แบบสรุปย่อการวิจัย

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย / แผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) **การเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันเพื่อพัฒนาเป็นสายพันธุ์ปลาสวยงามเพื่อการส่งออก**

(ภาษาอังกฤษ) **Development on Cultivation of Nieuhoffi's Catfish (*Clarias nieuhofii*) for Exporting as Ornamental Fish**

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

นางอานุช คีรีรัฐนิคม

หน่วยงานที่สังกัด มหาวิทยาลัยทักษิณ

หมายเลขโทรศัพท์ 074693992

โทรสาร 074693995

นายสุภฎา คีรีรัฐนิคม

หน่วยงานที่สังกัด มหาวิทยาลัยทักษิณ

หมายเลขโทรศัพท์ 074693992

โทรสาร 074693995

นายบุญกอบ วิริยะพงษ์สุธี

หน่วยงานที่สังกัด มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หมายเลขโทรศัพท์ 074465102

โทรสาร 074465102

นายกฤษณะ เรืองคล้าย

หน่วยงานที่สังกัด มหาวิทยาลัยทักษิณ

หมายเลขโทรศัพท์ 074693992

โทรสาร 074693995

นายพันธสิทธ์ โชคสวัสดิกร

หน่วยงานที่สังกัด มหาวิทยาลัยทักษิณ

หมายเลขโทรศัพท์ 074693992

โทรสาร 074693995

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 งบประมาณที่ได้รับ 906,000 บาท
ระยะเวลาทำวิจัย ตั้งแต่ กันยายน 2552 ถึง กันยายน 2553

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปลาดุกลำพันจัดเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในภาคใต้ (ศราวุธ และคณะ, 2538) และยังถูกจัดสถานะอนุรักษ์เป็นชนิดพันธุ์สัตว์ที่อยู่ในหมวดถูกคุกคาม (Threatened) มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ (Vulnerable) แต่ด้วยความสำเร็จในการเพาะขยายพันธุ์ และอนุบาลปลาดุกลำพันวัยอ่อนของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง (Kiriratnikom *et al*., 2007) ทำให้ปัจจุบันมีปลาดุกลำพันที่เพาะขยายพันธุ์ขึ้นเองในห้องปฏิบัติการเป็นจำนวนมาก และมีกลุ่มผู้สนใจเริ่มนำไปทดลองเลี้ยงทั้งในเชิงอนุรักษ์พันธุ์ปลาหายาก และเชิงปลาสวยงาม แม้ว่าปลาดุกลำพันจะพบอาศัยเฉพาะในป่าพรุที่มีสภาพน้ำเป็นกรด น้ำมีสีชาจากสารอินทรีย์ และแทนนินจากใบไม้ แต่จากการทดลองเลี้ยงปลาดุกลำพันที่เพาะขยายพันธุ์ได้เองในห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง พบว่าปลาดุกลำพันสามารถปรับตัวให้อาศัยได้ดีในสภาพน้ำที่มีความเป็นกรด-ด่างปกติ สามารถปรับตัวอาศัยในตู้กระจก และมีการเจริญเติบโตที่ดีในตู้กระจกทดลอง รวมทั้งยังมีพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ และผสมพันธุ์วางไข่ได้ในสภาพห้องปฏิบัติการที่มีคุณภาพน้ำปกติ (สุภฎา และคณะ, 2551)

จากการทดลองเลี้ยงปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟัก พบว่าปลาดุกลำพันเป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยมีอัตราการเจริญเติบโตเพียง 316.92 - 441.28 % ในเวลา 12 สัปดาห์ (พันธสิทธิ์ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังมีความต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูงถึง 40 % (สุภฎา และคณะ, 2551) ซึ่งอาจเป็นต้นทุนการผลิตที่สูงมาก และอาจไม่คุ้มทุนในกรณีการเลี้ยงเพื่อส่งขายเป็นปลาเนื้อเพื่อการบริโภค แต่ด้วยรูปร่างลักษณะ สีสันของลำตัวปลาเป็นสีน้ำตาลแดงเข้ม ตลอดจนลวดลายและจุดสีเหลืองสดที่แตกต่างกันในแต่ละตัว และพฤติกรรมที่น่าสนใจของปลาดุกลำพัน จึงจัดเป็นปลาที่มีผู้นิยมเลี้ยงในเชิงปลาสวยงามที่มีราคาสูงในตลาดปลาสวยงามภายในประเทศ อีกทั้งยังมีความเป็นไปได้สูงที่จะส่งเสริมเป็นสายพันธุ์ปลาสวยงามชนิดใหม่เพื่อส่งออกไปยังตลาดปลาสวยงามนานาชาติ แม้ว่าปลาชนิดนี้จะมีความต้องการของตลาดปลาสวยงามปริมาณสูง แต่ก็พบมีจำหน่ายน้อย เนื่องจากปลาดุกลำพันในตลาดปลาสวยงามทั้งหมดเป็นปลาที่จับรวบรวมมาจากธรรมชาติ ซึ่งนอกจากจะประสบปัญหาผลผลิตไม่พอในการขยายตลาดเพื่อการส่งออกแล้วยังจะส่งผลกระทบต่อปริมาณพันธุ์ปลาดุกลำพันในธรรมชาติให้ลดน้อยลง และเข้าสู่ภาวะใกล้สูญพันธุ์มากขึ้น ดังนั้นการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพัน โดยการผลิตลูกปลาดุกลำพันจากพ่อ-แม่พันธุ์ที่เพาะพันธุ์และเลี้ยงขึ้นเองในบ่อดิน การอนุบาลลูกปลาด้วยวิธีการที่เหมาะสมนับเป็นการฟื้นฟูทรัพยากรสัตว์น้ำที่หายากและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของปลาชนิดนี้ได้ อีกทั้งยังเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการพัฒนาและส่งเสริมพันธุ์

