การใช้กากมะพร้าวและ *Bacillus licheniformis* ในอาหารของปลาตะเพียนขาว

Use of Coconut Residue and *Bacillus licheniformis* in Feed for Silver Barb

มหัทธนี ภิญโญ*, ภัทรมาศ ถิ่นจันทร์ และ วิลาสินี อินญาวิเลิศ

Mahattanee Phinyo*, Phattharamat Thinjan and Wilasinee Inyawilert

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources*, and Environment, Naresuan University*

Received : 11 May 2018

Accepted : 10 August 2018

Published online : 16 August 2018

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของกากมะพร้าว (ผลพลอยได้จากมะพร้าวผ่านการคั้นกะทิ) และ *Bacillus licheniformis* ต่อการเจริญเติบโตและการต้านทานต่อโรคในปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) หลังจากเลี้ยงปลาตะเพียนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ด้วยอาหารทดลอง 4 สูตรได้แก่ สูตรควบคุม (ไม่มีการเสริม คือสูตรที่ 1) สูตรที่ 2 เสริมด้วย 4% (w/w) กากมะพร้าว สูตรที่ 3 เสริมด้วย *B. licheniformis* ระดับ 10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร และสูตรที่ 4 เสริมด้วย 4% (w/w) กากมะพร้าว และ *B. licheniformis* ระดับ 10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร พบว่าสูตรที่ 2 และ 4 ที่มีกากมะพร้าวสามารถช่วยด้านการเจริญเติบโตได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการแลกเนื้อ (p<0.05) ในขณะที่สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของ *B. licheniformis* (สูตร 3) ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p>0.05) ส่วนค่าโลหิตวิทยาพบว่าในสูตรอาหารที่มีการเสริม *B. licheniformis* (สูตร 3 และ 4) จะทำให้มีปริมาณเม็ดเลือดแดงสูงขึ้น (p<0.05) เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อโรค *Aeromonas hydrophila* ระยะเวลาสังเกต 14 วัน พบว่าสูตรอาหารที่มีการเสริม *B. licheniformis* ทำให้การตายลดลงเมื่อเทียบกับสูตร 1 และ 2 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเสริมอาหารที่มีกากมะพร้าวสามารถช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้นและไม่ทำให้ค่าโลหิตวิทยาเปลี่ยนแปลง สามารถลดต้นทุนด้านอาหารสำหรับการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวได้ ในขณะที่ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 4 ทำให้การเจริญเติบโต และการต้านทานต่อโรค *A. hydrophila* เพิ่มมากขึ้น

คำสำคัญ : กากมะพร้าว, ปลาตะเพียนขาว, บาซิลลัส ไลเคนนิฟอร์มิส

***Corresponding author. E-mail:** mahattaneep@nu.ac.th

Abstract

This study aimed to investigate the effect of coconut residue (by-product of the coconut milk extraction) and *Bacillus licheniformis* on the growth and disease resistant of the silver barb (*Barbodes gonionotus*). The silver barbs were fed for 8 weeks with 4 formulations of experiment diet consist of control group (without supplement; diet 1), 4% (w/w) coconut residue (diet 2), 10^6 CFU of *B. licheniformis* /g diet (diet 3), and 4% (w/w) coconut residue together with 10^6 CFU of *B. licheniformis* /g diet (diet 4). It is found that the diet 2 and 4 containing the coconut residue could improve the growth of the silver barbs which are the weight gain, specific growth rate (SGR) and food conversion ratio (FCR) ($p<0.05$) while the diet formulation consists of *B. licheniformis* (diet 3) have no impact on the growth of the silver barbs when compared with control group ($p>0.05$). For hematological parameter, it is found that in the diet formulation containing *B. licheniformis* (diet 3 and 4) could increase the number of red blood cell (RBC) in ($p<0.05$). After *Aeromonas hydrophila* resistant test with 14 days observation period, it is found that of the diet formulation containing *B. licheniformis* (diet 3 and 4) could decrease the fish mortality rate when compared with diet formulation 1 and 2. In conclusion, this result indicates that the coconut residue improves the growth of silver barb while having no impact on hematological parameter, could reduce the cost in silver barb cultivation. Furthermore, the diet formulation 4 increased the growth and disease resistant of *A. hydrophila*.

