การเสริมตะกอนไบโอฟลอคอบแห้งในสูตรอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Lin)

Dietary Supplementation of Dried Bioflocs on Disease Resistance Against *Aeromonas hydrophila* Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Lin)

สุไหลหมาน หมาดโหยด[1*] สุภิญญา ชูใจ[1] สุภาพร หนูชู[1] สุวรรณา ผลใหม่ [2] และ สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี[3]
Madyod, S.[1*], Chujai, S.[1], Hnuchu, S.[1], Pholmai, S. [2] and Wuthisuthimethavee, S. [3]

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช, 80240

[1] Faculty of Veterinary, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungyai, Nakhon si Thammarat, 80240

[2] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช, 80110

[2] Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon si Thammarat, 80110

[3] สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช, 80160

[3] School of Agricultural Technology and Food Industry, Walailak University, Tha-sala, Nakhon si Thammarat, 80160

[*] *Corresponding author: sulaiman.m @rmutsv.ac.th*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของตะกอนไบโอฟลอคอบแห้งต่ออัตราตายและอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ของปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลองๆละ 3 ซ้ำ ได้แก่ กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นอาหารสูตรมาตรฐานที่ไม่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค (กลุ่มควบคุม) กลุ่มการทดลองที่ 2-4 เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 0.5, 1, และ 5 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และกลุ่มการทดลองที่ 5 อาหารที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคน 0.5 กรัมต่อกิโลกรัม ใช้ปลานิลซ้ำละ 20 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 17 วัน โดยปรับเป็นสูตรอาหารทุกกลุ่มทดลองกำหนดให้มีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปลานิลทดลองขนาดเฉลี่ย 10.0±0.5 กรัม ให้อาหารแต่ละชุดการทดลองก่อนการฉีดเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วันและหลังฉีดเชื้ออีก 10 วัน โดยฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อเพื่อชักนำให้เกิดการติดเชื้อ จากนั้นเก็บข้อมูลอัตราการตายของปลาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของตะกอนไบโอฟลอคอบแห้งและวิเคราะห์อัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (%RPS) ผลการทดลองพบว่า อัตราการตายของปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 5 กรัม/กิโลกรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 0.5 กรัม/กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ส่วนอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ของกลุ่มทดลอง 2-5 เท่ากับ 2.87±1.4, 11.42 ± 0.4, 31.42 ± 2.85 และ17.14±8.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชุดการทดลองที่ผสมไบโอฟลอคในอาหาร 5 กรัมต่อกิโลกรัมให้ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่น ๆ ซึ่งแสดงว่าตะกอนไบโอฟลอคอบแห้งสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายในปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ได้เป็นอย่างดี และมีความเป็นได้ที่จะช่วยเพิ่มการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาต่อเชื้อโรคเมื่อมีการใช้ตะกอนฟลอคอบแห้งในส่วนผสมของอาหารแต่ต้องมีการทดลองต่อไป

คำสำคัญ: ตะกอนไบโอฟลอคอบแห้ง *Aeromonas hydrophila* ปลานิล

Abstract

The aim of this research is to determine the efficiency of dried biofloc sediment on mortality rate and relative percent survival of Nile Tilapia infected with *Aeromonas hydrophila*. The experiment was consisted of 5 treatments, each with 3 repetitions, and completely randomized design was used: 1) A standard diet without biofloc (control group) and (2) trials with diets containing 0.5, 1 and 5 g/kg of dried biofloc. While experiment 5 had 0.5 g/kg of beta-glucan. 20 fish with average weights of 10.00±0.5 grams were raised for experimentation. 17 days were experimented, each treatment group was fed for 7 days before the disease infection, in addition data on mortality for the next 10 days after infection was collected. *A. hydrophila* was intramuscularly injected at 0.2 mL/fish to induce disease infection. The fish mortality was analyzed for determining on relative percent survival (RPS) of each trial. The results of this study showed that the mortality rates of fish fed the diet with 5

g/kg of dried biofloc were significantly different (P<0.05) when compared with fish fed the diet with 0.5 g/kg of dried biofloc and control group. Moreover, the relative percent survival of 2-5 group were found at 2.87+1.4, 11.42 ± 0.4, 31.42 ± 2.85 and 17.14 ± 8.6 percent, respectively, which trial group4 (5 g/kg dried bio floc) was showed on significant statistical difference (P<0.05) from other treatment groups. Dried biofloc sediment indicated on effectively increase survival rate in Nile Tilapia infected with *A. hydrophila*, which will require further experimentation on immunity system of fish.

