



ผลของอาหารเคลือบสารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่า และมะขามป้อมต่อ ความสมบูรณ์เพศกบนา (*Ranarugulosa*, Wiegmann) และพัฒนาการ ของลูกอ๊อด

Effects of the *Spirulinaplantensis* and *Phyllanthusemblica* Linn. extract additional diets on the reproductive maturation of Lowland Frog (*Ranarugulosa*, Wiegmann) and its tadpole development

ณัฐฐา พงษ์ สุริยะ^{1*}, จงกมล พรหมยะ¹ และชนกันต์ จิตมนัส¹

Nattapong suriya^{1*}, Jongkon Promya¹, Chanagun Chitmanat¹

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมงและเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้เชียงใหม่

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

*Correspondent author: Ball_dreamteam_4@hotmail.com

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการใช้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่า และมะขามป้อมต่อความสมบูรณ์เพศกบนาและพัฒนาการของลูกอ๊อดวางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยฉีดพ่นสารสกัดบนอาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำขนาดใหญ่ คือ ชุดทดลองที่ 1 อาหารเม็ดสำเร็จรูปไม่ผสมสารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่าและมะขามป้อม ชุดทดลองที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมสารสกัดมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ และชุดทดลองที่ 3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์เพาะเลี้ยงกบในบ่อซีเมนต์ ขนาด 1.5 x 2 x 1 เมตร น้ำหนักพ่อพันธุ์เริ่มต้นเฉลี่ย 191.67±4.14 กรัมต่อตัว และน้ำหนักแม่พันธุ์เริ่มต้นเฉลี่ย 270.83±4.43 กรัมต่อตัว ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RHa เพื่อกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์วางไข่โดยฉีดพ่อพันธุ์ 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และแม่พันธุ์ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อัตราการปล่อย 1 คู่ต่อตารางเมตร ก่อนผสมพันธุ์ให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 8 เดือน ผลการทดลองพบว่า แม่พันธุ์ในชุดการทดลองที่ 2 มีดัชนีความสมบูรณ์เพศเท่ากับ 2.4965±0.0565 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าแม่พันธุ์ในชุดการทดลองที่ 3 และ 1 ตามลำดับ และพ่อพันธุ์ในชุดการทดลองที่ 1 มีดัชนีความสมบูรณ์เพศ เท่ากับ 0.3165±0.0478 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าพ่อพันธุ์ในชุดการทดลองที่ 3 และ 2 ตามลำดับ หลังจากผสมพันธุ์แล้วพบว่า พ่อแม่พันธุ์ทั้งสามชุดการทดลองมีอัตราการวางไข่เท่า 100.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ พ่อแม่พันธุ์ในชุดการทดลองที่ 3 มีจำนวนไข่เฉลี่ย 2077.50±530.63 ฟองต่อแม่ อัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย 98.50±0.58 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการฟักไข่เฉลี่ย 99.24±0.50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าพ่อแม่พันธุ์ในชุดการทดลองที่ 2 และ 1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ไข่จะฟักออกเป็นตัวภายใน 18–24 ชั่วโมงในวันที่ 9 ตั้งแต่ฟักออกเป็นตัวลูกอ๊อดมีความยาวเฉลี่ย 2.06±0.40, 2.08±0.52 และ 2.06±0.40 เซนติเมตร ในขณะที่อัตราการรอดตายเฉลี่ยของลูกอ๊อด 75.32±1.21, 82.40±.44 และ 86.28±3.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างทางสถิติ (p≤0.05) จากการทดลองสรุปได้ว่าอาหารเม็ด

สำเร็จรูปผสมสารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มทำให้กบนาที่มีจำนวนไข่เฉลี่ยอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย และอัตราการฟักไข่เฉลี่ยดีและอัตราการรอดตายเฉลี่ยของลูกอ๊อดดีที่สุดซึ่งเป็นทางเลือกสำหรับผู้สนใจจะผลิตลูกอ๊อดต่อไป