Keywords: coconut residue, silver barb, *Bacillus licheniformis*

บทนำ

ปลาตะเพียนขาว (silver barb; *Barbodes gonionotus*) เป็นปลากินพืช พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืดแถบประเทศไทย อินโดนีเซีย เวียดนาม และศรีลังกา ลักษณะลำตัวป้อม มีสีเงิน สามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิด ประเทศไทยนิยมนำมาผ่านกระบวนการแปรรูป ได้แก่ ปลาร้า ปลาส้ม ปลาจ่อม (Tesana *et al*., 2014, Vuthiphandchai *et al.,* 2015) เนื่องจากปริมาณความต้องการของปลาตะเพียนขาวมีเพิ่มสูงขึ้นและปลาที่ได้จากธรรมชาติมีปริมาณลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเลี้ยงเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักประสบปัญหาจากโรคที่เกิดจากแบคทีเรียโรคที่พบบ่อยได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มักพบทำให้เกิดโรคและสร้างความเสียหายในปลาน้ำจืดจำนวนมาก เกษตรกรในปัจจุบันนิยมใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมในการรักษา ทั้งนี้การใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปหรือไม่ตรงต่อโรค จะทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาหรือการพัฒนาสายพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถใช้ยาชนิดเดิมควบคุมโรคในสัตว์น้ำได้อีก (Namputta & Saipan, 2017) นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังสะสมอยู่ในตัวปลาทำให้ส่งผลกระทบตามห่วงโซ่อาหารส่งผลมายังผู้บริโภค อีกทั้งส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์รวมถึงสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ซึ่งปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับอาหารปลอดภัย (food safety) และการเลี้ยงสัตว์น้ำของเกษตรกรให้ได้ตามมาตรฐาน GAP (Good Agriculture Practices) โดยเฉพาะในด้านปัจจัยการผลิตในการให้อาหาร อาหารเสริม วิตามิน และปัจจัยการผลิตที่

ปลอดจากการปนเปื้อนของยาและสารต้องห้ามที่ตกค้างในสัตว์น้ำและส่งต่อไปยังผู้บริโภค ซึ่งการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยสร้างสมดุลในลำไส้ สร้างภูมิต้านทานแบบไม่จำเพาะในสัตว์น้ำ ซึ่งโปรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* เป็นกลุ่มที่น่าสนใจและมีการศึกษาในการช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น และเพิ่มความต้านทานเชื้อก่อโรคลดการตายหลังได้รับเชื้อ เช่นในการศึกษาในปลานิล (Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*) ปลากะรัง (Grouper; *Epinephelus coioides*) และปลาเรนโบว์เทราต์ (Rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) เป็นต้น (Adeoye *et al*., 2016; San *et al*., 2010; Merrifield *et al*., 2010)

มะพร้าว (*Cocos nucifera* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจของไทยที่มีความต้องการในประเทศอย่างต่อเนื่องการบริโภคในรูปน้ำมันมะพร้าว แบบสด หรือประกอบอาหาร น้ำมันมะพร้าวมีไขมันที่อิ่มตัวสูงช่วยเพิ่มอัตราเมตาบอลิซึมของร่างกาย และมีองค์ประกอบของกรดลอริก (lauric acid) ที่มีคุณสมบัติสร้างภูมิคุ้มกัน และการต้านทานแบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัว (Alice *et al*., 2006; Conrado, 2003) และส่วนเนื้อมะพร้าวมีสารอาหารพวกโปรตีน และไขมัน 10.57 และ 47.80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้พบแร่ธาตุ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และโคบอล อยู่ในส่วนของเนื้อมะพร้าวอีกด้วย (Obasi *et al*., 2012; Solangi & Zafar Iqbal, 2011) เนื้อมะพร้าวกะทิที่ผ่านกระบวนการการคั้นน้ำเรียกว่ากากกะทิหรือกากมะพร้าวถือเป็นวัสดุเศษเหลือและมีการนำไปใช้ประโยชน์น้อย โดยในกากมะพร้าวยังมีคุณค่าทางโภชนาการหลงเหลือได้แก่ โปรตีน และไขมัน (ตารางที่ 1) ที่ปลาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งมีการศึกษานำไปใช้ในการเลี้ยงปลา เช่นปลานิลวัยอ่อน (Nalinanon & Lerdsuwan, 2018) นอกจากนี้กากมะพร้าวมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่เป็นองค์ประกอบของมอโนแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์อีกด้วย (Nor, *et al*. 2017)

ในงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจการใช้กากมะพร้าวร่วมกับแบคทีเรีย *B. licheniformis* ในอาหารปลาตะเพียนขาวเพื่อทดสอบการเจริญเติบโต การรอดตาย และความต้านทานต่อโรค *A. hydrophila* ของปลาตะเพียนขาว

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมกากมะพร้าว

นำกากมะพร้าวที่ได้จากการคั้นน้ำกะทิมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียด นำกากมะพร้าวอบแห้งมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีการของ AOAC (1990) และเพื่อนำไปผสมในอาหารปลาต่อไป

การศึกษาการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* ร่วมกับกากมะพร้าว

ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* TBRC 371 ที่ได้จากศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย (Thailand Bioresource Research Center) นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA (Nutrient agar) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวลงอาหารเหลว NB (Nutrient broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* กับ 2% (w/w) กากมะพร้าวอบแห้ง โดยทำการเติมเชื้อ 0.2% (v/v) ในอาหารเหลว NB (สูตรควบคุม) และอาหารเหลว NB ที่มีการเติมกากมะพร้าว 2% ทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว (NB) 50 มิลลิลิตร อย่างละ 3 ซ้ำ วัดค่าการเจริญเติบโตเชื้อโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

การศึกษาการใช้ *B. licheniformis* ร่วมกับกากมะพร้าวในการเลี้ยงปลาตะเพียน

เตรียมตู้กระจกขนาด 40x90x45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 150 ลิตร ปิดด้วยผ้าพลาสติกอ่อนสีทึบ 3 ด้าน เพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากภายนอก ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ สภาวะการเลี้ยงจะได้รับแสงธรรมชาติอัตราส่วนกลางวันต่อกลางคืน 12 : 12 ชั่วโมง ปิดตาข่ายด้านบนของตู้ น้ำที่ใช้เลี้ยงปลาจะถูกพักในถังบรรจุน้ำขนาด 2,000 ลิตร เพื่อให้น้ำปราศจากคลอรีน

อนุบาลลูกปลาตะเพียนขนาด 1-2 เซนติเมตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยอาหารสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีน 40% ไขมันไม่น้อยกว่า 4% ความชื้นไม่มากกว่า 12% ให้ลูกปลากินจนอิ่ม จำนวน 2 ครั้งต่อวัน (เวลา 8.30 น. และ 16.30 น.) จนปลามีขนาด 3-4 เซนติเมตร ทำการอดอาหารปลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดขนาดของปลาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ทำการเตรียมอาหารทดลองโดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบในอาหารตามวิธีของ AOAC (1990) วัตถุดิบอาหารร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาดประมาณ 600 ไมโครเมตร คำนวณสูตรอาหารปรับให้อาหารแต่ละสูตรมีระดับของโปรตีน และไขมันที่ใกล้เคียงกัน ทำการผสมวัตถุดิบอาหารด้วยเครื่องผสมอาหารพร้อมเติมน้ำ 15% จนอาหารเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดอาหารสัตว์ที่มีรูผ่านขนาด 3 มิลลิเมตร นำอาหารที่ผ่านการอัดเม็ดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าความชื้นในอาหารมีค่าน้อยกว่า 10% นำอาหารไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และส่วนที่เหลือบรรจุในถุงพลาสติกและเก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดลองประกอบด้วยอาหาร 4 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารสูตรควบคุมโปรตีน 30% ไม่มีกากมะพร้าวและ *B. licheniformis*

สูตรที่ 2 อาหารที่มีโปรตีน 30% และมีองค์ประกอบของ 4% (w/w) กากมะพร้าวอบแห้ง

สูตรที่ 3 อาหารที่มีโปรตีน 30% และมีเชื้อ *B. licheniformis* (ความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร)

สูตรที่ 4 อาหารที่มีโปรตีน 30% และมีองค์ประกอบ 4% (w/w) กากมะพร้าวอบแห้ง ร่วมกับ *B. licheniformis* (ความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารทั้ง 4 ชุดการทดลอง

วัตถุดิบ	องค์ประกอบอาหาร (กิโลกรัม)			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
ปลาป่น	21.5	21.5	21.5	21.5
กากถั่วเหลือง	25	25	25	25
รำละเอียด	28	28	28	28
ข้าวโพด	8.5	8.5	8.5	8.5
ปลายข้าว	15.5	11.5	15.5	11.5
กากมะพร้าว	0	4	0	4
น้ำมันปลา	0.5	0.5	0.5	0.5
วิตามิน แร่ธาตุ	1	1	1	1
รวม	100	100	100	100
B. licheniformis	-	-	+	+
องค์ประกอบเคมี (เปอร์เซ็นต์)				
โปรตีน	30.22±0.12	29.95±0.19		
ไขมัน	9.63±0.18	10.14±0.22		
เยื่อใย	3.45±0.08	3.94±0.04		
เถ้า	7.09±0.04	7.30±0.03		