Keywords: Dried bio-floc sediment, *Aeromonas hydrophila,* Nile tilapia

บทนำ

ปลานิล เป็นปลาน้ำจืดที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทย และเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมากชนิดหนึ่ง ในทางอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองความต้องการการบริโภคทั้งภายในประเทศและการขยายตัวด้านการส่งออก สำหรับประเทศไทยปลานิลและปลานิลลูกผสมสีแดงเป็นปลาน้ำจืดที่ผลิตได้มากที่สุด โดยมีปริมาณรวม 205,971 ตัน ในปี 2563 และมีประเทศที่เป็นผู้ส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์มากที่สุดในโลก 3 อันดับแรก ได้แก่ จีน (มูลค่า 8,634.0 ล้านบาท) เกาหลีใต้ (มูลค่า 1,512.9 ล้านบาท) และอินโดนีเซีย (1,356.0 ล้านบาท) ตามลำดับ โดยไทยมีการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์เป็นอันดับที่ 16 คิดเป็นมูลค่า 277.9 ล้านบาท (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2564) ปัจจุบันการเลี้ยงปลาระดับความหนาแน่นสูงขึ้นเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น เกษตรกรต้องประสบปัญหาของเสียในระบบการเลี้ยง ซึ่งมักเกิดจากการให้อาหารในปริมาณที่มาก อาหารเหลือ หรือจากการขับถ่ายของตัวสัตว์น้ำเอง ส่งผลต่อสุขภาพสัตว์น้ำ เช่น ก่อให้เกิดความเครียด อ่อนแอ ระบบภูมิคุ้มกันลดลง และเป็นเหตุให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคติดเชื้อได้

เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของปลาเป็นจำนวนมาก ทั้งในโรงเพาะฟักและตามแหล่งน้ำธรรมชาติ พบการแพร่ระบาดในสัตว์น้ำหลายชนิดและก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจทั่วโลก โดยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ คือ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* ซึ่งทำให้ปลาที่ติดเชื้อมีอาการหลายอย่าง เช่น ภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) เกิดการตกเลือด (hemorrhage) แผลเน่าเปื่อยตามผิวหนัง (ulcer) (Cipriano, 2001) ในขณะที่ *A. jandaei* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมทางน้ำ เช่น น้ำจืดและน้ำที่มีความเค็มต่ำ แม้ว่า *A. jandae*i จะมีศักยภาพในการก่อโรคในสัตว์น้ำ แต่มักจะเป็นอันตรายต่อสัตว์ที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอ หรือที่มีอาการป่วยอยู่ก่อน ส่วนอาการของการติดเชื้อ *A. jandae*i ในสัตว์น้ำอาจประกอบด้วยอาการของการติดเชื้อทางเลือด (septicemia) ซึ่งสัตว์อาจมีอาการป่วย อ่อนเพลีย การหายใจเร็ว และการเคลื่อนไหวไม่ปกติ การติดเชื้อ *A. jandae*i ยังอาจทำให้เกิดอาการของการติดเชื้อในระบบหายใจ ทำให้เกิดปอดอักเสบในสัตว์น้ำ และ *A. veronii* เป็นชนิดแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* sp. ที่สามารถก่อโรคในสัตว์น้ำได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในสัตว์น้ำขนาดเล็กและตัวเต็มวัย อาการที่เกิดขึ้นอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำและระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์นั้น ๆ อาการที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *A. veronii* สามารถก่อให้โรค yellow disease หรือ ulcer disease ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการทำลายเนื้อเยื่อในส่วนต่าง ๆ ของสัตว์น้ำ เช่น ผิวหนัง กล้ามเนื้อ หรืออวัยวะภายใน เมื่อติดเชื้อ *A. veronii* สัตว์น้ำอาจแสดงอาการที่ผิวหนังมีจุดแผลหรือแผลเปิด อาการอักเสบ ก้อนหรือกล้ามเนื้อที่บวม และอาจเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในได้ด้วย (Dong *et al*., 2017)

