การประยุกต์การเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตะกอนฟลอคอบแห้งต่ออัตราการรอดตายในปลานิลที่ติดเชื้อ Streptococcus agalactiae, DMST 17129

Application Supplementation of Immunostimulant in Dried Bio-Flocs on Survival Rate of Nile Tilapia infected with Streptococcus agalactiae, DMST 17129

สุไหลหมาน หมาดโหยด[1*] สุวรรณา หมาดโหยด[2] สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี[3] ดิลกา ชุมทอง[1] กฤศณัฏฐ์ จันทศิลา[1] อรวรา นวลละออง[1] สุภาพร หนูชู[1] และสุรินทร บุญรอด[1]

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, นครศรีธรรมราช

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, นครศรีธรรมราช

[3]สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการประยุกต์ใช้ตะกอนฟลอคเหลือทิ้งในระบบการเลี้ยงปลานิลมาเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ เบต้ากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ จากนั้นให้ปลานิลกินร่วมกับอาหารสำเร็จรูป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โดยการตรวจสอบอัตราการรอดตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129 โดยใช้ปลานิลขนาด 1 นิ้ว ทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *streptococcus agalactiae*, DMST 17129 ระดับความเข้มข้นตั้ง 10^2-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และพบว่าปลาจะติดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ได้แก่ 1) กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) 2) กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกันไบโอฟลอคอบแห้งอย่างเดียว 3) กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับไบโอฟลอคอบแห้งเสริมเบต้ากลูแคน และ 4) กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับไบโอฟลอคอบแห้งเสริมนิวคลีโอไทด์ ใช้ปลานิลซ้ำละ 20 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน (ให้กินผลิตภัณฑ์ก่อนการฉีดเชื้อ 3 วัน และให้กินผลิตภัณฑ์หลังฉีดเชื้ออีก 7 วัน) จากนั้นเก็บข้อมูลการตายเพื่อประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ และวิเคราะห์ค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (%RPS) เปรียบเทียบความความแตกต่างด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95% ผลการทดลองพบว่า อัตราการตายเฉลี่ยของทั้ง 4 ชุดการทดลอง เท่ากับ 63.33±5.77, 3.33±5.77, 6.67±5.77 และ 3.33±5.77 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนอัตราการรอดสัมพัทธ์ของทั้ง 4 ชุดการทดลองเท่ากับ 9.53±8.25, 95.24±8.25, 90.47±8.25 และ 95.24±8.25 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งตะกอนฟลอคอบแห้งทั้งเสริม และไม่เสริมกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ เบต้ากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ สามารถเพิ่มอัตราการรอดตายในปลานิลที่ติดเชื้อ *streptococcus agalactiae*, DMST 17129 ได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: ตะกอนฟลอคอบแห้ง, สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน, อัตราการรอดตายสัมพัทธ์, ปลานิล

Abstract

A research was aimed to employ dumped bio-floc sediment to mix β-glucan and nucleotide in Nile Tilapia cultivation system as immunostimulants. Afterwards, Nile Tilapia was fed with immunostimulants with commercial feed with an objective to assess it efficiency via examination of survival rate of Nile Tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129. The 1-inch body size of Nile Tilapia was infected with 10^2-10^8 cells/ml *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129. After that, it was demonstrated that the fish was infected with 10^5 cells/ml *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129 and its efficacy against infection was probed. Experimental

design was completely randomized design as four experiment groups consisted of 20 fishes/ replication for 10 experiment days (supplemented feed was fed 3 days prior to pathogen injection and 7 days after injection). Thereafter, with 4 individual treatments as follows: 1) fed with commercial feed only, 2) fed with feed and dried bio-flocs: 3) fed with commercial feed together with dried bio-floc and β-glucan and 4) fed with commercial feed with dried bio-floc and nucleotide. Data collection related to survival rate was recorded to evaluate immunostimulants efficiency and relative percent survival was determined and their mean difference was statistically assessed through Duncan Multiple Range Test ($P < 0.05$). Results revealed that average survival rate of individual treatments were 63.33±5.77, 3.33±5.77, 6.67±5.77 and 3.33±5.77 % respectively with statistically significant differences ($P<0.05$) as relative percent survival rates were 9.53±8.25, 95.24±8.25, 90.47±8.25 and 95.24±8.25 % respectively. As a consequence, Dried bio-flocs with a supplementation and without a supplementation of immunostimulants as β-glucan and nucleotide could well increase survival rate of Nile Tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129.

