บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. พันธุ์ปลานิล

ลูกปลานิลเพศผู้ (GMT) น้ำหนักเฉลี่ย 2 - 3 กรัม จากศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดจังหวัดสุราษฎร์ธานี

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว อาหารทดลอง และมูลปลาทดลอง (ภาคผนวก ก)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โครมิกออกไซด์ (ภาคผนวก ก)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก)

2.4 สารเคมีสำหรับป้องกันและรักษาโรคปลา ได้แก่ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ฟอร์มาลิน (formalin) มาลาไคท์กรีน (malachite green) และยาสลบ (2-phenoxyethanol)

3. อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลานิลก่อนเริ่มต้นทดลอง

ให้อาหารปลาดุกเล็ก ยี่ห้อไฮ-เกรด (Hi-Grade) เบอร์ 9961 ซึ่งมีส่วนประกอบทางโภชนาการ คือโปรตีน 41 % ไขมัน 6 % ความชื้น 12 % และเยื่อใย 5 %

4. อาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลในกระชัง

ให้อาหารปลาดุก ยี่ห้อไทยลักซ์ เบอร์ 8942 ซึ่งมีส่วนประกอบทางโภชนาการ คือโปรตีน 25 % ไขมัน 3 % ความชื้น 12 % และเยื่อใย 8 %

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร

1.2 ตู้กระจกทดลองขนาด 93×47×46 เซนติเมตร ความจุน้ำ 200 ลิตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้กระจกทดลองด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบทั้ง 3 ด้าน เพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากภายนอก

1.3 อุปกรณ์ให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง และหัวทราย

1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วย สายยาง และเครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

1.5 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ประกอบด้วย ถังพลาสติก สวิงช้อนปลา และขันพลาสติก

1.6 อุปกรณ์ในระบบกรองน้ำ ประกอบด้วย ท่อพลาสติก แผ่นใยแก้ว และถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร ภายในบรรจุถ่าน เปลือกหอย และทรายละเอียด

2. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.1 เครื่องมือผสมอาหาร และอัดเม็ดอาหารของ Hobart Model A200T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ และถาดเตรียมอาหาร

2.3 อุปกรณ์สำหรับฉีดพ่นเอนไซม์ ประกอบด้วย ขวดสำหรับฉีดพ่นเอนไซม์ กระบอกตวง และบีกเกอร์

3. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ คือ เทอร์โมมิเตอร์

3.2 อุปกรณ์วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) คือ เครื่อง DO meter YSI model 57

3.3 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

3.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง หลอดหยด ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรต ขาตั้ง และชุดจับบิวเรต

3.5 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ความกระด้าง (hardnees) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง หลอดหยด ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรต ขาตั้ง ชุดจับบิวเรต และแผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.6 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (ammonia) ได้แก่ หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปต ลูกยาง หลอดหยด ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

4. อุปกรณ์วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง ปลาทดลอง และมูลปลาทดลอง

4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ประกอบด้วย ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถอบแห้ง (desiccator) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถอบแห้ง และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วย เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodes I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต ขาตั้ง ชุดจับบิวเรต ปิเปต หลอดหยด และขวดรูปชมพู่

4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมันรุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.5 อุปกรณ์วิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์เยื่อใย Fibertec system รุ่น M 1020 Hot extractor ของ FOSS Tecator ถ้วยกระเบื้องเคลือบแบบมีรู ตู้อบ โถอบแห้ง เตาเผา และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.6 อุปกรณ์วิเคราะห์พลังงาน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์พลังงานรุ่น Gallenkamp Autobomb (BA-305) เครื่องอัดเม็ดตัวอย่าง ตู้อบ โถอบแห้ง เตาเผา และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. อุปกรณ์เก็บมูลปลา

ประกอบด้วย สายยางพลาสติกเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร และถุงผ้าบาง

6. อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิกออกไซด์ในอาหารทดลอง และมูลปลาทดลอง

6.1 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วยเครื่องย่อย และหลอดย่อยโปรตีน

6.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง และขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร (volumetric flask)

7. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร ขันพลาสติก และสวิงช้อนปลา