Abstract

The purpose of this research was to determine the effects of diets added with either *Spirulinaplantensis* or *Phyllanthusemblica* Linn. extract on reproductive maturation of frog broodstock and its tadpole development. The CRD experiment was applied and divided into 3 treatments with 3 replication each; treatment 1 basal commercial diet (control), treatment 25% *Phyllanthusemblica* Linn. extract supplementary diet, and treatment 3 5% *Spirulinaplantensis* supplementary diet. Broodstock were reared in 1.5 X 2 X 1 m³ cement tank. Average initial weight of male broodstock was 191.76 ± 4.14 g/Frog and female broodstock was 270.83 ± 4.43 g/Frog. Frog broodstock were induced breeding by synthetic LHRHa. Females were injected with 20 µg/kg while males were injected with 15 µg/kg. A stocking density was 1 pair per square meter. Frogs were fed at 3 percent of body weight daily for 8 months. The reproductive index of females in treatment 2 was 2.4965±0.0565 percent which was higher than females in treatments 3 and 1, respectively. On the other hand, male reproductive index of frogs in treatment 1 was 0.3165±0.0478 percent which was greater than males in treatments 3 and 2, respectively. After induced breeding, all females, 100.00 ± 0.00 percent, spawned. The average number of eggs in treatment 3 was 2077.50±530.63 egg/dam, the average fertilization rate was 98.50±0.58 percent, and the average hatching rate was 99.24±0.50 percent which were better than ones in treatments 2 and 1, respectively. However, there were not statistical differences in number of eggs, fertilization rates, and hatching rates. The eggs were hatched within 18 – 24 hours. Newly hatched tadpoles in treatments 1, 2, and 3 had average lengths of 2.06±0.40, 2.08±0.52, and 2.06±0.40 cm. Their survival rates were 75.32±1.21, 82.40±0.44 and 86.28±3.09 percent, respectively. There were statistically significant differences in tadpole survival rates ($p \leq 0.05$). This study suggested that 5 percent *Spirulinaplantensis* supplementary diet provided higher survival rates of tadpoles than commercial diet and *Phyllanthusemblica* Linn. extract supplementary diets. In sum, the *Spirulinaplantensis* extract supplementary diet could be an alternative method for feed preparation to produce frog tadpoles.

คำสำคัญ: กบนา สไปรูลิน่า มะขามป้อม

Keywords: *Ranarugulosa*, *Spirulinaplantensis*, *Phyllanthusemblica* Linn

1. บทนำ

กบเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศฮ่องกง ไต้หวันจีน ญี่ปุ่นสหภาพยุโรป และอเมริกา (1) โดยผลผลิตของกบจากการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี ในปี 2534 มีผลผลิตกบ จำนวน 18 ตัน ต่อมาในปี 2535 มีผลผลิต จำนวน 131 ตัน และในปี 2548 มีผลผลิตกบจากการเลี้ยง จำนวน 1,781 ตัน(2) ขณะที่จำนวนกบในธรรมชาติลดลงอย่างมากเพราะแหล่งที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมได้รับการบุกรุกจากการขยายตัวของกิจกรรมทางการเกษตร หรือมีการสัมผัสกับสารพิษ เช่น สารกำจัดศัตรูพืช กลุ่ม organophosphate ซึ่งใช้อย่างกว้างขวางและปนเปื้อนลงในสิ่งแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกบอย่างไรก็ตามปัญหาที่ผู้เพาะพันธุ์กบมักประสบ คือ การได้ไข่จำนวนน้อยและมีอัตราการตายของลูกอ๊อดต่อการพัฒนาอาหารเพื่อเลี้ยงกบเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดีเป็นปัจจัยสำคัญ เพื่อให้ได้ลูกอ๊อดและกบวัยอ่อนที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอมีงานวิจัยที่ใช้อาหารเสริมกรดไขมัน วิตามินซี วิตามินอีและแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เพื่อขุนพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำ (3) ปริมาณวิตามินซีในอาหารพ่อแม่พันธุ์มีผลต่ออัตราการรอดต่อลูกปลา เนื่องจากวิตามินซีมีผลต่อการสร้างคอลลาเจนระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน (4) ความต้องการวิตามินซีของพ่อแม่พันธุ์ปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) มากกว่าปลาวัยรุ่นถึง 8 เท่า(5) อย่างไรก็ตามงานวิจัยด้านอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์กบมีน้อยมากซึ่งอาหารพ่อแม่พันธุ์แตกต่างจากอาหารสำหรับการเลี้ยงสัตว์ทั่วไปและปัญหาพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อนจะมีผลมาจากการให้อาหารพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่เหมาะสม (4) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาปรับปรุงอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบ โดยการนำพืชสมุนไพรที่มีส่วนประกอบวิตามินซี ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเสริมการเจริญเติบโต พัฒนาระบบสืบพันธุ์ กระตุ้นความต้านทานโรค เพิ่มความทนทานต่อความเครียด ซึ่งความเครียดมีผลทำให้ระดับการสร้างแอนติบอดีของร่างกายลดลง และมีผลต่อการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen) โดยทั่วไปในอาหารสัตว์น้ำมีวิตามินซีอยู่แล้วแต่จะค่อยๆ

ลดลงระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร และการเก็บรักษา อันเนื่องมาจากกระบวนการออกซิเดชัน(6)(7)(8) การใช้มะขามป้อม (*Indian gooseberry*) ซึ่งเป็นผลไม้ที่มีวิตามินซีสูง วิตามินซีจากมะขามป้อมมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินซีสังเคราะห์ประมาณ 12 เท่า และน่าจะมีประโยชน์ในการป้องกันโรคและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันแก่พ่อแม่และลูกพันธุ์กบในสารสกัดมะขามป้อม ปริมาณที่ 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมให้ผลที่ดีที่สุดคล้ายกับ (silymarin, a reference hepatoprotective agent: SL) ในการทดลองสารสกัดมะขามป้อม (75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) หรือ SL (5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) กับหนูเป็นเวลา 7 วันหลังจาก 21 วันที่มีการให้อาหารอด (4 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน, PO) การคืนสภาพเซลล์ตับเพิ่มขึ้น โดยระดับของ AST, ALT IL-1beta กลับมาเป็นปกติ การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า สารสกัดมะขามป้อมและ(SL)มีประโยชน์ต่อตับหนูที่เกิดจากการบาดเจ็บจากเอทานอล(9)นอกจากนี้สำหรับ(*Spirulina platensis*) เป็นสาหร่ายที่มีโปรตีนสูงถึง 60 – 70% ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุที่มีคุณค่าสูง อีกหลายชนิด เช่น phycocyanin, allophycocyanin, betacarotene, chlorophyll-a และกรดไขมันจำเป็นไม่อิ่มตัว เช่น gamma-linolenic acid; GLA เป็นกรดไขมันจำเป็นตัวหนึ่ง ซึ่งเป็นสารที่ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสิ่งมีชีวิต และได้รับความสนใจทางการแพทย์ และอุตสาหกรรม เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ลดระดับความดันโลหิต ลดปริมาณคอเลสเตอรอล ควบคุมฮอร์โมน Prostaglandin ช่วยรักษาเกี่ยวกับโรคหัวใจ และโรคภูมิแพ้ และรงควัตถุ C-phycocyanin และ allophycocyaninสามารถนำมาใช้เป็นสารติดตามในงานด้าน immunology assays microscopy เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเรืองแสง (10)(11)จึงมีความเป็นไปได้ว่าหากใช้สารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่าและมะขามป้อมผสมในอาหารพ่อแม่พันธุ์กบนาเพื่อเปรียบเทียบกับเออร์เซ็นต์การวางไข่ อัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และดัชนีความสมบูรณ์เพศ ข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นพื้นฐานต่อการส่งเสริมเกษตรกรไทยผู้เลี้ยงกบ และพัฒนาผลผลิตกบให้มีปริมาณ และคุณภาพเพียงพอต่อความต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ

2. วิธีวิจัย

2.1 การเตรียมบ่อทดลอง

ใช้บ่อซีเมนต์ขนาด 1.5x2.0x1.0 เมตร³ จำนวน 9 บ่อ ก่อนการทำการทดลองทำความสะอาดบ่อและแช่ด้วยคลอรีนผงเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อฆ่าเชื้อโรคเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นล้างออกด้วยน้ำสะอาดและตากบ่อทิ้งไว้ เติมน้ำให้ได้ระดับความลึก 10 ซม. นำพีชน้ำใส่เพื่อเป็นที่ยึดเกาะของไข่ และเปิดสปริงเกอร์จำลองสภาพฝนตก แล้วจึงใช้ตาข่ายพรางแสง 80 เปอร์เซ็นต์ปิดปากบ่อเพาะเลี้ยง เพื่อป้องกันศัตรูตามธรรมชาติของกบ

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกกบนาที่ใช้ในการทดลองนำมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ลูกกบนาที่มีอายุ 1 เดือน น้ำหนักกบเริ่มต้นเฉลี่ย 20.63 ± 8.16 กรัมต่อตัว อัตราการปล่อย 100 ตัวต่อตารางเมตรในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5x2.0x1.0 เมตร³ ปล่อยทั้งหมด 9 บ่อ โดยยังไม่ให้อาหารทดลองแต่ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำขนาดใหญ่ เปอร์เซ็นต์โปรตีนไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ของบริษัทเอกชนวันละ 2 ครั้งเช้าและเย็น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 วันเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อปรับสภาพให้กบคุ้นเคยกับอาหารและสภาพของบ่อ

2.3 การเตรียมสารสกัด

คัดเลือกผลมะขามป้อมสดมีลักษณะสมบูรณ์ ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง นำไปล้างลมให้สะเด็ดน้ำ แยกใช้แต่ส่วนเนื้อ และหั่นให้มีขนาดเล็กลงประมาณแล้วชั่งน้ำหนัก ส่วนสาหร่ายสาไปรูลิน่าจะบดให้เป็นผงละเอียดแล้วชั่งน้ำหนักจากนั้นบรรจุขวดติดบีบแต่ละชนิดใส่ขวดลูกขมฟู้เติมตัวทำละลาย(น้ำกลั่น) ในอัตราส่วน 1:3(w/v) ปิดปากขวดด้วยกระดาษพอลิเอทิลีนนาน 24 ชั่วโมงกรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง และกรองละเอียดด้วยกระดาษกรอง No.1 จะได้สารสกัดหยาบและเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง คัดแปลงจากวิธีของ (12)