Keywords : dried floc sediment, immunostimulants, relative percent survival, Nile Tilapia

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน smadyod@gmail.com โทร 0910354306

1. บทนำ

ปัจจุบันปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญที่สุดต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งมีมูลค่ามากที่สุดถ้าเทียบกับสัตว์น้ำจืดชนิดอื่น เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ขยายพันธุ์รวดเร็ว เป็นที่ต้องการของตลาด ประกอบกับหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนมีการส่งเสริม พัฒนาระบบการเลี้ยง รวมทั้งปรับปรุงสายพันธุ์อย่างต่อเนื่องจนปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอาชีพหลักกันเป็นจำนวนมากจนกลายเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญ เมื่อการเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น พร้อมๆ กับการเพิ่มกำลังการผลิตของเกษตรกรจึงส่งผลถึงสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้ปลานิลเกิดความเครียด อ่อนแอ และติดเชื้อได้ง่าย (อนงค์และคณะ, 2556) ไม่ว่าจะป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (แบคทีเรีย ไวรัส หรือปรสิต) และโรคไม่ติดเชื้อ (สิ่งแวดล้อม อาหารหรือพันธุกรรม) ล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดความเสียหายในการเลี้ยงปลานิลอย่างมาก เพื่อการแก้ไขปัญหาดังกล่าวเกษตรกรส่วนใหญ่ได้หันมาใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งนอกจากจะใช้ไม่ได้ผลแล้ว ยังได้ส่งผลกระทบต่อทั้งสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคที่ได้รับยาที่ตกค้างในตัวปลาอีกด้วย (เอกพล, 2551) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลด้วยเทคโนโลยีไบโอฟลอค เพื่อที่ให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น และแก้ปัญหาเรื่องของคุณภาพน้ำหากการจัดการไม่ดีพอ โดยเฉพาะเรื่องแอมโมเนีย ที่มักจะเกิดมาจากการให้อาหารในปริมาณที่มากเกินไป หรืออาจจะมาจากการขับถ่ายของตัวสัตว์น้ำเอง(กษิดิศ, 2551) ซึ่งถือเป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง

กลุ่มฟลอค (floc) หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์พวกเฮทเทอโรโทรฟิค (Heterotrophic bacteria) ที่มารวมตัวกันเป็นตะกอนแขวนลอย ขนาดของกลุ่มฟลอคอยู่ที่ 0.2-2.0 มิลลิเมตร กลุ่มฟลอคมีการดึงไนโตรเจนมาเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์น้ำแทน ซึ่งเรียกว่าจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าวนั้นก็คือ ไบโอฟลอค (Biofloc) หรือตะกอนจุลินทรีย์ที่รวมตัวเป็นฟลอคก็เท่ากับว่าสัตว์น้ำได้กิน อาหารที่มีโปรตีนเข้าไปนั่นเอง ดังนั้นเทคโนโลยีไบโอฟลอค เป็นเทคนิคการจัดการให้ของเสียที่เกิดจากสัตว์น้ำ สามารถกลับไปเป็นอาหารของสัตว์น้ำเหล่านั้นอีก โดยการทำงานของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยง และการควบคุมอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในบ่อ ทำให้สามารถทำการเลี้ยงได้อย่างหนาแน่น ไม่ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการเลี้ยง และสามารถใช้อาหารที่มีโปรตีนต่ำได้ ทำให้ต้นทุนการเลี้ยงในส่วนนี้ลดลง

จากการศึกษาของวรรัตน์ (2552) พบว่า ลักษณะของตะกอนไบโอฟลอคที่พบในการเลี้ยงปลานิล โดยมีรูปร่างที่ไม่รูปร่างที่ไม่แน่นอนและประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้น โรติเฟอร์ หนอนตัวกลม และจุลสาหร่ายกลุ่ม

