ปลาที่มีสีสวยงามตามความต้องการ⁽²⁾ หากปลาไม่ได้รับสารสีที่เพียงพออย่างต่อเนื่อง หรือมีการหยุดให้สารสีปลาจะมีสีซีดลง⁽¹²⁾ ส่งผลต่อความสวยงามของปลาได้

ตารางที่ 2 คะแนนคุณภาพสีเฉลี่ย (คะแนน $\pm$ SD) ของปลาการ์ตูนแดงที่ให้อาหารแตกต่างกันในระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	คะแนนคุณภาพสี (คะแนน)	
	เริ่มต้น	60 วัน
อาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8	1.13 $\pm$ 0.052 ^a	2.26 $\pm$ 0.94 ^a
อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1	1.07 $\pm$ 0.064 ^a	2.78 $\pm$ 0.63 ^a
อาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม <i>Haematococcus pluvialis</i>	1.12 $\pm$ 0.026 ^a	4.84 $\pm$ 0.27 ^b

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 คุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง

พารามิเตอร์	ชุดการทดลอง		
	อาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8	อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1	อาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม <i>Haematococcus pluvialis</i>
อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	30.54 $\pm$ 0.306	30.29 $\pm$ 0.485	30.42 $\pm$ 0.868
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ(mg/l)	6.21 $\pm$ 0.062	6.16 $\pm$ 0.098	6.18 $\pm$ 0.176
ความเค็ม (ppt)	28.91 $\pm$ 1.433	29.08 $\pm$ 0.850	29.67 $\pm$ 1.844
ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	8.17 $\pm$ 0.047	8.14 $\pm$ 0.023	8.14 $\pm$ 0.067
ไนโตรเจน (mg/l)	0.0047 $\pm$ 0.002	0.0048 $\pm$ 0.002	0.0046 $\pm$ 0.002
แอมโมเนีย (mg/l)	0.0021 $\pm$ 0.006	0.0018 $\pm$ 0.005	0.0035 $\pm$ 0.009

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแถวตามแนวนอนมีตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลาการ์ตูนแดงด้วยอาหารต่างชนิดกันตามชุดทดลอง พบว่า อุณหภูมิเฉลี่ย 30.417 $\pm$ 0.583 องศาเซลเซียส ออกซิเจนเฉลี่ย 6.184 $\pm$ 0.118 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเค็มเฉลี่ย 29.22 $\pm$ 1.410 ส่วนในพันส่วน ความเป็นกรดเป็นด่างเฉลี่ย 8.152 $\pm$ 0.049 ไนโตรเจนเฉลี่ย 0.0048 $\pm$ 0.0017 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียเฉลี่ย 0.0025 $\pm$ 0.0069 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยค่าทางคุณภาพน้ำเฉลี่ยในการทดลองอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการเลี้ยงสัตว์น้ำ⁽¹³⁾ และอาหารสัตว์น้ำในทุกชุดการทดลองไม่ส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำในการเลี้ยง (ตารางที่ 3)

สรุป

จากผลการทดลองการเลี้ยงปลาการ์ตูนแดงด้วยอาหารต่างกัน คือ อาหารลูกปลาทะเล NRD 5/8 อาหารลูกปลาสวยงาม เบอร์ 1 และอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ปลาการ์ตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารทุกชุดทดลองมีการเจริญเติบโตด้านน้ำหนัก ความยาว อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และค่าสีสูงขึ้น ซึ่งไม่แสดงค่าความแตกต่างของอัตราการโตในแต่ละชุดการทดลอง โดยในภาพรวมปลาการ์ตูนแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารลูกกุ้ง NURSING-MPL ผสม *Haematococcus pluvialis* มีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 0.64 ± 0.06 กรัม ความยาวสุดท้ายเฉลี่ย 23.12 ± 1.08 มิลลิเมตร อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน 0.009 ± 0.0005 กรัม และมีค่าสี 4.84 ± 0.27 ดีกว่าปลาการ์ตูนแดงในชุดทดลองอื่น ๆ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ สถานที่ และสารเคมีสำหรับงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ภวพล ศุภนันท์นามน. การดูแลก้ามหมึก. Aquarium Biz 2553; 1(3): 84-88.
2. สามารถ เดชสถิตย์ ไพบุลย์ ลิปตานนท์ บุศรา รัตนประพันธ์. การปรับปรุงคุณภาพปลาการ์ตูนด้วยเทคนิคการเลี้ยงในกระชัง. เอกสารเผยแพร่. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง 2546.
3. บรรเจิด สอนสุภาพ. ผลการใช้แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติเป็นแหล่งสารสีในอาหารปลาทอง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 2561; 12 (1): 35-48.
4. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร. ปลาการ์ตูน. [อินเทอร์เน็ต]. ม.ป.ป. [เข้าถึงเมื่อ 19 กุมภาพันธ์ 2564]. เข้าถึงได้จาก: https://www.fisheries.go.th/aquaculture/web2/index.php?option=com_content&view=article&id=52%3A2010-03-16-02-32-16&catid=19%3A2010-03-16-02-25-10&Itemid=21&showall=1.
5. สายชล สันสมบูรณ์ทอง. สถิติการวางแผนทดลองทางการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ; จามจุรีโปรดักส์; 2549.
6. Panis G , Carreon JR. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. Algae Research 2016; 18: 175-190.
7. ตูลยา หวังสุข. ความต้องการสารอาหารของปลาสวยงาม. [อินเทอร์เน็ต]. 2560. [เข้าถึงเมื่อ 19 กุมภาพันธ์ 2564]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-19-31/2016-08-30-14-15-11/272-2017-01-24-02-03-53>.
8. อมรรัตน์ ชมรุ่ง และ ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน. ปริมาณไขมัน รังควาญแคโรทีนอยด์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความเข้มสีของปลาการ์ตูน ส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*). รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยบูรพา. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล 2556.
9. วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และ มารุจ ลิ้มปะวัฒน์. แอสตาแซนธินคุณค่าที่มากกว่าความเป็นสี. เทคโนโลยีการอาหาร 2552; 5(1): 7-12.
10. คณางค์ รัตนนิคม, อมรรัตน์ กนกรุ่ง, ศิวาพร สีดาบุตร. ผลของการใช้สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ต่อการแสดงออกของสีของกุ้งก้ามกรามหลังปรุงสุก. แก่นเกษตร 2562; 47 (ฉบับพิเศษ 1): 1300-1304.
11. Kalyani HB, Yogesh AK, Gaikwad AB. Nutraceuticals as therapeutic agents for inflammation. In: Fruits, Vegetables, and Herbs: Elsevier, Inc 2016.

12. นงลักษณ์ สำราญราษฎร์, มณฑกานติ ท้วมตัน, สุพิศ ทองรอด, สิริพร ลือชัยชัยกุล. ระดับความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนในอาหารต่อการเพิ่มสี ในปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830). เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2555. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง 2555.
13. กรมควบคุมมลพิษ. มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน. [อินเทอร์เน็ต] 2535; [เข้าถึงเมื่อ 19 เมษายน 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water05.html.

ผลของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายในปลานิล Effect of *Bacillus* spp. As Probiotic on Growth and Survival Rate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ศุภมาส ศรีวงศ์พุท^{1*}, ศุภชัย เนตรทอง¹ และกฤษฎา จำปานิล¹
Supamas Sriwongpuk^{1*}, Supachai Natetong¹, and Krisada Chumpanile¹
¹คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
*ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: supamas_s@mutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลและปริมาณที่เหมาะสมของการเสริมโปรไบโอติก (*Bacillus* spp.) ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของปลานิล โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ปลอยปลานิลลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสปริมาตรน้ำ 150 ลิตร ในอัตราความหนาแน่นของปลา 70 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ให้อาหาร 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อมื้อ วันละ 4 ครั้ง เวลา 09.00 น. 11.00 น. 13.00 น. และ 15.00 น. ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 วัน เมื่อเริ่มต้นการทดลองปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.72 ± 0.11 , 0.72 ± 0.10 , 0.75 ± 0.10 และ 0.73 ± 0.09 กรัม ตามลำดับ ความยาวเฉลี่ยเริ่มต้น 3.81 ± 0.13 , 3.77 ± 0.14 , 3.82 ± 0.15 และ 3.80 ± 0.14 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตด้านน้ำหนัก ความยาว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ดีกว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ได้ผสม *Bacillus* spp. ในการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันทั้ง 4 ชุดการทดลอง พบว่า น้ำหนักสุดท้าย อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

คำสำคัญ: โปรไบโอติก, ปลานิล, การเจริญเติบโต, อัตราการรอดตาย

Abstract

The objectives of this research were to study the effects and appropriate of probiotic (*Bacillus* spp.) supplementation on growth and survival rate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The experimental design was completely randomized design (CRD) with 4 treatments of 3 replications (concentrations 0, 5, 10 and 15 g per 1 kg of food). Tilapia were raised in a fiberglass tank with a volume of 150 liters of water at the density of 70 fish per cubic meter. Feeding 2 percent of body weight per meal, 4 times a day at 09.00 am, 11.00 am, 13.00 pm and 15.00 pm, a trial period of 45 days. At the start of the experiment, tilapia had an initial mean weights of 0.72 ± 0.11 , 0.72 ± 0.10 , 0.75 ± 0.10 and 0.73 ± 0.09 g, respectively, and an initial mean length of 3.81 ± 0.13 , 3.77 ± 0.14 , 3.82 ± 0.15 and 3.80 ± 0.14 cm, respectively. At the end of the experiment, Nile Tilapia fed with 15 g of *Bacillus* spp. per 1 kg of feed were found that the growth rates of weight, length and average growth rates per day better than tilapia fed instant pellets without *Bacillus* spp. This experiment showed that Nile Tilapia fed with the different concentrations of *Bacillus* spp. (0, 5, 10 and 15 g per kg of feed) as a result, average final weight, feed conversion ratio (FCR) and survival rates were not significantly different ($p > 0.05$).

