



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

เทคนิคการลดกลิ่นโคลนในปลาไหลด้วยปุ๋ยปัสัฒ

ฟางข้าวและจุลินทรีย์

โดย

นิวุฒิ หวังชัย และอุดมลักษณ์ สมพงษ์

สิงหาคม 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

เทคนิคการลดกลิ่นโคลนในปลาไหลด้วยปูนยิปซัม

ฟางข้าวและจุลินทรีย์

คณะผู้วิจัย

- รองศาสตราจารย์ ดร. นิรุติ หวังชัย
- ดร.อุดมลักษณ์ สมพงษ์

สังกัด

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่เล็งเห็นความสำคัญของงานวิจัยและให้การสนับสนุนสถานที่ที่ใช้ในการวิจัย ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำและห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือขั้นสูง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยพร้อมรับคำแนะนำถึงข้อบกพร่องในงานวิจัยนี้ เพื่อนำไปใช้ปรับปรุงงานวิจัยต่อไปในอนาคต

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

จากกระแสนิยมบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพทำให้ปัจจุบันความต้องการบริโภคปลาน้ำจืดมีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งตลาดในประเทศและตลาดส่งออกต่างประเทศ เนื่องจากเนื้อปลาเป็นอาหารโปรตีนที่ย่อยง่ายและประกอบด้วยคุณค่าทางอาหารที่ครบถ้วน ในจำนวนปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงในปัจจุบัน ปลานิลเป็นปลาที่นิยมของผู้เพาะเลี้ยงและกลายเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่ปัญหาที่เป็นอุปสรรคต่อการส่งเสริมความนิยมในการบริโภค และทำให้ราคาของปลานิลตกต่ำ คือ กลิ่นโคลนในเนื้อปลา ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการบริหารจัดการบ่อเลี้ยงไม่ดี โดยเฉพาะบ่อดินที่มีการเลี้ยงปลานิลแบบผสมผสานที่มักจะประสบปัญหาการเน่าเสียของน้ำที่ใช้เลี้ยงและเกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่พื้นบ่อปริมาณมาก ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและแบคทีเรียบริเวณพื้นบ่อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่ทำให้เกิดกลิ่นโคลนได้ จึงส่งผลให้มีการปล่อยกลิ่นไม่พึงประสงค์สู่แหล่งน้ำและเข้าไปสะสมในเนื้อปลา และส่งผลกระทบต่อ การส่งออกปลานิล เนื่องจากผู้บริโภคชาวต่างชาติไม่ยอมรับระบบการเลี้ยงและกลิ่นโคลนในเนื้อปลา เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการหาวิธีการลดกลิ่นโคลนในปลานิล เพื่อให้สามารถผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพ ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และส่งเสริมการส่งออกปลานิลให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัสดุราดาก (ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์) ในการลดความเข้มข้นของจืออสมินและเอ็มไอบีในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเปรียบเทียบผลของการใช้วัสดุราดาก (ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์) ต่อการเปลี่ยนแปลงของจืออสมินและเอ็มไอบีในน้ำและปลา ชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกลิ่น แอคติโนมัซีสในดิน และคุณภาพน้ำในบ่อปลานิล

การดำเนินการวิจัย

ทำการดำเนินงานวิจัย 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ปูนยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลนในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองย่อย คือ การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน การใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน และการใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ตรวจสอบปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีในน้ำทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form ตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำทางเคมีและทางชีวภาพในน้ำ ทำการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน) ตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลา (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลิ่นโคลน) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลิ่นโคลน) สำหรับการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล (โดยเลือกระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ในการทดลองที่ 1) โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ตรวจสอบปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบี ทั้งในน้ำและดิน เก็บตัวอย่างทุกๆ 15 วัน/ครั้ง และการตรวจสอบปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีในเนื้อปลา เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 เดือน/ครั้ง ทำการตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำทางเคมีและทางชีวภาพในบ่อเลี้ยงปลานิล ทุกๆ 15 วัน/ครั้ง ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายและองค์ประกอบของแพลงก์ตอนพืช เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ทุกๆ 15 วัน/ครั้ง โดยใช้ถุงกรองแพลงก์ตอน แล้วเก็บรักษาสภาพด้วย Lugol s' solution หลังจากนั้นนำมาจัดจำแนกชนิด ในส่วนของการแยกและจำแนกเชื้อแอคติโนมัซีส ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากดินพื้นบ่อมาแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัซีสบนอาหาร Starch-Casein agar สำหรับการตรวจสอบชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงปลาจะทำตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อจางลำดับ ส่วน และ spread ลงในอาหาร plate count agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะบางชนิด (ดำเนินการเฉพาะชุดการ

ทดลองที่เดิมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลีโคไลน) รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ โดยใช้เทคนิค DGGE และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์ (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เดิมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลีโคไลน) และทำการเก็บข้อมูล เพื่อสู่วัดความยาว และน้ำหนัก ในแต่ละชุดการทดลอง ทุกๆ 30 วัน/ครั้ง เพื่อทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต และเพื่อคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการรอด และผลผลิต

ผลการวิจัยและสรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้นิยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลีโคไลน

ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้นิยิปซัมเพื่อการลดกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี)

จากการทดลองการใช้นิยิปซัมที่ความเข้มข้น 0 (ควบคุม), 200, 400 และ 600 ppm ในการลดกลีโคไลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา พบว่า นิยิปซัมสามารถลดทั้งสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำได้ทั้งในรูป particulate form และ dissolved form โดยนิยิปซัมสามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในรูป particulate form ได้ เนื่องจากนิยิปซัมสามารถแตกตัวได้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และไปรวมตัวกับฟอสเฟตซึ่งเป็นประจุลบ ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนที่มีน้ำหนักที่เรียกว่าฟล็อกหรือเป็นตะกอนเล็กๆ จมลงข้างล่าง ทำให้กลีโคไลนที่อยู่ในเซลล์ฟอสเฟตลดน้อยลงไปด้วย อีกทั้งนิยิปซายังช่วยลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตในน้ำ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) กับออร์โธฟอสเฟต (PO_4^{3-}) กลายเป็นแคลเซียมฟอสเฟต ส่งผลให้ฟอสเฟตไม่สามารถนำออร์โธฟอสเฟตไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทำให้ฟอสเฟตในน้ำในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตกลีโคไลนได้น้อยลงด้วย และเมื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดกลีโคไลนพบว่านิยิปซัมทุกความเข้มข้นสามารถลดกลีโคไลนได้ดีในวันที่ 6 ของการทดลอง และประสิทธิภาพของนิยิปซัมในการลดกลีโคไลนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ปรากฏว่านิยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 400 และ 600 ppm เมื่อนำมาคำนวณแต่ละความเข้มข้นให้ความเข้มข้นของนิยิปซัม 1 ppm พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดสารประกอบจีโอสมิน 3.30 ± 0.63 , 2.98 ± 1.11 และ 2.37 ± 1.02 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการลดสารประกอบเอ็มไอบี 5.71 ± 2.63 , 5.42 ± 2.64 และ 3.35 ± 1.30 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งนิยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm มีประสิทธิภาพในการลดกลีโคไลนได้ดีที่สุดและสามารถลดสารประกอบเอ็มไอบีได้มากกว่าจีโอสมิน ซึ่งเกิดจากนิยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถละลายและแตกตัวได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงเลือกนิยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm ไปใช้ในการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี)

สำหรับฟางข้าวที่แช่น้ำเป็นเวลา 15 วัน สามารถคำนวณความเข้มข้นของแทนนินได้จากสมการ $Y = 5.4309x$ ที่ $R^2 = 0.9956$ และเมื่อทดลองนำสกัดจากฟางข้าวโดยแบ่งตามความเข้มข้นของแทนนินเป็น 0 (ชุดควบคุม) 50, และ 100 ppm และทดลองควบคู่ไปกับสารละลายมาตรฐานแทนนินในความเข้มข้นเดียวกัน เพื่อลดกลีโคไลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา พบว่าน้ำสกัดจากฟางข้าวไม่สามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานแทนนินก็ไม่สามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาในห้องปฏิบัติการได้ แต่อย่างไรก็ตามแทนนินมีผลต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม เพราะชุดการทดลองที่เดิมแทนนินมีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมน้อยกว่าชุดควบคุม และเมื่อศึกษาเพิ่มเติมความเข้มข้นของแทนนินจากน้ำฟางข้าวกับสารละลายมาตรฐานแทนนินในการลดแอมโมเนีย ปรากฏว่าแทนนินสามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ เมื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของระดับแทนนิน (1 mg/l) ในอัตราการลดแอมโมเนียภายใน 6 ชั่วโมง ปรากฏว่าแทนนินจากน้ำฟางข้าวมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ดีมากเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานของแทนนิน และน้ำสกัดจากฟางข้าวที่ความเข้มข้น 5 ppm มีประสิทธิภาพลดแอมโมเนียสูงที่สุด คือ แทนนิน 1

มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดแอมโมเนียได้ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นน้ำสกัดจากฟางข้าวสามารถนำไปลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้แต่ในการนำแทนนินไปใช้ในการลดแอมโมเนียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรคำนึงถึงค่า pH ไม่ควรใช้แทนนินในความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจส่งผลให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้สัตว์น้ำเป็นอันตรายได้ ซึ่งจากการใช้น้ำสกัดจากฟางข้าวที่ความเข้มข้น 5 ppm ทำให้ค่า pH ลดลง จาก 7.02 เหลือ 6.43 ภายในเวลา 10 นาที ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงเลือกน้ำสกัดจากฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm เพื่อไม่ให้ค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปลานิลในบ่อเลี้ยงปลาได้

ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

การศึกษาการกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล และแหล่งบำบัดน้ำเสีย ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายกลิ่นโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 20 ไอโซเลท ทำการคัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด 5 ไอโซเลท คือ KY3 (*Delftia tsuruhatensis*), LS6 (*Acinetobacter calcoaceticus*), TS1 (*Achromobacter denitrificans*), PS1 (*Comamonas* sp.) และ LS4 (*Raoultella ornithinolytica*) ซึ่งตรวจสอบแล้วไม่ก่อให้เกิดโรคในปลานิล การทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการกำจัดจีโอสมินและเอมไอบีได้สูงถึง 82.87 และ 85.33 % ภายในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ที่มีปริมาณเชื้อ 2, 5 และ 10 เพอร์เซ็นต์ (10^5 - 10^6 , 10^6 - 10^7 และ 10^7 CFU/ml ตามลำดับ) พบว่าเชื้อ *Achromobacter denitrificans* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ที่สูงสุด และปริมาณในการใช้ที่ 5 เพอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล ปริมาณเชื้อ 5 เพอร์เซ็นต์ พบว่าทุกเชื้อมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดกลิ่นโคลนได้ประมาณ 40 เพอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง และลดได้มากขึ้นถึง 84 เพอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันได้ทดลองทำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้กำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ได้ดีคือผลิตภัณฑ์แบบน้ำ

การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล (โดยเลือกระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ในการทดลองที่ 1)

สำหรับการทดลองนี้ทำการทดลองในบ่อปลา 12 บ่อ โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม ยิปซัม ความเข้มข้น 200 ppm น้ำฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm (คำนึงถึง pH) และจุลินทรีย์ความเข้มข้น 0.1 เพอร์เซ็นต์ หรือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^4 - 10^5 CFU/ml

การเจริญเติบโตของปลานิล

น้ำหนักปลาสุดท้าย (Final weight) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain, ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR) ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion efficiency, FCE) อัตราการรอด (%) และผลผลิตปลาทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีน้ำหนักปลาสุดท้าย น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น และ ADG สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ รองลงมาคือ น้ำฟางข้าว 1 ppm ชุดควบคุม (ไม่เติม) และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ซึ่งมีน้ำหนักปลาสุดท้าย 413.3, 385.3, 374.0 และ 347.0 กรัมต่อตัว มีน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น 298.3, 270.0, 259.3 และ 232.0 กรัมต่อตัว และมี ADG 2.49, 2.25, 2.16 และ 1.93 กรัมต่อวัน ตามลำดับ สำหรับอัตราการรอดพบว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีอัตราการรอดสูงสุด คือ 90.40 เพอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ และชุดควบคุมมีค่า 84.53, 74.40 และ 71.20 เพอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ถึงแม้ว่าน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่เติมยิปซัมมีค่ามากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว แต่ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวมีอัตราการรอดที่ดีกว่า ทำให้ผลผลิตปลาทั้งหมดในแต่ละบ่อของชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวไม่มีความแตกต่างกัน แต่ถึงอย่างไรทั้งสองชุดการทดลองก็มีผลผลิตปลาที่สูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ อีกทั้งชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ต่ำกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCE) สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 87.02 และ 86.58 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 66.37 และ 64.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ปริมาณกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในบ่อปลาหิล

ปริมาณกลีโคไลนในน้ำ

ปริมาณกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.104 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยปริมาณจีโอสมินมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.034 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในรูป Particulate form มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.034 ไมโครกรัมต่อลิตร และอยู่ในรูป Dissolved form มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.003 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอ็มไอบีมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.071 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในรูป Particulate form ทั้งหมด โดยส่วนใหญ่กลีโคไลนในน้ำที่เกิดในบ่อเลี้ยงปลาหิลจะอยู่ในรูปของ Particulate form ซึ่งอยู่ในเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช ในการทดลองครั้งนี้ตรวจเจอกลีโคไลนในน้ำเมื่อปลาหิลมีอายุการเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ โดยชุดควบคุมมีปริมาณกลีโคไลนสูงที่สุดคือ 0.104 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีทั้งปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบี รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมยิปซัม และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์คือ 0.029 และ 0.020 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีเพียงปริมาณจีโอสมินอย่างเดียว อย่างไรก็ตามในชุดควบคุมและชุดที่เติมยิปซัม ปริมาณ cyanobacteria ที่พบมีค่าต่ำ แต่ก็ยังมีการสะสมจีโอสมินในตัวอย่างน้ำ ซึ่งจีโอสมินที่พบน่าจะสร้างมาจากแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes มากกว่า ในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 ชุดที่เติมจุลินทรีย์พบปริมาณ cyanobacteria มีค่าต่ำ แต่ก็ยังตรวจพบจีโอสมินในน้ำตัวอย่าง ผลที่ได้อาจจะมาจากการสร้างกลีโคไลนโดย Actinomycetes เช่นเดียวกัน สำหรับชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวไม่มีปริมาณกลีโคไลนในน้ำเกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงปลาหิล แม้ว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวม และ cyanobacteria ที่พบมีค่าสูง แต่ก็ตรวจไม่พบกลีโคไลนในน้ำตัวอย่างเลย ผลที่ได้อาจเกิดจากสารออกฤทธิ์กลุ่มแทนนินหรือกรดแทนนิกที่อยู่ในน้ำสกัดจากฟางข้าว มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยจากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าสารแทนนินหรือกรดแทนนิกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบางชนิด รวมทั้ง cyanobacteria ที่ตรวจพบในครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Chroococcales ซึ่งจากรายงานเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างกลีโคไลน โดย cyanobacteria ที่สำคัญที่สามารถผลิตกลีโคไลนประกอบด้วย สกุล *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Symploca* sp., *Microcystis* sp., *Phormidium* sp. ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) (Tabachek and Yurkowski 1976; Lovell and Broce, 1985) ดังนั้นจึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ตรวจไม่พบกลีโคไลนในน้ำตัวอย่างชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว

ปริมาณกลีโคไลนและแอคติโนมัยซิสในดินตะกอน

ปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบีในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลาหิลมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.384 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีเพียงปริมาณจีโอสมินเท่านั้น และมีปริมาณกลีโคไลนสูงที่สุดในชุดควบคุมเมื่อปลาหิลมีอายุการเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ ในการทดลองครั้งนี้ตรวจพบกลีโคไลนในดินตะกอนเมื่อปลาหิลมีอายุการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ ซึ่งมีเฉพาะชุดควบคุม แต่เมื่อมีอายุการเลี้ยง 8 และ 10 สัปดาห์มีปริมาณจีโอสมินทุกชุดการทดลอง

สำหรับแอคติโนมัยซิสในดินตะกอนมีปริมาณอยู่ระหว่าง $0.72 - 7.90 \times 10^4$ CFU ต่อกรัม และค่าเฉลี่ยของแอคติโนมัยซิสในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm

และชุดการทดลองที่เดิมจุลินทรีย์ คือ 3.16 ± 1.50 , 2.94 ± 2.29 , 3.31 ± 2.09 และ $2.22 \pm 1.09 \times 10^4$ CFU ต่อกรัม ตามลำดับ

แต่ถึงอย่างไรก็ตามเมื่อไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Gutierrez *et al.* (2013) พบว่าการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณกลีโคไลนทั้งในน้ำและดินตะกอนน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากช่วงที่ทดลองนั้นอยู่ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนสิงหาคม 2557 โดยเดือนที่สามและสี่ของการเลี้ยงปลาเป็นช่วงฤดูฝน ทำให้มีปริมาณแสงแดดน้อยและส่วนใหญ่ฝนตกส่งผลให้ปริมาณ cyanobacteria ในน้ำมีน้อย เพราะสาหร่ายเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่อุณหภูมิสูง อีกทั้งก่อนการทดลองมีการตากบ่อและใส่ปูนขาวในขั้นตอนการเตรียมบ่อ ทำให้จุลินทรีย์ในดินตายไปบางส่วน ดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณกลีโคไลนทั้งในน้ำและดินตะกอนน้อยกว่าการทดลองอื่น แต่ถ้ามีการเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงปลานานไปอีกประมาณ 6 – 8 เดือน มีการสะสมของสารอาหารทั้งในน้ำและดินมากขึ้น ซึ่งจะทำให้การสะสมของปริมาณกลีโคไลนมากกว่านี้ อาจจะทำให้การทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จมากขึ้น

ปริมาณกลีโคไลนในเนื้อมีปลา

สำหรับเนื้อมีปลาในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบกลีโคไลนทั้งวิธีการทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนและวิธีการวิเคราะห์แบบ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS พบว่าไม่มีปริมาณกลีโคไลน (จีเอสเอ็มและเอ็มไอพี) ในเนื้อมีปลา เนื่องจากปริมาณกลีโคไลนในน้ำมีปริมาณน้อยมาก และส่วนใหญ่อยู่ในรูป Particulate form ซึ่งจะไปสะสมในตัวปลาได้ต้องเกิดจากปลาเลือกกินแพลงก์ตอนพืชเข้าไป อีกทั้งในการทดลองนี้มีการให้อาหารปลาอย่างเต็มที่ ทำให้ปลาเลือกกินอาหารมากกว่าที่จะกินแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนพืชที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) และสาหร่ายกลุ่มยูกลีโนไฟต์ (Division Euglenophyta) ส่วนสาหร่ายที่สร้างกลีโคไลนในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ cyanobacteria (Division Cyanophyta) มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ จึงน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ไม่พบกลีโคไลนในเนื้อมีปลา

ชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อมีปลา

แพลงก์ตอนพืชที่พบในบ่อเลี้ยงปลา จำนวน 4 ชุดการทดลอง พบชนิดแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด 104 สปีชีส์ จัดอยู่ใน 7 ดิวิชัน ได้แก่ Division Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Euglenophyta, Pyrrophyta, Cryptophyta และ Chrysophyta ตามลำดับ โดยมีจำนวนสปีชีส์ที่พบในแต่ละดิวิชัน คือ 50, 21, 10, 17, 3, 2 และ 1 สปีชีส์ ตามลำดับ ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชที่พบในแต่ละชุดการทดลอง ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนสิงหาคม 2557 มีความแตกต่างกันทั้งจำนวนชนิดและปริมาตรชีวภาพที่พบ โดยปริมาณแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละสัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง ปริมาณแพลงก์ตอนพืชในชุดควบคุม ชุดที่เติมน้ำฟางข้าว และจุลินทรีย์มีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 2 เดือนแรก หลังจากนั้นพบว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อที่เติมน้ำฟางข้าวมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น รองลงมาคือชุดควบคุม จุลินทรีย์ และยิปซัมตามลำดับ

ปริมาตรชีวภาพ (biovolume) ของแพลงก์ตอนพืชมีค่าสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่วิเคราะห์ได้ ($y = 212.73x - 12.45$, $r = 0.88$) โดยแพลงก์ตอนพืชที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) และสาหร่ายกลุ่มยูกลีโนไฟต์ (Division Euglenophyta) ส่วนสาหร่ายที่สร้างกลีโคไลนในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ cyanobacteria (Division Cyanophyta) มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ Cyanobacteria ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Chroococcales ซึ่งจากการรายงานเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างกลีโคไลน

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปลา

แอมโมเนียเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะมีความเป็นพิษกับสัตว์น้ำโดยตรง สำหรับความเข้มข้นแอมโมเนียในการทดลองครั้งนี้ พบว่าแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 0.10 - 1.53

มิลลิกรัม ในโตรเจนต่อลิตร และมีค่าเฉลี่ย 0.52 ± 0.38 มิลลิกรัม ในโตรเจนต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น และเมื่อทำการเก็บน้ำตัวอย่างก่อนและหลังการเติมเพื่อดูประสิทธิภาพการลดแอมโมเนีย พบว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียดีกว่าชุดการทดลองอื่น โดยสามารถลดความเข้มข้นแอมโมเนียได้ 7.8 – 32.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแทนนินจากน้ำสกัดจากฟางข้าวก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการลดแอมโมเนียและลด pH ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียและ pH ในบ่อเลี้ยงปลานับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นภายในบ่อเลี้ยงปลา

สรุปโดยภาพรวมของการทดลองที่ 2 พบว่า ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลานิล เนื่องจากมีผลผลิตปลาและอัตราการรอดสูง ไม่มีปริมาณกลิ่นโคลนในน้ำ และมีปริมาณกลิ่นโคลนในดินน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น อีกทั้งยังช่วยลดแอมโมเนียในน้ำ นอกจากนี้แล้ว ฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาถูก และสะดวกในการทำงาน รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีผลผลิตปลาและอัตราการรอดไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว แต่มีปริมาณกลิ่นโคลนในน้ำและดินมากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว ถึงแม้ว่ายิปซัมความเข้มข้น 200 ppm จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการลดกลิ่นโคลนในห้องปฏิบัติการ แต่สำหรับใช้ในบ่อดินเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไป เนื่องจากการตกตะกอนและสะสมสารอินทรีย์บริเวณพื้นบ่อปลามากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว จึงทำให้มีปริมาณกลิ่นโคลนทั้งในน้ำและดิน แต่ก็ยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ได้ โดยการลดความเข้มข้นของยิปซัมให้น้อยลง

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล โดยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือก 2 ชนิด (*Achromobacter denitrificans* และ *Delftia tsuruhatensis*) จากการลดจืออสมินและเอ็มไอบีได้มากที่สุดในการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองในบ่อเพาะเลี้ยงปลานิล ตรวจพบจืออสมินในบ่อที่เติมจุลินทรีย์ลงไปเพียง 1 บ่อเท่านั้น อีก 2 บ่อ ตรวจไม่พบจืออสมินและเอ็มไอบีตลอดช่วงการทดลอง ส่วนในตะกอนดินก็พบปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีน้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ที่เติมลงไปมีส่วนลดกลิ่นโคลนบริเวณกันบ่อได้ดี จากผลการวิเคราะห์ปริมาณชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชพบว่ามีความสอดคล้องกับการปรากฏของจืออสมินภายในบ่อ โดยบ่อที่มีแพลงก์ตอนพืชสูง สามารถตรวจพบจืออสมินในน้ำตัวอย่างได้ จากค่าที่ได้อาจสรุปได้ว่า จืออสมินที่พบน่าจะสร้างมาจากแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes ได้เช่นเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำตัวอย่าง โดยเทคนิค DGGE พบว่า ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในน้ำตัวอย่าง พบแต่จุลินทรีย์ในธรรมชาติ กลุ่ม Uncultured bacteria ผลที่ได้อาจเนื่องมาจากการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ก่อนการเติมจุลินทรีย์ในแต่ละครั้ง ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด อาจจะไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะธรรมชาติ เมื่อผ่านไปเป็นระยะเวลานาน อีกทั้งเชื้อที่เติมลงไป ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแพลงก์ตอนพืชได้ จึงยังส่งผลให้ปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวมภายในบ่อมีค่าสูง

อัตราการรอดของปลานิลภายในบ่อที่เติมจุลินทรีย์เจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มอื่นๆ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของค่า pH โดยจุลินทรีย์แบบน้ำที่เติมลงไปมีค่า pH ก่อนข้างต่ำ (4-5) ทำให้ปลาต้องปรับตัวบ่อยครั้ง (เติมเชื้อทุกๆ 2 สัปดาห์) และอาจส่งผลถึงการแย่งออกซิเจนที่ใช้หายใจในน้ำอีกด้วย อีกทั้งปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำในบ่อมีค่าต่ำกว่าบ่ออื่นๆ ในช่วงเดือนแรก (เฉลี่ย 1.76 mg/l) และช่วงเดือนสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง (เฉลี่ย 2.6 mg/l) ปริมาณออกซิเจนมีค่าต่ำมาก ซึ่งไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ จึงส่งผลให้อัตราการรอดของปลานิลในชุดที่เติมจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ จึงควรเติมออกซิเจนลงในบ่อมากขึ้น เพื่อลดอัตราการตายของปลา

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1. สำหรับการทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลมีระยะเวลาในการทดลอง 4 เดือน ทำให้ไม่มีการสะสมกลิ่นโคลนในเนื้อปลา ดังนั้นในกรณีการทดลองแบบนี้ควรขยายเวลาการทดลองเป็นเวลา 6-8 เดือน เพื่อจะได้ผลการทดลองที่ชัดเจนกว่านี้
2. ยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm เหมาะสมในการลดกลิ่นโคลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลานิลในห้องปฏิบัติการในระยะเวลาสั้นๆ แต่สำหรับการประยุกต์ใช้ในบ่อดินในการเลี้ยงปลานิล ซึ่งมีระยะเวลาในการเลี้ยง 4-8 เดือน ควรจะลดความเข้มข้นของยิปซัมให้น้อยลง เพื่อป้องกันการสะสมของสารอินทรีย์และลดการเน่าเสียบริเวณพื้นบ่อ หรือนำยิปซัมมาใช้ในช่วง 2 เดือนหลังก่อนจับ ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนมากขึ้น เนื่องจากช่วงระยะแรกของการเลี้ยงยังมีสารอาหารและแพลงก์ตอนพืชในน้ำน้อย
3. สำหรับจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนในช่วงระยะเวลาสั้น เนื่องจากไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะธรรมชาติ เมื่อผ่านไปเป็นเวลานาน ดังนั้นควรเติมจุลินทรีย์ในบ่อในช่วง 1 เดือนหลังก่อนจับ

บทคัดย่อ

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยโดยที่ได้รับความนิยมบริโภคสูงทั้งในประเทศและมีศักยภาพเพื่อการส่งออกในอนาคต แต่ปัญหาที่เป็นอุปสรรคต่อการยอมรับในการบริโภค และทำให้ราคาของปลานิลตกต่ำ คือ กลิ่นโคลนในเนื้อปลา ในการการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นหาวิธีการลดกลิ่นโคลนในระบบการเลี้ยงโดยใช้วัสดุราคาถูก (ยิปซัม น้ำสกัดจากฟางข้าว) และจุลินทรีย์ในการลดสารที่ก่อให้เกิดกลิ่นโคลน (สารจีโอสมินและเอ็มไอบี) ยิปซัมได้จากการกากเหลือจากโรงไฟฟ้าแม่เมาะ และฟางข้าวได้จากนาในจังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (การทดลองที่ 1) และเปรียบเทียบผลของการใช้ยิปซัม น้ำสกัดจากฟางข้าวและจุลินทรีย์ต่อการเปลี่ยนแปลงของจีโอสมินและเอ็มไอบีในบ่อเลี้ยงปลานิล รวมทั้งชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกลิ่นและแอคติโนมัยซีส์ในดิน (การทดลองที่ 2)

ผลการศึกษาการทดลองที่ 1 พบว่ายิปซัม สามารถลดทั้งสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาได้ทั้งในรูป particulate และ dissolved form ที่ความเข้มข้นของยิปซัม 200 ppm มีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนได้ดีที่สุด สำหรับน้ำสกัดจากฟางข้าวไม่สามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาในห้องปฏิบัติการได้ แต่สามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ สำหรับผลของจุลินทรีย์ในการลดกลิ่นโคลนพบว่าเชื้อ *Achromobacter denitrificans* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นโคลนได้ดีที่สุด และปริมาณในการใช้ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุด และจากการทดลองทำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้กำจัดโคลนในน้ำ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ได้ดีคือผลิตภัณฑ์แบบน้ำ

สำหรับการทดลองที่ 2 ทำการทดลองในบ่อดิน พบว่า การใช้ยิปซัม ที่ 200 ppm และน้ำฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm ไม่มีผลต่อผลผลิตปลาและอัตราการรอด ($p>0.05$) และทั้งสองชุดการทดลองมีผลผลิตปลาและอัตราการรอดดีกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามบ่อที่เติมน้ำสกัดฟางข้าวพบการสะสมของกลิ่นโคลนน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น กลิ่นโคลนในเนื้อปลาดูไม่พบในทุกชุดการทดลอง แพลงก์ตอนพืชที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) และสาหร่ายกลุ่มยูกลีโนอยด์ (Division Euglenophyta) ส่วนสาหร่ายกลุ่ม cyanobacteria ที่ตรวจพบในครั้งนี้เป็นส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Chroococcales ซึ่งจากการรายงานเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างกลิ่นโคลน

ผลจากการวิจัยครั้งนี้เกษตรกรสามารถนำความรู้ไปปรับใช้ โดยใช้ยิปซัมและจุลินทรีย์ลดกลิ่นในช่วงก่อนจับขาย และใช้น้ำสกัดฟางข้าวในขณะเลี้ยงเพื่อลดสารพิษแอมโมเนีย ส่วนที่จะศึกษาต่อไปคือการศึกษาค้นคว้าผลของสารสกัดจากใบพืชเพื่อลดแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม

คำสำคัญ: กลิ่นโคลน, จีโอสมิน, เอ็มไอบี, ปลานิล, ยิปซัม, ฟางข้าว, จุลินทรีย์

Abstract

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) has been expanded rapidly, intensified and economically important commercial fish. However, earthy-musty off-flavors (geosmin and 2-methylisoborneol, MIB) containing in fish is the most serious problem of earthen pond-raised tilapia. The purpose of this research was to evaluate the effectiveness of low cost materials (gypsum, rice straw extract) and some microorganisms on reducing of both geosmin and MIB levels in laboratory scale (experiment 1) and in fish ponds (experiment 2). Phytoplankton and actinomycetes bacteria which responded for these undesirably odorous compounds were investigated. Gypsum powder was obtained from Maemoh Electricity Generating Authority of Thailand and rice straw was collected from paddy field.

The results in laboratory scale showed that gypsum could reduce in geosmin and MIB in water ponds through both particulate and dissolved form. In contrast, rice straw extract could not reduce geosmin and MIB in ponds water. However, it could reduce total ammonia concentration effectively. We also found the 5% *Achromobacter denitrificans* could degrade off-flavor compounds showed effectively. Bacterium in liquid product form performed better effect comparing with others production forms.

Result of second experiment revealed using gypsum (200 ppm) and rice straw extract (1 ppm) had no adverse effect for fish through culture period. It was found that off-flavors level was lower in ponds treated with rice straw extract than other treatments. According to our findings, we suggested that gypsum and microorganisms could be used for off flavor mitigation before harvest while rice straw extract could apply for toxic ammonia control. Further study will be focus on using plants extract for reducing ammonia in both fresh water and sea water aquaculture.

Keywords: Off-Flavor, Geosmin, MIB, Gypsum, Rice Straw, Microorganism

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของงานวิจัย	2
ทฤษฎี สมมติฐาน กรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	4
กลิ่นไม่พึงประสงค์หรือกลิ่นโคลน (Off-flavor)	4
การใช้ยิปซัมในการเลี้ยงปลา	6
การเลี้ยงปลาด้วยฟางข้าว	7
การกำจัดกลิ่นโคลนด้วยจุลินทรีย์	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	9
การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ปูนยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	9
ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน	9
ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน	9
ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	11
การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล	13
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ปูนยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	19
ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน	19
ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน	23
การใช้ยิปซัมและน้ำฟางข้าวในการลดความเข้มข้น total nitrogen (TN) และ total phosphate (TP)	29
ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	32
การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล	60
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	83
การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ปูนยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	83
ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน	83
ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน	83
ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	84
การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล	84
เอกสารอ้างอิง	89
ภาคผนวก ก	94
ภาคผนวก ข	98

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 3-1	ยิปซัมที่นำมาใช้ในการทดลอง
ภาพ 3-2	การเตรียมยิปซัมสำหรับการทดลอง
ภาพ 3-3	การทดลองการใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน
ภาพ 3-4	ความเข้มข้นของแทนนินในระดับฟางข้าวที่ต่างกัน
ภาพ 3-5	ความสัมพันธ์ของระดับฟางข้าวกับความเข้มข้นของแทนนินที่เวลา 15 วัน
ภาพ 3-6	การเตรียมฟางข้าวสำหรับการทดลอง
ภาพ 3-7	การทดลองการใช้แทนนินจากฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน
ภาพ 3-8	สารเคมีและอุปกรณ์การวิเคราะห์ total nitrogen และ total phosphorus
ภาพ 3-9	บ่อเลี้ยงปลาที่ใช้ในการทดลอง
ภาพ 3-10	การวิเคราะห์ จีออสมิน และ เอ็มไอบี ในน้ำและดิน โดยใช้ SPME ร่วมกับ GC/MS
ภาพ 3-11	การวิเคราะห์ จีออสมิน และ เอ็มไอบี ในเนื้อปลา โดยใช้ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS
ภาพ 3-12	Mass spectrum ของสารจีออสมิน (trans-1, 10-Dimethyl-trans-9-decalinol)
ภาพ 3-13	Mass spectrum ของสารเอ็มไอบี (2-methylisoborneol)
ภาพ 4-1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยิปซัมกับความกระด้างทั้งหมด
ภาพ 4-2	ปริมาณจีออสมิน (µg/L) ในวันที่ 3 6 และ 9 ของการทดลอง
ภาพ 4-3	ปริมาณเอ็มไอบี (µg/L) ในวันที่ 3 6 และ 9 ของการทดลอง
ภาพ 4-4	ความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตที่ละลายน้ำ (mg-P/I)
ภาพ 4-5	เปอร์เซ็นต์การลดออร์โธฟอสเฟต
ภาพ 4-6	ปริมาณจีออสมิน (µg/L) ในวันที่ 0 3 6 และ 9 ของการทดลอง
ภาพ 4-7	ปริมาณเอ็มไอบี (µg/L) ในวันที่ 0 3 6 และ 9 ของการทดลอง
ภาพ 4-8	ความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตที่ละลายน้ำ (mg-P/I)
ภาพ 4-9	ความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมในน้ำทดลอง (mg-N/L)
ภาพ 4-10	การลดแอมโมเนียด้วยสารละลายมาตรฐานแทนนิน (tannic acid) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน
ภาพ 4-11	การลดแอมโมเนียด้วยแทนนินจากน้ำฟางข้าวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน
ภาพ 4-12	ค่า pH ในการใช้สารละลายมาตรฐานแทนนิน (tannic acid) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน
ภาพ 4-13	ค่า pH ในการใช้แทนนินจากน้ำฟางข้าวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน
ภาพ 4-14	อัตราการลดแอมโมเนียในระดับแทนนินที่ต่างกันภายใน 6 ชั่วโมง
ภาพ 4-15	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (µg/L) ในน้ำทดลอง
ภาพ 4-16	เปอร์เซ็นต์การลด total nitrogen
ภาพ 4-17	เปอร์เซ็นต์การลด total phosphate
ภาพ 4-18	อัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร yeast extract
ภาพ 4-19	อัตราการรอดตายสะสมเฉลี่ยของลูกปลานิล ที่ทดสอบการก่อโรคในตัวปลา ตั้งแต่เริ่มฉีดเชื้อจนถึงวันที่ 10
ภาพ 4-20	อัตราการเจริญของเชื้อ <i>Achromobacter denitrificans</i> ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว
ภาพ 4-21	อัตราการเจริญของเชื้อ <i>Delftia tsuruhatensis</i> ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว
ภาพ 4-22	อัตราการเจริญของเชื้อ <i>Comamonas</i> sp. ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพ 4-23 อัตราการเจริญของเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว	49
ภาพ 4-24 อัตราการเจริญของเชื้อ <i>Raoultella ornithinolytica</i> ในน้ำเลี้ยงปลา ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	49
ภาพ 4-25 เจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ในแต่ละชุดการทดลองที่เติม <i>Raoultella ornithinolytica</i> , <i>Comamonas</i> sp., <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Achromobacter denitrificans</i> หรือ <i>Delftia tsuruhatensis</i> ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล	53
ภาพ 4-26 ผล DGGE แสดงตำแหน่งแถบ DNA ประชากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำเพาะเลี้ยงปลานิล โดยใช้เชื้อ <i>Comamonas</i> sp.	54
ภาพ 4-27 ผล DGGE ของเชื้อ <i>Achromobacter denitrificans</i>	55
ภาพ 4-28 ผล DGGE ของเชื้อ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	56
ภาพ 4-29 ผล DGGE ของเชื้อ <i>Comamonas</i> sp.	57
ภาพ 4-30 ผล DGGE ของเชื้อ <i>Delftia tsuruhatensis</i>	58
ภาพ 4-31 ปริมาณเชื้อในอาหารน้ำตาลอ้อยผสมแร่และกากถั่วเหลือง ที่มีความหวาน 5 brix และ 10 brix	59
ภาพ 4-32 ปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์แบบผง ในวันที่ 0 – 180 วัน	60
ภาพ 4-33 ปริมาณกลิ่นโคลน (จืออสมินและเอ็มไอบี) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล	62
ภาพ 4-34 ปริมาณจืออสมินในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form	63
ภาพ 4-35 ปริมาณเอ็มไอบีในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form	63
ภาพ 4-36 ปริมาณกลิ่นโคลน (จืออสมินและเอ็มไอบี) ในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิล	64
ภาพ 4-37 ปริมาณแอกติโนมัยซิสในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิล	65
ภาพ 4-38 ปริมาณกลิ่นโคลนในเนื้อปลาที่ใช้วิธีวิเคราะห์ต่างกัน	66
ภาพ 4-39 แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้บริโภคปลานิล	67
ภาพ 4-40 ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชและ Cyanobacteria ที่พบทั้งหมดในแต่ละชุดการทดลอง (ไมโครลิตร/ลิตร)	68
ภาพ 4-41 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	75
ภาพ 4-42 ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช (ไมโครลิตร/ลิตร) กับปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)	76
ภาพ 4-43 ค่า pH ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	76
ภาพ 4-44 ค่าอัลคาไลน์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	77
ภาพ 4-45 อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	77
ภาพ 4-46 ออกซิเจนที่ละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	78
ภาพ 4-47 ค่าความกระด้างทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	78
ภาพ 4-48 ค่าความขุ่น (NTU) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	79
ภาพ 4-49 สารแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	79
ภาพ 4-50 ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพ 4-51	เปอร์เซ็นต์การลดความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำบ่อเลี้ยงปลาของแต่ละชุดการทดลอง (เก็บน้ำตัวอย่างก่อนและหลังเติม)
ภาพ 4-52	ความเข้มข้นไนโตรท์ (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลาของแต่ละชุดการทดลอง
ภาพ 4-53	ความเข้มข้นไนเตรท (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลาของแต่ละชุดการทดลอง
ภาพ 4-54	ความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟต (มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลาของแต่ละชุดการทดลอง

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 3-1	ความเข้มข้นของแทนนินที่หมักจากฟางข้าวเป็นเวลา 15 วัน
ตาราง 4-1	เปอร์เซ็นต์การลดกลีโคเจน (จีออสมินและเอ็มไอบี) ด้วยยิปซัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละวัน (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตาราง 4-2	ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดกลีโคเจน (จีออสมินและเอ็มไอบี) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตาราง 4-3	ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดคลอโรฟิลล์เอ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตาราง 4-4	ค่าเฉลี่ยและต่ำสุด-สูงสุดของคุณภาพน้ำในความเข้มข้นยิปซัมที่ต่างกัน
ตาราง 4-5	คุณภาพน้ำในการทดลอง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตาราง 4-6	ประสิทธิภาพของระดับแทนนินในอัตราการลดแอมโมเนียภายใน 6 ชั่วโมง
ตาราง 4-7	ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง
ตาราง 4-8	ผลทดสอบเชื้อกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัส
ตาราง 4-9	ประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง
ตาราง 4-10	ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง
ตาราง 4-11	ประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมินในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่มีการฆ่าเชื้อ
ตาราง 4-12	ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่มีการฆ่าเชื้อ
ตาราง 4-13	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายจีออสมินในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล
ตาราง 4-14	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็มไอบี ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล
ตาราง 4-15	น้ำหนักปลาเริ่มต้น (Initial weight) น้ำหนักปลาสุดท้าย (Final weight) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain) และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain, ADG) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตาราง 4-16	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR) ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion efficiency, FCE) อัตราการรอด (%) และผลผลิตปลา (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ตาราง 4-17	ค่าเฉลี่ยและต่ำสุด-สูงสุดของแอคติโนมัยซีสในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิล
ตาราง 4-18	ปริมาณกลีโคเจน (จีออสมินและเอ็มไอบี) ในเนื้อปลานิลในบ่อ
ตาราง 4-19	เปอร์เซ็นต์ของเพศ อายุ การศึกษา และประเภทผู้บริโภคในการทดสอบกลีโคเจนในเนื้อปลานิล
ตาราง 4-20	ค่าเฉลี่ยปริมาณชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช (ไมโครลิตร/ลิตร) ในแต่ละดิวิชันของทุกชุดการทดลอง
ตาราง 4-21	ค่าเฉลี่ยปริมาณชีวภาพของ Cyanobacteria (ไมโครลิตร/ลิตร) ในแต่ละสปีชีส์ของทุกชุดการทดลอง

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

จากกระแสนิยมบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพทำให้ปัจจุบันความต้องการบริโภคปลาน้ำจืดมีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งตลาดในประเทศและตลาดส่งออกต่างประเทศ เนื่องจากเนื้อปลาเป็นอาหารโปรตีนที่ย่อยง่ายและประกอบด้วยคุณค่าทางอาหารที่ครบถ้วน ในจำนวนปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงในปัจจุบัน ปลานิลเป็นปลาที่นิยมของผู้เพาะเลี้ยงและกลายเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่ปัญหาที่เป็นอุปสรรคต่อความนิยมในการบริโภค และทำให้ราคาของปลานิลตกต่ำ คือ กลิ่นโคลนในเนื้อปลา ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการบริหารจัดการบ่อเลี้ยงไม่ดี โดยเฉพาะบ่อดินที่มีการเลี้ยงปลานิลแบบผสมผสานที่มักจะประสบปัญหาการสะสมของสารอินทรีย์ที่พื้นบ่อปริมาณมาก ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำและแบคทีเรียบริเวณพื้นบ่อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่ทำให้เกิดกลิ่นโคลนได้ จึงส่งผลให้มีการปล่อยกลิ่นไม่พึงประสงค์สู่แหล่งน้ำและเข้าไปสะสมในเนื้อปลา ปัญหากลิ่นในปลาส่งผลกระทบต่อ การส่งออกปลานิล เนื่องจากผู้บริโภคชาวต่างชาติไม่ยอมรับกลิ่นโคลนในเนื้อปลา เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการหาวิธีการลดกลิ่นโคลนในปลานิล เพื่อให้สามารถผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพ ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และส่งเสริมการส่งออกปลานิลให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

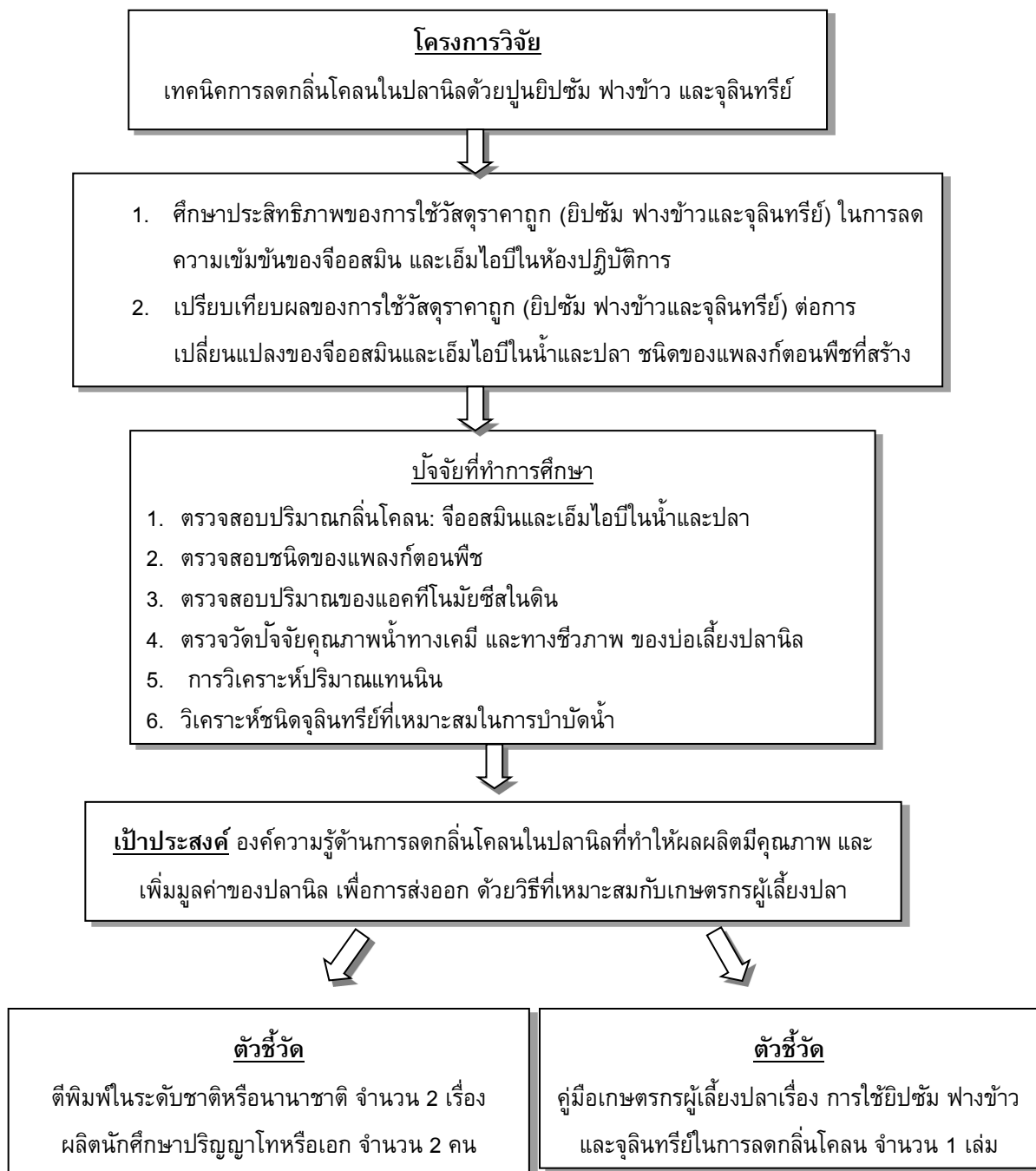
อย่างไรก็ตามในปัจจุบันต้นทุนการผลิตปลาที่เกษตรกรประสบภาระหนักคือต้นทุนค่าอาหาร เกษตรกรจำนวนมากหันกลับมาพัฒนาการเลี้ยงปลาแบบลดต้นทุน เช่น การใช้ปุ๋ยหมักหรืออาหารสมทบต่างๆ และเน้นการสร้างอาหารธรรมชาติ ซึ่งระบบการเลี้ยงแบบนี้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนได้ แต่วิธีการดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการสะสมกลิ่นโคลนในเนื้อปลา การสะสมกลิ่นในปลาอีกประการหนึ่งการซึมผ่านเหงือกปลาในขณะที่ปลาหายใจและการรับเข้าในขณะกินอาหาร ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการหาเทคนิคการลดกลิ่นโคลนในปลานิลด้วยปุ๋ยนิยซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์ โดยตรวจสอบจีโอสมินและเอ็มไอบี ในน้ำทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form และในตัวปลา ตรวจสอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชและแอคทีโนไมซีส์ที่สามารถผลิตกลิ่นโคลน และยังตรวจสอบคุณภาพน้ำต่างๆ รวมทั้งการตกตะกอนของแพลงก์ตอนพืชจากการใช้วัสดุปุ๋ยนิยซัม (ซึ่งเป็นวัสดุปุ๋ยที่มีราคาถูก และหาได้ง่ายในบริเวณใกล้เคียง เช่น โรงไฟฟ้าลิกไนต์ จังหวัดลำปาง) จากข้อมูลของ Wu and Boyd, 1990 พบว่าการใช้ปุ๋ยนิยซัมสามารถลดฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้ และยังสามารถลดความขุ่นของน้ำในบ่อปลาได้ แต่ยังไม่มียางานการใช้ปุ๋ยนิยซัมต่อการลดกลิ่นโคลน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของฟางข้าว ซึ่งเป็นเศษเหลือใช้จากการปลูกข้าวต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน เนื่องจากฟางข้าวมีสารประกอบแทนนิน ซึ่งน่าจะเป็นสารที่จับกับกลิ่นโคลนหรือยังยั้งการเจริญของแพลงก์ตอนได้และที่สำคัญ คือ ยังไม่มีรายงานเรื่องการใช้ฟางข้าวควบคุมกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลามาก่อนหน้านี้

การใช้สิ่งมีชีวิตกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบกลิ่นโคลน ซึ่งได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยในการใช้จุลินทรีย์ในแต่ละท้องถิ่นในการย่อยสลายกลิ่น พบว่าสามารถกำจัดกลิ่นโคลนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Saadoun and El-Migdadi, 1998 และ Persson *et al.*, 2007) ในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ในพื้นที่ทางภาคเหนือของไทย และได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายกลิ่นโคลนในระดับห้องปฏิบัติการแล้วพบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการกำจัดกลิ่นได้เป็นผลดี ซึ่งหากมีการวิจัยในขั้นต่อไปน่าจะเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาทั่วไปและเป็นการตอบโจทย์การลดต้นทุนการผลิตและอาหารปลอดภัยและเป็นการใช้วัสดุเหลือใช้ให้เป็นประโยชน์ วิจัยครั้งนี้ที่มวิจัยได้มีความร่วมมือกับ นักวิจัยจาก Tsukuba University ประเทศญี่ปุ่นที่ให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์กลิ่นและเทคนิคการวิเคราะห์สารแทนนิน ผลจากการวิจัยคาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ในวารสารในประเทศหรือต่างประเทศอย่างน้อย 2 เรื่องและผลิตนักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโทได้ 2 คน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัสดุราคาถูก (ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์) ในการลดความเข้มข้นของ จีออสมินและเอ็มไอบีในห้องปฏิบัติการ
2. เปรียบเทียบผลของการใช้วัสดุราคาถูก (ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์) ต่อการเปลี่ยนแปลงของจีออสมินและ เอ็มไอบีในน้ำและปลา ชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกลิ่น แอคติโนมัยซีสในดิน และคุณภาพน้ำในบ่อปลานิล

ขอบเขตของการวิจัย



ทฤษฎี สมมติฐาน กรอบแนวความคิดของการวิจัย

การเลี้ยงปลานิลในบ่อดินบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย ประสบปัญหาการสะสมกลิ่นโคลนในเนื้อปลา เนื่องจากผลผลิตปลานิลโดยส่วนใหญ่ได้มาจากการเลี้ยงแบบผสมผสาน หรือจากระบบน้ำเขียว โดยมีการใช้มูลสัตว์ใส่ในบ่อเลี้ยงปลาในปริมาณมากเพื่อสร้างอาหารธรรมชาติ เกิดปัญหากลิ่นโคลนสะสมในเนื้อปลาในระดับสูง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการหาเทคนิคการลดกลิ่นโคลนในปลานิลด้วยปูนยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์ ตลอดจนศึกษาชนิดของแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียกลุ่มแอคทีโนไมซีส์ที่ผลิตสารที่ทำให้เกิดกลิ่นโคลนในระบบการเลี้ยง นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลของยิปซัมและแทนนินจากฟางข้าวต่อการควบคุมสารอาหาร แพลงก์ตอนพืช และกลิ่นโคลนในปลาอีกด้วย และเพื่อนำข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ไปพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

อุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหารประเภทสัตว์น้ำมีการขยายตัวมากขึ้นทั้งสัตว์น้ำจากทะเล และน้ำจืด โดยเฉพาะปลาน้ำจืดตัวหลักที่ส่งออก ได้แก่ ปลานิลเป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็ว ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้เป็นที่นิยมบริโภคและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยในปี พ.ศ. 2549 พบว่าประเทศไทยมีผลผลิตปลานิลทั้งหมด 228,500 ตัน และในปี 2551 มีการส่งออกปลานิลถึง 16,733 ตัน มีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากเป็นปลาที่มีราคาดี โดยปัจจุบันปลานิลสามารถจัดเป็นสินค้าส่งออกไปสู่ต่างประเทศในลักษณะของปลาแช่เนื้อ โดยตลาดที่สำคัญๆ อาทิ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี เป็นต้น (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2547) ซึ่งปลานิลที่ได้ส่วนใหญ่มาจากการเลี้ยงแบบบ่อ กระชัง และการเลี้ยงแบบผสมผสาน ส่วนการบริโภคปลาน้ำจืดได้รับความนิยมอย่างมาก โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือมีอัตราการบริโภคสัตว์น้ำจืดต่อคนต่อปีสูงถึง 32 กิโลกรัม (Piumsombun, 2001) และจากข้อมูลของสหกรณ์ผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าความต้องการสัตว์น้ำประเภทปลาน้ำจืดในจังหวัดเชียงใหม่สูงถึง 40,000 กิโลกรัมต่อวัน (เทพรัตน์ และคณะ, 2545)

แหล่งผลิตปลานิลที่ใหญ่ที่สุดในภาคเหนือตอนบนที่สำคัญ ได้แก่ อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย โดยมีผลผลิตปลาประมาณ 17.71 ตัน/วัน ผลผลิตปลาที่เข้าสู่ตลาดมีทั้งใช้อาหารเม็ดอย่างเดียวและส่วนใหญ่มาจากการเลี้ยงปลาแบบผสมผสาน ซึ่งเป็นการเลี้ยงปลาร่วมกับสัตว์บก เช่น การเลี้ยงปลาร่วมกับไก่ หรือการเลี้ยงปลาร่วมกับสุกร โดยการเลี้ยงแบบดังกล่าวนี้สามารถลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากสิ่งขับถ่ายจากสัตว์เลี้ยงเหล่านี้ก่อให้เกิดอาหารธรรมชาติในบ่อเลี้ยงได้ และเป็นวิธีที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง ปลาที่นิยมนำมาเลี้ยงปลานิล ปลาตะบิม ซึ่งเป็นปลาที่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารธรรมชาติได้อย่างดีและเป็นที่ต้องการของตลาด

กลิ่นไม่พึงประสงค์หรือกลิ่นโคลน (Off-flavor)

กลิ่นโคลน (off-flavor) ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมทางด้านประมงอย่างมาก เนื่องจากกลิ่นโคลนเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้บริโภคสัตว์น้ำไม่ยอมรับ (Persson, 1982) โดยสัตว์น้ำที่พบปัญหาดังกล่าว ได้แก่ ปลาหมอสีอเมริกัน (Martin *et al.*, 1990) ปลาแซลมอน (Farmer *et al.*, 1995) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Yurkowski and Tabachek, 1974; Form and Horlyck, 1984) ปลาแฮร์ริง (herring) ปลาคาร์พ (carp) (Yurkowski and Tabachek, 1980) ปลานิล (Whangchai *et al.*, 2008) หอยกาบ (Tanchotikul and Hsieh, 1990) และกุ้ง (Lovell and Broce, 1985) เป็นต้น โดยที่ปัญหากลิ่นโคลนอาจเกิดขึ้นเนื่องจากปลากินสารประกอบกลิ่นโคลนเข้าไปโดยตรง หรือมีการปนเปื้อนกับสิ่งที่ปลากินหรือผ่านเข้าสู่ตัวปลาโดยการดูดซึมในส่วนของอวัยวะต่างๆ (Tanchotikul, 1990) สัตว์น้ำสามารถดูดซึมสารเมแทบอลิต์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นโคลนผ่านเหงือก หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ที่สัมผัสน้ำ มากกว่าการกินสาหร่ายหรือแบคทีเรียที่ผลิตสารโดยตรง (Form and Horlyck, 1984) ไปสะสมอยู่ในร่างกายโดยเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีไขมันสูง (Martin *et al.*, 1990)

กลิ่นโคลนเกิดจากสารที่จำเพาะเจาะจงหลายอย่าง ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์น้ำ แต่สารที่เป็นตัวหลักที่ก่อให้เกิดกลิ่นโคลนมี 2 ชนิด คือ จีออสมิน (1α , 10β -dimethyl-9 α -decalol: geosmin) และเอ็มไอบี (2-methylisoborneol: MIB) โดยเป็นสารประกอบแอลกอฮอล์อิ่มตัว (Saturated cyclic tertiary alcohol) ที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและแบคทีเรียบางชนิดสังเคราะห์ขึ้นในวิถีเทอร์ปีน (terpene pathway) โดยสารประกอบจีออสมินสร้างขึ้นจากสารประกอบฟานิลซิล-ไพโรฟอสเฟต (Farnesyl-PP) และสารประกอบเอ็มไอบีสร้างขึ้นจากสารประกอบเจอร์รานิล-ไพโรฟอสเฟต (Geranyl-PP) (Van Der Ploeg, 1989)

จีออสมินและเอ็มไอบีเป็นสารประกอบพวกแอลกอฮอล์อิ่มตัวที่ระเหยได้ โครงสร้างประกอบด้วยหมู่เมทิลและหมู่ไฮดรอกซิล (Izaguirre *et al.*, 1982) สารประกอบทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทั่วไปคือ ละลายในไขมันได้ดี ไม่ชอบน้ำ

สูง เป็นสารแปลกปลอมสำหรับสิ่งมีชีวิต โดยกระจายตัวและสะสมในเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง เมื่อเกิดการสะสมในร่างกายจะกำจัดออกได้ยากจึงก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (Johnsen *et al.*, 1996) แต่อย่างไรก็ตาม สารประกอบทั้งสองชนิดไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต และไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Dionigi *et al.*, 1993) จีออสมินเป็นสาร secondary product จากปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพในไอโซพรีนอยด์พาทเวย์ (isoprenoid pathway) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยจีออสมินจะเกิดจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพในคาโรทีนอยด์ พาทเวย์ (carotenoid pathway) และขั้นตอนการเกิดโฟโตเทล (phototial) ของคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) ดังนั้นจีออสมินจึงเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ ด้วยเหตุนี้ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตที่จำกัดสารจีออสมินจึงถูกสะสมเพิ่มขึ้น แต่ทว่าสัดส่วนของจีออสมินกับคลอโรฟิลล์ เอ จะมีความไม่แน่นอน ส่วนสารประกอบเอมไอบีถูกสังเคราะห์โดยไอโซพรีนอยด์ พาทเวย์ เช่นเดียวกับจีออสมินในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม *Actinomycetes* spp. และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Van Der Ploeg, 1989)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สำคัญที่มีผลต่อการเกิดกลิ่นโคลนประกอบด้วยสกุล *Anabena* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Symploca* sp., *Phormidium* sp. (Tabachek and Yurkowski 1976; Lovell and Broce, 1985; ชลอ, 2536) ส่วนแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารจีออสมิน และสารเอมไอบี ได้แก่ สกุล *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp., *Actinomadura* sp. และ *Actinomyces* sp. สามารถสร้างกลิ่นโคลนหรือกลิ่นไม่พึงประสงค์ และสารพิษตกค้างในเนื้อปลาได้ (Sivonen, 1982; Martin *et al.*, 1988; Klapper, 1991; Yamada *et al.*, 1994) โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* sp. จะทำให้เกิดกลิ่น-รสที่ไม่พึงประสงค์มากที่สุด (Van Der Ploeg and Boyd, 1991)

แอคทีโนมัยซีสสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ และพืช แหล่งที่พบมาก ได้แก่ บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน สามารถพบแอคทีโนมัยซีสในดินได้มากเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรีย โดยพบแอคทีโนมัยซีสจำนวนมากที่ดินชั้นบนและลดจำนวนลงไปในดินชั้นลึกลงไปและชอบดินพีเอช 6.5-8.0 โดยมีปัจจัยที่มีผลควบคุมปริมาณของแอคทีโนมัยซีสคือ สภาพทางปริมาณอินทรีย์วัตถุ ความเป็นกรดด่าง และระดับความชื้นของดิน รวมทั้งอุณหภูมิ และฤดูกาลของสิ่งที่อยู่อาศัย แอคทีโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลากหลาย ได้อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ (saprophytic) และชอบอุณหภูมิปานกลาง (Waksman, 1967 ; Mendez *et al.*, 1985) ส่วน Porter (1971) พบว่าแอคทีโนมัยซีสมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเกิดกลิ่นโคลน เนื่องจากพบโครงสร้างทางเคมีและแหล่งทางชีววิทยาบางส่วนของจีออสมินและเอมไอบี สอดคล้องกับ Tabachek and Yurkowski (1976) พบว่าแหล่งของจีออสมินและเอมไอบีในน้ำส่วนมากมาจากแอคทีโนมัยซีส

ปัจจัยที่ส่งผลทำให้เกิดการสะสมกลิ่นโคลนในสัตว์น้ำ ได้แก่ ปริมาณสารอาหารในน้ำ โดย Sivonen (1982) รายงานว่าในสภาวะที่ธาตุอาหารในน้ำสูงมาก (eutrophic water condition) ซึ่งเป็นผลมาจากการให้อาหารสัตว์น้ำที่มากเกินไป ส่งผลทำให้มีอาหารตกค้างภายในบ่อ หรือเกิดจากการเลี้ยงปลาที่หนาแน่นเกินไป และระบบการจัดการในการเลี้ยงที่ไม่ดี ก็เป็นสาเหตุทำให้มีการสะสมของธาตุอาหารโดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่กักเก็บอยู่มาก ดังนั้นหากป้องกันปัญหาควรมีการจัดการเกี่ยวกับระบบน้ำที่จะใช้ทำการเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงชีวภาพ (Yurkowski and Tabachek, 1980) ชนิดและปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณกลิ่นโคลนในน้ำ ถ้าในบ่อเลี้ยงมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวนมาก ก็จะพบว่าความเข้มข้นของจีออสมินหรือเอมไอบีในน้ำก็จะมีค่าความเข้มข้นที่สูงเช่นกัน (Van Der Ploeg and Boyd, 1991) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงช่วง 25-35 °C โดย Martin *et al.* (1987) พบว่าน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30 °C จะทำให้ปลาเกิดกลิ่นโคลนเกิดขึ้นได้ ส่วน Johnsen and Lloyd (1992) กล่าวว่า การดูดซึมและสะสมสารที่ก่อให้เกิดกลิ่นโคลนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิของน้ำ ปริมาณไขมันในปลา โดยปลาที่มีปริมาณไขมันมากสามารถสะสมสารประกอบกลิ่นได้มากกว่าปลาที่มีไขมันต่ำ

Grimm *et al.* (2004) ได้ทำการทดสอบหาปริมาณโคลนในฟาร์มปลากดอเมริกัน (channel catfish) โดยใช้วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัส วิธีการสกัดของแข็ง และวิธีเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าปลากดอเมริกันที่ทำการสุ่มตรวจพบว่ามีสารประกอบเอมไอบีมีค่าอยู่ที่ 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ส่วนสารประกอบจีโอสมินมีค่าอยู่ที่ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งพบว่าปริมาณสารประกอบจีโอสมินมีประมาณมากกว่าสารประกอบเอมไอบี

Yamprayoon and Noomhorm (2000) ได้ทำการศึกษาการดูดซึมและการแพร่กระจายทางชีวภาพของสารจีโอสมินในปลาไนล์ พบว่า การพักปลาไนล์ในน้ำที่มีสารละลายจีโอสมินเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร จะทำให้ปลาไนล์จะค่อยๆดูดซึมสารจีโอสมินเข้าสู่ตัวเพิ่มขึ้น โดยแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกายปลา ตั้งแต่เวลา 0-72 ชั่วโมง

Matsuyasu *et al.* (1996) ได้ทดสอบผลของสารประกอบจีโอสมิน และสารประกอบเอมไอบีต่อการพัฒนาการของหอยเม่น พบว่าระดับ IC_{50} ของสารประกอบจีโอสมินที่มีผลต่อการปฏิสนธิของหอยเม่นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.67 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนระดับ IC_{50} ของสารประกอบเอมไอบีที่มีผลต่อการปฏิสนธิของหอยเม่นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 68.77 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนระดับ IC_{50} ของสารประกอบจีโอสมินที่มีผลต่อรูปแบบของการแบ่งเซลล์ของหอยเม่นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.58 มิลลิกรัม/ลิตร และระดับ IC_{50} ของสารประกอบเอมไอบีที่มีผลต่อรูปแบบของการแบ่งเซลล์ของหอยเม่นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 66.58 มิลลิกรัม/ลิตร

Lovell and Broce (1985) ทำการตรวจสอบหาปริมาณโคลนของประเทศเอกวาดอร์ ในปี 1983 พบปัญหาทั้งมีโคลนโคลนเกิดขึ้น ซึ่งพบว่ามีสารประกอบจีโอสมินที่มีความเข้มข้นสูงที่บริเวณกล้ำมเนื้อกุ้ง โดยมีปริมาณความเข้มข้น 78 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเป็นปริมาณสารประกอบจีโอสมินที่สูงกว่าในปลา channel catfish ซึ่งมีปริมาณสารประกอบจีโอสมินเพียง 9.8 ไมโครกรัม/กิโลกรัม โดยสาเหตุที่ทำให้กุ้งเกิดโคลนที่มีความเข้มข้นสูงเนื่องมาจากมีความเค็มของน้ำระหว่างเลี้ยงมีปริมาณความเค็มที่ลดต่ำลง ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

การใช้ยิปซัมในการเลี้ยงปลา

ยิปซัมเป็นวัสดุที่เป็นผลพลอยได้จากการกำจัดก๊าซ SO_2 จากการใช้ถิกไนต์เป็นเชื้อเพลิงของการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย มี ยิปซัมได้ปีละประมาณ 2.3 ล้านตัน (ฝ่ายจัดการธุรกิจ; การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, 2555) ยิปซัมเป็นยิปซัมบริสุทธิ์ คือ มีสาร $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ เกือบ 100% ทำให้มีแคลเซียม (Ca) และกำมะถัน (S) อยู่ประมาณ 23 และ 19% แต่ไม่มี CO_3^{2-} และ OH^- เป็นองค์ประกอบ ยิปซัมละลายน้ำได้มากกว่า 2 กรัม/ลิตร ซึ่งถือว่าละลายน้ำได้ดีมากเมื่อเทียบกับปูนเกษตร อนุมูล Ca^{2+} และ SO_4^{2-} จากยิปซัมจึงเคลื่อนที่กับน้ำลงสู่ดินชั้นล่าง และลดความเป็นพิษของ Al^{3+} อิสระด้วยปฏิกิริยาระหว่าง SO_4^{2-} กับ Al^{3+} เป็นสารประกอบเชิงซ้อน $Al_2(SO_4)_3$ ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Tang *et al.*, 2003) ซึ่งในการใช้ยิปซัมในการเลี้ยงปลานั้นช่วยเพิ่มความกระด้างและลดความเป็นด่างของน้ำได้ ซึ่งช่วยลดสารพิษหลายประเภท เช่น โลหะหนักต่างๆ ได้แก่ปรอท ตะกั่ว แคดเมียม ดังนั้นการใช้ยิปซัมในช่วง 50 – 250 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเพิ่มความกระด้างของน้ำได้ (โกสินทร์, 2544) จากคุณสมบัติของยิปซัมในการลดปริมาณฟอสฟอรัสได้ จึงน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการกำจัดไนโตรเจนและลดกลิ่นไม่พึงประสงค์ของปลาได้

Cooke and Kenedy (1981) ศึกษาพบว่า การใช้ยิปซัมกำจัดฟอสฟอรัสในทะเลสาบธรรมชาติ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ โดยใช้กระบวนการทางเคมีและกายภาพไปรบกวนระบบกระบวนการทางชีวภาพของระบบนิเวศในน้ำ และจากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นพบว่า ส่วนใหญ่ในการลดฟอสฟอรัสในน้ำ มักจะใช้อะลูมิเนียมซัลเฟต ($Al_2(SO_4)_3$) หรือสารส้ม (Masuda and Boyd, 1994) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารส้มจะมีความสามารถในการจับตัวกับฟอสฟอรัสได้ต่ำ และจะตกตะกอน Al^{3+} ได้น้อยและมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว และแคลเซียมจะลดลงอย่างช้าๆ ดังนั้นในการบำบัดน้ำในบ่อด้วยการใช้ยิปซัมจะให้ผลได้ดีกว่าการใช้สารส้ม นอกจากนี้อัตราส่วนของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (N:P) ในน้ำ จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอน

พืช (Schindler, 1977; Smith and Pettit, 1983) เนื่องจากระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำ ถ้ามีระดับที่ต่ำจะมี การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ดีกว่าในน้ำที่มีระดับของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่สูง ดังนั้นการใช้ปุ๋ยผสมในการ เลี้ยงปลาน้ำจืดจะสามารถนำมาใช้ในการลดปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำ เพื่อกำจัดไซยาโนแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี

การเลี้ยงปลาด้วยฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นวัสดุราคาถูก ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรในภาคเหนือ จะนำไปเผาทิ้งไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ และ จากการค้นข้อมูลพบว่าเกษตรกรใน จ. เพชรบูรณ์ (มงคล, 2554) ค้นพบการเลี้ยงปลาด้วยฟางข้าวเป็นอาหาร Ng *et al.* (2002) กล่าวว่า การใช้ประโยชน์จากฟางข้าวเป็นวิธีหนึ่งที่มีการยอมรับเป็นอย่างมากในการนำผลผลิตการ เจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช เนื่องจากฟางข้าวเมื่อแช่อยู่ในน้ำจะทำการผลิตและปลดปล่อยสารประกอบหลายตัว และรวมถึงสารฟีนอล ประเภทแทนนินออกมา เพื่อยับยั้งการทำงานของแพลงก์ตอนพืชได้ นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่าง น้ำไปทำการวิเคราะห์ พบว่าสารประกอบเคมีจะไม่สามารถทำลายเยื่อหุ้มผนังเซลล์ได้ แต่จะสามารถทำการยับยั้งการ เจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ Park *et al.*, (2006) พบว่าสารสกัดที่ได้จากฟางข้าวมีฤทธิ์สามารถทำลายไซยาโน แบคทีเรีย กลุ่ม *Microcystis* sp. ได้ และนอกจากนี้ฟางข้าวยังมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงปลาได้ อีกด้วยแต่ในงานวิจัยในการใช้ฟางข้าวมาเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ และลดปริมาณการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช และลดกลิ่นโคลน และใช้ในการเพิ่มผลผลิตปลายังมีน้อยมาก

การกำจัดกลิ่นโคลนด้วยจุลินทรีย์

การใช้สิ่งมีชีวิตกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบกลิ่นโคลน สามารถย่อยสลายสารประกอบกลิ่น โคลนในน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการวิจัยและทดลองดังกล่าวในประเทศไทยมีเพียงไม่มากนัก ในต่างประเทศการ ประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ในการกำจัดกลิ่นโคลนในแหล่งน้ำธรรมชาติ และน้ำเสีย ซึ่งจากการวิจัยพบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ บางชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในแหล่งน้ำนั้นๆ สามารถกำจัดกลิ่นโคลนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Tanaka *et al.* (1996) ทำการสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเอมไอบี จากตัวกรองชีวภาพ จากโรงงานอุตสาหกรรม ประเทศญี่ปุ่น 2 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas* sp. และ *Enterobacter* sp. โดยสามารถสลาย สาร 2-methylisoborneol (2-MIB) ให้กลายเป็น 2-methylcampbene และ 2-methylenebornane (dehydration products) ในขณะที่สาร dehydration products ของเอมไอบี ที่ได้ยังทำให้เกิดกลิ่นโคลนในเนื้อปลาดุกบ้างในช่วงฤดู หนาว แต่ในระยะเวลาต่อมาได้มีการวิจัยของ Eaton and Sandusky (2009) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพของเอมไอบี โดย แบคทีเรียกลุ่ม Camphor-degrading bacteria (การบูรมีโครงสร้างใกล้เคียงกับเอมไอบีหรือเอมไอบี substrate analog) ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Rhodococcus* sp. ซึ่งสาร metabolites ที่ได้ไม่มีกลิ่นและรส หรืออาจมีน้อยมากเมื่อ เทียบกับสารเอมไอบี ซึ่งก็ได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในแบคทีเรียกลุ่ม terpene-degrading bacteria โดย Eaton and Sandusky (2010) ซึ่งทำการสลาย (เปลี่ยนแปลง) ของสารจีโอสมินให้กลายเป็นสาร 2-ketogeosmin และ 7-ketogeosmin ซึ่งไม่มีกลิ่นได้

Saadoun and El-Migdadi (1998) ทำการศึกษาการย่อยสลายจีโอสมินทางชีวภาพ โดยใช้แบคทีเรียแกรม บวก 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus* spp., *Arthrobacter* spp., *Chlorophenolicus* N-1053 และ *Rhodococcus maris* พบว่า *Arthrobacter atrocyaneus*, *Arth. globiformis*, *Chlorophenolicus* N-1053 และ *Rhodococcus maris* สามารถย่อย สลายสารจีโอสมินได้

Saito *et al.* (1999) ทำการศึกษาการย่อยสลายจีโอสมินโดยจุลินทรีย์ โดยแยกเชื้อจากน้ำลำระบบ ที่ผ่าน วัสดุกรองชีวภาพ และระบบแอกติเวตเต็ดสลัดจ์ โดยการใช้เชื้อผสม พบว่าสามารถย่อยสลายจีโอสมินให้กลายเป็น สาร metabolites ทั้งหมด 4 ชนิด โดยแยกชนิดสารโดยใช้ Gas Chromatography

Hoefel *et al.* (2006) ศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารจืออสมิน โดยทดสอบประสิทธิภาพจากการใช้ไบโอฟิล์ม (biofilm) ในคอลัมน์กรองทราย (sand filter column) พบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นชนิดเด่น 3 ชนิด คือ *Sphingopyxis alaskensis*, *Novosphingobium stygiae* และ *Pseudomonas veronii* ทำการตรวจสอบชนิดโดยใช้ลำดับเบส 16S rRNA gene sequences ที่ทดสอบได้จากเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ในถังกรองพบว่าสามารถลดปริมาณจืออสมินลงกว่า 70% ภายในเวลาเพียง 2 วัน และพบว่าหากใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ไม่สามารถเปลี่ยนรูปจืออสมินให้กลายเป็นสารรูปอื่นๆ (primary metabolite) ได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

1. วิธีการดำเนินการวิจัย โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน

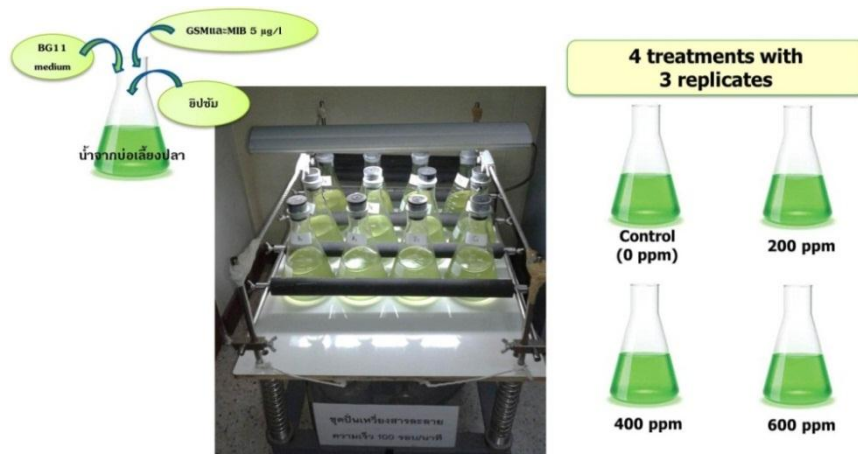
นำน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา ที่มีคลอโรฟิลล์ 400 ไมโครกรัมต่อลิตร และเติมสารมาตรฐานของจีโอสมิน และเอ็มไอบี 5 ไมโครกรัมต่อลิตร มาทดสอบในตู้ปลา ที่มีระดับความเข้มข้นของยิปซัม 0, 200, 400 และ 600 ppm โดยทำการทดลอง 9 วัน จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจสอบระดับกลิ่นโคลนและคุณภาพน้ำ



ภาพ 3-1 ยิปซัมที่นำมาใช้ในการทดลอง



ภาพ 3-2 การเตรียมยิปซัมสำหรับการทดลอง

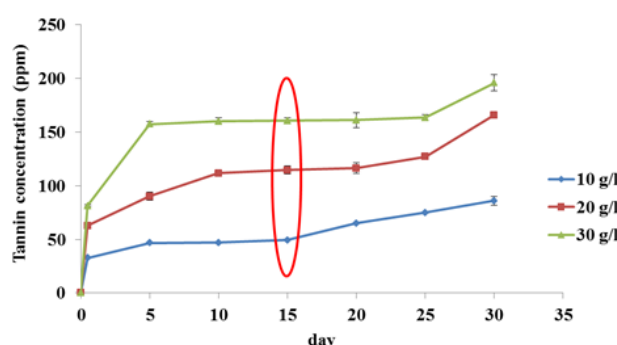


ภาพ 3-3 การทดลองการใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน

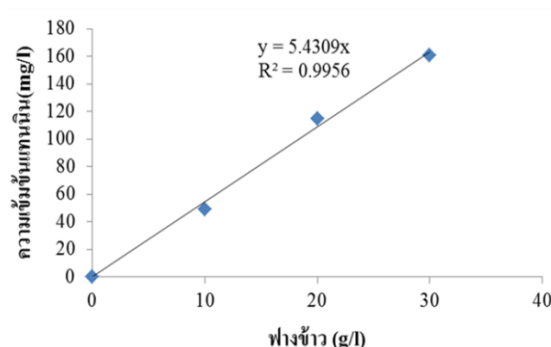
ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน

1.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของแทนนินในระดับฟางข้าวที่ต่างกัน เพื่อกำหนดความเข้มข้นของแทนนินและระยะเวลาในการสกัดฟางข้าวในการทดลองการใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดจืออสมินและเอ็มไอบี

โดยขั้นตอนแรกทำการสกัดน้ำฟางข้าวที่ระดับต่างกัน ซึ่งทำการทดลอง 3 ครั้งจากแหล่งฟางข้าวต่างกัน โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ คือ 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณแทนนิน จากการทดลองพบว่าระดับฟางข้าวที่ต่างกันส่งผลให้มีความเข้มข้นของแทนนินแตกต่างกัน (ภาพ 3-4 และตาราง 3-1) และการสกัดฟางข้าวที่ 15 วันเป็นเวลาที่เหมาะสมในการนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป เมื่อคำนวณอัตราส่วนของแทนนินที่ได้จากการสกัดฟางข้าวเป็นเวลา 15 วันมีสมการดังนี้ $Y = 5.4309x$ ที่ $R^2 = 0.9956$ (ภาพ 3-5) ซึ่งหมายความว่าในการสกัดฟางข้าว 15 วัน ฟางข้าว 1 กรัมให้ แทนนิน 5.43 มิลลิกรัม



ภาพ 3-4 ความเข้มข้นของแทนนินในระดับฟางข้าวที่ต่างกัน



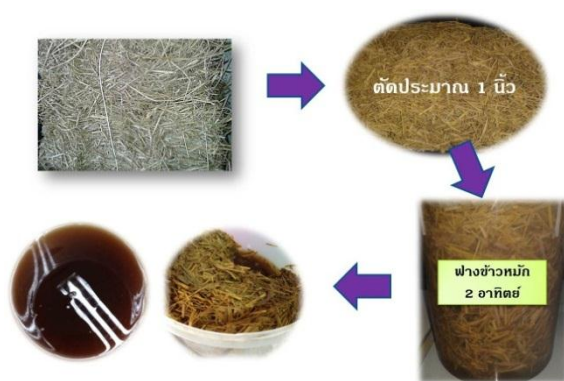
ภาพ 3-5 ความสัมพันธ์ของระดับฟางข้าวกับความเข้มข้นของแทนนินที่เวลา 15 วัน

ตาราง 3-1 ความเข้มข้นของแทนนินที่สกัดจากฟางข้าวเป็นเวลา 15 วัน

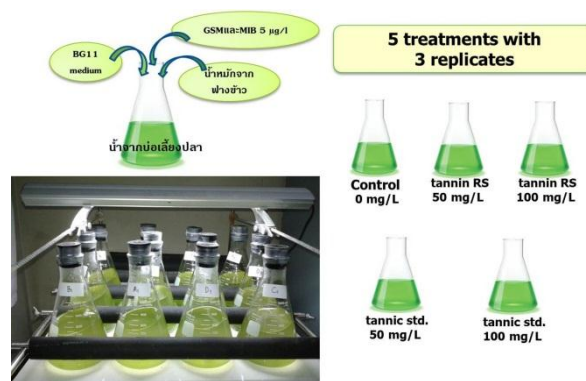
ระดับฟางข้าว (g/l)	ความเข้มข้นของแทนนิน (ppm)
10	49.35
20	114.63
30	160.57

1.2.2 การใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดจืออสมินและเอ็มไอบี

นำน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา ที่มีคลอโรฟิลล์ 400 ไมโครกรัมต่อลิตร และเติมสารมาตรฐานของจืออสมินและเอ็มไอบี 5 ไมโครกรัมต่อลิตร มาทดสอบในห้องปฏิบัติการ ที่มีความเข้มข้นของแทนนิน 0, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ฟางข้าวบดละเอียดและผ่านการแช่น้ำมาแล้ว 15 วัน และเปรียบเทียบกับชุดการทดลองของสารละลายมาตรฐานของแทนนินที่มีความเข้มข้นเดียวกัน ทำการทดลอง 9 วัน จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจวัดระดับกลิ่นโคลนและคุณภาพน้ำ



ภาพ 3-6 การเตรียมฟางข้าวสำหรับการทดลอง



ภาพ 3-7 การทดลองการใช้แทนนินจากฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน

ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นโคลนในน้ำมากที่สุด จำนวน 5 ชนิด จากตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถกำจัดกลิ่นโคลนได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลท (ซึ่งได้มีการรวบรวมโดยนักวิจัยในช่วงเวลาที่ผ่านมาแล้ว) โดยทำการทดสอบความปลอดภัยของเชื้อในการนำไปประยุกต์ใช้ในบ่อเลี้ยงปลา โดยไม่เป็นอันตรายต่อปลา รวมทั้งปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1.1 ทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยจุลินทรีย์บางชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำ (กระแสน้ำ) สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ส่งผลให้สัตว์น้ำตาย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ออก โดยใช้วิธีการ Blood agar plate ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบเชื้อกลุ่ม Fastidious bacteria โดยทดสอบความสามารถในการ Hemolysis เม็ดเลือดแดง (Wegner *et al.*, 1992) ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

1.2 ทดสอบเชื้อกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัส โดยเชื้อกลุ่มนี้ไม่เป็นที่ยอมรับในการใช้ในทางอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ ซึ่งสินค้าสัตว์น้ำส่งออกต้องตรวจไม่พบเชื้อกลุ่มนี้ (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2549) วิธีการตรวจสอบปรับปรุงตาม Smyth and Kahlmeter (2005) ใช้อาหาร Mannitol salt agar (MSA) โดยนำเชื้อที่ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (จากข้อ 1.1) เชื้อสแตฟิโลค็อกคัส สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร อาจทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี หรือไม่เปลี่ยนสีก็ได้ โดยการคัดเลือกเชื้อที่ดีทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ไม่ทำให้อาหารเปลี่ยนสี (ไม่ใช่เชื้อสแตฟิโลค็อกคัส)

1.3 ทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อในการย่อยสลายกลิ่นโคลน โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ผสมสารมาตรฐานจืออสมินและเอ็มไอบี วัดอัตราการเจริญ ณ ช่วงเวลาเริ่มต้น 24 และ 48 ชม. ของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 5 ไอโซเลทๆ ละ 3 ซ้ำ รวมเป็นจำนวน 45 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายและอัตราการเจริญในแต่ละช่วงเวลา

1.4 ทดสอบการก่อโรคในตัวปลา (In-vivo test) ในการทดลองใช้ลูกปลาซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 30-40 กรัม นำมาทดสอบอัตราการเกิดโรค ตรวจผลการทดลองโดยวัดขนาดและชั่งน้ำหนักของปลาและผ่าสังเกตอาการป่วยและตายของปลา โดยในส่วนของปลาที่ตายจะนำไปผ่าพิสูจน์รวมทั้งทำการแยกเชื้อจากอวัยวะภายในของปลาที่ตายด้วย (Verschuere *et al.*, 2000)

1.5 ทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อในการย่อยสลายกลิ่นโคลน ในน้ำตัวอย่างจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงปลาแบบหนาแน่น แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการ

ทดลอง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10%) ทำการทดสอบกับเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทๆ ละ 3 ซ้ำ เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายกลีโคไลนได้ดีแต่ละชนิด ในอัตราส่วนที่ต่างกันให้น้ำตัวอย่างที่เตรียมไว้ วัดค่า OD เริ่มต้น และสิ้นสุดการทดสอบ ที่ความยาวคลื่นแสง 600 nm เพื่อทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อแต่ละเชื้อ ทดสอบอัตราการเจริญ ด้วยวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ระยะเวลาต่างๆ รวมเป็นจำนวนทั้งสิ้น 300 ตัวอย่าง

1.6 ทดสอบการเจริญของเชื้อในการย่อยสลายกลีโคไลน ในน้ำตัวอย่างจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลา โดยเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงปลาแบบหนาแน่น เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญสูงสุด และเจริญเร็วที่สุด และมีปริมาณการใช้ที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 1.5 ลงในน้ำตัวอย่างที่เตรียมไว้ ที่มีปริมาณของเชื้อต่อปริมาณน้ำตัวอย่างเหมาะสม (อย่างน้อย 2 สายพันธุ์) วัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงเวลาต่างๆ ทดสอบการเจริญของเชื้อในสภาวะที่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลา และวิเคราะห์องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในน้ำ โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เพื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ที่เติมลงไป ในน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ การยู่รอดหรือปริมาณเชื้อที่เพิ่มหรือลดลงที่ระยะเวลาผ่านไป รวมทั้งประชากรจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในแหล่งน้ำด้วย จำนวนทั้งสิ้น 150 ตัวอย่าง

1.7 หาค่าอัตราการเจริญ อัตราการเจริญจำเพาะ และ doubling time ของเชื้อ ด้วยวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ระยะเวลาต่างๆ และทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลีโคไลนในน้ำ โดยใช้เครื่อง GC/MS ทำการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นก่อน ระหว่าง และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

1.8 คัดเลือกเชื้อ และสภาวะที่สามารถลดกลีโคไลนได้สูงสุด ทำการแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยเตรียมจุลินทรีย์ในรูปน้ำ ผง และแบบก้อน จำนวน 3 ซ้ำ ทดลองเป็นเวลา 20 วัน ตรวจวัดระดับกลีโคไลนทุกๆ 2 วัน

2. ปัจจัยที่ทำการศึกษา

2.1 ตรวจสอบปริมาณกลีโคไลน: จีออสมินและเอ็มไอบี ในน้ำทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form ตามวิธีของ Grimm *et al.* (2004) โดยดำเนินการตรวจสอบทุกๆ 3 วัน จนสิ้นสุดการศึกษา

2.2 ตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำ ทางเคมี และทางชีวภาพ ในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลานิล (ดำเนินการทุกๆ 3 วัน จนสิ้นสุดการศึกษา) ได้แก่

- อุณหภูมิ น้ำ โดยใช้ Thermometer
- ความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ pH meter (Schott-Gerate CG 840)
- ออกซิเจนละลายน้ำ โดยวิธี Azide modification
- ออร์โธฟอสเฟตฟอสฟอรัส โดยวิธี Stannous chloride
- แอมโมเนียไนโตรเจน โดยวิธี Direct Nesslerization
- ไนเตรทไนโตรเจน โดยวิธี Phenoldisulfonic acid
- คลอโรฟิลล์-เอ วัดแปลงจากวิธี Lee (2000)
- total nitrogen และ total phosphorus (APHA, 2012) โดยใช้สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ตามบริษัท Merck (ภาพ 3-8)



ภาพ 3-8 สารเคมีและอุปกรณ์การวิเคราะห์ total nitrogen และ total phosphorus

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

วิเคราะห์ปริมาณแทนนิน จากปริมาณ polyphenols จัดแปลงตามวิธีของ AOAC (1990) โดยนำน้ำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรแล้วผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu' phenol reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-8 นาที เติม 7.5% Na_2CO_3 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (อย่าให้โดนแสงแดด) จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร เทียบกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่น โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแทนนิก (tannic acid) (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน ในความถี่ 3 วัน/ครั้ง)

2.4 ตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลาทดสอบโดยใช้เชื้อจากลำดับส่วน และ spread ลงในอาหาร plate count agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะบางชนิด (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลิ่นโคลน)

2.5 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์เหล่านั้น ในตัวอย่างเป็นจำนวนทั้งหมด 160 ตัวอย่าง (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลิ่นโคลน)

การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล (โดยเลือก ระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ในการทดลองที่ 1)

1. วิธีการดำเนินการวิจัย

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้ 4 ชุดการทดลองๆละ 3 ซ้ำ ดังนี้

	ควบคุม (ไม่เติม)	ยิปซัม	ฟางข้าว	จุลินทรีย์
รูปแบบการใช้	-	ผง	น้ำ	น้ำ
วิธีการ	-	หว่านทั่วบ่อ	หว่านทั่วบ่อ	หว่านทั่วบ่อ
ความถี่	-	อาทิตย์ละ 2 ครั้ง	อาทิตย์ละ 2 ครั้ง	อาทิตย์ละ 2 ครั้ง

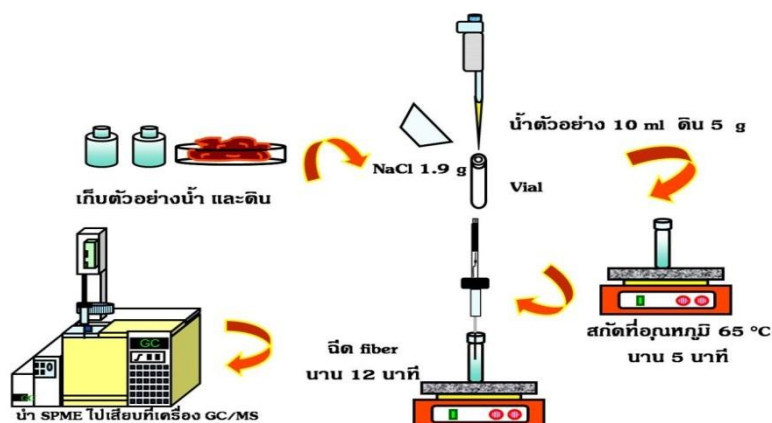
โดยทำการทดลองในบ่อปลาขนาด 50 ตารางเมตร ลึก 80 เซนติเมตร ปลอยลูกปลานิลแปลงเพศขนาด 100 กรัมที่ความหนาแน่น 3 ตัว/ตร.ม. ให้อาหารเม็ด 3-5 %ของน้ำหนักตัวต่อวัน และทำการเติมน้ำทุกๆ 2 อาทิตย์ เพื่อรักษาระดับน้ำให้คงที่ ซึ่งเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 4 เดือน และทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ 15 วัน



ภาพ 3-9 บ่อเลี้ยงปลานิลที่ใช้ในการทดลอง

2. ปัจจัยที่ทำการศึกษา

2.1 ตรวจสอบปริมาณกลิ่นโคลน: จีออสมินและเอ็มไอบี ทั้งในน้ำและดิน เก็บตัวอย่างทุกๆ 15 วัน/ครั้ง โดยทำตามวิธีของ Grimm *et al.* (2004) ดังภาพ 3-10



ภาพ 3-10 การวิเคราะห์จีออสมินและเอ็มไอบีในน้ำและดิน โดยใช้ SPME ร่วมกับ GC/MS

สำหรับการตรวจสอบปริมาณกลิ่นโคลน: จีออสมินและเอ็มไอบีในเนื้อปลา เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 เดือน/ครั้ง โดยใช้วิธี Microwave Distillation-Solid phase microextraction (MD-SPME) ร่วมกับ GC/MS ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Lloyd and Grimm (1999) ดังภาพ 3-11 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

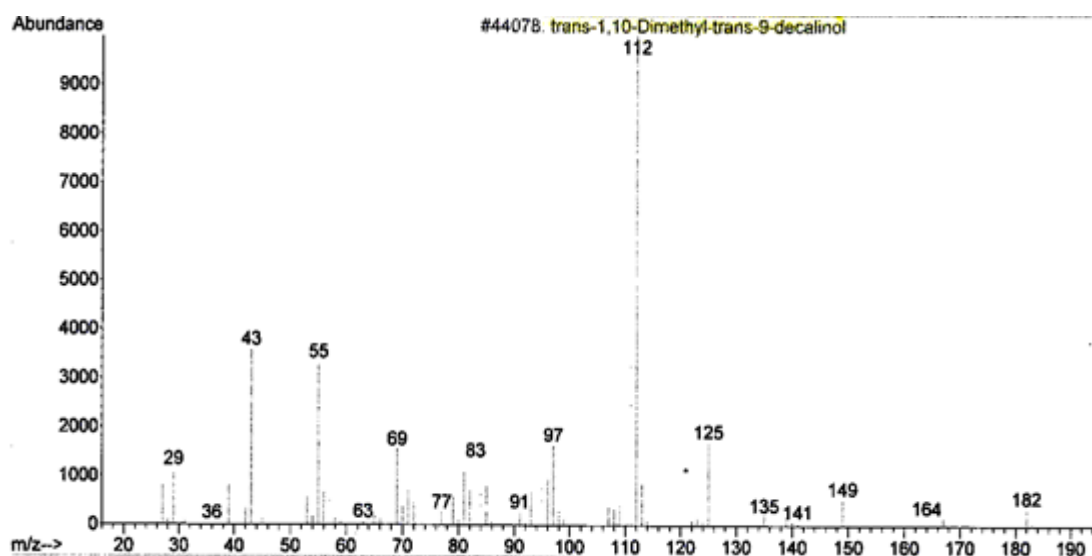
- โดยทำการสุ่มตัวอย่างปลาจำนวน 3 ตัวในแต่ละบ่อ ล้างทำความสะอาดตัวปลาเพื่อเอาสิ่งสกปรกที่ติดตัวปลาออก เนื่องจากระหว่างการจับจะมีดินและโคลนติดตัวปลา หลังจากนั้นทำการขูดเกล็ดและแล่เนื้อปลาออกจากก้าง เอาไปปั่นให้ละเอียด ทำการชั่งเนื้อปลา 5 กรัม เพื่อไปสกัดกลิ่นโคลนด้วยเครื่องไมโครเวฟ (600 วัตต์ เป็นเวลา 6 นาที ที่อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 2 ลิตรต่อนาที) และเก็บน้ำที่สกัดจากตัวปลาปริมาตร 2-3 มิลลิลิตรใส่ขวดไวอัล

- นำขวดไวอัลที่มีตัวอย่างน้ำที่สกัดจากเนื้อปลาพร้อมวิเคราะห์ มาเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.9 กรัม และใส่ magnetic bar จากนั้นปิดฝาด้วยจุกยางทนความร้อนสูง และฝาอะลูมิเนียม นำขวดไวอัลวางบนเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า และถาดให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65–70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแทงเข็มไฟเบอร์ที่ประกอบเข้ากับอุปกรณ์ SPME เข้าไปในขวดตัวอย่างทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไฟเบอร์ทำการจับกับสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในตัวอย่างน้ำสกัดจากเนื้อปลา โดยไฟเบอร์ที่ใช้ คือ 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane SPME fibre (SUPELCO, USA)

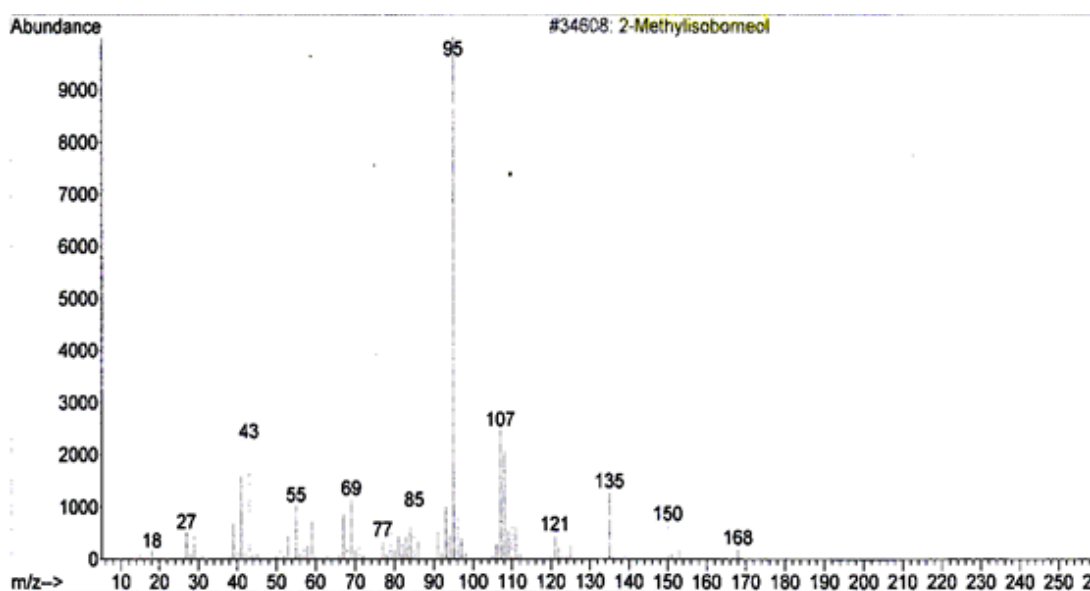
- หลังจากนั้นนำชุดอุปกรณ์ SPME ฉีดเข้ากับเครื่อง GC/MS (Agilent Technologies 6890 N Network GC system) เข้าไปตรงตำแหน่งที่ฉีดสารของเครื่อง โดยใช้ Splitless mode ที่ 230 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผ่านแคปิลลารีคอลัมน์ (DB-DURABOND) HP-5 (30 m. $\times$ 0.32 mm. μm . film thickness) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา ด้วยอัตรา 2.5 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของเตาอบ ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 15 องศาเซลเซียส/นาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 220 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที และจดบันทึกผลจากเครื่อง GC/MS (โดยใช้สารมาตรฐานกลิ่นไม่พึงประสงค์จากบริษัท Sigma)



ภาพ 3-11 การวิเคราะห์จีโอสมินและเอ็มไอบีในเนื้อปลา โดยใช้ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS



ภาพ 3-12 Mass spectrum ของสารจีโอสมิน (trans-1, 10-Dimethyl-trans-9-decalinol)



ภาพ 3-13 Mass spectrum ของสารเอ็มไอบี (2-methylisoborneol)

ในขณะเดียวกันทำการทดสอบกลิ่นโคลนในตัวอย่างเนื้อปลานิลที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองของการเลี้ยง ด้วยวิธีการทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน จำนวนอย่างน้อย 5 คน

2.2 ตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำ ทางเคมี และทางชีวภาพ ในบ่อเลี้ยงปลานิล ทุกๆ 15 วัน/ครั้ง ได้แก่

- อุณหภูมิ น้ำ โดยใช้ Thermometer
- ความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ pH meter (Schott-Gerate CG 840)
- ออกซิเจนละลายน้ำ โดยวิธี Azide modification
- ออร์โทฟอสเฟตฟอสฟอรัส โดยวิธี Stannous chloride
- แอมโมเนียไนโตรเจน โดยวิธี Direct Nesslerization

- ไนเตรทไนโตรเจน โดยวิธี Phenoldisulfonic acid
- คลอโรฟิลล์-เอ ดัดแปลงจากวิธี Lee (2000)

2.3 วิเคราะห์ความหลากหลายและองค์ประกอบของแพลงก์ตอนพืช

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ทุกๆ 15 วัน/ครั้ง โดยใช้ถุงกรองแพลงก์ตอน แล้วเก็บรักษาสภาพด้วย Lugal s' solution หลังจากนั้นนำมาจัดจำแนกชนิด

2.4 การแยกและจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีส

ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากดินพื้นบ่อ มาแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีสบนอาหาร Starch-Casein agar (Kuster and Williams, 1964) ที่เติม nystatin 25 µg/ml, cycloheximide และ nalidixic acid 10 µg/ml เพื่อช่วยข่มการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราปนเปื้อน คัดเลือกโคโลนีของแอคติโนมัยซีสมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการ restreak บนอาหารเดิม เก็บรักษาเชื้อบนอาหาร Yeast extract Malt extract agar (Shirling and Gottlieb, 1966) และในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Wellington and Williams, 1978)

2.5 ตรวจสอบชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงปลา

2.5.1 ตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้เจือจางลำดับส่วน และ spread ลงในอาหาร plate count agar และอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะบางชนิด (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลีโคไลน)

2.5.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำ โดยใช้เทคนิค DGGE (Muyzer *et al.*, 1993) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ ณ ช่วงเวลาต่างๆ จำนวน 8 ช่วงเวลา รวมเป็นตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่าง (ดำเนินการเฉพาะชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ซึ่งสามารถย่อยสลายกลีโคไลน)

2.6 การเก็บข้อมูล

สุ่มวัดความยาว และน้ำหนัก ในแต่ละชุดการทดลอง ทุกๆ 30 วัน/ครั้ง เพื่อทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต และเพื่อคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการรอด และผลผลิตตามวิธีของ Bagenal (1978) ดังนี้

1. น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

= น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง

2. อัตราน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)

=
$$\frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

3. อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (กรัม/วัน) (ADG)

=
$$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{จำนวนวัน}}$$

4. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR)

=
$$\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ให้}}{\text{น้ำหนักสัตว์น้ำที่เพิ่ม}}$$

5. ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion efficiency, FCE)

$$= \frac{\text{น้ำหนักสัตว์น้ำที่เพิ่ม}}{\text{น้ำหนักของอาหารที่กิน}} \times 100$$

6. อัตราการรอด (%)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

7. ผลผลิต

$$= \text{น้ำหนักปลาสุดท้าย} \times \text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}$$

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหาความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำ แพลงก์ตอนพืช และแอคติโนมายซีสกับกลิ่นโคลนโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Regression ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS

4. สถานที่ทำการทดลองและ / หรือเก็บข้อมูล

1. บ่อเลี้ยงปลานิล มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. ห้องปฏิบัติการ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
3. ห้องปฏิบัติการ ศูนย์เครื่องมือขั้นสูง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทที่ 4

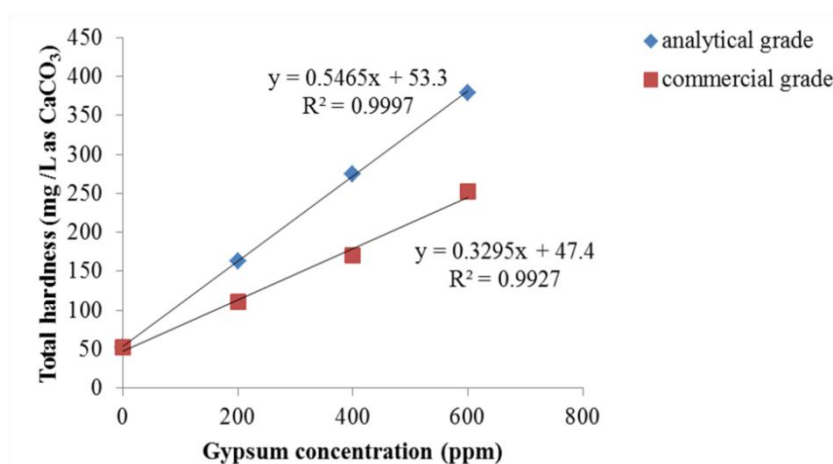
ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ปูนยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน

ประสิทธิภาพในการแตกตัวของยิปซัม

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการแตกตัวให้ค่าความกระด้างรวม (total hardness) ของยิปซัมในน้ำกลั่น โดยใช้ยิปซัมมาตรฐาน (analytical grade) และยิปซัมเกรดการค้า (commercial grade) พบว่า 1 มิลลิกรัมของยิปซัมมาตรฐาน (analytical grade) และยิปซัมเกรดการค้า (commercial grade) ให้ค่าความกระด้างรวม 0.546 และ 0.329 มิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต ตามลำดับ (ค่าสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยิปซัมกับความกระด้างทั้งหมดแสดงในภาพ 4-1) ซึ่งยิปซัมเกรดการค้า (commercial grade) ที่ได้จากโรงไฟฟ้าแม่เมาะมีการปนจากสารประกอบอื่นอีกด้วย