ปลาชนิดนี้ให้เป็นสายพันธุ์ปลาสวยงามที่มีปริมาณมากขึ้นในท้องตลาด ซึ่งจะสามารถส่งเสริม และขยายตลาดปลาสวยงามสายพันธุ์ใหม่ให้กว้างขวางมากขึ้น

การเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันยังคงประสบปัญหาหลายประการ โดยเฉพาะปัญหาเกี่ยวกับอัตราการฟักออกเป็นตัวของลูกปลามีค่าต่ำ และอัตราการรอดตายของลูกปลามีความผันแปรมาก ทั้งจากรายงานการศึกษาในอดีต โดยพรพนม (2538) ซึ่งพบว่าอัตราการฟักออกเป็นตัวมีค่าระหว่าง 2.87 – 21.78% และมีอัตราการรอดตาย 44.79 – 73.61% รวมทั้งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ก็พบว่าอัตราการฟักออกเป็นตัวของลูกปลาดุกลำพันมีความผันแปร ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตปลาดุกลำพันจนทำให้มีปริมาณไม่แน่นอนในตลาดปลาสวยงามที่เปิดตัวกว้างขึ้น ทั้งนี้ปัญหาเกี่ยว กับการฟักเป็นตัว และการรอดตายน้อยในระหว่างการเพาะขยายพันธุ์พบในปลาดุกชนิดอื่นๆ เช่นกัน ซึ่งแนวทางในการลดปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการควบคุมคุณภาพน้ำในระหว่างการเพาะฟักและอนุบาลลูกปลาให้เหมาะสม แต่ด้วยปลาดุกลำพันเป็นปลาที่ดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมเป็นป่าพรุซึ่งมีสภาพ แวดล้อมเฉพาะตัวจึงอาจมีความต้องการคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพ และเคมีที่แตกต่างจากปลาดุกชนิดอื่น นอกจากนี้การเลี้ยงปลาดุกลำพันให้มีสีสัน และลวดลายที่สวยงามก็เป็นปัญหาสำคัญ ซึ่งจากรายงานการศึกษา พบว่าการพัฒนาอาหารให้มีคุณค่าทางอาหารครบถ้วน และการใช้รงควัตถุแคโรทีนอยด์เสริมในอาหารจะช่วยให้ปลาสวยงามมีสีสันที่ตรงตามความต้องการมากขึ้น แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการใช้แคโรทีนอยด์ในรูปแบบและปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้อาหารสำหรับปลาดุกลำพันมีคุณภาพสูงโดยมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด

นอกเหนือจากปัญหาที่เกี่ยวข้องกับผลของคุณภาพน้ำต่อการฟักเป็นตัว การรอดตาย ตลอดจนผลของอาหารต่อการเจริญเติบโต และสีสัน ลวดลายของตัวปลาดุกลำพันแล้ว โรค และปรสิตก็นับเป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันเป็นอย่างมาก จากการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง พบว่าเกิดปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรียรุนแรงในลูกปลาดุกลำพันระยะปลานิ้ว มีอัตราการตายจากการติดเชื้อสูง และก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตปลาดุกลำพันเป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรค ปรสิตและแบคทีเรียของปลาดุกลำพัน โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างโรคและสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงในโรงเพาะฟักก็เป็นประเด็นสำคัญเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สำหรับใช้ในการเฝ้าระวัง และการป้องกันรักษาโรคของปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟักต่อไป

3. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการเพาะพันธุ์ และปรับสภาพน้ำให้เหมาะสมเพื่อสามารถเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันให้มีอัตราการฟัก และอัตราการรอดตายมากขึ้น

2. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกลำพันให้สุขภาพดี มีสีสัน และลวดลายเด่นชัดมากขึ้น โดยมีต้นทุนอาหารต่ำ

3. เพื่อศึกษาชนิดของปรสิต และโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟัก เพื่อวางแผนควบคุม ป้องกันและแก้ไขปัญหาโรคในปลาดุกลำพัน

4. ระเบียบวิธีการวิจัย (โดยย่อ)

4.1 การศึกษาผลของการแช่สารละลายโปแทสเซียมเปอร์มังกาเนต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมคลอไรด์ ฟอร์มาลดีไฮด์ และโพวิโดไอโอดีน ต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักออกเป็นตัวของลูกปลาดุกลำพัน

การเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟัก และการเตรียมสัตว์ทดลอง

คัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ปลาดุกลำพันจากการเพาะพันธุ์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง และพ่อ-แม่พันธุ์ปลาดุกลำพันจากการเพาะขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการที่เลี้ยงในบ่อดินของกลุ่มเกษตรกรเลี้ยงปลาดุกลำพันเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ ตามโครงการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ พ.ศ. 2551 ของสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ในเขตอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง เพื่อนำมาตรวจสอบสุขภาพ ตรวจสอบความสมบูรณ์เพศ แล้วจึงเพาะขยายพันธุ์ด้วยวิธีการผสมเทียม โดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RH ร่วมกับ Domperidone ตามวิธีการของ พรพนม (2538) และ ศราวุธ และคณะ (2538) ภายหลังการฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 2 เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จึงรวบรวมไข่จากแม่ปลา และน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้ ผสมพันธุ์เช่นเดียวกับปลาดุกชนิดอื่น ตามวิธีการของ Hossain *et al*. (2006) จากนั้นนำไปศึกษาผลของการแช่ไข่ปลาดุกลำพันต่ออัตราการฟัก และอัตราการรอดหลังฟักเป็นตัวต่อไป จัดเตรียมระบบการฟักไข่ปลาดุกลำพันตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al*. (2007) หลังจากนั้นแช่ไข่ปลาที่ปฏิสนธิแล้วในสารละลายตามชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นจึงฟักไข่ปลาดุกลำพันในระดับความหนาแน่น 1 ฟองต่อ 1 ตารางเซนติเมตร โดยใช้ถาดฟักไข่ที่มีขนาดพื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร ชุดการทดลองละ 3 ถาด ในระบบฟักไข่ปลาที่มีการหมุนเวียนน้ำ 200 % ต่อวัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นการฟักไข่ปลาดุกลำพันในสภาพควบคุม (ไม่มีการแช่ในสารละลายก่อนการฟัก), ฟัก

ไข่ปลาดุกลำพันหลังจากแช่ในสารละลายโปแทสเซียมเปอร์มังกาเนต ในระดับความเข้มข้น 1-3 ppm, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระดับความเข้มข้น 100-200 ppm, ฟอร์มาลดิไฮด์ ในระดับความเข้มข้น 100-200 ppm, โซเดียมคลอไรด์ ในระดับความเข้มข้น 2,000-5,000 ppm และโพวิโดไอโอดีน ในระดับความเข้มข้น 0.1-0.3 ppm

การตรวจสอบอัตราการฟักออกเป็นตัว

ตรวจสอบอัตราการฟักออกเป็นตัวของลูกปลาดุกลำพันที่เลี้ยงในแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ตามวิธีการของ Silva *et al*. (2003) และตรวจสอบการรอดตายของลูกปลาดุกลำพันหลังจากฟักออกเป็นตัว ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิ ตามวิธีการของ Silva *et al*. (2003)

4.2 การศึกษาผลของคุณภาพน้ำต่ออัตราการเพาะฟัก การรอดตาย และการเจริญเติบโตของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*)

จัดเตรียมระบบการฟักไข่ปลาดุกลำพันตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al*. (2007) โดยใช้ถาดฟักไข่ที่มีขนาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร โดยฟักไข่ปลาดุกลำพันในระดับความหนาแน่น 1 ฟองต่อ 1 ตารางเซนติเมตร ชุดการทดลองละ 3 ถาด ในระบบฟักไข่ปลาที่มีการหมุนเวียนน้ำ 200 % ต่อวัน โดยตรวจสอบผลของระดับความเค็ม 0, 0.5, 1 และ 2 ppt, แทนนิน 0, 10, 25 และ 50 ppm, แอมโมเนีย 0, 0.1, 0.25 และ 0.5 ppm, ไนไตรท 0, 0.5, 1 และ 3 ppm, ไนเตรท 0, 5, 15 และ 30 ppm, ความเป็นด่าง 20, 30, 40 และ 50 ppm, ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4, 5, 6, 7 และ 8, ช่วงแสงที่ต่างกัน ได้แก่ มืด 24 ชั่วโมง มืด 18 ชั่วโมง สว่าง 6 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง สว่าง 12 ชั่วโมง มืด 6 ชั่วโมง สว่าง 18 ชั่วโมง และแสงสว่าง 24 ชั่วโมง, ความเข้มแสง 500, 800, 1000, 1200 lux และ อุณหภูมิน้ำ 23, 25, 27 และ 29 $^{\circ}$C

การตรวจสอบอัตราการฟักออกเป็นตัว

ตรวจสอบอัตราการฟักออกเป็นตัวของลูกปลาดุกลำพันที่เลี้ยงในแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลา 30 และ 36 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ตามวิธีการของ Silva *et al*. (2003)

การตรวจสอบการรอดตายของลูกปลาดุกลำพันหลังฟักออกเป็นตัว

ตรวจสอบการรอดตายของลูกปลาดุกลำพันหลังจากฟักออกเป็นตัว ที่ระยะเวลา 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิ ตามวิธีการของ Silva *et al*. (2003)

การตรวจสอบการเจริญเติบโต และการรอดตายของลูกปลาดุกลำพันในระหว่างการอนุบาล

เมื่อลูกปลาดุกลำพันมีอายุประมาณ 96 ชั่วโมงหลังจากปฏิสนธิ จะเข้าสู่ระยะเริ่มกินอาหาร อนุบาลลูกปลาดุกลำพันด้วยตัวอ่อนอาร์ทีเมีย และตรวจสอบการรอดตาย และการเจริญเติบโตของลูกปลาดุกลำพันหลังจากเริ่มกินอาหาร โดยย้ายลูกปลาในแต่ละชุดการทดลองลงเลี้ยงในตู้กระจกที่มีความจุน้ำ 10 ลิตร ในระดับความหนาแน่น 10 ตัวต่อลิตร ควบคุมปัจจัยทดลองในแต่ละตู้ทดลองให้อยู่ในระดับต่างๆ ตามชุดการทดลอง ตรวจสอบการรอดตาย และความยาวตัวเฉลี่ยของลูกปลาในแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน ตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al*. (2007)