Keyword: probiotic, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), growth rate, survival rate

บทนำ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยมีมูลค่าผลผลิตต่อปีสูงที่สุดในบรรดาสัตว์น้ำจืดทั้งหมด เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว เนื้อปลามีรสชาติดี มีผู้นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางเป็นที่ต้องการทั้งในตลาดภายในประเทศและตลาดต่างประเทศ⁽¹⁾ จึงมีการเพาะเลี้ยงปลานิลโดยอาศัยเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ การควบคุมดูแล และการบริหารจัดการให้ปลาเจริญเติบโตเพียงพอต่อความต้องการบริโภคของประชากร

อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่ยังประสบปัญหาการตายของปลา ซึ่งมีสาเหตุมาจากปลามีภูมิคุ้มกันต่ำ ทำให้ปลาอ่อนแอและเกิดโรคได้ง่าย สร้างความเสียหายแก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก จึงมีการรักษาโรคในปลานิลโดยใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาปริมาณสูงอาจทำให้มียาตกค้างในปลานิลและในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งอาจทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมลงในอาหารเม็ดสำเร็จรูป จะช่วยส่งเสริมโภชนาการที่มีประโยชน์และส่งผลต่อสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ โดยปรับเยื่อบุผิวลำไส้และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายปลาให้อยู่ในสภาพสมดุล ซึ่งเป็นการป้องกันกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร^(2,3)

โปรไบโอติก (Probiotic) หมายถึง จุลินทรีย์มีชีวิตในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร กล่าวคือ จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะมีกลไกการทำงานในการต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค คือ จะไปแย่งที่ยึดเกาะกับจุลินทรีย์ชนิดใหม่บนผนังลำไส้เล็ก เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารโดยธรรมชาติ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีความสามารถในการต่อต้านการเกาะของจุลินทรีย์ชนิดใหม่บนผนังลำไส้โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และจะไปแย่งอาหารกับจุลินทรีย์ชนิดใหม่ โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะแย่งอาหารในบริเวณที่เกาะตั้งถิ่นฐานไม่ให้เหลือพอสำหรับจุลินทรีย์ชนิดใหม่ รวมทั้งยังสามารถผลิตสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยโปรไบโอติกจะผลิตสารแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารเน่าเสียประโยชน์ของโปรไบโอติกต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ มีส่วนช่วยเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อตัวสัตว์น้ำและช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำ⁽⁴⁾ ซึ่งโปรไบโอติก คือ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในอาหารใด ๆ ก็ตามสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้าน และสามารถมีชีวิตอยู่ได้เพื่อพร้อมที่จะไปปรับปรุงสุขภาพของตัวเจ้าบ้านนั้น ๆ ให้ดีขึ้น จุลินทรีย์โปรไบโอติกมีหลายชนิดเช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* และ *Bifidobacterium longum* เป็นต้น⁽²⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้โปรไบโอติกเสริมอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต ทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น⁽⁵⁾ ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค⁽⁶⁾ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน⁽⁷⁾ และเพิ่มอัตราการรอดตายให้แก่สัตว์น้ำ⁽⁸⁾ แทนการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีอีกด้วย

การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกยังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับการสนใจอย่างมากในการนำมาใช้ ประโยชน์ทางการประมง เนื่องจากโปรไบโอติกมีประโยชน์หลายประการ คือ ช่วยในการทำงานของลำไส้ ทำให้ลำไส้สามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้นป้องกันการเกิดโรคจากแบคทีเรียบางกลุ่มในทางเดินอาหาร ช่วยเพิ่มอัตราการรอดตายของตัวอ่อนสัตว์น้ำ⁽⁹⁾ ดังนั้น จึงได้ทำการวิจัยขึ้นเพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการเสริมโปรไบโอติก (*Bacillus* spp.) ในการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายในปลานิล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design; CRD) เลี้ยงปลานิลโดยใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผสมลงในอาหารสำเร็จรูปโดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัวรายละเอียด ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารที่ผสมโปรไบโอติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารที่ผสมโปรไบโอติก 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารที่ผสมโปรไบโอติก 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมถังไฟเบอร์และอุปกรณ์เลี้ยงปลานิล

เตรียมถังไฟเบอร์กลาสขนาด 200 ลิตร จำนวน 12 ถัง ทำการล้างทำความสะอาดถังไฟเบอร์กลาสและผึ่งให้แห้ง จากนั้นเติมน้ำสะอาดปริมาตร 150 ลิตร นำสายออกซิเจนต่อเข้ากับหัวทรายและเครื่องเติมอากาศจำนวน 12 ชุด แล้วนำไปใส่ไว้ในถังไฟเบอร์กลาสถึงละ 1 ชุด

3. การเตรียมอาหาร

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ในรูปแบบผง ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *B. licheniformis* โดยมีสปอร์ไม่น้อยกว่า 10 CFU/g ซึ่งจะใช้ผสมกับอาหารสำเร็จรูป (ไฮเกรต 9961) โปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ผสม โปรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 5, 10 และ 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาหารชุดควบคุมจะใช้โคโตซานผสมลงในอาหารเพียงอย่างเดียว สำหรับการผสมโปรไบโอติกลงในอาหาร จะผสมโปรไบโอติกกับอาหารก่อน หลังจากนั้นผกกล้วนน้ำว่าอาหารด้วยโคโตซาน 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร หลังจากนั้นผกอาหารให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที

4. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลเพศผู้ (จากฟาร์มเกษตรกร) ขนาดความยาว 1 นิ้ว ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วจึงนำมาใช้ในการทดลอง

5. วิธีการทดลอง

สุมชั่งน้ำหนักและวัดความยาวปลานิล แล้วใส่ลงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 200 ลิตร ปริมาณน้ำ 150 ลิตร จำนวน 12 ถัง แต่ละถังปล่อยปลานิลจำนวน 10 ตัว ให้อาหารปลานิลปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวปลานิลต่อมื้อ วันละ 4 ครั้ง (09.00 น. 11.00 น. 13.00 น. และ 15.00 น.) และเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดยดูดน้ำออก 20 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำให้ได้ปริมาณเท่าเดิม ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 45 วัน ทุก ๆ 15 วันจะทำการสุมปลาจำนวน 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชั่งน้ำหนักและวัดความยาว บันทึกผล

6. การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลด้านน้ำหนัก ความยาว เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง นำปลานิลมาชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง วัดความยาวโดยใช้อุปกรณ์วัดขนาดปลา จำนวน 30 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนปลาทั้งหมด และบันทึกผล

การประเมินการเจริญเติบโตและผลผลิตสัตว์น้ำ

1) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (กรัม) = น้ำหนักตัวปลาเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง - น้ำหนักตัวปลาเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการเลี้ยง

2) ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เซนติเมตร) = ความยาวเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง - ความยาวเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการเลี้ยง

3) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Average Daily Growth; ADG, กรัมต่อวัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (กรัม) - น้ำหนักปลาเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการเลี้ยง (กรัม)}}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)}}$$

4) อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{\text{จำนวนปลานิลที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปลานิลเมื่อเริ่มการทดลอง (ตัว)}}$

5) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลานิลกิน}}{\text{น้ำหนักของปลานิลที่เพิ่มขึ้น}}$

7. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในระหว่างดำเนินการทดลองจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ ๆ ละ 1 ครั้ง ในช่วงเวลา 13.00 น. โดยตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยเครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำรุ่น AMT08 แอมโมเนียรวมโดยชุดทดสอบแอมโมเนียรวมยี่ห้อ API® ไนโตรที่โดยชุดทดสอบไนโตรที่ยี่ห้อ API® ส่วนความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของน้ำโดยเครื่องวัดกรด-ด่างยี่ห้อ ANEX รุ่น PH868-5 จะตรวจวัดทุกวัน บันทึกผล