2.4 การจัดการด้านอาหาร

ใช้สารสกัดสาหร่ายสาไปรูลิน่า และมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ ฉีดพ่นให้ทั่วกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ดอาหาร 1.00 ซม. เปอร์เซ็นต์โปรตีนไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของบริษัทเอกชนเคลือบด้วยไข่ขาว แล้วฝังลงจนแห้งให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือเวลาเช้าและเย็นเริ่มให้อาหารทดลองหลังจากปรับสภาพให้กบคุ้นเคยกับอาหารโดยทำการปรับปริมาณอาหารที่ให้ทุก 30 วัน ตามน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกบในแต่ละบ่อของแต่ละชุดการทดลอง ตลอดจนการทดลอง 8 เดือน สุ่มตัวอย่างอาหารวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ (13) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการอาหารทดลอง

	ควบคุม	ชุดการทดลอง	
		อาหาร+มะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์	อาหาร+สาไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	24.53±1.89	25.38±1.55	27.19±1.92
ไขมัน	6.85±0.07 ^b	7.38±0.69 ^{ab}	7.96±0.53 ^a
ความชื้น	9.95±0.04 ^a	9.47±0.08 ^b	9.54±0.10 ^b
เถ้า	8.10±0.07 ^b	10.36±0.19 ^a	10.56±0.22 ^a
คาร์โบไฮเดรต	7.32±1.17 ^b	8.29±0.58 ^b	10.34±0.50 ^a
เยื่อใย	43.25±1.08 ^a	39.13±1.97 ^b	34.41±2.04 ^c

หมายเหตุอักษรภาษาอังกฤษกำกับค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$)

2.5 การวางแผนการทดลอง

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design : CRD) โดยใช้บ่อซีเมนต์ในการทดลองทั้งหมด 9 บ่อ แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ๓ ละ 3 ซ้ำดังต่อไปนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหาร + สไปรูลิน่าและมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหาร + มะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 3 อาหาร + สไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์

คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์โดยสังเกตตัวผู้จะมีถุงเสียงที่ได้คาง และที่นี้ของขาข้างหน้าจะนูนออกมีสีชมพู ส่วนตัวเมียลำตัวด้านข้างจะสากมือ ถ้าสากมากแสดงว่ามีความพร้อมที่จะผสมพันธุ์ น้ำหนักพ่อพันธุ์เฉลี่ย 191.67 ± 4.14 กรัมต่อตัว น้ำหนักแม่พันธุ์เฉลี่ย 270.83 ± 4.43 กรัมต่อตัวผสมพันธุ์กับดำเนินในช่วงเย็น ใช้วิธีเพาะพันธุ์โดยวิธีฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RHa พ่อพันธุ์ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แม่พันธุ์ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมโดยปล่อยอัตราส่วนของพ่อพันธุ์ต่อแม่พันธุ์ 1:1 และแยกพ่อแม่พันธุ์ในช่วงเช้าของวันถัดไป

2.6 การเก็บข้อมูล

ก่อนการฉีดฮอร์โมนทำการสุ่มพ่อแม่พันธุ์กับแต่ละชุดการทดลอง 1 คู่ เพื่อศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศ และหลังจากการฉีดฮอร์โมนประมาณ 12 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการวางไข่ของแม่กบ จดบันทึกจำนวนแม่กบที่วางไข่ จนครบ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการวางไข่ และอัตราการฟักเป็นตัว โดยสุ่มไข่ในแต่ละบ่อใส่กะละมังที่มีปริมาณน้ำ 1 ลิตร จำนวน 3 กะละมังๆ ละ 100 ฟอง เมื่อลูกอ๊อดอายุ 9 วัน นับจำนวนและจดบันทึกเพื่อศึกษาอัตราการรอดตาย ในแต่ละชุดการทดลองนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. ดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonad somatic index: เปอร์เซ็นต์)

$$GSI = (\text{น้ำหนักของรังไข่ หรืออัมชะ} / \text{น้ำหนักตัวกบ}) \times 100$$

2. อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)
(จำนวนไข่ที่เจริญถึงระยะแกสตรูลา / จำนวนไข่ทั้งหมด) x 100

3. อัตราการวางไข่ (Fertilize rate)
(จำนวนแม่พันธุ์วางไข่ / จำนวนแม่พันธุ์ทั้งหมด) x 100

4. อัตราการฟักไข่ (Hatching rate)
(จำนวนลูกกบวัยอ่อนที่ฟักเป็นตัว/จำนวนไข่ที่เจริญถึงระยะแกสตรูลา) x 100