โรคติดเชื้อ *Aeromonas* sp. หากไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาอย่างทันท่วงทีอาจก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากและส่งผลกระทบต่อผลผลิตของเกษตรกร จึงมีการพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในรูปแบบของจุลินทรีย์จากธรรมชาติเพื่อช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปทำให้เกิดสายพันธุ์แบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Yang et al., 2018) ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว มีการเปลี่ยนแปลงความจำเพาะเจาะจงของ DNA (พลาสมิด) ทำให้เกิดการดื้อยาของกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้มากขึ้นในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ (Haygood and Jha, 2016)

ระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบการใช้เทคโนโลยีไบโอฟลอคได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งและปลานิล เนื่องจากสามารถบำบัดสารอินทรีย์เหลือทิ้งในระบบและนำกลับไปเป็นอาหารสัตว์น้ำจากกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในน้ำ (Azim and Little, 2008) ซึ่งการเลี้ยงในระบบไบโอฟลอคจะพบอัตราการรอดตายของสัตว์น้ำสูงกว่าการเลี้ยงในระบบการเลี้ยงปกติ (Kim *et al*., 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่แสดงถึงคุณสมบัติและศักยภาพของตะกอนไบโอฟลอคเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ เมื่อสัตว์น้ำได้รับอาหารผสมไบโอฟลอคจะส่งผลให้มีภูมิต้านทานเพิ่มขึ้น เช่น ในปลานิล (ศุภณัฐ และคณะ, 2561) กุ้งขาว (Ekasari *et al*., 2014) และปลายี่สกเทศ (Ahmad *et al*., 2016) แต่อย่างไรก็ตามไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจะมีประสิทธิภาพของไบโอฟลอคในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิลแตกต่างกัน จากการศึกษาของ Ahmad et al (2016) ทดลองเลี้ยงปลายี่สกเทศในระบบไบโอฟลอคโดยใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิด (แป้งมันสำปะหลัง แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และกากอ้อยจากการผลิตน้ำตาล) พบว่าฟลอคที่เกิดขึ้นในระบบการเลี้ยงที่ใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดสามารถกระตุ้น

ภูมิคุ้มกันปลายี่สกเทศได้ แต่ประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน โดยแป้งมันสำปะหลังสามารถกระตุ้นได้ดีที่สุด และรายงานการวิจัยของ Caldini และคณะ (2015) ทดลองใช้ตะกอนฟลอคอบแห้งและตะกอนฟลอคไม่อบแห้งผสมกับอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเลี้ยงปลานิล ผลการทดลองพบว่า การให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับตะกอนฟลอคอบแห้งไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิลเมื่อเทียบกับการให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับตะกอนฟลอคไม่อบแห้ง และเมื่อพิจารณาอัตราการตายของแต่ละชุดการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดตายสูงถึง 87.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่งานวิจัยของ Binalshikh-Abubkr and Mohd Hanafiah (2021) พบว่า การเสริมสารอาหารด้วยไบโอฟลอคแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยทดลองใช้อาหารทดลอง 2 กลุ่ม (กลุ่ม T0: ไม่มีไบโอฟลอค; และกลุ่ม T1: ไบโอฟลอคแห้งแช่แข็ง 4%) ในการเลี้ยงปลานิลแดงเป็นระยะเวลา 57 วัน ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ไม่มีไบโอฟลอค (T0) มีการใช้อาหารมากกว่ากลุ่มที่มีไบโอฟลอค (T1) ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญระหว่างทั้งสองกลุ่มการทดลองในเรื่องน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Specific growth rate: SGR) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Rate: FCR) ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม สามารถเพิ่มไบโอฟลอคแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 4% เข้าไปในอาหารสูตรที่ออกแบบไว้ได้สำหรับการเลี้ยงปลานิลแดงเนื่องจากมีการใช้อาหารที่น้อย แม้ว่าจะไม่มีผลกระทบอย่างมากนักต่อการเจริญเติบโตในเรื่องน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย ก็ตาม

ปัจจุบันสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำมีราคาสูง ส่งผลต่อต้นทุนของเกษตรกรเมื่อนำมาใช้ในระบบฟาร์ม ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงหาแนวทางในการค้นหาประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรียจากตะกอนไบโอฟลอคในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้อาหารที่ผสมตะกอนไบโอฟลอคเหลือทิ้งจากระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำเสริมในอาหารสัตว์น้ำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของตะกอนไบโอฟลอคอบแห้งในสูตรอาหารต่ออัตราการรอดตาย และอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตตะกอนไบโอฟลอค

เตรียมน้ำจากแหล่งน้ำที่ไม่มีสารกำจัดจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8 ให้ออกซิเจนตลอดเวลา จากนั้นเตรียมตะกอนไบโอฟลอคในบ่อเลี้ยงปลาโดยกำหนดอัตราส่วนของคาร์บอน : ไนโตรเจน เท่ากับ 16:1 โดยใช้อาหารสำเร็จรูปเป็นแหล่งไนโตรเจน และแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเติมลงในถัง เมื่อผ่านไป 48-72 ชั่วโมงจะได้ตะกอนไบโอฟลอค โดยสังเกตตะกอนฟลอคจากอุปกรณ์ Imhoff cone จากนั้นนำปลาลงเลี้ยง จำนวน 50 ตัว ให้อาหารปลาวันละ 1 ครั้ง ในอัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน และเริ่มทำการเก็บตะกอนไบโอฟลอค เมื่อมีปริมาณมากกว่า 40 มิลลิลิตรในอุปกรณ์ Imhoff cone

การเก็บตะกอนฟลอคโดยการกรองผ่านผ้ากรองที่มีขนาด 40 ไมครอน สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือกรณีที่มีปริมาณมาก โดยทำการวัดปริมาณตะกอนชีวภาพจากอุปกรณ์ Imhoff cone ในแต่ละวัน ซึ่งถ้ามีตะกอนปริมาณมากกว่า 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ก็สามารถเก็บตะกอนฟลอคได้ (Avnimelech, 2007) จากนั้นนำไปอบแห้งโดยใช้เครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนจนกระทั่งความชื้นของตัวอย่าง อยู่ในช่วงประมาณ 10-15% จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโภชนะในตะกอนฟลอค โดยปรับปรุงจากวิธีการของ AOAC (2000) จากนั้นนำไปเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราจนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การวางแผนการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design ; CRD) โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 5 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ (15 ตู้ทดลอง) ดังต่อไปนี้

1. ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตรไม่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 0 กรัม/กิโลกรัม (กลุ่มควบคุม)
2. ชุดการทดลองที่ 2 อาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 0.5 กรัม/กิโลกรัม
3. ชุดการทดลองที่ 3 อาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 1 กรัม/กิโลกรัม
4. ชุดการทดลองที่ 4 อาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 5 กรัม/กิโลกรัม
5. ชุดการทดลองที่ 5 อาหารที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคน 0.5 กรัม/กิโลกรัม (Lee *et al*., 2017)

การเตรียมอาหารทดลอง

การกำหนดสูตรอาหาร โดยนำผงตะกอนฟลอค มาคำนวณเพื่อกำหนดสูตรอาหารปลานิลโดยดัดแปลงจากสูตรอาหารพื้นฐานที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย ธนาภรณ์ (2557) และปรับปริมาณโปรตีนเป็น 30 เปอร์เซ็นต์

Table 1 Diets formulation and composition of experimental diets

Feed ingredients	Experimental diets				
	Dried biofloc 0 g/kg	Dried biofloc 0.5g/kg	Dried biofloc 1g/kg	Dried biofloc 5 g/kg	Beta glucan 0.5 g/kg
Dried floc	0	0.5	1	5	0
Beta glucan	0	0	0	0	0.5
Fish meal	450	450	450	450	450
Soybean	290	280	280	260	280
Rice bran	200	230	165	180	200
Corn meal	35	14.5	79	80	44.5
Alpha starch	5	5	5	5	5
Premix***	20	20	20	20	20
Total (1000 g)	1000	1000	1000	1000	1000