* เครื่องหมาย – แสดงถึงไม่มีการเติมเชื้อ; + มีการเติมเชื้อ

จากนั้นอาหารสูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร ส่วนอาหารสูตรที่ 1 และ 2 ฉีดพ่นด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้ปริมาตรของเชื้อและน้ำฆ่าเชื้อสัดส่วน 100 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำการเคลือบอาหารทุกสูตรด้วยแป้งข้าวโพด 5 กรัมต่อ 100 กรัมอาหาร ตากอาหารให้แห้งเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

การทดสอบผลของอาหารแต่ละสูตรต่อการเจริญเติบโตปลาตะเพียน

ปลาที่ใช้ทดลองถูกคัดลงในตู้กระจกทดลองจำนวน 10 ตัวต่อตู้ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ปรับสภาพเพื่อการทดลองโดยอาหารสูตรควบคุม (สูตร 1 ปริมาณโปรตีน 30% และไขมัน 9.6%) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อเริ่มต้นให้อาหาร ปลามีน้ำหนักเฉลี่ย 5.06±0.06 กรัมต่อตัว (น้ำหนักแต่ละตัว 4.5-5.5 กรัมต่อตัว)เริ่มให้อาหารทดลองให้อาหารเป็นจำนวน 5% ของน้ำหนักตัว จำนวน 2 ครั้งต่อวัน (เวลา 8.30 น. และ 16.30 น.) ให้อาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง วิเคราะห์คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยง (แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และออกซิเจนที่ละลายน้ำ) ทำการสังเกตลักษณะและอาการของปลา บันทึกผลการตาย บันทึกน้ำหนักปลาทุกๆ 2 สัปดาห์ (อดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนชั่งน้ำหนัก)

การวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, กรัม/ตัว)

= น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม/ตัว)-น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม/ตัว)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR %/วัน)

$$= \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{T} \times 100$$

W_1=น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัมต่อตัว)

W_2=น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัมต่อตัว)

T= เวลาในการเลี้ยง (วัน)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม/ตัว)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)}}$$

อัตราการรอดตาย (survival rate, %)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)}} \times 100$$

หลังการทำการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลาจำนวน 5 ตัวต่อตู้ (15 ตัวต่อชุดการทดลอง) ทำการเก็บเลือดที่บริเวณเส้นเลือดบริเวณคอดหาง (Caudal vein) นำมาหาค่าโลหิตวิทยาได้แก่ เม็ดเลือดแดงอัดแน่น และนับปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว โดยใช้ Haemacytometer เซลล์เม็ดเลือดแดงทำการนับปริมาณเซลล์ทั้งหมด 5 ช่องเล็ก (R) และเม็ดเลือดขาวทำการนับเซลล์สี่เหลี่ยมทั้งหมด 4 ช่องใหญ่ (W)

สูตรคำนวณปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

$$\text{ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (\%)} = \frac{\text{ปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดง}}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

ทดสอบความต้านทานต่อโรคแบคทีเรีย *Aeromaonas hydrophila*

นำปลาตะเพียนที่ได้รับอาหารทดลอง 8 สัปดาห์ 5 ตัวต่อตู้ (จำนวน 15 ตัวต่อชุดการทดลอง) มาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* บนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เจือจางเชื้อ

ด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ $0.5x10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร ฉีดเชื้อเข้าบริเวณช่องท้องของปลาตะเพียนขาว 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว โดยกลุ่มควบคุมจะทำการฉีดด้วย 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว จำนวน 2 ตัวต่อตู้ สังเกตอาการและบันทึกอัตราการรอดตายของปลาเป็นระยะเวลา 14 วัน

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

แผนการทดลองวางแผนแบบสุ่มตลอด CRD (Completely Randomized Design) ประกอบไปด้วยอาหารทั้งหมด 4 สูตร วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ANOVA (One-way Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan New's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

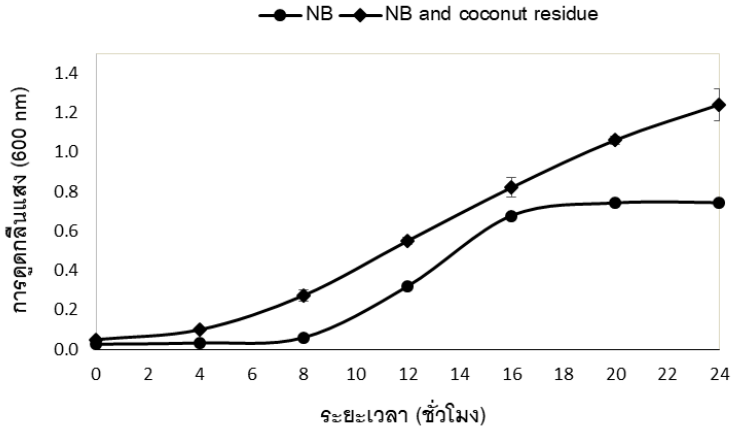
1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* ร่วมกับกากมะพร้าว