Heterotrophic bacteria ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ อาหารขึ้นเองได้ต้องใช้อาหารที่ได้จากการสร้างของสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งเป็นจุลสาหร่ายที่พบในตะกอนของฟล็อก และเป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น แบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* spp. เป็นตัวสำคัญของสารเสริมชีวนะ (probiotic) ในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และอาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นประกอบ เช่น *Saccharomyces , Enterococci (Streptococcus) , Lactobacillus และ Nitrobacter* เป็นต้น

มีรายงานการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีไบโอฟลอค เช่น เพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ เช่น กุ้งขาวแวนนาไม ปลานิล และกุ้งก้ามกราม (Samocha et al., 2007; De Schryver et al., 2008; Avnimelech and Kochba, 2009; Ballester et al., 2010; Crab et al., 2010; Ekkasari et al., 2015; Caldini et al., 2015) รวมถึงยังมีการศึกษาที่มาของคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ เพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานของเฮเทโรทรอฟิกแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบการเลี้ยงแบบไบโอฟลอค เช่น ข้าวสาลี (Megahed, 2010), แป้งข้าวจ้าว (Anand et al., 2013), แป้งมันสำปะหลัง (Asaduzzaman et al., 2010), สารอซิเตต (Crab et al., 2010) และglycerol (Ekasari et al. 2010), ซึ่งทั้งหมดนี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในระบบไบโอฟลอคเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น ปัจจุบันมีรายงานการประยุกต์ใช้ไบโอฟลอคเพื่อช่วยในการควบคุมโรคสัตว์น้ำ เช่น การใช้ควบคุมโรค infectious myonecrosis virus (IMNV) ในกุ้งขาวแวนนาไม (Ekasari et al., 2014) และ WSSV (Grillo et al., 2000) และควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Sreptococcus agalactiae* ในปลานิล (Ekasari et al., 2015) รวมถึงการนำมาประยุกต์ในการพัฒนาความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์น้ำ เช่น ในกุ้งสีฟ้า (*Litopeneaus stylostris*) ที่เลี้ยงด้วยไบโอฟลอค พบว่ามีการเจริญพันธุ์อย่างต่อเนื่อง และมีความดกไข่ที่เพิ่มขึ้น (Emerenciano et al., 2013) ในปลานิลสามารถเพิ่มความดกของไข่ และเพิ่มจำนวนของลูกปลา รวมทั้งอัตรารอดตาย เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในระบบที่ไม่ใช้ไบโอฟลอค และยังส่งผลต่ออัตรารอดของลูกพันธุ์สูงถึง 90-98% และรวมถึงอัตรารอดตายหลังชักนำให้มีการติดเชื้อ *Sreptococcus agalactiae* สูงถึง 75-80% (Ekasari et al., 2015) เนื่องจากในระบบไบโอฟลอคมีสารอาหารพิเศษที่มีคุณสมบัติช่วยให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโต และส่งผลต่อการรอดตายสูงกว่าสัตว์น้ำที่ไม่ได้เลี้ยงในระบบไบโอฟลอค (Emerenciano et al., 2011)