4.3 การศึกษาโรคติดเชื้อในปลาดุกลำพันที่เลี้ยงในโรงเพาะฟัก

การเก็บตัวอย่างปลาทดลอง

ระหว่างช่วงเดือน มกราคม-กุมภาพันธ์ 2553 พบปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 5-7 กรัมต่อตัว ที่เลี้ยงในบ่อคอนกรีตของหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง แสดงอาการผิดปกติภายนอก ได้แก่ เกิดแผลบริเวณครีบ และหาง ขอบแผลมีสีขาว ไม่กินอาหาร และตายในระยะเวลา 3-4 วัน จึงเก็บตัวอย่างปลาที่ยังมีชีวิตที่แสดงอาการทั้งหมด จำนวน 8 ตัว เพื่อนำไปตรวจสอบปรสิตและแบคทีเรีย

การตรวจสอบเชื้อปรสิต

ตรวจสอบปรสิตภายนอกบริเวณผิวหนัง เมือก ครีบ ตา เหงือก และช่องปาก โดยการใช้สไลด์ขูดเมือกจากแต่ละบริเวณแล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ส่วนตัวอย่างอวัยวะชิ้นใหญ่ทำการตัดชิ้นส่วนวางบนสไลด์และหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ หยดสารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบปรสิต ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 200-1,000 เท่า ซึ่งพบว่าตัวอย่างปลาทั้งหมดที่นำมาศึกษาไม่มีการติดเชื้อปรสิต

การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างปลาดุกลำพันเพื่อเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากแผล และ ม้าม ตับ ไต และน้ำในช่องท้องด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เพาะเชื้อโดยการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar และ Ordal's agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ นำไปทดสอบ Catalase และ Oxidase แล้วนำมาเลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์

การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาดุกลำพัน โดยการทดสอบเชื้อก่อโรค (Koch' postulates)

นำปลาดุกลำพันสุขภาพดีที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 11.28±1.46 กรัม ความยาวเฉลี่ย 13.20±0.76 เซนติเมตร เลี้ยงในตู้กระจกตู้ละ 10 ตัว 3 ซ้ำ เพื่อปรับสภาพให้เข้ากับการทดลอง เป็นเวลา 3 วัน เตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ (Pure culture) ที่แยกได้แต่ละเชื้อ ฉีดเข้าช่องท้องปลาดุกลำพัน บันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นนำปลาดุกลำพันที่มีอาการป่วยมาแยกเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ เพื่อเป็นการยืนยันการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา กายภาพและชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการก่อโรคในปลาดุกลำพันทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม ซึ่งข้อมูลที่ได้มาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากชุดทดสอบ API ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียตัวอย่าง โดยใช้ Identification table ในคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบ หรือโปรแกรมการวินิจฉัยของบริษัทผู้ผลิต (APILAB Plus software)

การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญเพื่อใช้ในการจำแนกตามสายวิวัฒนาการ

การสกัด genomic DNA

สกัด genomic DNA จากแบคทีเรียก่อโรค โดยปั่นแยกเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย PBS pH 7.4 ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยใช้ Sonicator ร่วมกับ ศysis buffer สกัด DNA โดยเติม DNAzol 400 µl จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสมาตกตะกอน DNA ด้วย Absolute alcohol 200 µl จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 95 % แอลกอฮอล์ที่เย็นจัด 2 ครั้ง ละลายตะกอน DNA ในน้ำกลั่น 30 µl โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าตะกอน DNA จะละลายหมด ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยใช้ 1.2 % Agarose gel ใน Tris-acetate ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง UV trans-illuminator นำไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

การเพิ่มจำนวน 16S rDNA และทำให้บริสุทธิ์

เพิ่มจำนวน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Bacterial universal primer 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1500R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3')

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

วิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง DNA sequencer (ABI, Prism377) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะ (GeneBank) โดยวิธี Basic local alignment search tool (Blast; http://www.ncbi.nlm.nih.gov ตามวิธีการของ Altschul *et al*., 1990)

4.4 การศึกษาผลของการใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบโปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ การรอดตาย และองค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกลำพันระยะปลานิ้ว

เตรียมอาหารทดลองที่มีระดับพลังงานเท่ากัน (Isocaloric test diet) ในช่วง 330 - 340 kcal / 100 g โดยมีระดับโปรตีนรวมของอาหารทดลอง 40 % อาหารทดลองแต่ละสูตรใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในระดับ 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 % ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยเลี้ยงปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วที่มีขนาด 1-1.5 กรัมต่อตัว ในตู้ทดลองขนาด 120 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ตู้ละ 15 ตัว โดยแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ให้อาหารปลาตามแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง ในปริมาณที่ปลากินหมดภายใน 20 นาที (ประมาณ 3-5 % ของน้ำหนักตัวต่อวัน) ดูดตะกอนและเศษอาหารที่พื้นตู้ปลาทุกวัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 % ทุกวัน ทุก 2 สัปดาห์ของการทดลอง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละชุดการทดลองโดยชั่งน้ำหนักรวม บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้ นับจำนวนปลาที่เหลือเพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการรอดตายของปลาในแต่ละตู้ทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ตามสมการของ Halver and Hardy (2002) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลา 6 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำไปตรวจสอบอัตราส่วนความยาวต่อน้ำหนัก (Condition factor) และค่าดัชนีตับต่อตัว (Hepatosomatic index, HSI) และสุ่มตัวอย่างปลาเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) คำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Apparent net protein utilization, ANPU) โดยใช้สมการของ Halver and Hardy (2002) วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยน้ำหนักปลา อัตราการเจริญเติบโต การรอดตายของปลา อัตราส่วนความยาวตัวต่อน้ำหนัก ค่าดัชนีตับต่อตัว องค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และ