8. การวิเคราะห์สถิติ

นำข้อมูลน้ำหนัก ความยาว อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's new Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. อัตราการเจริญเติบโตด้านน้ำหนัก และความยาว

ผลการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0, 5, 10 และ 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในระยะเวลาการทดลอง 45 วัน พบว่า ปลานิลมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย 8.04 ± 2.10 , 9.09 ± 2.73 , 8.88 ± 3.02 และ 9.44 ± 2.39 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Hassaan *et al.* (2014) ซึ่งพบว่า ผลของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* และสารสกัดจากยีสต์เป็นซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของปลานิลโดยน้ำหนักสุดท้ายของปลานิลที่เสริมด้วย *B. licheniformis* 0.1, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างประชากรมีจำนวนน้อย อาจทำให้เกิดการกระจายตัวของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แต่ปลานิลที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติก 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับวิลาวัลย์ และคณะ⁽¹¹⁾ ซึ่งทำการศึกษาผลของการเสริม คิว.พี. โปรไบโอติกแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญเติบโตของปลานิลเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า ปลานิลที่ได้รับโปรไบโอติกระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุด

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยและน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา						
	เริ่มต้น	15 วัน		30 วัน		45 วัน	
	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (กรัม)
1	0.72±0.11 ^a	1.87±0.59 ^a	1.14±0.15 ^a	3.85±0.77 ^a	3.12±0.65 ^a	8.04±2.10 ^a	7.31±0.48 ^a
2	0.72±0.10 ^a	1.97 ±0.61 ^a	1.24±0.11 ^a	4.84±1.37 ^a	4.11±0.24 ^{ab}	9.09±2.73 ^a	8.37±0.52 ^{ab}
3	0.75±0.10 ^a	1.75±0.59 ^a	0.99±0.23 ^a	4.98±1.30 ^a	4.23±0.88 ^{ab}	8.88±3.02 ^a	8.13±0.75 ^{ab}
4	0.73±0.09 ^a	2.02±0.25 ^a	1.28±0.15 ^a	5.43±1.07 ^a	4.69±0.31 ^b	9.44±2.39 ^a	8.71±0.32 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในระยะเวลาการทดลอง 45 วัน มีความยาวสุดท้ายเฉลี่ย 7.78±0.72, 8.24±0.80, 8.09±0.87 และ 8.37±0.64 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ปลานิลที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติก 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าความยาวสุดท้ายเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Hassaan et al. ⁽¹⁰⁾ ซึ่งพบว่า ผลของการใช้แบคทีเรีย *B. licheniformis* และสารสกัดจากยีสต์เป็นชีโนไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของปลานิล พบว่า ความยาวสุดท้ายของปลานิลที่เสริมด้วย *B. licheniformis* 0.1, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่ง Solitan and El-Laithy ⁽¹²⁾ แสดงให้เห็นว่า การเสริม *B. subtilis* ในอาหารปลานิลทำให้มีค่าความยาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 2 ความยาวเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

หน่วย: เซนติเมตร							
ชุดการทดลอง	ระยะเวลา						
	เริ่มต้น	15 วัน		30 วัน		45 วัน	
	ความยาวเฉลี่ย	ความยาวเฉลี่ย	ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น	ความยาวเฉลี่ย	ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น	ความยาวเฉลี่ย	ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น
1	0.72±0.11 ^a	1.87±0.59 ^a	1.14±0.15 ^a	3.85±0.77 ^a	3.12±0.65 ^a	8.04±2.10 ^a	7.31±0.48 ^a
2	0.72±0.10 ^a	1.97 ±0.61 ^a	1.24±0.11 ^a	4.84±1.37 ^a	4.11±0.24 ^{ab}	9.09±2.73 ^a	8.37±0.52 ^{ab}
3	0.75±0.10 ^a	1.75±0.59 ^a	0.99±0.23 ^a	4.98±1.30 ^a	4.23±0.88 ^{ab}	8.88±3.02 ^a	8.13±0.75 ^{ab}
4	0.73±0.09 ^a	2.02±0.25 ^a	1.28±0.15 ^a	5.43±1.07 ^a	4.69±0.31 ^b	9.44±2.39 ^a	8.71±0.32 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)

อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในระยะเวลาการทดลอง 45 วัน มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน 0.16±0.01, 0.18±0.01, 0.18±0.01 และ 0.196±0.00 กรัมต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่า ปลานิลที่ได้รับโปรไบโอติกเสริม 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม การเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติกเชื่อว่า ทำให้มีการย่อยอาหารที่ดีขึ้น เนื่องจากการเสริมสร้างการสังเคราะห์วิตามินและการทำงานของเอนไซม์ (Ding et al., 2004) ซึ่งมีส่วนช่วยในการปรับปรุงการย่อยอาหารและประสิทธิภาพการเติบโตทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา					
	15 วัน		30 วัน		45 วัน	
	ADG (กรัม/วัน)	FCR	ADG (กรัม/วัน)	FCR	ADG (กรัม/วัน)	FCR
1	0.07±0.01 ^a	0.64±0.09 ^a	0.10±0.02 ^a	0.93±0.25 ^b	0.16±0.01 ^a	0.96±0.04 ^a
2	0.08±0.00 ^a	0.60±0.03 ^a	0.13±0.01 ^{ab}	0.71±0.01 ^{ab}	0.18±0.01 ^b	0.99±0.00 ^a
3	0.06±0.01 ^a	0.79±0.18 ^a	0.14±0.02 ^{ab}	0.64±0.08 ^a	0.18±0.01 ^{ab}	1.01±0.06 ^a
4	0.08±0.01 ^a	0.57±0.06 ^a	0.15±0.01 ^b	0.63±0.04 ^a	0.19±0.00 ^b	1.07±0.08 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในระยะเวลาการทดลอง 45 วัน มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 0.96±0.04, 0.99±0.00, 1.01±0.06 และ 1.07 ±0.08 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Hassaan *et al.* (10) ซึ่งพบว่าผลของการใช้แบคทีเรีย *B. licheniformis* และสารสกัดจากยีสต์เป็นซินไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของปลานิลโดยอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลานิลที่เสริมด้วย *B. licheniformis* 0.1, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณการใช้โปรไบโอติกและระยะเวลาในการทดลองที่แตกต่างกัน

3. อัตราการรอดตาย

อัตราการรอดของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันระยะเวลาการทดลอง 45 วัน มีอัตราการรอด 100±0.00, 100±0.00, 100±0.00 และ 96.66±1.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของวิลาวัณย์ และคณะ (11) ซึ่งได้ทำการศึกษาค้นคว้าของการเสริม คิว.พี. โปรไบโอติกแตกต่างกัน 3 ระดับ พบว่า มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดตายของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

หน่วย: เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา		
	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
2	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
3	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
4	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	99.66±1.82 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. คุณภาพน้ำ

จากการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ และความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ทุกวันในเวลา 13.00 น. พบว่า มีอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ย 28.75± 1.04 องศาเซลเซียสค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เฉลี่ย 8.37±0.21 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) เฉลี่ย 6.49±0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียรวม (TAN) เฉลี่ย 0.43±0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) คุณภาพน้ำอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ และไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย⁽¹⁴⁾ แต่ปริมาณไนโตรเจน (NO₂) 0.36±0.74 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าเกณฑ์ แต่ไม่มีผลกระทบต่อปลาที่เลี้ยง เนื่องจากตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงมีการจัดการด้านคุณภาพน้ำเป็นอย่างดี

ตารางที่ 5 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

คุณภาพน้ำ	คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยง (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ค่ามาตรฐาน*
อุณหภูมิของน้ำ (องศาเซลเซียส)	28.75±1.04	23-32
ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	8.37±0.21	6.5-9
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	6.49±0.35	มากกว่า 0.3
แอมโมเนียรวม (TAN) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.43±0.56	น้อยกว่า 0.5
ไนไตรท์ (NO ₂) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.36±0.74	น้อยกว่า 0.3

หมายเหตุ: * ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา, ม.ป.ป.)

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในระยะเวลา 45 วัน พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. 15 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตด้านน้ำหนัก ความยาว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ดีกว่าปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ได้ผสม *Bacillus* spp. ในการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและน้ำหนักสุดท้ายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ในการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. การเพาะเลี้ยงปลานิลในบ่อดิน [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2550 [เข้าถึงเมื่อ 15 ม.ค. 2564]. เข้าถึงได้จาก: <http://thailand.gms-ain.org>
- Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999;180:147-165.
- Verschuere L, Heang H, Criel G, Dafnis S, Sorgeloos P, Verstraete W. Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66(1):139-1,146.
- เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. Probiotic & Prebiotic คู่หูวิกฤตโรคในระบบทางเดินอาหาร. *ส่งเสริมเทคโนโลยี* 2552;203:66-72.
- Sivagami K, Ronald J. Effect of Different Probiotic Enriched Diets on Growth Performance of *Cirrhinus mrigala* Fingerling. *International Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences* 2016;6(1):87-97.
- Sharma P, Sihag RC, Gahlawat SK. Effect of Probiotic on Haematological Parameters of Diseased Fish (*Cirrhinus mrigala*). *International Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences* 2013;7:323-328.
- Mukadam M. Probiotics in Aquaculture. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 2015;2(6):45-47.
- Tuan TN, Duc PM, Hatai K. Overview of the Use of Probiotics in Aquaculture. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture* 2013;3(3):89-97.
- Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B. Control of *Vibrio alginolyticus* in artemia culture by treatment with bacterial probiotic. *Aquaculture* 2003;219:43-56.