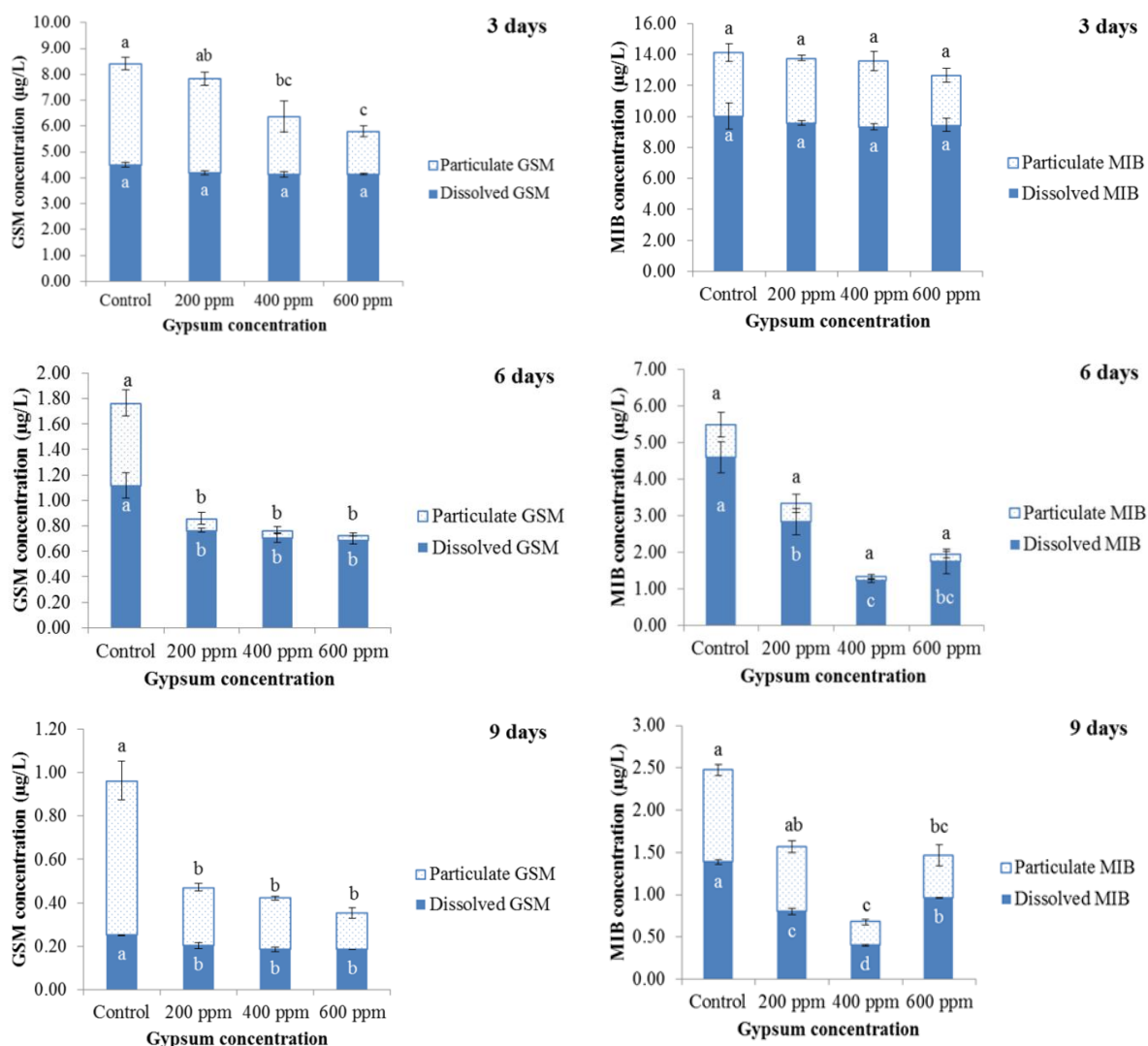
ภาพ 4-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยิปซัมกับความกระด้างทั้งหมด

การใช้ยิปซัมเกรดการค้า (commercial grade) ที่ได้จาก โรงไฟฟ้าแม่เมาะเพื่อการลดจืออสมินและเอ็มไอบี

จากการทดลอง พบว่าวันที่ 3 ของการทดลองมีปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งการทดลองนี้จะทำการเติมสารมาตรฐานจืออสมินและเอ็มไอบี 5 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจากว่าน้ำที่นำมาทดลองเป็นน้ำจากบ่อบำบัดที่มีระยะเวลาการเลี้ยงมาเป็นเวลา 5 เดือน จึงมีปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีในน้ำอยู่แล้ว เมื่อทำการเติมสารมาตรฐานจืออสมินและเอ็มไอบีลงไป จึงทำให้มีปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีมากกว่า 5 ไมโครกรัมต่อลิตร

สำหรับการทดลองในครั้งนียิปซัมสามารถลดทั้งจืออสมินและเอ็มไอบีในน้ำได้ทั้งในรูป particulate form และ dissolved form (ภาพ 4-2 และ 4-3) ซึ่งยิปซัมสามารถลดจืออสมินและเอ็มไอบีในรูป particulate form ได้ โดยยิปซัมสามารถแตกตัวได้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และไปรวมตัวกับแพลงก์ตอนพืชซึ่งเป็นประจุลบ ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนที่มี

น้ำหนักรที่เรียกว่าฟล็อกหรือเป็นตะกอนเล็กๆจมลงข้างล่าง ทำให้กลิ่นโคลนที่อยู่ในเซลล์แฟลงก์ตอนพืชลดน้อยลงไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sun *et al.* (2013) ที่ใช้โพลีลูมิเนียมคลอไรด์ไปตกตะกอน *Microcystis aeruginosa* เพื่อลดปริมาณสารพิษในน้ำในขั้นตอนการผลิตน้ำประปา ถึงแม้ว่าในวันที่ 9 ปริมาณจีโอสมินในรูป particulate form จะมีค่ามากกว่าวันที่ 6 เนื่องจากการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีแกมมาเงินบางชนิดที่ผลิตกลิ่นโคลน ทำให้ตรวจพบปริมาณจีโอสมินในรูป particulate form เพิ่มขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบีทั้งหมดมีปริมาณต่ำสุดในวันที่ 9 ของการทดลอง



ภาพ 4-2 ปริมาณจีโอสมิน (µg/L) ในวันที่ 3 6 และ 9 ของการทดลอง

ภาพ 4-3 ปริมาณเอ็มไอบี (µg/L) ในวันที่ 3 6 และ 9 ของการทดลอง

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในกราฟแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

สำหรับเปอร์เซ็นต์การลดกลิ่นโคลนเป็นการคำนวณโดยใช้ชุดการทดลองที่เติมยิปซัมเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละวัน ซึ่งพบว่ายิปซัมทุกความเข้มข้นสามารถลดกลิ่นโคลนได้ดีในวันที่ 6 (ตาราง 4-1) และประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดจืออสมินและเอ็มไอบีตลอดการทดลอง เมื่อคิดเป็นความเข้มข้นของยิปซัม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่ายิปซัมที่ความเข้มข้น 200 400 และ 600 ppm มีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm มีประสิทธิภาพการลดกลิ่นโคลนได้ดีที่สุดและสามารถลดเอ็มไอบีได้มากกว่าจืออสมิน (ตาราง 4-2) ซึ่งเกิดจากยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถละลายและแตกตัวได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ

ตาราง 4-1 เปอร์เซ็นต์การลดกลิ่นโคลน (จืออสมินและเอ็มไอบี) ด้วยยิปซัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในแต่ละวัน (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

วันที่ทำการทดลอง	Total GSM			Total MIB		
	200 ppm	400 ppm	600 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm
3	6.92 $\pm$ 4.87 ^a	24.25 $\pm$ 10.65 ^{ab}	31.11 $\pm$ 4.11 ^b	2.62 $\pm$ 2.00 ^a	3.89 $\pm$ 2.88 ^a	10.43 $\pm$ 6.59 ^a
6	51.32 $\pm$ 4.26 ^a	56.50 $\pm$ 2.61 ^a	58.47 $\pm$ 5.39 ^a	39.15 $\pm$ 13.93 ^a	75.63 $\pm$ 2.95 ^b	64.64 $\pm$ 13.56 ^{ab}
9	51.14 $\pm$ 5.19 ^a	56.14 $\pm$ 1.60 ^{ab}	63.41 $\pm$ 4.56 ^b	36.67 $\pm$ 7.61 ^a	72.68 $\pm$ 1.74 ^b	40.79 $\pm$ 9.19 ^{ab}

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

ตาราง 4-2 ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดกลิ่นโคลน (จืออสมินและเอ็มไอบี) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ความเข้มข้นของยิปซัม (mg/l)	ประสิทธิภาพการลดกลิ่นโคลน	
	จืออสมิน (ng/l)/ ยิปซัม 1 mg/l	เอ็มไอบี (ng/l)/ ยิปซัม 1 mg/l
200	3.30 $\pm$ 0.63 ^a	5.71 $\pm$ 2.63 ^a
400	2.98 $\pm$ 1.11 ^a	5.42 $\pm$ 2.64 ^a
600	2.37 $\pm$ 1.02 ^a	3.35 $\pm$ 1.30 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

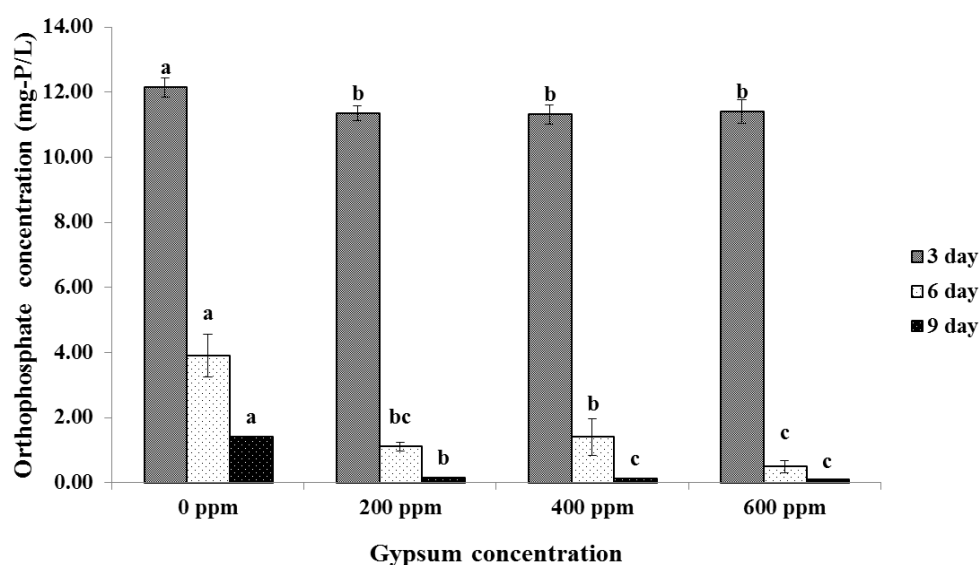
ผลของยิปซัมต่อความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เอ พบว่าประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดคลอโรฟิลล์เอ โดยความเข้มข้นของยิปซัมทั้ง 3 ความเข้มข้น (200, 400 และ 600 mg/l) สามารถลดคลอโรฟิลล์เอในน้ำได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยคิดเป็นความเข้มข้นของยิปซัม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นที่ 200, 400 และ 600 mg/l มีประสิทธิภาพการลดคลอโรฟิลล์เอ 1.26 $\pm$ 0.25 1.16 $\pm$ 0.22 และ 0.74 $\pm$ 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตาราง 4-3)

ตาราง 4-3 ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดคลอโรฟิลล์เอ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

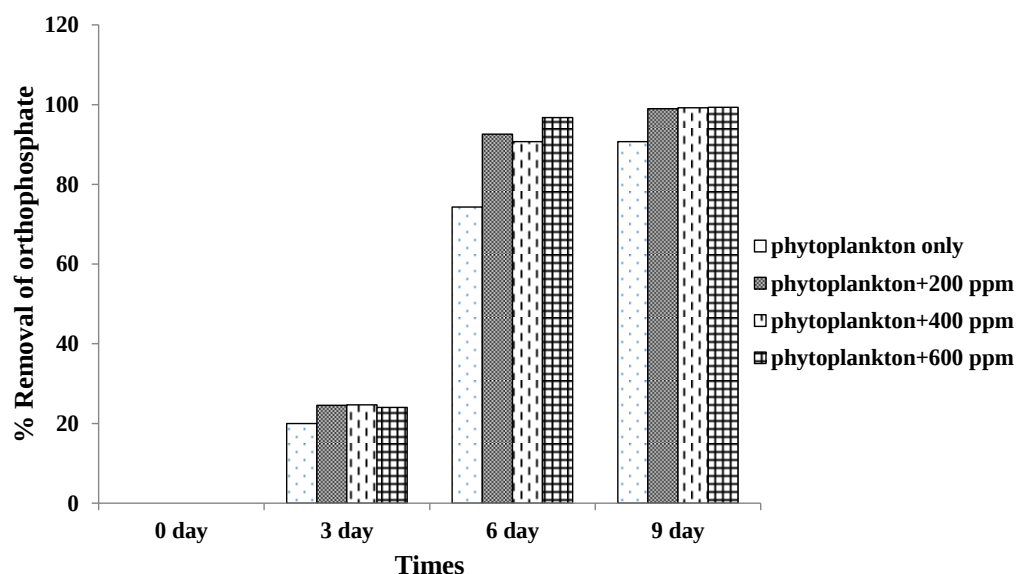
ความเข้มข้นของยิปซัม (mg/l)	ประสิทธิภาพการลดคลอโรฟิลล์เอ $\mu\text{g/L/ยิปซัม 1 mg/l}$
200	1.26 ± 0.25^a
400	1.16 ± 0.22^a
600	0.74 ± 0.29^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในสมมติเดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

ผลของยิปซัมต่อความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตที่ละลายน้ำ พบว่า ชุดการทดลองที่เติมยิปซัมสามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมยิปซัม โดยยิปซัมสามารถแตกตัวได้แคลเซียม (Ca^{2+}) และไปจับกับออร์โธฟอสเฟต (PO_4^{3-}) กลายเป็นแคลเซียมฟอสเฟต (Boyd, 1982; Wu and Boyd, 1990) ส่งผลให้ความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตลดลง (ภาพ 4-4) และชุดการทดลองที่เติมยิปซัมสามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้ดีในวันที่ 6 ของการทดลอง โดยชุดควบคุมสามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้ 74.3 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 400 และ 600 ppm สามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้ 92.55 90.67 และ 96.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพ 4-5) สำหรับชุดควบคุมที่สามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้ เนื่องจากว่าน้ำในการทดลองครั้งนี้เป็นน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา ซึ่งมีสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอาศัยอยู่ เช่น แพลงก์ตอนพืช จุลินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ต้องใช้ฟอสฟอรัสในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ เพื่อการเจริญเติบโตและดำรงชีพ โดยดวงพร (2545) กล่าวว่า การสร้างเซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบไปด้วย คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและกำมะถัน ซึ่งควรมีอัตราส่วนเท่ากับ 100:10:1:1 นอกจากนี้สารประกอบออร์โธฟอสเฟตหรือนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้นั้น แพลงก์ตอนพืชและพืชน้ำสามารถนำไปใช้เพื่อการเติบโตได้ดี (Huang and Hong, 1999; Gardolinski *et al.*, 2004) จึงทำให้ความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟตของชุดควบคุมมีค่าต่ำลง แต่ถึงอย่างไรก็ตามชุดการทดลองที่เติมยิปซัมสามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้ดีกว่าชุดควบคุม



ภาพ 4-4 ความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตที่ละลายน้ำ (mg-P/l)



ภาพ 4-5 เปอร์เซนต์การลดออร์โธฟอสเฟต

สำหรับคุณภาพน้ำปัจจัยอื่นๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดย pH มีค่าเฉลี่ย 8.58 ± 1.78 อุณหภูมิมีค่าเฉลี่ย 26.71 ± 0.19 องศาเซลเซียส แอมโมเนียรวมมีค่าเฉลี่ย 0.53 ± 0.31 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ไนไตรท์มีค่าเฉลี่ย 0.47 ± 0.74 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และไนเตรทมีค่าเฉลี่ย 11.18 ± 8.99 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (ตาราง 4-4)

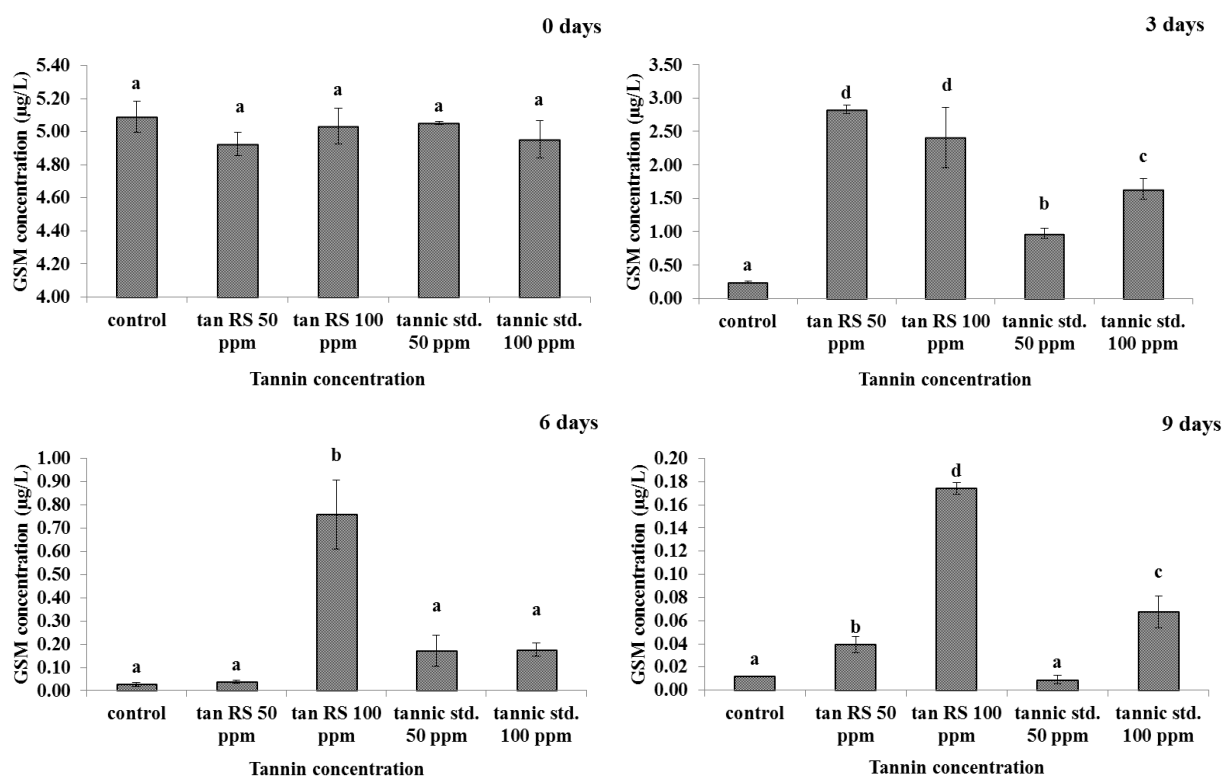
ตาราง 4-4 ค่าเฉลี่ยและต่ำสุด-สูงสุดของคุณภาพน้ำในความเข้มข้นยิปซัมที่ต่างกัน (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

คุณภาพน้ำ	ค่าเฉลี่ย	ต่ำสุด-สูงสุด
pH	8.58 ± 1.78	6.68 - 10.43
อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	26.71 ± 0.19	26.4 - 26.8
แอมโมเนียรวม (mg-N/L)	0.53 ± 0.31	0.24 - 0.96
ไนไตรท์ (mg-N/L)	0.47 ± 0.74	0.003 - 1.61
ไนเตรท (mg-N/L)	11.18 ± 8.99	2.57 - 22.88

ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน

การใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน พบว่าน้ำฟางข้าวไม่สามารถลดจืออสมินได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเพื่อเป็นการยืนยันผลในการทดลองว่าแทนนินในน้ำฟางข้าวไม่สามารถลดจืออสมินได้จึงได้มีการทดลองสารละลายมาตรฐานของแทนนินในการทดลองนี้ ซึ่งปรากฏว่าชุดการทดลองสารละลายมาตรฐานของแทนนินก็ไม่สามารถลดจืออสมิน (ภาพ 4-6) สำหรับสารประกอบเอ็มไอบีในน้ำพบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.005$) ในวันที่เริ่มต้นการทดลอง และวันที่ 3 ของการทดลอง แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในวันที่ 6 และ 9 ของการทดลอง โดยชุดแทนนินจากข้าวฟาง 50 ppm สามารถลดปริมาณเอ็มไอบีได้ดีที่สุด

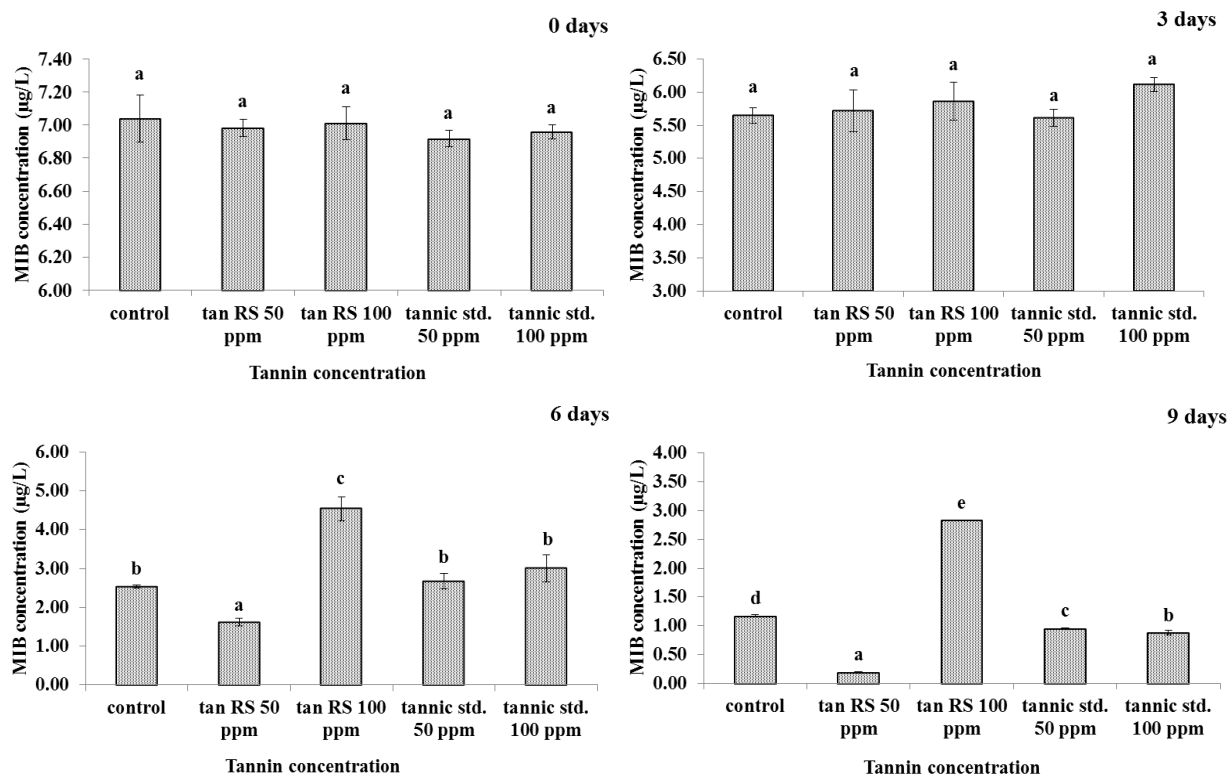
รองลงมาคือ สารละลายมาตรฐานแทนนินที่ 50 และ 100 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ชุดแทนนินจากข้าวฟ่าง 100 ppm สามารถลดปริมาณเอเอ็มไอบีได้ต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าแทนนินจากข้าวฟ่างในความเข้มข้นสูงมีประสิทธิภาพในการลดเอเอ็มไอบีได้ต่ำ (ภาพ 4-7)



ภาพ 4-6 ปริมาณจือสมิน (µg/L) ในวันที่ 0 3 6 และ 9 ของการทดลอง

(tan RS คือ แทนนินจากน้ำฟางข้าว และ tannic std. คือ สารละลายมาตรฐานของแทนนิน)

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในกราฟแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test



ภาพ 4-7 ปริมาณเอ็มไอบี (µg/L) ในวันที่ 0 3 6 และ 9 ของการทดลอง

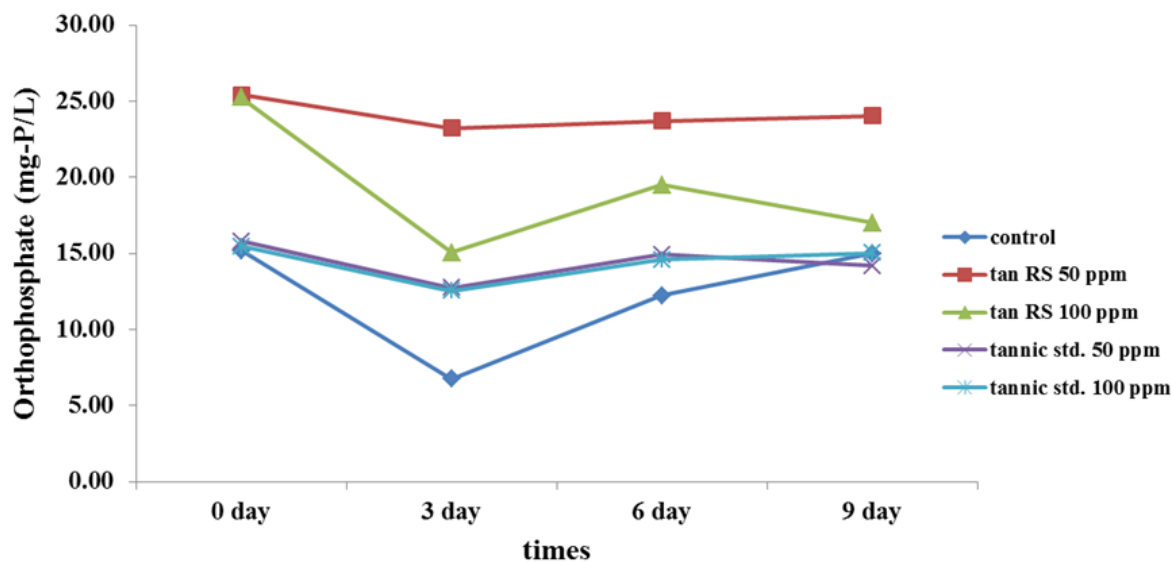
(tan RS คือ แทนนินจากน้ำฟางข้าว และ tannic std. คือ สารละลายมาตรฐานของแทนนิน)

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในกราฟแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

สำหรับผลของฟางข้าวต่อคุณภาพน้ำ พบว่าแทนนินไม่มีผลต่อความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟต เนื่องจากแทนนินที่เติมลงไปนั้นไม่สามารถลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแทนนิน ซึ่งมีความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตน้อยที่สุด (ภาพ 4-8) แต่อย่างไรก็ตามแทนนินมีผลต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม โดยความเข้มข้นแอมโมเนียมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งชุดควบคุมมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียสูงที่สุดตลอดการทดลอง ในขณะที่ชุดแทนนินจากฟางข้าวมีค่าความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำสุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ภาพ 4-9) สำหรับคุณภาพน้ำปัจจัยอื่นๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตาราง 4-5)

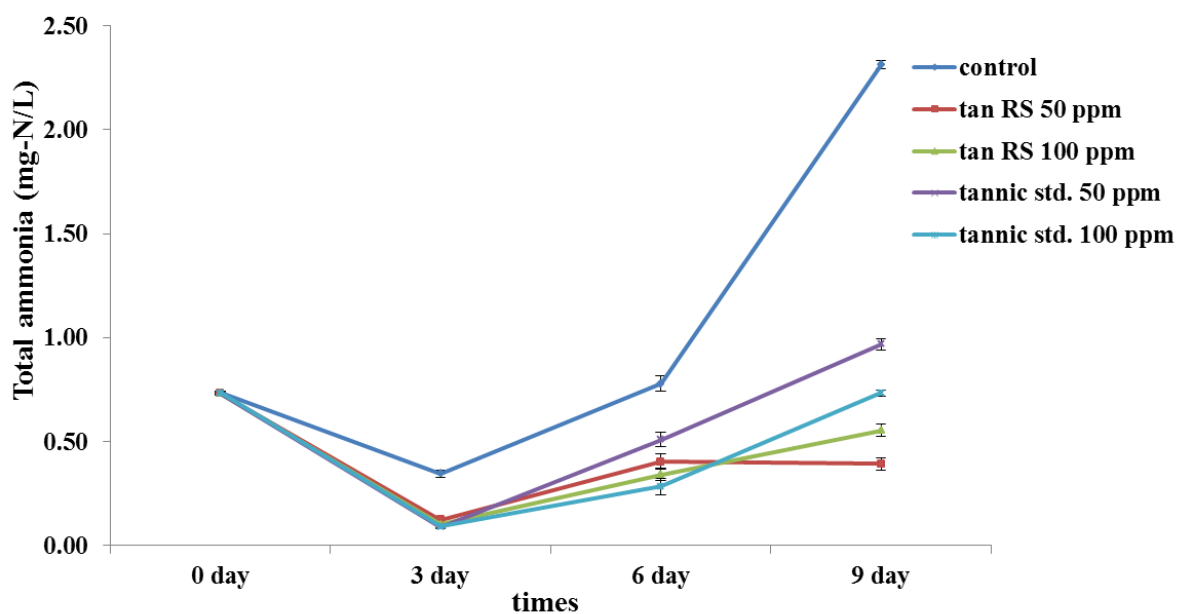
จากการศึกษาพบว่าแทนนินสามารถลดความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำได้ แต่ไม่ควรใส่แทนนินในบ่อปลาเกิน 5 ppm เนื่องจากการเติมแทนนินในบ่อปลาในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลต่อ pH ของน้ำ ทำให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในน้ำ และปลาได้ ถ้าในกรณีที่แอมโมเนียในบ่อมีปริมาณสูง แนะนำให้เติมแทนนินในบ่อครั้งละ 5 ppm แต่เติมถี่ๆ โดยอาจจะเติมติดต่อกันเป็นเวลา 3-5 วัน เพราะความเข้มข้นแทนนินจะลดลง

เมื่อมีแอมโมเนียปริมาณสูง ดังนั้นการเติมแทนนินติดต่อกันหลายวันในช่วงที่มีปริมาณแอมโมเนียสูง จึงไม่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำและปลาในบ่อ



ภาพ 4-8 ความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตที่ละลายน้ำ (mg-P/l)

(tan RS คือ แทนนินจากน้ำฟางข้าว และ tannic std. คือ สารละลายมาตรฐานของแทนนิน)



ภาพ 4-9 ความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมในน้ำทดลอง (mg-N/L)

(tan RS คือ แทนนินจากน้ำฟางข้าว และ tannic std. คือ สารละลายมาตรฐานของแทนนิน)

ตาราง 4-5 คุณภาพน้ำในการทดลอง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

คุณภาพน้ำ	ชุดการทดลอง				
	control	tan RS	tan RS	tannic std.	tannic std.
		50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm
pH	7.73 $\pm$ 0.73	7.67 $\pm$ 0.60	7.45 $\pm$ 0.74	7.03 $\pm$ 0.63	6.76 $\pm$ 0.62
อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	25.13 $\pm$ 0.83	25.18 $\pm$ 1.00	25.43 $\pm$ 1.32	25.20 $\pm$ 1.13	25.37 $\pm$ 1.36
ไนโตรเจน (mg-N/L)	0.31 $\pm$ 0.30	0.50 $\pm$ 0.41	0.09 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.12	0.14 $\pm$ 0.13
ไนเตรท (mg-N/L)	30.22 $\pm$ 20.94	36.94 $\pm$ 18.35	17.04 $\pm$ 11.80	26.32 $\pm$ 18.50	22.65 $\pm$ 17.84
คลอโรฟิลล์เอ (µg/L)	1,043 $\pm$ 420	1,694 $\pm$ 337	1,648 $\pm$ 699	863 $\pm$ 492	1,336 $\pm$ 528

tan RS คือ แแทนนินจากน้ำฟางข้าว และ tannic std. คือ สารละลายมาตรฐานของแทนนิน

การศึกษาเพิ่มเติม

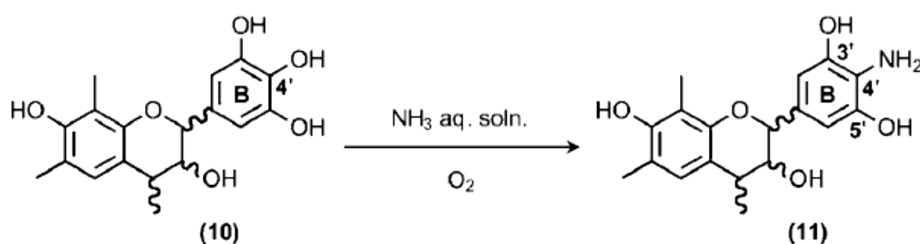
จากการทดลองการใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน ปรากฏว่าแทนนินไม่สามารถลดกลิ่นโคลนได้ แต่แทนนินเป็นที่น่าสนใจคือสามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ จึงได้ทำการศึกษา

ผลของความเข้มข้นของแทนนินต่อการลดแอมโมเนีย

จากข้อมูลที่ได้ในภาพ 4-9 เป็นที่น่าสนใจว่า น้ำฟางข้าวสามารถลดแอมโมเนียในน้ำได้จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเพื่อยืนยันผล โดยทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นและเติมแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งแอมโมเนีย ซึ่งอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 24.7-26.4 $^{\circ}$ C ในระหว่างการทดลอง มีการวัด pH และ แอมโมเนียที่ 0, 0.5, 3 และ 6 ชั่วโมง

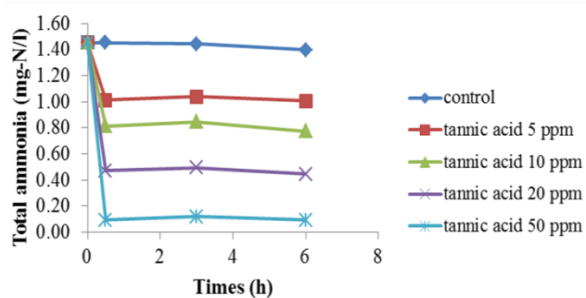
ผลการทดลอง

แทนนินจากสารละลายมาตรฐาน (tannic acid) และแทนนินจากน้ำฟางข้าวสามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง ดังนั้นแทนนินสามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำได้ (ภาพ 4-10 และ 4-11) โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Hashida *et al.* (2009) ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาดังนี้

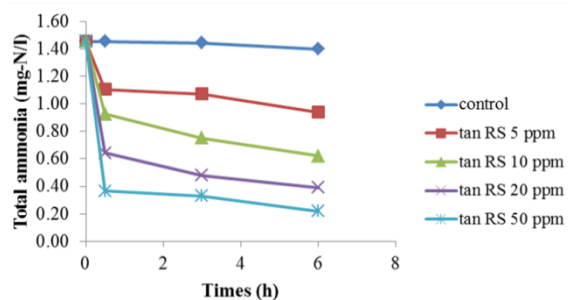


Amination of *A. mearnsii* tannin (prorobinetinidin, 10) by NH_3 treatment.

ที่มา: Hashida *et al.* (2009)

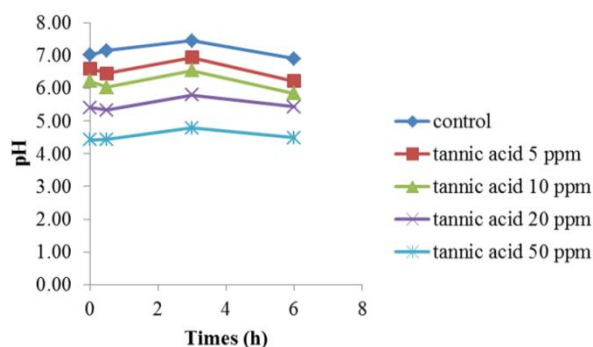


ภาพ 4-10 การลดแอมโมเนียด้วยสารละลายมาตรฐานแทนนิน (tannic acid) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

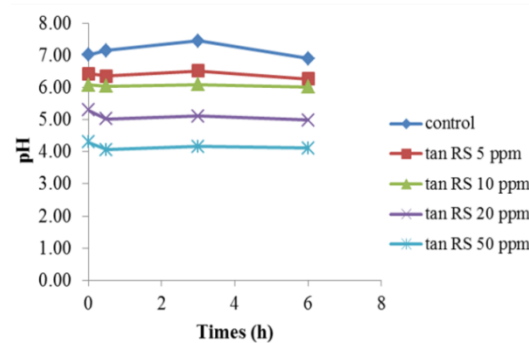


ภาพ 4-11 การลดแอมโมเนียด้วยแทนนินจากน้ำฟางข้าวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

สำหรับ pH พบว่าค่า pH ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของแทนนิน (ภาพ 4-12 และ 4-13) ซึ่งในการนำแทนนินไปใช้ในการลดแอมโมเนียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรคำนึงถึงค่า pH ไม่ควรใช้แทนนินในความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจส่งผลให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้สัตว์น้ำเป็นอันตรายได้

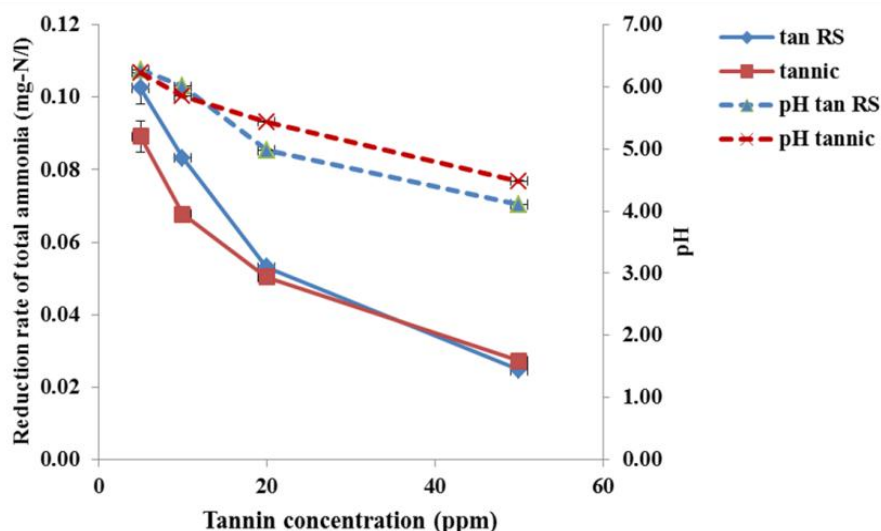


ภาพ 4-12 ค่า pH ในการใช้สารละลายมาตรฐานแทนนิน (tannic acid) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน



ภาพ 4-13 ค่า pH ในการใช้แทนนินจากน้ำฟางข้าวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เมื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของระดับแทนนิน (1 mg/l) ในอัตราการลดแอมโมเนียภายใน 6 ชั่วโมง ปรากฏว่าแทนนินจากน้ำฟางข้าวมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ดีมากเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานของแทนนิน และน้ำฟางข้าวที่ความเข้มข้น 5 ppm มีประสิทธิภาพลดแอมโมเนียสูงที่สุด คือ แทนนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดแอมโมเนียได้ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 4-14 และตาราง 4-6)



ภาพ 4-14 อัตราการลดแอมโมเนียในระดับแทนนินที่ต่างกันภายใน 6 ชั่วโมง

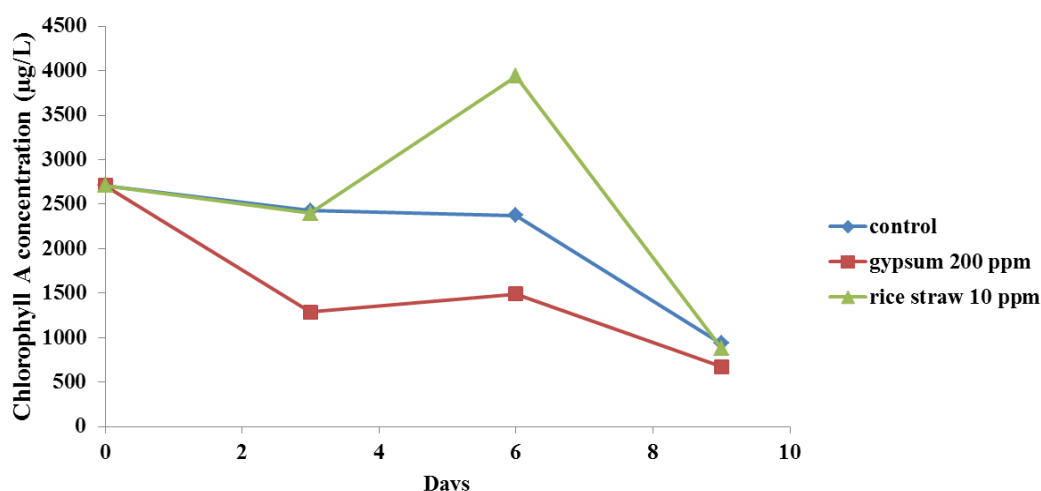
ตาราง 4-6 ประสิทธิภาพของระดับแทนนินในอัตราการลดแอมโมเนียภายใน 6 ชั่วโมง

Tannic std. (ppm)	Ammonia reduction rate (mg/l)/Tannin 1 mg/l	Rice straw water (ppm)	Ammonia reduction rate (mg/l)/Tannin 1 mg/l
5	0.09	5	0.10
10	0.07	10	0.08
20	0.05	20	0.05
50	0.03	50	0.02

การใช้ยิปซัมและน้ำฟางข้าวในการลดความเข้มข้น total nitrogen (TN) และ total phosphate (TP)

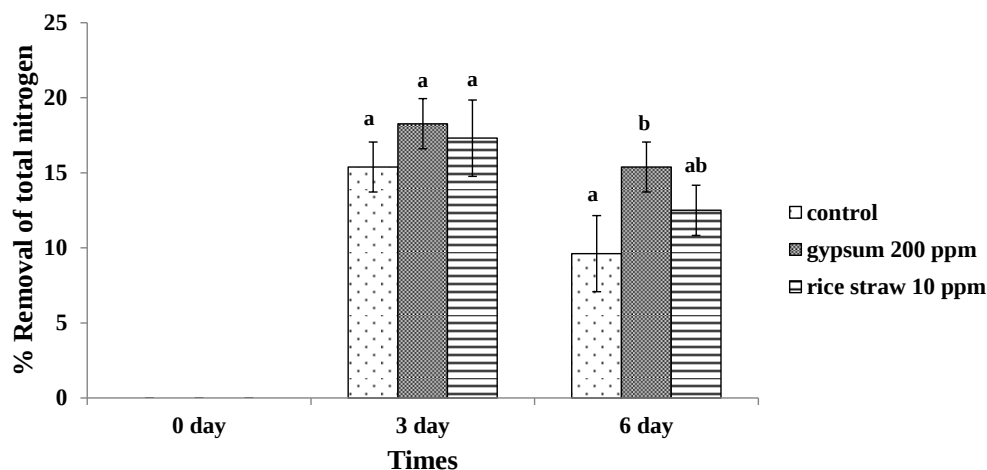
จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2 พบว่า ยิปซัมสามารถลดความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟต และแทนนินจากน้ำฟางข้าวสามารถลดความเข้มข้นแอมโมเนียได้ จึงทำการทดลองโดยนำน้ำจากบ่อปลาามาใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ใส่ปุ๋ย แพลงก์ตอนพืชสูตร BG11 เพื่อให้แพลงก์ตอนพืชมีการเจริญเติบโตได้ตามปกติ และติดหลอดไฟให้แสงที่ปริมาณแสง 5,000 – 6,000 ลักซ์ (สว่าง 16 ชั่วโมง และมีมืด 8 ชั่วโมง) ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลอง ทำ 3 ซ้ำคือ ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm และชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm

ผลการทดลอง พบว่าน้ำที่ทดลองมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอเริ่มต้น $2,713 \pm 60.36$ ไมโครกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm สามารถลดแพลงก์ตอนพืชได้ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm มีปริมาณแพลงก์ตอนพืชสูงขึ้นในวันที่ 6 ของการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามทุกชุดการทดลองมีปริมาณแพลงก์ตอนพืชน้อยลงในวันที่ 9 ของการทดลอง เนื่องจากการตายของแพลงก์ตอนพืช (ภาพ 4-15)



ภาพ 4-15 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (µg/L) ในน้ำทดลอง

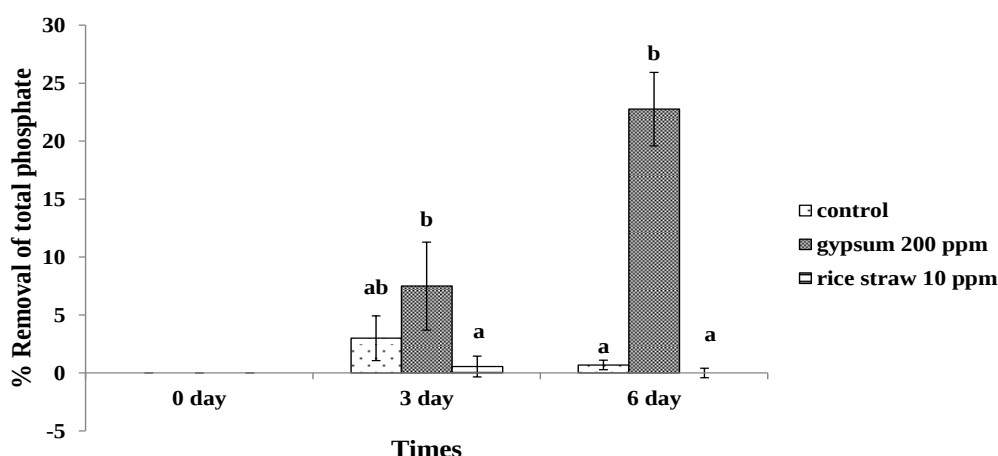
สำหรับเปอร์เซ็นต์การลด total nitrogen พบว่าวันที่ 3 ของการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm และชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm สามารถลด total nitrogen ได้ 15.38 18.27 และ 17.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และวันที่ 6 ของการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm สามารถลด total nitrogen ได้สูงสุดคือ 15.38 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm ที่สามารถลด total nitrogen ได้ 12.50 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมสามารถลด total nitrogen ได้ต่ำสุดคือ 9.62 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 4-16) โดยชุดควบคุมก็สามารถลด total nitrogen ได้เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในน้ำ อย่างเช่น จุลินทรีย์ แพลงก์ตอนพืช นาโนไตรเจนไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm และชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm สามารถลด total nitrogen ได้ดีกว่าชุดควบคุม เนื่องจากการทดลองที่ 1.2 แทนนินจากน้ำฟางข้าวสามารถลดแอมโมเนียได้ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm สามารถลด total nitrogen ได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm เนื่องจากยิปซัมสามารถลดแพลงก์ตอนพืชและความขุ่นในน้ำได้ (Wu and Boyd, 1990) ทำให้แพลงก์ตอนพืชและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก อย่างเช่น จุลินทรีย์ ตกลงสู่ก้นขวด ทำให้ไนโตรเจนในน้ำลดลง และจากการทดลอง 1.1 ยิปซัมไม่สามารถลดสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้ (แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท) ดังนั้นยิปซัมสามารถลด total nitrogen ในรูปของสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้



ภาพ 4-16 เปอร์เซนต์การลด total nitrogen

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในกลุ่มในแต่ละวันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

สำหรับเปอร์เซนต์การลด total phosphate พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ 3 และ 6 โดยวันที่ 3 ของการทดลอง ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm สามารถลด total phosphate ได้สูงสุดคือ 7.49 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm สามารถลด total phosphate ได้ 3.00 และ 0.28 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และวันที่ 6 ของการทดลอง ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm สามารถลด total phosphate ได้สูงสุดคือ 22.75 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm สามารถลด total phosphate ได้ 0.68 และ 0.00 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ภาพ 4-17) โดยชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm สามารถลด total phosphate ได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากยิปซัมสามารถลดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสได้ (Boyd, 1982) ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm ไม่สามารถลด total phosphate เนื่องจากมีการตรวจพบออร์โธฟอสเฟตในน้ำฟางข้าว จึงน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ชุดการทดลองที่เติมแทนนินจากน้ำฟางข้าว 10 ppm ไม่สามารถลด total phosphate ได้



ภาพ 4-17 เปอร์เซนต์การลด total phosphate

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในกลุ่มในแต่ละวันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

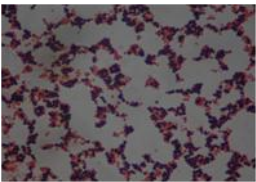
ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์

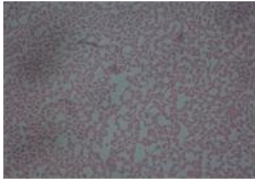
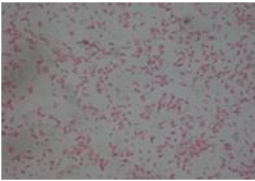
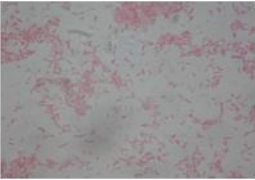
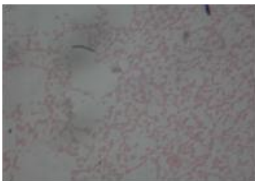
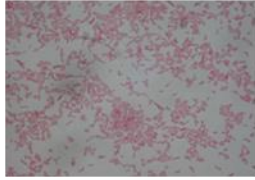
คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นโคลนในน้ำ ให้ได้จำนวน 5 ชนิด จากตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดกลิ่นโคลนได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลท โดยทำการทดสอบความปลอดภัยของเชื้อ ได้แก่การทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง และทดสอบกลุ่มสแตฟฟีโลค็อกคัส และทำการคัดแยกไอโซเลทนั้นๆ ออก ผลการทดลองพบว่า

1. ผลทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (Blood agar hemolysis) พบ γ hemolysis 22 ไอโซเลท เชื้อสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง อาหารจึงไม่พบรอยผิปกติขึ้นบริเวณรอบๆ โคโลนี β hemolysis 10 ไอโซเลท เชื้อสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์จะเกิดวงใสๆ (clear zone) ขึ้นรอบๆ โคโลนี และ α hemolysis จำนวน 11 ไอโซเลท เชื้อสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ อาหารจะเป็นสีคล้ำรอบๆ โคโลนี (ตาราง 4-7)

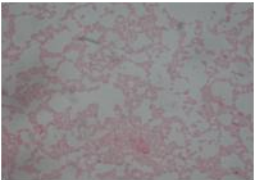
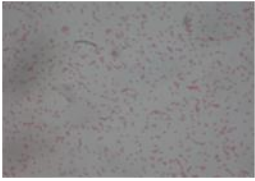
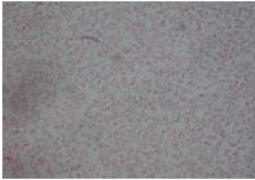
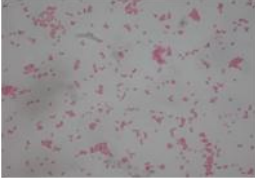
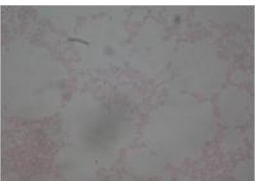
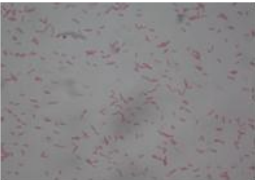
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	Hrs. 48
KY4	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่ แน่นอน นูน ขอบหยัก	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น เซลล์ เดี่ยว		γ	
LY1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม นูนขอบ เรียบ	แกรมบวก รูปร่าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม สร้างสปอร์		γ	

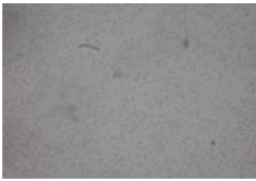
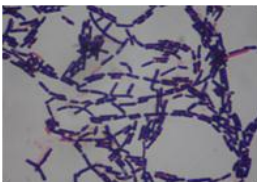
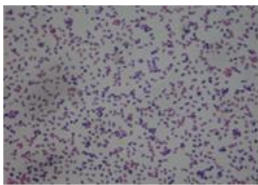
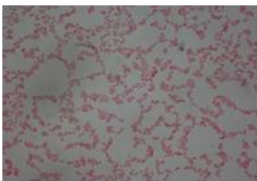
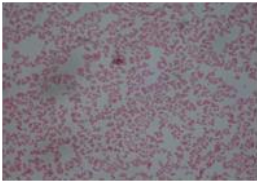
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
LY2	โคโลนีสีขาวใส วงกลม หนุน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		γ	
LY6	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบ เรียบ	แกรมบวก รูปร่าง กลม เซลล์เดี่ยว		γ	
LY5	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบ หยัก	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		β	
BY1	โคโลนีสีขาวใส วงกลม หนุน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่ง ปลายมน เซลล์เดี่ยว		α	
MY1	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่ แน่นอน หนุน ขอบหยัก	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		α	
TY1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		γ	