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ของปลาดุกลำพันที่ได้รับอาหารแต่ละชุดการทดลองด้วย One way analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' s multiple range test (DMRT) (Zar, 1984)

4.5 การศึกษาผลของการใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบโปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ การรอดตาย องค์ประกอบทางเคมีของปลาดุกลำพันระยะวัยรุ่น

เตรียมอาหารทดลองที่มีระดับพลังงานเท่ากัน (Isocaloric test diet) ในช่วง 330 - 340 kcal / 100 g โดยมีระดับโปรตีนรวมของอาหารทดลอง 40 % อาหารทดลองแต่ละสูตรใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในระดับ 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 % ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยเลี้ยงปลาดุกลำพันระยะวัยรุ่นที่มีขนาด 10-12 กรัมต่อตัว ในถังพลาสติกขนาด 500 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำ 300 ลิตร ถังละ 10 ตัว ตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละชุดการทดลองโดยชั่งน้ำหนักรวม บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้ นับจำนวนปลาที่เหลือเพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการรอดตายของปลาในแต่ละตู้ทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลา 6 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำไปตรวจสอบอัตราส่วนความยาวต่อน้ำหนัก และค่าดัชนีตับต่อตัว สุ่มตัวอย่างปลาเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) คำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Apparent net protein utilization, ANPU) วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยน้ำหนักปลา อัตราการเจริญเติบโต การรอดตายของปลา อัตราส่วนความยาวตัวต่อน้ำหนัก ค่าดัชนีตับต่อตัว องค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาดุกลำพันที่ได้รับอาหารแต่ละชุดการทดลองด้วย One way analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' s multiple range test (DMRT) (Zar, 1984)

4.6 การศึกษาผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต สีของตัวปลา และปริมาณแคโรทีนอยด์ในปลาดุกลำพัน

เตรียมอาหารทดลองโดยผสมสารสีสังเคราะห์ ได้แก่ แอสตาแซนทีนสังเคราะห์ (Astaxanthin) บีต้า-แคโรทีนสังเคราะห์ (Beta-Carotene) แคนทาแซนทีน (Cantaxanthin) ส่วนสารสีจากแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ เซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina* sp.) โดยปรับปริมาณให้มีแคโรทีนอยด์รวมเท่ากับ 100 ppm ส่วนอาหารสำหรับชุดควบคุมไม่เสริมแคโรทีนอยด์ในอาหาร ตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาหลังจากได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรทุกช่วง 2 สัปดาห์ของการทดลอง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักปลาทั้งตู้ บันทึก

จำนวนตัว เพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่ม และอัตราการรอดตาย บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้เพื่อนำมาคำนวณอัตราแลกเนื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บตัวอย่างปลาโดยสลบด้วยน้ำมันกานพลู (Clove oil) 100 ppm แล้วนำมาวัดค่าสีที่บริเวณผิวหนัง เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีภายนอกโดยตรวจวัดความแตกต่างของค่าสี L, a และ b ตามวิธีการของ Choubert and Heirich (1993) เก็บตัวอย่างปลาทดลองจำนวน 10 ตัวต่อชุดการทดลองนำมาตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามวิธีการของ Sommer *et al.* (1991) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 350-750 nm ด้วย Scanning spectrophotometer คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างโดยใช้ค่า $E^{1\%}_{cm}$ 2150

4.7 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของสไปรูลินาในอาหารสำหรับการปรับปรุงสีลำตัวปลาดุกลำพัน

เตรียมอาหารทดลองสำหรับปลาดุกลำพัน โดยให้มีโปรตีน 40 % ตามวิธีการของ สุภฎา และคณะ (2551) อาหารทดลองเสริมสาหร่ายสไปรูลินาแห้ง ที่ระดับความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์รวม 0, 25, 50, 100, 200 และ 300 ppm ตามลำดับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาหลังจากได้รับอาหารทดลองแต่ละสูตรทุกช่วง 2 สัปดาห์ของการทดลอง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักปลาทั้งตู้ บันทึกจำนวนตัวเพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่ม และอัตราการรอดตาย บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้เพื่อนำมาคำนวณอัตราแลกเนื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บตัวอย่างปลานำมาวัดค่าสีที่บริเวณผิวหนัง เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีภายนอกโดยตรวจวัดความแตกต่างของค่าสี L, a และ b ตามวิธีการของ Choubert and Heirich (1993) เก็บตัวอย่างปลาทดลองจำนวน 10 ตัวต่อชุดการทดลองนำมาตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ตามวิธีการของ Sommer *et al.* (1991) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 350-750 nm ด้วย Scanning spectrophotometer คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างโดยใช้ค่า $E^{1\%}_{cm}$ 2150

