ผลของสาหร่ายไส้ไก่ในอาหารต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของปลานิลแดง

Effects of *Enteromorpha intestinalis* in Diets on Growth Performance, Feed Utilization and Immune Response of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus*)

อานูวี บากา

Anuvee Baka

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for

the Degree of Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสาหร่ายไส้ไก่ในอาหารต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของปลานิลแดง

ผู้เขียน นาย อานูวี บากา

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
....	...................................ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)
	....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)
....	....กรรมการ
(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)	(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)
	....กรรมการ
	(ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

....
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสาหร่ายไส้ไก่ในอาหารต่อการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหาร และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของปลานิลแดง

ผู้เขียน นาย อานูวี บากา

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาการใช้สาหร่ายไส้ไก่ป่นทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ 7 ระดับ คือ 0 (ชุดควบคุม), 15, 30, 45, 60, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงปลาน้ำหนักเริ่มต้น 14.78 ± 0.02 – 14.81 ± 0.01 กรัม ในตู้กระจกที่มีความจุน้ำ 180 ลิตร ใส่น้ำ 130 ลิตร ใช้ปลา 20 ตัว/ตู้ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง และ มีการเปลี่ยนน้ำทุกวัน อาหารทดลองมีปริมาณโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 3,500 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หลังเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น 15 - 60 เปอร์เซ็นต์ ช่วยเสริมการเจริญเติบโตดี โดยใช้ร่วมกับโปรตีนจากวัตถุดิบพืชชนิดอื่น แต่พบว่า ที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนดีที่สุด เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเสริมสาหร่ายไส้ไก่ (ชุดควบคุม) ส่วน hematocrit และเม็ดเลือดขาวสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ($p<0.05$) แต่เม็ดเลือดแดงไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนค่า NBT reduction มีค่าสูงสุดเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองอื่นๆ ($p<0.05$) แต่ lysozyme activity ไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม ($p>0.05$) นอกจากนี้ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่ โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น มีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($p>0.05$) แต่มีค่าต่ำที่สุดเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น 100 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการรอดตายของปลาหลังฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* 14 วัน โดยพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น มีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

Thesis title Effects of *Enteromorpha intestinalis* in Diets on Growth Performance, Feed Utilizationand Immune Response of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus*)

Author Mr. Anuvee Baka

Major Program Aquatic Science

Academic Year 2011

ABSTRACT

Enteromorpha intestinalis was examined for its suitability as fishmeal protein substitutes in feed of red tilapia. Algal meal was included at 0 (control), 15, 30, 45, 60, 75 and 100 %. Fingerling tilapias with an average initial weight of 14.78 ± 0.02 – 14.81 ± 0.01 g were released into glass aquaria of 180 liters capacity, containing 130 liters of water with a stocking density of 20 fish per tank. Trial feeds were given twice daily for an 8 week period. Trial feed were formulated to contain 30% crude protein, 7% crude lipid, and 3,500 kcal/kg feed. The results indicated that the fish which received diets containing different algal meal between 15 and 60% showed good growth that there was insignificant difference among treatments and control ($p>0.05$) while fish fed on diet containing 15% algal meal provided the best growth and feed efficacy ($p<0.05$) compared to the control. In addition, hematocrit and white blood cell of fish fed on diet containing algal meal were higher than that of control ($p<0.05$) but red blood cell of fish fed on diet containing algal meal no difference among treatments and control ($p>0.05$) whereas NBT reduction of fish fed on diet containing 30% algal meal gave higher results compared to those of other treatments ($p<0.05$). Interestingly, the results from this study showed positive effects of algal meal as it promoted immune system in fish that antibody titer of fish fed on diet containing algal meal levels gave no difference compared to control ($p>0.05$). However, fish received the highest dose of algal meal (100%) provided the worst antibody titer value compared to those of other treatments ($p<0.05$). Survival of red tilapia fed on algal meal levels after injected with *Streptococcus agalactiae* was higher than that of control.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนในการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้ให้ความเมตตา ให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าซึ่งถือว่าสำคัญที่สุดในชีวิตของข้าพเจ้า จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนอบรม สั่งสอน การใช้ชีวิตในสังคม และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ตลอดจนแนวทางปฏิบัติในการทำวิจัย รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในส่วนของสถานที่ ในการทำวิจัย จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันติกิตติ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ แก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE) ที่สนับสนุนทุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.นเรศ ซ่วนยุก คุณจิรวัฒน์ ทัดแก้ว และคุณนัทท์ นันทพงศ์ ที่คอยให้คำแนะนำและวิธีการวิเคราะห์ต่างๆจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณกิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์ คุณบุญกอบ วิริยพงศ์สุธี คุณเชาว์ สุวรรณรัตน์ คุณสุนันท์ ช่วยป้อง และคุณจบ ห่อทอง สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดการทำวิจัย รวมทั้งพี่ปริญญาเอก เพื่อนนักศึกษาปริญญาโททุกท่าน และรวมไปถึงน้องๆนักศึกษาปริญญาตรี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ไม่สามารถเอ่ยนามได้ทั้งหมด

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งขอขอบคุณน้อง ๆ ของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจในยามทุกข์ ยามสุข ที่อยู่เคียงข้างข้าพเจ้ามาโดยตลอด และสนับสนุนทุนทรัพย์ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษาในครั้งนี้

อานูวี บากา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญญาลักษณ์ และคำย่อ	(11)
บทที่1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.2.1 สาหร่ายไส้ไก่	4
1.2.1.1 ชีววิทยาของสาหร่ายไส้ไก่	4
1.2.1.2 องค์ประกอบทางโภชนาการที่พบในสาหร่ายไส้ไก่	5
1.2.1.3 การใช้ประโยชน์จากสาหร่าย	7
1.2.1.3.1 อาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์	7
1.2.1.3.2 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	8
1.3 ปลานิล	
1.3.1 อนุกรมวิธานของปลานิล	11
1.3.2 ปลานิลแดง	11
1.3.3 ลักษณะของปลานิลแดง	12
1.3.4 สายพันธุ์ปลานิล	13
1.3.5 วิธีการผลิตปลานิลเพศผู้	15
1.3.6 ความต้องการสารอาหารของปลานิล	16
1.4 โรคที่พบในปลานิล	19
1.5 ผลผลิตและความต้องการของตลาดปลานิลใน และต่างประเทศ	20
1.6 ระบบภูมิคุ้มกันของปลา	21
1.6.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง	21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.6.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง 22
1.7 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ 22
1.8 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 24
บทที่2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 25
2.1 วัสดุ 25
2.1.1 การเตรียมปลาทดลอง 25
2.1.2 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนทดลอง 25
2.1.3 สารเคมี 25
2.2 อุปกรณ์ 26
2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง 26
2.2.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารทดลอง 26
2.2.3 อุปกรณ์การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองกับตัวปลา 26
2.2.4 อุปกรณ์การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด 27
2.2.5 การวิเคราะห์ lysozyme activity 27
2.2.6 การวิเคราะห์ NBT reduction 28
2.3 ระเบียบวิธีการวิจัย 29
2.3.1 การเตรียมการทดลอง 29
2.3.1.1 การวางแผนการทดลอง 29
2.3.1.2 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง 29
2.3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง 29
2.3.1.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง 30
2.3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 34
2.3.2.1 แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่ได้เลี้ยงในระบบธรรมชาติ 34
2.3.2.2 เตรียมวัคซีนจากเชื้อสเตรฟโตคอกคัส 34
2.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล 35
2.4.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกของปลา 35
2.4.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา 35
2.4.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา 37

2.4.4 การศึกษาภูมิคุ้มกันของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ 37
2.4.5 การศึกษาองค์ประกอบของเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศหลังได้รับอาหารทดลอง 38
2.5 ศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ 38
2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล 39
บทที่3 ผลการทดลอง 40
3.1 ลักษณะภายนอกและพฤติกรรมการกินอาหารของปลาที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร 40
3.1.1 การเจริญเติบโต 40
3.1.1.1 น้ำหนักปลาเฉลี่ยต่อตัว 40
3.1.1.2 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 42
3.1.1.3 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ของปลาที่ได้รับอาหารทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 44
3.2 ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทดลองหลังได้รับอาหารทดลอง 46
3.3 องค์ประกอบเลือด 48
3.4 ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ 50
3.5 Lysozyme activity และ NBT reduction ของปลานิลแดง 52
3.6 ความต้านทานเชื้อในปลานิล 54
บทที่4 วิจารณ์ผลการทดลอง 56
4.1 การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมี และอัตราการรอดตาย 56
4.2 ระบบภูมิคุ้มกันของปลา 59
บทที่5 สรุปและข้อเสนอแนะ 62
เอกสารอ้างอิง 62
ภาคผนวก 79
ประวัติผู้เขียน 89

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปลานิลแดงกับปลานิลธรรมดา 13
2. ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารทดลอง 30
3. สูตรอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศ ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 31
4. องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง 7 สูตร ที่แตกต่างกัน 7 ระดับ 32
5. น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 40
6. น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย ของปลาทดลองที่มีการทดแทนโปรตีนปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ ที่แตกต่างกัน 7 ระดับ 42
7. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ 44
8. ส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวปลาทั้งตัวหลังได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 46
9. องค์ประกอบของเลือดปลาที่ได้รับอาหารทดลอง 48
10. ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ที่รายงานในรูปของ reciprocal titer ของปลานิลแดง ที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นใน ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 50
11. Lysozyme activity และ NBT reduction ของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารทดลองเป็น เวลา 8 สัปดาห์ 52
12. อัตราการรอดตายของปลานิลหลังฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 14 วัน 54

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่	หน้า
1. ปลานิลมีตาขุ่นขาวที่เกิดจากการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* หลังฉีดเชื้อ 14 วัน	53
2. ลักษณะการเรียงตัวของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ย้อมแกรม ที่พบในปลานิลหลังมีการฉีดเชื้อ14 วัน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 X	54

สัญลักษณ์ และคำย่อ

%	percent
ACD	acid citrate dextrose solution
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
KOH	potassium hydroxide
LD_{50}	lethal dose 50 %
NBT	nitroblue tetrazolium dye reduction test
PBS	phosphate buffer solution
RBC	red blood cell
RPS	relative percent survival
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
WBC	white blood cell

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนามากยิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับอดีตที่ผ่านมา ซึ่งอาจเกิดจากหลากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น การขยายตัวของเมืองเพิ่มขึ้น รวมทั้งความต้องการของผู้บริโภคที่มีแนวโน้มต้องการโปรตีนจากสัตว์น้ำเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้ต้องมีการเลี้ยงแบบพัฒนามากขึ้น เพื่อเพิ่มผลผลิตสนองความต้องการของผู้บริโภค ฉะนั้นอาหารจึงเป็นต้นทุนหลักในการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนหลักในอาหาร จึงทำให้ต้นทุนค่าอาหารเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้นทุนค่าอาหาร เพราะโปรตีนถือเป็นสารอาหารหลักที่มีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารอาหารอื่น เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น (Lovell, 2002) จึงจำเป็นต้องหาแหล่งโปรตีนที่เป็นทางเลือกใหม่ (Alexis, 1997) ซึ่งทำให้ปัจจุบันได้มีการศึกษาวัตถุดิบจากพืชที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นมากยิ่งขึ้น (Kaushik *et al.*, 2004) ซึ่งหนึ่งในวัตถุดิบพืชที่ได้มีการศึกษาเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนในอาหารปลาคือ สาหร่าย (Buschmann *et al.*, 2001) ซึ่งมนุษย์รู้จักใช้ประโยชน์จากสาหร่ายมาเป็นเวลานานแล้ว ไม่ว่าจะเป็นเพื่อการบริโภค และเป็นอาหารของสัตว์ ทำปุ๋ยคอกปุ๋ยหมัก รวมไปถึงใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น (สรวิศ, 2543; Graham and Wilcox, 2000) จากรายงานของ Zemke-White และ Ohno (1999) ระบุว่าสาหร่ายทั่วโลกมีประมาณ 221 สายพันธุ์ซึ่งมากกว่า 145 สายพันธุ์ หรือกว่า 66 เปอร์เซ็นต์ ของสาหร่ายทั้งหมดถูกนำมาใช้เป็นอาหาร โดยสาหร่ายที่นำมาบริโภคส่วนใหญ่มีอยู่ 3ชนิด คือ สาหร่ายสีเขียวประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายสีน้ำตาลประมาณ 66.5 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายสีแดงประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีการบริโภคมากที่สุดในทวีปเอเชียได้แก่ ประเทศ ญี่ปุ่น จีน และเกาหลี เป็นต้น (Dawes, 1998) โดยในปี ค.ศ. 2007 มีผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลอยู่ที่ $14.5x10^6$ ตัน ประกอบด้วยสาหร่ายสีน้ำตาล สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีแดง รวมถึงพืชน้ำต่างๆ (FAO, 2009) ปัจจุบันได้มีแนวคิดในการนำสาหร่ายทะเลมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์น้ำ เพราะสาหร่ายทะเลหลายชนิดแม้จะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบค่อนข้างต่ำ แต่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณมาก เป็นแหล่งของวิตามินได้แก่ วิตามิน A, D, E, และ B_1, B_2, B_5, B_{12}, niacin และ folic acid ส่วนแร่ธาตุได้แก่ P, Ca, Na, และK (Nisizawa, 1988; Davies *et al.*, 1997) Hela และคณะ (2011) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี หน้าที่ และสรรพคุณของสาหร่ายผักกาด (*Ulva*

lactuca) ที่เก็บรวบรวมในประเทศ ตูนีเซีย พบว่า มีเยื่อใยประมาณ 54 เปอร์เซ็นต์ เป็น เฮมิเซลลูโลส 20.6 เปอร์เซ็นต์ กับ เซลลูโลส 9 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุ 19.6 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 8.5 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 7.9 เปอร์เซ็นต์ โดยพบกรดอะมิโนที่จำเป็นถึง 42 เปอร์เซ็นต์ จากกรดอะมิโนทั้งหมด ส่วนกรดไขมัน ยังพบกรด ปาล์มิติก (palmitic acid) เป็นชนิดเด่น มากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และกรดโอลิอิก (oleic acid) 16 เปอร์เซ็นต์ อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีแป้งในปริมาณมากโดยเป็นแป้งที่สัตว์น้ำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี (Zemke-White and Clements, 1999) จึงมีการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายทะเลในด้านการใช้เป็นสารประสาน (สารสกัดในรูปของ alginates, carageenans และ agar) สารดึงดูดการกินอาหาร สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และใช้เป็นแหล่งของแร่ธาตุที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณน้อย (trace mineral) (Hertrampf and Piedad-Pascual, 2000; McHugh, 2003) Veronica และ Nelson (1997) ใช้สาหร่ายสองชนิดคือ สาหร่ายผักกาด และสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria cornea*) เป็นตัวประสานในอาหารกุ้งขาวระยะวัยรุ่น พบว่า อาหารที่เสริมสาหร่ายผมนาง 10 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทำให้เม็ดอาหารคงทน และคุณภาพของน้ำดีสุด เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชม. อย่างไรก็ตามการใช้สาหร่ายทะเลเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์น้ำยังเป็นแนวความคิดใหม่ทำให้ขาดข้อมูลในด้านความต้องการทางการตลาดและคุณประโยชน์ซึ่งต้องการการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจน

มีสาหร่ายทะเลหลายชนิดที่มีการศึกษาเพื่อเป็นทางเลือกในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์น้ำเช่น *Porphyra purpurea* ในปลากระบอก (Davies *et al*., 1997) *Undaria pinnatifida* และ *Ascophyllum nodosum* ในปลาเรดซีบรีม (Yone *et al*., 1986) *Eucheuma cottonii* และ *Gracilaria lichenoides* ในปลาสลิดหิน (Tacon *et al*., 1990) *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* และ *Gracilaria cornea* ในปลากะพงยุโรป (Valente *et al*., 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ในประเทศตูนีเซียได้มีการใช้สาหร่าย *Ulva* sp., *Enteromorpha* sp. และ *Chaetomorpha* sp. เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงปลากระบอก ซึ่งเป็นเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายชนิดนี้เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น (Pillai, 1975) สาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha* spp.) หรือ "anori" เป็นสาหร่ายทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศเช่น ญี่ปุ่น จีน สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ชิลี เม็กซิโก (Nisizawa *et al*., 1987) รวมทั้งประเทศไทย (ประยูร และคณะ, 2549) โดยพบสาหร่ายชนิดนี้มากในภาคใต้บริเวณอ่าวปัตตานี ซึ่งส่วนใหญ่นำสาหร่ายชนิดนี้มาเป็นอาหารสัตว์ ส่วนน้อยมากที่นำมาบริโภคเป็นอาหารของมนุษย์ ส่วนใหญ่จะรู้จักกันเฉพาะกลุ่มคนในท้องถิ่นเท่านั้น สาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha intestinalis*) จะอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร เช่น โปรตีน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และกรดไขมัน (Aguilera และคณะ, 2005) รวมทั้งยังมีกลิ่น รสดี และสีสวย มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์มากกว่าสาหร่ายชนิดอื่น (Murata และ Nakazoe, 2001) Morales และคณะ (2005) ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไส้ไก่ เพื่อเป็นอาหารสำหรับ

มนุษย์ พบว่า มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า อยู่ในช่วง 9-14, 2-3.6 และ 32-36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนในสาหร่ายชนิดนี้อยู่ในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ มีกรดไขมันที่จำเป็น (EPA และ DHA) ในปริมาณสูง แต่มีสารต้านโภชนาการได้แก่ alkaloids, cyanogenic glucids, saponins, และ tannic acid ในปริมาณต่ำ เป็นที่น่าสังเกตคือ สาหร่ายชนิดนี้มีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ เช่น P, Ca, Na, K, Mg, และZn ในปริมาณสูง โดยเฉพาะ P และCa มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับปลาป่น นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงสารสกัดในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha intestinalis*) และพบว่า มีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญเติบโต และต้านทานเนื้องอก (anti-tumor) ได้ดี (Jiao *et al.*, 2009) สำหรับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย ในปัจจุบันจะเน้นไปที่การใช้เป็นอาหารธรรมชาติในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เรียกระบบการเลี้ยงแบบนี้ว่าการเลี้ยงกุ้งระบบชีวภาพ หรือการเลี้ยงกุ้งอินทรีย์ ซึ่งพบว่า ช่วยลดต้นทุนค่าอาหาร ลดการใช้ยาและสารเคมี และทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่ดี (ประยูร และคณะ, 2549) โดยสาหร่ายไส้ไก่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วได้ในช่วง 60 วันแรกของการเลี้ยงในบ่อดิน (ชนัดดา และคณะ, 2551)

นอกจากใช้สาหร่ายเป็นแหล่งวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีนทดแทนในอาหารปลาแล้ว ยังใช้เป็นแหล่งของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอาหารสัตว์น้ำได้ด้วย เห็นได้จากการศึกษาของ Sakevich (1985) ที่รายงานว่า พอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายไส้ไก่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่หลายอย่าง เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งแบคทีเรีย และสารต้านการอักเสบ ส่วน Jiao และคณะ (2010) ได้ศึกษาสารสกัดจากโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายไส้ไก่ ซึ่งพบว่า สามารถต้านเนื้องอก และช่วยในกิจกรรมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น Kiyaka และคณะ (1999) ศึกษาความสามารถของสาหร่ายไส้ไก่ที่มีผลในการต้านเนื้องอกที่ผิวของหนู พบว่า สารฟีโอไฟติน เอ (pheophytin-a) และคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่สกัดจากสาหร่ายไส้ไก่จะมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านเนื้องอกในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายไส้ไก่เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางชีวภาพที่ช่วยป้องกัน และยับยั้งการฝังตัวของแบคทีเรีย ไวรัส เนื้องอก และต้านการอักเสบ (inflammation) (Hagashi *et al.*, 2000)

สำหรับแนวคิดในการใช้สาหร่ายไส้ไก่ป่นเป็นแหล่งของวัตถุดิบผสมในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศครั้งนี้ เนื่องจากมีรายงานว่า โปรตีนที่อยู่ในสาหร่ายชนิดนี้ สัตว์น้ำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (Morales *et al.*, 2005) ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นการทดแทนโปรตีนในปลาป่นด้วยโปรตีนจากสาหร่ายไส้ไก่ในระดับต่างๆ เพื่อศึกษาผลของการแทนที่ต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหาร รวมทั้งศึกษาผลของสาหร่ายชนิดนี้ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลแดงแปลงเพศ

1.2 ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 สาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha intestinalis*)

อนุกรมวิธานของสาหร่ายไส้ไก่ ตามรายงานของ Fish and Fish (1989) ดังนี้

Phylum Chlorophyta

Class Ulvophyceae

Order Ulvales

Family Ulvaceae

Genus *Enteromorpha intestinalis*

1.2.1.1 ชีววิทยาของสาหร่ายไส้ไก่

สาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha* sp.) เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียวชนิดเด่นในแถบชายฝั่งทะเล และลุ่มน้ำ ที่มีแร่ธาตุไนโตรเจนปริมาณสูง (Farinha *et al.,* 1996) และสามารถที่จะปรับตัวจากน้ำจืดไปยังน้ำเค็มได้เป็นอย่างดี จะมีรูปร่างลักษณะคล้ายท่อ กลวง และ ประเภทใบคล้ายใบเฟิร์นยืดยาวออกไป อาจจะมีกิ่งก้านสาขา การแตกออกเป็นกิ่งก้านสาขาจะเกิดใกล้กับส่วนปลายของกิ่งก้าน และมีลักษณะที่แบนเรียบหรือพองตัว (Fish and Fish, 1989) บางครั้งอาจมีสีเขียวใส หรือสีขาวซีด บางชนิดมีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ลักษณะจำเพาะของสาหร่ายชนิดนี้จะยึดเกาะกับพื้นผิวที่มีก้อนหินโดยรอบ บางครั้งอาจพบลอยอยู่บริเวณผิวน้ำรวมกับสาหร่ายชนิดอื่นๆและบางครั้งจะมีการเคลื่อนที่ระหว่างผิวน้ำกับใต้น้ำ (Farinha *et al.,* 1996) ยังพบขึ้นบนพื้นโคลนหรือบนก้อนหินบริเวณแหล่งน้ำกร่อย ปากแม่น้ำตั้งแต่เขตน้ำขึ้นน้ำลง ซึ่งสามารถทนต่อการผึ่งแห้งขณะน้ำลงได้ ไปจนถึงเขตต่ำกว่าระดับน้ำทะเลลงต่ำสุด นอกจากนี้ยังพบในบ่อเลี้ยงปลา สาหร่ายชนิดนี้ชอบขึ้นในที่ที่มีธาตุอาหารสูง สามารถเจริญอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มต่ำ และทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ในช่วงกว้าง (Fish and Fish, 1989) Fu และคณะ (2008) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และสืบพันธุ์ ของสาหร่ายไส้ไก่ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และสืบพันธุ์ อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส โดย gamete จะรวมตัวกันเป็น flagellate ภายใน 5 วัน จากนั้นจะมีการพัฒนาและแบ่งเซลล์ต่อไป โดยสาหร่ายไส้ไก่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วได้ในช่วง 60 วันแรกของการเลี้ยงในบ่อดิน (ชนัดดา และคณะ, 2551) Wang และคณะ (2007) พบว่า สาหร่ายไส้ไก่จะมีการเจริญเติบโตปกติภายใต้อุณหภูมิ 10 – 30 องศาเซลเซียส ส่วน Wu และ Xu (2000) พบว่า ความเค็ม