***หมายเหตุ: วิตามิน: A C D3 E K3 B1 B3 B5 B6 B7 B8 B9 B12
แร่ธาตุ: เหล็ก สังกะสี ทองแดง ซีลิเนียม

สัตว์ทดลอง

ปลานิลจากฟาร์มเอกชนในจังหวัดนครศรีธรรมราช นำมาพักปรับสภาพการเลี้ยงก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ขนาดปลานิลที่ใช้ทดลองเฉลี่ย 10.0±0.5 กรัมต่อตัว เลี้ยงในตู้ขนาด 31.25 x 57.5 x 42.5 ซม. (ปริมาตรน้ำใช้เลี้ยงปลาประมาณ 55 ลิตร) เลี้ยงปลาตู้ละ 20 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน (เช้าและเย็น) จากนั้นเริ่มการทดลองโดยให้อาหารของแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวันจากนั้นเหนี่ยวนำปลานิลให้เกิดการติดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้น $3x10^8$ CFU/ml ฉีดเข้าชั้นกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำปลาลงเลี้ยงในตู้เป็นระยะเวลา 10 วัน นับจำนวนปลาตายเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การตาย และนำอวัยวะไตส่วนหน้าของปลาที่ตายไปเพาะบนอาหาร nutrient agar (NA) medium เพื่อยืนยันการตายของปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ชักนำให้เกิดการติดเชื้อ

การศึกษาค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival: RPS)

นำเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลานิลในแต่กลุ่มการทดลองไปหาค่าอัตรารอดสัมพัทธ์โดยดัดแปลงวิธีของ Ellis (1988) ดังนี้

$$RPS(\%) = \left[1 - \frac{\text{อัตราการตายเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารผสมไบโอฟลอคหรือเบต้ากลูแคน}}{\text{อัตราการตายเฉลียของปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมไบโอฟลอคหรือเบต้ากลูแคน}}\right] x100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าอัตราการตายและอัตราการรอดสัมพัทธ์ (RPS) มาเปรียบเทียบความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) ในแต่ละชุดการทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะในตะกอนฟลอค

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะโดยวิธีประมาณ (Proximate analysis) ในตะกอนฟลอคตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) พบว่าตะกอนฟลอคซึ่งเป็นตะกอนเหลือทิ้งที่ได้จากกระบวนการเลี้ยงปลานิลมีคุณค่าทางโภชนะ ดังนี้

Table 2 Analysis of chemical composition of floc sediment from the cultured system

Sample	Moisture (%)	Ash (%)	Crude protein (%)	Ether extract (%)	Crude fiber (%)
Floc sediment	11.16	13.42	12.28	11.88	3.35

ประสิทธิภาพของตะกอนฟลอคในสูตรอาหารสำเร็จรูปปลานิลต่ออัตราการตายและอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival: PRS) ในปลานิล

จากการทดลองเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของตะกอนไบโอฟลอคเพื่อตรวจสอบอัตราการตายและอัตราการรอดสัมพัทธ์ (%RPS) พบว่าอัตราการตายของปลานิลทั้ง 5 ชุดการทดลอง เท่ากับ 87.50 ± 7.5 , 85.00 ± 5.0 , 77.50 ± 7.5, 60.00 ± 5.0 และ 72.50 ± 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 5 กรัม/กิโลกรัม ให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 0.5 กรัม/กิโลกรัม และชุดการทดลองกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่าง ($P>0.005$) กับสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 1 กรัม/กิโลกรัม และอาหารที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคน 0.5 กรัม/กิโลกรัม

ส่วนอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ของปลานิลทั้ง 4 กลุ่มการทดลองโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับ 2.87 ± 1.4, 11.42 ± 0.4, 31.42 ± 2.85 และ 17.14 ± 8.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่เสริมไบโอฟลอคหรือเบต้ากลูแคน มีอัตราการตาย เท่ากับ 87.50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีการเสริมตะกอนไบโอฟลอคหรือเบต้ากลูแคนจะพบอัตราการตายลดน้อยลง และมีอัตราการรอดสัมพัทธ์สูงขึ้น ดัง Table 3 โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของตะกอนไบโอฟลอค 5 กรัมต่อกิโลกรัม พบอัตราการรอดสัมพัทธ์มากที่สุดเท่ากับ 31.42 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณตะกอนฟลอคสูงขึ้น อาจจะลดอัตราการตายของปลา และเพิ่มอัตราการรอดสัมพัทธ์ เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila*