4.8 การศึกษาระดับของวิตามินซีในอาหารต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย การแลกเนื้อ องค์ประกอบทางเคมี และปริมาณวิตามินซีในปลาดุกลำพัน

เตรียมอาหารทดลองที่มีโปรตีนรวม 40 % โดยอาหารทดลองแต่ละสูตรเสริมวิตามินซีอนุพันธ์ฟอสเฟต (Ascorbyl-2-polyphosphate) ในปริมาณที่มีวิตามินซี 0, 50, 100, 200 และ 300 ppm ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดเลี้ยงปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วที่มีขนาด 1-1.5 กรัมต่อตัว ในตู้เลี้ยงขนาด 120 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ตู้ละ 15 ตัว โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ให้อาหารปลาตามแต่ละชุดการทดลอง โดยให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง ทุก 2 สัปดาห์ของการทดลองตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละชุดการทดลองโดยชั่งน้ำหนักรวม บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้ นับจำนวนปลาที่เหลือเพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการรอดตายของปลาในแต่ละตู้ทดลองเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุด

การทดลองสุ่มตัวอย่างปลา 6 ตัวจากแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณวิตามินซีในตับ และไตส่วนหน้า โดยแช่เยือกแข็งปลาจากแต่ละตู้เลี้ยงที่อุณหภูมิ -80 °C แยกตัดตับ และไตส่วนหน้านำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ตามวิธีการของ Boonyaratpalin and Phromkunthong (2001) ตรวจสอบความผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลา 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองดองในสารละลาย 10 % Buffered formalin แล้วนำไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีการของ Humason (1972) จากนั้นสุ่มตัวอย่างปลาที่เหลือเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) คำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Apparent net protein utilization, ANPU) วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยน้ำหนักปลา อัตราการเจริญเติบโต การรอดตายของปลา ปริมาณวิตามินซีในตับ และไตส่วนหน้า องค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ของปลาดุกลำพันที่ได้รับอาหารแต่ละชุดการทดลองด้วย One way analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' s multiple range test (DMRT) (Zar, 1984)

5. ผลการวิจัย

การศึกษาผลของสารเคมีชนิดต่างๆ และคุณภาพน้ำต่ออัตราการฟัก การรอดตาย และการเจริญเติบโตของปลาดุกลำพันดำเนินการโดยเพาะฟักปลาดุกลำพันในระบบฟักไข่ภายใต้สภาวะต่างๆ ทั้งนี้ผลการทดลองพบว่าการใช้สารเคมีลดเชื้อ ได้แก่ โปแทสเซียมเปอร์มังกาเนต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ฟอร์มาลดีไฮด์ โซเดียมคลอไรด์ และโพวิโดไอโอดีนแช่ไข่ปลาก่อนนำไปฟัก ไม่มีผลต่ออัตราการฟัก การรอดตาย และการเจริญเติบโตของลูกปลา การเพาะฟักไข่ปลาดุกลำพันในน้ำที่มีความเค็ม 1-2 ppt มีผลให้การรอดตายของลูกปลาลดลงในระยะแรก แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกลำพันวัยอ่อน ขณะที่ปริมาณแทนนินในน้ำในระดับ 10-50 ppm มีผลให้ทั้งอัตราการรอดตาย และการเจริญเติบโตของลูกปลาดุกลำพันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณแอมโมเนียในน้ำตั้งแต่ 0.1 ppm ขึ้นไปมีผลให้การเจริญเติบโตของลูกปลาในระยะแรกลดต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีแอมโมเนีย จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างพบว่าปลาที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-7 มีการรอดตายสูงกว่าปลาที่เลี้ยงในความเป็นกรด-ด่าง 4 และ 8 การศึกษาผลของช่วงแสงพบว่าลูกปลาดุกลำพันมีการรอดตายหลังจากฟักออกเป็นตัวต่ำที่สุดในช่วงมืดตลอดเวลา ขณะที่ลูกปลาที่เลี้ยงในช่วงแสงมืด 18 ชั่วโมง สว่าง 6 ชั่วโมง, มืด 12 ชั่วโมง สว่าง 12 ชั่วโมง, มืด 6 ชั่วโมง สว่าง 18 ชั่วโมง และช่วงแสงสว่างตลอดเวลามีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ความเข้มแสงในช่วง 500-1200 lux ไม่มีผลต่ออัตราการฟัก การรอดตาย และการเจริญเติบโตของลูกปลาดุกลำพัน ทั้งนี้การเพาะฟักที่อุณหภูมิ 25-27^0 C มีผลให้ลูกปลามีการเจริญเติบโตดีกว่าที่อุณหภูมิ 23^{0}C

ในระหว่างการดำเนินการทดลอง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท ได้จากแผลบริเวณลำตัว ตับ และไต ของปลาดุกลำพันที่แสดงอาการป่วยในโรงเพาะฟัก นำเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท ฉีดกลับเข้าช่องท้องปลาดุกลำพันและบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 12 วัน พบว่า เชื้อ LE03 ทำให้ปลาดุกลำพันมีอัตราการรอดตายน้อยที่สุด คือ 36.67±5.77% ปลาที่ติดเชื้อลำตัวมีสีซีดและพบแผลแดงบริเวณลำตัว จากนั้นจึงนำแบคทีเรีย LE03 มาจำแนกชนิดโดยการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา กายภาพ และชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ให้ผลการทดสอบออกซิเดสและอาร์จินีน ไดไฮโดรเลส เป็นบวก และสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar และ Ordal's agar ได้ ยืนยันผลโดยศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย พบว่า 16S rDNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส นำ PCR product ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จาก primer 20F เปรียบเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย คือ *Pseudomonas putida* ซึ่งเป็นการรายงานการติดเชื้อชนิดนี้ครั้งแรกในปลาดุกลำพัน

การศึกษาการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลาดุกลำพัน ดำเนินการเพื่อศึกษาผลของการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่น ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลำพันทั้งในระยะปลานิ้ว และระยะวัยรุ่น พบว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วได้ในปริมาณ 45 % ของโปรตีนจากปลาป่น โดยมีผลให้การเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ การรอดตาย องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ตลอดจนประสิทธิภาพโปรตีน และการใช้ประโยชน์ของโปรตีนสุทธิไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับปลาดุกลำพันที่ได้รับอาหารทดลองเสริมกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในระดับ 0-30% ของโปรตีนจากปลาป่น ขณะที่การทดลองในปลาดุกลำพันระยะวัยรุ่น พบว่า สามารถใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาดุก ลำพันได้ในปริมาณ 60 % ของโปรตีนจากปลาป่น โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ การรอดตาย การศึกษาผลของการเสริมแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ และระดับที่เหมาะสม ต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และผลต่อสีบริเวณลำตัวของปลาดุกลำพัน พบว่าการเสริมบีตา-แคโรทีน แคนตาแซนทีน แอสตาแซนทีน และสาหร่ายสไปรูลินา ในปริมาณที่มีแคโรทีนอยด์ 100 ppm มีผลให้ค่าสีแดง บริเวณตัวปลาดุกลำพันมีค่าสูงขึ้น แต่เมื่อทำการตรวจสอบค่าสีเหลือง พบว่าเฉพาะปลาดุกลำพันที่ได้รับอาหารทดลองเสริมสาหร่ายสไปรูลินาจะมีค่าสีเหลืองบริเวณผิวหนังสูงที่สุด ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ การรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทุกสูตรมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อทำการศึกษาระดับที่เหมาะสมของสไปรูลินาต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และผลต่อสีบริเวณลำตัวของปลาดุกลำพัน พบว่า การใช้สาหร่ายสไปรูลินาผสมในอาหารในปริมาณที่มีแคโรทีนอยด์ 25-100 ppm (2.69 - 10.75 %) มีผลให้สีเหลือง และสีแดงของผิวหนังปลาดุกลำพันเพิ่มขึ้น โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตรา

การแลกเนื้อ และการรอดตาย แต่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองเสริมสไปรูลินาในปริมาณที่มีแคโรทีนอยด์ 200-300 ppm (21.50-32.25 %) จะมีการเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อ ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และการศึกษาผลของวิตามินซีในอาหารต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อพบว่าปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี 50-300 ppm มีการเจริญเติบโต การรอดตาย องค์ประกอบทางเคมี และปริมาณวิตามินซีในตัวปลาไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ขณะที่ปลาซึ่งได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีการเจริญเติบโตต่ำ และมีพยาธิสภาพของเยื่อบุผิวเหงือกเกิดขึ้น

ผลการศึกษาสรุปได้ว่า ไม่จำเป็นต้องแช่ไข่ปลาดุกลำพันในสารเคมีลดเชื้อก่อนนำไปฟัก สภาพน้ำที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะฟัก และอนุบาลลูกปลาดุกลำพันไม่ควรมีแทนนินละลายในน้ำ และควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-7 ความเค็มต่ำกว่า 0.5 ppt ความเป็นด่าง 20-50 ppm แอมโมเนียต่ำกว่า 0.1 ppm ในสภาพช่วงแสง และความเข้มแสงตามธรรมชาติ ที่ระดับอุณหภูมิ 25-27^0 C ส่วนอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกลำพันในลักษณะปลาสวยงามสามารถใช้กากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากปลาป่นได้ 45 % การเสริมสาหร่ายสไปรูลินาในปริมาณที่มีแคโรทีนอยด์รวม 100 ppm จะช่วยให้ตัวปลามีสีแดง และเหลืองเด่นชัดขึ้น ทั้งนี้การใช้วิตามินซี 50-300 ppm เสริมในอาหารจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