10. Hassaan MS, Soltan MA, Ghonemy MMR. Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The Egyptian Journal of Aquatic Research 2014;40:199-208.
11. วิลาวัณย์ ร่มรวย, สุรวัฒน์ ชลอสันติสกุล, สมฤดี ศิลาฤดี และ จารุณี เกษรพิกุล. ผลของ คิว.พี. โปรไบโอติกส์ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล. วารสารคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยศิลปากร (2554);2(3):1-7.
12. Soltan MA, El-Laithy SMM. Effect of probiotics and some spices as feed additives on the performance and behaviour of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries 2008;12:63-80.
13. Ding X, Li ZQ, Chen YQ, Lin HZ, Yang YY, Yang K. Effects of probiotics on growth and activities of digestive enzymes of *Pennaus vannamei*. Journal of Fishery Sciences of China 2004;6:580-584.
14. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา. การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; ม.ป.ป. [เข้าถึงเมื่อ 23 ม.ค. 2564]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.fisheries.go.th>

ASSESSMENT OF POLLUTION CARRYING CAPACITY IN THE LOWER PART OF MAE KLONG RIVER, THAILAND

* Boontarika Thongdonphum¹ and Shettapong Meksumpun²

¹Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand

²Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Thailand

*Corresponding Author, Received: 16 June 2019, Revised: 27 Oct. 2019, Accepted: 02 March 2020

ABSTRACT: Assessment of aquatic environmental impacts, nutrient transfer and the clarification of contaminated sites were conducted based on water quality analysis of the Mae Klong River. Twelve sampling stations were surveyed between April 2015 and April 2016 covering Kanchanaburi, Ratchaburi and Samut Songkhram Provinces. Results showed that aquatic environmental factors varied seasonally. A mathematical model developed using the box modeling method showed that middle (Ratchaburi Province) and lower (Samut Songkhram Province) riverine zones were point source areas. Highest DIN and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ loads were found in Samut Songkhram Province. Results implied that $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ levels were higher than the standard criterion for aquaculture ($< 1.45 \mu\text{mol L}^{-1}$). Levels of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ continued to increase, downriver, particularly in the estuary. Recent $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ levels suggest that the number of agroindustry plants discharging waste effluent into the river should be reduced. Monitoring to assess the aquatic status of the Mae Klong River and estuary using the $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ database is urgently required to control water quality and reduce contamination levels.

Keywords: Pollution, Carrying capacity, Environmental impact, Mae Klong River

1. INTRODUCTION

The Mae Klong at approximately 140 km long with a catchment area of 22,075 km², is the most important river in Western Thailand. The Mae Klong diversion dam is located in the upper zone, about 10 km from the river basin and forms the headworks of the Greater Mae Klong Irrigation Project which divert and distribute water to about 3.0 million rai (1 ha = 6.25 rai) of the cultivated area in 10 irrigation subprojects [1]. The river flows across the lower plain and passes through Ratchaburi Province, before discharging into the Gulf of Thailand in Samut Songkhram Province, where the important estuarine ecosystem supports a residential population as well as various industries [2]. More than 100 industrial factories are located along the banks of the Mae Klong River. Apart from industry and fisheries, other activities supported by the river include intensive agriculture [3].

[4] reported that freshwater inputs to the river depend on rainfall, irrigation control systems, and natural tributaries that flow through agricultural areas. Paddy rice is cultivated in about two-thirds of the area with the other third under sugar cane cultivation [5]. The aquatic environmental parameters, particularly dissolved oxygen and ammonia nitrogen, have deteriorated to critical levels over the past decade [6]. Rapid urbanization and industrial and agricultural development, coupled with inadequate sewerage systems, contribute to elevated material inputs in the water resources, e.g. nitrogen (N) and phosphorus (P) [7].

The abundance of nitrogen and phosphorus

compounds causes eutrophication problems [8]. Thus, this study aimed to describe the impacts of aquatic environmental parameter variations. Assessment of non-point source nutrient loads was a major focus, together with clarification of nutrient transfer patterns and a pollution carrying capacity assessment at the impacted sites using a mathematical model. Results will contribute to water quality conservation to maintain acceptable and sustainable utilization management of river ecosystems.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sampling sites

Twelve localities along the Mae Klong River were selected as sampling stations (Fig. 1). They were clustered in an 'upper' zone in Kanchanaburi Province (stn. 1-2), a 'middle' zone in Ratchaburi Province (stn. 3-7), and an 'estuarine' zone in Samut Songkhram Province (stn. 8-12).

Water sampling was conducted during two separate time periods to take account of the effects of seasonal variability on nutrient loadings as April 2015 (dry season) and September 2015 (rainy season). Under the influence of monsoon winds, Thailand has three seasons: rainy season (May-September), winter season (October-February) and dry season (March-April) [9].

2.2 Sample collection and analysis

Temperature, dissolved oxygen (DO), salinity and

pH of the water samples were measured using a multi-parameter probe (YSI-6600 Sonde Instrument) at the sampling sites (stn.1-12). For nutrient analysis, water samples were pre-filtered through GF/F (Whatman) and then immediately stored at 4 °C before transportation to the laboratory where they were kept at -20 °C until required for analysis.

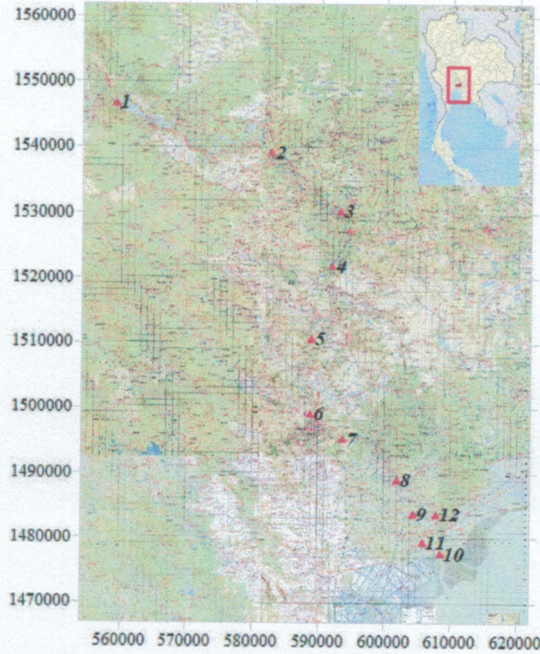


Fig. 1 Sampling stations (UTM; 47P) of the Mae Klong River with the 'upper' zone in Kanchanaburi province (stn. 1-2), a 'middle' zone in Ratchaburi province (stn. 3-7), and an 'estuarine' zone in Samut Songkhram province (stn. 8-12).

Ammonium (NH_4^+), nitrite and nitrate (NO_2^- and NO_3^-), and orthophosphate (PO_4^{3-}) concentrations were determined using a Skalar segmented flow analyzer with corresponding detection limits of 0.70-57.14, 0.70-14.28 and 0.03-3.87 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Specifically, the DIN and P loads were assessed at stn. 1-10 cross-sectional sites using a two-dimensional Surfer model. Nutrient loads were approximated by equation (1)

$$M_i = [\text{Conc}]A_iU_{hi}\Delta t_i \quad (1)$$

where M_i is the amount of nutrient load (ton/day), Conc is the nutrient concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$), A_i is the cross-sectional area of section i (m^2), U_{hi} is the flow velocity of section i (cm/s) and Δt_i is the length of time (i.e. 1 day) [2].

DIN and P loads were used for making decisions regarding the focus areas for pollution carrying capacity assessment using the

mathematical model (Fig. 2). Pollution carrying capacity was conducted at two separate time periods: September 2015 and April 2016.

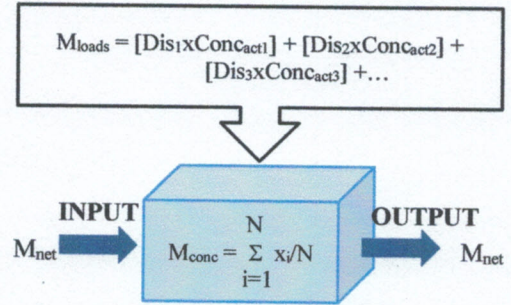


Fig. 2 Mathematical model for pollution carrying capacity assessment of the Mae Klong River.