แต่งานวิจัยที่ผ่านมามีการชักนำให้สัตว์น้ำเกิดโรคในขณะที่เลี้ยงสัตว์น้ำในบ่อที่เลี้ยงด้วยไบโอฟลอค ซึ่งไบโอฟลอคสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี ทำให้สัตว์น้ำมีอัตราการรอดตายสูง แต่ก็ยังไม่มีรายงานการนำผลผลิ ต หรือผลิตภัณฑ์จากตะกอนฟลอคในรูปแบบอบแห้งมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคในสัตว์น้ำ แต่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Cialdini et al., (2015) ได้รายงานการใช้ผลิตภัณฑ์จากตะกอนฟลอคแบบไม่อบแห้ง (Wet biofloc) และแบบอบแห้ง (Dryed biofloc) เสริมกับอาหารสำเร็จรูปในสัดส่วนที่ต่างกันในการเลี้ยงปลานิลพบว่า การใช้อาหารสำเร็จรูปเสริมด้วยตะกอนฟลอคอบแห้ง ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิลอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดการใช้อาหารสำเร็จรูปที่เสริมด้วยตะกอนฟลอคแบบไม่อบแห้ง เมื่อพิจารณาอัตราการรอดตายเฉลี่ยพบว่าทุกชุดการทดลองทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดตายสูงถึง 87.8% สืบเนื่องจากในตะกอนฟลอคจะมีกระบวนการผลิตกรดไขมันสายสั้น (*short chain fatty acid*) ซึ่งเป็นกลไกที่จุลินทรีย์ในตะกอนฟลอคผลิตขึ้นโดยจะส่งผลต่อการป้องกันและควบคุมโรคในสัตว์น้ำ และรวมถึงการผลิต Poly-B hydroxy butyrate (PHB) ซึ่งทำหน่าที่เปนแหลงคารบอนและพลังงานให้กับเซลล์ ซึ่ง Poly-B hydroxy butyrate ที่สะสมอยู่กับตะกอนฟลอคจะถูกชักนำออกมาเพื่อให้ค่าคาร์บอนเกิดขึ้นในปริมาณสูง (C:N ratio) จะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตโปรไบโอติกในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยเทคโนโลยีไบโอฟลอค (De Schryver et al., 2008)

ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงปลาและกุ้งให้โตดี มีผลผลิตสูง โดยการเปลี่ย นถ่ายน้ำน้อยระหว่างการเลี้ยง รวมถึงการใช้จุลินทรีย์ในน้ำมาจับกับแอมโมเนียแล้วให้เปลี่ยนรูปเป็นโปรตีน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์น้ำแทน ซึ่งเรียกว่าจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าวนั้นก็คือ ไบโอฟลอค (Biocfloc) หรือตะกอนจุลินทรีย์) ปัจจุบันพบว่าการนำเทคโนโลยีไบโอฟลอคมาใช้นั้นสามารถกระตุ้นภูมิคุมกันแบบไม่จำเพาะ(non-specific immune system) ในกุ้งขาวแวนนาไมได้ (Avnimelech et al, 2014) และผลการวิจัยการผลิตตะกอนฟลอคด้วยคาร์โบไฮเดรตในระบบการผลิตไบโอฟลอคสามารถเพิ่มการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันและใน

การต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งพลาสม่าและตับเพิ่มกิจกรรม superoxide dismutase ในพลาสม่าและลดกลูตาไธโอนออกซิไดซ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง(Wu et al, 2013) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการใช้ประโยชน์จากตะกอนฟลอคในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยนำตะกอนฟลอคที่เปลี่ยนแปลงสภาพเป็นอบแห้งมาเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ต่ออัตราการรอดตายของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129

2. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตะกอนฟลอคเหลือทิ้งจากกระบวนการเลี้ยงปลานิล

ทำการเลี้ยงปลานิลที่ระดับความหนาแน่นสูงด้วยเทคโนโลยีใบโอฟลอค ขนาดปลานิล 40 กรัมต่อตัว เลี้ยง 100 ตัวในน้ำ 1000 ลิตร (1 ถังไฟเบอร์) ในระดับ C:N ratio ที่ 16:1 ทำการดูดตะกอน 30% ต่อเดือนพร้อมให้ออกซิเจนมากกว่า 0. 5 mg/l ตลอดเวลา อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลา เป็นอาหารปลากินพืชที่มีโปรตีน ไม่น้อยกว่า 30% โดยให้อาหาร 10% ของน้ำหนักตัว เพื่อให้ได้ตะกอนฟลอคที่เหลือทิ้งมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการนำตะกอนฟลอคที่ผ่านกระบวนการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเกือบแห้ง จากนั้นเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae*, DMST 17129