ของน้ำจะอยู่ในช่วง 20.2 – 26.9 พีพีที (ppt) ส่วน pH จะอยู่ในช่วง 7 – 9 ตามลำดับ ส่วนสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายประกอบด้วย ไนเตรท ฟอสเฟส และซิลิเกต นอกจากนี้ยังมีส่วนของแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น B_1, B2 และB7 ส่วนความเข้มของแสงขึ้นอยู่กับความลึก และความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยง (Reddy *et al*., 2005) สำหรับความยาวของสาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha* sp.) โดยทั่วไปจะมีความยาวมากกว่า 70 มิลลิเมตร ขึ้นไป (Fish and Fish, 1989)

1.2.1.2 องค์ประกอบทางโภชนาการที่พบในสาหร่ายไส้ไก่

สาหร่ายป่นเป็นวัตถุดิบพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการเลือกใช้ในวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากมีสารโภชนาการที่ดี ต้นทุนต่ำ ความสามารถของการนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี (Hashim and Maat-Saat, 1992) จากการศึกษาของ Mamatha และคณะ (2006) ทดลองการใช้สาหร่ายไส้ไก่ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) โดยศึกษาความสามารถของการนำไปใช้แร่ธาตุเหล็กที่อยู่ในสาหร่ายไส้ไก่โดยได้จำลอง pH ที่ 7.5 เสมือน pH ในลำไส้ และมีการจำลอง pH ที่ 1.35 เสมือน pH ในกระเพาะอาหาร พบว่า ความสามารถของการนำไปใช้แร่ธาตุเหล็กที่อยู่ในสาหร่ายไส้ไก่อยู่ในช่วง 55-56 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 7.5 แต่เมื่อ pH เปลี่ยนมาเป็น 1.35 ความสามารถของการนำไปใช้แร่ธาตุเหล็กเพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 27.1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถของการดูดซึมแร่ธาตุเหล็กจะดูดซึมได้ดีในสภาพที่เป็นกรด และในสภาพที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กตอนบน เหล็กเฟอริค (ferric iron) จะถูกเปลี่ยนเป็นเหล็กเฟอรัส (ferrous iron) ซึ่งเป็นรูปที่ละลายได้ง่าย (ศูนย์สุขภาพ และโภชนาการไทย, 2554) นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในส่วนของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า และเยื่อใย ในสาหร่ายไส้ไก่ป่นพบว่า มีโปรตีน 21.0 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.3 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 48.2 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 18.6 เปอร์เซ็นต์ และ เยื่อใย 1.3 เปอร์เซ็นต์ Morales และคณะ (2005) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายไส้ไก่ที่ใช้เป็นแหล่งของอาหารมนุษย์ พบว่า มีโปรตีน ไขมัน และเถ้า อยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงคือ ประมาณ 9-14, 2-3.6, และ 32-36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังมีโอเมก้า 3 อยู่ 10.4 กรัม/100 กรัม ของกรดไขมันทั้งหมด และมีโอเมก้า 6 อยู่ 10.9 กรัม/100 กรัม ซึ่งมนุษย์สามารถที่จะนำไปบริโภคได้ เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารที่ดี Karthikai และคณะ (2009) ศึกษาองค์ประกอบของแร่ธาตุในสาหร่ายทะเล 8 ชนิด รวมทั้งสาหร่ายไส้ไก่พบว่า แร่ธาตุที่พบในสาหร่ายไส้ไก่ประกอบด้วย Co, Fe, Mg, Mn, Ni, Cu, Na, Fn, K และCa ซึ่งพบว่า มีปริมาณที่แตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด ซึ่งจากข้อมูลตรงนี้สามารถที่จะบ่งบอกได้ว่าในสาหร่ายไส้ไก่มีแร่ธาตุที่สำคัญต่อสัตว์น้ำหลายชนิดด้วยกันไม่ว่าจะเป็นแร่ธาตุหลัก และแร่ธาตุรอง เช่น Fn, K

และCa ซึ่งสัตว์น้ำสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์จากแร่ธาตุที่อยู่ในสาหร่ายได้ ส่วนโปรตีนที่อยู่ในสาหร่ายจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และแปบติเดส (peptidase) (NRC, 1994) นอกจากนี้ องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายไส้ไก่ยังขึ้นอยู่กับขนาด แหล่งที่อยู่อาศัย และสภาพแวดล้อมอีกด้วย (Ito and Hori, 1989) คมคาย และคณะ (2544) รายงานว่า สาหร่ายสีแดงคือ สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) และสาหร่ายสีเขียวคือ สาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha linsa*) มีระดับโปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า อยู่ในช่วง 7.32-30.08, 0.24-1.40, 5.35-27.57, 13.39-36.65 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Ca, P, และFe อยู่ในช่วง 492-1,561, 46-390 และ10-138 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ โดยพบว่า สาหร่ายสีเขียวคือ สาหร่ายไส้ไก่ มีปริมาณโปรตีน 30.08 เปอร์เซ็นต์ ไขมันรวม 1.4 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมสูงสุดเท่ากับ 1,561 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ Amany (2000) ศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาการของสาหร่ายไส้ไก่ที่มาจากชายฝั่ง Gulf of Gdan'sk ทางตอนเหนือของทะเลบาลติก ในประเทศอียิปต์ ในระยะเวลา 7 เดือน กับ 7 สถานที่ ตั้งแต่ เมษายน ถึง ตุลาคม 1993 โดยได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายไส้ไก่ เช่น ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต โดยพบว่า ระดับของโปรตีนในสาหร่ายไส้ไก่ที่ได้บันทึกไว้ตั้งแต่เริ่มต้นถึงสิ้นสุดจะสูงขึ้น ขึ้นอยู่กับฤดูกาล ส่วนระดับของคาร์โบไฮเดรตจะสูงกว่าเมื่อเทียบกับไขมัน และโปรตีน ส่วนฤดูกาลที่เปลี่ยนไปประกอบกับสถานที่ที่แตกต่างกันทำให้ระดับของคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายไส้ไก่เปลี่ยนไปด้วย ซึ่งฤดูใบไม้ผลิ และฤดูใบไม้ร่วง จะทำให้ระดับของคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายมีค่าต่ำสุด ส่วนฤดูร้อนจะมีค่าของคาร์โบไฮเดรตในสาหร่ายสูงที่สุด Mohammad (1997) ศึกษากรดอะมิโนกับกรดไขมันในสาหร่ายทะเล 4 ชนิด ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในอาหารปลา พบว่า องค์ประกอบทางโภชนาการ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน และกรดไขมันในสาหร่ายไส้ไก่โดยมีโปรตีน 13.6 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 4.6 เปอร์เซ็นต์ กรดอะมิโนจำพวกเมทไธโอนีน (methionine) 13.8 เปอร์เซ็นต์ กลูตาร์มิก 6.2 (glutamic acid) 6.2 เปอร์เซ็นต์ และยังพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มที่มีลักษณะเด่นอีกด้วย 68.1 เปอร์เซ็นต์ Manimala และ Rengasamy (1993) พบว่า สาหร่ายไส้ไก่ยังใช้เป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพ (bioactive) ที่ช่วยในการต้านและยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่เป็นสาเหตุทำให้ต้นข้าวเหี่ยวแห้ง

โดยทั่วไปผนังเซลล์ของสาหร่ายไส้ไก่ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ มัดเส้นใยที่เป็นส่วนประกอบของเซลลูโลส ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ และ ส่วนที่เป็น amorphous (ส่วนของเซลล์ที่มีลักษณะไม่แน่นอน) (Paulsen *et al.,* 1998) พอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายโดยทั่วไปมีปริมาณร้อยละ 38-50 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้มีประมาณร้อยละ 8-29 ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ คือ เซลลูโลส และกลุ่มที่ละลายได้ในสารละลายด่าง (Lahaye and Rubic 2007) ยังมีรายงานว่า

พอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่หลายอย่าง เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งแบคทีเรีย และสารต้านการอักเสบ เป็นต้น (Sakevich, 1985) Jiao และคณะ (2010) ได้ศึกษาสารสกัดจากโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายไส้ไก่ซึ่งพบว่าสามารถต้านเนื้องอกและช่วยในกิจกรรมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเพิ่มสูงขึ้น Kiyoka และคณะ (1999) ศึกษาความสามารถของสาหร่ายไส้ไก่ที่มีผลในการต้านเนื้องอกที่ผิวของหนู พบว่า สาร ฟีโอไฟติน เอ (pheophytin-a) และ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่สกัดจากสาหร่ายไส้ไก่จะมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านเนื้องอกในห้องปฏิบัติการ

1.2.1.3 การใช้ประโยชน์จากสาหร่าย

1.2.1.3.1 อาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์

มนุษย์ได้ใช้สาหร่ายเป็นอาหารมาเป็นเวลานานแล้ว โดยใช้เป็นอาหารของมนุษย์และเป็นอาหารของสัตว์ (ทำให้แห้งเหมือนหญ้าแห้ง) ทำปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก Ventura และคณะ (1994) ได้ใช้สาหร่ายผักกาดทะเล ผสมในอาหารไก่ในระดับ 0, 100, 200, และ300 กรัม/กิโลกรัมอาหาร พบว่าการกินอาหาร และการเจริญเติบโตของไก่ลดลง เมื่อเทียบกับ ชุดที่ไม่มีการเสริมสาหร่าย (0, เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้สาหร่ายเป็นอาหารที่นิยมบริโภคในเอเชียตะวันออก เนื่องจากอุดมด้วยวิตามินA, B_1 มีคุณสมบัติป้องกันแบคทีเรีย และความนิยมบริโภคได้แพร่กระจายออกสู่ชุมชนชาวเอเชียในประเทศต่างๆ สาหร่ายที่นิยมใช้เป็นอาหารได้แก่ สายใบ (จีฉ่าย, Nori: *Porphyra* spp.) และ anori (*Monostroma* spp., *Enteromorpha* spp.) รวมทั้ง *Caulerpa* spp. (สรวิศ, 2543) Kim และคณะ (2006) ได้มีการศึกษาการใช้สาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha liza*) ในการประกอบอาหารในวัด ในประเทศเกาหลี ซึ่งพบว่า สามารถที่จะนำในส่วนของทัลลัสสาหร่ายมาประกอบอาหารได้ หลายชนิด เช่น ทำซุป กิมชิ และสลัดผักได้ Fleurence (1999) รายงานว่า โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่พบในสาหร่ายผักกาด เฉลี่ยระหว่าง 10 – 26 % ของระดับโปรตีนที่พบในสาหร่ายไปจนถึง 47 % ของระดับโปรตีนที่พบ ในสาหร่ายสีแดง สามารถที่จะพัฒนาศักยภาพสำหรับเป็นอาหารของมนุษย์ และสัตว์ได้ El-Deek และ Mervat (2009) ศึกษาสารอาหารกับการประเมินทางชีววิทยาของสาหร่ายทะเล *Polysiphonia* spp ที่ใช้เป็นวัตถุดิบและตัวประสานในอาหารเป็ด พบว่าการใช้สาหร่ายทะเลมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ที่ใช้เป็นตัวประสานในอาหารไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเป็ด และคุณภาพของซาก นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของเม็ดอาหารให้มีความคงทน เม็ดไม่แตกง่าย ได้ดียิ่งขึ้นด้วย

1.2.1.3.2 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ปัจจุบันเกษตรกรได้มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำร่วมกับสาหร่ายไส้ไก่มากขึ้นเนื่องจากช่วยลดต้นทุนในส่วนของอาหาร จากการรายงานของ ประยูร และคณะ (2549) รายงานว่า ในบ่อที่มีสาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha intestinalis*) เจริญเติบโตประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นก้นบ่อ เมื่อปล่อยลูกกุ้งกุลาดำลงไปเลี้ยง กุ้งกุลาดำจะมีการเจริญเติบโตโดยไม่ต้องให้อาหารจนกว่าสาหร่ายไส้ไก่ในบ่อจะหมดไป ซึ่งใช้เวลาประมาณ 50 วัน จึงเริ่มให้อาหารและสามารถผลิตลูกกุ้งกุลาดำให้มีขนาดใหญ่และมีต้นทุนต่ำ ซึ่งจะเห็นว่าการเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ร่วมกับสัตว์น้ำที่เลี้ยงยังพบอยู่ในเมืองไทย เช่นฟาร์มสุรีรัตน์ เป็นต้น Yildirim และคณะ (2009) ศึกษาผลของสาหร่ายทะเล 2 ชนิด คือ สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายไส้ไก่ ต่อความน่ากินของอาหาร การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางโภชนาการในปลาเรนโบเทราท์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่ายไส้ไก่ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำสุด เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม ส่วนโปรตีนในตัวปลา ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การกินอาหารต่อวัน และการได้รับอาหารทั้งหมดตลอดการทดลอง ต่ำสุด เมื่อปลาได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่ายผักกาด และ สาหร่ายไส้ไก่ เทียบกับสูตรควบคุม แต่โปรตีนในตัวปลาสุดท้าย ไขมัน และเถ้า ในตัวปลาสูงกว่าปลาก่อนทดลองทุกสูตร ซึ่งจากการทดลองนี้เขายังสรุปว่าการเสริมสาหร่ายผักกาด และ สาหร่ายไส้ไก่ ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำสุดนั้นเป็นเพราะว่าปลาเรนโบเทราท์จะใช้อาหารที่มาจากวัตถุดิบพืชได้ไม่ดีเท่ากับวัตถุดิบจากสัตว์ ประกอบกับการสร้างสูตรอาหารที่ไม่มีความสมดุลของสารอาหารอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่ง ซึ่งปลาเรนโบเทราท์เป็นปลากินเนื้อไม่ใช่ปลากินพืช ส่วนYousif และคณะ (2004) ศึกษาการตอบสนองการเจริญเติบโต และองค์ประกอบของซากปลา ในปลาสลิดหินจุดขาว (*Siganus canaliculatus*) ที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่ายไส้ไก่ป่น(แห้ง) ซึ่งระดับที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อยู่ในช่วง 0, 10, 20, และ30 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร เทียบกับสาหร่ายไส้ไก่สด พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่ไม่มีการทดแทนของสาหร่ายป่น กับสาหร่ายสดทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด องค์ประกอบของโปรตีนในซากปลาไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างชุดการทดลอง ส่วนไขมันในตัวปลามีค่าสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการเลี้ยงด้วยสาหร่ายสด Zemke- White และ Clements (1999) ทดลองโดยการใช้สาหร่าย 9 ชนิด รวมทั้งสาหร่ายไส้ไก่ เพื่อศึกษาปัจจัยของแป้งที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่ายไส้ไก่โดยปลากินพืช พบว่าแป้งที่พบในสาหร่ายไส้ไก่ปลาสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี แต่ทั้งนี้ความสามารถของการย่อย

แป้งในอาหารขึ้นอยู่กับโครงสร้างของแป้งในอาหาร และสรีรวิทยาของปลา จากการศึกษาของ วิวรรธน์ และอรุณ (2539) ทดลองเลี้ยงสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) ร่วมกับปลานิลสีแดง *Oreochromis niloticus* (Linn) พบว่า ผลผลิตปลานิลสีแดงที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่ายผมนางสูงกว่าบ่อที่เลี้ยงสาหร่ายเพียงอย่างเดียวหรือเลี้ยงปลานิลสีแดงเพียงอย่างเดียว วลีรัตน์ และพุทธ (2547) ทดลองใช้สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera* J. Agardh) เพื่อบำบัดปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าปริมาณสารประกอบ แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทในมวลน้ำลดลง นอกจากนี้สาหร่ายนอกจากจะใช้เป็นอาหารโดยตรงสำหรับสัตว์น้ำที่เลี้ยงแล้ว ยังช่วยในการกำจัดของเสียที่เกิดจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำอีกด้วย วิวรรธน์ (2538) ทดลองเลี้ยงสาหร่ายผมนางร่วมกับปลานิลสีแดง ในบ่อซีเมนต์ ขนาด 2.5 ตารางเมตร พบว่า ปลานิลสีแดงที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่ายผมนางทั้ง 2 อัตราความหนาแน่น มีอัตราการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน และอัตราการรอดตาย เมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่าในบ่อควบคุม Diler และคณะ (2007) ได้ใช้สาหร่ายผักกาดทะเล ป่นเสริมในอาหารปลาไนในระดับที่แตกต่างกันคือ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นแหล่งของโปรตีน พบว่า การเสริมสาหร่ายป่นในอาหารปลาไนที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเทียบกับการทดลองอื่นๆ Guroy และคณะ (2007) ใช้สาหร่ายป่น 2 ชนิด (*Ulva* meal) ในอาหารปลานิล เพื่อศึกษาผลการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ความน่ากินของอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีของปลา พบว่า ระดับที่เหมาะสมที่ทำให้การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ความน่ากินของอาหาร ดีที่สุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์ การเสริมสาหร่ายป่นในอาหารไม่มีผลในทางลบหากมีการเสริมในอาหารอยู่ในช่วง 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ (Guroy *et al*., 2007; Azaza *et al.,* 2008) Ergun และคณะ (2008) ได้ใช้สาหร่ายผักกาดป่นในอาหารทดลองปลานิล 0, 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไขมัน 2 ระดับ 10, 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการเสริมสาหร่ายป่น 5 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีผลต่อคุณภาพของซาก นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายมีส่วนช่วยในกระบวนการเมทาบอลิซึมของไขมันในตัวปลา และมีความสัมพันธ์กับการดูดซึมวิตามินซี ด้วยที่ช่วยในกระบวนการทางสรีรวิทยาของปลา (Nakagawa, 1997) ไขมันที่พบในสาหร่ายขนาดใหญ่ (macro algae) จะมีความหลากหลายมากของกรดไขมัน โดยประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวที่เป็นโซ่ยาว และมีความสำคัญต่อเส้นประสาท กับสุขภาพ นอกจากนี้สารสกัดจากสาหร่ายทะเลถือได้ว่ามีบทบาทสำคัญอย่างมากในปัจจุบันที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่สัตว์น้ำเพื่อให้มีความต้านทานต่อโรค Dalmo และ Seljelid (1995) ศึกษาผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) แลมินาแรน (laminaran) ซัลเฟตลามินาแรน (sulphate laminaran) และเบต้ากลูแคน (*B*- glucan) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล

(*Laminaria hyperborean*) ในปลาแอตแลนติกแซลมอน พบว่า แมคโครฟาจ (macrophage) จากไตตอนต้นมีการกระจาย และมีการเพิ่มปริมาณออร์แกเนล (organelles) เพิ่มขึ้น การจับกินของนิวโทรฟิว (neutrophiles) และแมคโครฟาจ (macrophage) และยังมีความสัมพันธ์กับความสามารถของฟาโกซัยท์ที่เข้าไปทำลายเชื้อโรค อีกด้วย (Hardie *et al.,* 1996) Heo, และคณะ (2010) ศึกษาผลของฟิวโคแซนทิน (fucoxanthin) ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลที่ช่วยในการต้านการอักเสบ พบว่า สารฟิวโคแซนทิน สามารถยับยั้งระดับของไนตริก ออกไซด์ (nitric oxide) ใน ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้องค์ประกอบที่หลากหลายของเซลล์ในสาหร่ายทะเลสามารถเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพ (bioactive) ได้ซึ่งได้มีการทดสอบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาแล้ว (Harada et al., 1997) นอกจากนี้การเสริมสารสกัดจากพืชในอาหารสามารถเพิ่มค่า NBT reduction และค่าไลโซไซม์ แอคติวิตี้ (lysozyme activity) ให้เพิ่มสูงขึ้นแล้ว (Sudagar and Hajibeglou, 2010) ยังพบว่า สารสกัดจากพืชในธรรมชาติยังช่วยในกิจกรรมการต้านความเครียด เพิ่มความอยากกินของอาหาร ต้านจุลินทรีย์ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Citarasu *et al*., 2003) Sana และคณะ (2011) ศึกษาความสามารถของสาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha compressa*) ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (anti oxidant) โดยพบว่า สารสีจำพวกคลอโรฟิลล์ และ คาโรทีนอยด์ (carotenoids) กรดไขมันที่จำเป็น เช่น ลิโนลิอิก (linoleic acid) และเอนไซม์ ascobate กับ catalase สามารถต้านอนุมูลอิสระได้

1.3 ปลานิล

ปลานิลเป็นปลาพื้นเมืองของแอฟริกาและลุ่มแม่น้ำจอร์แดน พบได้ทั่วไปตาม หนอง บึง ทะเลสาบของประเทศ ยูกานดา และทันกายิกา ทวีปแอฟริกากลางและใต้ โดยสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ดี จึงแพร่กระจายทุกภูมิภาคของโลก มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง คือ ตั้งแต่ 11- 42 องศาเซลเซียส ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด ด่างได้ดีในช่วง 6.5-8.3 และทนต่อความเค็มของน้ำสูงถึง 20 พีพีที (ppt) ได้อย่างปลอดภัย ชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง ตามแม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง ทะเลสาบ (กรมประมง, 2541)

1.3.1 อนุกรมวิธานของปลานิล Trewavas (1982)

Phylum Vertebrata

Class Osteichthyes

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus *Oreochromis*

Species *niloticus*

1.3.2 ปลานิลแดง

ปลานิลแดงสายพันธุ์ไทยพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2511 ณ สถานีประมงน้ำจืด จังหวัด อุบลราชธานี ซึ่งได้มีการคัดปลานิลที่มีสีแดงทั้งตัวมาดำเนินการและเพาะขยายพันธุ์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2525 ได้กระจายพันธุ์ปลานิลสีแดงไปยังสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2527 กรมประมงได้ส่งปลานิลสีแดงไปตรวจสอบพันธุ์ ณ มหาวิทยาลัยสเตอร์ริง ประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งสรุปได้ว่าปลานิลสีแดงเป็นลูกผสมระหว่างปลาหมอเทศและปลานิล โดยมีความถี่ของปลาหมอเทศ 22 เปอร์เซ็นต์ และปลานิล 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวันที่ 2 มกราคม พ.ศ. 2527 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี ได้ทรงปล่อยพันธุ์ปลานิลสีแดงเพื่อเพาะขยายพันธุ์ในสวนจิตรลดา และได้ทรงพระราชทานชื่อปลานี้ว่า "ปลานิลสีแดง" ซึ่งต่อมาได้เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั่วโลกในนามว่า "ปลานิลสีแดง" หรือ "Thai Red Tilapia" (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