5. อัตราการรอดตาย (Survival Rate: เปอร์เซ็นต์)
(จำนวนกบที่เหลือรอด / จำนวนกบเริ่มต้น) x 100

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อศึกษาความแตกต่างของแต่ละหน่วยทดลอง (Treatment) จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละหน่วยการทดลองโดยวิธีการของ Duncan's-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS

2.8 ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

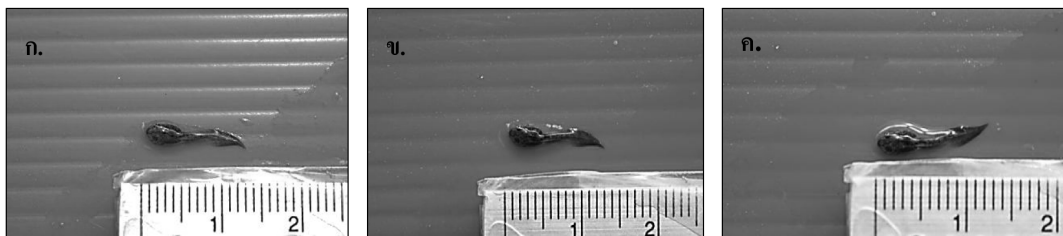
เริ่มการทดลองระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 –เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

การทดลองใช้สารสกัดสาหร่ายสไปรูลิน่าและมะขามป้อมในอาหารต่อการผสมพันธุ์กบนาโดยวิธีฉีดกระตุ้นการวางไข่ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RHa โดยน้ำหนักพ่อพันธุ์เฉลี่ย 191.67 ± 4.14 กรัมต่อตัว น้ำหนักแม่พันธุ์เฉลี่ย 270.83 ± 4.43 กรัมต่อตัวก่อนการผสมพันธุ์ได้ผ่าอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งน้ำหนักเพื่อศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศพ่อแม่พันธุ์ พบว่าแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์มีดัชนีความสมบูรณ์เพศสูงที่สุดเท่ากับ 2.4965±0.0565 เปอร์เซ็นต์

รองลงมาเป็นแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์มีดัชนีความสมบูรณ์เพศเท่ากับ 2.3449 ± 0.1548 เปอร์เซ็นต์ และแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่าและมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ มีดัชนีความสมบูรณ์เพศต่ำที่สุดเท่ากับ 2.299 ± 0.1115 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในพ่อพันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่าและมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ มีดัชนีความสมบูรณ์เพศสูงที่สุดเท่ากับ 0.3165 ± 0.0478 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นพ่อพันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ มีดัชนีความสมบูรณ์เพศเท่ากับ 0.3129 ± 0.0104 เปอร์เซ็นต์ และพ่อพันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีดัชนีความสมบูรณ์เพศต่ำที่สุดเท่ากับ 0.3116 ± 0.0290 เปอร์เซ็นต์ หลังการผสมพันธุ์ได้ สุ่มนับจำนวนและจดบันทึกข้อมูล พบว่าพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า มะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ และ 0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการวางไข่เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนไข่กบต่อแม่ พบว่า พ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนไข่สูงที่สุดเท่ากับ 2077.50 ± 530.63 ฟองต่อแม่ รองลงมาเป็นพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนไข่เท่ากับ 2036.83 ± 287.10 ฟองต่อแม่ และพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่าและมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนไข่น้อยที่สุดเท่ากับ

2024.67 ± 696.38 ฟองต่อแม่ อัตราการปฏิสนธิพบว่าพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุดเท่ากับ 98.5 ± 0.57 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 97.5 ± 1.29 เปอร์เซ็นต์ และพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า และมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุดเท่ากับ 96.75 ± 2.21 เปอร์เซ็นต์ และพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า และมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ และ 0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการฟักไข่เท่ากับ 99.23 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอัตราการรอดตายของลูกอ๊อดตั้งแต่ฟักเป็นตัวถึงวันที่ 9 พบว่า พ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายของลูกอ๊อดสูงที่สุดเท่ากับ 86.27 ± 3.09 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายของลูกอ๊อดเท่ากับ 82.40 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ และพ่อแม่พันธุ์กบนาที่ให้อาหารผสมสารสกัดสาหร่ายสีไปรูลิน่าและมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายของลูกอ๊อดต่ำที่สุดเท่ากับ 75.32 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 2) ลูกอ๊อดกบนาตั้งแต่ฟักเป็นตัวจนถึงวันที่ 9 (รูปที่ 1)



รูปที่ 1

ลูกอ๊อดกบนา อายุ 9 วัน

ก. พ่อแม่พันธุ์ที่ให้อาหารผสมสาหร่ายสีไปรูลิน่า และมะขามป้อม 0 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม)

ข. พ่อแม่พันธุ์ที่ให้อาหารผสมมะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์