Table 3 The effect of supplement dried biofloc meal on relative percent survival of *A. hydrophila*-infected for tilapia

Treatment	Survival rate (%)	RPS (%)
1. Control (non-floc sediment: 0 g/kg)	87.50 ± 7.5 ^{a}	
2. 0.5 g/kg of floc Supplement in feed formula	85.00 ± 5.0 ^{a}	2.87 ± 1.4 ^{c}
3. 1 g/kg of floc Supplement in feed formula	77.50 ± 7.5 ^{ab}	11.42 ± 0.4 ^{b}
4. 5 g/kg of floc Supplement in feed formula	60.00 ± 5.0 ^{b}	31.42 ± 2.85 ^{a}
5. 0.5 g/kg of beta glucan in feed formula	72.50 ± 7.5 ^{ab}	17.14 ± 8.6 ^{b}

ประเทศไทยประสบปัญหาขาดแคลนน้ำในบางฤดูกาล ส่งผลให้เกษตรกรเลี้ยงปลาประสบปัญหาไม่สามารถเปลี่ยนถ่ายน้ำในระบบการเลี้ยงปลาได้ แนวคิดในการนำเทคโนโลยีไบโอฟลอค (biofloc technology) มาใช้ในระบบการเลี้ยงปลานิล เนื่องจากสามารถลดปริมาณแอมโมเนียที่เป็นพิษได้ (Direkbusarakom, 2015) โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มของ Heterotrophic bacteria ซึ่งต้องการออกซิเจนในการสลายพลังงาน สามารถใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหาร แต่ต้องควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ให้มีความเหมาะสม ซึ่งจะช่วยลดการเปลี่ยนถ่ายน้ำได้ และสามารถนำตะกอน ไบโอฟลอคเหลือทิ้งมาทดแทนปลาป่นซึ่งเป็นวัตถุดิบในสูตรอาหารในการเลี้ยงปลานิล (Bureau of Agricultural Economics Research, 2012) มีรายการการนำตะกอนไบโอฟลอคมาใช้เป็นสูตรอาหารเลี้ยงปลานวลจันทร์เทศ โดยการทดลองของ Sharma และคณะ (2018) ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้อาหารปลาสำเร็จรูป โปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตะกอนไบโอฟลอคมีปริมาณโปรตีน 34 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12.6 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 31 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 15.2 เปอร์เซ็นต์ และในรายงานการวิจัยของ สิริพงษ์ และคณะ (2560) ใช้อาหารกุ้งเป็นแหล่งไนโตรเจน และแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าปริมาณโปรตีนเท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า เท่ากับ 13 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้งหมดเป็นการผลิตไบโอฟลอคโดยไม่ได้มีการเลี้ยงปลาร่วม ส่วนในรายงานการทดลองครั้งนี้ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า ปริมาณโปรตีนต่ำเท่ากับ 12.28 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการเลี้ยงปลานิลร่วมกับระบบไบโอฟลอคแล้วเก็บตะกอนไบโอฟลอคมาใช้ประโยชน์ ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสารอินทรีย์ในน้ำของจุลินทรีย์ในขั้นต้น ซึ่งยังย่อยไม่สมบูรณ์