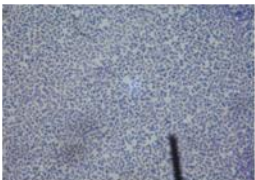
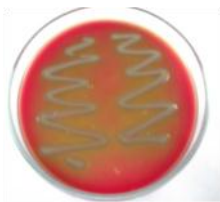
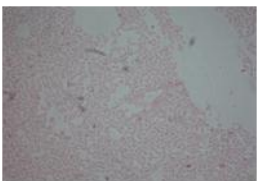
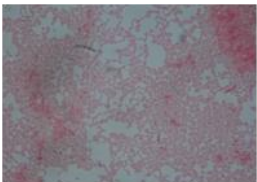
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
NY4	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		γ	
LY3	โคโลนีสีเหลือง วงกลม หนูน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น เซลล์เดี่ยว		γ	
LY5	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบ หยัก	แกรมบวก รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		β	
AY1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม		γ	
AY4	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม แบน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน ค่อนข้างกลม อยู่ เป็นกลุ่ม		γ	
BY2	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		α	

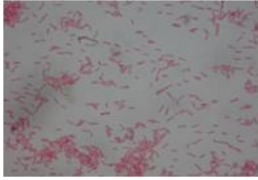
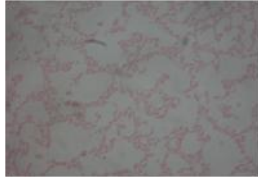
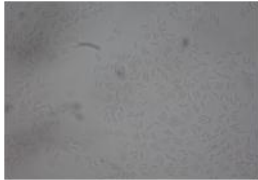
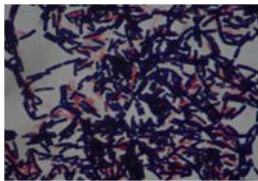
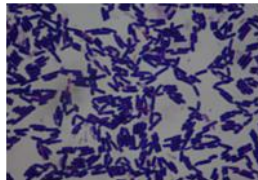
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
KY2	โคโลนีสีขาวใส วงกลม หนุน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน เซลล์เดี่ยว		γ	
PY2	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่าง แท่งยาว ปลายมน อยู่เป็นกลุ่ม สร้าง สปอร์		β	
LS5	โคโลนีสีเหลือง ขุ่น วงกลม หนุน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม		α	
LS4	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง กลม เซลล์เดี่ยว สร้างสปอร์		γ	
LS6	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม		γ	
BS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนุน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม		γ	

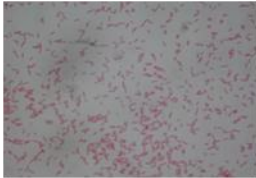
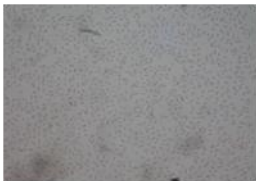
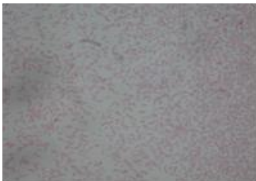
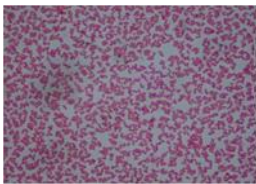
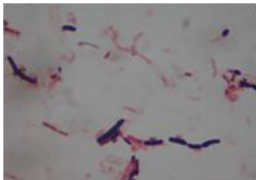
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
BS3	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ปลายมน เซลล์เดี่ยว		β	
JS1	โคโลนีสีขาวใส วงกลม ขนาด ไม่เกิน 1 มม. แบน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น ปลายมน อยู่ เป็นคู่		α	
PS2	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น ปลายมน อยู่ เป็นคู่		α	
PS3	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น อยู่เป็นกลุ่ม		α	
LY4	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่างแท่ง ปลายมน อยู่ เป็นกลุ่ม		γ	

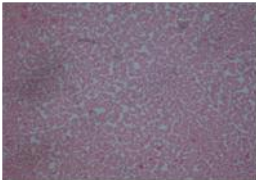
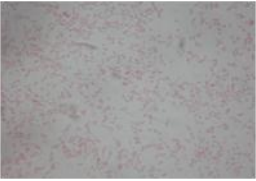
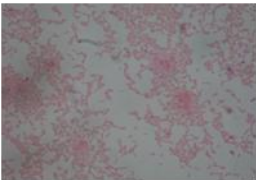
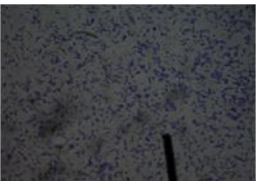
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
BY4	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม แบน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่ง ปลายมน อยู่ เป็นคู่		α	
BY3	โคโลนีสีขาวใส วงกลม หนูน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่กลุ่ม		γ	
MY2	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่แน่นอน แบน ขอบหยัก	แกรมบวก รูปร่าง แท่ง ปลายมน อยู่ เป็นกลุ่ม		β	
KY1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม แบน ขอบหยัก	แกรมบวก รูปร่าง แท่งยาว ปลายมน อยู่เป็นกลุ่ม สร้าง สปอร์		β	
KY3	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบ เรียบ	แกรมลบ รูปร่าง กลมรี อยู่เป็นคู่		γ	
PY3	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม ขนาดไม่ เกิน 1 มม. หนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่าง แท่งยาว ปลายมน อยู่เป็นกลุ่ม สร้าง สปอร์		β	

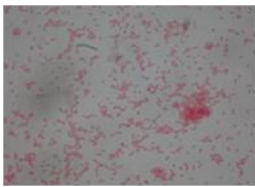
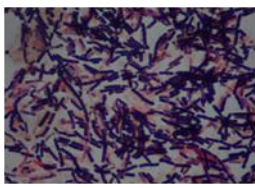
ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
AS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม ขนาดไม่เกิน 1 มม. แบน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่างแท่ง ปลายมน เซลล์เดี่ยว		α	
LS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม ขนาดไม่เกิน 1 มม. หนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ปลายมน เซลล์เดี่ยว		γ	
LS2	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม ขนาดไม่เกิน 1 มม. แบน ขอบหยัก	แกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น อยู่เป็นคู่		γ	
LS3	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบหยัก	แกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็นกลุ่ม		γ	
KS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม แบน ขอบหยัก	แกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ปลายมน อยู่เป็นคู่ สร้างสปอร์		β	

ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

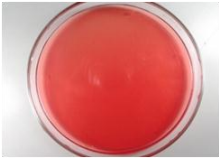
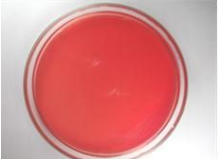
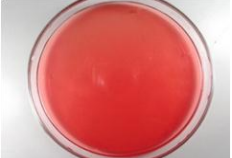
ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
BS2	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นกลุ่ม		γ	
MS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม แบน ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่าง แท่งสั้น ค่อนข้าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม		α	
MS2	โคโลนีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่ แน่นอน แบน ขอบหยัก	แกรมบวก รูปร่าง แท่งสั้น ปลายมน อยู่เป็นคู่		β	
PS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่าง แท่ง ปลายมน อยู่ เป็นกลุ่ม		γ	
NS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม หนูน ขอบหยัก	แกรมบวก รูปร่าง กลม อยู่เป็นกลุ่ม		α	

ตาราง 4-7 ผลการวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการทดสอบการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์		ผลการทดสอบอาหาร blood agar	
	ลักษณะ	ลักษณะ	รูป	ผล	48 Hr.
TS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม ขนาดไม่เกิน 1 มม. นูน ขอบเรียบ	แกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น ปลายมน เซลล์เดี่ยว		γ	
FS1	โคโลนีสีขาวขุ่น วงกลม นูน ขอบเรียบ	แกรมบวก รูปร่างแท่งยาว ปลายมน อยู่เป็นกลุ่ม สร้างสปอร์		β	

2. ผลทดสอบเชื้อกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัส โดยใช้อาหาร Mannitol salt agar ทดสอบกับเชื้อที่มีลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์คล้ายกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัสที่มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ทั้งหมด 6 ไอโซเลท พบเชื้อจุลินทรีย์ 2 ไอโซเลท ให้ผลเป็น + คือ LY1 สามารถเจริญบนผิวหนังอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อสามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี ส่วนไอโซเลท BS1 สามารถเจริญบนอาหาร Mannitol salt agar ได้ โดยไม่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี จุลินทรีย์ 4 ไอโซเลท ให้ผลเป็น - ไม่สามารถเจริญบนผิวหนังอาหารเลี้ยงเชื้อได้ คือ LY6, LS6, AY1 และ LS3 คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป (ตาราง 4-8)

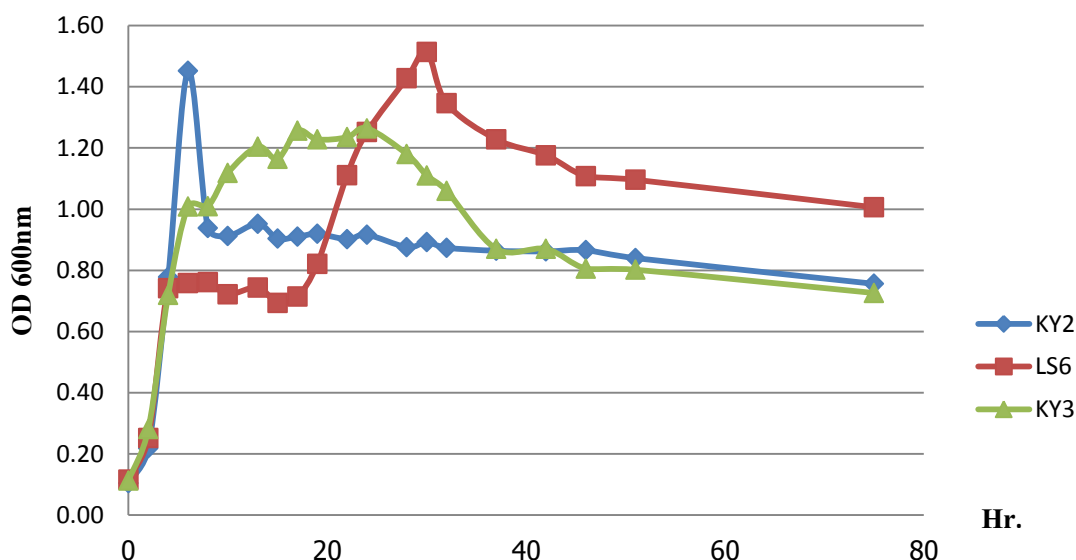
ตาราง 4-8 ผลทดสอบเชื้อกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัส

เชื้อ	ผล	
	การเจริญของเชื้อ	ผลการทดลองบนอาหาร Mannitol salt agar
LY6	-	
LS6	-	
AY1	-	
LS3	-	
BS1	+	
LY1	+	

การทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการคัดเลือกใช้จุลินทรีย์เบื้องต้น (เชื้อที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง และไม่ใช้เชื้อกลุ่มสแตฟิโลค็อกคัส) ได้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระยะเวลาต่างๆ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหาร yeast extract (YE) (0.1%) – peptone (0.1%) เก็บตัวอย่างเชื้อวัดค่า DO 600nm เริ่มต้น และทุกๆ 2 ชั่วโมง พบว่าหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อมีปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น

อย่างรวดเร็ว เข้าสู่ log phase เชื้อส่วนใหญ่มีปริมาณเซลล์สูงสุดที่เวลา 16-24 ชั่วโมง บางชนิดเจริญสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง และหลังจาก 48 ชั่วโมง เริ่มมีปริมาณเซลล์ที่ลดน้อยลง (ภาพ 4-18)



ภาพ 4-18 อัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร yeast extract

2. ผลการกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะเลียงเชื้อแต่ละไอโซเลทในอาหาร YE ที่เดิมสารมาตรฐานจีออสมินหรือเอ็มไอบี และปรับความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 1.00 mg/L วิเคราะห์หาปริมาณสารจีออสมิน หรือเอ็มไอบี โดยใช้เครื่อง GC/MS พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมินในไอโซเลท LS3 มีค่ามากที่สุด โดยลดปริมาณจีออสมินลงถึง 87.34 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือตัวอย่าง PS1 และ BS2 โดยสามารถลดจีออสมิน 85.80 และ 85.08 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตาราง 4-9) ประสิทธิภาพการย่อยสลายจะมีค่ามากขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมินของ TS1, PS1 และ LY6 มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 92.16, 91.08 และ 90.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบในตัวอย่างที่ใช้เชื้อ LS6 มีค่ามากที่สุด โดยลดปริมาณเอ็มไอบีลง 67.65 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือตัวอย่าง LY2 และ LS4 โดยสามารถลดเอ็มไอบีลง 66.07 และ 65.20 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตาราง 4-10) ประสิทธิภาพการย่อยสลายจะมีค่ามากขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีของตัวอย่าง LS6, TS1 และ AY4 มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 76.61, 74.78 และ 73.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 4-9 ประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

% Geosmin removal 24 Hr.		% Geosmin removal 48 Hr	
Control	26.88 ± 9.30 ^g	Control	38.79 ± 6.53 ^j
LS3	87.34 ± 1.15 ^a	TS1	92.16 ± 1.17 ^a
PS1	85.80 ± 1.31 ^{ab}	PS1	91.08 ± 0.64 ^{ab}
BS2	85.09 ± 2.73 ^{ab}	LY6	90.96 ± 3.19 ^{ab}
AY1	82.69 ± 1.35 ^{ab}	AY1	87.98 ± 3.84 ^{ab}
LS4	82.68 ± 0.92 ^{ab}	LS4	87.75 ± 1.14 ^{ab}
TS1	82.57 ± 1.54 ^{ab}	LS6	87.61 ± 1.96 ^{ab}
LS6	81.05 ± 2.53 ^{ab}	TY1	83.54 ± 0.64 ^{bc}
LS2	80.23 ± 1.86 ^{ab}	AY4	81.66 ± 2.05 ^{cd}
KS3	78.76 ± 2.39 ^{bc}	LS2	80.15 ± 3.89 ^{cd}
LY2	76.48 ± 1.82 ^{bc}	LY2	77.52 ± 2.04 ^{de}
LY6	74.85 ± 0.94 ^{bc}	KY4	77.00 ± 0.28 ^{de}
TY1	73.63 ± 0.45 ^{cd}	KY3	76.92 ± 0.54 ^{de}
AY4	65.54 ± 1.47 ^{de}	LY3	75.54 ± 2.71 ^{de}
NY4	55.00 ± 11.33 ^{ef}	NY4	75.26 ± 1.88 ^{de}
LS1	54.09 ± 4.34 ^{ef}	KS3	75.00 ± 0.80 ^{de}
KY4	52.40 ± 5.06 ^f	BS2	73.83 ± 3.75 ^{ef}
BY3	49.71 ± 3.55 ^f	LS1	69.10 ± 1.50 ^{fg}
LY4	48.35 ± 0.58 ^f	LS3	67.76 ± 1.73 ^{gh}
KY3	46.72 ± 3.28 ^f	BY3	67.05 ± 2.76 ^{hi}
LY3	45.08 ± 2.43 ^f	LY4	63.45 ± 1.78 ⁱ

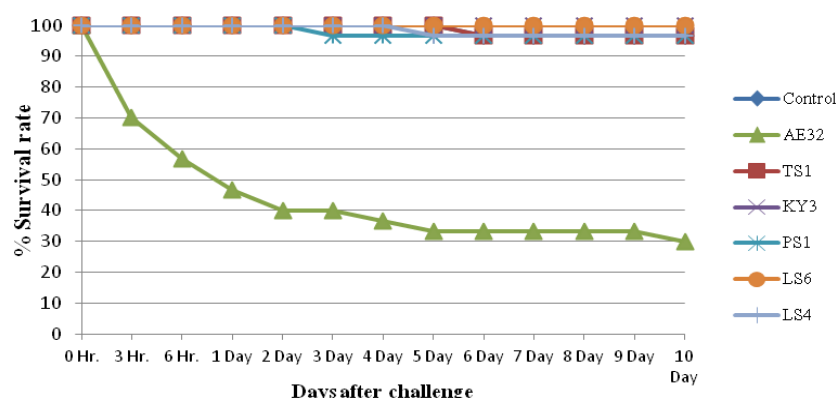
หมายเหตุ : พหุคูณระยะกำลังพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแต่ละชนิดของไอโซเลท (แนวตั้ง)

ตาราง 4-10 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

% MIB removal 24 Hr		% MIB removal 48 Hr	
Control	21.58 ± 9.37 ^{ef}	Control	27.26 ± 5.58 ^g
LS6	67.65 ± 7.20 ^a	LS6	76.61 ± 2.21 ^a
LY2	66.07 ± 3.26 ^{ab}	TS1	74.78 ± 2.01 ^{ab}
LS4	64.88 ± 3.94 ^{ab}	AY4	73.48 ± 1.70 ^{ab}
PS1	52.06 ± 2.00 ^b	LS4	70.30 ± 4.35 ^{ab}
LS3	51.18 ± 3.38 ^c	KY3	69.97 ± 0.70 ^{ab}
AY4	49.57 ± 1.29 ^c	KS3	69.81 ± 0.99 ^{ab}
KY4	49.04 ± 3.22 ^c	NY4	67.10 ± 3.18 ^{ab}
BS2	49.49 ± 0.71 ^c	LY3	67.33 ± 3.94 ^{ab}
LS2	49.04 ± 2.82 ^c	LY2	65.43 ± 1.91 ^b
AY1	45.00 ± 0.83 ^c	TY1	62.73 ± 1.02 ^c
TS1	44.36 ± 1.85 ^{cd}	BS2	61.61 ± 4.27 ^c
BY3	42.48 ± 1.80 ^{cd}	KY4	60.82 ± 1.06 ^c
TY1	42.22 ± 1.22 ^{cd}	BY3	60.79 ± 2.00 ^c
LY6	40.45 ± 1.57 ^{cd}	LS1	60.54 ± 3.10 ^c
KS3	39.68 ± 4.10 ^{cd}	LY6	59.91 ± 3.39 ^c
KY3	38.59 ± 3.91 ^{cd}	LS3	59.87 ± 4.37 ^c
LS1	31.75 ± 4.17 ^d	PS1	57.65 ± 3.36 ^d
NY4	30.67 ± 13.48 ^{de}	LS2	56.81 ± 5.39 ^d
LY3	29.20 ± 4.84 ^{de}	AY1	54.38 ± 4.10 ^e
LY4	16.28 ± 0.49 ^{ef}	LY4	50.02 ± 1.01 ^f

หมายเหตุ : พยัญชนะยกกำลังพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
ในแต่ละชนิดของไอโซเลท (แนวดิ่ง)

3. ผลการก่อโรคในตัวปลา (*In-vivo* test) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมินและเอ็มไอบีได้ดีที่สุด 5 ไอโซเลท คือ LS6, TS1, PS1, LS4 และ KY3 นำมาทดสอบการก่อโรคในตัวปลา โดยใช้ลูกปลานิลขนาด 15 กรัม จำนวน 20 ตัว เลี้ยงปลาเป็นเวลา 10 วัน พบว่าอัตราการรอดตายสะสมเฉลี่ยที่ 100.00, 100.00, 96.67, 96.67 และ 96.67 % ตามลำดับ โดยชุดควบคุม (ฉีดน้ำเกลือ) มีอัตราการรอดตาย 96.67% ในขณะที่เชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* (AE32) (Positive control) ทำให้ปลาตายลงถึง 70 % (ภาพ 4-19) ซึ่งสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่ทำให้ปลาตาย ซึ่งการตายที่เกิดขึ้นนั้น เกิดจากการบาดเจ็บขณะขนย้ายหรือเกิดจากการกัดกันเองของปลา ซึ่งไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อก่อโรค



ภาพ 4-19 อัตราการรอดตายสะสมเฉลี่ยของลูกปลานิล ที่ทดสอบการก่อโรคในตัวปลา ตั้งแต่เริ่มฉีดเชื้อจน ถึงวันที่ 10

การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์กำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์

การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ ทำได้โดยสกัด DNA เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ดีที่สุด 5 ไอโซเลท คือ KY3, LS6, TS1, PS1 และ LS4 ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ bacterial specific primer คือ 27 F และ 1492R ที่มีความจำเพาะกับ bacterial 16S rDNA Sequence จากนั้นหาลำดับเบส DNA และเปรียบเทียบลำดับเบส DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank และทำการ alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit ได้ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส DNA ดังต่อไปนี้

- ไอโซเลท TS1 ลำดับเบส DNA จำนวนเบสเท่ากับ 1393 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของไอโซเลท TS1 มีความคล้ายคลึงกับ *Achromobacter denitrificans* SM21 (99% similarity)

- ไอโซเลท KY3 ลำดับเบส DNA จำนวนเบสเท่ากับ 1385 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของไอโซเลท KY3 มีความเหมือนกับ *Delftia tsuruhatensis* (100% similarity)

- ไอโซเลท PS1 ลำดับเบส DNA จำนวนเบสเท่ากับ 849 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของไอโซเลท PS1 มีความคล้ายคลึงกับ *Comamonas* sp. 6.6 (99% similarity)

- ไอโซเลท LS6 ลำดับเบส DNA จำนวนเบสเท่ากับ 699 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของไอโซเลท LS6 มีความคล้ายคลึงกับ *Acinetobacter calcoaceticus* B40 (99% similarity)

- ไอโซเลท LS4 ลำดับเบส DNA จำนวนเบสเท่ากับ 843 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของไอโซเลท LS4 มีความคล้ายคลึงกับ *Raoultella ornithinolytica* B18 (99% similarity)

แบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดที่คัดเลือกได้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด รวมทั้งมีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำและผู้บริโภค จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายกลิ่นในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลา

1. ผลการทดลองประสิทธิภาพในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลที่มีการฆ่าเชื้อ การย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ ของเชื้อ คือ *Achromobacter denitrificans*, *Delftia tsuruhatensis*, *Comamonas* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, และ *Raoultella ornithinolytica* ที่มีเปอร์เซ็นต์ปริมาณเชื้อแตกต่างกันคือ 2, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น ที่ระดับ 2, 5, และ 10 % คือ 10^5 - 10^6 , 10^6 - 10^7 และ 10^7 CFU/ml ตามลำดับ) ในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ เติมน้ำมาตรฐานจืออสมินและเอ็มไอบี ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 1.00 mg/L วิเคราะห์หาปริมาณสารจืออสมินหรือเอ็มไอบี โดยใช้เครื่อง GC/MS ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

- การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลที่มีการฆ่าเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายจืออสมินโดยเชื้อ *Achromobacter denitrificans* มีประสิทธิภาพมากที่สุด 72.00-75.88 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4-11) โดยมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของเชื้อในน้ำเลี้ยงปลา ซึ่งจะพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงกว่าเชื้ออื่นๆรองลงมาคือเชื้อ *Delftia tsuruhatensis* สามารถย่อยสลายจืออสมินลงได้ 59.91-66.60 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการย่อยสลายจะมีค่ามากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยประสิทธิภาพการย่อยสลายจืออสมินของตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปริมาณจืออสมินลงถึง 79.91- 82.87 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) (ตาราง 4-11) แม้ว่าเชื้อ *Raoultella ornithinolytica* และ *Acinetobacter calcoaceticus* จะสามารถเจริญได้ดีในน้ำ (อัตราการเจริญมีค่าสูง เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 24 ชั่วโมง) แต่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายจืออสมินหรือเอ็มไอบีก็ไม่มากเท่ากับเชื้อตัวอื่นๆ (ภาพ 4-20 - 4-24)

ตาราง 4-11 ประสิทธิภาพการย่อยสลายจีออสมินในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่มีการฆ่าเชื้อ

		% removal Geosmin			
		24 Hr.		48 Hr.	
Control	-	6.90 ± 3.34	^{g A}	10.70 ± 3.59	^{j A}
<i>Achromobacter denitrificans</i>	2%	72.82 ± 2.43	^{a B}	79.91 ± 1.42	^{b A}
	5%	72.00 ± 4.65	^{a B}	82.31 ± 0.90	^{ab A}
	10%	75.88 ± 0.83	^{a B}	82.87 ± 1.23	^{a A}
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	2%	59.91 ± 0.38	^{c B}	63.49 ± 0.36	^{e A}
	5%	62.91 ± 0.32	^{bc B}	66.96 ± 0.38	^{d A}
	10%	66.60 ± 0.80	^{b A}	70.70 ± 0.70	^{c A}
<i>Comamonas sp.</i>	2%	53.57 ± 4.37	^{d B}	64.79 ± 2.35	^{de A}
	5%	63.29 ± 4.17	^{bc A}	67.44 ± 0.46	^{d A}
	10%	63.98 ± 0.67	^{bc B}	66.70 ± 0.40	^{d A}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2%	17.59 ± 6.60	^{f A}	22.56 ± 2.65	^{i A}
	5%	40.53 ± 1.31	^{e A}	41.59 ± 1.49	^{h A}
	10%	53.66 ± 0.94	^{d A}	54.14 ± 0.29	^{f A}
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2%	37.07 ± 0.93	^{e B}	41.38 ± 1.46	^{h A}
	5%	40.29 ± 0.99	^{e B}	44.55 ± 0.81	^{g A}
	10%	41.07 ± 2.01	^{e A}	44.10 ± 0.27	^{g A}

หมายเหตุ : พัยัญชนะยกกำลังพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์เชื้อที่ใช้ (แนวตั้ง)

พัยัญชนะยกกำลังพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแต่ละช่วงเวลา (แนวนอน)

ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบี พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายเอ็มไอบีโดยเชื้อ *Ach. denitrificans* มีประสิทธิภาพดีที่สุดเช่นกัน โดยปริมาณเอ็มไอบีลดลง 79.21-83.07 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4-12) รองลงมาคือเชื้อ *Delftia tsuruhatensis* สามารถย่อยสลายเอ็มไอบีได้ 60.56-70.68 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีจะมีค่ามากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยพบว่าอัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจากเดิมไม่มากนัก พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีของตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยปริมาณเอ็มไอบีลดลงถึง 85.33 และ 85.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 4-12)

ตาราง 4-12 ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่มีการฆ่าเชื้อ

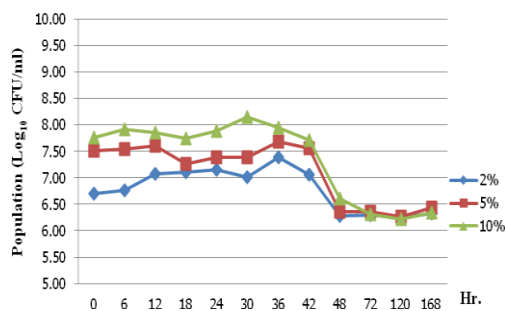
		% removal MIB	
		24 Hr.	48 Hr.
Control	-	15.96 ± 6.12 ^{j A}	18.58 ± 6.12 ^{k A}
<i>Achromobacter denitrificans</i>	2%	79.21 ± 3.14 ^{a B}	81.99 ± 3.14 ^{b A}
	5%	81.88 ± 0.19 ^{a B}	85.00 ± 0.19 ^{a A}
	10%	83.07 ± 0.84 ^{a A}	85.33 ± 0.84 ^{a A}
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	2%	67.10 ± 1.27 ^{b B}	69.90 ± 1.27 ^{cd A}
	5%	60.56 ± 0.94 ^{c B}	72.15 ± 0.94 ^{c A}
	10%	70.68 ± 0.59 ^{b B}	72.15 ± 0.59 ^{c A}
<i>Comamonas sp.</i>	2%	50.83 ± 0.68 ^{d B}	58.70 ± 0.68 ^{g A}
	5%	43.19 ± 1.08 ^{e B}	64.83 ± 1.08 ^{f A}
	10%	43.11 ± 1.61 ^{f B}	67.58 ± 1.61 ^{df A}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2%	24.03 ± 3.88 ^{h A}	26.67 ± 3.88 ^{j A}
	5%	25.37 ± 2.70 ^{h B}	32.14 ± 2.70 ^{i A}
	10%	34.27 ± 6.28 ^{g A}	38.22 ± 6.28 ^{h A}
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2%	17.36 ± 0.31 ^{ij A}	18.96 ± 0.31 ^{k A}
	5%	21.52 ± 1.35 ^{hi A}	24.19 ± 1.35 ^{j A}
	10%	22.71 ± 3.58 ^{h A}	24.83 ± 3.58 ^{j A}

หมายเหตุ : พัยัญชนะยกกำลังพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

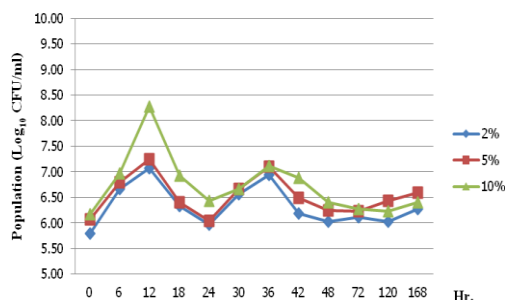
ในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์และเปอร์เซ็นต์เชื้อที่ใช้ (แนวตั้ง)

พัยัญชนะยกกำลังพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในแต่ละช่วงเวลา (แนวนอน)

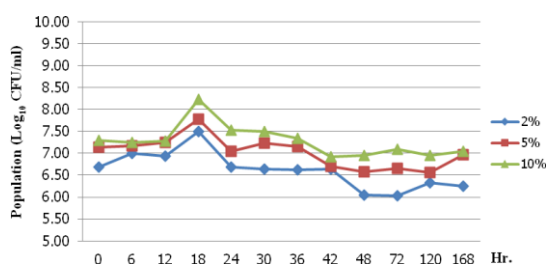
การทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่มีการฆ่าเชื้อ พบว่าระยะเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณเซลล์ ที่ระดับ 2, 5, และ 10 % คือ 10^5 - 10^6 , 10^6 - 10^7 และ 10^7 CFU/ml เมื่อระยะเวลาผ่านไป พบว่าเชื้อ *Ach. denitrificans* และ *Comamonas sp.* มีปริมาณค่อนข้างคงที่ ในขณะที่ *D. tsuruhatensis*, *Aci.calcoaceticus* และ *R. ornithinolytica* ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยเชื้อ *R. ornithinolytica* สามารถเจริญได้สูงที่สุด ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า 10^9 - 10^{10} CFU/ml และพบว่าปริมาณเซลล์ในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 10^6 - 10^7 CFU/ml หลังจากนั้นในแต่ละชุดการทดลอง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณเซลล์คงที่จนถึงเวลา 168 ชั่วโมง (ภาพ 4-(20-24))



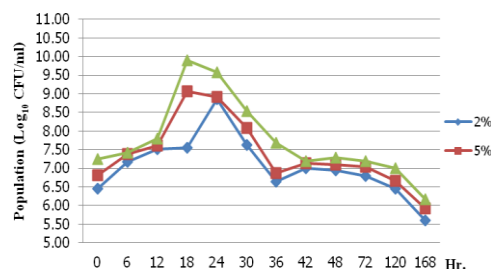
ภาพ 4-20 อัตราการเจริญของเชื้อ *Achromobacter denitrificans* ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว



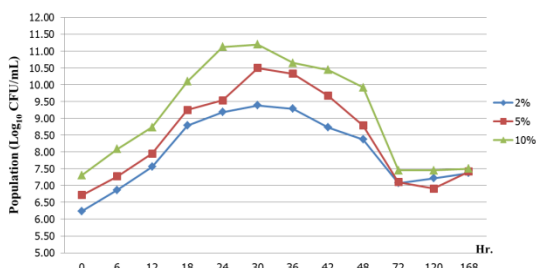
ภาพ 4-21 อัตราการเจริญของเชื้อ *Delftia tsuruhatensis* ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว



ภาพ 4-22 อัตราการเจริญของเชื้อ *Comamonas* sp. ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว



ภาพ 4-23 อัตราการเจริญของเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว



ภาพ 4-24 อัตราการเจริญของเชื้อ *Raoultella ornithinolytica* ในน้ำเลี้ยงปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล โดยเชื้อ *Achromobacter denitrificans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Delftia tsuruhatensis*, *Comamonas* sp. และ *Raoultella ornithinolytica* ที่เวลาต่างๆ ซึ่งได้ทำการคัดเลือกปริมาณเชื้อที่ใช้เริ่มต้นที่ทำให้ลดกลิ่นได้มากที่สุด ในปริมาณน้อยที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ (10^6 - 10^7 CFU/ml) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยสามารถลดปริมาณจืออสมินและเอมไอบีได้มากที่สุด และใกล้เคียงกับการทดลองในชุดการทดลอง 10 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) จึงใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองขั้นตอนต่อไป โดยผสมเชื้อลงในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล (ไม่มีการฆ่าเชื้อ) เติมสารมาตรฐานจืออสมินและเอมไอบีปรับความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 1 mg/L วิเคราะห์หาปริมาณสารจืออสมินหรือเอมไอบี โดยใช้เครื่อง GC/MS ได้ผลดังนี้

ประสิทธิภาพการย่อยสลายจืออสมินของเชื้อทุกชนิดมีค่าสูงขึ้น เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Comamonas* sp., *Ach. denitrificans* และ *R. ornithinolytica* ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดมากที่สุด โดยสามารถลดปริมาณจืออสมินลง 29.91, 29.58 และ 25.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p>0.05$) (ตาราง 4-13) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อนานขึ้นพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ณ เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เชื้อแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดจืออสมินลงได้เกือบ 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (4 วัน) ประสิทธิภาพก็เพิ่มสูงขึ้น โดยลดได้ถึงเกือบ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นไม่มากนัก จากการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง (7 วัน) พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดอยู่ที่ 83.57% โดยเชื้อทุกชนิดมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในขณะที่เดียวกันพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำอยู่แล้ว (ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อลงไป) มีความสามารถในการลดจืออสมินได้เช่นกัน โดยพบว่าในช่วงแรกอัตราการย่อยสลายต่ำมาก แต่เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายจืออสมินก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน จากการทดลองที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อในชุดควบคุมสามารถย่อยสลายจืออสมินได้ถึง 55.10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่านไป 7 วัน ประสิทธิภาพก็เพิ่มสูงขึ้นเป็น 68.97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการทดสอบปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่พบในน้ำทั้งหมดในแต่ละช่วงเวลาพบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในชุดควบคุม เมื่อเริ่มการทดลองมีปริมาณเซลล์ทั้งหมด 3.50×10^3 CFU/ml (ไม่มีการเติมเชื้อใดๆลงไป) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 24, 48, 96 และ 168 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เชื้อเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.06×10^4 , 3.90×10^4 , 3.40×10^5 และ 2.87×10^6 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งก็อาจมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายจืออสมินอยู่ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณจืออสมินในน้ำตัวอย่างลดลงได้เช่นกัน (ภาพ 4-25)

ประสิทธิภาพการย่อยสลายเอ็มไอบีของเชื้อทุกชนิดมีค่าสูงขึ้น เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับจืออสมิน โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Comamonas* sp. และ *Ach. denitrificans* มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยเอ็มไอบีมีค่าลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเอ็มไอบีลดลงเพียง 8.55 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4-14) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อนานขึ้นพบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ณ เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เชื้อแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดจืออสมินลงได้ 24.74-33.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (4 วัน) ประสิทธิภาพก็เพิ่มสูงขึ้นอีกเท่าตัว โดยลดได้สูงถึง 68.29 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นประสิทธิภาพการย่อยสลายเพิ่มขึ้นไม่มากนัก จากการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง (7 วัน) พบว่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุดอยู่ที่ 79.99% โดยเชื้อทุกชนิดมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ตาราง 4-13 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายจีออสมินในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล

	% Geosmin removal			
	24 Hr.	48 Hr.	96 Hr.	168 Hr.
Control	6.40 ± 0.55 ^{c D}	19.73 ± 0.16 ^{b C}	55.10 ± 2.45 ^{b B}	68.97 ± 1.99 ^{b A}
<i>Achromobacter denitrificans</i>	29.58 ± 4.78 ^{a D}	39.44 ± 4.78 ^{a C}	70.22 ± 2.12 ^{a B}	81.78 ± 1.87 ^{a A}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	16.53 ± 4.18 ^{b D}	33.36 ± 4.92 ^{a C}	71.76 ± 2.46 ^{a B}	83.49 ± 2.84 ^{a A}
<i>Comamonas</i> sp.	29.91 ± 2.72 ^{a D}	38.73 ± 4.56 ^{a C}	68.21 ± 2.41 ^{a B}	83.57 ± 0.18 ^{a A}
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	17.95 ± 4.54 ^{b D}	37.84 ± 4.54 ^{a C}	67.84 ± 1.56 ^{a B}	82.80 ± 2.40 ^{a A}
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	25.86 ± 0.84 ^{a C}	30.31 ± 4.79 ^{a C}	69.22 ± 1.09 ^{a B}	81.15 ± 1.38 ^{a A}

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ (10^6 - 10^7 CFU/ml)

ปัญญชนะยกกำลังพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแต่ละชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (แนวตั้ง)

ปัญญชนะยกกำลังพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแต่ละช่วงเวลา (แนวนอน)

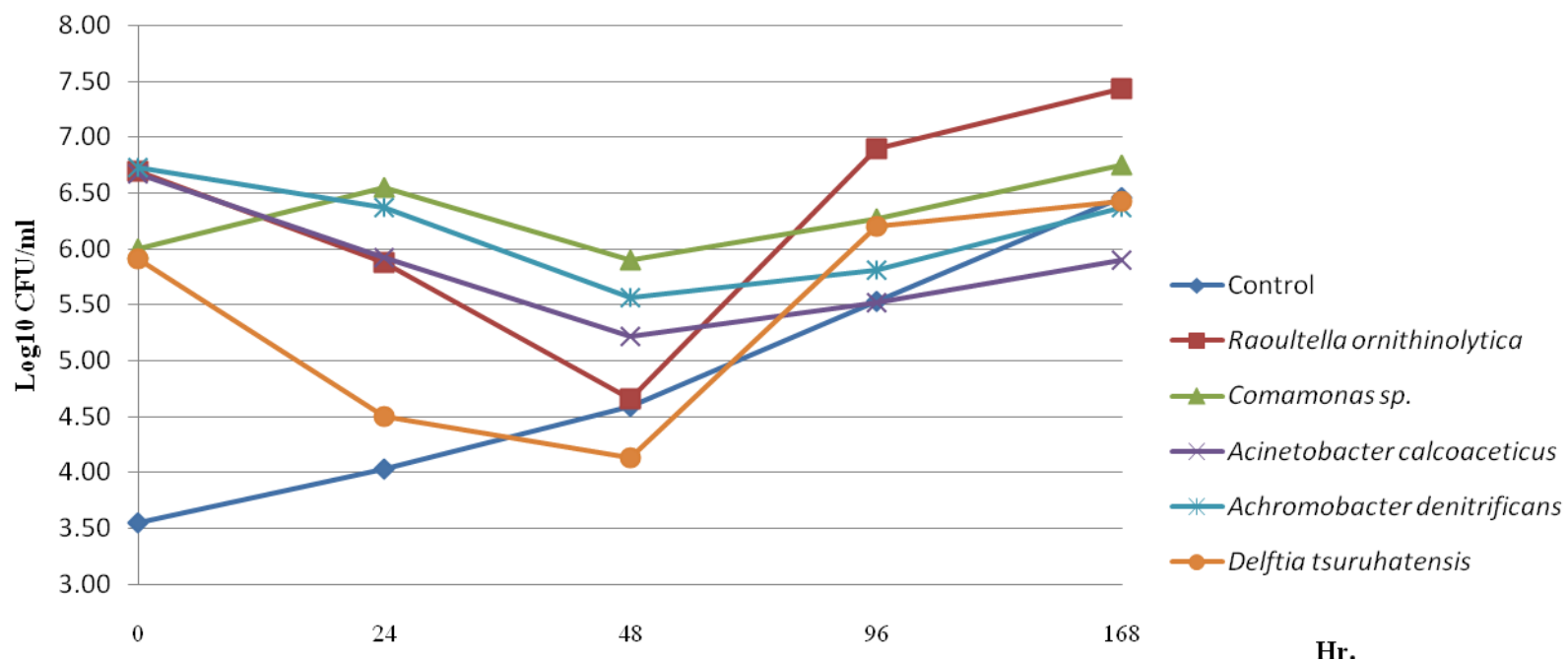
ตาราง 4-14 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็มไอบี ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล

	% MIB removal			
	24 Hr.	48 Hr.	96 Hr.	168 Hr.
Control	8.55 ± 0.06 ^{c D}	24.74 ± 2.86 ^{a C}	45.25 ± 2.30 ^{d B}	65.32 ± 0.66 ^{c A}
<i>Achromobacter denitrificans</i>	23.20 ± 4.93 ^{a D}	33.44 ± 2.54 ^{a C}	68.29 ± 0.94 ^{a B}	79.61 ± 1.62 ^{a A}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8.03 ± 3.15 ^{bc D}	27.93 ± 1.88 ^{a C}	66.04 ± 2.64 ^{ab B}	78.12 ± 0.63 ^{ab A}
<i>Comamonas</i> sp.	26.88 ± 3.04 ^{a C}	30.23 ± 4.06 ^{a C}	63.97 ± 2.43 ^{bc B}	79.99 ± 1.23 ^{a A}
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	20.24 ± 3.95 ^{ab D}	31.02 ± 4.71 ^{a C}	61.07 ± 0.79 ^{c B}	77.18 ± 0.98 ^{b A}
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	21.00 ± 2.21 ^{ab D}	33.34 ± 1.36 ^{a C}	63.56 ± 1.51 ^{bc B}	79.79 ± 1.35 ^{a A}

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 เพอร์เซ็นต์ (10^6 - 10^7 CFU/ml)

พัยัญชนะยกกำลังพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแต่ละชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (แนวตั้ง)

พัยัญชนะยกกำลังพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในแต่ละช่วงเวลา (แนวนอน)



ภาพ 4-25 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ในแต่ละชุดการทดลองที่เติม *Raoultella ornithinolytica*, *Comamonas sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter denitrificans* หรือ *Delftia tsuruhatensis* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลา

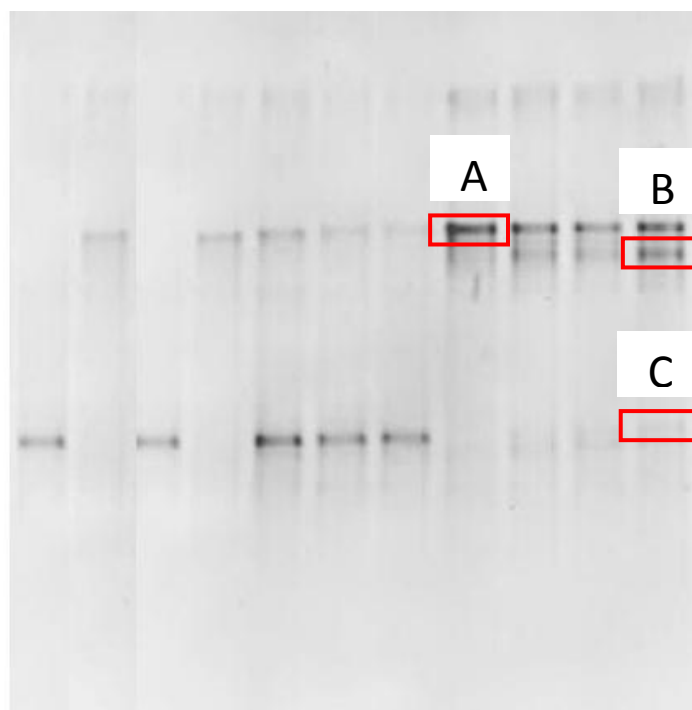
2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในน้ำตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงปลานิล โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในน้ำตัวอย่าง โดยการตัดเจลในส่วนที่มีแถบ DNA บนเจล acrylamide ที่ได้จากการใช้เทคนิค DGGE นำไปสกัด DNA (DNA extraction) จากตัวอย่างที่ตัดได้จากแถบ DNA บนเจล เพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR (PCR amplification of bacterial 16S rDNA) และนำ PCR product ที่ได้หาลำดับเบส DNA (DNA Sequencing) ได้ผลดังนี้

ตำแหน่ง A มีจำนวนลำดับเบส DNA เท่ากับ 531 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของตำแหน่ง A (ภาพ 20) มีความเหมือนกับ Uncultured bacterium clone E70 (100% similarity)

ตำแหน่ง B มีจำนวนลำดับเบส DNA เท่ากับ 386 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของตำแหน่ง B (ภาพ 20) มีความเหมือนกับ Uncultured bacterium clone Espejo_1_17_12_Water.255983 (100% similarity)

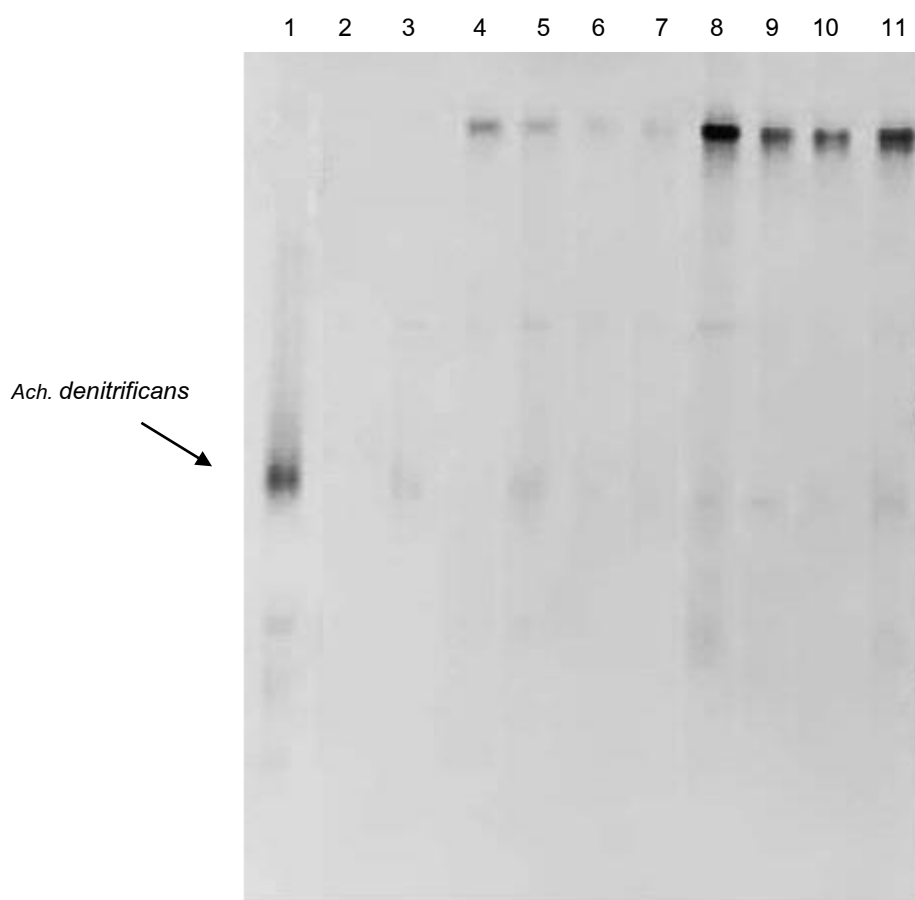
ตำแหน่ง C มีจำนวนลำดับเบส DNA เท่ากับ 424 bp เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าลำดับเบส DNA ของตำแหน่ง C (ภาพ 20) มีความคล้ายคลึงกับ *Methylophilus* sp. (99% similarity)



ภาพ 4-26 ผล DGGE แสดงตำแหน่งแถบ DNA ประชากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำเพาะเลี้ยงปลานิล โดยใช้เชื้อ *Comamonas* sp.