ค. พ่อแม่พันธุ์ที่ให้อาหารผสมสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ผลการผสมพันธุ์โดยวิธีฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์

ค่าเฉลี่ย	ชุดควบคุม	อาหาร+มะขามป้อม 5 เปอร์เซ็นต์	อาหาร+สาหร่ายสี 5เปอร์เซ็นต์
น้ำหนักตัวพ่อพันธุ์ (กรัม)	191.67±5.77	191.67±4.30	191.67±3.33
น้ำหนักตัวแม่พันธุ์ (กรัม)	272.5±50	270±4.70	270±4.40
ดัชนีความสมบูรณ์เพศบเพศผู้ (เปอร์เซ็นต์)	0.3165±0.0478	0.3116±0.0290	0.3129±0.0104
ดัชนีความสมบูรณ์เพศบเพศเมีย (เปอร์เซ็นต์)	2.299±0.1115	2.4965±0.0565	2.3449±0.1548
จำนวนไข่ (ฟองต่อแม่)	2024.67±696.38	2036.83±287.10	2077.50±530.63
อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)	96.75±2.21	97.5±1.29	98.5±0.57
อัตราการวางไข่ (เปอร์เซ็นต์)	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
อัตราการฟักไข่ (เปอร์เซ็นต์)	99.23±0.51	99.23±0.51	99.23±0.51
อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	75.32±1.20 ^c	82.40±0.43 ^b	86.27±3.09 ^a

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษกำกับค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกัน (p<0.05)

3.1 การอภิปรายผล

การเลี้ยงกบนาเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ด้วยอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม และสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้แม่กบนาอายุ 8 เดือนที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดของลูกอ๊อดสูง และมีแนวโน้มของจำนวนไข่สูงกว่าอาหารที่ผสมสารสกัดมะขามป้อม และอาหารที่ไม่ผสมในสาหร่ายสีไปรูลิน่า เป็นแหล่ง carotenoid ทางเลือกในธรรมชาติทดแทน astaxanthin สังเคราะห์ได้ และปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่ให้สาหร่ายสีไปรูลิน่า 7.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เป็นระดับที่เหมาะสมที่มีการแสดงของสีที่ชัดเจน แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลา(14) มีสาหร่ายน้ำจืดสามชนิดที่มีประสิทธิภาพการดูดซึมค่อนข้างต่ำในปลานิลวัยอ่อนขนาด 0.8-3.4 ซม. แต่ในปลานิลวัยอ่อนขนาด 0.8-1.2 ซม. ประสิทธิภาพการดูดซึมจะดีขึ้นและสาหร่ายสีไปรูลิน่ามีประสิทธิภาพการดูดซึมมากขึ้น (61.4-80%) มากกว่ายูกลีนาและคลอเรลล่า ซึ่งสาหร่าย *Spirulina platensis* มีวิตามิน และเกลือแร่ต่าง ๆ ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมระบบสืบพันธุ์(15) จึงน่าจะมีส่วนทำให้พ่อแม่พันธุ์กบนา มีความสมบูรณ์เพศ

ดีขึ้นซึ่งในกบที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายสีไปรูลิน่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ที่ดีกว่ากบที่ได้รับอาหารผสมกระเทียม สาหร่ายไค 5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารชุดควบคุม(16) ส่วนในพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกที่กินอาหารผสมสาหร่ายสีไปรูลิน่า 9 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำเชื้อและไข่สมบูรณ์กว่าปลาบึกที่กินอาหารไม่ผสมสาหร่าย *S. platensis* พร้อมทั้งการศึกษาการอนุบาลและเลี้ยงปลานิลจนถึงระยะวางไข่ด้วยสาหร่ายสีไปรูลิน่าสด พบว่า อัตราการฟักสูงกว่าอาหารไม่ผสมสาหร่าย *S. platensis* (17) อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาประสิทธิภาพการสืบพันธุ์วางไข่ของปลานิล โดยให้กินสาหร่ายสีไปรูลิน่าสดเทียบกับการให้อาหารสำเร็จรูป พบว่า มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการวางไข่ของลูกปลาไม่แตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารสำเร็จรูป (15) (18) การใช้สาหร่ายสีไปรูลิน่าสดทดแทนปลาป่นหรือแหล่งอาหารโปรตีนสูงจากแหล่งอื่น ในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงได้ถึง 50 – 55 % โดยช่วยเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในอาหาร การผสมสาหร่ายสีไปรูลิน่ามีส่วนต่อการเพิ่มระดับคุณค่าทางโภชนาการ และคาร์โบไฮเดรต