Nutrient loads were approximated by equation (2), (3) and (4) in Fig. 2,

$$M_{\text{loads}} = [\text{Dis}_1 \times \text{Conc}_{\text{act}1}] + [\text{Dis}_2 \times \text{Conc}_{\text{act}2}] + [\text{Dis}_3 \times \text{Conc}_{\text{act}3}] + \dots \quad (2)$$

$$M_{\text{conc}} = \sum_{i=1}^N x_i / N \quad (3)$$

$$M_{\text{net}} = \sum_{i=1}^{25} [\text{Conc}] \cdot U_h \cdot A \quad (4)$$

where M_{loads} is the amount of nutrient discharge (ton day^{-1}) from industrial (Ind.) residential (Res.) and agricultural (Agr.) activity, Dis_i is the amount of discharge in each activity (L day^{-1}), $\text{Conc}_{\text{act}i}$ is the average concentration of DIN or $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) M_{conc} is the amount of nutrients within the box (ton/day), x_i is the concentration of DIN or $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) at the present time within the box, M_{net} is the amount of each nutrient load (ton/day), $[\text{Conc}]$ is the concentration of DIN or $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$) in the time focus (1-25 hrs). U_h is the flow velocity (cm s^{-1}) passing through the section in the time focus, and A is the cross-sectional area (m^2) of the section in focus.

2.3 Data analysis

Physicochemical properties of the water samples associated with both sampling periods (April 2015 and September 2015) were determined using descriptive statistics and presented as means $\pm$ standard deviations (SD). T-test was used to verify statistical differences between the two study periods, with $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

Table 1 shows the physicochemical characteristics of the water samples for both study periods (rainy and dry seasons). Results revealed that water temperature and salinity varied minimally from season to season ($p \leq 0.05$) and were lower during the rainy season. Sampling locations (stn.1-12) and seasonal variability had no significant impact on pH levels which remained relatively constant throughout.

Table 1 Physicochemical properties of water samples (mean $\pm$ SD)

Parameters	Study period	
	April 2015 (dry)	September 2015 (rainy)
Temp ($^{\circ}\text{C}$)	31.85 $\pm$ 0.71 ^a	29.19 $\pm$ 0.72 ^b
DO (mg L ⁻¹)	5.62 $\pm$ 2.26 ^a	5.47 $\pm$ 1.11 ^a
Salinity (psu)	2.79 $\pm$ 5.19 ^a	0.39 $\pm$ 0.62 ^a
pH	7.63 $\pm$ 0.22 ^a	7.18 $\pm$ 0.19 ^a
NH ₄ ⁺ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	8.57 $\pm$ 8.41 ^a	5.13 $\pm$ 2.08 ^a
NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	26.83 $\pm$ 13.34 ^a	11.55 $\pm$ 3.76 ^b
PO ₄ ³⁻ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1.31 $\pm$ 1.90 ^a	1.77 $\pm$ 1.18 ^a

The DO varied in response to seasonal variability ($p > 0.05$) at alarmingly higher than Thailand's minimum threshold of 4 mg L⁻¹. Average levels of NH₄⁺ and NO₂⁻+NO₃⁻ also varied significantly ($p \leq 0.05$) with the season. Minimum and maximum concentrations of NH₄⁺ and PO₄³⁻ associated with dry and rainy seasons were respectively 1.73 and 28.92 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and 0.10 and 5.23 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Observations also revealed that NH₄⁺ and NO₂⁻+NO₃⁻ were high during the dry season.

Table 2 shows the cross-sectional area, water volume and current velocity associated with the 10 cross-sectional sites (stn. 1-10). During the dry season (April), stn. 10 exhibited the highest volume and velocity of 78.49 $\times 10^6$ ton day⁻¹ and 39.7 cm s⁻¹, respectively. Meanwhile, stn. 2 recorded the lowest volume (3.09 $\times 10^6$ ton day⁻¹) and stn. 7 had the lowest velocity (12.5 cm s⁻¹).

Nutrient loads (DIN and P) associated with stn. 1-10 were estimated using (1). Results indicated that the DIN and P loads were respectively in the range of 2.09-31.00, and 0.03-5.25 ton day⁻¹. The highest DIN and P loads were registered at stn. 10, 31.00 ton day⁻¹ and 5.25 in the dry season (Table 3).

Nutrient (DIN and P) transport analysis implied that the major contaminated sites were

around Samut Songkhram Province. Results of nutrients loads indicated that the lower zone (Samut Songkhram Province) should focus on a point source area in the Mae Klong River.

Table 2 Water volume and velocity of the 10 cross-sectional sites during the dry (April 2015) season

Zone	St n.	Section area (m ²)	Volume (10 ⁶ ton day ⁻¹)	Velocity (cm s ⁻¹)
Upper	1	1,217.05	31.34	29.8
	2	196.58	3.09	18.2
	3	253.98	4.37	19.9
	4	536.14	10.84	23.4
Middle	5	531.77	10.93	23.8
	6	564.10	9.07	18.6
	7	732.09	7.91	12.5
Lower	8	747.91	10.15	15.7
	9	1,213.72	26.95	25.7
	10	2,288.23	78.49	39.7

Table 3 DIN and P transport (ton day⁻¹) at three cross-sectional sites during the dry season (April 2015)

Zone	Sectioned codes	DIN (ton day ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ -P (ton day ⁻¹)
Upper	St1	9.80	0.13
	St2	2.09	0.03
	St3	3.22	0.04
Middle	St4	3.36	0.10
	St5	3.35	0.11
	St6	4.71	0.12
	St7	4.54	0.11
	St8	5.97	0.13
Lower	St9	12.64	0.44
	St10	31.00	5.25

Table 4 Parameters for calculating the mathematical model in the lower area (Samut Songkhram Province) of the Mae Klong River

Type of waste water	Waste water volume	No.	Levels of concentration ($\mu\text{g/l}$)	
			DIN	PO ₄ ³⁻ -P
Industry *	5 $\times 10^5$ Lday ⁻¹	80 factory	23.6 $\times 10^3$	4.45 $\times 10^3$
Domestic	342 Lcap. ⁻¹ day ⁻¹	194,069 cap.	10.9 $\times 10^3$	1.4 $\times 10^3$
Shrimp pond	1.9 $\times 10^4$ LRai ⁻¹ day ⁻¹	1,613 Rai	2.7 $\times 10^3$	43.1
Rice field	2.3 $\times 10^3$ LRai ⁻¹ day ⁻¹	-	3.6 $\times 10^3$	49.6

DIN and P transport for pollution carrying capacity were calculated using the equations shown in Fig. 2, with primary and secondary data collected from government officials (Table 4).

Results revealed that DIN and P transport during the rainy season were higher than levels in the dry season. However, output levels of DIN and P loads in both seasons were lower than input levels (Fig.3). To improve self-remediation of the river, especially during the dry season, high DIN and P levels in the box require larger recharge from the Mae Klong River in the dry season and imposition of restrictions on the discharge of wastewater into the river.

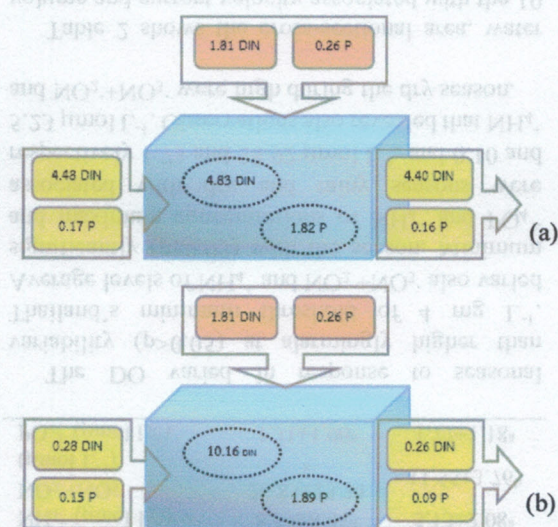


Fig. 3 DIN and P transport (ton day^{-1}) for pollution carrying capacity assessment using the mathematical model in the rainy (September 2015) and dry (April 2016) seasons in the lower part of the Mae Klong River.

4. DISCUSSION

Research results indicated that temperature and salinity of the river water varied minimally with seasons, while pH levels also remained relatively constant throughout. According to [2], freshwater inflow and precipitation-induced drainage influence the salinity level. Findings also revealed that dissolved oxygen (DO) was higher than Thailand's minimum threshold of 4 mg L^{-1} , rendering the water unfit for aquatic animals [10].

Furthermore, high DIN and P nutrient concentrations suggested anthropogenic contamination from the high population density along and near both sides of the river. Nutrient loads

from the major areas revealed the impact of anthropogenic activity, while water flow characteristics influenced water quality in those areas [2]. Generally, nutrient loadings in a river are linked to natural and anthropogenic sources, e.g. runoff from urban areas and plantations, and inflow through organic-rich ground [11]. In addition, non-point sources e.g. storm water runoff and runoff from agricultural and urban areas contribute significantly to riverine biogeochemistry [12].