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของกากมะพร้าวอบแห้งพบว่ามีปริมาณของโปรตีน 4.51% และไขมัน 23.04% (ตารางที่ 2) ซึ่งมีสารอาหารที่สามารถนำมาเป็นอาหารทดแทนให้กับสัตว์ได้ และผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. licheniformis* ด้วยอาหารเหลว NB หลอดทดลองพบว่าเมื่อมีการเติม 2% (w/v) ของกากมะพร้าว ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อดีกว่าเมื่อเทียบกับสูตรที่เลี้ยงในอาหาร NB โดยเมื่อทำการเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 16-24 เชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร NB เริ่มมีการเจริญที่คงที่ แต่เชื้อที่เลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมกากมะพร้าวยังมีการเจริญเติบโตสูงขึ้น (ภาพที่ 1) จากการศึกษาพบว่ากากมะพร้าวมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนและแร่ธาตุที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังงานวิจัยของ Poopathi & Archana (2012) ได้เติมกากมะพร้าวในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าส่งเสริมการเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มากกว่ากลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีกากมะพร้าว นอกจากนี้กากมะพร้าวยังมีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ มอโนแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตจุลินทรีย์โปรไบโอติก จากงานวิจัยของ Nor *et al.* (2017) ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการสกัดน้ำมัน พบว่ามีองค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 1.69, 17.26 และ 25.73 % ตามลำดับ ปริมาณสารทางโภชนาการของกากมะพร้าวจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์มะพร้าวและกระบวนการสกัดเนื้อมะพร้าวที่แตกต่างกัน เมื่อมีการศึกษาคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกพบว่ากากมะพร้าวหลังสกัดน้ำมันมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มีเท่ากับ 0.73 % ที่เป็นองค์ประกอบของมอโนแซ็คคาร์ไรด์ 2 ชนิด ได้แก่น้ำตาลกลูโคสและฟลุคโตส

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าวอบแห้ง

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	7.38±0.09
โปรตีน	4.51±0.10
ไขมัน	23.04±0.39
เยื่อใย	20.39±0.24
เถ้า	1.89±0.03

*ค่าที่ปรากฏคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)



ภาพที่ 1 แสดงกราฟการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* TBRC 371 ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) และอาหาร NB ที่มี 2% (w/v) กากมะพร้าว

2. ผลการทดสอบผลของอาหารแต่ละสูตรในการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวต่อการเจริญเติบโตและค่าโลหิตวิทยา

จากการศึกษากากมะพร้าวและโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลาตะเพียนขาวหลังได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาตะเพียนขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีกากมะพร้าวในสูตรที่ 2 และ 4 ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตมากกว่าสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 ที่ไม่มีการเติมกากมะพร้าว (p<0.05) และกากมะพร้าวไม่ทำให้อัตราการตายแตกต่างจากสูตรอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 3 ส่วนสูตรอาหารที่เสริมด้วย *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร (สูตร 3) มีการเจริญเติบโตและการรอดตายไม่มีความแตกต่างกับสูตรควบคุม (p>0.05) ดังนั้นกากมะพร้าวส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาตะเพียนขาว ซึ่งจากการศึกษาของ Rodjan *et al*. (2017) ที่ใช้กากมะพร้าวจากกระบวนการสกัดน้ำมันทดแทนรำข้าวสกัดน้ำมันร่วมกับการใช้เอนไซม์ ในอาหารสุกร พบว่าความสามารถย่อยได้ของอาหารดีขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มอาหารควบคุม (p<0.05) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Aderolu & Akinremi (2009) ที่เสริมน้ำมันมะพร้าวในอาหารเลี้ยงปลาดุกแอฟริกา (African mud catfish; *Clarias gariepinus*) พบว่าน้ำมันมะพร้าวที่ระดับ 5 และ 10% มีการเจริญเติบโตของปลาสูงกว่ากลุ่มควบคุม และทำให้ค่าอัตราการแลกเนื้อต่ำเมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุม (p<0.05) และจากงานวิจัยของ Nalinanon & Lerdsuwam (2018) ทำการเสริมกากมะพร้าวทดแทนปลายข้าวในอาหารเลี้ยงปลานิลวัยอ่อนพบว่าเมื่อเสริมกากมะพร้าวที่ 20% (w/w) ทำให้การเจริญเติบโตของปลานิลลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากปริมาณเยื่อใยของกากมะพร้าวสูงหากมีการเสริมในปริมาณมากจะทำให้มีผลในเชิงลบต่อการเจริญเติบโตได้ ในขณะที่การเสริม *B. licheniformis* เพียงอย่างเดียวไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาตะเพียนขาว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bagheri *et al*. (2008) ที่มีการเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเสริมเชื้อที่ระดับ $4.8x10^8$, $1.2 x10^9$, $2.01x10^9$ CFU ต่อกรัมอาหาร แต่มีอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงขึ้นเมื่อเสริมโปรไบโอติกในอาหารที่ระดับ $3.8x10^9$ CFU ต่อกรัมอาหาร นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Merrifield *et al*. (2010) เป็นการเสริมโปรไบโอติกของ Biogen® ที่มีส่วนประกอบของเชื้อ *B. licheniformis* ร่วมกับ *B. subtilis* ปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ในปลาเรนโบว์เทราต์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราส่วนประสิทธิภาพของโปรตีน (protein efficiency