ประสิทธิภาพของตะกอนฟลอคในสูตรอาหารสำเร็จรูปสัตว์น้ำ มีรายงานการวิจัยของ Caldini และคณะ (2015) ทดลองใช้ตะกอนฟลอคอบแห้งและตะกอนฟลอคไม่อบแห้งผสมกับในอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเลี้ยงปลานิล พบว่าการให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับตะกอนฟลอคอบแห้ง ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิลเมื่อเทียบกับการให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับตะกอนฟลอคไม่อบแห้ง เมื่อพิจารณาอัตราการตายของแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดตายสูงถึง 87.8 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานการวิจัยของ Shyne และคณะ (2014) ทดลองสูตรอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้ตะกอนไบโอฟลอคอบแห้ง ในอัตราส่วน 0, 4, 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จากตะกอนไบโอฟลอค เท่ากับ 24.30 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลอง พบว่าการเพิ่มปริมาณตะกอนฟลอคอบแห้งในสูตรอาหารกุ้งกุลาดำในอัตราส่วน 8 เปอร์เซ็นต์ให้น้ำหนักสุดท้ายของกุ้งกุลาดำดีที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่าตะกอนฟลอคอบแห้งสามารถนำมาเสริมในอาหารสำเร็จรูปเพื่อสร้างการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เหมือนกับเบต้ากลูแคนและนิวคลีโอไทด์

โรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์สร้างความเสียหายต่อการพัฒนาและส่งผลกระทบต่อความยั่งยืนของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก ส่งผลให้ต้องมีการพัฒนาเครื่องมือที่เหมาะสมในการควบคุมการระบาดของโรคในสัตว์น้ำ ทางเลือกหนึ่งที่ใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะคือการใช้สารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น β-glucans ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ β-glucans ในปลาหลายๆ ชนิด ผ่านการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต และเกิดกลไกเฉพาะของการป้องกันแบบสารน้ำ ซึ่งแนวทางการให้ยากระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นสิ่งสำคัญและควรเป็นที่ยอมรับในด้านการใช้งาน และรวมถึงระดับการป้องกันที่อาจส่งผลต่อความเครียดของปลา ดังนั้นการแช่ และการผสมในอาหาร จึงเป็นแนวทางที่ดีที่สุดเพื่อให้ยาได้กระจายได้ทั่วถึงและไม่ส่งผลต่อความเครียดของปลา จากรายงานของ Sado และคณะ (2016) ในการศึกษาการบริหารยาของการให้ β-glucan (ทางปาก, การฉีด, การแช่) ต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและโลหิตวิทยาของปลานิล โดยหลังจากการทดลองเป็นเวลา 15 วัน จะมีการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อกำหนดพารามิเตอร์โลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลา ผลการศึกษาพบว่าปลาที่ได้รับการฉีดด้วย β-glucan มีค่าความเข้มข้นของไลโซไซม์ในเลือดสูงกว่าการบริหารยาด้วยวิธีการอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้ β-glucan ผ่านทางปากและการแช่ ไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับปลานิลขนาดเล็กเหมือนกับการให้ผ่านทางการฉีดเข้าช่องท้อง

สรุปผล

จากการทดลองการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของตะกอนไบโอฟลอคเพื่อตรวจสอบอัตราการตายและอัตราการรอดสัมพัทธ์ (%RPS) พบว่าอาหารที่มีส่วนผสมของไบโอฟลอค 5 กรัม/กิโลกรัม สามารถเพิ่มอัตราการรอดสัมพัทธ์ (%RPS) ได้มากที่สุด

ข้อเสนอแนะควรทำการศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกันในปลานิลในชุดการทดลอง และวิเคราะห์ จุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกในตะกอนไบโอฟลอคด้วยเทคนิคจุลชีววิทยาเพื่อจะได้ข้อมูลสาเหตุที่แท้จริงที่เกี่ยวข้องกับผลการรอดตายของปลานิลเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และเพิ่มปริมาณของตะกอนไบโอฟลอคในสูตรอาหารสำเร็จรูปในสัดส่วนที่สูงขึ้น เพื่อประเมินปริมาณที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยจากงบเงินอุดหนุนมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เรื่อง การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิลจาก Bio-flocs เหลือทิ้งจากระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่น ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวฤดีรัตน์ ฉลาด และนางสาวอัญมณี ชูเกลี้ยง นักศึกษาผู้ช่วยวิจัยชั้นปีที่ 6 ที่พัฒนาระบบการเลี้ยงปลา การทดลองด้วยระบบการเลี้ยงแบบไบโอฟลอค ตลอดจนการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. 2564. ปลานิลและผลิตภัณฑ์. เข้าถึงได้จาก: https://api.dtn.go.th/files /v 3/614af620ef4140fe44141855/download [15 เมษายน 2566].