1.3.3 ลักษณะของปลานิลแดง

ปลานิลแดงสายพันธุ์ไทยจะมีลักษณะคล้ายกับปลานิลธรรมดามาก ต่างกันเพียงสีของลำตัว ปลานิลแดงมีสีบริเวณลำตัวเป็น สีส้ม ส้มแดง แดง ส้มเหลือง หรือชมพู ครีบหางมักมีสีส้มแดง ทำให้เห็นเป็นแถบสีส้มแดงมีลักษณะที่แตกต่างจากปลานิลธรรมดา ซึ่งลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาลหรือเทาปนน้ำเงิน ลักษณะที่มีความแตกต่างกันได้ชัดคือ สีของผนังช่องท้องมีสีขาวเนื่องจากไม่มีเม็ดสีดำ แต่ปลานิลธรรมดาผนังช่องท้องมักมีสีดำ เนื่องจากมีเม็ดสีและในช่องท้องของปลานิลแดงมีปริมาณไขมันมากกว่าปลานิลธรรมดา มีริมฝีปากเฉียงขึ้น บริเวณครีบหางไม่มีลายเส้นตามขวาง มีเกล็ด 3 แถวที่บริเวณแก้ม ครีบหลังมีอันเดียวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15 – 17 อัน ก้านครีบอ่อน 12 – 14 อัน ครีบอกมีเฉพาะก้านครีบอ่อน 13 อัน ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 อัน ก้านครีบอ่อน 5 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน ก้านครีบอ่อน 9-11 อัน และครีบหางมีก้านครีบอ่อน 16 – 18 อัน จำนวนเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 33 – 38 เกล็ด รอบคอดหาง 18 – 19 เกล็ด (ปกรณ์, 2527) ดังตารางที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างของปลานิลแดงกับปลานิลธรรมดา

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปลานิลแดงกับปลานิลธรรมดา

องค์ประกอบทางสรีระวิทยา	ปลานิลแดง	ปลานิลธรรมดา
1. สีของตัวปลา	ส้ม, ส้มแดง,ส้มเหลือง	น้ำตาล, เขียวปนน้ำตาล
2. สีของตา	แดง, ส้ม และเหลือง	ดำ
3. ความยาวลำตัว/ความยาวหัว	3.64-4.15	3.52-3.76
4. ความกว้างลำตัว/ความกว้างหัว	1.05-1.23	0.97-1.14
5. จำนวนครีบหลัง	XVI-XVII, 12-14	XVI-XVII, 12-13
6. จำนวนครีบก้น	III, 9-11	III, 9-10
7. จำนวนครีบท้อง	I, 5	I, 5
8. จำนวนเกล็ดเส้นข้างลำตัว	33-38	33-39
9. จำนวนเกล็ดเหนือเส้นข้างลำตัว	4-5	4-5
10. จำนวนเกล็ดใต้เส้นข้างลำตัว	10-11	11-12
11. สีของไข่	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
12. สีผนังช่องท้อง	ขาว	ดำ
13. นิสัยการกินอาหาร	ชอบกินเนื้อมากกว่ากินพืช (Omnivorous)	กินพืชและเนื้อ (Omnivorous)

ที่มา: กรมประมง (2526)

1.3.4 สายพันธุ์ปลานิล

ปัจจุบันปลานิลไทย ได้รับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์จากหน่วยงานของรัฐ และบริษัทเอกชน ทำให้เกิดเป็นปลานิลสายพันธุ์ใหม่ๆ ประมาณ 7 สายพันธุ์ ดังนี้

1.3.4.1 สายพันธุ์จิตรลดา เป็นปลานิลที่เจ้าชายอากิฮิโตมกุฎราชกุมารแห่งราชอาณาจักรญี่ปุ่น ทูลเกล้าถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ซึ่งพระกรุณาโปรดเกล้าให้เลี้ยงไว้ที่ตำหนัก จิตรลดารโหฐาน พร้อมกับพระราชทานชื่อว่า “ปลานิล” ต่อมาทรงพระราชทานปลานิลให้กรมประมงนำไปเพาะพันธุ์ขยายให้แก่เกษตรกรทั่วประเทศ

1.3.4.2 สายพันธุ์จิตรลดา 1 เป็นสายพันธุ์ปลาที่กรมประมงทำการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการคัดพันธุ์จากปลานิลในพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน ประมาณ 7 ชั่วอายุ ทำให้ได้ปลาสายพันธุ์ใหม่ที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์เดิม ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์

1.3.4.3 สายพันธุ์จิตรลดา 2 (Genefically Male Tilapia; GMT) เป็นปลาได้จากพันธุกรรม ในปลานิล สายพันธุ์อียิปต์ให้พ่อพันธุ์มีโครโมโซมเพศเป็น YY ที่เรียกว่า YY – male หรือพ่อพันธุ์ซุปเปอร์เมล (YY) ซึ่งเมื่อนำไปผสมกับแม่พันธุ์ปกติจะได้ลูกปลานิลเพศผู้ทั้งหมด

1.3.4.4 สายพันธุ์จิตรลดา 3 (Genefically Improved Farmel Tilapis Line; GIFT) เป็นปลานิลปรับปรุงพันธุ์ด้วยการคัดพันธุ์ปลานิล 8 สายพันธุ์ ประมาณ 5 ชั่วอายุ (F5) ซึ่งกรมประมงนำเข้ามาจากประเทศฟิลิปปินส์ แล้วทำการคัดพันธ์ต่อประมาณ 2 ชั่วอายุ ได้ปลานิลที่มีหัวเล็ก ตัวกว้าง เนื้อหนา เจริญเติบโตเร็ว ได้ขนาด 3-4 ตัวต่อกิโลกรัม ภายใน 6-8 เดือน ผลผลิตสูงกว่าปลาทั่วไป 40 เปอร์เซ็นต์ อัตรารอดสูง กว่าปลานิลปกติ 24 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ปลานิลจิตรลดา 3 จึงเป็นพันธุ์ที่กรมประมงส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงในปัจจุบัน

1.3.4.5 สายพันธุ์ CP เป็นปลานิลสีดำลูกผสมจากปลานิล 3 ชนิด คือ *Oreochromis niloticus,O.mossamlicus, O.ausres* ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ อาหารสัตว์จำกัด (มหาชน) ปลานิลนี้ถูกพัฒนาด้วยการคัดพันธุ์ต่อมาเรื่อยๆ จนได้ปลานิลลูกผสมที่มีลำตัวกว้าง เนื้อหนา สามารถทนความเค็มได้ในช่วงกว้าง จึงถูกนำไปเลี้ยงแทนที่กุ้งกุลาดำระบบปิด เพื่อทำให้ที่ควบคุมปริมาณพรรณไม้น้ำ

1.3.4.6 สายพันธุ์นิลแดง จากการตรวจสอบโดยมหาวิทยาลัยสเตอร์ลิ่ง และมหาวิทยาลัยฟิลิปปินส์ ด้วยวิธี Electorphoresis พบว่า ปลานิลสีแดงสายพันธุ์ไทยในปัจจุบันเป็นลูกผสมระหว่างปลานิล *Oreochromis niloticus* และปลาหมอเทศ *O.mossamlicus* มีรูปร่างเหมือนปลานิล มีสีแดง สีแดงส้ม สีขาว สีส้ม สามารถเลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และทะเล เนื่องจากมีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถอยู่ในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 11 - 35 พีพีที (ppt)

1.3.4.7 นิลแดงสายพันธุ์ทับทิม เป็นปลานิลสีแดงที่คัดพันธุ์มาจากปลานิล 3 ชนิด คือ *Oreochromis niloticus*, *O. mossamlicus* ของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน) ปลานิลนี้ถูกพัฒนาด้วยการคัดพันธุ์ต่อมาเรื่อยๆ จนได้พันธุ์ปลาที่มีความสามารถในการกินสูง จึงโตเร็ว สามารถทนความเค็มได้ถึง 30 พีพีที (ppt) เป็นปลาที่มีเนื้อขาว ให้ผลผลิตสูงถึง 25 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ภายในเวลา 3 เดือน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

1.3.5 วิธีการผลิตปลานิลเพศผู้

1.3.5.1 การคัดลูกปลาเฉพาะตัวผู้โดยการดูลักษณะเพศภายนอก แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากขนาดปลาที่สามารถแยกเพศได้ต้องมีขนาดความยาวตั้งแต่ 12 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 50 กรัมขึ้นไป (กรมประมง, 2541)

1.3.5.2 การให้ปลากินฮอร์โมน โดยจะให้ปลากินฮอร์โมน 17 α – เมลธิลเทสโทสเตอร์โรน (17 α- methyltestosterone หรือ17-MT) ความเข้มข้น 40 - 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 - 30 วัน แต่การผลิตลูกปลาโดยวิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องมีความรู้ความชำนาญเพียงพอ นอกจากนั้นฮอร์โมน 17- MT ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง และเสื่อมคุณภาพได้ง่าย โดยเฉพาะภูมิอากาศร้อนอย่างประเทศไทย ทำให้ต้นทุนในการผลิตปลาเพศผู้โดยวิธีนี้ค่อนข้างสูง และการผลิตก็ไม่สม่ำเสมอ หากลูกปลาอาหารผสมฮอร์โมนไม่ครบ ก็จะให้ผลผลิตเพศผู้ไม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามแม้ว่าฮอร์โมนเหล่านี้ได้รับการยืนยันว่า ไม่มีผลตกค้างในเนื้อปลาที่มีขนาดจับขายได้ แต่ก็มีผู้บริโภคบางส่วนไม่ยอมบริโภคปลานิลถูกเปลี่ยนเพศด้วยฮอร์โมนเหล่านี้

1.3.5.3 การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) การใช้วิธีการผสมข้ามสายพันธุ์ ทั้งข้ามสกุล (genus) และชนิด (species) ในปลาบางชนิด สามารถเกิดลูกทั้งหมดเป็นเพศเดียวกัน ได้สำหรับการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง *O. niloticus* x *O. aureus* จะได้ลูกที่มีเพศผู้ 100 เปอร์เซ็นต์

1.3.5.4 การผลิตปลานิลเพศผู้โดยทางอ้อม (indirect monosex production) เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะผลิตปลานิลเพศผู้ทั้งหมด สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาฮอร์โมนอาจตกค้างในเนื้อ และปัญหาประสิทธิภาพการผลิตปลาเพศผู้ที่ไม่สม่ำเสมอ การผลิตปลานิลเพศผู้โดยทางอ้อม ทำได้โดยผลิตพ่อพันธุ์ปลานิลซูเปอร์เมล (supermale หรือ YY-male) ซึ่งมีโครโมโซมเพศเป็น YY นำพ่อพันธุ์ปลานิลซูเปอร์เมลเหล่านี้ไปผสมกับแม่พันธุ์ปลานิลปกติจะได้ลูกปลาที่เป็นเพศผู้ทั้งหมด เนื่องจากลูกปลาเพศผู้เหล่านี้เป็นปลาเพศผู้โดยพันธุกรรม (genetically male tilapia) มีโครโมโซมเพศเป็น XT จึงนิยมเรียกปลาเพศผู้เหล่านี้ว่า ปลานิลเพศผู้ GMT สามารถอธิบายได้ดังนี้

1.3.5.4.1 รวบรวมลูกปลาจากปากแม่ปลามาอนุบาลจนถุงไข่แดงยุบ และเริ่มกินอาหาร

1.3.5.4.2 เตรียมอาหารผสมฮอร์โมนไดเอทธิลสทิลเบสทรอล (diethylstilbestrol, DES) อัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ละลายฮอร์โมนในสารละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ และคลุกกับอาหารให้ทั่ว ให้ลูกปลากิน 28 วัน จะได้ลูกปลาเพศเมียโครโมโซม 2 แบบ คือ XX และ XY

1.3.5.4.3 ตรวจสอบว่าปลาเพศเมียตัวใดเป็นเพศเมียที่มีโครโมโซม XY โดยเลี้ยงปลาเหล่านั้นจนเป็นแม่พันธุ์ แล้วนำมาผสมกับปลาเพศผู้ปกติที่มีโครโมโซมเพศ XY ถ้าแม่ปลาตัวใดผลิตลูกปลาที่มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย เท่ากับ 3 ต่อ 1 แสดงว่าเป็นโครโมโซมเพศเป็น XY

1.3.5.4.4 นำปลาเพศเมียที่มีโครโมโซม XY ดังกล่าวมาผสมกับปลาเพศผู้ปกติ จะได้ลูกปลาเพศเมียต่อเพศผู้ เท่ากับ 1 ต่อ 3 โดยในลูกปลาเพศผู้เหล่านี้จะมี 1 ส่วนที่มีโครโมโซมเพศเป็น Y

1.3.5.4.5 ตรวจสอบปลาเพศผู้ที่มีโครโมโซม YY โดยนำไปผสมกับปลาเพศเมียปกติ ถ้าลูกปลาเป็นเพศผู้ทั้งหมด แสดงว่าโครโมโซมเพศเป็น YY เป็นปลานิลซูเปอร์เมล เมื่อนำมาผสมกับปลาเพศเมียปกติ จะได้ปลาเพศผู้ที่เป็น GMT หรือที่เรียกว่าเป็นปลาสายพันธุ์จิตรลดา 2 การเลี้ยงปลานิล GMT จากการทดลองเลี้ยงปลานิลเพศผู้ GMT อายุ 1 เดือน ในบ่อดินนาน 8 เดือน พบว่า ปลานิลเพศผู้ GMT เจริญเติบโตได้เร็วกว่าการเลี้ยงปลานิลรวมเพศ โดยการเลี้ยงปลานิลรวมเพศให้ผลผลิตต่อบ่อ 217.43 กิโลกรัม ส่วนการเลี้ยงปลานิลเพศผู้ GMT ให้ผลผลิตรวมต่อบ่อ 303.02 กิโลกรัม ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงปลานิลรวมเพศ 28.28 เปอร์เซ็นต์ (นวลมณี และ พุทธรัตน์, 2538)

1.3.6 ความต้องการสารอาหารของปลานิล

1.3.6.1 ความต้องการโปรตีน

โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นทางโภชนาการ แหล่งของโปรตีนที่สำคัญที่มีการใช้ในวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำคือ ปลาป่น กุ้งป่น หมึกป่น ขนไก่ป่น กากถั่วเหลือง เป็นต้น จากการศึกษาความต้องการโปรตีนในปลานิล พบว่า มีความต้องการที่แตกต่างกันโดยปลานิลขนาดเล็กมีความต้องการโปรตีนสูงกว่าปลาขนาดใหญ่ (Fitzsimmons, 2005) เช่น ลูกปลาระยะเริ่มกินอาหาร (ขนาดเล็กกว่า 1 กรัม) ต้องการโปรตีน 40-50 เปอร์เซ็นต์ ปลาวัยอ่อน (ขนาด 1-10 กรัม) ต้องการโปรตีน 30-40 เปอร์เซ็นต์ ตลอดจนปลานิลเต็มวัยจะมีความต้องการโปรตีนอยู่ในช่วง 28-30 เปอร์เซ็นต์ แต่ความต้องการโปรตีนสามารถลดลงได้หากมีการเลี้ยงในบ่อดินที่มีอาหารธรรมชาติ ความต้องการโปรตีนในอาหารสามารถลดลงได้อยู่ในช่วง 20-25 เปอร์เซ็นต์ (Byamungu *et al.,* 2001; Yong-Solum *et al.,* 2006) Mohsen และคณะ (2010) ศึกษาผลของระดับโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของปลาที่มีน้ำหนักเริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่า ปลานิลระยะวัยอ่อน (0.4-0.5 กรัม) มีความต้องการโปรตีนในอาหาร 45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะวัยรุ่น (17-22 กรัม) และตัวเต็มวัย (37-43 กรัม) มีความต้องการโปรตีนในอาหารไม่แตกต่างกัน คือ 35 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ๆ อย่างไรก็ตาม กรดอะมิโนถือเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของโปรตีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโต (Kivin, 1997) Santiago และ Lovell (1988) พบว่าปลานิลต้องการกรดอะมิโนแต่ละชนิดในปริมาณที่แตกต่างกันเช่น อาร์จีนีน (1.18 %), ไอโซลูซีน (0.87 %), ไลซีน (1.34 %), ฟีนิลอะลานีน (1.05 %), วาลีน (0.78 %), ฮีสตีดีน (0.48 %), ลูซีน

(0.95 %), เมทไธโอนีน (0.75 %), ทริฟโตเฟน (0.28 %) และทรีโอนีน (1.05 %) เปอร์เซ็นต์ต่ออาหารแห้งตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ความต้องการโปรตีนยังขึ้นอยู่กับพลังงานในอาหาร อัตราการให้อาหาร (El-Sayed and Teshima, 1992) NRC (1993) พบว่า อัตราส่วนของโปรตีนที่ย่อยได้ต่อพลังงานที่ต้องการที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาอยู่ระหว่าง 81-117 มิลลิกรัม/กิโลแคลอรี

1.3.6.2 ความต้องการคาร์โบไฮเดรต

เวียง (2542) อ้างโดย เนตรชนก และคณะ (2550) พบว่า ปลานิลสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานได้ดี วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลักในอาหารได้แก่ แป้งสาลี ปลายข้าว รำ โดยผสมในอาหารได้ 30-40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานที่ช่วยสำรองโปรตีน (protein – sparing effect) ที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโต จากการรายงานของกรมประมง (2541) พบว่า การทดแทนโปรตีนด้วยคาร์โบไฮเดรตในอาหารปลานิล ปลาสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ Shiau และ Peng (1993) ทดลองใช้กลูโคส, แป้ง และเด็กซ์ตริน (dextrin) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลลูกผสมวัยรุ่น พบว่าสามารถลดระดับโปรตีนในอาหารลงจาก 28 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 24 เปอร์เซ็นต์ โดยเพิ่มแป้งหรือเด็กซ์ตรินจาก 37 เปอร์เซ็นต์ เป็น 41 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และคุณภาพซากของปลา Quin และKeough (2003) พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตเกิน 35 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลทำให้การเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการย่อยลดลง แต่ถ้าทำให้แป้งสุกสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเพิ่มขึ้น 25-30 เปอร์เซ็นต์ Kivin (1997) พบว่า ในอาหารปลานิลที่มีขนาดต่ำกว่า 1 กรัม ไม่ควรมีคาร์โบไฮเดรตในอาหารเป็นส่วนประกอบเกิน 25 เปอร์เซ็นต์

1.3.6.3 ความต้องการไขมัน

ความต้องการไขมันของปลานิล ปลานิลเป็นปลาที่ต้องการกรดไขมันที่จำเป็นในกลุ่มโอเมก้า-6 (18:2n-6) มากกว่าโอเมก้า-3 (18:3n-3) Kanazawa และคณะ (1980) พบว่า ปลานิล *Tilapia zillii* ต้องการกรดไขมันในอาหารที่มีกรดลิโนลิอิค (18:2n-6) 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลาเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีกรดลิโนลินิค (18:3n-3) ส่วนแหล่งของไขมันที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง คือน้ำมันจากข้าวโพด และน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณที่ต้องการอย่างน้อย 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ (Chou and Shiau, 1996) ส่วน El-Sayed (1998) ได้ทดลองในการใช้กากเมล็ดในปาล์มน้ำมัน (ที่มีกรดไขมันจำเป็นในกลุ่มของกรดลิโนเลอิค) (18:2n-6) เป็นวัตถุดิบในการผลิต

อาหารทดลอง พบว่าปลานิลมีการเจริญเติบโตได้ดี ไม่แตกต่างกับอาหารที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งไขมัน และยังพบว่า การใช้น้ำมันจากพืช เช่น น้ำมันจากปาล์ม ยังช่วยลดสภาวะเครียด และลดการเกิดโรคในปลานิลได้อีกด้วย (Ng *et al*., 2004) นอกจากนี้ Huang และคณะ (1998) พบว่า การเสริมระดับของ n-3 (PUFA) ในปริมาณสูงส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของปลานิลลดลง Chou และ Shiau, (1996) ศึกษาระดับของไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่า ระดับที่เหมาะสมของไขมันต่อการเจริญเติบโตของปลานิล อยู่ในช่วง 10-15 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร

1.3.6.4 ความต้องการแร่ธาตุ

ความต้องการแร่ธาตุของปลานิล สามารถที่จะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ ความต้องการแร่ธาตุหลัก เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม และโพแทสเซียม โดยแร่ธาตุหลักที่นิยมศึกษากันมากที่สุดคือ ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ซึ่งจากการศึกษาของ Watanabe และคณะ (1983) พบว่าความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลานิล *(Oreochromis niloticus*) อยู่ในช่วงประมาณ 0.45-0.6 เปอร์เซ็นต์ Robinson และคณะ (1988) พบว่า ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลานิล *(Oreochromis niloticus*) อยู่ที่ระดับ 0.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของปลาและส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารทดลองด้วย (Haylor *et al*.,1988) นอกจากนี้จากการทดลองของ Phromkunthong และ Udom (2008) พบว่า อาหารสำหรับปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้วัตถุดิบจากพืชทั้งหมดเป็นแหล่งโปรตีนหลักควรมีฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ในช่วง 0.76 ถึง 0.79 เปอร์เซ็นต์ Watanabe และคณะ (1980) พบว่า ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลานิลประมาณ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากว่าฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ phosphoproteins, nucleic acid และphospholipids ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเผาผลาญพลังงาน (Wee and Shu, 1989) Shiau และ Tseng (2007) ศึกษาความต้องการแคลเซียมในปลานิล (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) พบว่าการเสริมแคลเซียมแลคเตทปริมาณ 3.7 กรัมในอาหารส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด และระดับของแคลเซียมที่เหมาะสมในอาหารอยู่ในช่วง 3.5-4.2 กรัม

1.4 โรคที่พบในปลานิล

โรค *Streptococcus* sp. ถือเป็นอีกโรคหนึ่งที่พบบ่อยในปลานิล เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ลักษณะการเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือเรียงตัวกันอยู่เป็นคู่ๆ พบว่า แบคทีเรียในวงศ์นี้มีมากกว่า 100 ชนิด สามารถก่อโรคในปลาหลาย

ชนิดทั่วโลก ทั้งในปลาน้ำจืด กร่อย และน้ำเค็ม (Teska and Shotts, 1994; Robert, 1998; Dodson *et al*., 1999)