ในเนื้อปลาโดยระดับสาหร่ายที่สามารถส่งผลกระทบต่อ คาร์โบไฮเดรตในเนื้อปลาดีที่สุด คือ อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลินาสด 55 %(19) ในสาหร่ายมีส่วนช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้ปลาที่มีความสามารถต้านทานกับโรคติดเชื้อ นั้นอาจจะเป็นสาเหตุทำให้ปลาที่ได้รับสาหร่ายเป็นอาหารมีอัตราการรอดที่สูงขึ้น (20) ซึ่งมีจำนวนไข่ปลาทะเลหลายชนิดลดลงอาจเนื่องมาจากผลของการขาดสารอาหาร และสารสำคัญบางชนิดที่เหมาะสมต่อขบวนการสร้างไข่ (4) งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า กบที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลินาและสารสกัดจากมะขามป้อมมีแนวโน้มของไข่ที่เพิ่มขึ้นแม้ว่า จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

วิตามินซีเป็นสารอาหารที่มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในปลาแซลมอน(5) และช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของสเปิร์มเซลล์วิตามินซีที่เสริมในอาหารพ่อแม่พันธุ์มีผลต่ออัตราการรอดของลูกพันธุ์ (4) จะเห็นได้ว่า การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า อัตราการรอดของลูกกบในอาหารที่เสริมสาหร่ายและสกัดมะขามป้อมมีแนวโน้มสูงขึ้น นั้นอาจเกิดจากปริมาณวิตามินในอาหารทดลอง ซึ่งในกบบูลฟร็อกที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ได้รับการเสริมวิตามินซี 2% จะมีอัตราการรอดสูงสุด แตกต่างจากกบที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ไม่มีการเสริมวิตามินซี ซึ่งมีอัตราการรอดต่ำสุด(21) และตัวอ่อนของกบ (*Xenopus laevis*) ที่แช่ในวิตามินซี 200 มก./ล.จะมีความต้านทานความเป็นพิษของพาราควอตเพิ่มขึ้นจะเห็นได้ว่า การให้อาหารเสริมวิตามินซีมีส่วนช่วยให้กบมีความแข็งแรงสามารถทนต่อสารพิษที่อาจจะปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้(22)(23) ส่วนการพัฒนารูปร่างในแต่ละสัปดาห์มีค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ค่าเปอร์เซ็นต์ขาหลังงอก (Hindleg) ค่าเปอร์เซ็นต์ขาหน้างอก (Foreleg) ค่าเปอร์เซ็นต์ตัวสำเร็จ (Complete metamorphosis) และค่าอัตราการรอดของลูกกบวัยอ่อน ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมไอโอดีน 0.03 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุด และมากกว่าชุดควบคุมในสัปดาห์แรก(24) ในกบนาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมยีสต์ 4% มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ประสิทธิภาพของโปรตีน ประสิทธิภาพของอาหารและอัตราแลกเนื้อดีกว่าอีกด้วย และเมื่อพิจารณาถึงความต้านทานโรคของกบนา โดยดูจากค่าองค์ประกอบเลือด

พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมและเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ในเลือดของกบนาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมยีสต์ 2-4% มีจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมและเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyteมากกว่าในเลือดของกบนาที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมยีสต์ ซึ่งเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากมีหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย(25)

4. สรุป

การใช้สารสกัดสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารต่อการผสมพันธุ์กบนาส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การวางไข่ อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก การใช้สารสกัดมะขามป้อมในอาหารส่งผลดีต่อดัชนีความสมบูรณ์เพศเมีย ทำให้จำนวนไข่มีเพิ่มขึ้น

การให้อาหารเสริมสาหร่ายสไปรูลินาและสารสกัดจากมะขามป้อม มีผลต่ออัตราการรอดตายของลูกพันธุ์กบ อย่างไรก็ตามสารอาหารชนิดอื่นที่นำจะมีผลต่อการเจริญพันธุ์ของกบและความแข็งแรงของลูกพันธุ์ที่ควรจะมีการศึกษาต่อไป เช่น วิตามินเอ วิตามินอี กรดโฟลิก (folic acid) ที่มีในธรรมชาตินอกจากนี้ควรศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงานของสารเหล่านี้ต่อการเจริญพันธุ์และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มเติมด้วย

5. เอกสารอ้างอิง

- (1) Champasri T, Jiwyam W, Visitvithayakorn N, Preecha C. Research and development of feed and feeding for frogs. *KKU Res. J.* 2005;10(3): 208-223. Thai.
- (2) Uppananchai A, Taksin Y, Wannapat S, Phosri J, Sripat S. Effect of 17 beta-estradiol on sexual differentiation, growth and survival rate of common lowland frog, *ranarugulosa* (Wiegmann, 1935). Department of Fisheries. Technical Paper. 2011; (5). Thai.