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae, DMST 17129* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยนำเชื้อมาละลายลงในน้ำเกลือ 0.6% ในหลอดทดลองให้มีค่า Absorbance ต่างๆ กันด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่ ค่า Absorbance 0.08 จะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เจือจางสารละลายแบคทีเรีย 7 ความเข้มข้น คือ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือ 0.6% โดยไม่ใส่เชื้อทดสอบความสามารถในการก่อโรคตามวิธีของ (Evans, 1976) โดยนำสารละลายเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 7 ความเข้มข้น (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และน้ำเกลือความเข้มข้น 0.6% มาฉีดให้ปลานิลทดลองขนาดความยาว 1 นิ้ว หลังจากเลี้ยงเพื่อปรับสภาพการเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) ฉีดเข้าสู่ช่องท้อง และ 2) ฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อบริเวณใต้โคนครีบหลัง ปริมาณตัวละ 0.2 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำต่อชุดการทดลอง ปลานิลที่ใช้ในการทดลองตู้ละ 10 ตัว

3. การทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนฟลอคต่ออัตราการรอดตายของปลานิล

โดยแบ่งการทดลอง เป็น 4 กลุ่มการทดลอง คือ

กลุ่มการทดลองที่ 1 กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูป (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มการทดลองที่ 2 กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับตะกอนฟลอค

กลุ่มการทดลองที่ 3 กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับตะกอนฟลอคเคลือบเบต้ากลูแคน

กลุ่มการทดลองที่ 4 กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับตะกอนฟลอคเคลือบนิวคลิโอไทด์

ปลานิลที่ใช้ในการทดลองมีขนาด 1 นิ้ว โดยจัดแบ่งใส่ตู้ๆละ 20 ตัว กำหนดเปอร์เซ็นต์การให้อาหารปลาเป็น 5% ของน้ำหนักตัวต่อวันโดยแบ่งเป็น 2 มื้อ ซึ่งจะมีอัตราส่วนการให้กินเท่ากับ 4:1 ของอาหารสำเร็จรูป:ตะกอนฟลอคเคลือบสารกระตุ้นภูมิ (เบต้ากลูแคนและนิวคลิโอไทด์) โดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอัตราส่วนเท่ากับ เบต้ากลูแคน 0.5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และนิวคลีโอไทด์ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำการทดลอง 10 วัน (ให้กินอาหารทดลอง 3 วัน ก่อนฉีดเชื้อ และตรวจสอบการตาย 7 วันหลังจากฉีดเชื้อ)

4. การศึกษาประสิทธิภาพของตะกอนฟลอคโดยการหาค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival : RPS)

นำเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลานิล ในแต่กลุ่มการทดลองไปหาค่าอัตรารอดสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival: RPS) โดยดัดแปลงวิธีของ Ellis (1988) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดสัมพัทธ์} = \left[1 - \frac{\text{อัตราการรอดตายของปลาที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน}}{\text{อัตราการตายเฉลี่ยของปลาที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน}}\right] \times 100$$

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย และค่าอัตรารอดตายสัมพัทธ์ ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

3. ผลการวิจัย

1. ความสามารถในการก่อโรค

จากการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของปลานิลหลังจากฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae,* DMST 17129 เข้าทางช่องท้องและกล้ามเนื้อ พบว่าความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus agalactiae,* DMST 17129 ในระดับที่ทำให้ปลาตายมากกว่า 50% เมื่อฉีดเชื้อเข้าช่องท้องอยู่ที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อในช่วงระดับความเข้มข้นที่ 10^5 ทำให้ปลามีอัตราการตาย 70% ซึ่งการฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อที่ระดับความเข้มข้นนี้เป็นระดับที่ถูกคัดเลือกในการนำไปใช้ในการทดลอง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae,* DMST 17129 ของปลานิลหลังฉีดเชื้อเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สายพันธุ์แบคทีเรียที่ทดสอบ	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแบคทีเรียของปลานิลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ															
	ปริมาณเชื้อที่ฉีดเข้าช่องท้อง(เซลล์ต่อมิลลิลิตร)								ปริมาณเชื้อที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ(เซลล์ต่อมิลลิลิตร)							
	C	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	C	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Streptococcus agalactiae, DMST 17129	0	0	0	0	0	0	10	90	0	10	10	30	70	80	100	100

2. การทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนฟลอคต่ออัตราการรอดตายของปลานิล

จากการทดลองการเพิ่มสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตะกอนฟล็อก ต่ออัตราการตาย และอัตราการรอดสัมพัทธ์ ในระยะเวลา 7 วันหลังจากฉีดเชื้อ ได้ผลดังนี้ อัตราการตายเฉลี่ยของทั้งสี่กลุ่มการทดลอง เท่ากับ 63.33±5.77, 3.33±5.77, 6.67±5.77 และ 3.33±5.77 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ ส่วนอัตราการรอดสัมพัทธ์ของทั้งสี่กลุ่มการทดลองเท่ากับ 9.53±8.25, 95.24±8.25, 90.47±8.25 และ 95.24±8.25 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากการทดลองพบว่า กลุ่มที่ไม่ได้เสริมไบโอฟลอค มีอัตราการตายมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น เท่ากับ 63.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตะกอนฟลอค พบว่ามีอัตราการตายน้อยมาก และมีอัตราการรอดสัมพัทธ์สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ย ดังตาราง

ตารางที่ 2 ผลของการเพิ่มสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตะกอนฟลอคต่ออัตราการรอดสัมพัทธ์ในปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae,* DMST 17129 ที่ระดับความเข้มข้น 10^5

Treatments	อัตราการตาย (%)	RPS(%)
1. กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูป (กลุ่มควบคุม)	63.33 ± 5.77^a	9.53 ± 8.25^a
2. กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับตะกอนฟลอค	3.33 ± 5.77^b	95.24 ± 8.25^b
3. กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับตะกอนฟลอคเคลือบเบต้ากลูแคน	6.67 ± 5.77^b	90.47 ± 8.25^b
4. กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับตะกอนฟลอคเคลือบนิวคลิโอไทด์	3.33 ± 5.77^b	95.24 ± 8.25^b

a, b คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P<0.05$

4. สรุปผลและอภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่า อัตราการตายเฉลี่ยของทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง เท่ากับ 63.33±5.77, 3.33±5.77, 6.67±5.77 และ 3.33±5.77 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนอัตราการรอดสัมพัทธ์ของทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง เท่ากับ 9.53±8.25, 95.24±8.25, 90.47±8.25 และ 95.24±8.25 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในกลุ่มการทดลองที่ 1 ไม่มีการเสริมไบโอฟลอคและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน จึงทำให้มีอัตราการตายที่มากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองที่ 2 , 3 และ 4 ที่ได้รับตะกอนไบโอฟลอคและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่ปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มการทดลองส่วนหนึ่งอาจจะได้รับความกระทบกระเทือนจากการจับและการฉีดเชื้อ เนื่องจากปลาที่ตายทั้งหมดนั้นตายภายในหนึ่งวันหลังการฉีดเชื้อแต่ไม่พบรอยโรคที่บ่งบอกว่าเกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae,* DMST 17129 แต่อย่างไรก็ตามหลังจากวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายในปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae,* DMST 17129 ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 ได้

Avnimelech (2015) ได้รายงานผลของไบโอฟลอคต่อการต้านเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลานิล ซึ่งเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ปลานิลมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ และมีการตายเกิดขึ้น ในการทดลองดังกล่าวมีการศึกษาในบ่อขนาดความจุน้ำ 2 ตัน จำนวน 2 ชุดการทดลอง คือ บ่อที่เลี้ยงปลานิลในระบบไบโอฟลอค และบ่อควบคุมที่ไม่มีการใช้ระบบไบโอฟลอค ทั้งสองบ่อมีการให้อากาศในบ่อให้มีการหมุนวนภายในบ่อ มีการถ่ายน้ำเพื่อลดตะกอนผ่านท่อกลางบ่อเมื่อมีจำนวนมาก ใช้ปลานิลจำนวน 200 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง ให้กินอาหารที่มีโปรตีน 25% จำนวน 2% ต่อน้ำหนักตัว ทำการฉีดเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลา 50 ตัว ในระดับความเข้มข้น $5x10^4$ cell/ml ปริมาตร 2 ml/ตัว เลี้ยงนาน 20 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า มีการติดเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อมในปลานิล โดยทางตรงจะทำให้ปลาตายหลังจากได้รับเชื้อ 2-3 วัน ส่วนทางอ้อมปลาจะได้รับเชื้อจากปลาที่ตายทำให้ปลาป่วยและตายในช่วงท้ายๆของการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่มีเลี้ยงปลาในระบบไบโอฟลอค พบการตายเท่ากับ $3\pm$ 1 ตัว ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยระบบไบโอฟลอคพบการตายเท่ากับ $11\pm$ 5 ตัว