อาการโดยทั่วไปของปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีอาการตกเลือดหรือเป็นแผลที่บริเวณผิวลำตัว รอบตา และปาก บางครั้งจะพบว่า ท้องบวม ตาโปน และยังพบว่า ปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. จะมีตาขุ่นขาว ว่ายน้ำช้าๆ ลอยนิ่ง รอบๆ ช่องขับถ่ายจะบวมแดง มักจะระบาดรุนแรงในหน้าร้อน (นิลุบล และคณะ 2549) การติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) ทำให้เกิดภาวะติดเชื้อทั่วร่างกาย (Septicemia) สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) นอกจากนี้จะมีผลต่ออวัยวะภายในของปลาคือ ตับ ไต สมอง ม้าม ซึ่งปลาที่ติดเชื้อแล้วตับจะมีขนาดเล็กลง และมีสีซีด เกิดการตายของเซลล์ตับ ตับจะบวมผิดปกติ มีสีแดงคล้ำและบวม (Plumb, 1994) Perera และคณะ (1994) รายงานว่า ปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus iniae* จะเกิดการอักเสบของเยื่อหัวใจ สมองมีการตกเลือด และสะสมของเหลวในบริเวณช่องท้อง มีการเลือดคั่งในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ Kei และคณะ (2008) ศึกษาการฝังตัวของเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลที่เลี้ยงในแถบเอเชีย ซึ่งได้ศึกษาปลานิลที่เลี้ยงในกระชังริมแม่น้ำโขงในจังหวัด มุกดาหาร พบว่า ปลาที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp. มีอัตราการตายอย่างช้าๆประมาณ 2 สัปดาห์ โดยอัตราการตายอยู่ในช่วง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปลาที่ติดเชื้อจะพบอาการท้องบวม มีน้ำในลำไส้ และยังพบฝีบริเวณก้านดอก (peduncle) เมื่อแยกเชื้อที่สมองไปเพาะพบว่าเป็นเชื้อ *Streptococcus agalactiae* กับ *Streptococcus iniae* แกรมบวก

การแพร่กระจายของเชื้อ *Streptococcus* sp. สามารถอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมทั่วๆไป ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม Inglis และคณะ (1993) พบว่า เชื้อ *Streptococcus* sp. ปะปนอยู่ในน้ำทะเลและดินโคลนในบริเวณที่เลี้ยงปลาต่างๆ ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อนจะมีจำนวนเชื้อในปริมาณที่สูง ประเทศไทยมีการรายงานครั้งแรกของการเกิดโรค *Streptococcus* sp. ในปลาบู่ทราย (จิราพร และเยาวนิตย์, 2529) ต่อมาในปี พ.ศ. 2530 มีการรายงานพบโรคนี้ในปลากะพงขาว (สถาพร และเยาวนิตย์, 2530) ซึ่งโรค *Streptococcus* sp. นี้จะเป็นที่รู้จักในชื่อของโรคป๊อปอาย (pop-eye disease) ก่อให้เกิดอาการสมอง เยื่อหุ้มสมอง และไขสันหลังอักเสบ (Meningocephalitise) หรือโรคไฟลามทุ่ง (Erypsipelas) ที่เกิดในคน (Smith, 1969)

1.5 ผลผลิตและความต้องการของตลาดปลานิลใน และต่างประเทศ

ปลานิลเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในเอเชียและแอฟริกา ซึ่งปลาชนิดนี้เป็นที่รู้จักในตลาดอเมริกา ยุโรป และอีกหลายประเทศ โดยรูปแบบการบริโภคปลานิลโดยเฉพาะปลานิลแดงเป็นที่นิยมกันมาก เพราะเป็นปลาที่มีเนื้อสีขาว เนื้อมีความนุ่ม ละเอียด มีรสหวานมัน

กว่าปลานิลธรรมดา ซึ่งในประเทศไทยนิยมวางขายในห้างสรรพสินค้าทั่วไป (พรรณศรี, 2531) ปัจจุบันข้อจำกัดของผู้ประกอบการคือ ต้องการปลาที่มีคุณภาพ คือ ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส มีขนาดมาตรฐานและราคาถูก ซึ่งสามารถยึดเป็นแนวทางในการ พัฒนาการเพาะเลี้ยงให้เป็นอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกได้ นอกจากข้อกำหนดดังกล่าวแล้ว การเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องอยู่บนพื้นฐานของความปลอดภัยทางอาหาร (Food Safety) ด้วย ซึ่งหมายความว่า การเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องมีรูปแบบที่ชัดเจน เช่น การจัดการฟาร์มเลี้ยงให้ได้มาตรฐาน การใช้สารเคมีที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (กรมประมง, 2553)

FAO (2006) รายงานว่า ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้เป็นอันดับที่ 4 ของภูมิภาคเอเชียในปี พ.ศ. 2549 เป็นจำนวน 153,000 ตัน รองลงมาจากประเทศจีนจำนวน 1,111,461 ตัน ฟิลิปปินส์จำนวน 160,482 ตัน และ อินโดนีเซีย จำนวน 179,934 ตัน ซึ่งประเทศเหล่านี้ล้วนเป็นประเทศที่อาจจะเป็นคู่แข่งที่สำคัญทางการค้าได้ ในอนาคต โดยเฉพาะประเทศจีน และอีกประเทศที่น่าจับตามอง คือ เวียดนาม เพราะ ทางการของเวียดนามนั้นให้การสนับสนุนอย่างจริงจัง และได้แหล่งน้ำที่มาจากแม่น้ำโขง ต่างจากประเทศไทยที่ต้อง พึ่งจากธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่และต้นทุนการผลิตทั้งค่าวัตถุดิบและค่าแรงงานก็สูงกว่ามาก

ผลผลิตปลานิลของโลก 50 เปอร์เซ็นต์ มาจากกลุ่มประเทศในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งถือว่าเป็นผู้ผลิตปลานิลรายใหญ่ของโลก ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย มาเลเซีย และบังกลาเทศ ซึ่งผลผลิตปลานิลในปี พ.ศ. 2553 จำนวน 3.7 ล้านตัน โดยจีนเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ของโลกเหมือนเดิมอยู่ที่ 1.1 – 1.2 ล้านตัน คิดเป็น 30 – 32 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตโลก ซึ่งส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง 79 เปอร์เซ็นต์ จากการจับ 21 เปอร์เซ็นต์ และได้มีการพยากรณ์ผลผลิตปลานิลของโลกในปี พ.ศ. 2558 จำนวน 4.6 ล้านตัน (INFOFISH Tilapia, 2010)

สหรัฐอเมริกาเป็นผู้นำเข้าปลานิลรายใหญ่ของโลก ในปี พ.ศ. 2553 มีการนำเข้าปลานิลและผลิตภัณฑ์จำนวน 215.38 พันตัน โดยมีรูปแบบผลิตภัณฑ์นำเข้าดังนี้

1. เนื้อปลาฟิลเล่แช่แข็ง (เนื้อปลาแช่แข็ง) จำนวน 150.77 พันตัน (คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์) มูลค่า 611.07 ล้านเหรียญสหรัฐ นำเข้าจากจีนเป็นหลัก 90 เปอร์เซ็นต์ อินโดนีเซีย 7 เปอร์เซ็นต์ ไต้หวัน 2 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆอีก 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่นำเข้าจากในไทย จำนวน 1.06 พันตัน คิดเป็น 0.70 เปอร์เซ็นต์

2. ปลานิลแช่แข็ง จำนวน 40.89 พันตัน คิดเป็น 19 เปอร์เซ็นต์ มูลค่า 65.51 ล้านเหรียญสหรัฐ นำเข้าจากจีนเป็นหลัก 56 เปอร์เซ็นต์ ไต้หวัน 40 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆคิดเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่มีการนำเข้าจากไทยมากเป็นอันดับ 3 จำนวน 1.18 พันตัน คิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ มูลค่า 1.78 ล้านเหรียญสหรัฐ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมา

3. เนื้อปลานิลฟิเล่แช่เย็น (เนื้อปลาแช่เย็น) จำนวน 23.72 พันตัน คิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ มูลค่า 166.28 ล้านเหรียญสหรัฐ นำเข้าจากเอกวาดอร์มากที่สุด 33 เปอร์เซ็นต์ ฮอนดูรัส 31 เปอร์เซ็นต์ คอสตาริกา 25 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ 11 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีการนำเข้าเนื้อปลาฟิลเล่แช่เย็นจากไทย เนื่องจากระยะทางไกลกว่ากลุ่มประเทศอเมริกาใต้ ซึ่งมีผลต่อต้นทุนค่าขนส่งและคุณภาพเนื้อปลา (INFORFISH Trade News, NO 22/2010)

1.6 ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

การพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของปลา จะมีการสร้างลิมโฟไซท์ (lymphocyte) ที่ตับในช่วงยังเป็นตัวอ่อน ซึ่งลิมโฟไซท์นี้จะแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย โดยเฉพาะที่ม้าม (spleen) และต่อมน้ำเหลือง แต่เมื่อปลาโตขึ้นอวัยวะที่ให้กำเนิดลิมโฟไซท์ที่สำคัญ คือกระดูกสันหลัง (bone marrow) ระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะมีลักษณะคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sakai, 1999) แต่ยังพัฒนาไม่ดีเท่า เนื่องจากปลามีวิวัฒนาการที่ต่ำกว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) ซึ่งภูมิคุ้มกันของปลาส่วนใหญ่เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยระบบภูมิคุ้มกันลักษณะนี้ถูกสร้างขึ้นมาโดยธรรมชาติไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากแอนติเจนหรือเชื้อโรค (Vadstein, 1997)

1.6.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เป็นกลไกของร่างกายสร้างขึ้นเอง เป็นภูมิคุ้มกันที่สามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมได้หลายชนิด มีในร่างกายตั้งแต่กำเนิด หรืออาจเรียกว่าภูมิคุ้มกันแบบธรรมชาติ (natural immunity หรือ innate immunity) ในปลาประกอบด้วย เยื่อเมือก เกล็ด ผิวหนัง โดยถือเป็นด่านแรกที่ช่วยป้องกันและต่อต้านสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆ ที่จะเข้าไปทำลายทำให้เกิดความผิดปกติของปลา (Ellis, 1988) นอกจากนี้จะมีการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ และสิ่งขีดขวางที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทั้งชนิดที่เกี่ยวกับเซลล์ (cell mediated immunity) และสารน้ำ (humoral factor) (Ellis, 1988) โดยภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับเซลล์จะประกอบด้วย เซลล์ที่มีหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytotic cell) เช่น แมคโครฟาจ (macrophage) นิวโทรฟิล (neutrophyll) อีโอซิโนฟิล (eosinophils) และเบโซฟิลล์ (basophil) เป็นต้น (Roberts, 1989) ไลโซไซม์ (lysozyme) เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (Dalmo *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กับสารต่อต้าน

เอนไซม์ของเชื้อโรค เช่น ทรานเฟอร์ริน (transferrin) อินเตอร์ฟีรอน (interferon) และแมคโครกลูบูลิน (macroglobulin)

1.6.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง

สามารถตอบสนองได้ 3 ทาง คือ cell mediated immunity (CMI), humoral immunity (HI) และ memory humoral immunity โดยมีลิมโฟไซท์เป็นตัวหลักที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน สามารถพบได้ในระบบหมุนเวียนเลือดของร่างกาย ลิมฟอยด์ ออร์แกน (lymphoid organ) และเนื้อเยื่ออื่นๆ ลิมโฟไซท์มีความสามารถในการจดจำ (memory) คือ เมื่อเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมที่ก่อโรค (antigen) ชนิดเดิมเป็นครั้งที่ 2 มีการตอบสนองต่อแอนติเจนเร็วขึ้น (Robert, 1989) ลิมโฟไซท์มี 2 กลุ่มคือ ที-ลิมโฟไซท์ (thymus-derived, T-lymppcytes) และบี-ลิมโฟไซท์ (bone marrow-derived, B-lympocyte) ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีบทบาทสำคัญในการจดจำ (memory cell) อิมมูโนกลูบูลิน (immunoglobulin, Ig) มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง เช่น การกำจัดไวรัส และแบคทีเรีย การกระตุ้นคอมพลีเมนต์ โดยอิมมูโนกลูบูลิน ที่พบในปลาชั้นสูงมีเพียงชนิดเดียว คือ ไอจีเอ็ม (IgM) พบได้ในสารคัดหลั่ง เมือกบริเวณผิวหนัง ทางเดินอาหาร และในท่อน้ำดี (บุญเยี่ยม และคณะ 2524)

1.7 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ

สาหร่ายถือเป็นวัตถุดิบพืชที่นิยมเสริมลงไปในอาหารสัตว์น้ำในปัจจุบันมากขึ้น เพื่อใช้เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดสะสมอยู่ เช่น วิตามิน แร่ธาตุ โพลีแซคคาไรด์ และคาร์โรทีนอยด์ เป็นต้น ที่มีบทบาทสำคัญที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

คาโรทีนอยด์ เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ ซึ่งมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Hunter, 2000) ถือเป็นสารชนิดหนึ่งในการต้านอนุมูลอิสระ และมีบทบาทสำคัญในการขัดขวางทางด้านพยาธิวิทยาที่มีความเชื่อมต่อกับความเครียดที่เกิดขึ้นกับร่างกาย (Okuzumi *et al.*, 1993) ซึ่งส่วนใหญ่ที่พบในสาหร่ายสีเขียวจะประกอบด้วย ซีแซนทีน (zeaxanthin) ลูทีน (lutein) Amar และคณะ (2004) พบว่าปลาเรนโบว์เทราท์ ที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมแอสตาแซนทิน และแคนตาแซนทิน ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้น โดยทำให้ปฏิกิริยาไลโซไซม์ในซีรัม และอัตราการกินแบบฟาโกไซติก และดัชนีฟาโกไซติก ความว่องไวของซีรัม แอนติโปรติเอส และซีรัมคอมพลีเม้นต์เพิ่มมากขึ้น (Thompson *et al.,* 1995)

โพลีแซคคาไรด์ ถือเป็นองค์ประกอบที่พบในสาหร่ายขนาดใหญ่ที่มีปริมาณมากที่สุดและมีการสกัดออกมาในรูป อัลจีเนท (alginate) คาร์ราจีแนน (carrageenans) และอาการ์ (agar) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกระตุ้นภูมิกันในสัตว์น้ำ และกิจกรรมทางด้านชีววิทยาช่วยในการต้านจุลินทรีย์ การจับตัวเป็นก้อนของเลือด ต้านไวรัส และต้านมะเร็ง (Charreau *et al*., 1997)

โพลีฟีนอล (polyphenols) หรือเรียกว่า โพลโรแทนนิน (phlorotannins) เป็นสารที่สกัดจากสาหร่าย ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในสาหร่าย สีน้ำตาลมากกว่าชนิดอื่น สาร polyphenols มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้มีการศึกษาทดลอง (Nakamura *et al.,* 1996) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการขัดขวางการเกิดโรค รวมถึงการต้านสภาวะเครียดของร่างกาย ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่พบทั้งหมดในสาหร่ายนี้ถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในปัจจุบันที่พยายามเลี่ยงการใช้สารเคมีในการรักษาที่จะส่งผลให้เกิดการตกค้างในสัตว์น้ำ แต่กลับใช้สาหร่ายเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพแทนเพื่อลดการใช้ยา จะสังเกตว่าปัจจุบันได้มีความพยายามศึกษาเรื่องการใช้สาหร่ายมากขึ้นที่นอกเหนือจากการใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนแล้วสาหร่ายยังเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้ดีอีกด้วย

1.8 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลแดงแปลงเพศโดยการใช้สาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น

2. ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลแดงแปลงเพศที่มีการใช้สาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นที่ระดับต่างๆ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 การเตรียมสาหร่ายไส้ไก่ป่น

นำสาหร่ายไส้ไก่ป่นแห้งบดละเอียด จากฟาร์ม ทรัพย์ตะวัน จากจังหวัดปัตตานี

2.1.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลานิลแดงแปลงเพศ จากมหาวิทยาลัยทักษิณ ต.บ้านพร้าว อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง จำนวน 5,000 ตัว ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 4-5 กรัม มาอนุบาลในบ่อคอนกรีตที่มีความจุน้ำ 7,000 ลบ.ม. เลี้ยงจนได้ขนาดที่ต้องการโดยมีน้ำนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 12-13 กรัม โดยใช้เวลาในการอนุบาลประมาณ 1 เดือน

2.1.3 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนการทดลอง

นำปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 4-5 กรัม/ตัว มาอนุบาลในบ่อซีเมนต์ขนาด 7,000 ลบ.ม. ให้อาหารสูตรควบคุม สูตรที่ 1 (ไม่มีการเสริมสาหร่ายไส้ไก่ป่น) วันละ 2 ครั้ง ช่วงเช้า 9.00 น. และช่วงเย็นหลังมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 16.00 น. เมื่อปลาทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 12 กรัม/ตัว (จากการสุ่มชั่ง) จึงคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีสุขภาพแข็งแรงลงในตู้ทดลองตู้ ละ 20 ตัว ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ก่อนชั่งน้ำหนักปลางดให้อาหารเป็นเวลา 1 มื้อ) บันทึกข้อมูลน้ำหนักปลาเริ่มต้นเพื่อนำ ไปคำนวณการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

2.1.4 สารเคมี

2.1.4.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารทดลอง และซากปลาก่อน และเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง (ภาคผนวก ก)

2.1.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันปลา (ภาคผนวก ข)

2.1.4.3 สารเคมีสำหรับรักษาโรคปลา เช่น ออกซีเตตระไซคลิน (oxytetracycline) ฟอร์มาลิน (formalin)

2.1.4.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับสลบปลา คือ น้ำมันกานพลู

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.2.1.1 บ่อซีเมนต์ที่มีความจุน้ำ 7,000 ลบ.ม. จำนวน 1 บ่อ

2.2.1.2 ตู้ทดลองกระจกที่มีขนาด 45 x 91 x 45 เซนติเมตร มีความจุน้ำ 180 ลิตร

2.2.1.3 เครื่องปั๊มน้ำสำหรับเปลี่ยนถ่ายน้ำช่วงที่อนุบาลปลาอยู่ในบ่อซีเมนต์

2.2.1.4 อุปกรณ์ให้อากาศ เช่น หัวทราย สายยาง

2.2.1.5 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ เช่น สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่มยี่ห้อ WALRUS ที่มีกำลังไฟ 400 วัตต์

2.2.1.6 อุปกรณ์สำหรับขนย้ายปลา เช่น สวิง กะละมังพลาสติก ขนาด 30 ลิตร และ 50 ลิตร ถังน้ำสีดำสำหรับขนย้ายปลา

2.2.1.7 อุปกรณ์สำหรับชั่งปลา เช่น ตาชั่งขนาด 3,100 กรัม ที่มีทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น Basic

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารทดลอง

2.2.2.1 เครื่องทำอาหารทดลองยี่ห้อ Hobart Mixer รุ่น A 200 T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2.2.2 อุปกรณ์ใช้สำหรับชั่งตวง เช่น เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง 250, 100 บิกเกอร์ ถาดเหล็กสำหรับใส่อาหารก่อนที่จะอบ และถุงพลาสติกที่บรรจุวัตถุดิบกับอาหารทดลองที่ทำเสร็จสิ้นแล้วก่อนที่จะนำไปใช้

2.2.2.3 ตู้แช่สำหรับเก็บอาหารทดลอง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.3 อุปกรณ์การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลองกับตัวปลา

2.2.3.1 อุปกรณ์การวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldathem เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I และหลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บิกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่ เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.2.3.2 อุปกรณ์การวิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือการวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 กระดาษกรองสาร (thimble) ถ้วยสกัดไขมัน ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.3.3 อุปกรณ์การวิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) โถดูดความชื้น เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.3.4 อุปกรณ์การวิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์เยื่อใย รุ่น Fibertec System ถ้วยแก้ว (glass crucible) เบอร์ 1 ตู้อบ เตาเผา โถดูความชื้น เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.3.5 อุปกรณ์การวิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) ตู้อบ (hot air oven) โถดูดความชื้น (desiccators) เครื่องชั่งศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.4 อุปกรณ์การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.2.4.1 อุปกรณ์สำหรับเจาะเลือดปลา ได้แก่ เข็มฉีดยาขนาด 25 G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA)

2.2.4.2 อุปกรณ์สำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ Backmaan รุ่น Avanti ™ หลอดเก็บซีรัม (ependorf) ขนาด 1 มิลลิลิตร ขาตั้งสำหรับวางหลอด ถาดสำหรับใส่ซีรัม 96 หลุม (micro plate 96 well)

2.2.4.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด ได้แก่ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) RBC-diluting pipete

2.2.4.4 อุปกรณ์สำหรับทำฮีมาโตคริท ได้แก่ หลอดคาปิลลารี่ (capillary tube) ดินน้ำมัน สำหรับอุดปลายหลอด และที่วางหลอด

2.2.4.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Elisa reader micro plate)

2.2.5 การวิเคราะห์ Lysozyme activity

นำเลือดที่เจาะได้วางให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง วางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสซึ่งเรียกว่าซีรัมที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ Lysozyme activity ตามวิธีการของ Obach และ คณะ (1993)

วิธีการ

2.3.1 ใส่ซีรัมของปลา 25 ไมโครลิตร ในถาดหลุมแบบ 96 หลุม จำนวน (1 ตัวอย่าง 3 หลุม)

2.3.2 เติม *Micrococcus lysodeikticus* (0.075 %) ปริมาตร 175 ไมโครลิตร

2.3.3 ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที วัดการทำงานของเอนไซม์ทุกๆ 30 วินาที ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.3.4 คำนวณการทำงานของไลโซไซม์จากอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง (Optical dencity, OD) เป็นหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร (โดยหนึ่งยูนิตเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่า OD ลดลง 0.001 ต่อนาที)

วิธีการคำนวณ

1. นำความยาวคลื่นที่มีการเปลี่ยนแปลง ใน 1 นาที
2. ความเข้มข้นของ egg white lysozyme อยู่แกน x และค่าการดูดกลืนแสง ที่เปลี่ยนแปลงใน 1 นาที อยู่แกน y
3. หา linear regression เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ lysozyme จากค่าการดูดกลืนแสง

2.2.6 การวิเคราะห์ NBT reduction

เป็นการศึกษากระบวนการหายใจของเม็ดเลือดขาว (Phagocyte) บนฐานการปล่อยซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนดัดแปลงตามวิธีของ Stasiak และ Bauman (1996)

วิธีการ

2.4.1 เติมตัวอย่างเลือด 50 ไมโครลิตร ใน microtitre plate และเติม ACD ลงไป 30 ไมโครลิตร ลงไป

2.4.2 นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.4.3 ดูดสารละลายทิ้งให้แห้ง (ระวังอย่าให้ tip โดนที่ก้นหลุม)

2.4.4 ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง

2.4.5 เติม 0.2 NBT ใน 0.85 Nacl

2.4.6 อบที่อุณหภูมิ 37 องศา 1 ชั่วโมง

2.4.7 ตรึงเซลล์ด้วย 100 % เมทานอล 2-3 นาที

2.4.8 ล้างด้วย 70 % เมทานอล 3 ครั้ง

2.4.9 ผึ่ง microtitre plate ให้แห้ง

2.4.10 เติม 2N KOH 60 ไมโครลิตร กับ DMSO 70 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน

2.4.11. นำไปวัดเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

2.3 ระเบียบวิธีการวิจัย

2.3.1 การเตรียมการทดลอง

2.3.1.1 การวางแผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้โปรตีนจากสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ โดยทำการทดแทนโปรตีนในระดับ 15, 30, 45, 60, 75, และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยได้ใช้สาหร่ายไส้ไก่แห้งบดละเอียด (*Enterromorpha intestinalis* meal) จาก ฟาร์มทรัพย์ตะวันจังหวัด ปัตตานี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งการทดลอง เป็น 7 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ

2.3.1.2 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 45 × 91 × 45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 180 ลิตร ทำการแช่คลอรีน 1-2 วัน ก่อนทำความสะอาดตู้เพื่อฆ่าเชื้อต่างๆที่ติดอยู่ในตู้ มีการติดตั้งอุปกรณ์ เช่น สายออกซิเจน หัวทราย เครื่องให้อากาศ มีการเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ให้ได้ปริมาตร 130 ลิตร ก่อนปล่อยปลาทดลองโดยจะมีการเตรียมน้ำไว้ในบ่อพักน้ำก่อนที่จะนำไปใช้ทุกครั้ง

2.3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองมีทั้งหมด 7 สูตร ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมือนกันคือ โปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 3,500 กิโลแคลอรี/อาหาร 1 กิโลกรัม วัตถุดิบที่ใช้ประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำข้าว แป้งมันสำปะหลัง เนื้อไก่ป่น หวีดกลูเตน (wheat gluten) สาหร่ายไส้ไก่ป่น น้ำมันพืช น้ำมันปลา โคลีน คลอไรด์ วิตามินรวม แร่ธาตุรวม เมทไธโอนีน และโมโนโซเดียมฟอสเฟต โดยมีรายละเอียดของชุดการทดลอง ดังนี้

สูตรที่ 1 สูตรควบคุมไม่มีการทดแทนโปรตีนจากปลาป่น
สูตรที่ 2 เสริมสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 15 เปอร์เซ็นต์
สูตรที่ 3 เสริมสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 30 เปอร์เซ็นต์
สูตรที่ 4 เสริมสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 45 เปอร์เซ็นต์
สูตรที่ 5 เสริมสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 60 เปอร์เซ็นต์
สูตรที่ 6 เสริมสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 75 เปอร์เซ็นต์
สูตรที่ 7 เสริมสาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่น 100 เปอร์เซ็นต์

2.3.1.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง

2.3.1.4.1 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ ได้แก่ ความชื้นโปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย และสร้างสูตรอาหารโดยคำนวณอาหารทดลองทุกสูตรให้มีระดับของโปรตีน ไขมัน และพลังงานที่เท่ากัน (ตารางที่ 2)

2.3.1.4.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) ตามปริมาณที่ต้องการแยกถุงไว้ใช้ในแต่ละชุดการทดลอง สูตรอาหารแสดงไว้ใน (ตารางที่ 3)

2.3.1.4.3 นำวัตถุดิบทั้งหมดที่แยกไว้ข้างต้นยกเว้นน้ำมันปลา และน้ำมันพืชมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสมอาหารประมาณ 15 นาที โดยในช่วง 5 นาทีแรกให้ใส่น้ำมันปลาและน้ำมันพืชลงไปในสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง หลังจากนั้นอีก 5 นาทีก็เติมน้ำสะอาด 35 เปอร์เซ็นต์ จนครบเวลาตามที่กำหนดเพื่อให้วัตถุดิบอาหารเข้าสู่กระบวนการอัดเม็ด

2.3.1.4.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นที่ผ่านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกันและให้พอเหมาะกับปากของปลา

2.3.1.4.5 อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3.1.4.6 เก็บอาหารทดลองที่ผ่านกระบวนการอบแล้วบรรจุถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.1.4.7 นำอาหารที่เตรียมไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย ตามวิธีของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก, nitrogen free extract, NFE) คำนวณได้จากสูตร

Nitrogen free extract หรือ NFE = 100 - (% ความชื้น + % โปรตีน + % ไขมัน + % เถ้า + % เยื่อใย)

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง แสดงไว้ใน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารทดลอง (% บนฐานน้ำหนักแห้ง)

	คุณค่าทางโภชนาการ[1] (เปอร์เซ็นต์)					
วัตถุดิบอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE[2]
ปลาป่น	6.23 ± 0.52	58.33 ± 0.80	10.48 ± 0.19	20.43 ± 0.19	1.02 ± 0.01	3.49 ± 0.34
กากถั่วเหลือง	10.90 ± 0.87	50.95 ± 1.18	1.86 ± 0.16	7.05 ± 0.07	2.90 ± 0.11	26.34 ± 0.48
รำข้าว	16.41 ± 0.62	12.72 ± 0.27	12.10 ± 0.39	7.77 ± 0.10	7.44 ± 0.51	43.56 ± 0.38
แป้งมันสำปะหลัง	10.50 ± 0.07	2.35 ± 0.27	0.62 ± 0.15	7.29 ± 0.34	3.83 ± 0.15	75.91 ± 0.19
เนื้อไก่ป่น	5.37 ± 0.06	60.14 ± 2.36	14.62 ± 0.05	14.04 ± 0.34	0.44 ± 0.05	5.39 ± 0.57
สาหร่ายไส้ไก่ป่น	7.17 ± 0.24	8.05 ± 0.02	1.38 ± 0.02	40.30 ± 0.18	40.89 ± 0.34	2.21 ± 0.16
หวีดกลูเตน	6.11 ± 0.74	76.0 ± 0.54	2.46 ± 0.28	0.80 ± 0.14	0.56 ± 0.05	14.07 ± 0.35

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ 3 ซ้ำ

[2] NFE หรือ Nitrogen free extract = 100 - (% ความชื้น + % โปรตีน + % ไขมัน + % เถ้า + % เยื่อใย)

ตารางที่ 3 สูตรอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศ ระยะเวลา 8 สัปดาห์

วัตถุดิบอาหารทดลอง	ชุดการทดลอง						
	1	2	3	4	5	6	7
	0%	15%	30%	45%	60%	75%	100%
ปลาป่น	10	8.5	7	5.5	4	2.5	0
กากถั่วเหลือง	21	21	21	21	21	21	21
รำข้าว	5	5	5	5	5	5	5
แป้งมันสำปะหลัง	37.19	32.44	27.7	23.15	18.57	13.86	6.28
เนื้อไก่ป่น	20	20	20	20	20	20	20
สาหร่ายไส้ไก่ป่น	0	5.43	10.87	16.30	21.74	27.17	36.23
หวีดกลูเตน	0	0.58	1.15	1.73	2.30	2.88	3.84
น้ำมันพืช	0.8	0.9	1	1	1.02	1.1	1.1
น้ำมันปลา	0.8	0.9	1	1	1.02	1.1	1.1
วิตามินรวม[1]	1	1	1	1	1	1	1
โคลีน คลอไรด์	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
แร่ธาตุรวม[2]	3	3	3	3	3	3	3
โมโนโซเดียมฟอสเฟต	1	1	1	1	1	1	1
เมทไธโอนีน	0.11	0.15	0.18	0.22	0.26	0.29	0.35
รวม	100	100	100	100	100	100	100
พลังงานที่ย่อยได้[3] (กิโลแคโลรี/อาหาร 1 กก.)	3,470.59	3,470.06	3,470.1	3,450.19	3,470.23	3,470.46	3,460.94

[1]วิตามินผสม (กรัม/กิโลกรัมอาหาร): Thiamine (B1) 10 mg; Riboflavin (B2) 20 mg; Pyridoxine (B6) 10 mg; Cobalamin (B12) 2 mg; Retinal (A) 4,000 IU; Cholecalciferol (D3) 2,000 IU; Menadione sodium bisulfite (K3) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 50 IU; Ascorbic acid (C) 500 mg; Biotin 3 mg [2]แร่ธาตุผสม (กรัม/กิโลกรัมอาหาร): Na 0.098 ; Mg 0.758; K 2.298; Ca 1.473; Fe 0.145; Zn 0.02; Mn 0.013; Cu 2.07mg; Co 0.59 mg; I 0.45 mg [3]พลังงานที่ย่อยได้ คำนวณจาก (% โปรตีน x 4.4)+ (%ไขมัน x 9.0)+ (%คาร์โบไฮเดรต x 3.7) (กระทรวงสาธารณะสุข, 2541)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง 7 สูตร ที่ทดแทนโปรตีนด้วยสาหร่ายไส้ไก่ในระดับที่แตกต่างกัน (บนฐานน้ำหนักแห้ง)

		คุณค่าทางโภชนาการ (%)					
ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE
1	0	2.76 ± 0.66	31.00 ± 0.38	8.46 ± 0.42	13.75 ± 0.79	2.55 ± 0.12	41.48 ± 0.47
2	15	3.22 ± 0.42	31.09 ± 0.08	9.41 ± 0.73	14.66 ± 0.31	4.59 ± 0.08	37.06 ± 0.32
3	30	3.22 ± 0.53	30.03 ± 0.20	9.78 ± 0.50	16.65 ± 0.20	6.62 ± 0.07	33.70 ± 0.30
4	45	3.80 ±0.04	29.49 ± 0.57	9.73 ± 0.14	18.72 ± 0.20	8.66 ± 0.01	29.60 ± 0.19
5	60	3.03 ±0.18	30.38 ± 0.43	9.67 ± 0.01	18.78 ± 0.23	10.70 ± 0.08	27.44 ± 0.19
6	75	2.85 ±0.32	31.16 ± 0.91	9.56 ± 0.34	21.14 ± 0.20	12.74 ± 0.08	22.55 ± 0.37
7	100	3.39 ±0.13	29.90 ± 0.53	9.05 ± 0.67	23.03 ± 0.18	16.14 ± 0.02	18.49 ± 0.31

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

2.3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

2.3.2.1 แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่ได้เลี้ยงในระบบธรรมชาติ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่มีอาการตกเลือดที่บริเวณครีบ และลำตัวสีคล้ำ แสดงถึงความเครียดของปลาที่มีเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ลำตัว โดยการผ่าท้องด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic teqchique) เขี่ยเชื้อจาก ตับ ไต และสมอง มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Peres *et al.,* 2004) สุ่มเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเด่นไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น จากจานเพาะเชื้อมาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตรฟโตคอคคัส จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA^- จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อ (stock) ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ที่มีกลีเซอรีน (glycerin) ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

2.3.3.2 เตรียมวัคซีนจากเชื้อสเตรฟโตคอคคัส (Klesius *et al.,* 2000)

นำเชื้อสเตรฟโตคอคคัสบริสุทธ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ trypthic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อที่ได้ มาเลี้ยงต่อในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร TSB เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการเกลี่ยสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ้ามีการเจริญของเชื้อให้เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หากเชื้อไม่เจริญ ต่อไปจึงทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอน เทส่วนสารละลายทิ้ง และล้างด้วย phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนครบ 3 ครั้ง จากนั้นนำเชื้อที่ทำให้ตายแล้วมาทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีน โดยนำวัคซีนที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบว่าเชื้อที่เป็นวัคซีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ถ้าหากเชื้อไม่เจริญก็สามารถนำมาทำวัคซีนได้ โดยจะทำการเติมฟอร์มาลินให้ได้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

2.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.4.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกของปลา

ช่วงระหว่างทำการศึกษาวิจัยจะสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของปลา โดยตรวจสอบพฤติกรรมการยอมรับอาหารของปลานิลที่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ในระดับต่างๆในอาหารทดลอง

2.4.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักรวมของปลาทุก 2 สัปดาห์ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหารก่อนชั่งน้ำหนัก 1 มื้อ) เพื่อนำข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไปคำนวณการเจริญเติบโต นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ของทุกชุดการทดลอง พร้อมจดบันทึก ตลอดจนจบการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ อัตราการรอดตาย (survival rate) และการเจริญเติบโต ตามวิธีของ Hardy และ Barrows (2002) จากสมการ

อัตรารอดตาย (Survival rate) (เปอร์เซ็นต์) จากสมการ

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

การเจริญเติบโต คำนวณตามวิธีของ Jantrarotai และคณะ (1994) จากสมการ

น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (Weight gain)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) - น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) (เปอร์เซ็นต์/วัน) จากสมการ

$$= \frac{\text{ln น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) - ln น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{ระยะเวลา (วัน)}} \times 100$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion rate) คำนวณตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966) จากสมการ

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง}} \times 100$$

อัตราการกินอาหาร (Rate of feed intake) (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) คำนวณตามวิธีของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการ

$$\text{อัตราการกินอาหาร} = \frac{F \times 100}{\frac{W_0 + W_1}{2} \times \frac{N_0 + N_1}{2} \times t}$$

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)

N_0 = จำนวนปลาเริ่มต้น (กรัม)

W_0 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)

N_1 = จำนวนปลาสุดท้าย (กรัม)

W_1 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)

t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2.4.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนการทดลองจำนวน 10 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในตัวปลาทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า นำค่าโปรตีนที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973) จากสมการ

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio, PER)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}} \times 100$$

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (Apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีการของ Robinson และ Wilson (1985) จากสมการ

$$\text{การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ} = \frac{\text{(\% โปรตีนสิ้นสุดการทดลอง - \% โปรตีนเริ่มต้นการทดลอง)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

2.4.4 การศึกษาภูมิคุ้มกันของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ

การศึกษากลไกการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเมื่อปลาถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนหรือวัคซีน เป็นผลให้มีการผลิตแอนติบอดีซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายอยู่ในน้ำเลือด ดำเนินการโดยนำปลามาสลบด้วยน้ำมันกานพลู 100-200 ไมโครลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร จากนั้นฉีดวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* หลังจากฉีด 15 วัน จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างซีรัมมาตรวจค่า reciprocal titer ตามวิธีของ Klesius (2000) โดยเจือจางซีรัมแบบ 2 เท่า ในถาดหลุมชนิดก้นกลม (microtiter plate) จากนั้นนำแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ผสมลงในซีรัมให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C นาน 22 ชั่วโมง ศึกษาการการตกตะกอน และบันทึกผล

2.4.5 ศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศหลังได้รับอาหารทดลอง

สุ่มตัวอย่างปลาหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่ายไส้ไก่ แต่ละชุดการทดลองเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสุ่มมาชุดการทดลอง ทดลองละ 5 ตัว สลบด้วยน้ำมันกานพลู ประมาณ 2-3 นาที แล้วทำการเจาะเลือดจากบริเวณโคนหาง โดยใช้เอทีลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ เคลือบในกระบอกฉีดยา เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (กิจการ และคณะ, 2530) แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดคือ

2.4.5.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Red blood cell count, RBC) และเม็ดเลือดขาว (White blood cell count, WBC) โดยวิธีการดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973) ดังนี้ เจือจางเลือดด้วยสี Yokoyama ในอัตราส่วน 1:200 แล้วนำไปหยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (hematocytometer) นับปริมาณเม็ดเลือดขาวและแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว/เลือด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.4.5.2 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% hematocrit, Hct) โดยวิธีการดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973) โดยบรรจุเลือดใน capillary tube 2 หลอด ปั่นด้วย hematocentrifuge ด้วยความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำเลือดที่ปั่นแล้วมาวัดด้วยเครื่อง hematocrit accessory วัดค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ hematocrit

2.5 ศึกษาความต้านทานเชื้อ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำปลาทดลองจำนวน 10 ตัวต่อชุดการทดลอง ฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Streptococcus agalactiae*) ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $1x10^8$ CFU/ml (LD_{50} ที่ 14วัน) เข้าบริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 ml แล้วนำไปเลี้ยงต่อในตู้ทดลองที่จัดเตรียมไว้ สังเกตและบันทึกอัตราการตายหลังฉีดเชื้อ เป็นเวลา 14 วัน นำเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลาในแต่ละชุดการทดลองไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบจำแนกทางเดียว (One Way Analysis of Variances) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 16.0)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ลักษณะภายนอกและพฤติกรรมการกินอาหารของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร

จากการสังเกตลักษณะภายนอกของปลา และพฤติกรรมการกินอาหารของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร พบว่า ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ในระดับที่แตกต่างกันทั้ง 7 ระดับ มีการยอมรับอาหารที่ดี และปลาทุกตัวมีพฤติกรรมปกติเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (ชุดที่ไม่มีการเสริมสาหร่ายไส้ไก่ , ชุดการทดลองที่ 1)

3.1.1 การเจริญเติบโต

3.1.1.1 น้ำหนักปลาเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักปลาเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 14.78 ± 0.02 – 14.81 ± 0.01 กรัม (ตารางที่ 5) น้ำหนักของปลาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง และ เริ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ($p < 0.05$) ของการเลี้ยง โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15-100 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ย ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($p > 0.05$) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (กรัม) ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลอง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์[1]

		ระยะเวลา (สัปดาห์)				
ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	0	2	4	6	8
1	0	14.81 ±0.01	25.09 ±0.06^{ab}	37.84 ±0.32^{ab}	55.65 ±0.64^{ab}	77.61 ± 0.89^{a}
2	15	14.78 ±0.03	25.58 ±0.65^{b}	39.44 ±1.44^{b}	58.09 ±3.75^{b}	86.53 ± 3.61^{b}
3	30	14.78 ±0.02	25.39 ±0.25^{b}	39.62 ±2.43^{b}	58.32 ±3.75^{b}	80.62 ± 3.51^{ab}
4	45	14.78± 0.02	24.48 ±0.25^{ab}	36.94 ±1.09^{ab}	54.23 ±1.89^{ab}	79.89 ± 0.46^{ab}
5	60	14.79 ±0.02	25.14 ±0.46^{ab}	37.67 ±0.86^{ab}	55.11 ±2.40^{ab}	81.01 ± 2.40^{ab}
6	75	14.79± 0.02	25.32 ±0.98^{b}	38.24 ±1.92^{ab}	56.22 ±2.97^{ab}	78.01 ± 1.72^{a}
7	100	14.79 ±0.02	23.93 ±1.06^{a}	35.20 ±2.34^{a}	51.25 ±4.82^{a}	76.31 ± 5.27^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p >0.05)

3.1.1.2 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ มีค่า สูงที่สุด มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 30-60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ส่วนที่ระดับ 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มที่ลดลง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวันของปลาทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวันสูงที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 6) และชุดการทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

อัตราการกินอาหารของปลาทดลองทั้ง 7 สูตร พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการกินอาหารต่ำที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุม แต่จะมีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองอื่นๆ ($p<0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการกินอาหารสูงที่สุด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 6)

อัตราการรอดตายของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร อยู่ในช่วง 96.67 ± 2.89 – 100.00 ± 0.00 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และอัตราการรอดตาย ของปลาทดลองที่มีการแทนที่ปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ ที่แตกต่างกัน 7 ระดับ[1]

ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (เปอร์เซ็นต์/ตัว/วัน)	อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์/ตัว/วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1	0	424.26 ± 6.49^{a}	2.96 ± 0.02^{a}	3.25 ± 0.02^{ab}	98.33 ± 2.89^{a}
2	15	484.99 ± 25.68^{b}	3.15 ± 0.08^{b}	3.12 ± 0.12^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
3	30	445.27 ± 24.83^{ab}	3.03 ± 0.08^{ab}	3.43 ± 0.04^{bc}	96.67 ± 2.89^{a}
4	45	440.46 ± 4.31^{ab}	3.01 ± 0.01^{ab}	3.39 ± 0.07^{bc}	98.33 ± 2.89^{a}
5	60	447.80 ± 16.65^{ab}	3.04 ± 0.04^{ab}	3.41 ± 0.04^{bc}	98.33 ± 2.89^{a}
6	75	427.51 ± 10.47^{a}	2.97 ± 0.04^{a}	3.36 ± 0.08^{b}	100.00 ± 0.00^{a}
7	100	415.44 ± 35.15^{a}	2.93 ± 0.12^{a}	3.57 ± 0.15^{c}	100.00 ± 0.00^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์($p>0.05$)

3.1.1.3 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ของปลาที่ได้รับอาหารทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุม ส่วนชุดการทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 7)

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาทดลองที่ได้รับอาหาร ทั้ง 7 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มของประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงกว่าปลาที่ได้รับสูตรอาหารสูตรอื่นๆ และมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่รับดับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับควบคุม และชุดการทดลองอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 7)

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุม แต่ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายป่น 15 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มของการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ และมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ
1	0	1.34 ± 0.00^{ab}	2.95 ± 0.02^{ab}	47.10 ± 1.41^{a}
2	15	1.23 ± 0.07^{a}	3.04 ± 0.18^{b}	49.93 ± 3.95^{a}
3	30	1.43 ± 0.04^{bc}	2.93 ± 0.17^{ab}	47.25 ± 5.13^{a}
4	45	1.38 ± 0.03^{bc}	2.85 ± 0.19^{ab}	46.72 ± 3.69^{a}
5	60	1.39 ± 0.03^{bc}	2.86 ± 0.09^{ab}	45.59 ± 3.69^{a}
6	75	1.38 ± 0.04^{bc}	2.92 ± 0.03^{ab}	45.95 ± 1.35^{a}
7	100	1.48 ± 0.10^{c}	2.70 ± 0.12^{a}	43.84 ± 3.13^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

3.2 ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทดลองหลังได้รับอาหารทดลอง

ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทดลองที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ทั้ง 7 สูตร เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 8 แสดงไว้ใน ตารางที่ 8 โดยพบว่า ระดับของความชื้นของตัวปลาทั้ง 7 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 71.80 ± 0.87 – 72.96 ± 0.60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

โปรตีนในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 55.18 ± 0.46 - 56.52 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นทุกระดับ มีแนวโน้มทำให้โปรตีนในตัวปลาเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการมีการทดแทนโปรตีนด้วยสาหร่าย มีความแตกต่างกับชุดควบคุม (ตารางที่ 8)

ไขมันในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) โดยไขมันในตัวปลามีค่าอยู่ในช่วง 20.21 ± 0.10 – 25.02 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นทุกระดับ มีแนวโน้มลดลงเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการทดแทนโปรตีนด้วยสาหร่ายในระดับที่สูงขึ้น มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 8)

เถ้าในตัวปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นทุกระดับ มีแนวโน้มทำให้เถ้าในตัวปลาเพิ่มสูงขึ้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม ที่ไม่มีการเสริมสาหร่ายป่น (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัวหลังได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
1	0	71.80 0.87[a]	55.18 ± 0.46[a]	23.86 ± 0.13[c]	14.58 ± 0.36[a]
2	15	72.03 0.87[a]	56.52 ± 0.04[e]	22.87 ± 0.81[b]	14.78 ± 0.15[ab]
3	30	71.92 1.72[a]	55.42 ± 0.58[ab]	23.45 ± 0.10[c]	16.39 ± 0.62[d]
4	45	71.83 0.61[a]	55.80 ± 0.38[bcd]	21.99 ± 0.99[b]	16.39 ± 0.30[d]
5	60	72.31 2.36[a]	55.75 ± 0.53[abc]	22.39 ± 0.48[b]	15.51 ± 0.16[c]
6	75	72.96 0.60[a]	56.29 ± 0.09[de]	20.21 ± 0.10[a]	15.35 ± 0.37[bc]
7	100	72.15 0.60[a]	56.25 ± 0.32[cde]	20.91 ± 0.69[a]	15.65 ± 0.14[c]