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในน้ำตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงปลานิล พบว่าเชื้อ *Achromobacter denitrificans* ไม่สามารถเจริญแข่งแย้งกับจุลินทรีย์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลได้ โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *Ach. denitrificans* มีปริมาณลดน้อยลง (แถบ DNA บนเจลจางกว่าในระยะเริ่มต้น) เชื้อที่อยู่ในธรรมชาติมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อใน

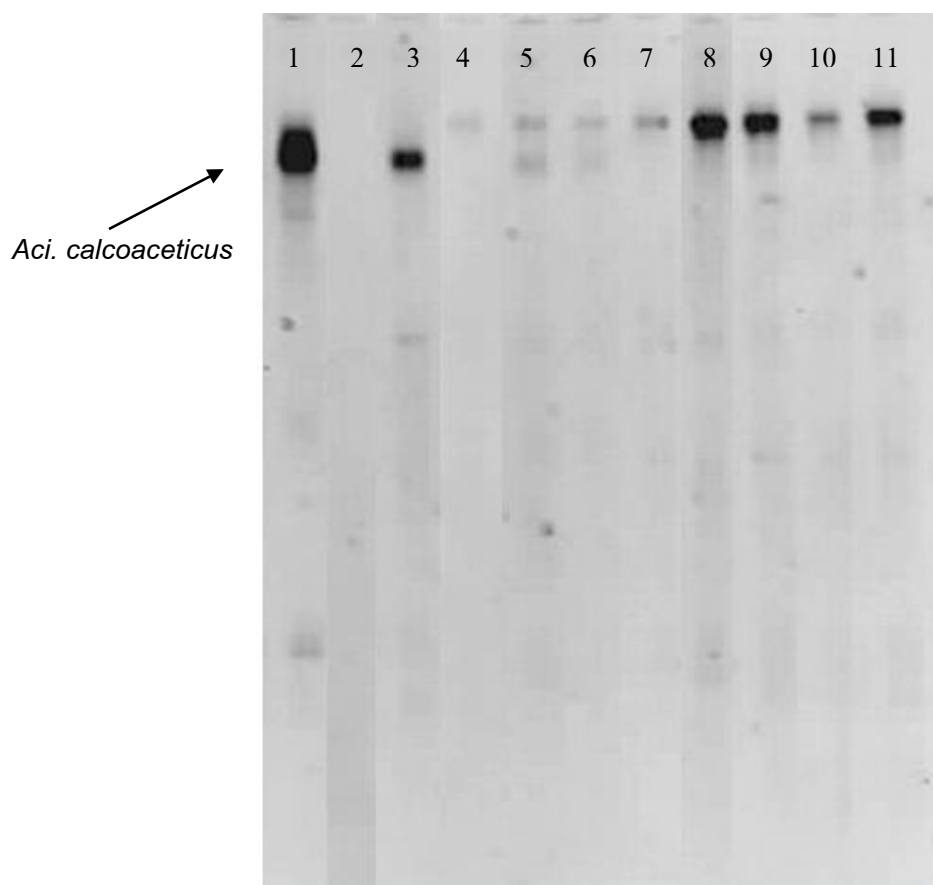
ธรรมชาติมีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่เชื้อ *Ach. denitrificans* มีปริมาณน้อยมาก จนไม่สามารถมองเห็นได้ (ภาพ 4-27)



ภาพ 4-27 ผล DGGE ของเชื้อ *Achromobacter denitrificans*

หมายเหตุ : Lane 1 = เชื้อบริสุทธิ์ *Achromobacter denitrificans*
 Lane 2 = Control ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 3 = *Achromobacter denitrificans* ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 4 = Control ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 5 - 7 = *Achromobacter denitrificans* ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 8 = Control ที่ 48 ชั่วโมง
 Lane 9 - 11 = *Achromobacter denitrificans* ที่ 48 ชั่วโมง

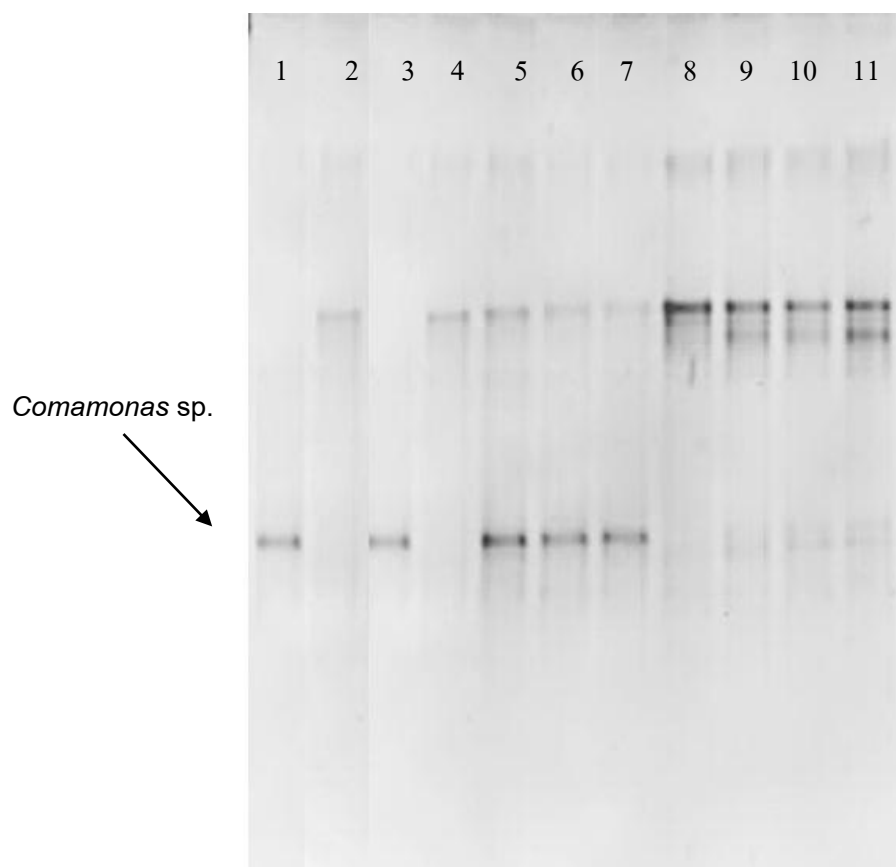
เชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* ไม่สามารถเจริญแข่งแย้งกับจุลินทรีย์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลได้ โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *Aci. calcoaceticus* มีปริมาณลดลง (แถบ DNA บนเจลจางกว่าในระยะเริ่มต้น) เชื้อที่อยู่ในธรรมชาติมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อในธรรมชาติมีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่เชื้อ *Aci. calcoaceticus* มีปริมาณน้อยมาก จนไม่สามารถมองเห็นได้ (ภาพ 4-28)



ภาพ 4-28 ผล DGGE ของเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus*

หมายเหตุ : Lane 1 = เชื้อบริสุทธิ์ *Acinetobacter calcoaceticus*
 Lane 2 = Control ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 3 = *Acinetobacter calcoaceticus* ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 4 = Control ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 5 - 7 = *Acinetobacter calcoaceticus* ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 8 = Control ที่ 48 ชั่วโมง
 Lane 9 - 11 = *Acinetobacter calcoaceticus* ที่ 48 ชั่วโมง

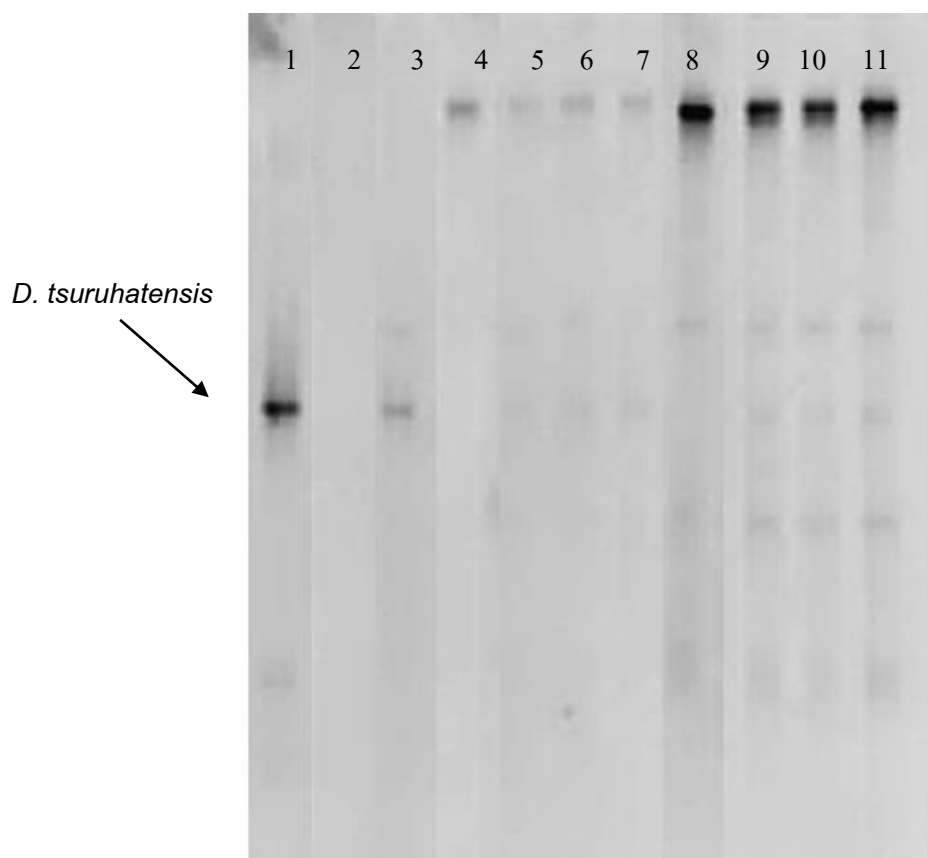
เชื้อ *Comamonas* sp. สามารถเจริญแ่งแ่งกับจุลินทรีย์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลได้ โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *Comamonas* sp มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (แถบ DNA บนเจลเข้มกว่าในระยะเริ่มต้น) เชื้อที่อยู่ในธรรมชาติมีปริมาณเท่าเดิม เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อในธรรมชาติมีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่เชื้อ *Comamonas* sp มีปริมาณน้อยมาก (ภาพ 4-29)



ภาพ 4-29 ผล DGGE ของเชื้อ *Comamonas* sp.

หมายเหตุ : Lane 1 = เชื้อบริสุทธิ์ *Comamonas* sp.
 Lane 2 = Control ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 3 = *Comamonas* sp. ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 4 = Control ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 5 - 7 = *Comamonas* sp. ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 8 = Control ที่ 48 ชั่วโมง
 Lane 9 - 11 = *Comamonas* sp. ที่ 48 ชั่วโมง

เชื้อ *Delftia tsuruhatensis* ไม่สามารถเจริญแก่งแย่งกับจุลินทรีย์ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลได้ โดยพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *D. tsuruhatensis* มีปริมาณลดน้อยลง (แถบ DNA บนเจลจางกว่าในระยะเริ่มต้น) เชื้อที่อยู่ในธรรมชาติมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อในธรรมชาติมีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่เชื้อ *D. tsuruhatensis* มีปริมาณน้อยมาก (ภาพ 4-30)



ภาพ 4-30 ผล DGGE ของเชื้อ *Delftia tsuruhatensis*

หมายเหตุ : Lane 1 = เชื้อบริสุทธิ์ *Delftia tsuruhatensis*
 Lane 2 = Control ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 3 = *Delftia tsuruhatensis* ที่ 0 ชั่วโมง
 Lane 4 = Control ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 5 - 7 = *Delftia tsuruhatensis* ที่ 24 ชั่วโมง
 Lane 8 = Control ที่ 48 ชั่วโมง
 Lane 9 - 11 = *Delftia tsuruhatensis* ที่ 48 ชั่วโมง

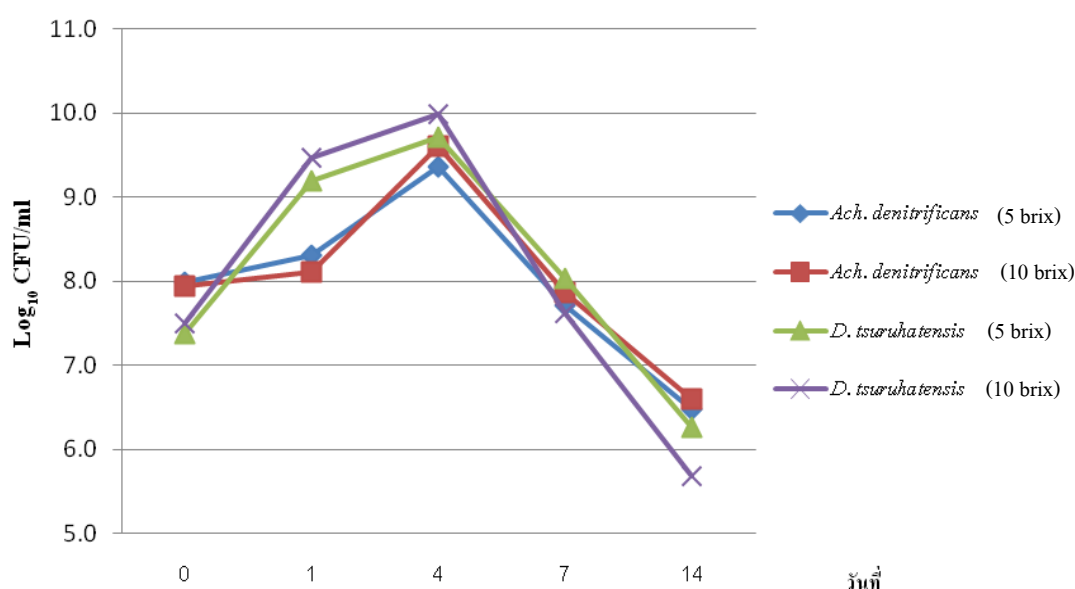
3. ผลการทดลองทำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ โดยนำเชื้อที่สามารถกลั่นได้ดี ในการย่อยสลาย กลิ่นไม่พึงประสงค์ ในน้ำตัวอย่างจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลา

3.1 ผลการทดลองทำผลิตภัณฑ์แบบน้ำ โดยนำเชื้อ *Achromobacter denitrificans* และ *Delftia tsuruhatensis* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 CFU/ml เพิ่มปริมาณเซลล์เชื้อ ในน้ำหมักน้ำตาลอ้อย ที่ผสมแร่ลิโอ นาร์ไดต์ และกากถั่วเหลืองป่น 1% ที่มีความหวาน 5 และ 10 brix หมักเป็นเวลา 14 วัน

การเจริญของเชื้อ *Achromobacter denitrificans* เริ่มต้นการทดลองมีปริมาณเซลล์เชื้อ ที่ความหวาน 5 และ 10 brix คือ 9.70×10^7 และ 8.70×10^7 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 1 วัน ปริมาณ เซลล์เชื้อเพิ่มขึ้น ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.00×10^8 และ 1.27×10^8 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 4 วัน ปริมาณเซลล์เชื้อเพิ่มขึ้น ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มากที่สุด มีปริมาณ เซลล์เท่ากับ 2.28×10^9 และ 4.06×10^9 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 7 วัน มีปริมาณเซลล์เชื้อ

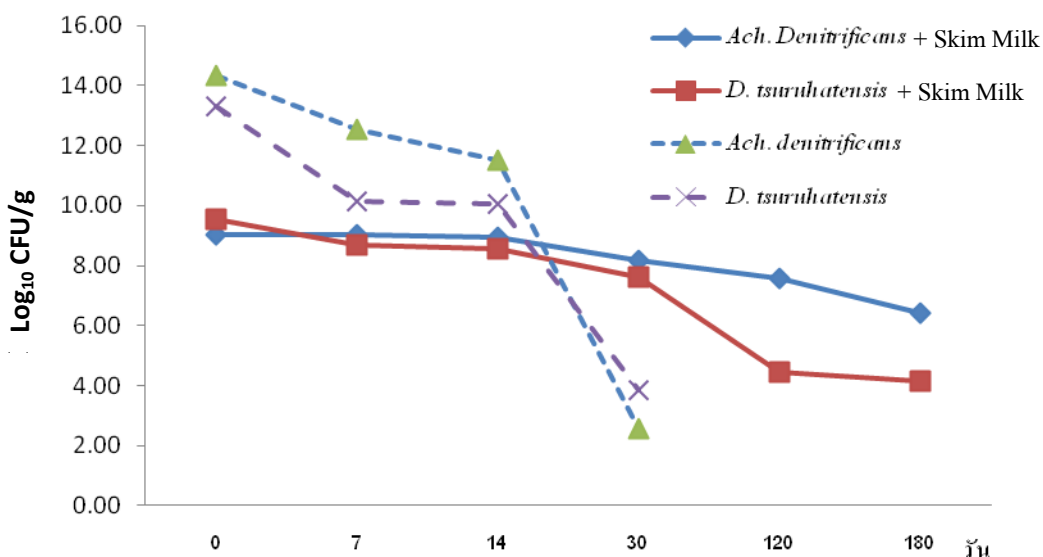
ลดลง ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.15×10^7 และ 7.30×10^7 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณเซลล์เชื้อลดลง ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.01×10^6 และ 3.89×10^6 CFU/ml ตามลำดับ (ภาพ 4-31)

การเจริญของเชื้อ *Delftia tsuruhatensis* เริ่มต้นการทดลองมีปริมาณเซลล์เชื้อ ที่ความหวาน 5 และ 10 brix คือ 2.38×10^7 และ 3.13×10^7 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 1 วัน ปริมาณเซลล์เชื้อเพิ่มขึ้น ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.56×10^9 และ 2.91×10^9 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 4 วัน ปริมาณเซลล์เชื้อเพิ่มขึ้น ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มากที่สุด มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5.10×10^9 และ 9.80×10^9 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 7 วัน มีปริมาณเซลล์เชื้อลดลง ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.09×10^8 และ 4.20×10^7 CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไปเป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณเซลล์เชื้อลดลง ที่ความหวาน 5 และ 10 brix มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.84×10^6 และ 4.70×10^5 CFU/ml ตามลำดับ (ภาพ 4-31)



ภาพ 4-31 ปริมาณเชื้อในอาหารน้ำตาลอ้อยผสมแร่และกากถั่วเหลือง ที่มีความหวาน 5 brix และ 10 brix

3.2 ผลการทดลองทำผลิตภัณฑ์แบบผง เมื่อได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อย สลายกลิ่นได้ดี คือ *Achromobacter denitrificans* และ *Delftia tsuruhatensis* ผสมกับ Skim Milk (10%) และทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) แล้วทำการตรวจหาปริมาณเซลล์เชื้อที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์หลังจากทำเป็นผงแล้ว ในวันที่ 0, 7, 14, 30, 120 และ 180 วัน เก็บที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27°C พบว่า ในวันที่ 0 มีเซลล์เชื้อ *A. denitrificans* อยู่ 1.08×10^9 CFU/g เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7, 14, 30 และ 120 วัน พบว่ามีปริมาณเซลล์เชื้อลดลงเท่ากับ 1.06×10^9 , 8.50×10^8 , 1.46×10^8 และ 3.85×10^7 CFU/g ตามลำดับ และเชื้อ *D. tsuruhatensis* ในวันที่ 0 มีปริมาณเซลล์เชื้ออยู่ 3.61×10^9 CFU/g เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7, 14, 30 และ 120 วัน พบว่ามีปริมาณเซลล์เชื้อลดลง 4.70×10^8 , 3.66×10^8 , 4.00×10^7 และ 2.80×10^4 CFU/g ตามลำดับ และสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 180 วัน พบว่ามีปริมาณเซลล์เชื้อลดลงเหลือ 2.69×10^6 CFU/g ในเชื้อ *A. denitrificans* และในเชื้อ *D. tsuruhatensis* มีอยู่ 1.39×10^4 CFU/g (ภาพ 4-32)



ภาพ 4-32 ปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์แบบผง ในวันที่ 0 – 180 วัน

3.3 ผลการทดลองทำผลิตภัณฑ์ แบบก้อน โดยนำเชื้อ *Achromobacter denitrificans* และ *Delftia tsuruhatensis* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 CFU/ml ผสมกับดินเหนียว, แกลบดิบ, รำละเอียด ในอัตราส่วน 1:1:2 และกากน้ำตาล 15 ml / 1 กิโลกรัมปั้นขึ้นรูปเป็นก้อนกลม ทำให้แห้งโดยเก็บในตู้ปั๊มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 45°C เพื่อให้ก้อนเชื้อแห้ง พบว่าเริ่มต้นการทดลอง *A. denitrificans* มีปริมาณเซลล์ทั้งหมด 5.80×10^4 CFU/g ก้อนเชื้อ *D. tsuruhatensis* มีปริมาณเซลล์ 8.40×10^4 CFU/g และใน ชุดควบคุม มีปริมาณเซลล์ 3.20×10^2 CFU/g เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน พบว่าก้อนเชื้อ *D. tsuruhatensis* มีปริมาณเชื้อลดลงเหลือน้อยกว่า 30 CFU/g ส่วนก้อนเชื้อ *A. denitrificans* และ ชุดควบคุม ไม่พบการเจริญของเชื้อเลย

การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลา (โดยเลือก ระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ในการทดลองที่ 1)

สำหรับการทดลองนี้ทำการทดลองในบ่อปลา 12 บ่อ โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม ยิปซัม ความเข้มข้น 200 ppm น้ำฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm (มีผลกระทบต่อ pH น้อยที่สุด และการทดลองนี้มีความเข้มข้น แอมโมเนียในน้ำไม่มาก จึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ 5 ppm) และจุลินทรีย์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือปริมาณ เซลล์เริ่มต้น 10^4 - 10^5 CFU/ml (ปรับปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นให้พอเหมาะกับปริมาณน้ำในบ่อ โดยลดความเข้มข้นของ เชื้อจาก 5 % เหลือเพียง 0.1%)

2.1 การเจริญเติบโตของปลา

น้ำหนักปลาสุดท้าย (Final weight) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตต่อ วัน (Average Daily Gain, ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR) ประสิทธิภาพการ เปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion efficiency, FCE) อัตราการรอด (%) และผลผลิตปลาทั้งหมดมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตาราง 4-15 และ 4-16) โดยชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีน้ำหนักปลา

สุดท้าย น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น และ ADG สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ รองลงมาคือ น้ำฟางข้าว 1 ppm ชุดควบคุม (ไม่เติม) และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ซึ่งมีน้ำหนักปลาสุดท้าย 413.3 385.3 374.0 และ 347.0 กรัมต่อตัว มีน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น 298.3 270.0 259.3 และ 232.0 กรัมต่อตัว และมี ADG 2.49 2.25 2.16 และ 1.93 กรัมต่อวัน ตามลำดับ (ตาราง 4-15) สำหรับอัตราการรอดพบว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีอัตราการรอดสูงสุด คือ 90.40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ และชุดควบคุมมีค่า 84.53 74.40 และ 71.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่เติมยิปซัมมีค่ามากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว แต่ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวมีอัตราการรอดที่ดีกว่า ทำให้ผลผลิตปลาทั้งหมดในแต่ละบ่อของชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวไม่มีความแตกต่างกัน แต่ถึงอย่างไรทั้งสองชุดการทดลองก็ให้ผลผลิตปลาที่สูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ อีกทั้งชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ต่ำกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCE) สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 87.02 และ 86.58 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 66.37 และ 64.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 4-16) สาเหตุที่ปลาในชุดที่เติมจุลินทรีย์เจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มอื่นๆ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของค่า pH โดยจุลินทรีย์แบบน้ำที่เติมลงไปมีค่า pH ก่อนขังต่ำ (4-5) ทำให้ปลาต้องปรับตัวบ่อยครั้ง (เดิมเชื่อกันว่า 2 สัปดาห์) และอาจส่งผลถึงการแย่งออกซิเจนที่ใช้หายใจในน้ำอีกด้วย อีกทั้งในการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งพบว่า ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำในบ่อที่เติมจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าบ่ออื่นๆ ในช่วงเดือนแรก ปริมาณออกซิเจนมีค่าต่ำมาก โดยมีค่าเฉลี่ย 1.76 mg/l ซึ่งปลาในบ่อมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นมากกว่าบ่ออื่น อีกทั้งในช่วงเดือนสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง (สัปดาห์ที่ 16 และ 18) โดยมีค่าออกซิเจนเฉลี่ย 2.6 mg/l ซึ่งไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ จึงส่งผลให้อัตราการรอดของปลาในชุดที่เติมจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ (ภาพ 4-46) จึงควรเติมออกซิเจนลงไปในบ่อเพิ่มขึ้นในขณะที่มีการเติมเชื้อลงไปในแต่ละครั้ง จะสามารถลดอัตราการตายของปลาลงได้

ตาราง 4-15 น้ำหนักปลาเริ่มต้น (Initial weight) น้ำหนักปลาสุดท้าย (Final weight) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain) และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain, ADG) (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

Treatment	Initial weight (g/fish)	Final weight (g/fish)	weight gain (g/fish)	ADG (g/day)
Control	114.7 ± 2.6 ^a	374.0 ± 11.7 ^{ab}	259.3 ± 9.1 ^{ab}	2.16 ± 0.08 ^{ab}
Gypsum 200 ppm	115.0 ± 2.3 ^a	413.3 ± 20.2 ^b	298.3 ± 18.7 ^b	2.49 ± 0.16 ^b
Rice straw 1 ppm	115.3 ± 2.6 ^a	385.3 ± 17.5 ^{ab}	270.0 ± 15.0 ^{ab}	2.25 ± 0.13 ^{ab}
Bacteria	115.0 ± 2.1 ^a	347.0 ± 16.5 ^a	232.0 ± 14.7 ^a	1.93 ± 0.12 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในสมมติเดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

ตาราง 4-16 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR) ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion efficiency, FCE) อัตราการรอด (%) และผลผลิตปลา (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

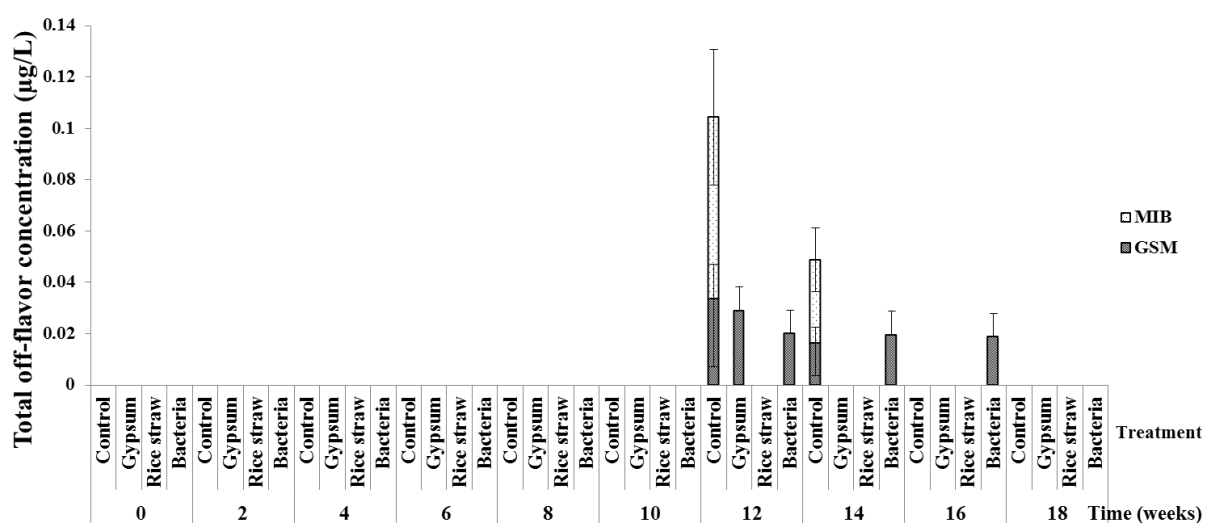
Treatment	FCR	FCE (%)	Survival rate (%)	Biomass of fish (kg/pond)
Control	1.53 ± 0.13 ^b	66.37 ± 5.79 ^a	71.20 ± 6.80 ^a	66.37 ± 5.79 ^a
Gypsum 200 ppm	1.16 ± 0.06 ^a	87.02 ± 4.32 ^b	84.53 ± 5.41 ^{ab}	87.02 ± 4.32 ^b
Rice straw 1 ppm	1.16 ± 0.04 ^a	86.58 ± 2.67 ^b	90.40 ± 6.11 ^b	86.58 ± 2.67 ^b
Bacteria	1.56 ± 0.03 ^b	64.32 ± 11.1 ^a	74.40 ± 2.77 ^{ab}	64.32 ± 1.11 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test

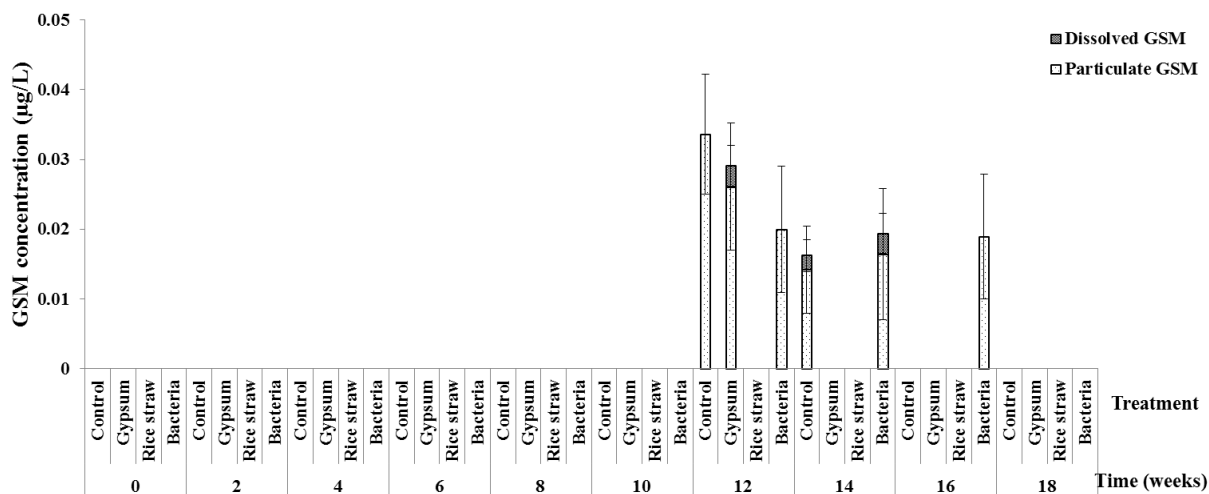
2.2 ปริมาณกลิ่นโคลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในบ่อปลานิล

ปริมาณกลิ่นโคลนในน้ำ

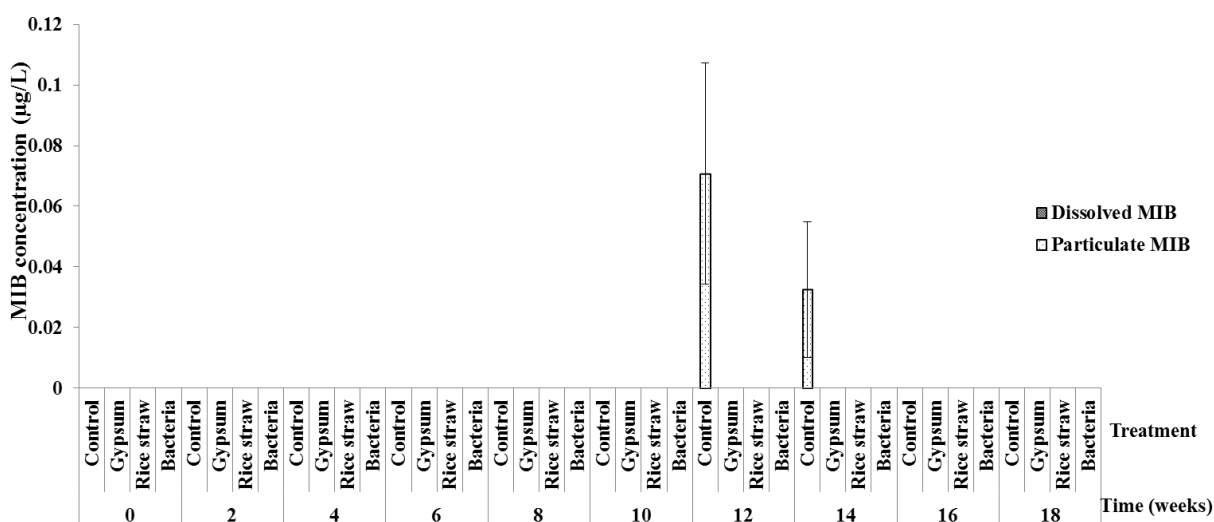
ปริมาณกลิ่นโคลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.104 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาพ 4-33) โดยปริมาณจีโอสมินมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.034 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในรูป Particulate form มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.034 ไมโครกรัมต่อลิตร และอยู่ในรูป Dissolved form มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.003 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาพ 4-34) สำหรับปริมาณเอ็มไอบีมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.071 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในรูป Particulate form ทั้งหมด (ภาพ 4-35) โดยส่วนใหญ่กลิ่นโคลนในน้ำที่เกิดในบ่อเลี้ยงปลานิลจะอยู่ในรูปของ Particulate form ซึ่งอยู่ในเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช ในการทดลองครั้งนี้ตรวจเจอกลิ่นโคลนในน้ำเมื่อปลานิลมีอายุการเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ โดยชุดควบคุมมีปริมาณกลิ่นโคลนสูงที่สุดคือ 0.104 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีทั้งปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบี รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 0.029 ไมโครกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ 0.020 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเพียงปริมาณจีโอสมินอย่างเดียว สำหรับชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวไม่มีปริมาณกลิ่นโคลนในน้ำเกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงปลานิล



ภาพ 4-33 ปริมาณกลิ่นโคลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล



ภาพ 4-34 ปริมาณจืออสมินในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form



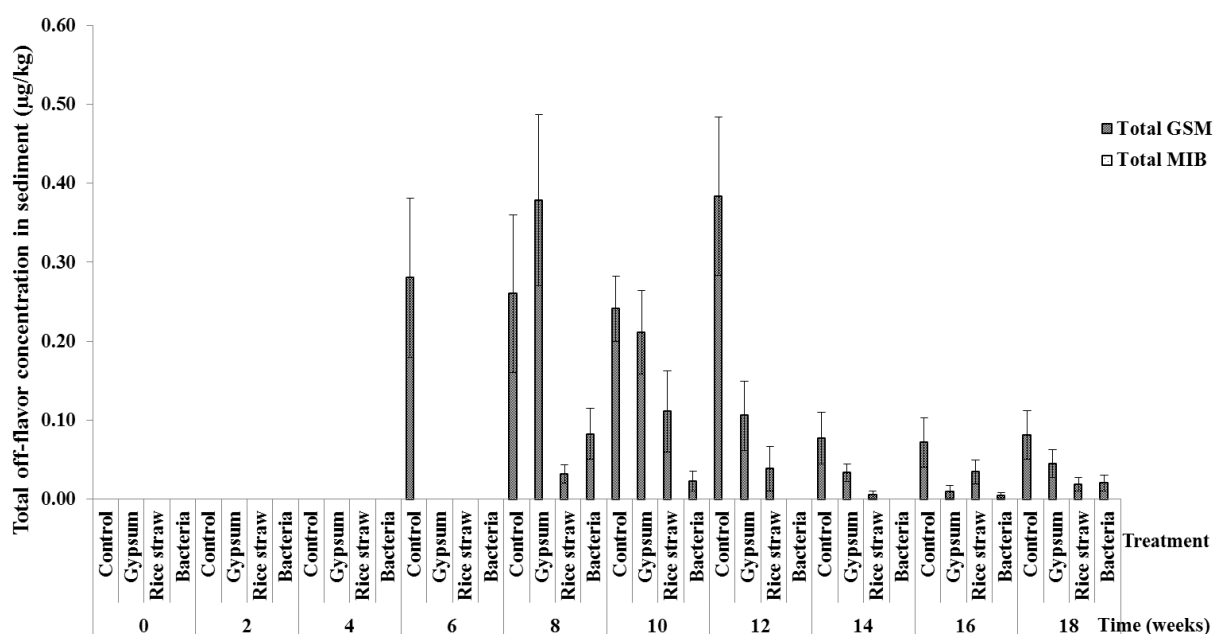
ภาพ 4-35 ปริมาณเอ็มไอบีในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลทั้งในรูป Particulate form และ Dissolved form

ปริมาณกลิ่นโคลนและแอมโมเนียในดินตะกอน

ปริมาณจืออสมินและเอ็มไอบีในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิลมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.384 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีเพียงปริมาณจืออสมินเท่านั้น และมีปริมาณกลิ่นโคลนสูงที่สุดในชุดควบคุมเมื่อปลานิลมีอายุการเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ ในการทดลองครั้งนี้ตรวจพบกลิ่นโคลนในดินตะกอนเมื่อปลานิลมีอายุการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ ซึ่งมีเฉพาะชุดควบคุม แต่เมื่อมีอายุการเลี้ยง 8 และ 10 สัปดาห์มีปริมาณจืออสมินทุกชุดการทดลอง (ภาพ 4-36)

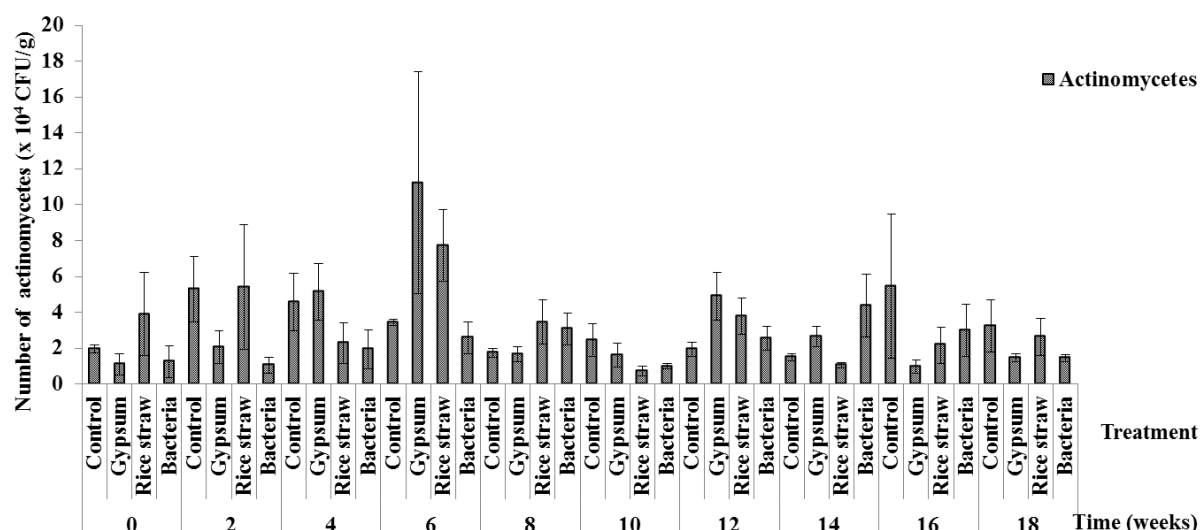
แต่ถึงอย่างไรก็ตามเมื่อไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Gutierrez *et al.* (2013) พบว่าการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณกลิ่นโคลนทั้งในน้ำและดินตะกอนน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากช่วงที่ทดลองนั้นอยู่ในช่วงเดือนเมษายนถึง

เดือนสิงหาคม 2557 โดยเดือนที่สามและสี่ของการเลี้ยงปลานิลเป็นช่วงฤดูฝน ทำให้มีปริมาณแสงแดดน้อยและส่วนใหญ่ฝนตกส่งผลให้ปริมาณ cyanobacteria ในน้ำมีน้อย เพราะสาหร่ายเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่อุณหภูมิสูง อีกทั้งก่อนการทดลองมีการตากบ่อและใส่ปูนขาวในขั้นตอนการเตรียมบ่อ ทำให้จุลินทรีย์ในดินตายไปบางส่วน ดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณกลิ่นโคลนทั้งในน้ำและดินตะกอนน้อยกว่าการทดลองอื่น แต่ถ้ามีการเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงปลานิลนานไปอีกประมาณ 6 – 8 เดือน มีการสะสมของสารอาหารทั้งในน้ำและดินมากขึ้น ซึ่งจะทำให้การสะสมของปริมาณกลิ่นโคลนมากกว่านี้



ภาพ 4-36 ปริมาณกลิ่นโคลน (จีออสมินและเอ็มไอบี) ในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิล

สำหรับแอคติโนมัยซีส์ในดินตะกอนมีปริมาณอยู่ระหว่าง $0.72 - 7.90 \times 10^4$ CFU ต่อกรัม และค่าเฉลี่ยของแอคติโนมัยซีส์ในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ คือ 3.16 ± 1.50 2.94 ± 2.29 3.31 ± 2.09 และ $2.22 \pm 1.09 \times 10^4$ CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (ตาราง 4-17) โดยปริมาณแอคติโนมัยซีส์สูงสุดในชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ในสัปดาห์ที่ 6 และปริมาณแอคติโนมัยซีส์ต่ำสุดในชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm ในสัปดาห์ที่ 10 (ภาพ 4-37) ซึ่งปริมาณแอคติโนมัยซีส์น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดินตะกอน จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณกลิ่นโคลนในดินตะกอนมีน้อย



ภาพ 4-37 ปริมาณแอกติโนมัยซีต ($\times 10^4$ CFU ต่อกรัม) ในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิล

ตาราง 4-17 ค่าเฉลี่ยและต่ำสุด-สูงสุดของแอกติโนมัยซีต ($\times 10^4$ CFU ต่อกรัม) ในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิล

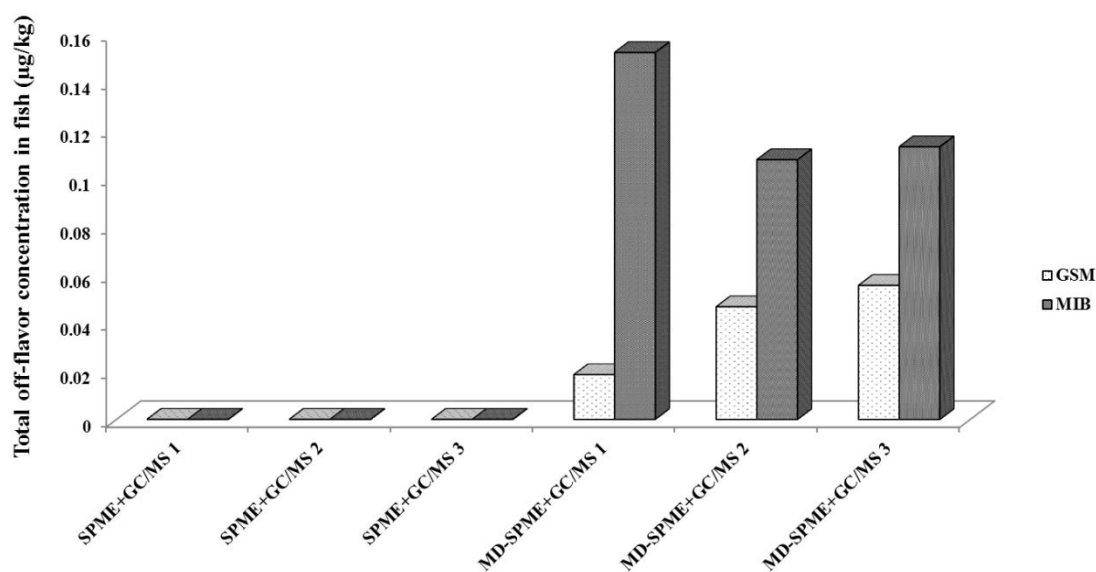
ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย	ต่ำสุด-สูงสุด
Control	3.16 ± 1.50	1.48 – 5.47
Gypsum 200 ppm	2.94 ± 2.29	0.96 – 7.90
Rice straw 1 ppm	3.31 ± 2.09	0.72 – 7.72
Bacteria	2.22 ± 1.09	0.98 – 4.37

องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในน้ำจากบ่อที่เติมจุลินทรีย์ โดยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาที่เติมจุลินทรีย์ผสม 2 ชนิดคือ *Achromobacter denitrificans* และ *Delftia tsuruhatensis* (ย่อยสลายจืออสมีนและเอมไอบีได้มากที่สุด ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ) โดยทำการเก็บน้ำตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในน้ำตัวอย่างโดยเทคนิค PCR (PCR amplification of bacterial 16S rDNA) และเปรียบเทียบ DNA profile โดยเทคนิค DGGE ซึ่งจะเป็นการแสดงองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่า ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในน้ำตัวอย่าง พบแต่จุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งเมื่อนำมาทำการหาลำดับเบส พบว่าเป็นกลุ่มเชื้อ Uncultured bacteria ผลที่ได้อาจเนื่องมาจากการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ก่อนการเติมจุลินทรีย์ในแต่ละครั้ง ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด อาจจะไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะธรรมชาติ เมื่อผ่านไประยะเวลานาน อีกทั้งเชื้อที่เติมลงไป ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแพลงก์ตอนพืชได้ จึงยังส่งผลให้ปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวมภายในบ่อมีค่าสูง (ภาพ 4-40)

ปริมาณกลิ่นโคลนในเนื้อปลา

ก่อนการวิเคราะห์เนื้อปลานิลได้มีการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์แบบ SPME ร่วมกับ GC/MS (แบบเดิม) กับ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS (วิธีในการทดลองนี้ โดยใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด ซึ่งใช้ความร้อน 600 วัตต์ นาน 6 นาที) โดยนำเนื้อปลาที่มีกลิ่นโคลนจากวิธีการทางประสาธน์ผสม ซึ่งมีเนื้อปลานิล และปลาบึกมาวิเคราะห์ พบว่า วิธีการวิเคราะห์แบบ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS สามารถตรวจพบปริมาณกลิ่นโคลนทั้งจีออสมินและเอ็มไอบี ทั้ง 3 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธีการวิเคราะห์แบบ SPME ร่วมกับ GC/MS ไม่สามารถตรวจพบปริมาณกลิ่นโคลน ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์แบบ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจปริมาณกลิ่นโคลนในเนื้อปลามากกว่า วิธีการวิเคราะห์แบบ SPME ร่วมกับ GC/MS (ภาพ 4-38)



ภาพ 4-38 ปริมาณกลิ่นโคลนในเนื้อปลาที่ใช้วิธีวิเคราะห์ต่างกัน

สำหรับเนื้อปลานิลในการศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่มีปริมาณกลิ่นโคลน (จีออสมินและเอ็มไอบี) (ตาราง 4-18) เนื่องจากปริมาณกลิ่นโคลนในน้ำมีปริมาณน้อยมาก และส่วนใหญ่อยู่ในรูป Particulate form ซึ่งจะสะสมในตัวปลา ได้ต้องเกิดจากปลานิลกินแพลงก์ตอนพืชเข้าไป อีกทั้งในการทดลองนี้มีการให้อาหารปลาอย่างเต็มที่ ทำให้ปลานิลเลือกกินอาหารมากกว่าที่จะกินแพลงก์ตอนพืช จึงน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ไม่พบกลิ่นโคลนในเนื้อปลานิล

ตาราง 4-18 ปริมาณกลิ่นโคลน (จีออสมินและเอ็มไอบี) ในเนื้อปลานิลในบ่อ

Treatment	Initial	1 month	2 month	3 month	4 month
Control	ND	ND	ND	ND	ND
Gypsum 200 ppm	ND	ND	ND	ND	ND
Rice straw 1 ppm	ND	ND	ND	ND	ND
Bacteria	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ : ND คือ ตรวจไม่พบ

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดจีออสมินและเอ็มไอบี (Limit of Detection, LOD) คือ 0.005 ppb.

ในขณะเดียวกันทำการทดสอบกลิ่นโคลนในตัวอย่างเนื่อปลานิลที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองของการเลี้ยงด้วยวิธีการทางประสาธน์ผสมโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 10 คน (ภาคผนวก ก) โดยทำการสุ่มปลาทั้ง 12 บ่อๆ ละ 3 ตัวทำการลวกปลาและให้ผู้ทดสอบทำการชิมรสชาติและทำแบบสอบถามความพึงพอใจของผู้บริโภคปลานิล (ภาพ 4-39) พบว่า ผู้ทดสอบมีเพศหญิง 50 เปอร์เซ็นต์และเพศชาย 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่จะมีอายุอยู่ในช่วง 21- 40 ปี ซึ่งเป็นนักศึกษาและจบการศึกษาระดับปริญญาโท (ตาราง 4-19) โดยในการทดสอบกลิ่นโคลนในเนื่อปลานิลทางประสาธน์ผสมในครั้งนี้ไม่มีผู้ใดพบกลิ่นโคลนในเนื่อปลานิล ซึ่งตรงกับวิธีการวิเคราะห์แบบ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS

ตาราง 4-19 เปอร์เซ็นต์ของเพศ อายุ การศึกษา และประเภทผู้บริโภคในการทดสอบกลิ่นโคลนในเนื่อปลานิล

เพศ	อายุ	การศึกษา	ประเภทผู้บริโภค
ชาย 50 %	21-30 ปีมี 40 %	ปริญญาตรี 20 %	นักศึกษา 70%
หญิง 50 %	31-40 ปีมี 30 %	ปริญญาโท 50 %	ข้าราชการ 30%
	41-50 ปีมี 10 %	สูงกว่าปริญญาโท 30 %	
	50 ปีขึ้นไปมี 20 %		

แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้บริโภคปลานิล

ตอนที่ 1 ร้อยละทั่วไป

1. เพศหญิงชาย

2. อายุ 10 - 20 ปี 21 - 30 ปี 31 - 40 ปี 41 - 51 ปี 51 ปีขึ้นไป

3. การศึกษา ประถมศึกษา มัธยมศึกษา ปริญญาตรี ปริญญาโท สูงกว่าปริญญาโท

4. ประเภทผู้บริโภค เด็ก นักศึกษา ข้าราชการ ประชาชนทั่วไป

ตอนที่ 2 ประเมินระดับความพึงพอใจของผู้บริโภค (โปรดทำเครื่องหมายถูก หน้าคำตอบที่ตรงกับความจริง)

กรณีที่มีกลิ่นไขระดู ระดับคะแนน 5= มากที่สุด 4= มาก 3= ปานกลาง 2= น้อย 1= น้อยที่สุด

ข้อ	ตัวที่ 1		ตัวที่ 2		ตัวที่ 3	
	มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	มี	ไม่มี
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

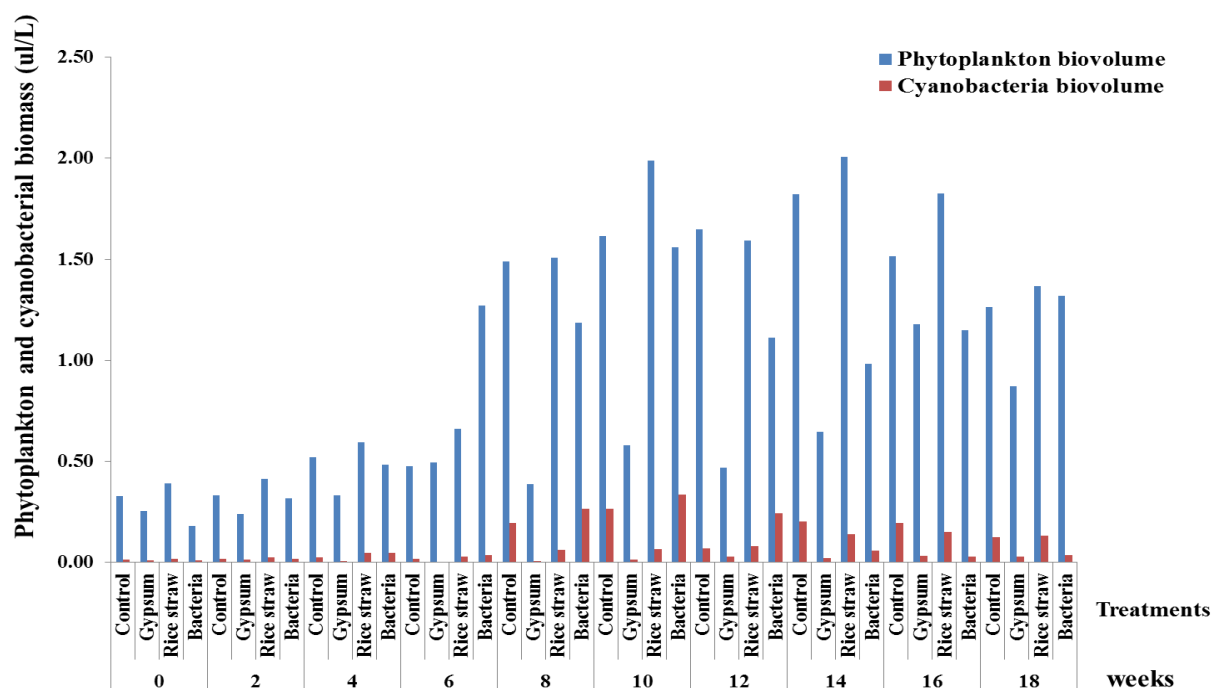
ตอนที่ 3 ให้ความคิดเห็น หรือข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

ภาพ 4-39 แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้บริโภคปลานิล

2.3 ชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อปลานิล

แพลงก์ตอนพืชที่พบในบ่อเลี้ยงปลานิล จำนวน 4 ชุดการทดลอง พบชนิดแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด 104 สปีชีส์ จัดอยู่ใน 7 ดิวิชัน ได้แก่ Division Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Euglenophyta, Pyrrophyta, Cryptophyta และ Chrysophyta ตามลำดับ โดยมีจำนวนสปีชีส์ที่พบในแต่ละดิวิชัน คือ 50, 21, 10, 17, 3, 2 และ 1 สปีชีส์ ตามลำดับ ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชที่พบในแต่ละชุดการทดลอง ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือน

สิงหาคม 2557 มีความแตกต่างกันทั้งจำนวนชนิดและปริมาตรชีวภาพที่พบ ซึ่งดิวิชัน Euglenophyta มีปริมาตรชีวภาพมากที่สุด รองลงมาคือ Chlorophyta, Bacillariophyta, Cyanophyta, Pyrrhophyta และ Cryptophyta ตามลำดับ (ตาราง 4-20 และ 4-21) โดยปริมาณแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละสัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง ปริมาณแพลงก์ตอนพืชในชุดควบคุม ชุดที่เติมน้ำฟางข้าว และจุลินทรีย์มีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 2 เดือนแรก หลังจากนั้นพบว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อที่เติมน้ำฟางข้าวมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น รองลงมาคือชุดควบคุม จุลินทรีย์ และยิปซัมตามลำดับ (ภาพ 4-40)



ภาพ 4-40 ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชและ Cyanobacteria ที่พบทั้งหมดในแต่ละชุดการทดลอง (ไม่โครลิตร/ลิตร)

ตาราง 4-20 ค่าเฉลี่ยปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช (ไม่โครลิตร/ลิตร) ในแต่ละดิวิชันของทุกชุดการทดลอง

Weeks	Treatments	Division						
		Chlorophyta	Cyanophyta	Bacillariophyta	Euglenophyta	Pyrrhophyta	Cryptophyta	Chrysophyta
0	Control	0.063	0.015	0.039	0.127	0.073	0.011	0.001
	Gypsum	0.047	0.010	0.030	0.093	0.066	0.008	-
	Rice straw	0.059	0.016	0.041	0.177	0.088	0.010	-
	Bacteria	0.041	0.009	0.023	0.060	0.037	0.008	-
2	Control	0.072	0.020	0.044	0.122	0.064	0.009	-
	Gypsum	0.034	0.014	0.025	0.110	0.043	0.013	-
	Rice straw	0.095	0.024	0.046	0.170	0.064	0.013	-
	Bacteria	0.087	0.016	0.029	0.134	0.042	0.011	-

Weeks	Treatments	Division						
		Chlorophyta	Cyanophyta	Bacillariophyta	Euglenophyta	Pyrrhophyta	Cryptophyta	Chrysophyta
4	Control	0.109	0.026	0.059	0.230	0.080	0.017	-
	Gypsum	0.040	0.005	0.036	0.143	0.081	0.026	-
	Rice straw	0.117	0.048	0.054	0.230	0.113	0.031	-
	Bacteria	0.124	0.046	0.043	0.225	0.036	0.009	-
6	Control	0.136	0.020	0.038	0.219	0.046	0.019	-
	Gypsum	0.104	0.004	0.038	0.243	0.071	0.035	-
	Rice straw	0.110	0.029	0.067	0.423	0.015	0.019	-
	Bacteria	0.214	0.037	0.081	0.778	0.131	0.030	-
8	Control	0.435	0.194	0.198	0.456	0.104	0.105	-
	Gypsum	0.083	0.006	0.040	0.119	0.052	0.088	-
	Rice straw	0.391	0.061	0.172	0.791	0.049	0.043	-
	Bacteria	0.255	0.266	0.131	0.423	0.047	0.062	-
10	Control	0.369	0.267	0.297	0.479	0.147	0.056	-
	Gypsum	0.108	0.015	0.018	0.282	0.107	0.048	-
	Rice straw	0.560	0.064	0.623	0.706	0.011	0.024	-
	Bacteria	0.243	0.335	0.143	0.821	0.005	0.014	0.001
12	Control	0.355	0.071	0.600	0.509	0.016	0.097	-
	Gypsum	0.067	0.030	0.045	0.191	0.071	0.065	-
	Rice straw	0.636	0.080	0.157	0.645	0.026	0.049	-
	Bacteria	0.303	0.242	0.085	0.370	0.000	0.113	-
14	Control	0.192	0.201	0.069	1.235	0.016	0.111	-
	Gypsum	0.034	0.020	0.043	0.316	0.082	0.151	-
	Rice straw	0.550	0.138	0.289	0.753	0.196	0.079	-
	Bacteria	0.169	0.060	0.104	0.400	0.148	0.101	-
16	Control	0.416	0.194	0.207	0.591	0.048	0.059	-
	Gypsum	0.069	0.031	0.037	0.414	0.439	0.187	-
	Rice straw	0.582	0.150	0.147	0.627	0.184	0.136	-
	Bacteria	0.146	0.029	0.105	0.687	0.121	0.062	-
18	Control	0.321	0.125	0.172	0.519	0.083	0.045	-
	Gypsum	0.051	0.030	0.031	0.332	0.282	0.146	-
	Rice straw	0.412	0.133	0.090	0.494	0.155	0.081	-
	Bacteria	0.152	0.035	0.115	0.719	0.195	0.102	-