ratio; PER) สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05) และพบโปรไบโอติกเข้าเกาะบริเวณเยื่อบุผนังลำไส้สูงกว่าเสริมด้วย *Enterococcus faecium* นอกจากนี้มีการศึกษาการเสริมซินไบโอติกในอาหารด้วยแบคทีเรีย *B. icheniformis* ปริมาณเชื้อ 0.48x10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร ร่วมกับ 1% yeast extract ในปลานิล Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) ทำให้อัตราส่วนประสิทธิภาพของโปรตีน (protein efficiency ratio; PER) และ โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (protein productive; PPV value) เพิ่มขึ้น ส่วนอัตราการแลกเนื้อ FCR (feed conversion ratio) น้อยเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่มี *B. icheniformis* ที่ความเข้มข้น 0.24 x10^6 และ 0.96 x10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร ร่วมกับ yeast extract ที่ปริมาณ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ การเสริมอาหารซินไบโอติกยังช่วยเพิ่มค่าโลหิตวิทยาได้แก่ เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) เม็ดเลือดแดง (red blood cells; RBCs) เม็ดเลือดขาว (white blood cells; WBCs) Hemoglobin (Hb) เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม (Hassaan, *et al*., 2014) ทั้งนี้การส่งผลของการเสริมโปรโบโอติกต่อการเจริญเติบโตในปลาแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของโปรไบโอติกและปริมาณของเชื้อโปรไบโอติกที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิดที่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานต่อโรคในปลา

ผลการศึกษาค่าโลหิตวิทยาได้แก่ ค่าเม็ดแดงอัดแน่น ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ของปลาตะเพียนขาวในการได้รับอาหารสูตรต่างๆ พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ปริมาณเม็ดเลือดขาวไม่มีความแตกต่างกัน (p>0.05) ดังตารางที่ 4 แต่ปริมาณเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงขึ้น ซึ่งเม็ดเลือดแดงมีความเกี่ยวพันกับยีน *interferon* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของปลา (Shen *et al*., 2018) และการเพิ่มของเม็ดเลือดแดงจะช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้สามารถส่งไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของปลาได้มากขึ้น Mourino *et al*. (2016) เช่นเดียวกับงานวิจัยที่เสริม *B. licheniformis* ในอาหารเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าบ่งชี้ว่าการเสริมเชื้อ *B. licheniformis* ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดแดงสูงขึ้น ซึ่งไม่ทำให้ปลามีสภาวะโลหิตจางหลังได้รับการเสริมเชื้อ เช่นเดียวการเสริม *B. licheniformis* และ *B. subtilis* และงานวิจัยของ Hassaan *et al*. (2014) ที่เลี้ยงปลานิลด้วยอาหารที่ประกอบด้วย *B. licheniformis* (ความเข้มข้น 0.96x10^6 CFU ต่อกรัมอาหาร) พบว่ามีปริมาณเม็ดแดงสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ดังนั้นเชื้อ *B. licheniformis* ที่เสริมในอาหารทำให้ปลาตะเพียนขาวไม่เกิดภาวะโลหิตจางและไม่ส่งผลต่อสุขภาพของปลาเนื่องจากการสร้างเม็ดเลือดขาวที่มีหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมไม่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของปลาตะเพียนที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ

พารามิเตอร์	**ชุดการทดลอง**			
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัมต่อตัว)	15.15±1.37[b]	18.63±0.63[a]	16.15±0.53[b]	19.19±0.89[a]
น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อตัว)	10.15±1.37[b]	13.59±0.57[a]	11.04±0.53[b]	14.07±0.89[a]
อัตราการเจริญจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)	1.97±0.16[b]	2.34±0.04[a]	2.05±0.06[b]	2.36±0.08[a]
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (เปอร์เซ็นต์)	2.61±0.17[a]	2.00±0.01[c]	2.34±0.08[b]	1.96±0.15[c]
อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	96.7±5.8[a]	100[a]	100[a]	96.7±5.8[a]