In water quality assessment, NH_4^+ is an important determinant [13]. The NH_4^+ levels in water bodies should be below 1 mg L^{-1} (or $71.4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) [14], and the PO_4^{3-} levels below $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ to avert eutrophication [2]. The PO_4^{3-} levels in the Mae Klong River were in excess of the limit.

Anthropogenic activity and water mass transfer direction of the Mae Klong River, especially in the lower zone (Samut Songkhram Province), contributed to high DIN and P loads. Nutrient input-outputs were high in the dry season when nutrient loads were excessive. High nutrient load have to be focused on the reduction of diffuse sources, particularly the nitrogen and phosphorus emissions by drainage systems have to be reduced [15]. [11] reported that nutrients in water could be diluted or enhanced in response to areas that the water flows through, and that nutrient concentrations influence the self-remediation of the waterways.

[16] also suggested that the potential for nutrient reduction may be greatly enhanced by the discharge of large pulses of water. An opposite effect from a decrease in the flow velocity in the middle zone due to the river's morphology could I water and, thus, nutrient accumulation could be enhanced. In addition, land use contributes to nitrogen enrichment in the river [17], while phosphorus emission from wastewater is prevalent in highly populated areas [18]. Nutrient contamination in surface waters can pose a health risk for humans and aquatic life. In addition, runoff from urban and agricultural land uses can contribute to nutrient fluctuation and consequentially water quality [19].

The mathematical model for pollution carrying capacity of the area (lower zone) was positive, indicating adequate self-remediation and nutrient input-output balance. However, nutrient loads should be monitored, especially during the dry season. The levels of these nutrients were affected by the water velocity. The results revealed that the estuarine zone had higher loaded volumes when compared to the middle zones of the river. High loads found in the lowest zone could imply that either intermittent loads or estuarine upward functions had impacted on the aquatic ecosystem [2].

5. CONCLUSION

Effects of seasonal variability (rainy and dry seasons) and nutrient transfer patterns on the anthropogenic nutrient loads (DIN and P) and the self-remediation of the Mae Klong River in Thailand were investigated. Findings revealed maximum DIN and P loads of 31.0 ton day⁻¹ and 5.25 ton day⁻¹, respectively during the dry season in the lower part of the river.

The predominantly positive nutrient transport for DIN and P indicated adequate self-remediation with subsequent nutrient input-output still in balance. To address self-remediation in the area requires enhanced recharge from the Mae Klong River during the dry season. Observations also indicated that water mass transfer direction influenced drainage, nutrient dilution and nutrient accumulation in the area.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to extend their deep gratitude to the Research Institute and Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi (RMUTT) for financial support. The authors are grateful to all members of the Marine Environment Laboratory and the Sediment and Aquatic Environment Research Laboratory, Faculty of Fisheries, Kasetsart University for their kind cooperation.

7. REFERENCES

- [1] EGAT, Srinakarind Dam, Electricity Generating Authority of Thailand, 2018..
- [2] Thongdonphum B., Meksumpun S. and Meksumpun C., Nutrient Loads and their Impacts on Chlorophyll a in the Mae Klong River and Estuarine Ecosystem: An Approach for Nutrient Criteria Development. *Water Science and Technology*, Vol. 64, Issue 1, 2011, pp. 178-188.
- [3] Thongdonphum B., Meksumpun S., Meksumpun C., Sawasdee B. and Kasemsiri P., The Predictive Model for Biochemical Component of Phytoplankton in the River and Estuary System of the Mae Klong River, Thailand. *International Journal of Environmental and Rural Development*, Vol. 4, Issue 1, 2013, pp. 13-18.
- [4] Poolpak T., Pokethitiyook P., Kruatrachue M., Arjarasirikoon U. and Thanwaniwat N., Residue Analysis of Organochlorine Pesticides in the Mae Klong River of Central Thailand. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 156, 2008, pp. 230-239.
- [5] Vudhivanich V., Pajongkitkran S., Bunpian A. and Cherdchanpipat N., Irrigation Efficiency of the Greater Chao Phraya and the Greater Mae Klong Irrigation Projects. *Kasetsart Journal*, Vol. 36, 2002, pp. 110-118.
- [6] PCD, Inland Water Quality Information System. Pollution Control Department, Thailand. 2010.
- [7] Glibert P.M., Mayorga E. and Seitzinger S., *Prorocentrum minimum* Tracks Anthropogenic Nitrogen and Phosphorus Inputs on Global Basis: Application of Spatially Explicit Nutrient Export Models. *Harmful Algae*, Vol. 8, 2008, pp. 33-38.
- [8] Flemer D.A. and Champ M.A., What is the Future Fate of Estuaries Given Nutrient Over-enrichment, Freshwater Diversion and Low Flows. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 52, 2006, pp. 247-258.
- [9] TMD, Climate of Thailand, Thai Meteorological Department, Thailand, 2017.
- [10] PCD, Water Quality Standard, Pollution Control Department, Thailand. 2018.
- [11] Xia Y., Ti C., She D. and Yan X., Linking River Nutrient Concentrations to Land Use and Rainfall in a Paddy Agriculture-urban Area Gradient Watershed in Southeast China. *Science of the Total Environment*, Vol. 566-567, 2016, pp. 1094-1105.
- [12] David S.E., Chattopadhyay M., Chattopadhyay S. and Jennerjahn T.C., Impact of Human Interventions on Nutrient Biogeochemistry in the Pamba River, Kerala, India. *Science of the Total Environment*, Vol. 541, 2016, pp. 1420-1430.
- [13] Wang S., Lu A., Dang S. and Chen F., Ammonium Nitrogen Concentration in the Weihe River, Central China during 2005-2015. *Environmental Earth Science*, Vol. 75, 2016, pp. 1-10.
- [14] PHILMINAQ, Water Quality Criteria and Standards for Freshwater and Marine Aquaculture, Mitigating Impact from Aquaculture in Philippines, 2019.
- [15] Behrendt H. and Bachor A., Point and Diffuse Load of Nutrients to the Baltic Sea by River Basins of North East Germany (Mecklenburg-Vorpommern). *Water Science and Technology*, Vol. 38, Issue 10, 1998, pp. 147-155.
- [16] Lane R.R., Day J.W., Mirx B.D., Reyes E., Hyfield E. and Day J.N., The Effects of Riverine Discharge on Temperature, Salinity, Suspended Sediment and Chlorophyll a in a Mississippi Delta Estuary Measured using a Flow-through System. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 74, 2007, pp. 145-154.
- [17] Li R., Liu S., Zhang G., Ren J. and Zhang J.,

- Biogeochemistry of Nutrients in an Estuary Affected by Human Activities: the Wanquan River Estuary, Eastern Hainan Island, China. *Continental Shelf Research*, Vol. 57, 2013, pp. 18-31.
- [18] Mockler E.M., Deakin J., Archbold M., Gill L., Daly D. and Bruen M., Sources of Nitrogen and Phosphorus Emission to Irish Rivers and Coastal Waters: Estimates from a Nutrient Load Apportionment Framework. *Science of the Environment*, Vol. 601-602, 2017, pp. 326-339.
- [19] Longley K.R., Huang W., Clark C. and Johnson E., Effects of Nutrient Load from St. Jones River on Water Quality and Eutrophication in Lake George, Florida. *Limnologia*, Vol. 77, 2019, pp. 1-13.

Copyright © Int. J. of GEOMATE. All rights reserved, including the making of copies unless permission is obtained from the copyright proprietors.

Effect of Oxygen-free Ice Produced by Fine Bubble Technology on Microbial Contamination and Sensory Preference of Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*) Preservation

Boontarika Thongdonphum*, W. Pivsa-Art, S. Pivsa-Art, S. Pavasupree, K. Yoshikawa
Rajamangala University of Technology Thanyaburi,
Pathum Thani, Thailand

Abstract: Effects of oxygen-free ultra-fine bubbles ice on the preservation of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) was studied. This species is significant aquaculture economic values in Thailand. To assess the applicability of ultra-fine bubbles technology for preservation, three types of preservation were tested using different types; (1) keep in normal ice (Treatment 1 or T1), 2) keep fish in oxygen-free ice; OFI (T2), and 3) freeze (T3). Twelve days, physical sensory preference scores of the Asian sea bass were evaluated for the three treatments. The oxygen free ice has a positively impact between Day 4 and Day 8 on the physical quality and sensory preference of Asian sea bass. The finding showed the OFI is found to be substantially successful in maintaining Asian sea bass freshness. However, the results revealed that the Asian sea bass retained in regular ice during the experiment displayed a dramatic shift in its color.

Keywords—Oxygen-free ultra-fine bubbles ice, Preservation, *Lates calcarifer*

I. INTRODUCTION

Seafood is one of the major natural economic products and a favorite diet of Thailand [1]. Asian sea bass (*Lates calcarifer*) is an extremely good source of protein economically importance worldwide, yet very low in fat and calories, making them a very healthy food choice. Formaldehyde or formalin is commonly used as tissue preservatives. Many fish sellers spray or dip fish with formalin-treated water to keep seafood products looking fresh for longer period of time, where this chemical puts public health at risk [2].