ตาราง 4-21 ค่าเฉลี่ยปริมาณชีวภาพของ Cyanobacteria (ไมโครลิตร/ลิตร) ในแต่ละสปีชีส์ของทุกชุดการทดลอง

Weeks	Cyanophyta	Treatments			
		Control	Gypsum	Rice straw	Bacteria
0	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00178	0.00213	0.00213	0.00142
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00053	0.00027	0.00053	0.00027
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00126	0.00101	0.00126	0.00101
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00089	0.00044	0.00089	0.00044
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00076	0.00076	0.00076	0.00076
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	-	-	0.00019	-
	<i>Phormidium</i> sp.	0.00770	0.00385	0.00785	0.00385
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00178	0.00178	0.00222	0.00133
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.00047	0.00024	0.00047	0.00024
2	<i>Anabaena circinalis</i>	-	-	0.00140	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00213	0.00213	0.00213	0.00036
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00053	-	0.00053	0.00044
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00101	0.00013	0.00152	0.00013
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	0.00133	-
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00133	-	0.00266	0.00222
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00076	0.00051	0.00025	0.00063
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	-	0.00006	0.00035	0.00019
	<i>Phormidium limnetica</i>	-	-	0.00044	-
	<i>Phormidium</i> sp.	0.01155	0.01155	0.01155	0.01155
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00200	-	0.00111	0.00089
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.00047	-	0.00024	-
	<i>Romeria gracilis</i>	-	-	0.00016	-
4	<i>Anabaena circinalis</i>	0.00140	-	-	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00249	-	0.00320	0.00142
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00018	-	0.00107	0.00195
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00177	0.00025	0.00139	-
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.00073	-	0.00886	-
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	0.00400	-
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00266	-	0.00400	0.00089
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00051	0.00038	0.00076	0.00076
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00028	0.00019	0.00028	0.00047
	<i>Microcystis</i> sp.	0.00247	-	0.00740	0.00987
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-	-	0.01851
	<i>Phormidium limnetica</i>	-	-	0.00089	0.00207
	<i>Phormidium</i> sp.	0.01155	0.00385	0.01155	0.00962

Weeks	Cyanophyta	Treatments			
		Control	Gypsum	Rice straw	Bacteria
6	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00178	0.00067	0.00444	0.00089
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	-	-	-	-
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	-	0.00047	-
	<i>Romeria gracilis</i>	0.00031	-	-	-
	<i>Synechococcus</i> sp.	0.00018	-	-	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00178	0.00142	0.00213	0.00036
	<i>Aphanothece</i> sp.	-	-	-	0.00030
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00053	0.00027	0.00027	-
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00101	0.00013	0.00088	0.00063
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.00293	-	0.00493	0.00220
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	-	0.00133
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00178	0.00044	0.00400	0.00044
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00051	-	0.00038	0.00076
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00006	0.00013	-	0.00009
	<i>Microcystis</i> sp.	0.00247	-	0.00493	0.00987
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-	-	0.01851
	<i>Phormidium limnetica</i>	0.00341	0.00104	0.00933	0.00015
	<i>Phormidium</i> sp.	0.00385	-	0.00192	0.00192
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00111	-	0.00044	-
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	-	0.00080	-	-
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	-	-	0.00024
	<i>Romeria gracilis</i>	0.00016	-	-	-
8	<i>Anabaena circinalis</i>	-	-	-	0.00350
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.02132	0.00089	0.00799	0.01599
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00711	-	0.00044	0.02287
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00442	0.00032	0.00126	0.00347
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.01282	-	0.00183	0.02331
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00222	-	0.00444	0.00111
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00032	-	0.00158	0.00032
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00071	0.00071	0.00008	0.00039
	<i>Microcystis</i> sp.	0.02467	-	0.00617	0.03084
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.11566	-	0.02313	0.16192
	<i>Phormidium limnetica</i>	0.00074	-	0.00777	-
	<i>Phormidium</i> sp.	-	-	0.00481	-
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00222	0.00222	0.00167	0.00111

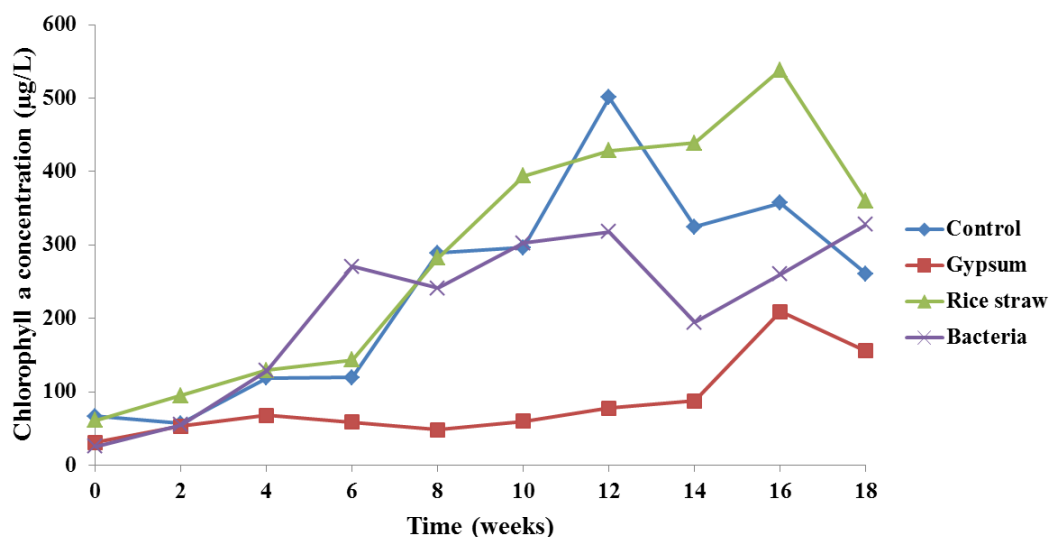
Weeks	Cyanophyta	Treatments			
		Control	Gypsum	Rice straw	Bacteria
10	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	-	0.00200	-	-
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.00118	-	-	0.00118
	<i>Romeria gracilis</i>	0.00026	-	-	0.00013
	<i>Synechococcus</i> sp.	0.00004	0.00022	-	0.00004
	<i>Anabaena circinalis</i>	0.00933	-	-	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.04145	0.00474	0.01303	0.03790
	<i>Aphanothece</i> sp.	-	-	0.00049	0.00049
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.01125	0.00089	0.00030	0.01510
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00042	0.00042	0.00084	0.00421
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.14035	-	0.00822	0.01466
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	-	0.00888
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00296	0.00148	0.00444	-
	<i>Merismopedia punctata</i>	-	-	0.00042	0.00168
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00474	0.00105	-	0.00211
	<i>Microcystis</i> sp.	-	-	0.02467	-
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.03084	-	-	0.21590
	<i>Phormidium limnetica</i>	0.01924	0.00345	0.01036	-
	<i>Phormidium</i> sp.	-	-	-	0.00642
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00518	-	0.00074	0.01777
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	-	0.00266	-	-
12	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.00079	-	0.00079	0.00237
	<i>Romeria gracilis</i>	0.00069	-	-	0.00760
	<i>Anabaena circinalis</i>	0.00700	-	-	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00266	0.00711	0.00444	0.01865
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00355	-	0.00378	0.04419
	<i>Coelomoron</i> sp.	-	-	0.00095	0.00347
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.01099	-	-	0.01099
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.03109	-	-	-
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00063	-	0.00221	0.00032
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00047	-	0.00063	0.00039
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-	0.04626	0.16192
	<i>Phormidium</i> sp.	0.01443	0.00481	0.00962	-

Weeks	Cyanophyta	Treatments			
		Control	Gypsum	Rice straw	Bacteria
14	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	-	0.00056	0.01110	0.00111
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	-	-	0.00118
	<i>Romeria gracilis</i>	-	-	0.00078	0.00013
	<i>Synechococcus</i> sp.	-	0.01732	-	0.00004
	<i>Anabaena circinalis</i>	-	-	0.00350	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00977	0.00089	0.00888	0.00266
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00355	-	0.00155	0.00067
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00063	0.00063	0.00032	0.00189
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.17871	-	0.00733	0.02032
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	0.00999	-
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	-	-	0.00111	0.00111
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00189	0.00190	-	-
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00024	0.00032	0.00055	-
	<i>Microcystis</i> sp.	-	-	0.00617	-
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-	0.09253	0.02313
	<i>Phormidium limnetica</i>	-	-	-	0.00259
	<i>Phormidium</i> sp.	-	0.02406	-	-
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00444	0.00444	0.00555	0.00333
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	0.00200	-	-	0.00400
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	-	-	0.00059
16	<i>Romeria gracilis</i>	0.00013	-	0.00091	-
	<i>Anabaena circinalis</i>	-	-	0.01049	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00622	0.00355	0.00622	0.00089
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00444	0.00111	0.00089	0.00044
	<i>Coelomoron</i> sp.	0.00126	0.00095	0.00063	0.00095
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.10526	-	0.00916	0.00366
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	0.00666	0.00333
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	-	0.00333	-	0.00111
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00221	0.00316	0.00189	-
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00055	0.00047	0.00079	0.00016
	<i>Microcystis</i> sp.	0.01851	0.00617	-	0.00617
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.04626	-	0.09253	-

Weeks	Cyanophyta	Treatments			
		Control	Gypsum	Rice straw	Bacteria
18	<i>Phormidium limnetica</i>	-	-	-	0.00555
	<i>Phormidium</i> sp.	0.00000	0.00962	0.01443	-
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00777	-	0.00611	0.00056
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	-	0.00200	-	0.00600
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.00118	0.00059	-	-
	<i>Romeria gracilis</i>	0.00026	-	0.00039	-
	<i>Synechococcus</i> sp.	0.00004	-	-	-
	<i>Anabaena circinalis</i>	-	-	0.00350	-
	<i>Aphanocapsa</i> sp.	0.00622	0.00444	0.00622	0.00266
	<i>Chroococcus limneticus</i>	0.00244	0.00111	0.00089	0.00044
	<i>Coelomorion</i> sp.	0.00126	0.00095	0.00063	0.00189
	<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i>	0.03264	-	0.00550	0.00366
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	0.00333	0.00333
	<i>Leptolyngbya limnetica</i>	0.00000	0.00333	-	0.00111
	<i>Merismopedia punctata</i>	0.00221	0.00158	0.00095	0.00221
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.00055	0.00047	0.00079	0.00032
	<i>Microcystis</i> sp.	0.02467	0.00617	-	0.00617
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.04626	-	0.09253	-
	<i>Phormidium limnetica</i>	-	-	-	0.00555
	<i>Phormidium</i> sp.	-	0.00962	0.01443	-
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0.00722	-	0.00444	0.00111
	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	-	0.00200	-	0.00600
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.00118	0.00059	-	-
	<i>Romeria gracilis</i>	0.00026	-	-	-
	<i>Synechococcus</i> sp.	0.00004	-	-	0.00019

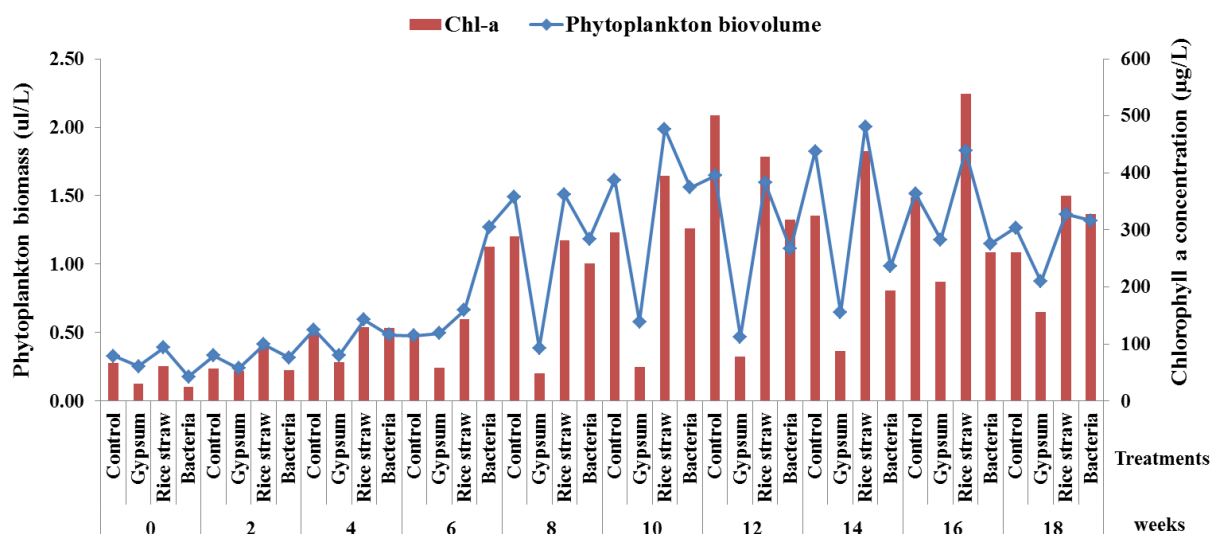
สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์เอในน้ำบ่อเลี้ยงปลาของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 25.3 – 538.5 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น (ภาพ 4-41) ซึ่งยิปซัมสามารถลดความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชได้ โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่เป็นประจุบวกไปจับกับแพลงก์ตอนพืชที่เป็นประจุลบ แล้วรวมตัวเป็นก้อนตะกอนจนมีน้ำหนักและจมลงสู่ก้นบ่อ ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Sun *et al.* (2013) ที่ใช้โพลีอลูมิเนียมคลอไรด์ (Polyaluminum chloride; PACl) เป็นสารโคแอกกูแลนต์ (Coagulant) ในการกำจัด *Microcystis aeruginosa* ในน้ำที่ผลิตน้ำประปา โดยให้จับกันเป็นตะกอน หรือที่เรียกว่าฟล็อก เพื่อสะดวกใน

การกำจัดแพลงก์ตอนชนิดนี้ อีกสาเหตุหนึ่งที่ยิปซัมสามารถลดความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชได้ คือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ไปรวมตัวกับออร์โธฟอสเฟต กลายเป็นแคลเซียมฟอสเฟต ทำให้แพลงก์ตอนพืชนำฟอสฟอรัสไปใช้ในการเจริญเติบโตได้น้อยลง (Wu and Boyd, 1990)



ภาพ 4-41 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลาของแต่ละชุดการทดลอง

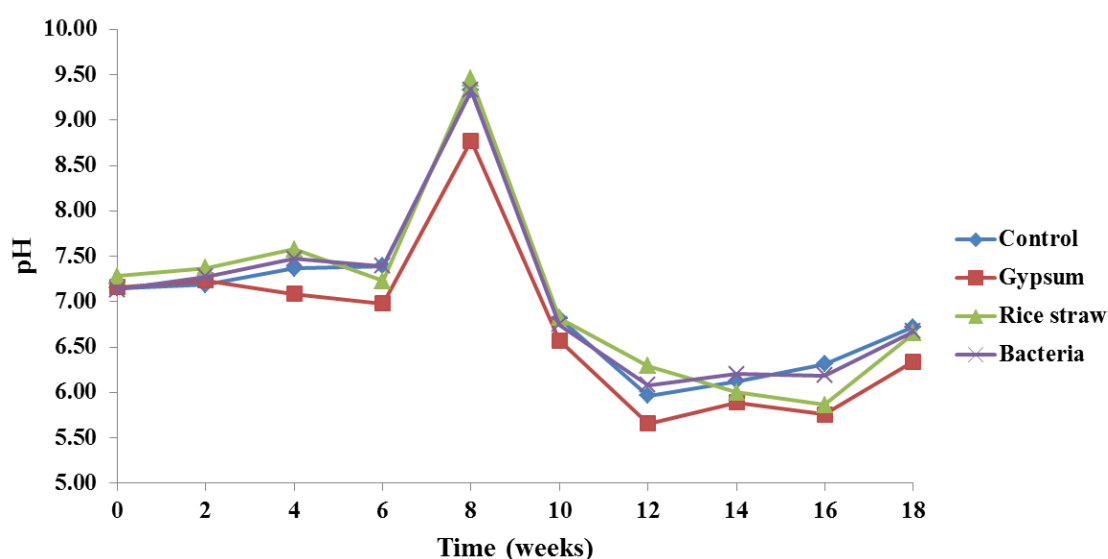
ปริมาตรชีวภาพ (biovolume) ของแพลงก์ตอนพืชมีค่าสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่วิเคราะห์ได้ ($y = 238.36x - 22.85$, $r = 0.89$) ในภาพ 4-42 ช่วงสัปดาห์ที่ 16 และ 18 ของการทดลอง (เดือนกรกฎาคม-สิงหาคม) พบว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลง อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำฝนที่ตกลงมาเจือจาง ทำให้มีปริมาณน้อยลง แพลงก์ตอนพืชที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) และสาหร่ายกลุ่มยูกลีโนยด์ (Division Euglenophyta) ส่วนสาหร่ายที่สร้างกลีโนโคลนในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ cyanobacteria (Division Cyanophyta) มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ (ภาพ 4-40) Cyanobacteria ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Chroococcales ซึ่งจากการรายงานเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างกลีโนโคลน โดย cyanobacteria ที่สำคัญที่สามารถผลิตกลีโนโคลนประกอบด้วยสกุล *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Symploca* sp., *Microcystis* sp., *Phormidium* sp. ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) (Tabachek and Yurkowski 1976; Lovell and Broce, 1985) ปริมาณ cyanobacteria ที่พบในสัปดาห์ที่ 12 ในชุดที่เติมจุลินทรีย์ มีค่าค่อนข้างสูง สอดคล้องกับการตรวจพบจีออสมินในน้ำตัวอย่างดังกล่าว (พบได้จากชุดการทดลองนี้เพียง 1 บ่อเท่านั้น จากทั้งหมด 3 บ่อ) ซึ่งจากค่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวมทั้งหมดในแต่ละบ่อ มีค่าที่แตกต่างกันมาก ซึ่งอาจจะยังสรุปผลไม่ได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อการเจริญของแพลงก์ตอนพืชหรือไม่ อย่างไรก็ตามในชุดควบคุมและชุดที่เติมยิปซัม ปริมาณ cyanobacteria ที่พบมีค่าต่ำ แต่ก็ยังมีการสะสมจีออสมินในตัวอย่างน้ำ ซึ่งจีออสมินที่พบน่าจะสร้างมาจากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีต มากกว่า ในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 ชุดที่เติมจุลินทรีย์พบปริมาณ cyanobacteria มีค่าต่ำ แต่ก็ยังตรวจพบจีออสมินในน้ำตัวอย่าง ผลที่ได้อาจจะมาจากการสร้างกลีโนโดยแอคติโนมัยซีตเช่นเดียวกัน ส่วนในชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว แม้ว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวม และ cyanobacteria ที่พบมีค่าสูง แต่ก็ตรวจไม่พบกลีโนโคลนในน้ำตัวอย่างเลย ผลที่ได้อาจจะเกิดจากสารออกฤทธิ์กลุ่มแทนนินหรือกรดแทนนิกที่อยู่ในน้ำฟางข้าว มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยจากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าสารแทนนินหรือกรดแทนนิกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบางชนิด เช่น *Edwardsiella ictaluri* และ *Flavobacterium columnare* (Chung et al., 1995; Schrader, 2008 ; Straus et al., 2015)



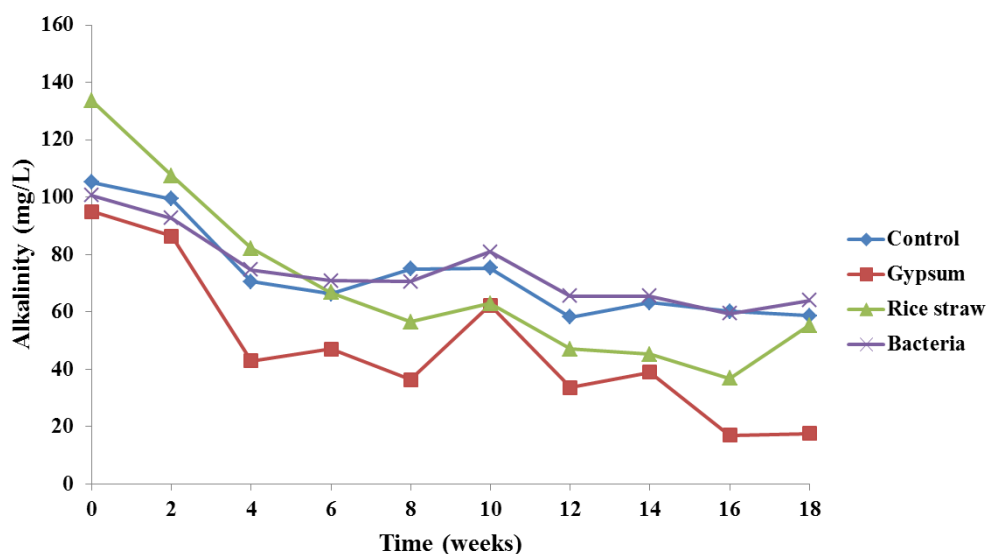
ภาพ 4-42 ปริมาณชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช (ไมโครลิตร/ลิตร) กับปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)

2.4 คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปลานิล

สำหรับค่า pH อยู่ในช่วง 5.66 – 9.46 ซึ่งตั้งแต่สัปดาห์ที่ 10 pH มีค่าต่ำลง (ภาพ 4-43) เนื่องจากช่วงนั้นเป็นฤดูฝนมีปริมาณน้ำฝนไหลลงบ่อ โดยน้ำฝนจะชะล้างความเป็นกรดจากอากาศและดินลงสู่บ่อ ทำให้ pH ของน้ำในบ่อต่ำลง และชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีค่า pH ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ เช่นเดียวกับค่าอัลคาไลน์ที่ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีค่าต่ำสุด เนื่องจากแคลเซียมไปรวมตัวกับคาร์บอเนตทำให้กลายเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต และตรงกับการศึกษาของ Wu and Boyd (1990) ที่พบว่ายิปซัมสามารถลดค่า pH และอัลคาไลน์ได้ และในการทดลองนี้มีค่าอัลคาไลน์อยู่ในช่วง 17 – 134 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 4-44)

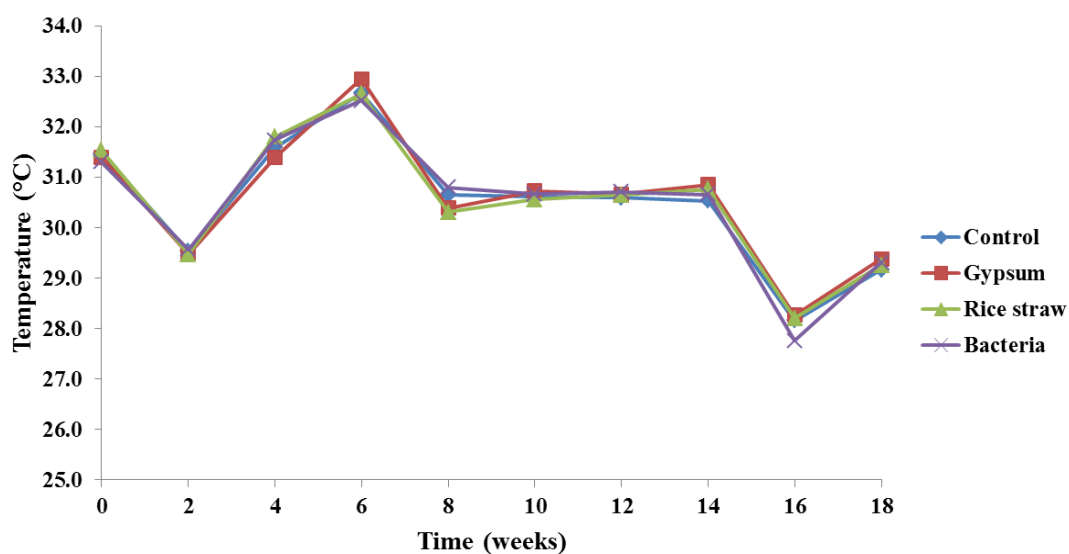


ภาพ 4-43 ค่า pH ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

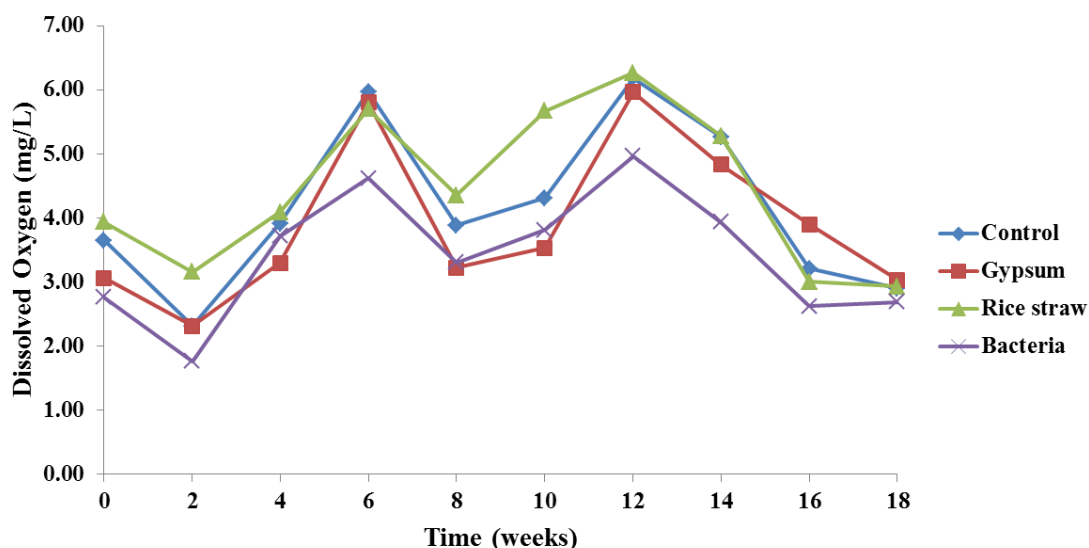


ภาพ 4-44 ค่าอัลคาไลน์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

อุณหภูมิในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 28.2 – 32.9 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเฉลี่ย 30.5 ± 1.2 องศาเซลเซียส (ภาพ 4-45) และออกซิเจนที่ละลายในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลมีค่าอยู่ระหว่าง 1.76 – 6.26 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าเฉลี่ย 4.00 ± 1.19 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 4-46) หลังจากสัปดาห์ที่ 2 ได้มีการเติมอากาศลงในบ่อ โดยใช้หัวทราย เนื่องจากช่วงที่ทดลองประสบปัญหาฟ้าปิด ไม่มีแสงแดด และบางวันฝนตก ทำให้ปริมาณออกซิเจนในบ่อน้อยลง จึงต้องมีการเติมอากาศลงไป เพื่อลดปัญหาปลาตายจากการขาดออกซิเจน

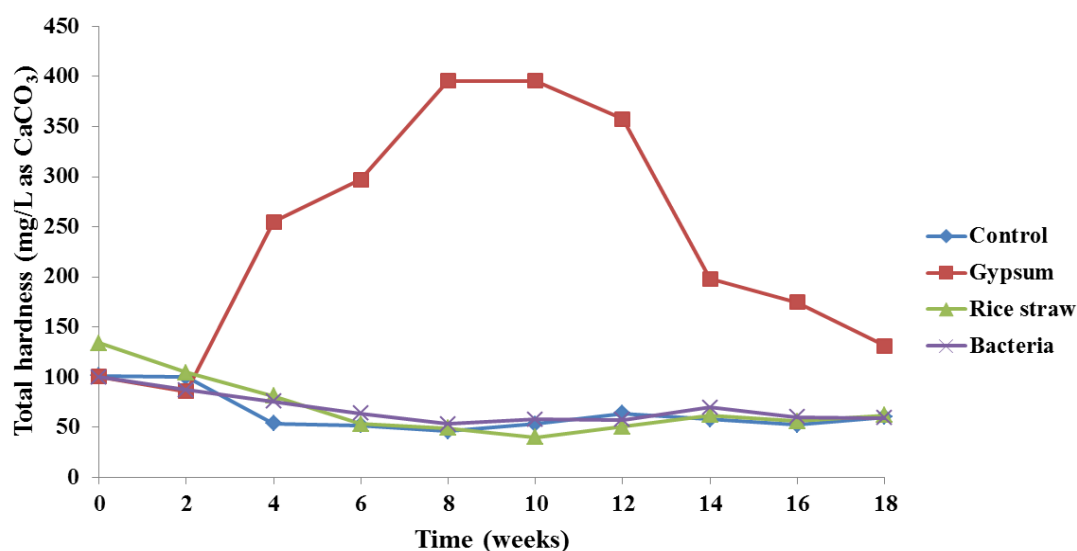


ภาพ 4-45 อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง



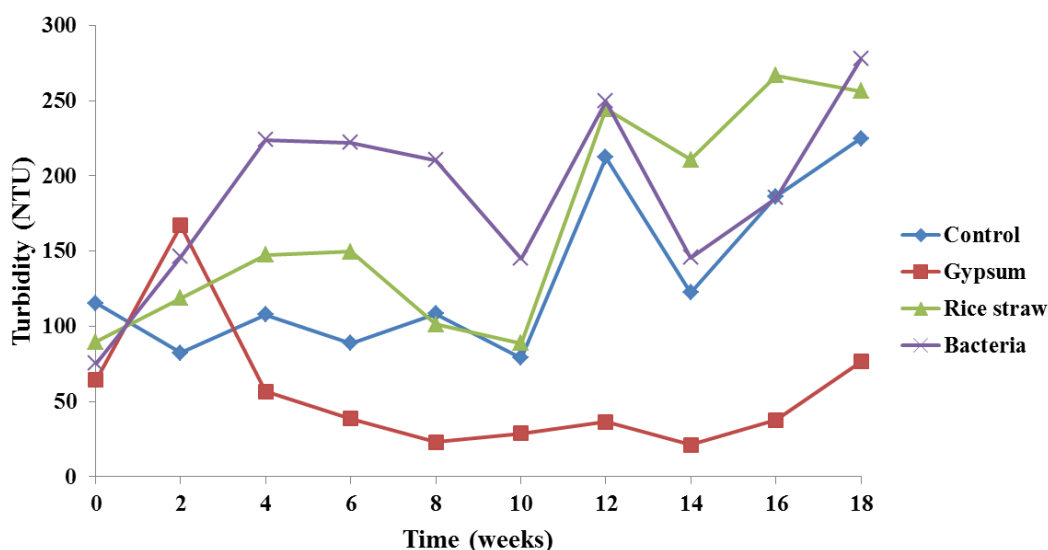
ภาพ 4-46 ออกซิเจนที่ละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

ความกระด้างทั้งหมดในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 40.0 – 395.7 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์มีค่าความกระด้างทั้งหมดใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีค่าความกระด้างทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองอื่น (ภาพ 4-47) เนื่องจากยิปซัมเมื่อละลายน้ำจะแตกตัวให้แคลเซียมไอออน ทำให้ค่าความกระด้างทั้งหมดในน้ำมีปริมาณสูงไปด้วย

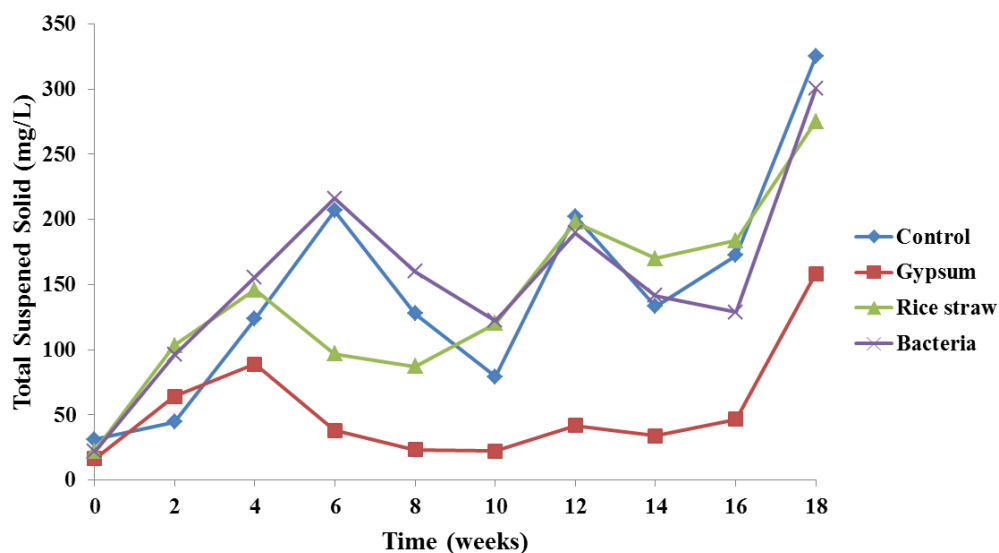


ภาพ 4-47 ค่าความกระด้างทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

ความขุ่นในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 21.2 – 277.7 NTU โดยชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีค่าความขุ่นต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น (ภาพ 4-48) ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Wu and Boyd (1990) ที่พบว่ายิปซัมสามารถลดความขุ่นได้ 6.7 – 62.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวันที่ 3 ของการทดลอง สำหรับสารแขวนลอยทั้งหมดในน้ำมีลักษณะเช่นเดียวกับความขุ่นคือชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีค่าสารแขวนลอยทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น และมีค่าอยู่ระหว่าง 16.5 – 325.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ 4-49)



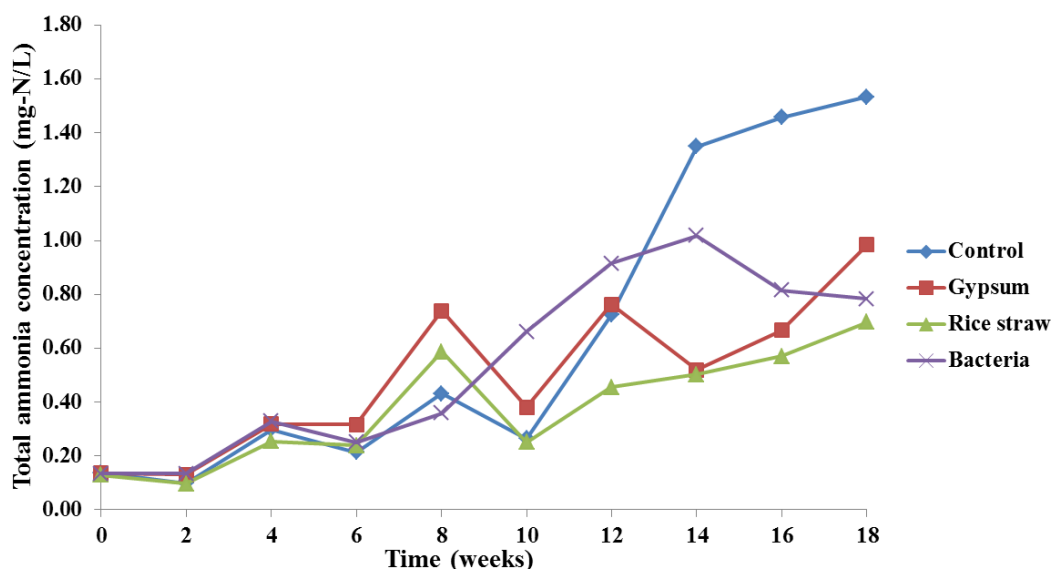
ภาพ 4-48 ค่าความขุ่น (NTU) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง



ภาพ 4-49 สารแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

สำหรับสารอาหารในน้ำ พบว่า ความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 0.10 - 1.53 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร และมีค่าเฉลี่ย 0.52 ± 0.38 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร

โดยชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น (ภาพ 4-50) และเมื่อทำการเก็บน้ำตัวอย่างก่อนและหลังการเติม เพื่อดูประสิทธิภาพการลดแอมโมเนีย พบว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียดีกว่าชุดการทดลองอื่น โดยสามารถลดความเข้มข้นแอมโมเนียได้ 7.8 – 32.8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 4-51) ซึ่งแทนนินจากน้ำฟางข้าวก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการลดแอมโมเนียและลด pH ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียและ pH ในบ่อเลี้ยงปลานับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นภายในบ่อเลี้ยงปลา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhou and Boyd (2015) พบว่าแอมโมเนียรวมในบ่อปลาดุกเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง pH ที่เกิดขึ้นในรอบวัน ทำให้ปริมาณแอมโมเนียอยู่ในรูปที่เป็นพิษส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาดุก อีกทั้งยังไม่มีวิธีการที่เหมาะสมในการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้อย่างทันท่วงที่

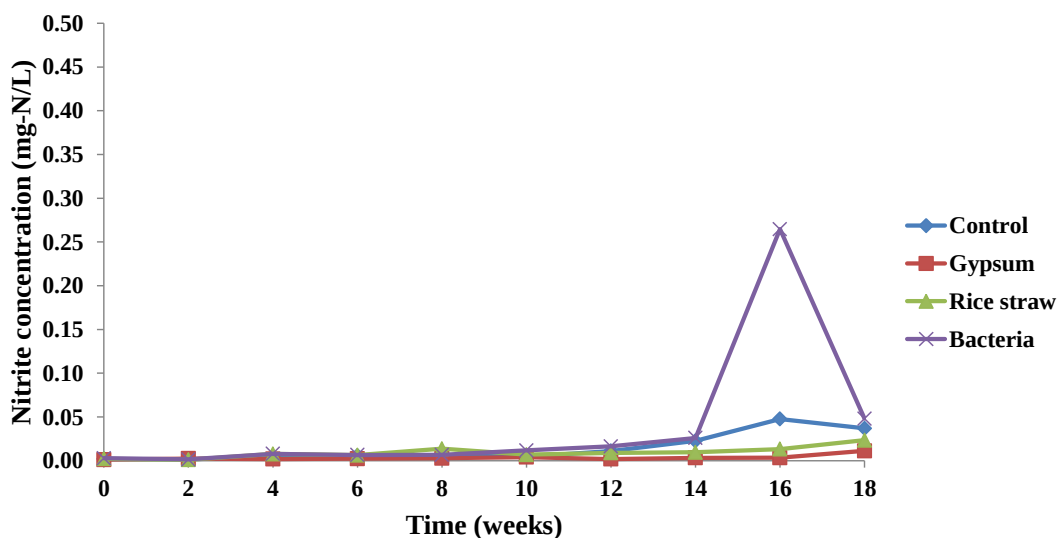


ภาพ 4-50 ความเข้มข้นแอมโมเนีย (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง



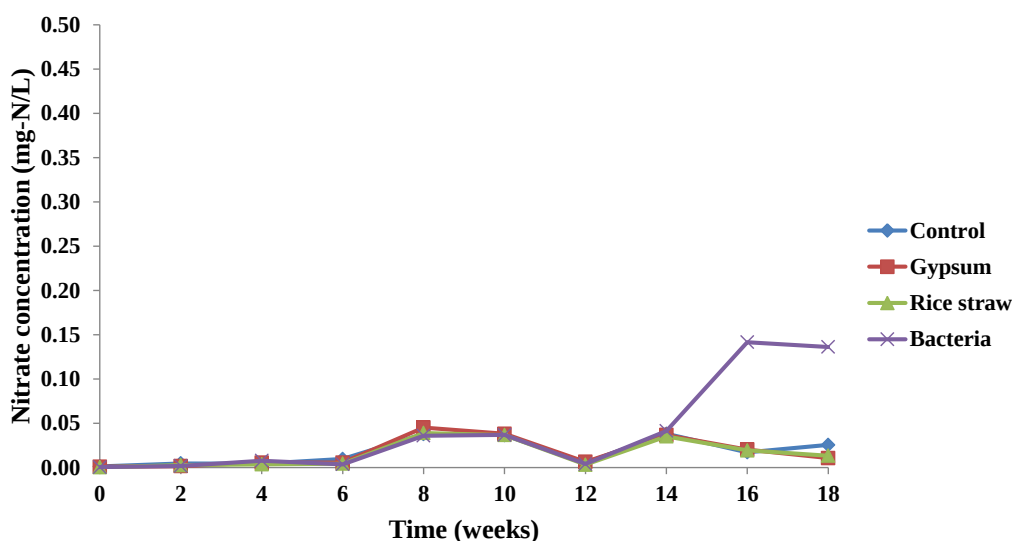
ภาพ 4-51 เปอร์เซ็นต์การลดความเข้มข้นแอมโมเนียในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง (เก็บน้ำตัวอย่างก่อนและหลังเติม)

ความเข้มข้นไนโตรทในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 0.001 – 0.265 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร และมีค่าเฉลี่ย 0.020 ± 0.042 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ มีความเข้มข้นไนโตรทสูงสุดในสัปดาห์ที่ 16 (ภาพ 4-52)



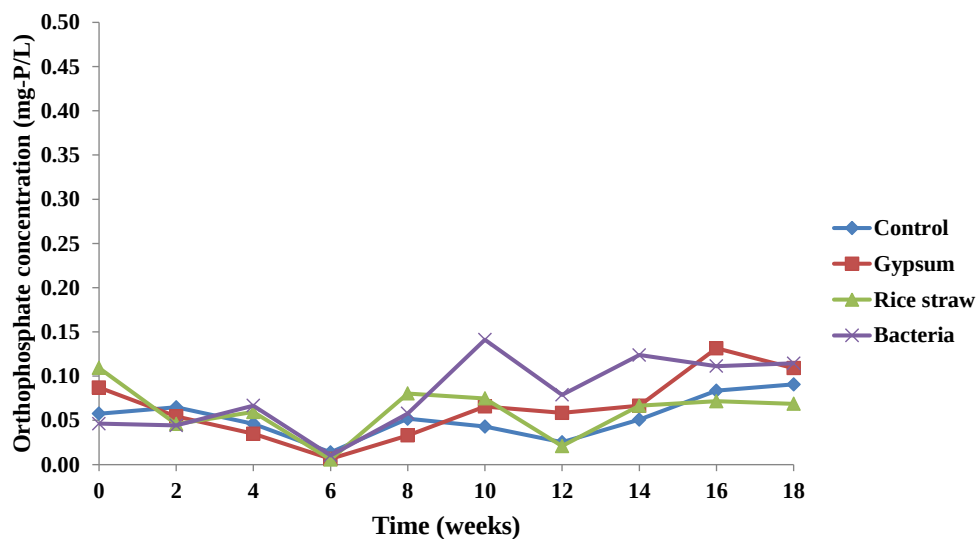
ภาพ 4-52 ความเข้มข้นไนโตรท (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

ความเข้มข้นไนเตรทในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 0.000 – 0.142 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร และมีค่าเฉลี่ย 0.023 ± 0.031 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ มีความเข้มข้นไนเตรทสูงสุดในสัปดาห์ที่ 16 (ภาพ 4-53)



ภาพ 4-53 ความเข้มข้นไนเตรท (มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

ความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟต ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 0.006 – 0.141 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสต่อลิตรและมีค่าเฉลี่ย 0.064 ± 0.034 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่เติม จุลินทรีย์มีความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟตสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 (ภาพ 4-54)



ภาพ 4-54 ความเข้มข้นออร์โธฟอสเฟต (มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสต่อลิตร) ในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลของแต่ละชุดการทดลอง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

ชุดการทดลองที่ 1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี)

จากการทดลองการใช้ยิปซัมที่ความเข้มข้น 0 (ควบคุม), 200, 400 และ 600 ppm ในการลดกลิ่นโคลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา พบว่า ยิปซัมสามารถลดทั้งสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำได้ทั้งในรูป particulate form และ dissolved form โดยยิปซัมสามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในรูป particulate form ได้ เนื่องจากยิปซัมสามารถแตกตัวได้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และไปรวมตัวกับฟอสเฟตซึ่งเป็นประจุลบ ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนที่มีน้ำหนักที่เรียกว่าฟล็อกหรือเป็นตะกอนเล็กๆจมลงข้างล่าง ทำให้กลิ่นโคลนที่อยู่ในเซลล์ฟอสเฟตลดน้อยลงไปด้วย อีกทั้งยิปซายังช่วยลดความเข้มข้นของออร์โธฟอสเฟตในน้ำ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) กับออร์โธฟอสเฟต (PO_4^{3-}) กลายเป็นแคลเซียมฟอสเฟต ส่งผลให้ฟอสเฟตไม่สามารถนำออร์โธฟอสเฟตไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ทำให้ฟอสเฟตในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตกลิ่นได้น้อยลงด้วย และเมื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดกลิ่นโคลนพบว่ายิปซัมทุกความเข้มข้นสามารถลดกลิ่นโคลนได้ดีในวันที่ 6 ของการทดลอง และประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดกลิ่นโคลนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยคิดเป็นความเข้มข้นของยิปซัม 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่ายิปซัมที่ความเข้มข้น 200 400 และ 600 ppm มีประสิทธิภาพในการลดสารประกอบจีโอสมิน 3.30 ± 0.63 , 2.98 ± 1.11 และ 2.37 ± 1.02 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการลดสารประกอบเอ็มไอบี 5.71 ± 2.63 , 5.42 ± 2.64 และ 3.35 ± 1.30 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm มีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนได้ดีที่สุดและสามารถลดสารประกอบเอ็มไอบีได้มากกว่าจีโอสมิน ซึ่งเกิดจากยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถละลายและแตกตัวได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงเลือกยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm ไปใช้ในการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1.2 การใช้น้ำฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี)

สำหรับฟางข้าวที่แช่น้ำเป็นเวลา 15 วัน สามารถคำนวณความเข้มข้นของแทนนินได้จากสมการ $Y = 5.4309x$ ที่ $R^2 = 0.9956$ และเมื่อทดลองน้ำฟางข้าวโดยแบ่งตามความเข้มข้นของแทนนินเป็น 0 (ชุดควบคุม) 50, และ 100 ppm และทดลองควบคู่ไปกับสารละลายมาตรฐานแทนนินในความเข้มข้นเดียวกัน เพื่อลดกลิ่นโคลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลา พบว่าน้ำสกัดจากฟางข้าวไม่สามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานแทนนินก็ไม่สามารถลดสารประกอบจีโอสมินและเอ็มไอบีในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาในห้องปฏิบัติการได้

แต่อย่างไรก็ตามแทนนินมีผลต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียรวม เพราะชุดการทดลองที่เติมแทนนินมีค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมน้อยกว่าชุดควบคุม และเมื่อศึกษาเพิ่มเติมความเข้มข้นของแทนนินจากน้ำฟางข้าวกับสารละลายมาตรฐานแทนนินในการลดแอมโมเนีย ปรากฏว่าแทนนินสามารถลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ เมื่อ

นำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของระดับแทนนิน (1 mg/l) ในอัตราการลดแอมโมเนียภายใน 6 ชั่วโมง ปรากฏว่าแทนนินจากน้ำฟางข้าวมีประสิทธิภาพในการลดแอมโมเนียได้ดีมากเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานของแทนนิน และน้ำสกัดจากฟางข้าวที่ความเข้มข้น 5 ppm มีประสิทธิภาพลดแอมโมเนียสูงที่สุด คือ แทนนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดแอมโมเนียได้ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นน้ำสกัดจากฟางข้าวสามารถนำไปลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้แต่ในการนำแทนนินไปใช้ในการลดแอมโมเนียในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรคำนึงถึงค่า pH ไม่ควรใช้แทนนินในความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจส่งผลให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และทำให้สัตว์น้ำเป็นอันตรายได้ ซึ่งจากการใช้น้ำฟางข้าวที่ความเข้มข้น 5 ppm ทำให้ค่า pH ลดลง จาก 7.02 เหลือ 6.43 ภายในเวลา 10 นาที ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงเลือกน้ำสกัดจากฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm เพื่อไม่ให้ค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลกระทบต่อปลานิลในบ่อเลี้ยงปลาได้

ชุดการทดลองที่ 1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน

การศึกษาการกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล และแหล่งบำบัดน้ำเสีย ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายกลิ่นโคลนได้ 20 ไอโซเลท ทำการคัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด 5 ไอโซเลท คือ KY3 (*Delftia tsuruhatensis*), LS6 (*Acinetobacter calcoaceticus*), TS1 (*Achromobacter denitrificans*), PS1 (*Comamonas* sp.) และ LS4 (*Raoultella ornithinolytica*) ซึ่งตรวจสอบแล้วไม่ก่อให้เกิดโรคในปลานิล การทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการกำจัดจือสมีนและเอ็มไอบีได้สูงถึง 82.87 และ 85.33 % ภายในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ที่มีปริมาณเชื้อ 2, 5 และ 10 เพอร์เซ็นต์พบว่าเชื้อ *Achromobacter denitrificans* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ที่สูงที่สุด และปริมาณในการใช้ที่ 5 เพอร์เซ็นต์เหมาะสมที่สุด การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายกลิ่นไม่พึงประสงค์ ในน้ำจากแหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล ปริมาณเชื้อ 5 เพอร์เซ็นต์ พบว่าทุกเชื้อมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดกลิ่นโคลนได้ประมาณ 40 เพอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง และลดได้มากขึ้นถึง 84 เพอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 168 ชั่วโมง ทดลองทำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อใช้กำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ได้คือ ผลิตภัณฑ์แบบน้ำ

การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล (โดยเลือก ระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ในการทดลองที่ 1)

สำหรับการทดลองนี้ทำการทดลองในบ่อปลา 12 บ่อ โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม ยิปซัม ความเข้มข้น 200 ppm น้ำฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm (คำนึงถึง pH) และจุลินทรีย์ความเข้มข้น 0.1 เพอร์เซ็นต์ หรือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^4 - 10^5 CFU/ml

การเจริญเติบโตของปลานิล

น้ำหนักปลาสุดท้าย (Final weight) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain, ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion ratio, FCR) ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (food conversion efficiency, FCE) อัตราการรอด (%) และผลผลิตปลาทั้งหมดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีน้ำหนักปลาสุดท้าย น้ำหนักปลาที่

เพิ่มขึ้น และ ADG สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ รองลงมาคือ น้ำฟางข้าว 1 ppm ชุดควบคุม (ไม่เติม) และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ซึ่งมีน้ำหนักปลาสุดท้าย 413.3, 385.3, 374.0 และ 347.0 กรัมต่อตัว มีน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น 298.3, 270.0, 259.3 และ 232.0 กรัมต่อตัว และมี ADG 2.49, 2.25, 2.16 และ 1.93 กรัมต่อวัน ตามลำดับ สำหรับอัตราการรอดพบว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีอัตราการรอดสูงสุด คือ 90.40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ และชุดควบคุมมีค่า 84.53, 74.40 และ 71.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่เติมยิปซามีค่ามากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว แต่ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวมีอัตราการรอดที่ดีกว่า ทำให้ผลผลิตปลาทั้งหมดในถังของชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวไม่มีความแตกต่างกัน แต่ถึงอย่างไรทั้งสองชุดการทดลองก็มีผลผลิตปลาที่สูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ อีกทั้งชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ต่ำกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCE) สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งชุดการทดลองที่เติมยิปซัมและน้ำฟางข้าวมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 87.02 และ 86.58 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ 66.37 และ 64.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ปริมาณกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในบ่อปลานิล

ปริมาณกลีโคไลนในน้ำ

ปริมาณกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.104 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยปริมาณจีโอสมินมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.034 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในรูป Particulate form มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.034 ไมโครกรัมต่อลิตร และอยู่ในรูป Dissolved form มีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.003 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอ็มไอบีมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.071 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในรูป Particulate form ทั้งหมด โดยส่วนใหญ่กลีโคไลนในน้ำที่เกิดในบ่อเลี้ยงปลานิลจะอยู่ในรูปของ Particulate form ซึ่งอยู่ในเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช ในการทดลองครั้งนี้ตรวจเจอกลีโคไลนในน้ำเมื่อปลานิลมีอายุการเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ โดยชุดควบคุมมีปริมาณกลีโคไลนสูงที่สุดคือ 0.104 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีทั้งปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบี รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมยิปซัม และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์คือ 0.029 และ 0.020 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีเพียงปริมาณจีโอสมินอย่างเดียว อย่างไรก็ตามในชุดควบคุมและชุดที่เติมยิปซัม ปริมาณ cyanobacteria ที่พบมีค่าต่ำ แต่ก็ยังมีการสะสมจีโอสมินในตัวอย่างน้ำ ซึ่งจีโอสมินที่พบน่าจะสร้างมาจากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซิส มากกว่า ในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 ชุดที่เติมจุลินทรีย์พบปริมาณ cyanobacteria มีค่าต่ำ แต่ก็ยังตรวจพบจีโอสมินในน้ำตัวอย่าง ผลที่ได้อาจจะมาจากการสร้างกลีโคไลนโดยแอคติโนมัยซิสเช่นเดียวกัน สำหรับชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวไม่มีปริมาณกลีโคไลนในน้ำเกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงปลานิล แม้ว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวม และ cyanobacteria ที่พบมีค่าสูง แต่ก็ตรวจไม่พบกลีโคไลนในน้ำตัวอย่างเลย ผลที่ได้อาจเกิดจากสารออกฤทธิ์กลุ่มแทนนินหรือกรดแทนนิกที่อยู่ในน้ำฟางข้าว มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยจากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าสารแทนนินหรือกรดแทนนิกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบางชนิด เช่น *Edwardsiella ictaluri* และ *Flavobacterium columnare* (Chung et al., 1995; Schrader, 2008 ; Straus et al., 2015) และ cyanobacteria ที่ตรวจพบในครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Chroococcales ซึ่งจากรายงานเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างกลีโคไลน โดย cyanobacteria ที่สำคัญที่สามารถผลิตกลีโคไลนประกอบด้วยสกุล *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Symploca* sp., *Microcystis* sp., *Phormidium* sp. ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) (Tabachek and Yurkowski 1976; Lovell and Broce, 1985) ดังนั้นจึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ตรวจไม่พบกลีโคไลนในน้ำตัวอย่างชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว

ปริมาณกลีโคไลนและแอคติโนมัยซีสในดินตะกอน

ปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบีในดินตะกอนบ่อเลี้ยงปลานิลมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 0.384 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีเพียงปริมาณจีโอสมินเท่านั้น และมีปริมาณกลีโคไลนสูงที่สุดในชุดควบคุมเมื่อปลานิลมีอายุการเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ ในการทดลองครั้งนี้ตรวจพบกลีโคไลนในดินตะกอนเมื่อปลานิลมีอายุการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ ซึ่งมีเฉพาะชุดควบคุม แต่เมื่อมีอายุการเลี้ยง 8 และ 10 สัปดาห์มีปริมาณจีโอสมินทุกชุดการทดลอง

สำหรับแอคติโนมัยซีสในดินตะกอนมีปริมาณอยู่ระหว่าง $0.72 - 7.90 \times 10^4$ CFU ต่อกรัม และค่าเฉลี่ยของแอคติโนมัยซีสในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ คือ 3.16 ± 1.50 , 2.94 ± 2.29 , 3.31 ± 2.09 และ $2.22 \pm 1.09 \times 10^4$ CFU ต่อกรัมตามลำดับ

แต่ถึงอย่างไรก็ตามเมื่อไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Gutierrez *et al.* (2013) พบว่าการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณกลีโคไลนทั้งในน้ำและดินตะกอนน้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากช่วงที่ทดลองนั้นอยู่ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนสิงหาคม 2557 โดยเดือนที่สามและสี่ของการเลี้ยงปลานิลเป็นช่วงฤดูฝน ทำให้มีปริมาณแสงแดดน้อยและส่วนใหญ่ฝนตกส่งผลให้ปริมาณ cyanobacteria ในน้ำมีน้อย เพราะสาหร่ายเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่อุณหภูมิสูง อีกทั้งก่อนการทดลองมีการตากบ่อและใส่ปูนขาวในขั้นตอนการเตรียมบ่อ ทำให้จุลินทรีย์ในดินตายไปบางส่วน ดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณกลีโคไลนทั้งในน้ำและดินตะกอนน้อยกว่าการทดลองอื่น แต่ถ้ามีการเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงปลานิลนานไปอีกประมาณ 6 – 8 เดือน มีการสะสมของสารอาหารทั้งในน้ำและดินมากขึ้น ซึ่งจะทำให้การสะสมของปริมาณกลีโคไลนมากกว่านี้ อาจจะทำให้การทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จมากขึ้น

ปริมาณกลีโคไลนในเนื้อปลา

สำหรับเนื้อปลานิลในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบกลีโคไลนทั้งวิธีการทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนและวิธีการวิเคราะห์แบบ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS พบว่าไม่มีปริมาณกลีโคไลน (จีโอสมินและเอ็มไอบี) ในเนื้อปลา เนื่องจากปริมาณกลีโคไลนในน้ำมีปริมาณน้อยมาก และส่วนใหญ่อยู่ในรูป Particulate form ซึ่งจะไปสะสมในตัวปลาได้ต้องเกิดจากปลานิลกินแพลงก์ตอนพืชเข้าไป อีกทั้งในการทดลองนี้มีการให้อาหารปลาอย่างเต็มที่ ทำให้ปลานิลเลือกกินอาหารมากกว่าที่จะกินแพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนพืชที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) และสาหร่ายกลุ่มยูกลีโนไฟต์ (Division Euglenophyta) ส่วนสาหร่ายที่สร้างกลีโคไลนในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ cyanobacteria (Division Cyanophyta) มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ จึงน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ไม่พบกลีโคไลนในเนื้อปลานิล

ชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อปลานิล

แพลงก์ตอนพืชที่พบในบ่อเลี้ยงปลานิล จำนวน 4 ชุดการทดลอง พบชนิดแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด 104 สปีชีส์ จัดอยู่ใน 7 ดิวิชัน ได้แก่ Division Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Euglenophyta, Pyrrophyta, Cryptophyta และ Chrysophyta ตามลำดับ โดยมีจำนวนสปีชีส์ที่พบในแต่ละดิวิชัน คือ 50, 21, 10, 17, 3, 2 และ 1 สปีชีส์ ตามลำดับ ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชที่พบในแต่ละชุดการทดลอง ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนสิงหาคม 2557 มีความแตกต่างกันทั้งจำนวนชนิดและปริมาตรชีวภาพที่พบ โดยปริมาณแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละสัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง ปริมาณแพลงก์ตอนพืชในชุดควบคุม ชุดที่เติมน้ำฟางข้าว และจุลินทรีย์มีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 2 เดือนแรก หลังจากนั้นพบว่าปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อที่เติมน้ำฟางข้าวมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น รองลงมาคือชุดควบคุม จุลินทรีย์ และยิปซัมตามลำดับ

ปริมาตรชีวภาพ (biovolume) ของแพลงก์ตอนพืชมีค่าสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่วิเคราะห์ได้ ($r = 0.88$) โดยแพลงก์ตอนพืชที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Division Chlorophyta) และสาหร่ายกลุ่มยูกลีโนอยด์ (Division Euglenophyta) ส่วนสาหร่ายที่สร้างกลีโคไลนในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ cyanobacteria (Division Cyanophyta) มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ Cyanobacteria ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Chroococcales ซึ่งจากการรายงานเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างกลีโคไลน

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงปลานิล

แอมโมเนียเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะมีความเป็นพิษกับสัตว์น้ำโดยตรง สำหรับความเข้มข้นแอมโมเนียในการทดลองครั้งนี้ พบว่าแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 0.10 - 1.53 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร และมีค่าเฉลี่ย 0.52 ± 0.38 มิลลิกรัม ไนโตรเจนต่อลิตร โดยชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีความเข้มข้นแอมโมเนียต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น และเมื่อทำการเก็บน้ำตัวอย่างก่อนและหลังการเติมเพื่อดูประสิทธิภาพการลดแอมโมเนีย พบว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว 1 ppm มีประสิทธิภาพการลดแอมโมเนียดีกว่าชุดการทดลองอื่น โดยสามารถลดความเข้มข้นแอมโมเนียได้ 7.8 – 32.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแทนนินจากน้ำฟางข้าวก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการลดแอมโมเนียและลด pH ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียและ pH ในบ่อเลี้ยงปลานิลว่าเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นภายในบ่อเลี้ยงปลา

สรุปโดยภาพรวมของการทดลองที่ 2 พบว่า ชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าวความเข้มข้น 1 ppm น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลานิล เนื่องจากมีผลผลิตปลาและอัตราการรอดสูง ไม่มีปริมาณกลีโคไลนในน้ำ และมีปริมาณกลีโคไลนในดินน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น อีกทั้งยังช่วยลดแอมโมเนียในน้ำ นอกจากนี้แล้วฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาถูก และสะดวกในการทำงาน รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมยิปซัม 200 ppm มีผลผลิตปลาและอัตราการรอดไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว แต่มีปริมาณกลีโคไลนในน้ำและดินมากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว ถึงแม้ว่ายิปซัมความเข้มข้น 200 ppm จะเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการลดกลีโคไลนในห้องปฏิบัติการ แต่สำหรับใช้ในบ่อดินเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไป เนื่องจากการตกตะกอนและสะสมสารอินทรีย์บริเวณพื้นบ่อปลามากกว่าชุดการทดลองที่เติมน้ำฟางข้าว จึงทำให้มีปริมาณกลีโคไลนทั้งในน้ำและดิน แต่ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ได้ โดยการลดความเข้มข้นของยิปซัมให้น้อยลง

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการลดกลีโคไลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล โดยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือก 2 ชนิด (*Achromobacter denitrificans* และ *Delftia tsuruhatensis*) จากการลดจีโอสมินและเอ็มไอบีได้มากที่สุด ในการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองในบ่อเพาะเลี้ยงปลานิล ตรวจพบจีโอสมินในบ่อที่เติมจุลินทรีย์ลงไปเพียง 1 บ่อเท่านั้น อีก 2 บ่อ ตรวจไม่พบจีโอสมินและเอ็มไอบีตลอดช่วงการทดลอง ในตะกอนดินก็พบปริมาณจีโอสมินและเอ็มไอบีน้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งคาดว่าจุลินทรีย์ที่เติมลงไปมีส่วนลดกลีโคไลนบริเวณก้นบ่อได้ดี จากผลการวิเคราะห์ปริมาตรชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชพบว่ามีความสอดคล้องกับการปรากฏของจีโอสมินภายในบ่อ โดยบ่อที่มีแพลงก์ตอนพืชสูง สามารถตรวจพบจีโอสมินในน้ำตัวอย่างได้ จากค่าที่ได้ อาจสรุปได้ว่า จีโอสมินที่พบน่าจะสร้างมาจากแบคทีเรียกลุ่ม แอคติโนมัยซีส์ ได้เช่นเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำตัวอย่าง โดยเทคนิค DGGE พบว่า ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในน้ำตัวอย่าง พบแต่จุลินทรีย์ในธรรมชาติ กลุ่ม Uncultured bacteria ผลที่ได้ อาจเนื่องมาจากการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ก่อนการเติมจุลินทรีย์ในแต่ละครั้ง ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด อาจจะไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะธรรมชาติ เมื่อผ่านไปเป็นระยะเวลาอันยาวนาน อีกทั้งเชื้อที่เติมลงไป ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแพลงก์ตอนพืชได้ จึงยังส่งผลให้ปริมาณแพลงก์ตอนพืชรวมภายในบ่อมีค่าสูง

อัตราการรอดของปลานิลภายในบ่อที่เติมจุลินทรีย์เจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มอื่นๆ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของค่า pH โดยจุลินทรีย์แบบน้ำที่เติมลงไปมีค่า pH ค่อนข้างต่ำ (4-5) ทำให้ปลาต้องปรับตัวบ่อยครั้ง (เติมเชื้อทุกๆ 2 สัปดาห์) และอาจส่งผลถึงการแย่งออกซิเจนที่ใช้หายใจในน้ำอีกด้วย อีกทั้งปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำในบ่อมีค่าต่ำกว่าบ่ออื่นๆ ในช่วงเดือนแรก (เฉลี่ย 1.76 mg/l) และช่วงเดือนสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง (เฉลี่ย 2.6 mg/l) ปริมาณออกซิเจนมีค่าต่ำมาก ซึ่งไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ จึงส่งผลให้อัตราการรอดของปลาในชุดที่เติมจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ จึงควรเติมออกซิเจนลงในบ่อมากขึ้น เพื่อลดอัตราการตายของปลา

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1. สำหรับการทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิลมีระยะเวลาในการทดลอง 4 เดือน ทำให้ไม่มีการสะสมกลิ่นโคลนในเนื้อปลา ดังนั้นในกรณีการทดลองแบบนี้ควรขยายเวลาการทดลองเป็นเวลา 6-8 เดือน เพื่อจะได้ผลการทดลองที่ชัดเจนกว่านี้
2. ยิปซัมที่ความเข้มข้น 200 ppm เหมาะสมในการลดกลิ่นโคลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลานิลในห้องปฏิบัติการในระยะเวลาสั้นๆ แต่สำหรับการประยุกต์ใช้ในบ่อดินในการเลี้ยงปลานิล ซึ่งมีระยะเวลาในการเลี้ยง 4-8 เดือน ควรจะลดความเข้มข้นของยิปซัมให้น้อยลง เพื่อป้องกันการสะสมของสารอินทรีย์และลดการเน่าเสียบริเวณพื้นบ่อ หรือนำยิปซัมมาใช้ในช่วง 2 เดือนหลังก่อนจับ ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนมากขึ้น เนื่องจากช่วงระยะแรกของการเลี้ยงยังมีสารอาหารและแพลงก์ตอนพืชในน้ำน้อย
3. สำหรับจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการลดกลิ่นโคลนในช่วงระยะเวลานั้น เนื่องจากไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะธรรมชาติ เมื่อผ่านไปเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นควรเติมจุลินทรีย์ในบ่อในช่วง 1 เดือนหลังก่อนจับ

เอกสารอ้างอิง

- ฝ่ายจัดการธุรกิจ. 2555. การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.).เลขที่ 53 หมู่ 2 ถนนจรูญสนิทวงศ์ ตำบลบางกรวย อำเภอบางกรวย นนทบุรี ประเทศไทย 11130.
- โกสินทร์ พัฒนมนี, 2544. หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. 112 น.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2536. แนวทางการเลี้ยงกุ้งหน้าฝน. วารสารอะควาฟาร์มมิ่ง 5: 30-36.
- ดวงพร คันธ์โชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ ฯ สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- เทพรัตน์ อึ้งเศรษฐพันธ์ สุเทพ ปันธิวงศ์ สมบูรณ์ ใจปิ่นตา ประจวบ ฉายบุ สุตปราณี มณีศรี และรุ่งกานต์ อำไพพงศ์. 2545. แนวทางการจัดการปัญหาการผลิตและการตลาดปลาน้ำจืดจังหวัดเชียงใหม่. รายงานวิจัยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย PDG45N0008. 85 น.
- มงคล ทวีสิน, 2554. การเลี้ยงปลาด้วยฟางข้าว ซึ่งช่องทางการทำกิน. <http://anusorn911.blogspot.com/2010/12/blog-post.html>
- ศูนย์สารสนเทศ. 2547. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2545. กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 91 น.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2549. ปลาแล่เยือกแข็ง: มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 7014-2548. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15 น.
- American Public Health Association (APHA). 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. American Public Health Association, Washington. DC.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington. DC.
- Bagenal, T. 1978. Methods for the Assessment of Fish Production in Fresh Waters, 3rd Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London.
- Boyd, C.E. 1982. Water quality management for pond fish culture. Elsevier Scientific, Amsterdam.
- Chung, K.-T., Zhao, G., Stevens Jr., E., Simco, B.A., Wei, C.I., 1995. Growth inhibition of selected aquatic bacteria by tannic acid and related compounds. J. Aquat. Anim. Health 7: 46–49.
- Cooke, G.D. and Kennedy R. H. 1981. Control of Lake Phosphorus with Aluminum Sulfate: Dose Determination and Application Techniques. Water Resources Bulletin American Water Resources Association (18): 389-395.
- Dionigi, C.P., T.E. Lawlor, J.E.M. Farland and P.B. Johnsen. 1993. Evaluation of geosmin and 2-methylisoborneol on the histidine dependence of TA98 and TA100 *Salmonella typhimurium* tester strain. Water Research 27: 1615-1618.
- Eaton, R.W. and Sandusky, P. 2009. Biotransformations of 2-methylisoborneol by camphor-degrading bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 583–588.
- Eaton, R.W. and Sandusky, P. 2010. Biotransformations of (+/-)-geosmin by terpene-degrading bacteria. Biodegradation, 21:71–79.

- Farmer, L.J., J.M. McConnell, T.D.J. Hagan and D.B. Harper. 1995. Flavor and off - flavor in wild and farmed Atlantic salmon from locations around Northern Ireland. *Water Science and Technology*. 31(11): 259-264.
- Form, J. and V. Horlyck. 1984. Site of uptake geosmin a cause of earthy-flavor in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1224-1226.
- Gardolinski, P.C.F.C., P.J Worsfold and I.D. Mckelvie. 2004. Seawater induced release and transformation of organic and inorganic phosphorus from river sediments. *Water Research*. 38: 688-692.
- Grimm, C.C., W.L. Steven, and V.Z. Paul. 2004. Instrumental versus sensory detection of off-flavors in farm-raised channel catfish. *Aquaculture*. 236: 309-319.
- Gutierrez, R., N Whangchai, U Sompong, W Prarom, N Iwami, T Itayama, N Nomura and N Sugiura. 2013. Off-flavour in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in an integrated pond-cage culture system. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 7(Special Issue): S1-13.
- Hashida, K., R. Makino and S. Ohara. 2009. Amination of pyrogallol nucleus of condensed tannins and related polyphenols by ammonia water treatment. *Holzforschung*. 63: 319-326.
- Hoefel, D., L. Ho, W. Aunkofer, P. T. Monis, A. Keegan, G. Newcombe and C.P. Saint. 2006. Cooperative biodegradation of geosmin by a consortium comprising three gram-negative bacteria isolated from the biofilm of a sand filter column. *Applied Microbiology*. 43: 417-423.
- Huang, B. and H. Hong. 1999. Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*. 39: 205-211.
- Izaurire, G., C.J. Hwang, S.W. Krasner and J. Micheal. 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply system. *App. Envi. Micro.* 43(3): 708-714.
- Johnsen, P.B. and S.W. Lloyd. 1992. Influence of fat content on uptake and depuration of the off-flavor 2-methylisoborneol by channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 2406-2411.
- Johnsen, P.B., S.W. Lloyd, B.T. Vingad and P.C. Dionigi. 1996. Effect of temperature on uptake and depuration of 2-methylisoborneol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. World Aqua. Soc.* 27(1): 15-20.
- Klapper, H. 1991. *Control of Eutrophication in Inland Waters*. New York: Ellis Horwood.
- Kuster, E., Williams, S., 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature (London)* 202 (4935), 928-929.
- Lee, T. G. 2000. Development of ultrasonic irradiation process for the control of cyanobacteria bloom in eutrophic lake. Doctoral dissertation. Tsukuba University. 130 pp.
- Lloyd, S.W. and C.C. Grimm. 1999. Analysis of 2-methylisoborneol and geosmin in catfish by microwave distillation-solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 47: 164-169.
- Lovell, R.T. and D. Broce. 1985. Cause of musty flavor in pond culture penaeid shrimp. *Aquaculture penaeid shrimp*. *Aquaculture* 50: 169-174.

- Martin, J.F., C.P. McCoy, W. Greenleaf and L.W. Bennett. 1987. Analysis of 2-methylisoborneol in water, mud and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) from commercial culture ponds in Mississippi. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 909-912.
- Martin, J.T., L.W. Bennett and W.H. Graham. 1988. Off-flavor in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) due to 2-methylisoborneol and its dehydration products. Water Sci. Technol. 29 (8/9): 59-65.
- Martin, J.F., M.S. Plakas, H.J. Holley, J.V. Kitzman and A.M. Guaino. 1990. Pharmacokinetics and tissue disposition of the off-flavor compound 2-methylisoborneol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can. J. Fish. Aqua. Sci. 47: 544-547.
- Masuda, K. and C. E. Boyd. 1994. Phosphorus fractions in soil and water of aquaculture ponds built on clayey, Ultisols at Auburn, Alabama. Journal of the World Aquaculture Society 25:379–395.
- Matsuyasu, N., O. Takahoro, K. Yoshiyuki, I. Noriyuki, I. Taichi, A. Akiro, S. Toshiaki, H. Euichi and S. Michio. 1996. Inhibitory effects of odor substances, geosmin and 2-methylisoborneol, on early development of sea urchins. Elsevier Science Ltd. PII: S0043-1354(96)00104-2.
- Mendez, C., A.F. Brana, M.B. Mamzanal, and C. Hardisson. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. Canadian Journal of Microbiology. 31: 446-450.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59: 695-700.
- Ng, H.H., Q. Feng, H. Wang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Zhang, and K. Struhl. 2002. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. Genes & Development. 16:1518–1527.
- Park, M.H., M.S. Han, C.Y. Ahn, H.S. Kim, B.D. Yoon and H.M. Oh 2006. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract. The Society for Applied Microbiology, 43: 307-312.
- Persson, P.E. 1982. Muddy odor: a problem associated with extreme eutrophication. Hydrobiologia 89: 161p.
- Persson, F., Heinicke, G., Hedberg, T., Hermanson, M. and W. Uhl. 2007. Removal of geosmin and MIB by biofiltration—an investigation discriminating between adsorption and biodegradation. Environ. Technol., 28: 95–104.
- Piumsombun, S. 2001. Production, accessibility and consumption patterns of aquaculture products in Thailand. FAO Fisheries Circular No. 973.
- Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic-producing actinomycetes. Applied Microbiology. 14: 73-92.
- Saadoun, I. and El-Migdadi, F. 1998. Degradation of geosmin-like compounds by selected species of Gram-positive bacteria. Letters in Applied Microbiology, 26: 98–100.

- Saito, A., Tokuyama, T., Tanaka, A., Oritani, T. and Fuchigami, K. 1999. Microbiological Degradation of (-)-Geosmin. *Wat. Res.*, 33 (13): 3033-3036.
- Schindler, D.W. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes: Natural mechanisms compensate for deficiencies of nitrogen and carbon in eutrophied lakes. *Science* 195: 260-262.
- Schrader, K.K., 2008. Compounds with inhibitory activity against the channel catfish pathogens *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. *N. Am. J. Aquac.* 70, 147–153.
- Sivonen, K. 1982. Factor influencing odor production by actinomycetes. *Hydrobiologia*. 86: 165-170.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313– 340
- Smith and Pettit. 1983. Bayesian model comparisons in the presence of outliers. *Bull. Int. Statist. Inst.* 50, 1, 292-306.
- Smyth, R. W. and Kahlmeter, G. 2005. Mannitol salt agar-cefoxitin combination as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. of Clinical Microbiology*. 43(8): 3797–3799.
- Sun, F., H-Y. Pei, W-R. Hu, X-Q. Li, C-X. Ma and R-T. Pei. 2013. The cell damage of *Microcystis aeruginosa* in PACI coagulation and floc storage processes. *J. Separation and Purification Technology*. 115: 123-128.
- Straus, D.L., Farmer, B.D., Beck, B.H., Bosworth, B.G., Torrains E.L. and C.S. Tucker. 2015. Water hardness influences *Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish. *Aquaculture*. 435: 252–256.
- Tabachek, J.L. and M. Yurkowski. 1976. Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites and 2-methylisoborneol in saline lake in Monitoba. *J. Fish Res. Board Can.* 33: 25-35.
- Tanaka, A., Oritani, T., Uehara, F., Saito, A., Kishita, H., Niizeki, Y., Yokota, H. and Fuchigami, K.. 1996. Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoboneol. *Wat. Res.*, 30 (3): 759-761.
- Tanchotikul, U. 1990. Studies on important volatile flavor compounds in Louisiana rangia clam (*Rangia cuneata*). Doctoral dissertation. Louisiana state university. 96 p.
- Tanchotikul, U. and T.C.Y. Hsieh. 1990. Methodology for quantification of geosmin and Levelin raggia clam (*Rangia cuneata*). *J. Food Sci.* 55(5): 235-312.
- Tang, K., Ngoi, S.M., Gwee, P.C., Chua, J.M.Z., Lee, E.J.D., Chong, S.C. and Lee, C.G.L. 2003. Impacts of aerosols and clouds on photolysis frequencies and photochemistry during TRACE-P: 2. Three-dimensional study using a regional chemical transport model, *J. Geophys. Res.*, 108(D21), 8822.
- Van Der Ploeg, M. 1989. Seasonal trends in flavor quality of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) from commercial pond in Mississippi. *J. of Applied Aquaculture*. 2(3): 22-31.
- Van Der Ploeg, M. and C.E. Boyd. 1991. Geosmin production in cyanobacteria (blue green algae) in fish pond at Auburn, Alabama: *J. of the World Aquaculture Society* 22(4): 207-216.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:655-671.
- Waksman, A. 1967. *The Actinomycetes: A summary of current knowledge*. New York: The Ronald Press Company. 250 p.

- Wegner, D.L., Witte, D.L. and Schrantz, R.D. 1992. Insensitivity of rapid antigen detection methods and single blood agar plate culture for diagnosing streptococcal pharyngitis. *JAMA.*, 267(5):695-697.
- Wellington, E.M.H. and Williams, S.T. 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Lett.*, 6, 151-157.
- Whangchai N, K. Kannika, S. Deejing, T. Itayama, N. Iwami, T. Kuwabara and Y. Peerapornpisal. 2008. Growth performance and accumulation of off-flavor in red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mosambicus*, cultured by green water system using chicken manure. *Asian Environmental research* 1: 8-16.
- Wu, R. and C.E. Boyd. 1990. Evaluation of calcium sulfate for use in aquaculture ponds. *Progressive Fish-Culturist* 52:26-31.
- Yamada, N., N. Marakami, N. Kawamura and J. Sakakibara. 1994. Mechanism of an early lysis by fatty acid from *Axenic Phormidium tenue* (Musty odor-producing cyanobacterium) and its growth prolongation by bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* 17(9): 1277-1281.
- Yamprayoom, J. and A. Noomhorm. 2000. Geosmin and off-flavor in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. of Aquatic product technology* 9(2): 29-41.
- Yurkowski, M. and J.L. Tabachek. 1974. Identification analysis and removal of geosmin from Muddy flavored trout. *J. Fish. Res Board. Can.* 31: 1851-1858.
- Yurkowski, M. and J.L. Tabachek. 1980. Geosmin and 2-methylisoborneol implicated as a cause of muddy odor and flavor in commercial fish from Cedar Lake. Manitoba. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 1449-1450.
- Zhou, L. and C.E. Boyd. 2015. An assessment of total ammonia nitrogen concentration in Alabama (USA) ictalurid catfish ponds and the possible risk of ammonia toxicity. *Aquaculture*. 437: 263-269.

ภาคผนวก ก

วิธีการคำนวณ

1. ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดกลิ่นโคลน (หน้า 21)

$$\begin{aligned} & \text{ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดกลิ่นโคลน (ng/l ต่อยิปซัม 1 mg/l)} \\ &= \frac{\text{กลิ่นโคลนของชุดที่เติมนยิปซัม} - \text{กลิ่นโคลนของชุดควบคุม}}{\text{ความเข้มข้นของยิปซัม (mg/l)}} \end{aligned}$$

2. ประสิทธิภาพของยิปซัมในการลดคลอโรฟิลล์เอ (หน้า 20 และ 21)

$$\begin{aligned} & \text{ประสิทธิภาพการลดคลอโรฟิลล์เอ (µg/L ต่อยิปซัม 1 mg/l)} \\ &= \frac{\text{คลอโรฟิลล์เอของชุดที่เติมนยิปซัม} - \text{คลอโรฟิลล์เอของชุดควบคุม}}{\text{ความเข้มข้นของยิปซัม (mg/l)}} \end{aligned}$$

สูตร BG11 (BlueGreen Medium) (Stanier et al., 1971)

Stocks	per litre
(1) NaNO ₃	15.0 g
	per 500 ml
(2) K ₂ HPO ₄	2.0 g
(3) MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.75 g
(4) CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.80 g
(5) Citric acid	0.30 g
(6) Ammonium ferric citrate green	0.30 g
(7) EDTANa ₂	0.05 g
(8) Na ₂ CO ₃	1.00 g
(9) Trace metal solution:	per litre
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.05 g
Medium	per litre
Stock solution 1	100.0 ml
Stock solutions 2-8	10.0 ml each
Stock solution 9	1.0 ml

Make up to 1 litre with deionized water. Adjust pH to 7.1 with 1M NaOH or HCl. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

การฝึกฝนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส

ผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส จำนวน 10 คน มาฝึกฝนการชิมรสชาติเนื้อปลาที่มีกลิ่นโคลนและไม่มีกลิ่นโคลน โดยการนำเนื้อปลาที่มีกลิ่นโคลน 5-10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (วิเคราะห์แบบ MD-SPME ร่วมกับ GC/MS) เนื่องจากระดับต่ำสุดของจืออสมินที่สามารถตรวจพบโดยมนุษย์ในปลาหนัง (catfish) คือ 8.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในปลาเทราต์ คือ 6.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Lelana, 1983; Yurkowski and Tabachek, 1974; พรพิมล, 2014) ซึ่งทำการชิมรสชาติเนื้อปลาลวกสุก โดยใช้สเกลความชอบ (Hedonic scale) ดังนี้

แบบฝึกฝนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส(เนื้อปลาลวก)

ชื่อผู้ทดสอบ : วันที่ :

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวา โดยให้คะแนนความชอบในแต่ละกลุ่มลักษณะตามลำดับคะแนนที่ได้กำหนดไว้ข้างล่าง

ระดับคะแนน

- 0 = ไม่มีกลิ่นโคลน
- 1 = มีกลิ่นโคลนน้อยที่สุด
- 2 = มีกลิ่นโคลนน้อย
- 3 = มีกลิ่นโคลนปานกลาง
- 4 = มีกลิ่นโคลนมาก
- 5 = มีกลิ่นโคลนมากที่สุด

รหัสตัวอย่าง	รสชาติเนื้อปลา

ข้อเสนอแนะ

.....

ในกรณีที่ผู้ทดสอบไม่สามารถแยกรสชาติของเนื้อปลาระหว่างที่มีกลิ่นโคลนและไม่มีกลิ่นโคลนได้ จะทำการฝึกฝนเพิ่มเติมจนกว่าผู้ทดสอบจะแยกรสชาติของเนื้อปลาได้

วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 10 คน ซึ่งทำการชิมรสชาติเนื้อปลาลวกสุก โดยใช้สเกลความชอบ (Hedonic scale) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมประมวลผลทางสถิติ

แบบสอบถามความพึงพอใจของผู้บริโภคปลาไหล

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1. เพศหญิงชาย
2. อายุ10 - 20 ปี 21 - 30 ปี31 - 40 ปี 41 - 51 ปี51 ปีขึ้นไป
3. การศึกษาประถมศึกษามัธยมศึกษาปริญญาตรีปริญญาโทสูงกว่าปริญญาโท
4. ประเภทผู้บริโภคเด็กนักศึกษาข้าราชการประชาชนทั่วไป

ตอนที่ 2 ประเมินระดับความพึงพอใจของผู้บริโภค (โปรดทำเครื่องหมายถูก หน้าคำตอบที่ตรงกับความจริง)

กรณีที่มีกลิ่นให้ระบุ ระดับคะแนน 5= มากที่สุด 4= มาก 3= ปานกลาง 2= น้อย 1= น้อยที่สุด

ข้อ	ตัวที่ 1		ตัวที่ 2		ตัวที่ 3	
	มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	มี	ไม่มี
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

ตอนที่ 3 ให้ความคิดเห็น หรือข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

ภาคผนวก ข

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. นำเสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง Application of Gypsum and rice straw for water qualities improvement and algae control in fish ponds. ในงานประชุมวิชาการ “Globalization and Water environment” ที่ Nagasaki University ประเทศญี่ปุ่น วันที่ 20-21 มีนาคม 2557



2. นำเสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง Effects of Gypsum on Algal-rich Pond Water. ในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 6 “Climate Change: Impact on Aquatic Resources and Fisheries” ที่คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในวันที่ 4 ธันวาคม 2556 (ดั่งเอกสารแนบ)

3. กำลังดำเนินการตีพิมพ์ผลงานวิจัย 2 เรื่อง คือ

3.1 Use of gypsum for removal of off-flavor compounds in fish ponds. First International Conference on Science, Engineering and Environment (SEE), Tsu City, Mie, Japan, Nov. 19-21, 2015 (ดั่งเอกสารแนบ)

3.2 Mitigation Technique for Earthy-Musty Odour in Pond-Raised Tilapia Using Gypsum and Rice straw ในวารสาร Walailak Journal (ดั่งเอกสารแนบ)



Book of Abstracts

4 December 2013

The Sixth International Fisheries Conference
with the theme

***"Climate Change : Impact on Aquatic Resources
and Fisheries"***

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources
Maejo University, Chiang Mai, Thailand

IO-09

Effects of Gypsum on Algal-rich Pond Water

Niwooti Whangchai*, Redel Gutierrez, Supanee Suwanpakdee and
Pornpimol Pimolrat

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai,
Thailand

*Corresponding author e-mail: niwooti@hotmail.co.th

ABSTRACT

Controlling or eliminating cyanobacteria from aquaculture ponds is one of the most challenging problems in the industry. Excessive abundance of cyanobacteria can cause water quality aberrations that affect fish growth and health, including the possibility of rendering fish off-flavored and contaminated with algal toxins. This study investigated the effectiveness of gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a cheap and readily available source of calcium and sulfur, for removing phytoplankton cells by flocculation. Algal-rich water samples from a fish pond were collected and added with varying amounts of gypsum (0, 200, 400 and 600 ppm) to compare the chlorophyll a levels and water quality for 6 days. The result showed that gypsum had significantly ($P < 0.05$) reduced chlorophyll a in the treatments when compared with the control (0 ppm). After 3 days, the reduction rates of chlorophyll a by gypsum at 200, 400 and 600 ppm were 26.47, 48.53 and 46.43 %, respectively which were comparable with the observed reduction rates after 6 days. However, no significant differences in chlorophyll a were observed between the gypsum-treated waters. Dissolved orthophosphate levels in the algal-rich waters were also significantly ($P < 0.05$) decreased in the treatments through calcium phosphate precipitation, which could reduce and limit phytoplankton abundance. After 6 days, orthophosphate levels in 200, 400 and 600-ppm gypsum-treated waters were 71.28, 64.10 and 87.44%, respectively. Gypsum concentration at 600 ppm was the most effective in precipitating dissolved orthophosphate in water. Moreover, result further showed that chlorophyll a and orthophosphate levels in water were significantly correlated ($P < 0.05$) with water hardness.

Keywords: Off-flavor, Removal, Gypsum, Fish pond water

USE OF FLU GAS DESULFURIZING GYPSUM FOR REMOVAL OF OFF-FLAVOR COMPOUNDS IN FISH PONDS WATER

Niwooti Whangchai^{1*}, Redel Gutierrez², Udomluk Sompong¹, Supanee Suwanpakdee¹,
Pornpimol Pimolrat³ and Kanda Whangchai⁴

¹Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai, Chiang Mai, Thailand;

²College of Arts and Sciences, Central Luzon State University, Science City of Munoz, Nueva Ecija, 3120, Philippines;

³Program in Fisheries, Maejo University, Chumphon Campus, La Mae, Chumphon, Thailand;

⁴Department of Biology, Faculty of Science, Chiangmai University, Thailand

*Email: niwooti@hotmail.co.th

ABSTRACT

Accumulation of off-flavor in fish flesh caused by the presence of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) in pond water is a worldwide quality problem in aquaculture. This study investigated the effectiveness of commercial flue gas desulfurizing gypsum (CFG), a cheap and readily soluble material, for the removal of off flavor substances: geosmin and MIB, in fish pond water. Water samples from fish ponds were spiked with known concentrations of geosmin and MIB and varying amounts of CFG (0, 200, 400 and 600 mg/L) were added to compare the removal rate of geosmin and MIB, chlorophyll *a* levels and orthophosphate. The experiment was conducted for 9 days. It was revealed that CFG had significantly reduced both geosmin and MIB in spiked ponds water when compared with the control (0 mg/L) ($P < 0.05$). The highest removal rates of geosmin (63.41%) were found when 600 mg/L of CFG was used after 9 days. However, the removal rate of geosmin at 200 and 400 mg/L CFG was not significantly ($P > 0.05$) different from 600 mg/L. The highest removal rates of MIB (75.63%) were found with the treatment with 400 mg/L CFG after 6 days. In addition, 200 mg/L CFG was also highly effective in reducing chlorophyll *a* and orthophosphate concentration through calcium phosphate precipitation. It was suggested that 200 mg/L CFG is the suitable dose to apply for removal of off flavor compounds in fish ponds water.

Keywords: Off-flavor, Removal, Gypsum, Fish pond water, Geosmin, MIB

INTRODUCTION

Increase in population resulting in increased demand has pushed extensive aquaculture towards intensively operated production systems and commonly resulting in eutrophic conditions and cyanobacterial blooms. Cyanobacterial secondary metabolites can cause undesirable tastes and odors leading to acceptability in aquaculture products [1], [2]. Off-flavors especially earthy-musty off-flavors in drinking water supplies and aquatic animals for human consumption are world-wide problems. 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin are the two most common earthy/musty-causing compounds. These off-flavors metabolites can be detected by consumers at the concentrations as low as 5–10 ng/L [3]. Some studies have shown that earthy/musty aromas were excreted by cyanobacteria such as *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp. [4]–[6]. The conventional methods for controlling cyanobacterial bloom (sources of metabolites) are coagulation, clarification, filtration, algaecide and ozone [7], [8]. These methods, except coagulation, are usually expensive, complicated and can cause further pollution due to the use of chemicals.

Commercial flue gas desulfurizing gypsum has been used in agriculture purposes for soil amendment. Because it is a cheap and readily available source of

calcium and sulfur that has been widely used in agriculture for recovery of alkali soils and as a source of calcium and sulfate in fertilizer [9]–[11]. Some studies suggested that natural rock gypsum powder could be used as a pond treatment in aquaculture for: flocculation of clay particles, increasing the concentration of calcium and total hardness, precipitation of phosphate and reducing in water pH [12]. However, the information on using CFG for water treatment in aquaculture especially in algal rich ponds water is limited. So, this study aimed to evaluate and the effectiveness of CFG in removing off-flavors compounds. The changes of phytoplankton cells and water qualities were also observed.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Protocol

Algal-rich water samples collected from fish ponds were spiked with known concentrations of geosmin and MIB and varying amounts of CFG (0, 200, 400 and 600 mg/L) were added. Three replications of each group were performed. Commercial flue gas desulfurizing gypsum used in this study was purchased from local company.

The removal rate of geosmin and MIB, chlorophyll *a*

levels and water quality were monitored for 9 days. The production of hardness of each concentration was analyzed to compare with analytical grade gypsum.

Analysis of Geosmin and MIB in Water

Off flavor analysis was conducted by headspace solid phase microextraction (HS SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) model Agilent Technology, USA [13]. A Geosmin and MIB standard from Sigma were used as source of off flavor.

Water Quality and Nutrient Analysis

Standard methods [14] were used for the analysis of total hardness, and orthophosphate-phosphorus in the laboratory.

Hydro-biological Analysis

Chlorophyll-*a* in the water samples was extracted with 10 mL of hot methanol (60°C in water bath) and quantified with a spectrometer (Hach DR4000, USA) [14]. Chlorophyll-*a* concentration was calculated as described by Wintermans and de Mots [15] and Saijo [16].

Data Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to test for difference between means of observed parameters in each treatment. Duncan Multiple Range Test (DMRT) at 95% confidence level was used for treatment comparison.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Effect of gypsum on total hardness

In this study, it was founded that gypsum from different sources (analytical grade and CFG) gave different concentrations of total hardness (Fig. 1). The analytical grade showed higher total hardness than commercial grade and positive correlation between total hardness and gypsum concentration in both analytical and commercial grade. The total hardness per 1 mg of analytical and commercial grade gypsum was 0.546 and 0.329 mg/L of CaCO_3 , respectively (Fig. 2). In this study, CFG could dissolve easily and provide harness in to the water. Some studies reported that gypsum is more soluble than liming materials and has been widely used in agriculture for increasing concentration of calcium and total hardness [11], [12]. However CFG: available and cheap material is suggested to use as hardness source in aquaculture.

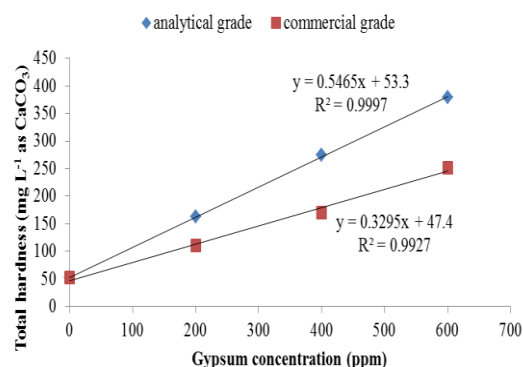


Fig. 1 Relation between total hardness and gypsum concentration

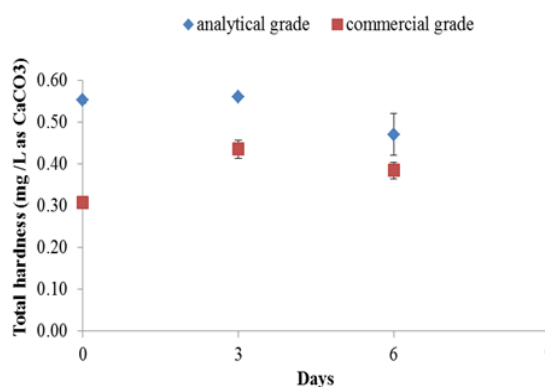


Fig. 2 Total hardness concentration from 1 mg/L analytical and commercial grade gypsum

2. Effect of CFG on geosmin and MIB removal in fish ponds water

In this study, CFG could reduce both geosmin and MIB in ponds water when compared with the control (0 mg/L). Geosmin could be reduced since 3 days when treated with different concentrations of CFG (Fig. 3a). The highest removal rates of geosmin (63.41%) were found in the treatment using 600 mg/L CFG (Table 1). However, the removal rate of geosmin in the groups that use 400 and 200 mg/L CFG was not significantly different from 600 mg/L (Fig. 3b-c, Table 2). It is possibly due to the solubility of different gypsum concentrations in water. The solubility of calcium sulfate (in pond water) at the concentrations of 50-1,600 mg/L at 25 °C ranged from 88.6 to 95% and dissolution increased with decreasing concentration and with increasing temperature [11]. In addition, it was also founded that the intracellular forms of both compounds showed better removal rate than the dissolved forms. It can be assumed that the negatively charged of cyanobacteria cells aggregated, and then settled, due to surface charge neutralization with the positively

charged colloidal formed by coagulant gypsum [19].

MIB concentration decreased slightly with the different concentrations of CFG added on 3 days (Figure. 3d). However, after 6 days the removal rate of MIB

showed sharply decrease when treated with CFG (Fig. 3e-f). The highest removal rates of MIB (75.63%) were found when 400 mg/L CFG was used (Table 1).

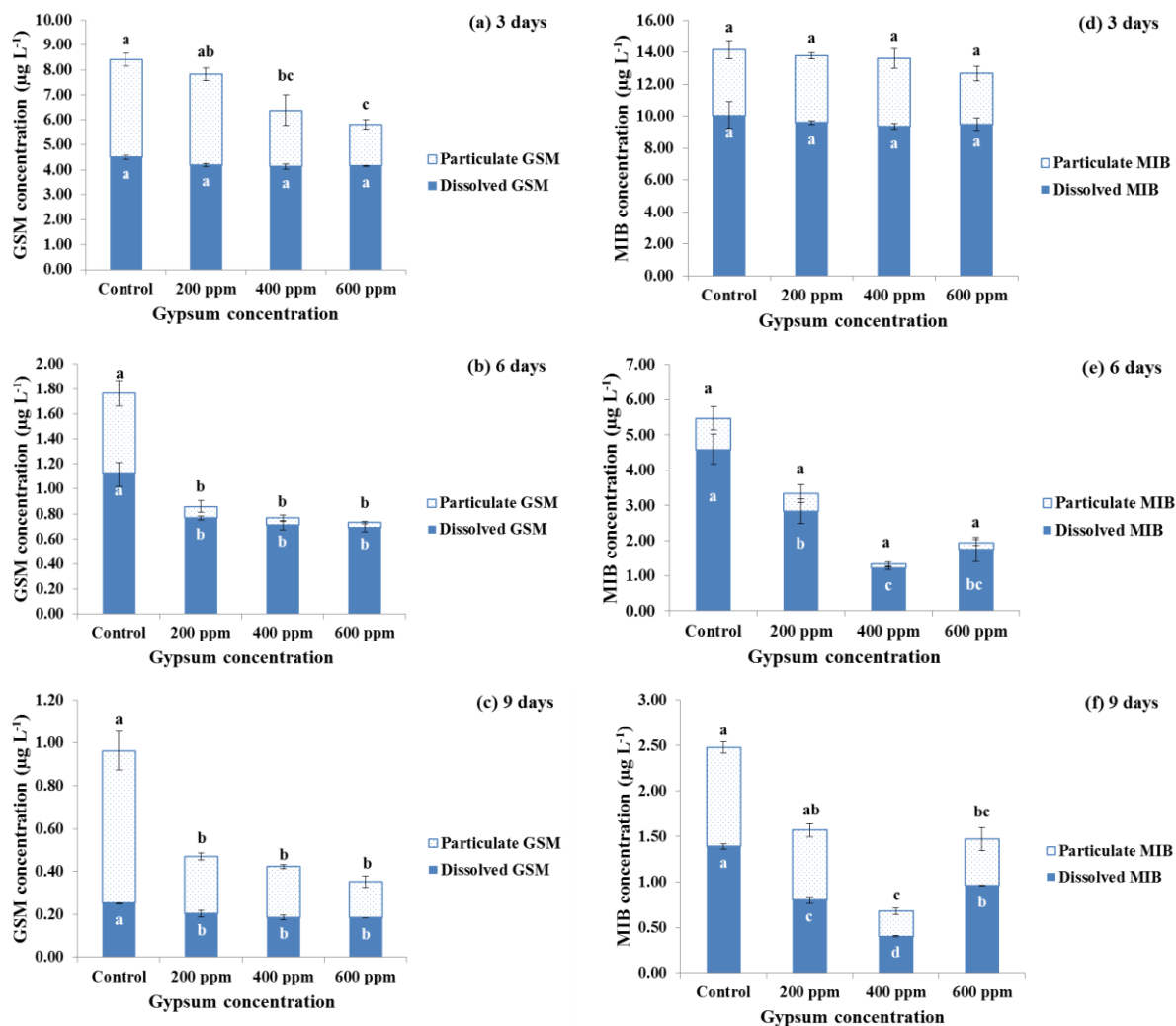


Fig. 3 Effect of CFG on particulate and dissolved geosmin (a-c) and particulate and dissolved MIB (d-e) concentrations at different times

Table 1 Removal rate (%) of geosmin and MIB at different CFG concentrations

Days	Removal rate (%)					
	Total GSM			Total MIB		
	200 mg/L	400 mg/L	600 mg/L	200 mg/L	400 mg/L	600 mg/L
3	6.92	24.25	31.11	2.62	3.89	10.43
6	51.32	56.50	58.47	39.15	75.63	64.64
9	51.14	56.14	63.41	36.67	72.68	40.79

Table 2 Effectiveness of CFG in removing off-flavor compounds (geosmin and MIB) (mean $\pm$ SD)

CFG concentration (mg/l)	Effectiveness in removing off-flavor compounds	
	geosmin (ng/l)/ CFG 1 mg/l	MIB (ng/l)/CFG 1 mg/l
200	3.30 $\pm$ 0.63	5.71 $\pm$ 2.63
400	2.98 $\pm$ 1.11	5.42 $\pm$ 2.64
600	2.37 $\pm$ 1.02	3.35 $\pm$ 1.30

In general some filamentous cyanobacteria and actinomycetes released geosmin and MIB to the water. When algal die and decompose, these metabolites consisted both particulate and dissolved forms and have been shown to be somewhat recalcitrant to conventional water treatment [17], [18].

Base on this study, CFG could apply for off flavor removal in fish pond. The recommendation level is 200 mg/l

3. Effect of CFG on chlorophyll a concentrations

Increasing of cyanobacteria and the release of their secondary metabolite, including geosmin and MIB, present an enormous risk to fish pond water. Chlorophyll a is generally considered as an important indicator of algal biomass [20].

In this study, the application of CFG to reduce the algal biomass was evaluated in the laboratory conditions. it was shown that all the three concentrations of CFG (200, 400 and 600 mg/L) could reduce chlorophyll a level when compared with the control treatments (Table 3). The highest effectiveness of 1 mg/L CFG that could reduce chlorophyll a was obtained in the treatment using 200 mg/L CFG (Table 3). The reduction of Chlorophyll a occurred by coagulation mechanism. Coagulation is a key step in conventional drinking water treatment for algal removal through colloidal charge neutralization followed by aggregation into floc [8]. In general, the effectiveness of coagulants increases with the charge on the metal ion. The calcium (Ca^{2+}) in gypsum (CaSO_4) is more effective because it carries a +2 charge [21]. Wu and Boyd [11] also reported that treatment of ponds at Auburn University with 250-500 mg/L of agricultural gypsum affected turbidity: many substances suspended in water including phytoplankton. Removal is similar to that achieved with 15-25 mg/L alum but gypsum has the advantage of a longer residual life than alum, and it is safer to use. Another possible mechanism of gypsum treatment is the reduction of phytoplankton abundance by lowering

dissolved orthophosphate concentration through calcium phosphate precipitation in water. [11].

Table 3 Removal of chlorophyll a by different CFG concentrations

Gypsum (mg/l)	Effective removal of chlorophyll a (μg chlorophyll a/ mg CFG)
200	1.26
400	1.16
600	0.74

4. Effectiveness of CFG on orthophosphate removal

Phosphorus is an essential phytoplankton nutrient. In the commercial fish culture most phosphate gets into the water from metabolic waste of fish and from decomposition of uneaten feed [6], [22]. As feeding rate increases, nutrient concentration rises then the phytoplankton become more abundant.

In this experiment, the effect of CFG on dissolved orthophosphate concentration was investigated. The CFG treated water showed higher reduction in orthophosphate concentration than the control group (Figs. 4 and 5). The highest effect of CFG that could reduce orthophosphate concentration was observed in the treatment using 600 mg/L CFG after 9 days. However, the removal rate of orthophosphate in the groups that use 200 and 400 mg/L CFG was not significantly different ($P > 0.05$) from the 600 mg/L group.

CFG treatment reduced orthophosphate concentration through calcium phosphate precipitation. Wu and Boyd [11] reported that in the water with low calcium concentration, gypsum application would precipitate phosphate. Additionally, gypsum is safe for human and aquatic life; its residual time in the pond depends on water flocculant retention time. Therefore, CFG is a suitable for use in aquaculture ponds.

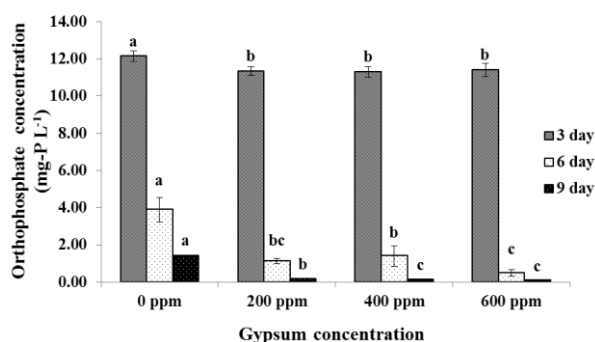


Fig. 4 Orthophosphate concentration in fish pond water

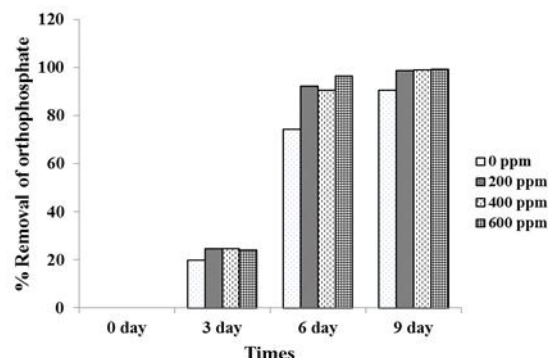


Fig. 5 Removal rate of orthophosphate with different CFG concentrations

CONCLUSION

It was confirmed that CFG at 200 mg/L was suitable for the reduction of geosmin and MIB especially in the particulate form. It also reduce phytoplankton in algal rich pond water because it is shown to be effective in reducing chlorophyll a. In addition, CFG could also remove orthophosphate in fish ponds water through calcium phosphate precipitation which is an alternative way to control the problem from phytoplankton in fish culture. Finally it was recommend that CFG can use for water improvement in aquaculture pond.

ACKNOWLEDGEMENT

The work was carried out with the aid of a grant from the Thailand Research Fund (RDG5620050) and Maejo University for the laboratory instruments and research facilities.