ธนาภรณ์ จิตตปาลพงศ์. 2557. การสร้างสูตรอาหารสัตว์น้ำและสูตรอาหารสัตว์น้ำเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สิริพงษ์ วงศ์พรประทีป ธรรมนูญ ง่านวิสุทธิพันธ์ และกรกฎ สันทัดการ. 2560. การใช้ไบโอฟลอคอบแห้งในการผลิตอาหารปลานิล (*Oreochromis niloticus*). Prawarun Agricultural Journal 14(2): 231-237.

ศุภณัฐ วัฒิธรรม, ณัฏนิชา เมืองกาญจน์, ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล, นิอร จิรพงศธรกุล และกิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์. 2561. ผลของไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 20(2): 1-13.

Ahmad, H.I. Verma, A.K., Babitha Rani, A.M., Rathore, G., Saharan, N. and Gora, A.H. 2016. Growth, nonspecific immunity and disease resistance of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources. Aquaculture 457: 61-67.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Virginia

Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture 264: 140–147.

Azim, M.E. and Little, D.C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283(1-4): 29-35.

Binalshikh-Abubkr, T. and Mohd Hanafiah, M. 2021. Effect of freeze-dried biofloc as a dietary supplement on water quality and growth performance of red Tilapia (Hybrid) . IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 880: 1-11

Bureau of Agricultural Economics Research. 2012. Study of economy, production, marketing of fishmeal. Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives Agricultural Economics Research. Thailand. Available from: http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_baer/download/article/article_20141013135447.pdf [20 April 2023]

Caldini, N.N., de Holanda Cavalcante, D. Filho, P.R.N.R. and do Carmo e Sá, M.V. 2015. Feeding Nile tilapia with artificial diets and dried bioflocs biomass. Acta Scientiarum Animal Sciences 37 (10): 335-241.

Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Washington, D.C.: U.S. Fish and Wildlife Service.

Direkbusarakom, S. 2015. Aquaculture by flocculation. Available from: http://www.coastalaqua.com/files/technology [25 April 2023].

Dong, H.T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., Taengphu, S., Charoensapsri, W., Khunrae, P., Rattanarojpong, T. and Senapin, S. 2017. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Fish Diseases 40: 1395–1403.

Ekasari, J., Azhar, M.H., Surawidjaja, E.H., Nuryati, S., De Schryver, P. and Bossier, P. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. Fish & Shellfish Immunology 41(2): 332-339

Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. New York: Academic Press.

Haygood, A.M. and Jha, R. 2016. Strategies to modulate the intestinal microbiota of Tilapia (*Oreochromis* sp.) in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture 10(2): 1–14

Kim, S.K., Pang, Z., Seo, H.C., Cho, Y.R. Samocha, T. and Janget, I.K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture Research 45(2): 362-371.

Lee, Y., Srisapoome, P., Unajak, S., Kannika, K. and Areechon, N. 2017. Innate and Adaptive Immunity Response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) to Dietary Supplementation of Vitamin C and β-glucan. *In* The 55th Kasetsart University Annual Conference, 31 Jan-3 Fab 2017.

Sado, R.Y., Gimbo, R.Y. and Salles, F.B. 2016. Routes of β-glucan administration affect hematological and immune responses of *Oreochromis niloticus*. Archivos de Zootecnia 65 (252): 519-524.

Sharma, A, Behrens, S.H., Chernoff, Y.O. and Bommarius, A.S. 2018. Modulation of the formation of A β- and Sup35NM-based amyloids by complex interplay of specific and nonspecific ion effects. The Journal of Physical Chemistry B. 122(19): 4972-4981

Shyne, A.P.S, Kumar, S., Kohli, M.P.S., Sundaray, J.K., Sinha, A., Pailan, G.H. and Dam, R.S. 2014. Dietary biofloc supplementation in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: effects on immunity, antioxidant and metabolic enzyme activities. Aquaculture Research 48: 4512–4523

Yang Y., Zhou R., Chen B., Zhang T., Hu, L. and Zou S. 2018. Characterization of airborne antibiotic resistance genes from typical bioaerosol emission sources in the urban environment using metagenomic approach. Chemosphere 213: 463–471.