The presence of formaldehyde in fresh seafood has been notice in the fresh market, flea market and field far from the coastal region [3]. Cooling, packaging in modified atmosphere preserves the fresh fish products. Of these products, the microflora is often complex. Much of the spoilage is from microbial action [4]. Aerobic bacteria that decompose fish protein using dissolved oxygen (DO) in water initiate degradation mechanisms for maintaining fish freshness in water. Oxygen-free water can significantly suppress bacterial activity and increase the time need to maintained freshness. This approach has the benefit that it is absolutely free, without any chemical additives.

Nowadays, micro/nano bubble (MNB) technologies are evolving rapidly in various field [5], especially in Japan. Micro/Nano-bubbles technology based on realistic bio-applications, the production of biological treatment at the cell-level [6]. Fine bubbles (FB) technology, bubbles consisting of micro bubbles ($1\mu\text{m} < \text{MB} < 100\mu\text{m}$ dia.), and ultra-fine bubbles (UFB $< 1\mu\text{m}$ dia.), is now rapidly emerging as an innovative technology in different fields [5].

Thongdonphum et al. [7] stated that between Day 4 and Day 8 the oxygen free water and ice positively affected the physical quality and sensory preference of Threadfin bream. The mechanism for preserving fish freshness is as follows; as fish degradation in water is caused by aerobic bacteria which decompose fish protein using dissolved oxygen in the water, oxygen-free water can greatly suppress the activity of such bacteria, resulting in long-term preservation of fish freshness.

The method's greatest benefit is absolutely free, without any chemicals. Yoshikawa and Thonglek [5] reported that ultra-fine bubbles of oxygen were measured and found to remain longer under atmosphere conditions, for as long as one month. It has also been proved that free radicals are generated during the microbubble collapse, which can very strongly kill bacteria [8, 9]. For OFW, on the other hand, to prevent oxygen re-dissolution into water, OFW must be kept free of air contact [7].

In this analysis, oxygen-free ice produced by fine bubble technology was applied to preserve Asian sea bass. To compare with traditional, the microbial count and spoilage on fish skin were tested.

Manuscript received June 14, 2020; revised June 26, 2020; accepted June 29, 2020; Date of publication June 30, 2020.

*Corresponding author: Asst. Prof. Dr. Boontarika Thongdonphum is with Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thanyaburi District, Pathum Thani, 12130, Thailand (Email: Boontarika@rmutt.ac.th).

II. METHODOLOGY

A. Fish Source

Asian sea bass was harvested from the fish farm, Chachoengsao Province, Thailand, and transported to the laboratory within around 3 hours. The Asian sea bass had a total weight of approximately 700 g/individual per treatment and was tested at normal temperature in each treatments and tested for 12 days in plastic bags in the iced storage box in the room.

B. Experimental design

All experiments followed a completely randomized design (CRD) consisting of three treatments as follows: fish preserved in standard tap water ice (NI, Treatment 1 or T1), fish in oxygen-free ice (OFI) (T2). Fish samples T1 and T2 were placed in ice storage boxes containing ice layers using a 1:2 (w/w) of fish/ice ratio, while T3 was designed to test the air freezing still.

Fish have been divided into 27 group samples. Then, nine group samples were divided into three batches. Evaluation of physical parameters for every batch was recorded for a total of 12 days every 4 days. They were not returned to the experiment after the samples were analyzed in each group.

Fish samples weighting 700 g per group were individually packed in polyethylene bags (PE) and then divided into groups for sensory tests in 12 days. Fish were prepared according to the above experimental design, and kept at less than 5 °C in iced storage boxes.

Ice was frozen at twice the weight of the fish in the storage boxes and refilled every day to preserve the consistency of the fish [10] and to avoid changes in various chemical and physical factors after processing and storage [11]. The ratio of fish samples/ice was held at 1:2 and regular replacement of the melted ice in the storage boxes [12] was undertaken. Evaluation of microbial change during the 12-day period was conducted every 4 days.

C. Oxygen-free water

An economical but high performance RMUTT-MNB generator was developed at RMUTT to generate N₂-FB, based on the pressurized dissolved gas method (Fig. 1) for basic research. A generator of RMUTT-MNB can generate many tens of thousands/mL of microbubbles (MB), and ultra-fine bubbles (UFB) up to 10⁶ nitrogen bubbles/mL, (Fig. 2), measured with Malvern Panalytical NanoSight NS300.

Oxygen-free water (OFW) was made from distilled water. Prior to production, a once-through cleaning of all the generator channels was performed using distilled water for 20 min with a flow rate of 1 L/min. The MNB generator had dead space of about 0.4 L.

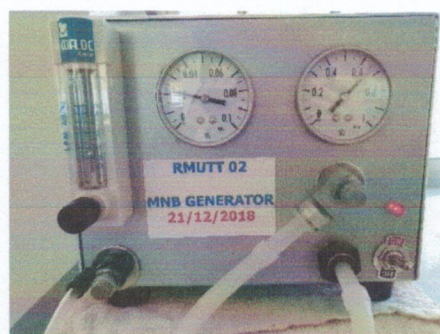


Fig. 1. RMUTT-MNB generator developed for basic research at RMUTT.

Nitrogen FB was injected and recirculated for 15 min with nitrogen gas flow rate of 0.05 L/m by the MNB generator to 10 L water in the plastic bottle, resulting in DO of approximately 0.18 mg/L and average OFW size of 179.3 nm±134.5 nm (Fig. 2).

OFW was produced by an in-house micro/nano bubble generator at RMUTT, packed in 20L plastic hard bottles. The OFW was contained in plastic bags to produce oxygen-free ice at -20 °C. The OFW was used immediately to preserve fish without any delay, to keep OFW as real OFW and to reduce the contact time with air.

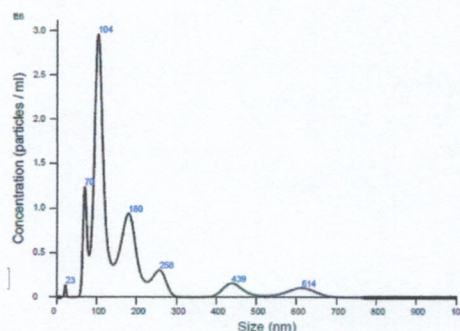


Fig. 2. Size measurement of ultra-fine nitrogen bubbles in oxygen-free water and concentration (bubbles/mL) produced by an RMUTT-MNB generator.

III. RESULTS

Fish preservation

Fish samples were packed in plastic bags at approximately 700 g weight in each 12-day treatment at RMUTT. Table 1 shows results. Fish preserved in oxygen-free ice (OFI) were found to be in excellent condition after 4 days and comparable to those brought from the market, while fish in normal ice (T1) showed a shift in light color and smell as opposed to live fish skin.

The results on Day 4 showed the highest overall parameter score was freezing, following by OFI and NI, respectively, while the results on Day 8 showed a similar pattern compared to Day 4. The overall results in the fish preservation test had the high score in sequence, freezing, OFI, and NI, respectively, when considered in each parameter shown in Table 1.

TABLE I
PHYSICAL PREFERENCE TEST SCORES OF FISH PRESERVATION FOR THE
THREE TREATMENTS

Day	Treat ment	Physical preference scores				
		Eyes	Gill	Skin	Odor	Texture
0	T1	4.9±0.3 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	4.4±0.5 ^a	5.0±0.0 ^a
	T2	5.0±0.0 ^a	4.7±0.5 ^a	5.0±0.0 ^a	4.5±0.5 ^a	5.0±0.0 ^a
	T3	5.0±0.3 ^a	5.0±0.0 ^a	4.9±0.3 ^a	4.6±0.5 ^a	4.9±0.3 ^a
4	T1	3.8±0.2 ^a	3.5±0.2 ^a	3.8±0.5 ^a	3.5±0.6 ^a	3.3±0.7 ^a
	T2	3.5±0.6 ^a	3.8±0.6 ^b	3.9±0.8 ^a	3.5±0.6 ^a	3.4±0.7 ^a
	T3	4.7±0.3 ^b	4.1±0.3 ^c	4.2±0.6 ^a	3.7±0.5 ^a	3.6±0.5 ^a
8	T1	3.3±0.5 ^a	3.1±0.6 ^a	3.8±0.5 ^a	3.5±0.6 ^a	3.3±0.7 ^a
	T2	3.3±1.0 ^a	3.1±1.1 ^a	3.9±0.8 ^a	3.5±0.6 ^a	3.4±0.7 ^a
	T3	4.3±0.5 ^b	4.0±0.6 ^a	4.2±0.6 ^a	3.7±0.5 ^a	3.6±0.5 ^a
12	T1	2.2±0.9 ^a	1.8±0.5 ^a	2.1±0.4 ^a	2.3±0.7 ^a	1.9±0.4 ^a
	T2	2.3±0.7 ^a	2.3±0.5 ^a	2.2±0.5 ^a	2.9±0.5 ^a	2.5±0.5 ^a
	T3	3.9±0.4 ^b	3.9±0.5 ^b	3.9±0.3 ^b	4.0±0.0 ^b	4.0±0.1 ^b

Note: The values in the same column with different superscript letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Evaluation of Bacteria

Results of microbial assessment on fish skin in each treatment are shown in Table 2. Measurements of changes in microbial quality were taken every 4 days for a total period of 12 days. Observations of total bacteria on fish skin were compared on the 1st, 4th, 8th and 12th day. The overall findings showed that freezing (T3) obtained the lowest of total bacteria followed respectively by OFI (T2) and NI (T1).