และจากการศึกษาของวรรัตน์ (2552) พบว่า ลักษณะของตะกอนไบโอฟลอคที่พบในการเลี้ยงปลานิล โดยมีรูปร่างที่ไม่รูปร่างที่ไม่แน่นอน และจากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของไบโอฟลอค พบว่ามีส่วนประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นวิตามิน แร่ธาตุ และสาร poly-β-hydroxylbutyrate (PHB) ซึ่งช่วยเสริมสุขภาพและเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อของสัตว์น้ำระบบเทคโนโลยีไบโอฟลอคจะมีอัตราการสร้างมวลชีวภาพโดยแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทโรโทรฟิกที่รวดเร็ว (Avnimelech, 2009) และเมื่อนำตะกอนฟลอคเสริมด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น และจากการศึกษาของ จิราพร (2557) ได้อธิบายผลของการใช้เบต้ากลูแคลนต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาไว้ พบว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

และจากการศึกษาของ Shiau et al.(2015) ได้ทำการศึกษาในเรื่องผลของการให้นิวคลีโอไทด์ในปลานิลเพื่อดูอัตราการรอดตายในปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus iniae* และพบว่านิวคลีโอไทด์เป็นแหล่งพลังงานที่ช่วยเพิ่มอัตราเมทาบอลิซึมในร่างกายปลาได้ โดยจะประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญต่างๆ เช่น coenzyme, allosteric effector และ cellular agonist โดยอธิบายได้ว่านิว

คลีโอไทด์นั้นสามารถเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบ non-specific immune เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่เซลล์ macrophage ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้ามาสู่ร่างกาย ทำให้ปลามีภูมิคุมกันในการต่อต้านเชื้อมากยิ่งขึ้น

5. **กิตติกรรมประกาศ**

รายงานการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากงบอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2557-2558 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและคลินิกสุขภาพสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เครื่องมือวิจัยในห้องปฏิบัติการ และอาคารปฏิบัติการเพื่อการวิจัยจนงานวิจัยประสบผลสำเร็จ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] จิราภร พงค์เพชร, 2557, “การใช้ Brewer’s yeast เป็นแหล่งโปรตีนเพื่อทดแทนการใช้ปลาป่นในอาหารปลาสวายโมง”, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

[2] วรรัตน์ วณิชชานัย, 2552, “ผลจากการเติมสารอินทรีย์คาร์บอนต่อการเกิดตะกอนตะกอนจุลินทรีย์และคุณภาพน้ำในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบปิด”. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[3] อนงค์ นิ่มละมัย, ปิยะพงค์ โชติพันธุ์, สถาพร ดิเรกบุษราคัม และสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี. 2556, “ความต้านทานโรคและการค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)”, วารสารเทคโนโลยีการประมง, 7 (2), 38-50.

[4] เอกพล วังคะฮาต, 2551, “การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs)”, วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, สาขาพันธุวิศวกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[5] Anand, P.S.S., Kumar, S., Panigrahi, A., Ghoshal, T.K., Syama Dayal, J., Biswas, G., Sundarym, J.K., De, D., Ananda Raja, R., Deo, A.D., Pillai, S.M. and Ravichchandran, P., 2013, “Effects of C: N ratio and substrate intergration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles”, Aquaculture International**,** 21(2), 511-524.