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

3.3 องค์ประกอบเลือด

องค์ประกอบของเลือดปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง แสดงไว้ใน (ตารางที่ 9)

3.3.1 ค่าฮีมาโตคริตของปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับแตกต่างกันทั้ง 7 สูตร พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) มีค่าอยู่ในช่วง 27.48 ± 0.15 – 34.63 ± 1.21 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ ตั้งแต่ 30 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าฮีมาโตคริต สูงกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 9)

3.3.2 ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร มีค่าอยู่ในช่วง 4.57 ± 1.31 – 5.27 ± 0.38 $X 10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p>0.05$) (ตารางที่ 9)

3.3.3 ปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับอาหารที่มีทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น ทุกระดับมีแนวโน้มทำให้ค่าเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น แตกต่างกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเสริมสาหร่ายในอาหาร โดยมีค่าอยู่ในช่วง 11.82 ± 1.84 – 15.83 ± 2.41 $X 10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบเลือดปลาที่ได้รับอาหารทดลอง[1]

ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	ฮีมาโตคริต (เปอร์เซ็นต์)	เม็ดเลือดแดง ($X10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เม็ดเลือดขาว ($X10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
1	0	27.48 ± 0.15^{a}	4.85 ± 0.88^{a}	11.82 ± 1.84^{a}
2	15	28.76 ± 0.39^{a}	4.87 ± 0.58^{a}	12.86 ± 1.95^{ab}
3	30	34.63 ± 1.21^{b}	5.01 ± 0.56^{a}	15.83 ± 2.41^{b}
4	45	33.99 ± 0.41^{b}	4.74 ± 0.94^{a}	14.46 ± 1.79^{ab}
5	60	34.32 ± 0.89^{b}	5.13 ± 0.71^{a}	14.33 ± 1.12^{ab}
6	75	34.54 ± 1.87^{b}	4.57 ± 1.31^{a}	14.83 ± 1.71^{ab}
7	100	34.38 ± 1.78^{b}	5.27 ± 0.38^{a}	15.36 ± 2.71^{b}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

3.4 ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์

ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ของปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ทั้ง 7 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) มีค่าอยู่ในช่วง $3.27 \pm 0.87 - 4.85 \pm 0.57$ โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ 15-75 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ไม่ต่างกับชุดควบคุม ($p>0.05$) ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ ต่ำที่สุด และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม

ตารางที่ 10 ค่าแอนติบอดี (antibody titer) รายงานในรูปแบบ reciprocal titer ของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารทดลอง ที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ในระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลองที่	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์
1	0	4.30 ± 0.58^{b}
2	15	4.16 ± 0.69^{b}
3	30	4.65 ± 0.52^{b}
4	45	4.85 ± 0.57^{b}
5	60	4.62 ± 0.72^{b}
6	75	4.85 ± 0.49^{b}
7	100	3.27 ± 0.87^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

3.5 Lysozyme activity และค่า NBT reduction ของปลานิลแดง

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มี Lysozyme activity อยู่ในช่วง 9.50 ± 0.04 – 10.99 ± 0.68 ยูนิตต่อวินาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง โดยปลาได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นทุกระดับ มีแนวโน้มของค่าไลโซไซม์ แอคติวิตี้ ต่ำกว่าชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 8 มีค่าการปล่อยซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (NBT reduction) อยู่ในช่วง 0.139 ± 0.02 – 0.22 ± 0.04 O.D โดยพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการปล่อยซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนสูงที่สุด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p<0.05$) ส่วนปลาทดลองที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ที่ระดับอื่นๆ (15, 45, 60, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์) มีค่าแนวโน้มสูงกว่า ชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 Lysozyme activity และค่า NBT reduction ของปลานิลแดงที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	Lysozyme activity (ยูนิตต่อวินาที)	NBT reduction (O.D)
1	0	10.99 ± 0.68^{a}	0.14 ± 0.02^{a}
2	15	10.66 ± 1.06^{a}	0.14 ± 0.03^{a}
3	30	9.63 ± 1.14^{a}	0.22 ± 0.04^{b}
4	45	9.74 ± 1.16^{a}	0.17 ± 0.03^{a}
5	60	9.90 ± 0.37^{a}	0.14 ± 0.02^{a}
6	75	9.50 ± 0.04^{a}	0.15 ± 0.03^{a}
7	100	9.88 ± 0.90^{a}	0.15 ± 0.03^{a}

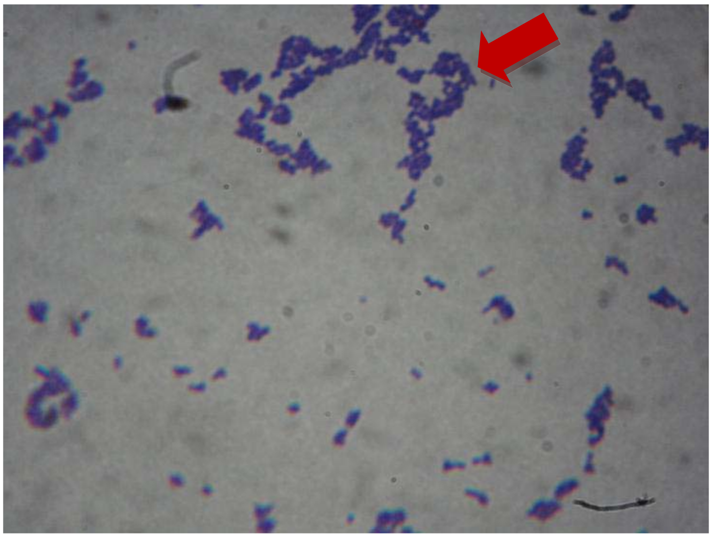
[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

3.6 ความต้านทานเชื้อในปลานิล

อัตราการรอดตายของปลาทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ด้วยการฉีด เป็นเวลา 14 วัน อยู่ในช่วง 55.56 ± 38.49 – 77.78 ± 19.25 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ทุกระดับ มีแนวโน้มของอัตราการรอดตายสูงกว่า ชุดควบคุมที่ไม่มีการเสริมสาหร่าย ($p>0.05$) (ตารางที่ 12)

ภาพที่1 ปลานิลมีตาขุ่นขาวที่เกิดจากการติด *Streptococcus agalactiae* หลังจากฉีดเชื้อ 14 วัน



ภาพที่2 ลักษณะการเรียงตัวของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ย้อมแกรม พบในปลานิลหลังมีการฉีดเชื้อ 14 วัน ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X

ตารางที่ 12 อัตราการรอดตายของปลานิลแดงหลังมีการฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 14 วัน

ชุดการทดลอง	ทดแทนโปรตีนปลาป่น (%)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1	0	55.56 ± 38.49[a]
2	15	77.78 ± 19.25[a]
3	30	66.67 ± 33.33[a]
4	45	77.78 ± 19.25[a]
5	60	66.67 ± 0.00[a]
6	75	66.67 ± 0.00[a]
7	100	66.67 ± 33.33[a]

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบทางเคมี และอัตราการรอดตาย

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารซึ่งมีการแทนที่ปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น 15-100 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($p>0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการแทนที่ปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่น 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก มีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด แตกต่างจากชุดควบคุม ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่มีการทดแทนโปรตีนจากปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่ระดับ 30, 45 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้สามารถทดแทนปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ป่นได้สูงสุดไม่ควรเกิน 60 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่จะช่วยเสริมการเจริญเติบโตของปลานิลแดง หรือคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณสาหร่ายที่สามารถเสริมลงไป เพราะเห็นได้ชัดเจนว่าเมื่อเสริมลงไปในอาหารตั้งแต่ 75 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป แนวโน้มการเจริญเติบโตเริ่ม และประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง แม้ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมก็ตาม ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Hiskia และคณะ (2011) ที่พบว่า การเสริมสาหร่ายไส้ไก่ป่น (*Enteromorpha prolifera*) ทดแทนโปรตีนในอาหารปลา yellow croaker ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้ปลามีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มระดับสาหร่ายในอาหารขึ้นเป็น 10, 15 เปอร์เซ็นต์ กลับพบว่าการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง ทั้งนี้ปลา yellow croaker เป็นปลากินเนื้อจึงทำให้ความสามารถของการนำสารอาหาร ที่มีส่วนผสมของพืชไปใช้ประโยชน์ได้น้อยกว่าปลากินพืช เพราะปลากินเนื้อมีการหลั่งน้ำย่อยออกจากตับอ่อนเท่านั้นในขณะที่ปลากินพืชจะมีการหลั่งน้ำย่อยตลอดทางเดินอาหาร (Steffens, 1989) จึงส่งผลให้มีการย่อยวัตถุดิบจากพืชได้ดีกว่า ประการที่ 2 การสร้างสูตรอาหารในครั้งนี้ไม่มีการปรับความสมดุลของเมทไธโอนีนในอาหารจึงส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตได้ด้วยเช่นเดียวกัน เนื่องจากการขาดเมทไธโอนีนจะส่งผลต่อการสังเคราะห์สารประกอบตัวอื่นอีกหลายชนิดเช่น โฮโมซีสเตอีน ซีสเตอีน คาร์นิทีน ทอรีน ครีเอติน โคลีน เลซิติน ฟอสฟาติดิลโคลีน และฟอสโฟลิปิด หากสารประกอบเหล่านี้มีสัดส่วนไม่สมดุลกับความต้องการของร่างกาย จะส่งผลให้กระบวนการเมทาบอลิซึมของกรดอะมิโนเมทไธโอนีนผิดปกติ และส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ได้

(Scott *et al*., 1982) และยังพบว่า การขาดเมทไธโอนีนยังส่งผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงมากกว่าการขาดไลซีน (Sugahara *et al*., 1969) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้วัตถุดิบพืชในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ขาดสารอาหารบางชนิด ที่มีในปริมาณน้อยในพืชเช่นเมทไธโอนีน กับที่มีมากแต่สัตว์น้ำนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยอย่างฟอสฟอรัส ในวัตถุดิบพืช ซึ่งฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปของกรดไฟติก ทำให้สัตว์น้ำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย (NRC, 1993) ส่วนองค์ประกอบทางโภชนาการของตัวปลาหลังการทดลองที่ได้รับอาหารที่ทดแทนโปรตีนปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนในตัวสูงสุดเทียบกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้ ส่วนไขมัน และแร่ธาตุมีความแตกต่างกัน คือการทดลองของ Hiskia และคณะ (2011) พบว่า ไขมันในตัวสูงขึ้นในขณะที่แร่ธาตุในตัวปลาไม่มีความแตกต่าง แต่การทดลองครั้งนี้กลับพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนสาหร่ายในระดับที่เพิ่มขึ้นแนวโน้มครั้งนี้ทำให้ไขมันในตัวลดลง ซึ่ง Guillaume และ Choubert (2001) ได้อธิบายว่า ไซโฟนิน ที่พบในสาหร่ายจะไปรบกวนและขัดขวางการดูดซึมของไขมันในอาหารและขัดขวางการทำให้แตกตัวของไขมันของถุงน้ำดีอีกด้วย ส่งผลทำให้ปลาไม่สามารถใช้ไขมันจากอาหารได้อย่างเต็มที่ ด้วยเหตุนี้ทำให้พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนสาหร่ายในระดับที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้การสะสมไขมันในตัวลดลง และเช่นเดียวกับ Wong และคณะ (1999) ที่พบว่า หนูที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาหร่าย *Hypnea charoides* และ *Ulva* sp. ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้ปริมาณ คอเลสเตอรอลทั้งหมด (total cholesterol) ในตัวลดลง เป็นในทิศทางเดียวกับ Guroy และคณะ (2007) ที่พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนสาหร่าย *Ulva rigida* กับ *Cystoseira barbata* ที่ระดับสูงสุดคือ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในอาหาร ทำให้ระดับของไขมันในซากปลาลดลง เช่นเดียวกับ Morehouse และคณะ (1999) ที่พบว่า อาหารสัตว์ที่ประกอบด้วยซาโปนิน สามารถลดคอเลสเตอรอลที่อยู่ในพลาสมาและลดคอเลสเตอรอลในตับได้ เมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการทดแทนสาหร่ายในอาหารที่เพิ่มขึ้น ส่วนการศึกษาครั้งนี้พบว่า แร่ธาตุมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนสาหร่ายเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเสริมสาหร่าย แตกต่างกับการศึกษาของ Yildirim และคณะ (2009) ที่ศึกษาผลของสาหร่ายทะเล 2 ชนิด คือ สาหร่ายผักกาดทะเล กับสาหร่ายไส้ไก่ ที่มีผลต่อความน่ากินของอาหาร การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางโภชนาการในปลาเรนโบเทราท์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่ทดแทนโปรตีนด้วยสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร ทำให้การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเสริมสาหร่าย ส่วนองค์ประกอบทางโภชนาการของตัวปลา เช่นโปรตีน ไขมัน และเถ้ามีค่าเพิ่มสูงขึ้นทุกชุดการทดลองเทียบกับปลาเริ่มต้น ซึ่งการทดลองของ Yildirim และคณะ (2009) ครั้งนี้ที่ไม่ส่งผลในทางบวกเป็นเพราะว่าใช้ปลาเรนโบเทราท์ซึ่งเป็นปลา

กินเนื้อเช่นเดียวกันในการทดลองทำให้ความสามารถของการนำสารอาหารจากพืชไปใช้ประโยชน์ลดลงเช่นเดียวกัน ส่วนองค์ประกอบทางโภชนาการของปลา พบว่า มีความใกล้เคียงกันในส่วนของไขมันในตัวปลาที่พบว่า การเสริมสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ส่งผลทำให้ไขมันในตัวลดลง ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ ส่วนโปรตีน และเถ้า พบว่า มีความแตกต่างกันโดย Yildirim และคณะ (2009) พบว่าโปรตีนในตัวไม่มีความแตกต่าง ส่วนเถ้า กลับพบว่า มีแนวโน้มที่ลดลงในตัวปลาที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yousif และคณะ (2004) ที่พบว่า การเสริมสาหร่ายไส้ไก่ป่นในอาหาร 0 (ชุดควบคุม), 10, 20 และ30 โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญเติบโตของปลาสลิดหินจุดขาว (*Siganus cunalicalatus*) ต่ำกว่าชุดควบคุม ที่ไม่ได้เสริมสาหร่าย ส่วน Guroy และคณะ (2007) พบว่า การเสริมสาหร่าย *Ulva* sp. ป่นในอาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลในทางลบ ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบทางโภชนาการของตัวปลา และยังพบอีกว่าการเสริมสาหร่าย *Ulva* sp. ลงไปในอาหารในช่วง 2.5-5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร ทำให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในอาหารได้ดียิ่งขึ้น แต่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Diler และคณะ (2007) ที่พบว่า การเสริมสาหร่ายผักกาดในอาหาร 5-15 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลาไน (*Cyprinus capio*) แต่ในทางกลับกัน การเสริมสาหร่ายผักกาดในอาหารยังช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตได้อีก เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเสริมสาหร่าย ซึ่งจะเห็นว่าหลายๆงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาการใช้สาหร่ายในอาหารปลานั้น ส่วนใหญ่สามารถทดแทนสูงสุดได้ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายจากต่างแหล่งมีค่าที่แตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน แม้กระทั่งแร่ธาตุ ซึ่งก็เป็นอีกสาเหตุที่ทำให้การแทนที่ได้ไม่มาก ประกอบกับชนิดปลาที่ใช้ในการทดลอง ส่วนใหญ่ใช้ปลากินเนื้อมากกว่า กินพืช เช่นเดียวกับ Mustafa และคณะ (1995) ที่ได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาเรดซีบรีม (red sea bream) ระยะปลานิ้ว ที่ใช้สาหร่าย 3 ชนิด ได้แก่ *Ascophyllum nodosum, Porphyra yezeoensis* และ *Ulva pertusa* ในอาหารทดลอง พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารทดลองที่มีการทดแทนโปรตีนจากสาหร่ายป่น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักมีการเจริญเติบโตดีสุด เช่นเดียวกับกับการศึกษาของ Guroy และคณะ (2007) ที่ศึกษาผลของสาหร่าย 2 ชนิด คือ *Ulva rigida* กับ *Cystoseira barbata* ป่นในอาหารปลานิล พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการทดแทนโปรตีนด้วยสาหร่ายทะเลทั้งสองชนิดที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แตกต่างเดียวกับการศึกษาของ Deveis และคณะ (1997) ที่ศึกษาผลของสาหร่าย *Porphyra purpurea* ทดแทนโปรตีนปลาป่นในอาหารปลากระบอก (*Parupeneus cinnabarins*) 2 ระดับ คือ 9 กับ 18 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาหร่ายทั้ง 2 ระดับ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ต่ำกว่า ชุดที่ไม่มี

การเสริมสาหร่าย ทั้งนี้ผู้วิจัยเห็นว่า ความไม่สมดุลของสารอาหารโดยเฉพาะอาหารที่มีการใช้วัตถุดิบพืชในปริมาณที่ค่อนข้างสูงทำให้แร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อปลาในอาหารไม่เพียงพอ เช่น ฟอสฟอรัส และ เมทไธโอนีน เนื่องจากในพืชจะพบ ไฟติก ในปริมาณสูง และจะไปยับยั้งการปลดปล่อยของแร่ธาตุในพืช ส่งผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงจากการรายงานของ Azaza และคณะ (2008) พบว่า การเสริมสาหร่ายผักกาดป่นลงไปในอาหารในระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีสารต้านโภชนาการจำพวก ไซโฟนิน 1.13 เปอร์เซ็นต์ แทนนิน 0.16 เปอร์เซ็นต์ และกรดไฟติก 0.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเป็นตัวขัดขวางการดูดซึมสารอาหาร ฉะนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องสร้างสูตรอาหารให้มีความสมดุล โดย Phromkunthong และ Udom (2008) พบว่า อาหารสำหรับปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้วัตถุดิบจากพืชทั้งหมดเป็นแหล่งโปรตีนหลักควรมีฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ในช่วง 0.76 ถึง 0.79 เปอร์เซ็นต์ และเมทไธโอนีน 0.75 เปอร์เซ็นต์ (Santiago and Lovell, 1988) Robinson และคณะ (1988) พบว่า ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลานิล *(Oreochromis niloticus*) อยู่ที่ระดับ 0.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของปลาและส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารทดลองด้วย ส่วน Watanabe และคณะ (1980) พบว่า ความต้องการฟอสฟอรัสในอาหารปลานิลประมาณ 0.9 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ phosphoproteins, nucleic acid และphospholipids ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเผาผลาญพลังงาน (Wee and Shu, 1989) นอกจากนี้ชนิดของปลาก็มีผลต่อการใช้วัตถุดิบเช่นกัน ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Wassef และคณะ (2001) ที่พบว่า ระดับสูงสุดของสาหร่ายป่นในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากระบอก (*Mugil dussumieri*) ทำให้การเจริญเติบโตดี และการสะสมโปรตีนในตัวสูงสุดคือ ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาหร่าย 20 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร

4.2 ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

ระบบภูมิคุ้มกันของปลาโดยธรรมชาติจะมี 2 แบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษา องค์ประกอบที่เป็นตัวบ่งชี้ของระบบภูมคุ้มกันทั้ง 2 แบบ จากผลการทดลอง พบว่า ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดขาว ค่า NBT reduction และอัตราการรอดตายของปลาหลังฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* 14 วัน มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ยกเว้นค่า ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ พบว่า การทดแทนโปรตีนปลาป่นด้วยสาหร่ายไส้ไก่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tutsuk และคณะ (2011) ที่พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาหร่าย สไปรูไลนา กับ สาหร่ายไก สามารถช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในปลาทองได้ โดยจะไปเพิ่ม ค่าฮีมาโตคริต และการจับ

กินของเม็ดเลือดขาว และสอดคล้องกับการทดลองของ Shieh-Tsung และคณะ (2008) ที่เสริม sodium alginate ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะรัง (*Epinephelus fuscoguttatus*) ระยะปลานิ้ว พบว่า ทำให้อัตราการรอดตายหลังฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. และค่าสุขภาพของปลา เช่น คอมพลีเม้นต์ แอคติวิตี การจับกินของฟาโกซัยด์ และNBT reduction เพิ่มสูงขึ้น ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริม sodium alginate 1 หรือ 2 กรัม/กิโลกรัมอาหาร เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับอาหารที่มีการเสริม sodium alginate ทั้งนี้เนื่องจากในสาหร่ายมี polysaccharide ที่เป็นตัวส่งเสริมให้ระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น ซึ่ง Skjermo และคณะ (1995) พบว่า โพลีแซคคาไรด์ จากสาหร่ายทะเลสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านทานเชื้อโรคในปลาได้ เช่น alginate, fucoidan พบในสาหร่ายสีน้ำตาล (*Ascophyllum nodosum*) ช่วยเพิ่มอัตราการรอดตาย และความต้านทานเชื้อ *Vibrio anguillarum* ในปลาลิ้นหมา (*Brachirus harmandi*) ระยะวัยอ่อนได้ ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ในสาหร่ายทะเลประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ (Perecival, 1975) ซึ่งโพลีแซคคาไรด์เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีความสัมพันธ์กับการต้านทานเชื้อที่ดี โดยลักษณะของกลุ่มซัลเฟตจะมีรูปแบบที่แตกต่างกัน และมีสรรพคุณในการต้านไวรัส ต้านการจับตัวเป็นก้อนของเลือด สารต้านเนื้องอก และกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก โพลีแซคคาไรด์ ที่พบในสาหร่ายจะมีผนังของเซลล์คล้ายกับผนังของเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อร่างกาย หรือตัวปลาได้รับสาหร่าย ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันกระตุ้นการสร้าง บีลิมโฟไซด์ ที่บริเวณม้าม และไขสันหลัง เพื่อกำจัดและจดจำ (memory) เมื่อได้รับเชื้อโรคจะมีการตอบสนองที่เร็วขึ้น (Sakai, 1999) โพลีแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อการย่อยของเอนไซม์ในลำไส้เล็ก มีความสำคัญที่ใช้เป็นแหล่งของเยื่อใยในอาหารและยังเป็นแหล่งของ prebiotic ที่ช่วยในการขัดขวางการย่อยที่มากเกินไปในท่อทางเดินอาหาร (Delzenne and Kok, 2007) สอดคล้องกับการศึกษาของ วุฒิพร และอัญชลี (2548) ที่พบว่า การเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาทดแทนโปรตีนปลาป่น ที่ระดับ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปลาดุกพันธ์ผสม ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มสูงขึ้น ทุกชุดการทดลองที่มีการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจาก ในสาหร่ายจะมีสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาไม่ว่าจะเป็นวิตามินเอ วิตามินอี วิตามินซี และคาโรทีนอยด์, (Hughes, 2001) แม้กระทั่งสารสกัดจากสาหร่ายจำพวก คาราจีแนน อัลจิเนท และโพลีแซคคาไรด์ (Skjermo *et al*., 1995) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chitmanat (2011) พบว่า แคโรทีนอยด์เป็นสารที่ช่วยให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อต้านเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และยังช่วยให้ปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวของปลานิลเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Sudagar และ Hajibeglou (2010) ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชที่

ผสมในอาหารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาไน (*Cyprinus capio*) พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบิน มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีการเสริมสารสกัดจากพืชในอาหารเทียบกับชุดควบคุม เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Duncan และ Klesius (1996) พบว่า เม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซท์ (lymphocyte) เพิ่มขึ้นเมื่อปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*)ได้รับอาหารที่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 2.7 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร และไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Rosario และคณะ (2004) พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายมีผลต่อการปล่อยค่าการปล่อยซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (NBT reduction) ของฟาโกไซด์ในปลาลิ้นหมา (*Brachirus harmandi*) ซึ่งได้มีการศึกษาในสาหร่ายทะเล 8 ชนิด รวมทั้งสาหร่ายไส้ไก่ พบว่า สารสกัดจำพวกโพลีแซคคาไรด์ที่พบในสาหร่ายมีแนวโน้มช่วยกระตุ้นทำให้ค่าการปล่อยซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของฟาโกไซด์ในปลาลิ้นหมาเพิ่ม เช่นเดียวกับ Peddie และคณะ (2002) ที่ศึกษาสาร alginic acid ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล พบว่าช่วยเพิ่มระดับของนิวโทรฟิว ฟาโกไซโตซิส NBT reduction และเพิ่มการแสดงออกของ interleukins ในปลาเรนโบเทราท์ เช่นเดียวกับ Tsuneo และ Nobuo (1981) ศึกษาสารสกัดจากสาหร่ายไส้ไก่(*Enteromorpha linza*) ที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจำพวกสารสี (pigment) ที่พบในสาหร่าย เช่น yellow และ orange pigment สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และยับยั้งจำพวกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเค็มได้ เช่นเดียวกับ Fujiki และ Yano (1997) พบว่าปลาไนที่ได้รับการฉีดสาร คาร์ราจีแนนที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง (*Chondrus ocellatus*) ช่วยต้านโรค *Edwarsiella tarda* กับโรค *Aeromonas hydrophila* เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับปลาชุดควบคุมที่ไม่มีการฉีด สอดคล้องกับการศึกษาของ MacAllister (2009) พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายทะเล เช่น phlorotannins ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Ascophyllum nodosum*) สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งสาร phlorotannins ที่พบในสาหร่ายจะมีโครงสร้างที่ประกอบด้วย phloroglucinal-based phenolics (1,3,5-trihydroxybenzene) แต่จะพบในปริมาณสูงในสาหร่ายสีน้ำตาลมากกว่าชนิดอื่น (Targett and Arnold, 1998) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกระตุ้นที่ดี แต่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ อุดมนันท์ (2549) ศึกษาผลของแคโรทีนอยด์สังเคราะห์และสาหร่ายสไปรูไลต่อการเจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ และภูมิคุ้มกันในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่ายสไปรูไลนา มีค่าฮีมาโตคริต ไม่แตกต่างกัน ส่วนเม็ดเลือดแดงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเทียบกับชุดควบคุม

ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมสาหร่ายไส้ไก่ป่นลงไปในอาหารนอกจากจะช่วยในส่วนของการเจริญเติบโตแล้ว ยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาได้เป็นอย่างดี ซึ่งพิสูจน์แล้วจากหลายๆงานวิจัยที่ได้กล่าวข้างต้น รวมทั้งงานวิจัยนี้ที่ได้ศึกษาการใช้สาหร่ายไส้ไก่ทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารปลานิลแดง

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

5.1.1 การใช้สาหร่ายไส้ไก่ป่นทดแทนโปรตีนจากปลาป่นสามารถทดแทนได้สูงสุดไม่ควรเกิน 60 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร ที่สามารถช่วยเสริมการเจริญเติบโต หรือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของปริมาณสาหร่าย แต่การทดแทนที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้มีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหาร ดีที่สุด

5.1.2 การเสริมสาหร่ายไส้ไก่ป่นทดแทนโปรตีนปลาป่นในอาหาร 15-75 เปอร์เซ็นต์ ช่วยปรับปรุงสุขภาพของสัตว์น้ำให้เพิ่มสูงขึ้น เช่น ทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count) และค่าการปล่อยซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (NBT reduction) มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5.1.3 การเสริมสาหร่ายไส้ไก่ป่นทดแทนโปรตีนปลาป่นในอาหารทุกระดับ 15-100 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลทำให้อัตราการรอดตายมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น หลังฉีดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เป็นเวลา 14 วัน แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายไส้ไก่ที่เสริมในอาหารมีผลต่อการต้านทานเชื้อชนิดนี้ของปลานิลแดงแปลงเพศ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยสารอาหารของสาหร่ายไส้ไก่เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างสูตรอาหารที่ใช้สาหร่ายชนิดนี้ต่อไป

5.2.2 ปัจจุบันยัง พบว่าสาหร่ายไส้ไก่ป่นที่นำมาใช้ในอาหารสัตว์น้ำยังมีข้อจำกัด เนื่องจากราคาสูง หากมีการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะเลี้ยงสาหร่ายเอง จะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิต และลดผลกระทบจากการนำสาหร่ายจากธรรมชาติมาใช้เป็นอาหารปลา

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณะสุข. 2541. ฉลากโภชนาการ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 182. กระทรวงสาธารณะสุข.

กรมประมง. 2553. ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล 2553 – 2557. กองประมงต่างประเทศ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมประมง. 2541. คู่มือการเพาะเลี้ยงปลานิลเพศผู้สายพันธุ์จิตรลดา 2. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมประมง. 2526. ปลานิลสีแดง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 17. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กิจการ ศุภมาตย์, เยาวนิตย์ ดนยดล และ สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2530. การศึกษาองค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาว. ว. สงขลานครินทร์ 9: 59-68.

คมคาย ลาวัณยวุฒิ, สุภาพร วโรทัยพันธุ์ และอัศวิน แก้วคง. 2544. Calcium, Phosphorus and Iron quantities of seaweed in Thailand. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 27 กลุ่มวิชาการ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.

จิราพร เกษรจันทร์. 2526. เปรียบเทียบการสร้างแอนติบอดีและภูมิคุ้มกันโรคในปลาดุกด้านภายหลังการฉีดวัคซีนที่แตกต่างกัน 2 ชนิด. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิราพร เกสรจันทร์ และเยาวนิตย์ ดนยดล. 2529. *Streptococcus* sp. กับโรคในปลาบู่ทราย. ว. สงขลานครินทร์ (วทท) 8: 329-332.

ชนัดดา เกตุมา, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, จริยาวดี สุริยพันธุ์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, เดชานาท ทองพิทักษ์ และ ประยูร หงส์รัตน์. 2551. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46, 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551. น. 200 - 209.

นิลุบล กิจอันเจริญ ชุติมา หาญจวณิช นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. ว. มหาวิทยาลัยขอนแก่น 11: 53 – 61.

นวลมณี พงศ์ธนา และ พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล. 2538. การทดลองเพาะเลี้ยงปลานิลเพศผู้ GMT. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เนตรชนก เจริญลาภ, มนทกานต์ ท้ามติ้น, บัญญัติ ศิริธนาวงศ์ และสุพิศ ทองรอด. 2550. โปรตีนในอาหารสำเร็จรูปสำหรับปลาดุกทะเล. เพชรบุรี: เอกสารวิชาการฉบับที่ 6 สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ, อรุ่น เกียรติวุฒิ, เทิด เทศประทีป และ พิเคราะห์ อาจทรงคุณ. 2524. วิทยาภูมิคุ้มกัน: วัคซีนและประยุกต์ใช้ทางสัตวแพทย์. สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ใน พระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.

ประยูร หงส์รัตน์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และ ชัชรี แก้วสุรลิขิต. 2549. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำร่วมกับสาหร่ายไส้ไก่. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

พรรณศรี จริโมภาศ. 2531. ปลานิลสีแดงสายพันธุ์ไทย. ว. การประมง 41: 41-43.

แพรพรรณ ห้องทองแดง และดรุณี กอเซาะ. 2542. คู่มือการวิเคราะห์อาหารสัตว์ทางกล้องจุลทรรศน์ เล่ม 1: วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีน. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สุภัทรา อุไรวรรณ และ พรรณศรี เชิดชูพรรณเสวี. 2530. ปลานิลสีแดง. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 10. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ระพีพร เรืองช่วย. 2537. ความชุกชุมและวงจรสืบพันธุ์ของสาหร่ายวุ้น 2 ชนิด ในอ่าวปัตตานี. ปัตตานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

วลีรัตน์ มูสิกะสังข์ และพุทธ ส่องแสงจินดา. 2547. ประสิทธิภาพและดุลไนโตรเจนของการบำบัดจากบ่อเลี้ยงระบบหมุนเวียนโดยใช้สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera* J. Agardh). เอกสารวิชาการฉบับที่ 71/2547. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา, กรมประมง.

วิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์. 2538. ศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายผมนาง Gracilaria fisheri (Xia & Abbott) Abbott, Zhang & Xia ร่วมกับปลานิลสีแดง *Oreochromis niloticus* (Lin). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์ และอรุณ มีกิริยา. 2539. การเลี้ยงสาหร่ายผมนาง *Gracilaria fisheri* (Xia & Abbott, Zhang & Xia) ที่มีความหนาแน่น 2 ระดับร่วมกับปลานิลสีแดง, *Oreochromis*

niloticus (Linn). เอกสารวิชาการฉบับที่ 28/2539. จันทบุรี: ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. ชลบุรี: ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ศักยภาพการผลิตและการตลาดปลานิล. เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ 119. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สถาพร ดิเรกบุษราคม และเยาวนิตย์ ดนยดล. 2530. โรคระบาดที่เกิดจาก non-hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/2530. สงขลา: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. สาหร่าย ศักยภาพและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย. เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการ “อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ” สกว. ชุดที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์สุขภาพและโภชนาการไทย. 2554. เหล็ก. Available: http//www.nutritionthailand.com. Accessed: 20 December 2010.

อุดมนันท์ อุดม. 2549. ผลของคาโรทีนอยด์สังเคราะห์และสไปรูไลนาต่อการเจริญเติบโต การสะสมคาโรทีนอยด์ และภูมิคุ้มกันในปลานิลแดงแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aguilera-Morales, M., Casas-Valdez, M., Carrillo-Dominguez, S., Gonzalez-Acosta, B. and Perez-Gil, F. 2005. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. J. Food Compos. Anal. 18: 79-88.

Alexis, M.N. 1997. Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. *In*: Tacon, A.G.J., Basurco, B. (Eds.), Feeding Tomorrow's FishCahiers Options Mèditerranéennes, Zaragoza:CIHEAM-IAMZ. 22: 183–204.

Amany, M.H. 2000. The biochemical composition of *Enteromorpha* spp. from the Gulf of Gdansk coast on the southern Baltic Sea. NIOF. 42: 19-28.

Amar, EC., Kiron, V., Satoh, S., and Watanabe, T. 2004. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Res. 32:162–173.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

Appler, H.N. 1985. Evaluation of *Hydrodictyon reticulatum* as protein source in feeds for *Oreochromis niloticus* and Tilapia zillii. J. Fish Biol. 27: 327–334.

Azaza, M.S., Mensi, F., Ksouri, J., Dhraief, M.N., Brini, B., Abdelmouleh, A.I. and Ai Kraiem, M.M. 2008. Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae Ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of southern Tunisia. J. Appl. Ichthyol. 24: 202-207.

Bairai, A., Sarker, K., Ghosh, S., Sen, K. and Ray A.K. 2002. Duckweed (*Lemna polyrhiza*) leaf meal as a source of feedstuff in formulated diets for rohu (*Labeo rohita* Ham.) fingerlings after fermentation with a fish intestinal bacterium. Bioresour. Technol. 85: 17-24.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5: 771-781.

Budd, G.C. and Pizzola, P. 2002. *Enteromorpha intestinalis.* Gut weed. Marine life information network: Biology and Sensitivity key information subprogram [on line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. Available from: http://www.marlin.ac.uk/species/Ulvaintestinalis.htm. Accessed: 10 November 2003.

Buschmann, A.H., Correa, J.A., Westermeier, R., Hernández-González, M., Norambuena, R. 2001. Red algal farming in Chile: a review. Aquaculture 194: 203–220.

Byamungu, N., Darras, V.M. and Kuhn, E.R. 2001. Growth of heat-shock induced triploids of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) reared in tanks and in pond in eastern Congo: Feeding regimes and compensatory growth response of triploid female. Aquaculture 198: 109-122.

Charreau, B. 1997. Efficiency of fucans in protecting porcine endothelial cells against complement activation and lysis by human serum. Transplantation Proceedings, 29: 889-890.

Chitmanat, C. 2011. Ornamentfish diseases. [Internet]. Available from: http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/index.php?action=main&id=16&os_c_ id=1 &Category=. Thai. Accessed: 6 May 2011.

Chou, B.S. and Shiau, S.Y. 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Aquaculture 143: 185-195.

Citarasu, T., Venket Ramalingam, K., Raja Jeya Sekar, R., Micheal Babu, M., Marian, MP. 2003. Influence of the antibacterial herbs, Solanum trilobatum, Andrographis paniculata and Psoralea corylifolia on the survival, growth and bacterial load of Penaeus monodon post larvae. Aquaculture Int. 11: 583–595.

Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J. 1997. Nonspecific deference mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). J. of Fish Disease 20: 241-271.

Davies, S.J., Brown, M.T. and Camilleri, M. 1997. Preliminary assessment of the seaweed *Porphyra purpurea* in artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrows*). Aquaculture 152: 249-258.

Dawes, C.J. 1998. Marine Botany. Washington DC: John Wiley and Sons, Inc.

Delzenne, N.M. and N. Kok. 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism, Am. J. Clin. Nutr. Suppl. 73: 456–458.

Dias, J. 1999. Lipid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Eropean seabass (*Dicentrarchus labrax*): Nutritional regulation of hepatic lipogenesis. PhD Thesis. Instituto de Ciencias Biomedicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.

Diler, I., Adem, T.A., Guroy, D., Guroy, B.K. and Murat, S. 2007. Effect of *Ulva rigida* on the growth, feed intake and body composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Biol. Sci. 7: 305-308.

Dodson S.V., Haft, R. J. and Hickey, E. K. 1999. Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. J. of Fish Disease 22: 331-336.

Duncan, P.L. and P.H. Klesius. 1996. Effects of feeding spirulina on specific and nonspecific immune responses of Channel catfish. J. Aquatic Anim. Health 8: 308-313.

Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1966. Response of Channel Catfish Fingerling to Different Levels of Major Nutrients in Purified Diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlife. Tech. Pap. No. 9.

El-Deek A.A., and Mervat A. Brikaa. 2009. Nutritional and Biological Evaluation of Marine Seaweed as a Feedstuff and as a Pellet Binder in Poultry Diet. Inter. J. Poultry Scie. 8: 875-881.

Ellis, A.E. 1988. Difference between the immune mechanism of fish and higher vertebrate. *In* Microbial Diseases of Fish. (ed. R.J. Roberts) pp. 1-30. London: Academic Press.

El-Shafai, S.A., Gijen, H.J., Nasr, F.A. and El-Gohary, F.A. 2004. Microbial quality of tilapia reared in fecal-contaminated ponds. Environ. Res. 95: 231-238.

El-Sayed, A.F.M. 1992. Effect of substituting fish meal with *Azolla pinnata* in practical diets for fingerlings and adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture Manag. 23: 167-173.

El-Sayed, A.F.M. 1998. Total replacement of fish meal with animal protein source in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) feeds. Aquaculture Res. 29: 275-280.

El-Sayed, A.M. and S.I. Teshima, 1992. Protein and energy requirements of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fry. Aquaculture 103: 55-63.

Ergun, S., Soyuturk, M., Guroy, B., Guroy, D. and Merrifield, D. 2008. Influence of Ulva meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) at two levels of dietary lipid. Int. Aquaculture. 7: 355-361.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. Fish stat plus, Universal software for fishery statistical time series at http://www.fao.org/fi/statist. Accessed: 27 March 2009.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome, Italy. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/*Oreochromis_niloticus*. Accessed: 19 May 2006.

Fasakin, E.A., Balogun, E.M. and Fasuru, B.E. 1999. Use of duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) Schleiden, as a protein feedstuff in practical diets for tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture 30: 313-318.

Farinha, JC., Costa, LT., Zalidis, GC., Mantzavelas, AL., Fitoka, EN., Hecker, N and Vives TP. 1996. Mediterranean wetland Inventory: Habitat Description System MedWet/IUCN. Publicat Vol. No. IV.

Fiogbe, E.D., Micha, J.C. and Van Hove, C. 2004. Use of natural aquatic fern (*Azolla microphylla*) as a main component in food for the omnivorous-phytoplanktonophageous tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). J. Appl. Ichthyol. 20: 517-520.

Fish, J.D. and Fish, S. 1989. A Student's Guide to the Seashore. London: Unwin Hyman Ltd.

Fitzsimmons, K. 2005. Tilapia nutrition overview feeding shrimp's partner in polyculture. Feed Int. 3: 24-27.

Fleurence, J. 1999. Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential usea. Trends in Food Scie. Technol. 10: 25-28.

Fu, Gang., Yoa, Jianting., Liu, Fuli., Liu, Jidong., Wang, Xiuliang., Fu, Wandong., Li, Dapeng., Zhou Mingjing., Su, Song. and Duan, Delin. 2008. Effect of temperature and irradiance on the growth and reproduction of *Enteromorpha prolifera* J. Ag. Chinese J. Oceanol. Limnol. 26: 357-362.

Fujiki, K., and Yano, T. 1997. Effects of sodium alginate on the non-specific defense system of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish Shellfish Immunol. 7, 417– 427.

Goddard, S. 1996. Feed Management in Intensive Aquaculture. New York: Chapman & Hall.

Graham, L.E. and Wilcox, L.W. 2000. Algae. Washington DC: Prentice-Hall, Inc.

Guillaume, J., and Choubert, G. 2001. Digestive physiology andnutrient digestibility in fishes. In, Guillaume J, Kaushik S,Bergot P, Me' tailler R (Eds): Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. pp. 27-56. Springer, London, UK.

Guroy, B.K., Cirik, S., Guroy, D., Sanver, F. and Terkinay, A.A. 2007. Effect of *Ulva rigida* and *Cytstoseira barbata* meals as a feed additive on growth performance, feed utilization, and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31: 91-97.

Higashi-Okai, K., Otani, S., Okai, Y. and Hiqashi-Okai, K. 2000. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. Cancer Lett. 148: 111.

Harada., H, Naro, T., Kamei, Y. 1997. Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japon coasts. Biol. Pharm. Bull. 20: 541-546.

Hardy, R.W. and Barrows, F.T. 2002. Diet formulation and manufacture. In: Fish Nutrition 3rd edition. Halver, J.E. and Hardy, R.W. (eds.), London: Academic Press.

Hardy, L., Jones, G. and Gould, D. 1996. Understanding Psychological Preparation for Sport: Theory and Practice of Elite Performers. Wiley, Chichester.

Hashim, R. and Maat-Saat, A. 1992. The utilizations of seaweed meal as binding agents in pelleted feeds for snakehead (*Channa striatus*) fry their effects on growth. Aquaculture 108: 299-308.

Haylor, G.S., Beveridge, M.C.M. and Jauncey, K. 1988. Phosphorus nutrition of juvenile *Oreochromis niloticus* L. The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference Proceedings 15, 623 pp. Department of Fisheries, Bangkok and ICLARM, Manila. 341-345.

Hela, Yaich., Haikel, Garna., Souhail, Besbes., Michel, Paquot., Christophe Blecker. and Hamadi, Attia. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. Food Chem. 128: 895-901.

Heo, S. J., Ko, S. C., Cha, S. H., Kang, D. H., Park, H. S., and Choi, Y. U. 2009. Effect of phlorotannins isolated from Ecklonia cava on melanogenesis and their protective effect against photooxidative stress induced by UV-B radiation. Toxicology in Vitro 23: 1123-1130.

Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Ahn, G. N., Kang, S. M. and Kang, D. H. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharidestimulated RAW 264.7 macrophages. Food and Chem Toxicol. 48: 2045-2051.

Hertrampf, J.W. and Piedad-Pascual, F. 2000. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. London: Kluwer Academic Publishers.

Hiskia, Asino., Qinghui, Ai. and Kangsen Mai. 2011. Evaluation of *enteromorpha prolifera* as a feed component in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson, 1846) diets. Aquaculture Res. 42: 525-53

Hunter, B. 2000. Physiological function of astaxanthin and other carotenoids in marine organisms. In first south east asia and pacific region meeting on carotenoids, p. 19 Bangkok Thailand 2-5 Augast 2000, Mahidol University Bangkok.

Info fish Tilapia. 2010. October 27-29, 2010 -Kuala Lumpur, Malaysia.

Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. 1993. Chapter 12, Streptococcal Infections. In Bacterial Diseases of Fish, Halsted Press, John Wiley & Sons, Inc., NY. pp. 196-197.

Ito, K. and Hori, K. 1989. Seaweed; chemical composition and potential food uses. Food Rev. Int. 5: 101-144.

Jantrarotai, W., Sitasit, P. and Rajchapakdee, S. 1994. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid Clarias catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) diets containing raw broken rice. Aquaculture 127: 61–68.

Jiao, L., Li, X., Li, T., Jiang, P., Zhang, L., Wu, M. and Zhang, L. 2009. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. Int. Immunopharma. 9: 324-329.

Jiao, QingcaLi., Chen, Xiao., Men, Meirong, Ma., Pengfu, Lii., Shan, Lu. 2010. Polysaccharide release by aphanothece halophytica inhibitscyanobacteria/clay flocculation. J. Phycol. 46: 417-423.

Kanazawa, A., Teshima, S. T., Sakamoto, M. and Awal, M.A. 1980. Requirement of *Tilapia zillii* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48: 587-590.

Karthikai, D.G., Thirumaran, G., Manivannan, K. and Anantharaman, P. 2009. Element composition of certain seaweeds from Gulf of Mannar marine biosphere reserve; Southeast Coast of India. World J. Dairy & Food Sci. 4: 46-55.

Kaushik, S.J., Covès, D., Dutto, G., Blanc, D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of amarine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 230: 391–404.

Kevin, F. 1997. Introduction to tilapia nutrition *In* Tilapia Aquaculture (ed. F. Kevin) 1: 9-12.

Yuasa, K., Kamaishi, T., Hatai, K., Bahnnan, M. and Borisuthpeth, P. 2008. Two cases of streptococcal infections of cultured tilapia in Asia, pp. 259-268. *In* Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 500 pp.

Kim, K.D., Kim, K.M., Kim, K.W., Jin Kang, Y. and Lee, S.M. 2006. Influence of lipid level and supplemental lecithin in diet on growth, feed utilization and body composition of juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*) in suboptimal water temperatures. Aquaculture 251: 484–490.