Day 4 test revealed that freezing produced the lowest total number of bacteria followed by OFI and NI, respectively. Results at the end of the experiments, exhibited freezing as the most effective for fish preservation, while oxygen-free ice made from RMUTT-MNB had a positive influence on the number of total bacteria.

TABLE II
EVALUATION OF TOTAL BACTERIA (CFU/ML) ON SKIN OF FISH
PRESERVATION FOR THE THREE TREATMENTS

Treatment	Day			
	0 ($\times 10^5$)	4 ($\times 10^5$)	8 ($\times 10^5$)	12 ($\times 10^5$)
T1	0.73±0.00 ^a	0.64±0.46 ^a	8.38±0.96 ^b	21.88±1.63 ^c
T2	0.54±0.00 ^a	0.94±1.28 ^a	6.33±2.64 ^b	13.52±0.05 ^b
T3	0.25±0.00 ^a	0.17±0.00 ^a	2.88±0.12 ^a	6.51±4.39 ^a

Note: The values in the same column with different superscript letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

The number of total bacteria in meat (Table 3) differentiated significantly between the three experimental groups when compared in each treatment, particularly on Day 8 and 12. In comparison, the total bacteria values in meat displayed the lower average bacteria values on the skin relative to the total bacteria.

Overall finding showed that freezing (T3) also hit the lowest total bacteria followed respectively by OFI (T2) and NI (T1). TABLE II

EVALUATION OF TOTAL BACTERIA (CFU/ML) IN MEAT OF FISH
PRESERVATION FOR THE THREE TREATMENTS

Treatment	Day			
	0 ($\times 10^5$)	4 ($\times 10^5$)	8 ($\times 10^5$)	12 ($\times 10^5$)
T1	0.47±0.00 ^a	1.45±1.23 ^a	9.68±0.97 ^c	18.76±23.00 ^c
T2	0.16±0.00 ^a	0.32±0.07 ^a	2.38±1.02 ^b	10.02±0.29 ^b
T3	0.15±0.00 ^a	0.11±0.17 ^a	0.24±0.10 ^a	5.83±2.53 ^a

Note: The values in the same column with different superscript letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

IV. DISCUSSION

Reasons for declining fish quality leading to spoilage need to be carefully evaluated. Depending on the individual the time of pre-rigor mortis and rigor mortis varies. It also depends on a variety of factors, such as temperature, handling, size, physical condition, biochemical reactions and microorganism activities of the fishes [12].

In the detailed studies of the Food and Agriculture Organization (FAO) on the use of ice in fish preservation, when ice is used to lower temperature to about 0 °C, the growth of spoilage and pathogenic micro-organisms are reduced [13], as well as the rate of enzymatic reactions, in particular those associated with early rigor mortis period.

Gradual degradation of color, texture and taste during extended of storage frozen shrimps becomes apparent organoleptically [14]. Products stored in the upper shelves of horizontal freezers were frequently exposed to temperatures close to 10 °C, while recommended storage temperatures were only reported on the lower shelves. Deviations in the temperature of domestic storage were even more pronounced, with reported temperatures in some cases as high as 5 °C.

Oxygen is needed for the growth of aerobic bacteria, but the flushing of nitrogen gas can be deleterious to bacteria [15, 16]. Bacteriological analysis is used to determine the potential existence of microorganisms of public health importance and to give an indication of the fish's hygienic condition [17].

Thus, in our experiments, nitrogen bubbling in a form of ultra-fine bubbles could penetrated fish meat through skin and visceral, preventing oxidation of oil and fat content, as well as aerobic bacteria's activity and growth. In such condition freshness is kept with good taste for at least 8 days [18].

V. CONCLUSION

Results revealed that the oxygen-free ice also had positive effects for 4 days on physical quality and sensory preference of fish freshness. Experiments also demonstrated the applicability of ultra-fine bubble technology as an option for enhancing fish product shelf life.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to extend deep gratitude and deep appreciation to the Research Institute and Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi (RMUTT) for all the support given during this study.

REFERENCES

- [1] S. Osiri, "Sea food safety situation in the East," *Thailand Journal of Health Promotion and Environment Health*, pp. 74-86, 2009. Available: <http://digi.library.tu.ac.th/index/0125/32-4-Oct-Dec-2552/08PAGE74-PAGE86.pdf>
- [2] N. Jaman, Md. S. Hoque, S. C. Chakraborty, Md. E. Hoq and H. P. Seal, "Determination of formaldehyde content by spectrophotometric method in some fresh water and marine fishes of Bangladesh," *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, Vol. 2, No. 6, pp. 94-98, 2015.
- [3] V. Somjit, K. Yooyen and C. Kwannak, "Survey of formalin contamination in popular seafood from fresh market and flea market in Amphoe Meaung, Amphoe Sri Bun Reung and Amphoe Na Klang, Nong Bua Lum Phu Province," The 1st national conference, July 29, 2016, Ubonratchathani, Thailand. pp. 1621-1628.
- [4] L. Gram, "Microbiological spoilage of fish and seafood products," In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. New York: Springer, 2009.
- [5] K. Yoshikawa and V. Thonglek, "Research and development of simple detector of nanobubble density through spectroscopic method," The 2nd International Symposium on Application of High-voltage, Plasma & Micro/Nano Bubbles to Agriculture and Aquaculture, July 26th-27th, 2017, Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang Mai, Thailand. Available: https://webs.rmutil.ac.th/assets/upload/files/2017/12/20171225115505_23136.pdf
- [6] T. Marui, "An Introduction to Micro/Nano-bubbles and their applications," *Systemics, Cybernetics and Informatics*, vol. 11, no. 4, pp. 68-73, 2013.
- [7] B. Thongdonphum, W. Pivsa-Art, S. Pivsa-Art, S. Pavasupree, V. Thonglek and K. Yoshikawa, "Effects of Oxygen-free Water on Preservation of Threadfin bream (*Nemipterus hexodon*) & Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*)," *IJPEST*, vol. 12, no. 2, pp. 93-96, 2019.
- [8] M. Takahashi, K. Chiba and P. Li, "Free-Radical Generation from Collapsing Microbubbles in the Absence of a Dynamic Stimulus," *J. Phys. Chem. B*, Vol. 111, No. 6, pp. 1343-1347, 2007.
- [9] M. Takahashi, K. Chiba and P. Li, "Formation of Hydroxyl Radicals by Collapsing Ozone Microbubbles under Strongly Acidic Conditions," *J. Phys. Chem. B*, No. 39, pp. 11443-11446, 2007.
- [10] P. Kwan-on, P. Suwansakornkul, N. Raksakulthai and J. Runglertkreingrai, "Effect of freshness on physicochemical properties of flesh and protein gel from Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) during iced storage," Available: <http://old.rmutto.ac.th/fileupload/Wannasa%20Balsong6No.5.pdf>
- [11] A. Imran, J. Chawalit, and K. Somrote, "Characterization of quality degradation during chilled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) supply chain," *International Food Research Journal*, Vol. 20, No. 4, pp. 1833-1842, 2013.
- [12] N. Huy Quang, "Guidelines for handling and preservation of fresh fish for further processing in Vietnam," Quality Assurance Department, Seafood Export and Quality Improvement Program, Vietnam, 2005.
- [13] FAO, "Improved fresh fish handling methods," Food and Agriculture Organization of the United Nations, Available: <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180e08.htm>
- [14] T. Tsironi, E. Dermesonlouoglou, M. Giannakourou, P. Taouki, "Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions," *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 42, pp. 664-671, 2009.
- [15] N. Khunsoongnern, "Quality change of Tilapia fillet stored under modified atmosphere," Master of Science in Food Technology, Suranaree University of Technology, 2003.
- [16] P. Munsch-Alatossava and T. Alatossava, "Nitrogen gas flushing can be bactericidal: the temperature-dependent destiny of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 under a pure N₂ atmosphere," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, 1-11, 2014.
- [17] A.A. Edris, F.S. Hassanien, F.A.E. Shaltout, A.H. Elbaba and N.M. Adel, "Microbiological evaluation of some heat treated fish products in Egyptian markets," *EC Nutrition* 12.3, pp. 124-132, 2017.
- [18] A. Serizawa, "Fundamentals and Applications of Micro/Nano Bubbles," The 1st International Symposium on Application of High voltage, Plasmas & Micro/Nano Bubbles to Agriculture and Aquaculture (ISHPMNB 2017), January 5-7, 2017, Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang Mai, Thailand. Available: http://webs.rmutil.ac.th/assets/upload/files/2017/01/20170106155252_97638.pdf