- (3) Sawanboonchun J, RoyWJ, Robertson DA, BellJG. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadusmorhua*, L.). *Aquaculture*.2008;(283): 97–101.
- (4) Izquierdo M.S, Fernández-Palacios H, Tacon A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*.2001;(197): 25–42.
- (5) BlomJ,H, DabrowskiK. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *BiolReprod*. 1995;52(5):1073-80.
- (6) Teshima, SI, Kanazawa A, Koshio S,ItohS.. L-ascorbyl-2-phosphate-mg as Vitamin C source for the Japanese flounder (*Paralichthysolivaceus*). *Fish Nutrition in Practice*. Biarritz, France. 1991.
- (7) Thompson IA, White A, Flectcher TC, Houlihan .F, Secombes CJ. The effect of stress on the immune response of Atlantic Salmon (*Salmo solar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*.1993;(114): 1-18.
- (8) Papp G.Z, Sarolia M, Jeney Z, Jeney G, Terova G. Effects of dietary vitamin C on tissue ascorbate and Collagen Status in sturgeon hybrids (*Acipenserruthenus* L.X*Acipenserbaeri* Brandt). *Journal of Applied Ichthyology*. 1999;15(4-5): 258-260.
- (9) Pramyothei P. The protective effects of *Phyllanthusemblica* Linn.extract on ethanol induced rat hepatic injury. *Journal of Ethnopharmacology*.2006;(107): 361 – 364.
- (10) Nakamura H. *Spirulina*, food for a hungry world: a pioneer’s story in aquaculture. University of the Trees Press. 1982.
- (11) Venkataraman LV, Becker EW. *Biotechnology & utilization of algae: The Indian experience*. Department of Science and Technology, New Delhi.1985.
- (12) Rojtinnakorn J, PromyaJ,KlairuangS. Thai herbs substitute antibiotics in culture of *Macrobrahium-rosenbergi*. The Office of Agricultural Research and Extension Maejo University Chiangmai and Office of National Research Council of Thailand.2004-2006.Thai.
- (13) AOAC. Official method of analysis of the association of official analytical chemists. Washington D.C: 1970; 1015p.
- (14) Teimouri M, Amirkolaie AK, Yeganeh S. The effects of *Spirulinaplantensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). *Aquaculture*.2013;(396–399):14–19.
- (15) Lu J, Toshio T, Hiroo S. Ingestion and assimilation of three species of freshwater algae by larval Nile tilapia *Oreochromisniloticus*. *Aquaculture*. 2004;238: 437–449.
- (16) Boonta T, Chitmanat C, Promya J. Effects of *Spirulinaplantensis*, *Cladophoras*p. and *Allium sativum*supplementary diets on growth performance, reproductive maturity, and phagocytic activity in common lowland frog (*Ranarugulosa*). *J. Fish.Tech. Res* 2012;6(1): 23-35.Thai.
- (17) Mengumphan K,Saengkrachang J. Production of Generation-2 Mekong giant catfish (*Pangasinodongigas*) cultured with *Spirulina* sp. Maejo International Journal of Science and Technology. 2008;2(3): 559-567.Thai.
- (18) Takeuchi T, Noto S,Yoshizaki G. Study on the development of closed ecological recirculating aquaculture system. *Aquaculture*.1997;(10): 1-4.

- (19) Promya J, Ungsethaphand T, Saeton K. Effect of raw *Spirulina* on growth performance, nutrition valued and carotenoid in red Tilapia (*Oreochromis sp.*). J. Fish. Tech. Res. 2007;1(1): 30-41. Thai.
- (20) Chitmanat C. Fish welfare. Naresuan University Journal. 2010;18(2): 106 – 111. Thai.
- (21) Lim LC, Dhert P, Chew WY, Dermaux V, Nelis H, Sorgeloos P. Enhancement of stress resistance of Guppy *Poecilia reticulata* through feeding with vitamin C supplement. Journal of World Aquaculture Society. 2002;33(1):32-40.
- (21) Ungsethaphand T, Whangchai N, Thongmee B. A study on supplementation of diets with vitamins and minerals on growth performance in bullfrog, *Ranacatesbieana*. J. Fish. Tech. Res. 2007;1(1): 1-10. Thai.
- (23) Vismara C, Vailati G, Bacchetta R. Reduction in paraquat embriotoxicity by ascorbic acid in *Xenopus laevis*. Aquatic Toxicology. 2000;(51): 293-303.
- (24) Uppananchai A, Somsueb P, Booin A. Using of seaweed and iodine (2 iodine sources) at 2 level in feed of tadpole leg (*Ranarugulosa*). Proceeding the seminar on fisheries 2004. Department of Fisheries. 2005: 691-696. Thai.
- (25) Uppananchai A, Khuncharoen W, Sripat S, Somsueb P. Use of Brewers Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for Increasing Feed Efficiency of Common Lowland Frog, *Ranarugulosa* Wiegmann, 1935. Department of Fisheries. Technical Paper. 2008;(12). Thai.