Kiyoka, Hiqashi-Okaj, Shuzo, Otani and Yasuji, Okai. 1999. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed Enteromopha prolifera (sujiao-nori) on initiation and promotion phase of chemically induced mouse skin tumurigenesis. Cancer letters 140: 21-25.

Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. and Evans, J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture 188: 237- 246.

Lahaye, M. and Robic, A. 2007. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. Biomacromolecules 8: 1765–1774.

Liebert, F., Sunder, A. and Mohamed, K. 2006. Assessment of nitrogen maintenance requirement and potential for protein deposition in juvenile tilapia genotypes by application of an exponential nitrogen utilization model. Aquaculture 261: 1346-1355.

Lovell, R.T. 2002. Diet and fish husbandry. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, pp. 703–754.

Mamatha, B.S., Namitha, K.K., Senthil, A., Smitha, J. and Ravishankar, G.A. 2006. Studies on use of *Enteromorpha* sp. in snack food. Available online at www.sciencedirect.com. Accessed: 24 April 2006.

Manimala, K. and Rengasamy, R. 1993. Effect of bioactive compounds of seaweeds on the phytopathogen *Xanthomonas oryzae*. Phykos 32: 77-83.

Mc-Hugh, D.J. 2003. A Guide to the Seaweed Industry. FAO Fisheries Technical Pap. No. 441.

Mohammad I, Wahbeh. 1997. Amino acid and Fatty acid profiles of four species of macro algae from Aqaba and their suitability for use in fish diets. Aquaculture 159: 101-109.

Mohsen Abdel-Tawwab Mohammad, H., Ahmad Yassir, A.E., Khattab Adel, M.E. Shalaby. 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture 298: 267-274.

Morales-Aguilera, M., Valdez-Casas, M. and Dominguez-Carrillo, S. 2005. Chemical composition and microbiology assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. J. Food Compos. Anal. 18: 79-88.

Morehouse, LA., Bangerter, F.W., DeNinno, M.P., Inskeep, P.B., McCarthy, P.A., Pettini, R.W., Wilson, T.C. 1999. Comparison of synthetic saponin cholesterol absorption inhibitors in rabbits: evidence for a non-stoichiometric, intestinal mechanism of action. J. of Lipid Res. 40: 464-474.

Murata, M and Nakazoe, J. 2001. Production and use of marine algae in Japan. Japan Agricul. Res. Quart. 4: 281-290.

Mustafa, G.M.,Wakamatsu, S., Taked, T., Umino, T. and Nagakawa, H. 1995. Effects of algae meal as a feed additive on growth performance, feed efficiency and body composition in red sea bream. Fish. Sci. 61:25-28.

Nader, E. and Tawil-El. 2010. Effects of green seaweeds (*Ulva* sp.) as feed Supplements in red tilapia (*Oreochromis* sp.) diet on growth performance, feed utilization and body composition. J. Arabian Aquaculture Society 5: 179-193.

Naegel, L.C.A. 1999. Azolla meal as a supplemental feed ingredients for tilapias. Proceedings of the 4th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Orlando, FL, USA, 9-11 November 1997, pp. 20-30.

Ng, W.K., Wang, Y. and Yuen, K.H. 2004. Replacement of dietary fish oil with palm fattyacid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscles of African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture 233: 423-437.

Nakagawa, Heisuke. 1997. Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. Biomed & Phamacother 51: 345-348.

Nakagawa, Heisuke. and Kasahara, Shogoro. 1986. Effect of *Ulva* meal supplement to diet on the lipid metabolism of Red sea bream. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries 52: 1887-1893.

Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., and Tanaka, R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga Eisenia bicyclis. Fisheries Sci. 62: 923–926.

Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R. and Watamaba, T. 1987. The main seaweeds food in Japan. Hydrobiol. 152: 5–29.

Nisizawa, K. 1988. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds *In* FAO (ed. D.J. Mchaugh). vol. 299. pp. 1–147. Amsterdam: Balkema Publishers.

NRC. 1993. Nutrient Requirements of Fish. Washington DC: National Academy Press, National Research Council 114 pp.

NRC. 1994. Nutrient Requirements of Domestic Animals. Sixth revised edition, Washington, DC: National Academy of Sciences. National Research Council.

NTP (National Toxicology Program). 1983. Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS NO. 108-78-1) in F344/N Rats and B6C3F1 mice (feed study). Technical Report Series no.245.

Obach, A., Quentel, C. and Laurencin, F.B. 1993. Effect of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of seabass (*Dicentrarchus labrax*). Dis. Aquat. Org. 15: 175-185.

Okuzumi, J., Takahashi, T., Yamane, T., Kitao, Y., Inagake, M., Ohya, K., Nishino, H., Tanaka, Y. 1993. Inhibitory effects of fucoxanthin, a naturalcarotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineinduced mouse duodenal carcinogenesis. Cancer Lett.68: 159-168.

Olvera-Novoa, M.A., Dominguez-Cen, L.J., Olivera-Castillo, L. and Martinez-Palacios, C.A. 1998. Effect of use of the micrialga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* Peters, Fry. Aquaculture Res. 29: 709-715.

Paulsen, IT., Nguyen, L., Sliwinski, MK., Rabus, R and Saier, MH. 1998. Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. J. Mol Biol. 301: 75–100.

Peddie, S., Zou, J. and Secombes, C.J. 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. Vet. Immunol. Immunopathol. 86: 101.

Perera, RP., Johnson, SK., Collins, MD., and Lewis, DH. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica X *T.* aurea hybrids. J. Aquat Anim. Health. 6: 335-340.

Percival, E. 1975. Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed Ulva clathrata (Roth) C. Agardh. J. of Appl. Phycol. 23: 3537-3542.

Perez, M., Greenwald, D. L. and Torre, J. C. 2004. Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. J. Virol. 78: 11443–11448.

Phromkunthong, W. and Udom, U. 2008. Available phosphorus requirement of sex-reversed red tilapia fed all-plant diets. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 30: 7-16.

Pillai, T.G. 1975. Possibilities for aquaculture development in Tunisia. Bull. Rches Tunisie. 2: 69-130.

Plumb, J.A. 1994. Health maintenance of cultured fishes Principal Microbial Diseases. CRC Press. USA. 254.

Quinn, G. P. and M. J. Keough. 2003. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge.

Reddy, P.V.G.K., Ayyappan, S., Thampy, D.M. & Krishna, G. 2005. Textbook of Fish Genetics and Biotechnology. New Delhi, Indian Council of Agricultural Research. 218 pp.

Roberts, R.J. 1998. Fish Pathology. Institute of Aquaculture, Scotland : University of Stirling.

Robinson, E.H. and Wilson, R.P. 1985. Nutrition and feeding. *In* Channel Catfish Culture. (ed. C.S. Tucker) pp. 323-404. Amsterdam: Elsevier.

Robinson, E.H., Labomuscus, D., Brown, D.B. and Linton, L.T. 1988. Dietary calcium and phosphorus requirement of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. Aquaculture 64: 267-276.

Rosario, Castroa., Ignacio, Zarrab., Jesus, Lamas. 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate therespiratory burst activity of turbot phagocytes. Aquaculture 229: 67–78.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquculture 172 : 63-92.

Sakevich, A.I. 1985. Ekzometabolity presnovodnykh vodoroslei (Exometabolites of Freshwater Algae), Kiev: Naukova Dumka.

Samocha, T.M., Davis, D.A., Saoud, I.P. and Debault, K. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture 231: 197-203.

Santiago, C.B. and Lovell, R.T. 1988. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. J. Nutr. 118: 1540-1546.

Sanaa, M.M., Shanab, Emad A., Shalaby. and Eman A, El-Fayoumy. 2011. *Enteromorpha compressa* Exhibits Potent Antioxidant Activity. J. Biomedicine and Biotech. p 11.

Scott, M. L., M. C. Nesheim, and R. J. Young. 1982. Proteins and amino acids. *In* Nutrition of Chicken. M. L. Scott and Association Publisher, pp 58–118. Ithaca, NY.

Shiau, S.Y. and Peng, C.Y. 1993. Protein – sparing effect by carbohydrate in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). Aquaculture 117: 327-334.

Shiau, S.Y. and Tseng, H.C. 2007. Dietary calcium requirements of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared in fresh water. Aquaculture. Nutr. 13: 298-303.

Shieh-Tsung, Chiu., Rung-Ting, Tsai., Jung-Pin, Hsu., Chun-Hung, Liu. and Winton, Cheng. 2008. Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus.* Aquaculture 277: 66-72.

Shien, T.C., Reng, T.T., Jung, P.H., Chun, H.L. and Winton, C. 2008. Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Aquaculture 277: 66–72.

Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skjåk-Bræk, G., Sorgeloos, P. and Vadstein, O., 1995. Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism Artemia. Fish and Shellfish Immunol. 5: 531-534.

Smith, T. K., Hager, H. A., Francis, R., Kilkenny, D. M., Lo, C. W., Bader, D. M. 1969. Bves directly interacts with GEFT, and controls cell shape and movement through regulation of Rac1/Cdc42 activity. Proc Natl Acad Scie. U S A. 105: 298-303.

Stasiak, S.A. and P.C. Baumann. 1996. Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis. Fish and Shellfish Immunol. 6: 537-539.

Steffens, W. 1989. Principles 0f Fish Nutrition. Ellis Horwood Limited: Chichester.

Sudagar, M. and Hajibeglou, A. 2010. Immune response of common carp (Cyprinus capio) fed with herbal immunostimulants diets. J. Agric. 5: 163-172.

Sudaryono, A., Hoxey, M.J., Kailis, S.G. and Evans, L.H. 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 134: 313-323.

Sugahara, M., Baker, D. H. and Scott, H. M. 1969. Effect of different patterns of excess amino acids on performance of chicks fed amino acid-deficient diets. J. Nutr. 97: 29-32.

Tacon, A.G.J., Rausi, N., Kadari, M. and Cornelis, P. 1990. The food and feeding of marine finfish in floating net cages at the National Sea farming Development Centre Lampung, Indonesia: Rabbit fish (*Siganus canalicalatus* Park). Emir. J. Agric. Sci. 16: 27-38.

Targett, N. M. and Arnold, T. M. 1998. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. J. Phycol. 36: 195-205.

Teska, J. D. and E. B. Shotts. 1994. Nonhaemolytic group B streptococci from humans, fish, and frogs. Biomedical Letters 50: 195–201.

Thompson, K.D., Henderson, R.J. and Tatner, M.F. 1995. A comparison of the lipid composition of peripheral blood cells and head kidney leucocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Comp. Biochem. Physiol. 112: 83-92.

Trewavas, E. 1982. Tilapias: Taxonomy and speciation. Proceedings of the International Conference on the Biology and Culture of Tilapias, Bellagio, Italy, 2-5 September 1980, pp. 3-13.

Tsuneo, Shiba. and Nobuo, Taga. 1981. Effects of the extracellular products of *Enteromorpha iinza* on its Epiphytic bacterial flora. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 47: 1193-1197.

Tutsuk K., Jongkon P., Meng-Umphan, K., Niwooti, W and Chanagun C. 2011. Effects of *Spirulina platensis* and *Cladophora* sp. On immunity stimulating capacity and color improvement of Goldfish (*Carassius auratus*). KKU Res. J. 16: 612-621.

Vadstein, O. 1997. The use immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. Aquaculture 155: 401-417.

Valente, L.M.P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E.F. and Pinto, I.S. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 252: 85-91.

Ventura, M.R., Castanon, J.I.R. and Mcnab, J.M. 1994. Nutrition value of seaweed (*Ulva rigida*) for poultry. Anim. Feed Sci. Technol. 49: 87-92.

Veronica, D. Penaflorida. and Nelson, V. Goles. 1996. Use of seaweed meals from *Kappophycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquacultuer 143: 393-401.

Wang, J. W., B. L. Yan, A. P. Lin, J. P. Hu and S. S. Dong. 2007. Ecological factor research on the growth and induction of spores release in *Enteromorpha prolifera* (Chlorophyta). Marine Science Bulletin 26: 60-64.

Wassef, E.A., Masry-El, M.H. and Maihail, F.R. 2001. Growth enhancement muscle structure of striped mullet (*Mugil cephalus* L.) fingerling by feeding algal meal based diets. Aquaculture. Res. 32: 315-322.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Murakami, A. and Ogino, C. 1980. The availability to *Tilapia niloticus* of P in white fishmeal. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 46: 897-899.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Murakami, A. and Ogino, C. 1983. The availability to *Tilapia nilotica* of phosphorus in white fishmeal. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46: 897-899.

Wee, K.L. and S.W. Shu. 1989. The nutritive value of boiled fullfat soybean in pelleted feed for Nile tilapia. Aquaculture 81: 303-314.

Wong, K.H., S.W. Sam, P.C.K. Cheung, P.O. and Ang, Jr. 1999. Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. Nutrition Res. 19: 1519-1527.

Wu, H. X. and A. G. Xu, 2000. Preliminary experimental study on *Enteromorpha prolifera*. Journal of Zhejiang Ocean University Natural Science Edition 19: 230-234.

Yildirim, O., Ergun, S., Yaman, S. and Turker, A. 2009. Effect of two seaweed (*Ualva lactuca* and *Enteromorpha linsa*) as a feed additive in diets on growth performance, feed utilization, and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 15: 455-460.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on nutrition of red seabream-XI: Effect of Omega 3 fatty acid supplement in a corn oil diet on growth rate and feed efficiency. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 41: 73-77.

Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K. 1986. Effects of wakame *Undariu pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red sea bream. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52: 1817-1819.

Yong-Solum, S., Tchantchou, L., Nguefack, F. and Brummett, R.E. 2006. Advanced nursing of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerling in earthen ponds, through recycling of tilapia recruits. Aquaculture 256: 212-215.

Yousif, O.M., Osman, M.F., Anwahi, A.R., Zarouni, M.A. and Cherian, T. 2004. Growth response and carcass composition of Rabbitfish (*Siganus canaliculatus* Park) fed diets supplemented with dehydrated seaweed (*Enteromropha* sp.). Emir. J. Agric. Sci. 16: 18-26.

Zeitoun, I.H., Jack, P.I., Halver, J.E. and Ullrey, D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerling. J. Fish. Res. Board Can. 30: 1867-1873.

Zemke-White, W.L. and Clements, K.D. 1999. Chlorophyte and rhodophyte starches as factors in diet choice by marine herbivorous fish. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 240: 137 –149.

Zemke-White, W.L. and Ohno, M. 1999. World seaweed utilization: An end-of-century summary. J. Appl. Phycol. 11: 369–376.

Zimmermann, M. and Goddard, P. 1996. Biology and distribution of arrowtooth, *Atheresthes stomias*, and Kamchatka, *A. evermanni*, flounders in Alaskan waters. Fish. Bull. 94: 358-37.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ อาหารทดลอง และซากปลาทดลอง (ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

1.1.1 นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.1.2 ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

1.1.3 ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 3 กรัม และบันทึกน้ำหนัก

1.1.4 นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.1.5 นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วบันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

1.1.6 ทำซ้ำตามข้อ 4 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไป คือ น้ำหนักของความชื้น

คำนวณหาความชื้นด้วยสมการ

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(a - b)\ \Delta\ 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1.2.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

1.2.2 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

1.2.3 นำถ้วยกระเบื้องเคลือบเข้าโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

คำนวณหาเถ้าด้วยสมการ

$$\text{เถ้า (\%)} = \frac{(b - a) \Delta 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังการเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

1.3.1 กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H_2SO_4) เข้มข้น 93 – 98 %

1.3.2 สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม และโปแตสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

1.3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 % (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ด 450 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

1.3.4 สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลาย กรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

1.3.5 กรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4%: เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่กรดบอริคลงไป 4 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3.6 อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทธิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทธิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

1.3.7 เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3.8 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดย อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารที่อบแล้ว 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด ทำการไตเตรตด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (Digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเป็นสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (Distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลายต่อหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 มิลลิลิตรอยู่ โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริค เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดแก้ววิเคราะห์ช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. หยดอินดิเคเตอร์รวมในกรดบอริค 2 – 3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา ทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (Titration)

1. ไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือ เพื่อใช้คำนวณต่อไป

การคำนวณหาโปรตีนด้วยสมการ

$$\text{โปรตีน (\%)} = \frac{1.4 \Delta (V_1 - V_2) \Delta N \Delta 6.25}{W}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ไขมัน (เครื่อง Soxtec System HT6)

สารเคมี

1. สารละลายไตรคลอโรเอททีลีน (Trichroloethylene)

2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

1.4.1 อบถ้วยพร้อมลูกแก้ว ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.4.2 อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.4.3 ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)

1.4.4 ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 ประมาณ 1 – 2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง

1.4.5 นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติม คลอโรฟอร์ม: เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่อง

1.4.6 เปิดเครื่อง ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดเครื่องทำความเย็น เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

1.4.7 จากนั้นเลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

1.4.8 ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหย 5 นาที

1.4.9 ปิดสวิทซ์อากาศ และเครื่องทำความเย็น เลื่อนปุ่ม evaporation กลับตำแหน่งเดิม นำถ้วยออกจากเครื่อง อบที่ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.4.10 นำถ้วยออกมาใส่โถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

คำนวณหาไขมันด้วยสมการ

$$\text{ไขมัน (\%)} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \Delta 100$$

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

1.5 การวิเคราะห์เยื่อใย (ใช้เครื่อง Fibertec system)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก 0.128 M: เตรียมโดยเจือจางกรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจาก อิออน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.223 M: เตรียมโดยชั่งโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 12.5125 กรัม ละลายในน้ำปราศจากอิออน ปรับปริมาตร 1 ลิตร

3. ออกทานอล (1-Octanol reinst)

4. อะซิโตน (acetone)

ภาคผนวก ข

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (% hematocrit) ตามวิธีการของ Blaxhall และ Daisley (1973)

2.1.1 นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริท (microheamatocrit capillary tube) ประมาณครึ่งหลอด อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน

2.1.2 ปั่นด้วยฮีมาโตคริทเซนตริฟิวจ์ (hematocrit centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 10,000-15,000 รอบต่อนาทีประมาณ 5-10 นาที

2.1.3 วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต จากสูตร

$$\text{ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดอัดแน่น (มิลลิเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (มิลลิเมตร)}}$$

2.2 การนับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (blood cell count) ตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley (1973)

การนับเลือดในตัวปลาได้ดัดแปลงวิธีการนับเม็ดเลือดในคนและสัตว์บกอื่นๆมาใช้ ซึ่งจะใช้ RBC-diluting pipette ในการเจือจาง ไม่ว่าจะนับเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็ตามมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

การนับเม็ดเลือดในตัวปลาได้ดัดแปลงวิธีการนับเม็ดเลือดในคนและสัตว์บกอื่น ๆ มาใช้ซึ่งจะใช้ RBC- diluting pipette ในการเจือจาง ไม่ว่าจะนับเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาวก็ตามมีขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ

2.2.1 ใช้ RBC diluting pipette ดูดเลือด (ที่เจาะใหม่ ๆ) ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกินขีด 0.5 ให้ปรับโดยใช้กระดาษทิชชูค่อยๆ ซับอย่างระมัดระวัง แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด

2.2.2 ใช้ปิเปตอันเดิมดูด diluting fluid (Yokoyama's fluid) จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต

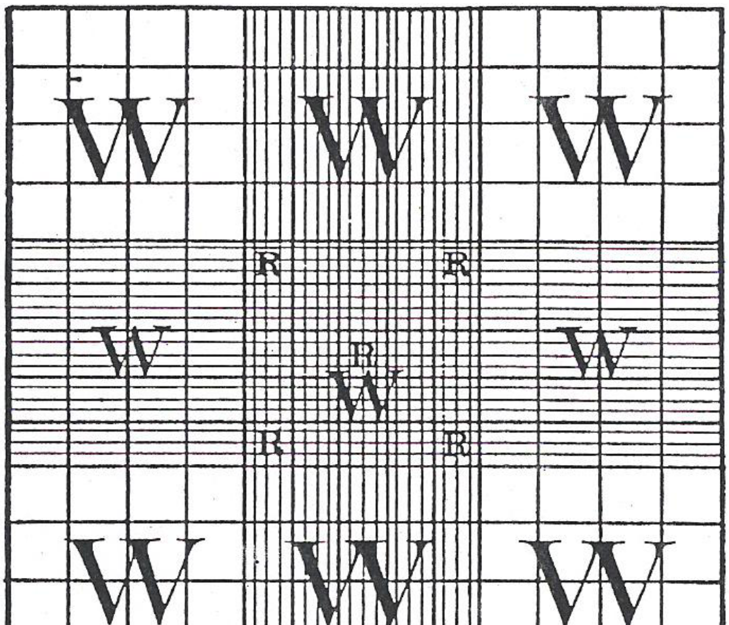
2.2.3ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยาง จากนั้นใช้หัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้างเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที

2.2.4 หยดของเหลวในปิเปตทิ้งไป 3-4 หยด เพราะของเหลวของส่วนนี้อยู่ในก้านไม่ได้ถูกนำไปผสมกับเลือดในกระเปาะของปิเปต

2.2.5 หยดของเหลวหยดต่อไปลงในร่องของ haemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่เรียบร้อยแล้ว ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นหรือของเหลวหยดโตเกินไปจนล้นขอบของ haemacytometer ให้ทำความสะอาดแล้วทำใหม่

2.2.6 วาง Haemacytometer ลงบนพื้นโต๊ะ 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดลงไปเรียงบนพื้นสไลด์ นับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20X – 40X

2.2.7 จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ในวงกลมเล็กรวมกัน 5 ช่องคูณด้วย 104 และจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ต่อหนึ่งวงกลมใหญ่คูณด้วย 2,000 คือค่าของจำนวนเม็ดเลือดแดงและขาวต่อ 1 mm^3



2.5 การวิเคราะห์ค่าไตเตอร์ ดัดแปลงตามวิธีการของ จิราพร (2526)

2.5.1 สุ่มปลานิลจากชุดการทดลอง ชุดละ 9 ตัว ฉีดวัคซีนเข้าช่องท้อง 0.2 มิลลิลิตร/ตัว หลังจากนั้น 14 วัน ทำการเจาะเลือด เพื่อเก็บซีรัมไปหาค่าไตเตอร์

2.5.2 การทดสอบใช้วิธีเจือจางเป็น 2 เท่า (two – fold dilution) โดยใช้ microtitre plate ชนิด 96 well ก้นกลม

2.5.3 เติม *Streptococcus agalactiae* ในหลุม (well) ก้นกลม หลุมละ 50 ไมโครลิตร

2.5.4 เติมซีรัมลงไปในหลุมก้นกลม หลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.5.5 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง

2.5.6 ตรวจผลโดยการสังเกตการตกตะกอนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

2.5.7 บันทึกผลการตกตะกอน และคำนวณค่าที่ได้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นาย อานูวี บากา
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5210620017

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชา วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549