การพัฒนาสายพันธุ์ปลาท้องถิ่นเพื่อเป็นปลาสวยงามสำหรับการส่งออก จำเป็นต้องดำเนินการพัฒนาทั้งด้านการผลิตลูกพันธุ์จากโรงเพาะฟักให้มีปริมาณ การเจริญเติบโต และการรอดตายสูงเพื่อให้มีผลผลิตคงที่ และมีปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการของตลาดโลก อีกทั้งยังต้องพัฒนาสูตรอาหารให้ปลามีสุขภาพสมบูรณ์ ตลอดจนมีสีสันเด่นชัด และรูปร่างลักษณะตามธรรมชาติควบคู่กันไป เพื่อให้คุณภาพของผลผลิตตรงตามความต้องการ รวมทั้งยังต้องมีการเฝ้าระวังปัญหาโรคติดเชื้อที่อาจพบในโรงเพาะฟัก ซึ่งจะส่งผลเสียต่อทั้งคุณภาพ และปริมาณผลผลิตได้ ผลจากการวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันเพื่อพัฒนาเป็นสายพันธุ์ปลาสวยงามเพื่อการส่งออก ทำให้ทราบถึงปัจจัยด้านคุณภาพน้ำในระบบการเพาะฟักที่จะมีผลให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตปลาดุกลำพันสูงสุด กล่าวคือในการเตรียมน้ำสำหรับเพาะฟักควรเป็นน้ำที่มีความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5-7 ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) 20-50 ppm ต้องเป็นน้ำที่ปราศจากแทนนินละลายอยู่ โดยมีความเค็มต่ำกว่า 0.1 ppt ปริมาณแอมโมเนียในน้ำต่ำกว่า 0.1 ppm ในสภาพช่วงแสง และความเข้มแสงตามธรรมชาติ ที่ระดับอุณหภูมิ 25-27^0 C โดยไม่จำเป็นต้องแช่ไข่ปลาดุกลำพันในสารเคมีลดเชื้อก่อนนำไปฟักแต่อย่างใด ในขณะที่อาหารสำเร็จรูปสำหรับใช้เลี้ยงปลาดุกลำพันเป็นปลาสวยงามเพื่อการส่งออกควรเสริมสาหร่ายสไปรูลินาในสูตรอาหารในปริมาณที่มีแคโรทีนอยด์ 25-100 ppm (2.69 -10.75 % ของสไปรูลินาในสูตรอาหาร) ซึ่งจะทำให้ตัวปลามีลวดลายสีเหลือง และสีแดงของลำตัวปลาดุกลำพัน

เพิ่มขึ้นคล้ายกับปลาที่พบในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการใช้สไปรูลินาในปริมาณที่มีแคโรทีนอยด์มากกว่านี้จะทำให้การเจริญเติบโต ของปลาลดต่ำลง ในการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลาดุกลำพันสามารถลดปริมาณการใช้ปลาป่นลงได้โดยการใช้กากถั่วเหลือง เป็นวัตถุดิบทดแทนโปรตีน โดยสามารถใช้กากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนในสูตรอาหารได้ในปริมาณ 45% ของโปรตีนทั้งหมดในอาหาร (26-28% ของกากถั่วเหลืองในสูตรอาหาร) โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของปลา นอกจากนี้ในการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลาดุกลำพันควรเสริมวิตามินซีในอาหารในปริมาณ 50-300 ppm ซึ่งจะทำให้ปลามีการเจริญเติบโต การรอดตาย และสุขภาพที่ดี ขณะที่ปลาซึ่งได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินซีมีการเจริญเติบโตต่ำและมีพยาธิสภาพของเยื่อบุผิวเหงือกเกิดขึ้น นอกจากนี้ในระหว่างการเลี้ยงปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟักควรเฝ้าระวังปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ที่เป็นรายงานการติดเชื้อชนิดนี้เป็นครั้งแรก โดยโรคดังกล่าวมีความรุนแรงและก่อให้เกิดการตายของปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟัก ภายหลังการรับเชื้อ

อย่างไรก็ตามการประชาสัมพันธ์ที่ทั่วถึง และเข้าสู่กลุ่มเป้าหมาย นับเป็นปัญหา และอุปสรรคในการดำเนินงานเพื่อให้ประสบผลสัมฤทธิ์ของโครงการ จำเป็นต้องอาศัยสื่อต่างๆ รวมทั้งการประชาสัมพันธ์โครงการวิจัยในวงกว้างเพื่อให้ผลจากการวิจัยครั้งนี้กระจายเข้าสู่กลุ่มเป้าหมายได้มากยิ่งขึ้น

7. การนำไปใช้ประโยชน์

จากการทดลองในด้านผลของคุณภาพน้ำต่ออัตราการเพาะฟัก การรอดตาย และการเจริญเติบโตของปลาดุกลำพันทำให้ทราบถึงสภาวะ และระดับของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลให้ไข่ปลาดุกลำพันมีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และการรอดตายสูงที่สุด ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟักเพื่อให้มีปริมาณผลผลิตคงที่ และมีปริมาณที่แน่นอน ปัจจุบันองค์ความรู้ดังกล่าวได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในแง่การเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ คณะผู้วิจัยได้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะพันธุ์ และอนุบาลปลาดุกลำพันให้แก่คณะดำเนินการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกลำพันในป่าพรุควนเคร็ง ของโครงการพัฒนาป่าไม้และระบบนิเวศน์ป่าพรุ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ กรมป่าไม้ หมู่ที่ 10 ต.สวนหลวง อ. เฉลิมพระเกียรติ จ. นครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นหน่วยงานด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติที่จะถ่ายทอดกระบวนการ และแนวปฏิบัติในการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันให้กับชุมชนท้องถิ่น ผลจากการศึกษาวิจัยด้านสูตรอาหารสำหรับปลาดุกลำพันได้นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงปลาดุกลำพันในโรงเพาะฟัก ซึ่งหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณได้มีการผลิต และจำหน่ายลูกพันธุ์ปลาดุกลำพัน ตลอดจนอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงปลาดุกลำพันให้มีคุณภาพดี รวมทั้งยังมีการถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวในโครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยีของหน่วยงานอย่างต่อเนื่อง