REFERENCES

- [1] Smith JL, Boyer GL and Zimba, PV, "A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture", *Aquaculture*, Vol. 280, bNo.1-4, 2008, pp. 5-20.
- [2] Han J, Jeon BS, Futatsugi N and Park HD, "The effect of alum coagulation for in-lake treatment of toxic *Microcystis* and other cyanobacteria related organisms in microcosm experiments", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 96, 2013, pp. 17-23.
- [3] Zhou B, Yuan R, Shi C, Yu L, Gu J and Zhang C, "Biodegradation of geosmin in drinking water by novel bacteria isolated from biologically active carbon", *J. Environmental Sciences*, Vol. 23, No.5, 2011, pp. 816-823.
- [4] Tabachek JL and Yurkowski M, "Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites and 2-methylisoborneol in saline lake in Monitoba", *J. Fish Res. Board Can.*, Vol. 33, 1976, pp. 25-35.
- [5] Lovell RT and Broce D, "Cause of musty flavor in pond culture penaeid shrimp", *Aquaculture penaeid shrimp*, *Aquaculture*, Vol. 50, 1985, pp. 169-174.
- [6] Pimolrat P, Whangchai N, Chitmanat C, Itayama T and Lebel L, "Off-flavor Characterization in High Nutrient Load Tilapia Ponds in Northern Thailand", *Turkish J. of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 15, No.2, 2015, pp. 275-283.
- [7] Cooke GD, Welch EB, Peterson SA and Nichols SA, *Restoration and Management of lakes and reservoirs*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida: USA, 2005.
- [8] Sun F, Pei HY, Hu WR, Li XQ, Ma CX and Pei RT, "The cell damage of *Microcystis aeruginosa* in PACI coagulation and floc storage processes", *Separation and Purification Technology*, Vol. 115, 2013, pp. 123-128.
- [9] Jackson ML, *Soil chemical analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1958.
- [10] Jones US, *Fertilizers and soil fertility*. Reston Publishing, Reston, Virginia, 1979.
- [11] Wu R and Boyd CE, "Evaluation of calcium sulfate for use in aquaculture ponds", *The Progressive Fish-Culturist*, Vol. 52, 1990, pp. 26-31.
- [12] Boyd CE, *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier Scientific, Amsterdam, USA, 1982.
- [13] Gutierrez R, Whangchai1 N, Sompong U, Prarom W, Iwami N, Itayama T, Nomura N and Sugiura N, "Off-flavour in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in an integrated pond-cage culture system", *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, Vol. 7(Special Issue), 2013, pp. S1-13.

- [14] APHA, Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 15th Edition, Washington DC: American Public Health Association, USA, 1980.
- [15] Wintermans JFGM and de Mots A, "Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their pheophytins in ethanol", *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 109, 1965, pp. 448-453.
- [16] Saijo Y, "A method for determination of chlorophyll", *Jpn J. Limnol.*, Vol 36, No.3, 1975, pp. 103-109.
- [17] Nerenberg R, Rittmann BE and Soucie WJ, "Ozone/biofiltration for removing MIB and geosmin", *J. Am. Water Work Ass.*, Vol. 92, 2000, pp. 85-95.
- [18] Ho L, Hoefel D, Bock F, Saint PC and Newcombe G, "Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors", *Chemosphere*, Vol. 66, 2007, pp. 2210-2218.
- [19] He W, Zhu Y, Xiao QH, Yang J, Lei LM, Han BP and Zhang YM, "Study of removal of water bloom cells by red earth modified with polyaluminium chloride and ferric chloride", *Ecol. Environ. Sci.*, Vol. 19, 2010, pp. 550-555.
- [20] Izydorczyk K, Carpentier C, Mrówczyński J, Wagenvoort A, Jurczak T, and Tarczyńska M, "Establishment of an alert level framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the algae online analyser for monitoring cyanobacteria chlorophyll *a*", *Water Res.*, Vol. 43, 2009, pp. 989-996.
- [21] Bockris JOM and Reddy AKN, *Modern Electrochemistry*. New York: Plenum Press, 1973, 622pp.
- [22] Boyd CE, "Chemical budgets for channel catfish ponds", *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol. 114, 1985, pp. 291-298.

Mitigation Technique for Earthy-Musty Odour in Pond-Raised Tilapia Using Gypsum and Rice straw

Supanee SUWANPAKDEE¹, Niwooti WHANGCHAI^{1*}, Chanagun CHITMANAT¹, Udomluk SOMPONG¹, Sudaporn TONGSIRI¹, Pornpimol PIMOLRAT¹, Redel GUTIERREZ² and Nakao NOMURA³

¹Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Sansai, Chiang Mai, 50210, Thailand.

²College of Arts and Sciences, Central Luzon State University, Science City of Munoz, Nueva Ecija, 3120, Philippines.

³Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, 305-0008, Japan.

(*Corresponding author; e-mail: niwooti@hotmail.co.th)

Abstract

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture in Thailand has been expanding rapidly, intensified and economically important commercial fish. On the other hand, earthy-musty odour (geosmin and 2-methylisoborneol) are one of the most serious problems affecting commercial freshwater aquaculture due to off-flavors consumers are strongly averse. The most important purpose of this research was to determine the effective of gypsum and rice straw extraction to reduce levels of earthy-musty odour in earthen ponds. Three treatments with 3 replicates in a completely randomized design were performed as follows: T1 – control; T2 –gypsum at 200 ppm and T3 –rice straw extract at 1 ppm. Result showed that the treatment of 1 ppm rice straw extract in tilapia ponds was the most effective method to reduce off-flavour. The use of gypsum at 200 ppm in minimizing off-flavour in ponds was also effective than the control. Both rice straw and gypsum-treated ponds had increased fish biomass and %FCE. These methods can be recommended as alternative methods for the reduction and control of phytoplankton, turbidity and TSS in tilapia ponds.

Keywords: Earthy-musty odour, Geosmin, MIB, Gypsum, Rice straw, Nile tilapia

Introduction

Increasing per capita of freshwater fish consumption due to increased global population result in constant, growing demand in both domestic and export markets. Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, are popular fast growing freshwater fish and produce good fillets which are easily digestible protein and contain a host of nutrients. However, problems concerning earthy-musty odour and taste in fish hound the tilapia aquaculture industries which affect marketability. Geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) are the two main causative compounds of earthy-musty odor and taste (off-flavor) in drinking water and freshwater-farmed fish. They are lipophilic terpenoid compounds produced as secondary metabolites by certain species of cyanobacteria (planktonic and benthic) particularly filamentous forms such as *Anabaena circinalis* Kütz, *Lyngbya cryptovaginata*, *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., and *Pseudanabaena* sp. into the water [1] and actinomycetes that can modify the water surface chemistry, with major socio-economic implications [2-5]. Cyanobacteria synthesize either MIB or geosmin or both during growth, store (intracellular form) these odourants within the cell and released (intercellular) in the water during cell lysis, depending on the growth phase and also based on environmental factors [5].

In this study, gypsum was used because it is a cheap and readily available source of calcium and sulfur that has been widely used in agriculture for recovery of alkali soils and as a source of calcium and sulfate in fertilizer [6-8]. The calcium phosphate precipitation is a possible mechanism of gypsum in phosphate and phytoplankton reduction in water because gypsum could be used to increase the

concentration of calcium when added in to the water. Boyd [9] suggested that gypsum could be used as a pond treatment in aquaculture for: (1) flocculation of clay particles, (2) increases the concentration of calcium and total hardness, (3) precipitation of phosphate and (4) reducing pH.

In aquaculture, barley and rice straws are alternative and sustainable materials from agricultural waste that can be used to economically control cyanobacteria. Several researches, for example, showed barley straw extract effectively inhibit the growth of several planktonic and filamentous algae in the laboratory and reservoirs [10-12]. Barley straw (40 and 80 g m⁻²) was capable of inhibiting the growth of *Microcystis*, *Anabaena* and *Aphanizomenon* in ponds [13]. The utilization of rice straw offers another cheap and environmentally acceptable way of controlling algae. Aside from barley straw, rice straw has received considerable attention as an algaecide based on research done in many countries throughout the world and has proved to be very successful side effects. Rotten rice straw successfully inhibited filamentous algae in Suez Canal waters, due to the synergistic effects of various humic substances in the rice straw [14]. Similarly, several studies [12, 15] reported that the growth of *Microcystis aeruginosa* was inhibited by rice straw extract, which was due to the synergistic effects of various phenolic compounds in the rice straw. Shahabuddin *et al.* [16] conducted an experiment to assess the effect of rice straw mat on the water quality parameters, plankton density, pond water bacterial and mitigation of clay turbidity in fertilized fish ponds. They reported that rice straw mat effectively mitigate clay turbidity and 25kg per 200 m² pond can effectively reduce the population of phytoplankton and zooplankton.

However, little research have been conducted to investigate techniques to mitigate earthy-musty odor in fish pond. Therefore, this study aimed to determine and monitor the effectiveness of gypsum and rice straw for removing earthy-musty odour in fish ponds.

Materials and methods

Experimental protocol

The study was carried out during a 4-month period at the Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University. Nine experimental ponds, each with a 100-m² area and 0.8-m depth, were used. Three treatments with 3 replicates in a completely randomized design were performed as follows: T1 – control; T2 – gypsum at 200 ppm and T3 – tannin from rice straw extract at 1 ppm. The optimal concentrations used in this study had previously been tested in laboratory.

Nile tilapias with an average initial weight of 115±2.5 g were transferred to the experimental ponds at a stocking density of 2-3 fish m⁻² (**Table 1**). Samples for physico-chemical (water) and off-flavour (water and sediment) analyses were collected every 15 days. Data on fish off-flavor and growth were recorded every 30 days.

Add Table 1 here

Analysis of Geosmin and MIB

Dissolved and particulate geosmin and MIB were extracted from water and sediment samples using solid phase microextraction (SPME) and quantified with gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) according to Gutierrez *et al.* [17]. The 5-g minced fish sample was pre-extracted with microwave distillation (600 watt, 6 min) and then extracted on a hotplate-stirrer and exposed to the SPME fibre for a 30-min modified method from Lloyd and Grimm [18] and also quantified with GC/MS.

Water Quality and Nutrient Analysis

Physico-chemical parameters (pH, temperature dissolved oxygen (DO) and turbidity) were measured *in situ* using a multimeter (TOA-DKK WQC-22A Model, Japan). Standard methods [19] were used for the analysis of total ammonia-nitrogen (TAN), nitrate-nitrogen, nitrite-nitrogen, orthophosphate-phosphorus and total suspended solids (TSS) in the laboratory. Alkalinity and total hardness were analysed by method as described by Boyd and Tucker [20].

Hydro-Biological Analysis

Chlorophyll-*a* in water samples was extracted with 10 mL of hot methanol (60°C in water bath) and quantified with a spectrometer (Hach D9000, USA) [19]. Chlorophyll-*a* concentration in the extract was calculated as described by Wintermans and de Mots [21] and Saijo [22]. Phytoplankton genera/species and numbers were determined using a light microscope (Olympus BH2, Japan). The identification of phytoplankton was carried out using picture database and related texts such as Peerapornpisal [23].

Isolation and Screening of Earthy-Musty Odour-Producing Streptomycetes in Sediments

Ten grams of sediment sample from tilapia ponds were mixed with 90 mL of 0.85 % NaCl solution. The suspension was shaken at 150 rpm for 30 minutes at room temperature and serially diluted ten folds to 10^{-5} . Soil suspensions (100 μ L) from 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} dilution were spread onto the surface of starch casein agar (SCA) plates, and incubated at 30°C for 7-14 days. Actinomycetes were assigned into streptomycetes (filamentous and fungus-like sporulation structures) and non-streptomycetes groups. Colonies from both groups were counted and recorded as CFU g^{-1} . Earthy-musty odour-producing streptomycetes were purified by re-streaking on SCA, sealed with paraffin film and incubated at 30°C for 7-14 days or until complete sporulation was observed. The isolates were subjected to qualitative testing and verified whether they were geosmin or MIB-producers or both by GC/MS [24].

Growth Performances of Nile tilapia

The growth parameters were calculated following the method described by Bagenal [25] as follows:

Weight gain	=	Final weight-initial weight
Average Daily Gain (ADG)	=	$\frac{\text{Final weight-Initial weight}}{\text{Days}}$
Feed Conversion Ratio (FCR)	=	$\frac{\text{Total feed (g)}}{\text{Weight gain (g)}}$
Feed Conversion Efficiency (FCE)	=	$\frac{\text{Weight gain (g)}}{\text{Total feed (g)}} \times 100$
Survival Rate (%)	=	$\frac{\text{No. of animals survived (fish)}}{\text{No. of animals leased (fish)}} \times 100$

Data Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to test for difference between means of observed parameters and each treatment. Tukey's multiple range tests at 95% confidence level was used for treatment comparison. Relationships between water quality variables phytoplankton and earthy-musty compounds were analyzed using Pearson correlation analysis. Significant correlation was assumed when $p < 0.05$ in either positive or negative correlations.

Results and Discussion

Earthy-musty odour in fish pond

Total geosmin and MIB concentrations in water samples collected from fish pond are shown in **Figure 1**. The concentration of geosmin in water samples ranged between not detectable (ND) – 0.034 $\mu g L^{-1}$, whilst that of MIB ranged between ND – 0.071 $\mu g L^{-1}$. The highest total off-flavour (geosmin + MIB) concentration (0.104 $\mu g L^{-1}$) was recorded in the control group after 12 weeks. Most of these compounds were observed in particulate (intracellular) from (**Figure 2, 3**) within the algal cells. In the present study, only geosmin was detected in the gypsum treatments after 12 weeks (only 1 out of 3 ponds), which coincided with the time when *Phormidium* sp. bloom was recorded (**Table 2**). It was possible that *Phormidium* sp. might be the biological origin of geosmin in this pond for the reason that this specie is well known as producers of odorous compounds [1].

Add Figure 1 here

No earthy-musty odour was detected in pond water treated with 1 ppm tannin from rice straw extract during the four month period particularly in week 12 and 14 when geosmin was detected in both the control and gypsum-treated ponds. This might be due the inhibitory effects of tannin or tannic acid compounds from rice straw extract on earthy-musty odour causing cyanobacteria and microorganism in the pond. Decomposing rice straw can release phenolic compounds that have a synergistic effect on growth of plankton production [16]. Several studies reported that rice straw can inhibit the growth of some cyanobacteria such as *Microcystis* sp., *Anabaena* sp. and *Oscillatoria* sp. [12, 16]. Other cellulosic materials like decomposing barley straw similarly produces chemical substances that effectively inhibit the growth of some nuisance cyanobacterial species under laboratory conditions [26, 27]. The inhibitory effect of barley straw might be due to chemical compounds such as oxidized phenolics and hydrogen peroxide, which occur during the decomposition process [28, 29]. The inhibitory effect of decomposing rice straw towards cyanobacteria is deemed to follow the same mechanism as in barley straw.

Add Figure 2 and 3 here

Earthy-musty odour levels in sediment samples collected from fish pond are presented in **Figure 4**. The results indicated that geosmin was mainly responsible for the off-flavor episodes in these samples. The concentration of geosmin in fish pond sediment samples ranged between ND – 0.384 $\mu\text{g L}^{-1}$. The highest concentration of geosmin was observed in the control group at 12 weeks culture period. As expected, culture time affected geosmin concentration as geosmin was normally detectable in the later part of the culture (after 6 weeks) but not earlier. In the present study, high geosmin occurrence was observed in the control group whilst ponds treated with rice straw extract contained lower geosmin than the control and gypsum-treated ponds except in week 16 where geosmin levels in gypsum-treated ponds tend to have lower levels than both the control and rice straw extract treatments.

Add Figure 4 here

The detected geosmin in the sediment samples might have produced by actinomycetes. Actinomycetes are another systematic group that has been shown to produce MIB and geosmin [30]. Actinomycetes produce many compounds including 2-MIB and geosmin and have long been recognized as sources of severe earthy-musty tastes and odors in drinking water [31]. In the present study, number of actinomycetes spp. in sediments samples were found to ranged between 0.72 - 7.90 $\times 10^4$ CFUg⁻¹. The highest actinomycetes was found to occur in gypsum-treated ponds at 6 weeks culture period, while the lowest were detected in the tannin/rice straw extract-treated ponds at 10 weeks culture period (**Figure 5**). The genus *Streptomyces* spp., which are widely reported to produce odorous compounds was detected in the sediments after 12 weeks of culture period (**Figure 6**), which coincided with the highest geosmin and MIB levels in water. Therefore, the results suggest that *Streptomyces* spp. and possibly odour-producing cyanobacteria might be the biological origin of geosmin in these tilapia ponds and less likely from *Phormidium* sp. *Pseudanabaena* sp. and *Anabaena* sp. Klausen *et al.* [32] attributed the occurrence of geosmin and MIB in freshwater environments to *Actinobacteria*, most of them belonging to the genus *Streptomyces* [33, 34, 31, 30].

However, the concentrations of geosmin and MIB in water and pond sediment were very low when compared with those reported by Gutierrez *et al.* [17]. This might be due the effect of frequent rainfall during the rainy season, particularly from July to August of the experimental period, to the abundance of cyanobacteria. Preparation of the ponds before culture might have reduced the population of some organisms in the sediments. If culture time was increased from 6 to 8 months, tilapia in ponds may have acquired off-flavour as Pimolrat *et al.* [35] observed in their study. Geosmin concentration was generally affected by culture time, detecting geosmin in the later part of the culture period (after 120 days) but not earlier.

Add Figure 5 and 6 here

Fish can acquire off-flavors directly from contaminated water by osmosis through their skin and gills and/or from the gut by ingesting food contaminated with the substances which are later on accumulated in their flesh [36, 37]. The bioaccumulation of earthy-musty taints in fish have been shown

to be dependent on many factors, such as the exposure concentration of geosmin/MIB excreted into water by off-flavour sources (cyanobacteria and actinomycetes), water temperature, fat content, species and size of fish [38, 39]. In the present study, geosmin and MIB were not detected in all Nile tilapia sampled throughout the experimental period. This could be due to less intercellular geosmin dissolved in pond water and more intracellular form stored in the cells, which can accumulate in fish by ingestion of cyanobacteria. However, in the cases of geosmin and MIB, due to their low octanol/water partition coefficients (K_{ow}), uptake is overwhelmingly through the gills [37]. Hence, the magnitude of fish contamination may depend on the concentration excreted into water by cyanobacteria and actinomycetes [17]. Moreover, the intensive feeding using pellet food employed in this experiment might have influenced the low growth and biovolume of cyanobacteria compared to other phytoplankton groups (Figure 7) which might have caused the non-detection of off-flavour in fish.

Diversity and Composition of Phytoplankton in fish pond

The phytoplankton found in fish ponds were categorised into 58 genera and 6 divisions, namely Chlorophyta (27; 46.6%), Cyanophyta (14; 24.1%), Bacillariophyta (8; 13.8%), Euglenophyta (4; 6.9%), Pyrrophyta (3; 5.2%) and Cryptophyta (2; 3.4%). Chlorophyta was the most abundant in terms of composition, however the highest biomass in pond water was Euglenophyta ($0.39 \pm 0.12 \mu\text{L}^{-1}$) followed by the Chlorophyta, Bacillariophyta, Cyanophyta, Pyrrophyta and Cryptophyta, which showed average biomass of 0.22 ± 0.08 , 0.13 ± 0.08 , 0.12 ± 0.08 , 0.09 ± 0.04 and $0.06 \pm 0.02 \mu\text{L}^{-1}$, respectively (Figure 7). Species and biomass of cyanobacteria are known to be important factors influencing MIB and geosmin concentrations in water [40].

Add Figure 7 here

Add Table 2 here

In this study, even though earthy-musty odour-producers cyanobacteria including *Phormidium* sp., *Anabaena* sp. and *Pseudanabaena* sp. (Figure 8) were found at lower bio-volume than other species, these species are well known producers of odorous compounds [41, 1, 42, 5] and might have somehow contributed to the geosmin concentration in pond water but less likely as the main sources.

Add Figure 8 here

The bio-volume of phytoplankton was positively correlated with chlorophyll *a* ($r=0.88$; $p<0.05$) in pond water (Figure 9) and both parameters continued to increase from 8 weeks of culture period onwards. In the present study, it can be observed that the addition of gypsum at 200 ppm resulted to lower bio-volume and chlorophyll-*a* values compared to the other treatments. This could be due to the positively-charged gypsum which interact with the negatively-charged algal surfaces and bind them, resulting in flocculation. Similarly, Sun *et al.* [43] reported that all cells of *Microcystis aeruginosa* were removed by the surface charge neutralization with polyaluminum chloride (PACl) in the coagulation process of conventional drinking water treatment through colloid charge neutralization followed by aggregation into flocs that are amenable to solid/liquid separation with subsequent processes such as sedimentation and filtration. Gypsum treatment also reduces phytoplankton abundance by lowering the dissolved orthophosphate concentration, the nutrient most commonly limiting phytoplankton growth in freshwater ecosystems, through calcium phosphate precipitation in water [8].

Add Figure 9 here

Water quality in fish ponds

The variations in the physico-chemical parameters (pH, temperature, DO, alkalinity, turbidity, total hardness, total ammonia, nitrite, nitrate, orthophosphate concentrations and TSS) in nine experimental ponds are shown in Table 3. No significant differences ($p>0.05$) in pH, temperature, DO, total ammonia, nitrite, nitrate and orthophosphate were found, while alkalinity, turbidity, total hardness and TSS showed significant differences ($p<0.05$) in each treatment. The gypsum-treated ponds had lower alkalinity,

turbidity and TSS but had higher total hardness than the other treatments. Boyd [9] reported that gypsum could be used as a pond treatment in aquaculture for flocculation of clay particles and also increases the concentration of calcium and total hardness. In this study, it was suggested that nitrogen nutrients (total ammonia, nitrite and nitrate) were shown rather low when compared with other treatments.

Add Table 3 here

Growth Performances of Nile tilapia

The growth parameters of Nile tilapia are shown in **Table 4**. The highest survival rate (90%) of tilapia was recorded in rice straw extract-treated ponds, while the control ponds gave the lowest (71%). No significant difference ($p>0.05$) was observed in growth parameters (final weight, weight gain, ADG, FCR, FCE and biomass) of fish in both gypsum and rice straw extract-treated ponds, although it was higher in adding gypsum 200 ppm group, which might be due to the binding of cationic of calcium from gypsum on anion of phytoplankton to form complex macro-aggregates (biofloc) and additional feed source for tilapia in these ponds. The consumption of biofloc by shrimp or fish has demonstrated in numerous benefits such as improvement of growth rate [44], decrease of FCR and associated cost in feed [45]. In tilapia, Hari *et al.* [46] estimated that feed utilization is higher in biofloc at a rate of 20% less than conventional water-exchange system.

Add Table 4 here

Conclusions

The use of 1 ppm rice straw extracts appeared to be the most effective in mitigating off-flavour occurrences in tilapia ponds. Both water and sediment samples from the rice straw extract –treated ponds had lower geosmin and MIB levels compared to the control and gypsum-treated ponds. The use of gypsum at 200 ppm in minimizing off-flavour in ponds was also effective than the control. In addition, both rice straw and gypsum also increased the fish biomass and %FCE. Thus, these methods, which are simple, practical and cost effective, can be recommended as alternative methods to reduce and control phytoplankton, turbidity and TSS in tilapia ponds, as well as to improve tilapia productivity.

Acknowledgements

The work was carried out with the aid of a grant from the Thailand Research Fund (TRF) and the support of Maejo University for the laboratory instruments and research facilities used.

References

- [1] JL Smith, GL Boyer and PV Zimba. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*. 2008; **280**, 5-20.
- [2] F Juttner. Physiology and biochemistry of odorous compounds from fresh-water cyanobacteria and algae. *Water Sci. Technol.* 1995; **31 (11)**, 69–78.
- [3] G Izaguirre and WD Taylor. A Pseudanabaena species from Castaic Lake, California, that produces 2-methylisoborneol. *Water Res.* 1998; **32(5)**, 1673–77.
- [4] N Sugiura and K Nakano. Causative microorganisms for musty odor occurrence in the eutrophic lake kasumigaura. *Hydrobiologia*. 2000; **434**, 145–150.
- [5] RL Gutierrez. 2014, Remediation and Mitigation of Off-flavor and Odor Compounds (Geosmin and 2-Methylisoborneol) in Water for Aquaculture, Ph. D. Dissertation. Maejo University, Chiang Mai, Thailand.
- [6] ML Jackson. *Soil chemical analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1958.
- [7] US Jones. *Fertilizers and soil fertility*, Reston Publishing, Reston, Virginia, 1979.
- [8] R Wu and CE Boyd. Evaluation of calcium sulfate for use in aquaculture ponds. *Prog. Fish. Cult.* 1990; **52**, 26-31.

- [9] CE Boyd. *Water quality management for pond fish culture*, Elsevier Scientific, Amsterdam, USA, 1982.
- [10] MT Gibson, IM Welch, PRF Barrett and I Ridge. Barley straw as an inhibitor of algal growth II: laboratory studies. *J. Appl Phycol.* 1990; **2**, 241–48.
- [11] PRF Barrett, JC Curnow and JW Littlejohn. The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barley straw. *Hydrobiologia.* 1996; **340**, 307–11.
- [12] MH Park, MS Han, CY Ahn, HS Kim, BD Yoon and HM Oh. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006; **43**, 307–12.
- [13] H Rajabi, Y Filizadeh, M Soltani and MH Fotokian. The use of barley straw for controlling of cyanobacteria under field application. *J. Fish. Aquat. Sci.* 2010; **5(5)**, 394–401.
- [14] SM Abou El Ella, MM Hosny and MF Bakry. Growth inhibition of bloom forming using rice straw in water courses (case study). In: Proceeding of the 11th International Conference for Water Technology (IWTC11), Sharm El-Sheikh, Egypt. 2007, p. 105-12.
- [15] MAM Gammal and DAR Al-Kenawy. Environment-friendly biomaterial (rice straw extract) for controlling the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in natural water in Abbassa and RYAN water in Egypt. In: Proceedings of the 2nd Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Cairo International Convention Center. 2009, p. 171-181.
- [16] AM Shahabuddin, MT Oo, Y Yi, DP Thakur, AN Bart and JS Diana. Study about the effect of rice straw mat on water quality parameters, plankton production and mitigation of clay Turbidity in earthen fish ponds. *World J. Fish Marine Sci.* 2012; **4(6)**, 577-85.
- [17] R Gutierrez, N Whangchai, U Sompong, W Prarom, N Iwami, T Itayama, N Nomura and N Sugiura. Off-flavour in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in an integrated pond-cage culture system. *Maejo Int. J. Sci. Tech.* 2013; **7(Special Issue)**, S1-13.
- [18] SW Lloyd and CC Grimm. Analysis of 2-methylisoborneol and geosmin in catfish by microwave distillation-solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **47**, 164-69.
- [19] APHA. *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater*, 15th Edition, American Public Health Association, Washington DC, 1980.
- [20] CE Boyd and CS Tucker. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, 1992.
- [21] JFGM Wintermans and A de Mots. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 1965; **109**, 448-53.
- [22] Y Saijo. A method for determination of chlorophyll, *Jpn J. Limnol.* 1975; **36 (3)**, 103-09.
- [23] Y Peerapornpisal. *Freshwater Algae in Thailand*, Department of Biology, Chiang Mai University, Chiang Mai, 2013.
- [24] CN Seong, JH Choi and KS Baik. An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *J. Microbiol. Soc.-Korea.* 2001; **39**, 17-23.
- [25] T Bagenal. *Methods for the Assessment of Fish Production in Fresh Waters*, 3rd Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, 1978.
- [26] EF Brownlee, SG Sellner and KG Sellner. Effects of barley straw (*Hordeum vulgare*) on freshwater and brackish phytoplankton and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 2003; **15**, 525-31.
- [27] D Murray, SA Parsons, P Jarvis and B Jefferson. The impact of barley straw conditioning on the inhibition of *Scenedesmus* using chemostats. *Water Res.* 2010; **44(5)**, 1373-80.
- [28] JM Pillinger, JA Cooper and I Ridge. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw. *J. Chem. Ecol.* 1994; **20**, 1557-69.
- [29] TJ Waybright, DE Terlizzi and MD Ferrier. Chemical characterization of the aqueous algistatic fraction of barley straw (*Hordeum vulgare*) inhibiting *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.* 2008; **21**, 333-40.
- [30] B Zaitlin and S Watson. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res.* 2006; **40**, 1741-53.
- [31] B Zaitlin, S Watson, J Ridal, T Satchwill and D Parkinson. Actinomycetes in Lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. *J. Am. Water Works Assoc.* 2003a; **95**, 113-18.

- [32] C Klausen, MH Nicolaisen, BW Strobel, F Warnecke, JL Nielsen and NOG Jorgensen. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005; **52**, 265-78.
- [33] NN Gerber. Volatile substances from actinomycetes-their role in the odor pollution of water. *CRC Cr. Rev. Microbiol.* 1979; **7(3)**, 191-214.
- [34] KK Schrader and WT Blevins. Geosmin-producing species of *Streptomyces* and *Lyngbya* from aquaculture ponds. *Can. J. Microbiol.* 1993; **39**, 834-40.
- [35] P Pimolrat, N Whangchai, C Chitmanat, T Itayama and L Lebel. Off-flavor Characterization in High Nutrient Load Tilapia Ponds in Northern Thailand. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* 2015; **15(2)**, 275-83.
- [36] U Tanchotikul. 1990, Studies on important volatile flavor components in Louisiana Rangia clam (*Rangia cuneata*), Ph.D. Dissertation. Louisiana State University, USA.
- [37] KE Clark, FAPC Gobas and D Mackay. Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environ. Sci. Technol.* 1990; **24**, 1203-13.
- [38] PB Johnsen and SW Lloyd. Influence of fat content on uptake and depuration of the off-flavor 2-methyl-isoborneol by channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1992; **49**, 2406-11.
- [39] P Howgate. Tainting of farmed fish by geosmin and 2-methylisoborneol: a review of sensory aspects and of uptake/depuration. *Aquaculture.* 2004; **234**, 155-81.
- [40] M Van Der Ploeg and CE Boyd. Geosmin production in cyanobacteria (blue green algae) in fish pond at Auburn, Alabama. *J. World Aqua. Soc.*, 1991; **22**, 207-16.
- [41] F Juttner and SB Watson. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; **73**, 4395-406.
- [42] F Zhong, Y Gao, T Yua, Y Zhang, D Xua, E Xiao, F He, Q Zhoua and Z Wua. The management of undesirable cyanobacteria blooms in channel catfish ponds using a constructed wetland: Contribution to the control of off-flavor occurrences. *Water Res.*, 2011; **45**, 6479-88.
- [43] F Sun, H-Y Pei, W-R Hu, X-Q Li, C-X Ma and R-T Pei.. The cell damage of *Microcystis aeruginosa* in PACl coagulation and floc storage processes. *Sep. Purif. Technol.* 2013; **115**, 123-28.
- [44] W Wasielesky Jr., H Atwood, A Stokes and CL Browdy Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 2006; **258**, 396-403.
- [45] MA Burford, PJ Thompson, RP McIntosh, RH Bauman and DC Pearson. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a highintensity, zero-exchange system. *Aquaculture.* 2004; **232**, 525-37.
- [46] B Hari, BM Kurup, JT Varghese, JW Schrama and MCJ Verdegem Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture.* 2004; **241**, 179-94.

Table 1 Description of experimental treatments (T1 – control; T2 – gypsum at 200 ppm and T3 – tannin from rice straw extract at 1 ppm)

	Treatments		
	T1	T2	T3
Types	-	Powder	Extracted water
Methods	-	Sprinkle	Sprinkle
The application frequency		Every 15 days	Every 15 days
Pond area (m ²)	100	100	100
Pond depth (m)	0.8	0.8	0.8
No. of Nile tilapia stocked	250	250	250
Feeding rate	Twice a day (3-5% body weight per day)		

Table 2 Biovolume of cyanobacteria ($\times 10^{-3} \mu\text{L}^{-1}$) in fish pond during the experimental period (mean $\pm$ SE)

Div. Cyanophyta	Treatments		
	Control	Gypsum at 200 ppm	Rice straw extract at 1 ppm
<i>Anabaena circinalis</i>	1.97 $\pm$ 1.20	1.71 $\pm$ 1.17	-
<i>Aphanocapsa</i> sp.	9.96 $\pm$ 4.47	2.54 $\pm$ 0.75	5.57 $\pm$ 1.27
<i>Aphanothece</i> sp.	-	-	0.05 $\pm$ 0.05
<i>Chroococcus limneticus</i>	3.52 $\pm$ 1.24	0.28 $\pm$ 0.14	1.04 $\pm$ 0.37
<i>Coelomoron</i> sp.	1.31 $\pm$ 0.43	0.43 $\pm$ 0.12	1.01 $\pm$ 0.13
<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i> 11	6.38 $\pm$ 2.31	-	2.20 $\pm$ 1.18
<i>Cylindrospermopsis philippinensis</i> 37	43.82 $\pm$ 23.09	-	2.28 $\pm$ 1.18
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	-	-	2.44 $\pm$ 1.23
<i>Leptolyngbya limnetica</i>	4.77 $\pm$ 3.31	0.63 $\pm$ 0.37	2.39 $\pm$ 0.63
<i>Merismopedia punctata</i>	0.84 $\pm$ 0.24	0.74 $\pm$ 0.36	0.92 $\pm$ 0.26
<i>Merismopedia tenuissima</i>	0.78 $\pm$ 0.50	0.33 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.10
<i>Microcystis</i> sp.	5.35 $\pm$ 3.13	0.69 $\pm$ 0.69	5.48 $\pm$ 2.62
<i>Microcystis aeruginosa</i>	21.42 $\pm$ 13.09	-	28.27 $\pm$ 13.23
<i>Phormidium limnetica</i> 35	3.05 $\pm$ 1.54	0.50 $\pm$ 0.39	0.33 $\pm$ 0.18
<i>Phormidium limnetica</i> 5	1.87 $\pm$ 1.74	-	0.16 $\pm$ 0.10
<i>Phormidium</i> sp.	6.84 $\pm$ 1.98	6.42 $\pm$ 2.60	2.45 $\pm$ 1.60
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	2.92 $\pm$ 0.81	1.07 $\pm$ 0.50	3.71 $\pm$ 1.16
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	0.22 $\pm$ 0.22	0.83 $\pm$ 0.36	-
<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.46 $\pm$ 0.17	0.22 $\pm$ 0.10	0.09 $\pm$ 0.07
<i>Romeria gracilis</i>	0.20 $\pm$ 0.07	-	0.25 $\pm$ 0.12
<i>Synechococcus</i> sp.	0.03 $\pm$ 0.02	-	-

Table 3 Physico-chemical and biological characteristics of monitored fish ponds during the experimental period (mean±SE)*

Parameters	Treatments		
	Control	Gypsum at 200 ppm	Rice straw extract at 1 ppm
pH	7.07±0.59	6.79±0.57	7.10±0.61
Temperature (°C)	30.6±0.74	30.7±0.73	30.7±0.73
DO (mgL ⁻¹)	4.30±0.88	4.00±0.91	4.61±0.99
Alkalinity (mgL ⁻¹)	74.84±15.33 ^b	51.07±15.85 ^a	70.96±18.87 ^b
Turbidity (NTU)	122.5±40.6 ^b	52.5±29.5 ^a	157.4±73.0 ^b
Total hardness (mgL ⁻¹ as CaCO ₃)	64.6±16.20 ^a	251.0±69.48 ^b	70.1±18.43 ^a
Total ammonia-N (mgL ⁻¹)	0.553±0.30	0.441±0.15	0.343±0.10
Nitrite-N (mgL ⁻¹)	0.012±0.011	0.003±0.001	0.008±0.003
Nitrate-N (mgL ⁻¹)	0.016±0.008	0.016±0.009	0.015±0.008
Orthophosphate -P (mgL ⁻¹)	0.048±0.02	0.035±0.01	0.059±0.02
TSS (mgL ⁻¹)	124.5±54.21 ^b	41.7±16.14 ^a	125.2±51.29 ^b

*Means followed by different letters in the same row were significantly different according to Tukey's multiple range tests at $p<0.05$

Table 4 Growth Performances of Nile tilapia; Initial weight, final weight, weight gain, average daily gain (ADG), Feed conversion ratio (FCR), feed conversion efficiency (FCE), survival rate (%) and biomass of fish (mean±SE)*

Growth Performances	Treatments		
	Control	Gypsum 200 ppm	Rice straw 1 ppm
Initial weight (g fish ⁻¹)	114.7 ± 2.6 ^a	115.0 ± 2.3 ^a	115.3 ± 2.6 ^a
Final weight (g fish ⁻¹)	374.0 ± 11.7 ^a	413.3 ± 20.2 ^a	385.3 ± 17.5 ^a
Weight gain (g fish ⁻¹)	259.3 ± 9.1 ^a	298.3 ± 18.7 ^a	270.0 ± 15.0 ^a
ADG (g day ⁻¹)	2.16 ± 0.08 ^a	2.49 ± 0.16 ^a	2.25 ± 0.13 ^a
FCR	1.53 ± 0.13 ^b	1.16 ± 0.06 ^a	1.16 ± 0.04 ^a
FCE (%)	66.37 ± 5.79 ^a	87.02 ± 4.32 ^b	86.58 ± 2.67 ^b
Survival rate (%)	71.20 ± 6.80 ^a	84.53 ± 5.41 ^a	90.40 ± 6.11 ^a
Biomass of fish (kg pond ⁻¹)	66.37 ± 5.79 ^a	87.02 ± 4.32 ^b	86.58 ± 2.67 ^b

*Means followed by different letters in the same row were significantly different according to Tukey's multiple range tests at $p<0.05$

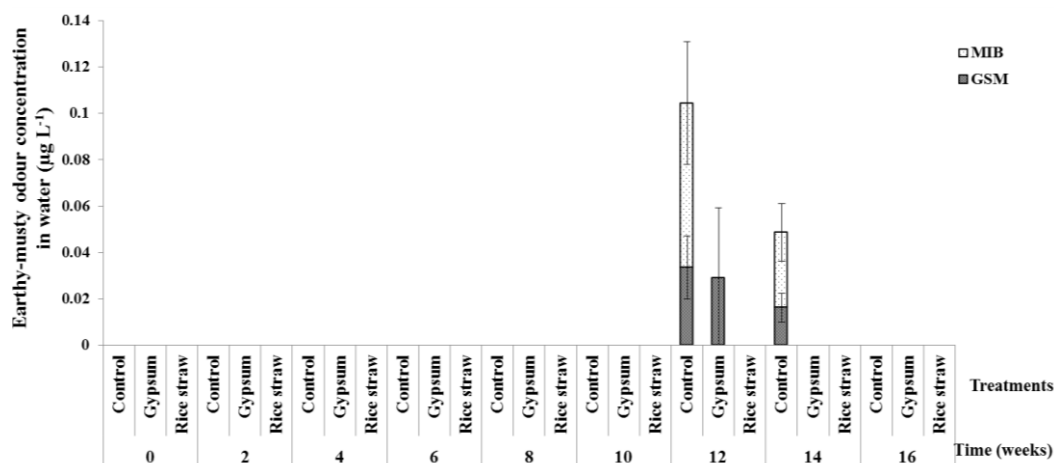


Figure 1 Concentrations of earthy-musty odour (geosmin and MIB) in pond water in the 3 treatments. Error bars represent the standard error of 3 replicates (control; gypsum at 200 ppm and tannin from rice straw extract at 1 ppm)

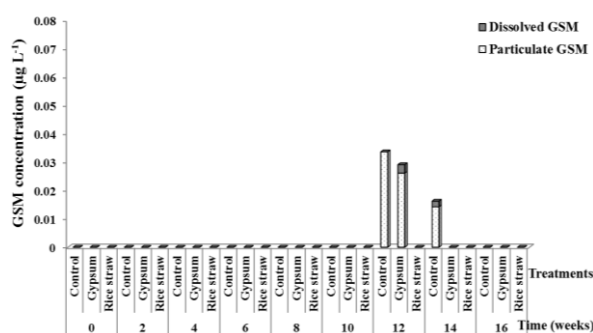


Figure 2 Concentrations of geosmin (Particulate and Dissolved) in pond water

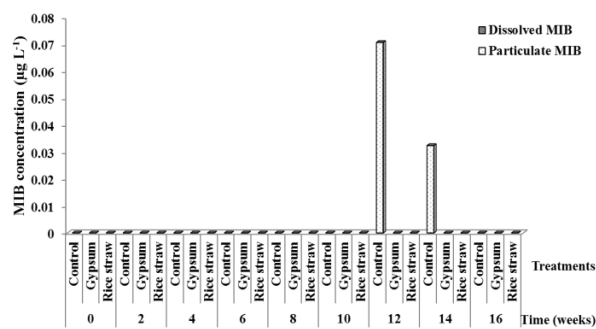


Figure 3 Concentrations of MIB (Particulate and Dissolved) in pond water

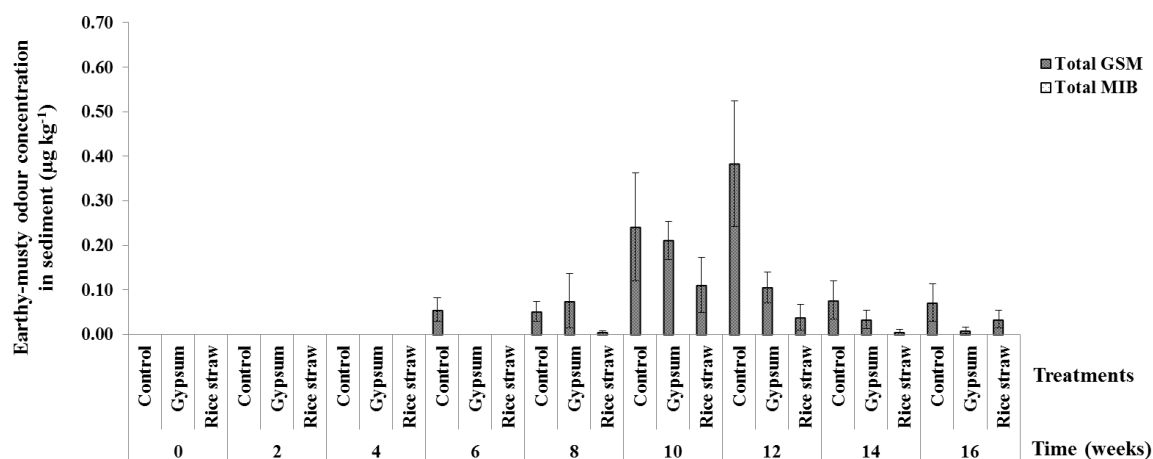


Figure 4 Concentrations of geosmin and MIB in pond sediment in the 3 treatments. Error bars represent the standard error of 3 replicates (control; gypsum at 200 ppm and tannin from rice straw extract at 1 ppm)

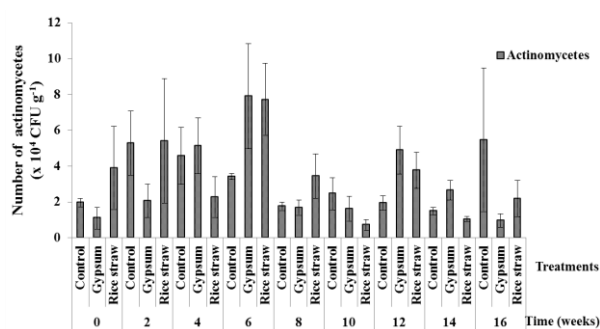


Figure 5 Number of actinomycetes spp. in sediments (CFU g^{-1}).

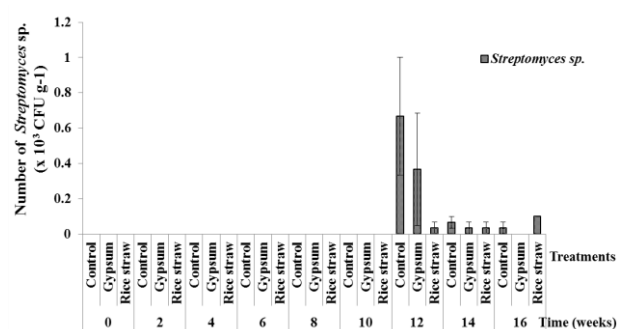


Figure 6 Number of *Streptomyces* spp. in sediments (CFU g^{-1}).

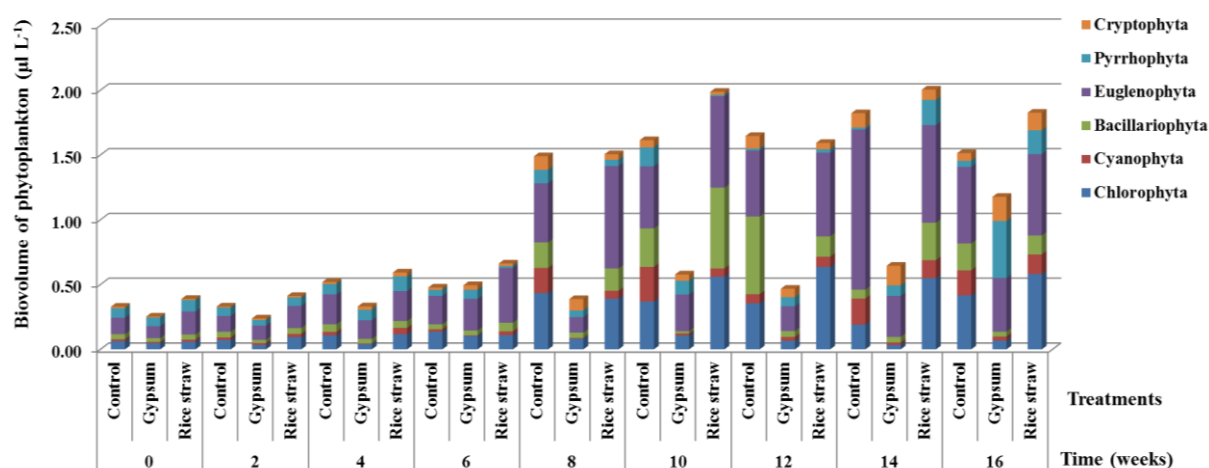


Figure 7 Diversity and composition of phytoplankton in fish pond.

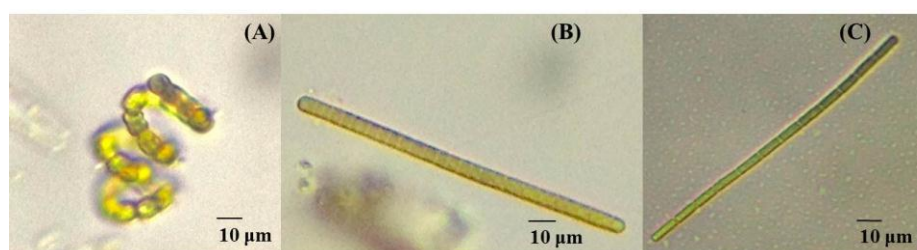


Figure 8 Photomicrographs of the cyanobacteria earthy-musty odour-producing in fish pond. (A) *Anabaena* sp., (B) *Phormidium* sp. and (C) *Pseudanabaena* sp.

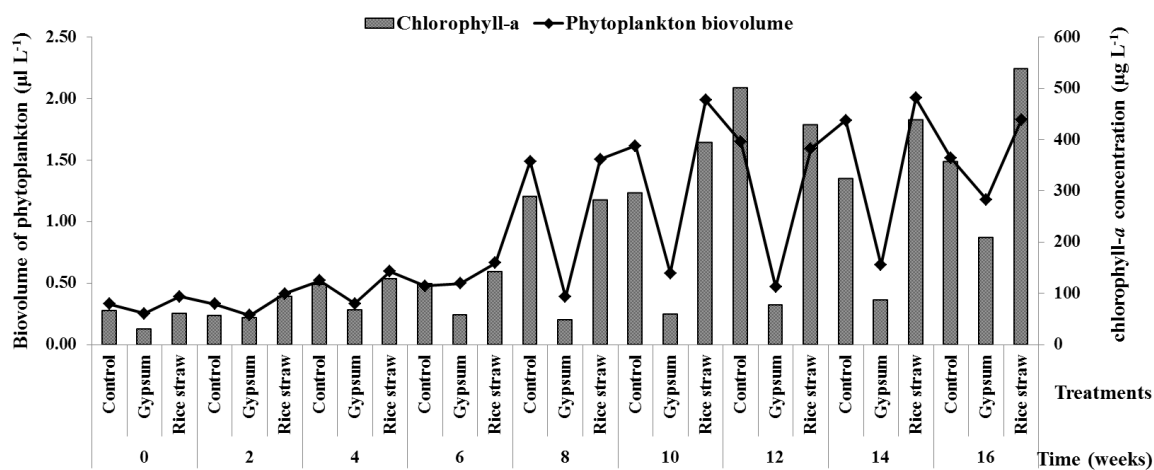


Figure 9 Biovolume of phytoplankton and chlorophyll-a in fish pond.

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลการดำเนินงาน
1. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วัสดุราคาถูก (ยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์) ในการลดความเข้มข้นของสารประกอบจืออสมินและเอ็มไอบีในห้องปฏิบัติการ	ทำการทดลองที่ 1: ประสิทธิภาพของการใช้ปูนยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	ทราบประสิทธิภาพของยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์ในการลดกลิ่นโคลนในห้องปฏิบัติการ	สามารถนำยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ในการลดกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล
	1.1 การใช้ยิปซัมเพื่อการลดกลิ่นโคลน	ทราบระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัมในการลดกลิ่นโคลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลานิล	สามารถเลือกระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของยิปซัมไปประยุกต์ใช้ในการลดกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล
	1.2 การใช้ฟางข้าวเพื่อการลดกลิ่นโคลน	ทราบระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของฟางข้าวในการลดกลิ่นโคลนในน้ำจากบ่อเลี้ยงปลานิล	สามารถเลือกระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดของฟางข้าวไปประยุกต์ใช้ในการลดกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล
	1.3 การใช้จุลินทรีย์เพื่อการลดกลิ่นโคลน	ทราบชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในการลดกลิ่นโคลนในห้องปฏิบัติการ	สามารถเลือกชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดไปประยุกต์ใช้ในการลดกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล
2. เปรียบเทียบผลของการใช้วัสดุราคาถูก (ยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์) ต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบจืออสมินและเอ็มไอบีในน้ำและปลา ชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่สร้างกลิ่นแอมโมเนียในดินและคุณภาพน้ำในบ่อปลานิล	การทดลองที่ 2: ผลของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ต่อการลดกลิ่นโคลนในน้ำบ่อเลี้ยงปลานิล - วิเคราะห์สารกลิ่นโคลนในน้ำดินและเนื้อปลา - วิเคราะห์คุณภาพน้ำ - ศึกษาชนิดของแพลงก์ตอนพืช - ศึกษาชนิดของแอมโมเนียในดิน - ตรวจสอบชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงปลา	- ทราบประสิทธิภาพของยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์ในการลดความเข้มข้นของกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล - ทราบผลของยิปซัม ฟางข้าวและจุลินทรีย์ต่อแพลงก์ตอนพืช แอมโมเนียในดินและคุณภาพน้ำที่เป็นสาเหตุของกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล	- สามารถเลือกวิธีที่เหมาะสมในการลดกลิ่นโคลน (จืออสมินและเอ็มไอบี) ในบ่อเลี้ยงปลานิล - มีความรู้ความเข้าใจสาเหตุของการเกิดกลิ่นโคลนและหาวิธีป้องกันแก้ไขปัญหาลำนี้ได้

ตาราง Output ของโครงการ

Output		กรณีผลสำเร็จไม่ถึง 100% และการแก้ไขที่ดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/ หรือการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
1. ทราบประสิทธิภาพของยิปซัม ฟางข้าว และจุลินทรีย์ในการลดความเข้มข้นของกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิล	100	
2. เกิดองค์ความรู้ทางด้านวิชาการ เพื่อนำไปพัฒนาระบบการเลี้ยงปลานิลปลอดกลิ่นโคลน	100	
3. จัดทำคู่มือการจัดการเพื่อเพิ่มคุณภาพปลานิล เรื่องกลิ่นโคลนในปลานิล	80	กำลังอยู่ในขั้นตอนการตรวจจากคณะกรรมการ
4. เผยแพร่ผลงานวิจัยระดับชาติหรือนานาชาติ 4.1 นำเสนอผลงานทางวิชาการจำนวน 2 เรื่อง คือ 4.1.1 Application of Gypsum and rice straw for water qualities improvement and algae control in fish ponds. ในงานประชุมวิชาการ “Glocalization and Water environment” ที่ Nagasaki University ประเทศญี่ปุ่น วันที่ 20-21 มีนาคม 2557 4.1.2 Effects of Gypsum on Algal-rich Pond Water. ในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 6 “Climate Change: Impact on Aquatic Resources and Fisheries” ที่คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในวันที่ 4 ธันวาคม 2556 4.2 ตีพิมพ์ผลงานวิจัย 2 เรื่อง คือ 4.2.1 Use of gypsum for removal of off-flavor compounds in fish ponds. First International Conference on Science, Engineering and Environment (SEE), Tsu City, Mie, Japan, Nov. 19-21, 2015 4.2.2 Mitigation Technique for Earthy-Musty Odour in Pond-Raised Tilapia Using Gypsum and Rice straw ในวารสาร Walailak Journal	80	งานตีพิมพ์กำลังรอผลการประเมินจากวารสาร
5. ผลิตนักศึกษาปริญญาโทหรือเอก จำนวน 2 คน คือ นางสาวสุพันธ์ณี สุวรรณภักดี นักศึกษาปริญญาเอก และนายพิชัย พงษ์อุดม นักศึกษาปริญญาโท	100	

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

(รองศาสตราจารย์ ดร.นิรุฒิ หวังชัย)

วันที่ 10 สิงหาคม 2558