*ค่าที่ปรากฏคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)

ตัวอักษร (a,b และ c) ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของปลาตะเพียนที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ

พารามิเตอร์	**ชุดการทดลอง**			
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เปอร์เซ็นต์)	35.47±2.50[a]	36.40±2.08[a]	38.13 ±1.72[a]	36.73±1.10[a]
ปริมาณเม็ดเลือดแดง (10^6 cell/µl)	1.72±0.10[c]	1.87±0.16[c]	2.42±0.15[a]	2.13±0.06[b]
ปริมาณเม็ดเลือดขาว (10^4 cell/µl)	2.06±0.27[a]	2.09±0.19[a]	2.13±0.18[a]	2.06±0.47[a]

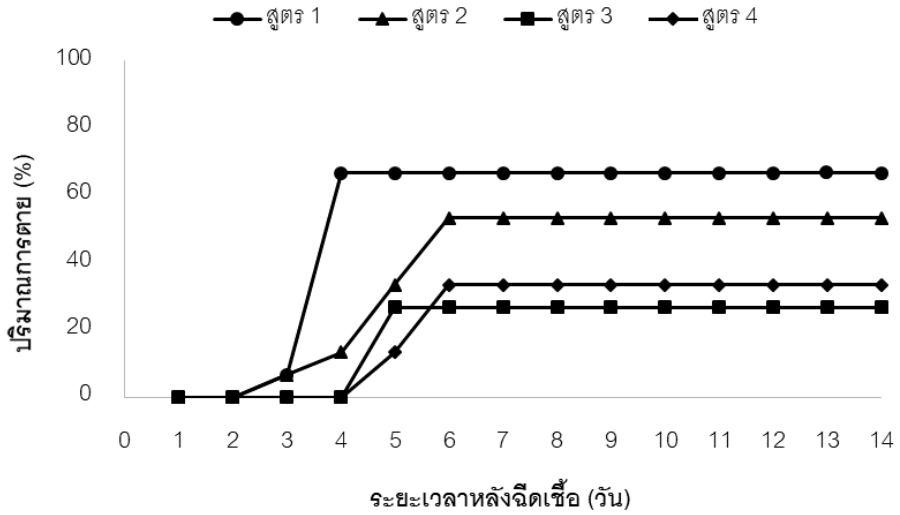
*ค่าที่ปรากฏคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)

ตัวอักษร (a,b และ c) ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05)

3. ทดสอบความต้านทานต่อโรคแบคทีเรีย *A. hydrophila*

การทดสอบความต้านทานต่อโรค *A. hydrophila* พบว่าอาหารสูตรที่เสริม *B. licheniformis* (สูตร 3 และ 4) มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้มากกว่าอาหารสูตรควบคุมและสูตรที่เสริมกากมะพร้าว แสดงดังภาพที่ 2 และไม่พบการตายของปลากลุ่มควบคุม อาจเป็นเพราะปลาที่ได้รับอาหารที่มี *B. licheniformis* เชื้อจะมีการเจริญเติบโตในลำไส้และสร้างสมดุลในลำไส้ปลา และส่งผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่ช่วยต้านทานต่อโรคทำให้การตายของปลาตะเพียนลดลง

หลังได้รับเชื้อ *A. hydrophila* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Raida, *et al*. (2003) มีการเสริมเชื้อ *B. icheniformis* ร่วมกับ *B. subtilis* ในอาหารเพื่อเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์ (Rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*) ทำให้ปลามีอัตราการรอดเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับเชื้อ *Yersinia ruckeri* และจากงานวิจัยของ Zhang *et al*. (2013) ศึกษาการเสริม *B. licheniformis* ระดับความเข้มข้น 10^7 CFU ต่อกรัม ในอาหารปลา triangular bream และการใช้ *B. licheniformis* (10^7 CFU ต่อกรัมอาหาร) ร่วมกับพรีไบโอติกกลุ่มฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharide) ที่ระดับ 0.3 % (w/w) ทำให้อัตราการรอดตายหลังได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า *B. licheniformis* ส่งผลต่อความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค



ภาพที่ 2 แสดงกราฟจำนวนการตายของตะเพียนขาวที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาการใช้กากมะพร้าว และ/หรือ *B. licheniformis* ร่วมกับกากมะพร้าวพบว่าอาหารสูตรที่ 4 ให้ผลการเจริญเติบโตและการต้านทานต่อโรค *A. hydrophila* ดีที่สุด ทั้งนี้การเสริม *B. licheniformis* ส่งผลต่อการต้านทานต่อโรค *A. hydrophila* ทำให้การตายของปลาตะเพียนขาวหลังได้รับเชื้อลดลง อย่างไรก็ตามควรมีการทดลองเพื่อหาปริมาณของกากมะพร้าวและระดับความเข้มข้นของเชื้อ *B. licheniformis* ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของปลาตะเพียนขาวในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยงานกองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมงที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ (*A. hydrophila*)

เอกสารอ้างอิง

Adeoye, A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D.L. & Davies, S.J. (2016). Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, *463,* 61-70.