[6] Asaduzzaman, M., Wahab, M.A., Verdegem, M.C.J., Adhikary, R.K., Rahman, S.M.S., Azim,M.E., Verreth, J.A.J., 2010, “Effects of carbohydrate source for maintaining a high C:N ratio and fish driven re-suspension on pond ecology and production in periphyton based freshwater prawn culture systems”, Aquaculture, 301, 37–46.

[7] Avnimelech, Y. and Kochba, M. .2009, “Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using 15 n tracing”, Aquaculture, 287(1), 163-168.

[8] Avnimelech, Y., Hoang, T., Browdy, C., Hargreaves, J.A., 2014, “Biofloc Technology and Shrimp Disease Workshop Summary**”.** .https://www.was.org/documents/ Meeting Presentations/ APA2013/APA2013_0469.pdf (20 พ.ค.60)

[9] Avnimelech, De Schryver, P., Emerenciano, M., Kuhn, D., Ray, A. and Taw,N., 2015, “Biofloc technology : apractice guidebook”, 3 rd edition, Wol\rld aquaculture society, 258.

[10] Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., Abreu, L. and Wasielesky, W., 2010, “Effect of practical diets with di!erent protein levels onthe performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles

nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system". Aquaculture Nutrition, 16, 163-172.

[11] Caldini, N.N., Cavalcante, D. de H., Filho, P.R.N.R. and do Carmo e Sá, M.V., 2015, "Feeding Nile tilapia with artificial diets and dried bioflocs biomass", Maringa, 37(10), 335-341.

[12] Crab, R., 2010, "Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture", PhD thesis, Ghent University.

[13] De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N. Verstraete, W., 2008, "The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture", Aquaculture, 277, 125–137.

[14] Ekasari, J., Crab, R. and Verstraete, W., 2010, "Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity". HAYATI Journal of Biosciences, 17, 125-130.

[15] Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S.H., Bachtia,r T., Surawidjaja, E.H., Bossier, P., De Schryver, P., 2014, "The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals", Aquaculture, 426–427, 105–111.

[16] Ekasari, J., Rivandi, D.R., Firdausi,A.P. Surawidjaja, E.H., Zairin, J.R., Bossier, P. and De Schryver, P., 2015, "Biofloc technology positively affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae performance", Aquaculture, 441, 72-77.

[17] Ellis, A. E., 1988, "Fish vaccination". Fish and shellfish pathology, Academic Press, New York, 45.

[18] Emerenciano, M., Cuzon, G., López-Aguiar, K., Noreña-Barroso, E., Máscaro, M., Gaxiola, G., 2011, "Biofloc meal pellet and plant-based diet as an alternative nutrition for shrimp under limited water exchange systems". CD of abstracts of World Aquaculture Society Meeting 2011, Natal, RN, Brazil.

[19] Emerenciano. M, Gaxiola, G. and Gerard, C., 2013, "Biofloc technology (bft): A review for aquaculture application and animal food industry", Chapter 12, Biomass Now–Cultivation and Utilization, 304-328.

[20] Evans, J. J., Klesius, P. H., and Shoemaker, C. A. ,2004, :Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration". Vaccine, 22(27-28), 3769–3773.

[21] Grillo, M., Dugger, D.M. Jory,D.E., 2000, "Zero exchange shrimp production success in WSSV infected Panama", Global Aquaculture Advocate, 3 (6), 55-56.

[22] Megahed, M.E., 2010, "The effect of microbial biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus Semisulcatus*) Fed with different crude protein levels". Journal of The Arabian Aquaculture Society, 5, 119-142.

[23] Samocha, T.M, Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, M.J., Almeida, R.V., 2007. "Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*". Aquacult. Eng, 36, 184-191.

[24] Shiau, S.-Y., Gabaudan, J. and Lin, Y.-H. 2015, "Dietary nucleotide supplementation enhances immune responses and survival to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia fed diet containing low fish meal". Aquaculture Reports, 2 ,77–81.

[25] Wu, W., Wu, B., Ye,T., Huang, H. and Dai, C., 2013, “TCTP Is a Critical Factor in Shrimp Immune Response to Virus Infection”. PLoS ONE, 8(9),744-760.