Aderolu, A.Z. & Akinremi, O.A. (2009). Dietary effect of coconut oil and penut oil improving biochemical characteristics of *Clarias gariepinus* juvenile. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 9,* 105-110.

Alice, H., Lichtenstein, L.J., Appel, B., Micheal, S. & Camethon, M. (2006). Diet and life style recommendations revision. *Scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committe Circulation*, *114*, 82-96.

AOAC (Association of Official Chemists). (1990). Official Methods of Analysis. AOAC, Washington DC. pp 69-82.

Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M. & Farzanfar, A. (2008). Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8*, 43-48.

Conrado, S.D. (2003). Coconut oil: Atherogenic or not? What therefore causes Atherosclerosis?. *Journal of cardiology, 31*(3), 97-104.

Hassaan, M.S., Soltan, M.A. & Ghonemy, M.M.R. (2014). Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Egyptian Journal of Aquatic Research, 40*, 199-208.

Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M. & Davies, S.J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition, 16*, 496-503.

Nalinanon, W. & Lerdsuwam, S. (2018). Study on the effect of coconut (by-product) meal and *Acacia mangium* leaf in diets on growth and carcass quality of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Khon Kaen Agriculture Journal*, *46* (Supplement 1), 1026-1032.

Namputta, S. & Saipan, P. (2017). Resistance to antibiotics and heavy metals of *Aeromonas hydrophila* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *SNRU Journal of Science and Technology*, 624-632.

Nor, N., Abbasiliasi, S., Marikkar, M.N., Ariff, A., Amid, M., Lamasudin, D.U., Manap, M.Y.A. & Mustafa, S. (2017) Defatted coconut residue crude polysaccharides as potential prebiotics: study of their effects on proliferation and acidifying activity of probiotics in vitro. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(1), 164-173.

Obasi, N.A., Ukadilonu, J, Eze, E., Akubugwo, E.I. & Okorie, U.C. (2012). Proximate composition, extraction, characterization and comparative assessment of coconut (*Cocos nucifera*) and melon (*Colocynthis citrullus*) seeds and seed oils. *Pakistan Journal of Botany*, *15*(1), 1-9.

Poopathi, S. & Archana, B. (2012). Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis. Indian journal of experimental biology*, *50*(1), 65-71.

Raida, M.K. Raida, Larsen, J.L., Nielsen, M.E. & Buchmann, K. (2003). Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus 2B). *Journal of Fish Diseases, 26*, 495-498.

Rodjan, P., Buasang, K., Choopun, J. & Boonchana, P. (2017). The effect of increased levels of dried coconut meal supplemented with an enzyme cocktail® on diet utilization in growing pigs. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *39*(1), 101-108.

Sun, Y., Yang, H., Ma, R. & Lin, W. (2010). Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, *29*, 803-809.

Selvakumar, P. & Pandey, A. (1999). Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, *34*, 851–855.

Shena, Y., Wanga, D., Zhaoa, J. & Chen, X. (2018). Fish red blood cells express immune genes and responses. *Aquaculture and Fisheries*, *3*, 14-21.

Solangi, A.H. & Zafar Iqbal, M. (2011). Chemical composition of meat (kernel) and nut water of major coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars at coastal area of pakistan, *Pakistan Journal of Botany, 43*(1), 357-363.

Tesana S, Thabsripair P, Suwannatrai A, Haruay S, Piratae S, Khampoosa, P.,Thammasiri, C., Prasopdee, S., Kulsantiwong, J., Chalorkpunrut, P. & Jones, M.K. (2014). Parasite surveys and environmental management for prevention of parasitic infection in cultivated *Barbonymus gonionotus* (Cyprinidae) in fishponds, in an opisthorchiasis endemic area of northeast Thailand. *Aquaculture,* 428-429, 54-60.

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. & Nimrat, S. (2015). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research, 46*, 2443-51.

Zhang, C., Li, X., Xu, W., Jiang, G., Lu, K., Wang, L. & Liu, W. (2013). Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Fish and Shellfish Immunology, 35*, 1380-1386.