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 93×47×46 เซนติเมตร ความจุน้ำ 200 ลิตร (หน่วยทดลอง) โดยทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ เติมน้ำจากบ่อพักน้ำที่ปราศจากคลอรีนลงในตู้ทดลอง ให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิด ประกอบด้วย ถังกรองน้ำซึ่งเป็นถังไฟเบอร์กลาสกลมปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และแผ่นใยแก้ว จำนวน 2 ถัง บ่อพักน้ำเป็นบ่อคอนกรีต บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และเครื่องให้อากาศ มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลของน้ำ 0.8-1.2 ลิตรต่อนาที น้ำที่ไหลเวียนในระบบ จะล้นออกทางท่อน้ำล้นซึ่งติดอยู่ในตู้ทดลอง และไหลไปรวมกันในท่อน้ำทิ้งลงสู่ถังกรองน้ำ จากถังกรองน้ำไหลลงสู่บ่อบำบัดน้ำ จากนั้นก็จะถูกสูบขึ้นไปยังบ่อพักน้ำ และไหลไปยังตู้ทดลอง

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกปลานิลดำแปลงเพศขนาด 2-3 กรัม มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ปลาขนาดที่ต้องการ ช่วงเวลานี้จะให้อาหารปลาดุกเล็กยี่ห้อไฮ-เกรด วันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้าและช่วงเย็น โดยให้ระยะเวลาห่างกัน 8 ชั่วโมง สังเกตพฤติกรรมการยอมรับอาหาร ก่อนเริ่มการทดลองนำปลาไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย และปรสิตภายนอก ปลาที่ใช้ทำการทดลองต้องมีสุขภาพดี ไม่มีโรค การทดลองที่ 1 ใช้ปลานิลดำแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 4-5 กรัม อัตราการปล่อย 20 ตัวต่อตู้ ใช้ปลาจำนวน 480 ตัว การทดลองที่ 2 นำปลานิลดำแปลงเพศที่เหลือ จากการทดลองที่ 1 ประมาณ 1,000 ตัว มาเลี้ยงในกระชังขนาด 2.40×2.65×2.10 เมตร จำนวน 4 กระชัง ๆละ 250 ตัว โดยลอยกระชังไว้ในบ่อดินเป็นเวลา 6 เดือน ให้อาหารปลาดุกยี่ห้อไทยลักซ์ เบอร์ 8942 วันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้าและช่วงเย็น โดยให้ระยะเวลาห่างกัน 8 ชั่วโมง เลี้ยงจนกระทั่งได้ปลานิลดำแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 150-200 กรัม อัตราการปล่อย 12 ตัวต่อตู้ ใช้ปลาจำนวน 288 ตัว การทดลองที่ 3 นำปลานิลแดงแปลงเพศขนาด 70-80 กรัม มาเลี้ยงในกระชังขนาด 2.40×2.65×2.10 เมตร จำนวน 4 กระชัง ๆละ 250 ตัว โดยลอยกระชังไว้ในบ่อดินเป็นเวลา 2 เดือน ให้อาหารปลาเหมือนการทดลองที่ 2 เลี้ยงจนกระทั่งได้ปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 150-200 กรัม อัตราการปล่อย 20 ตัวต่อตู้ ใช้ปลาจำนวน 480 ตัว เมื่อปล่อยปลาลงตู้ทดลอง ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้ทดลองเป็นเวลา 7 วัน หลังจากปลาคุ้นเคยกับสภาพตู้ทดลองแล้ว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของปลา และให้อาหารทดลอง

1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

1.3.1 การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหาร ที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ดังแสดงในตารางที่ 1 เตรียมอาหารสูตรอ้างอิง (reference diet) ให้มีองค์ประกอบของวัสดุอาหารแสดงในตารางที่ 2 (ส่วนประกอบอาหารสูตรอ้างอิง) นำวัตถุดิบพืชที่ต้องการทดสอบ คือกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน และกากถั่วเหลือง อย่างละ 30 % รวมกับอาหารสูตรอ้างอิงอีก 70 % แสดงในตารางที่ 3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมอาหาร ทำการอัดเม็ดอาหาร ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเม็ดอาหาร 2 มิลลิเมตร อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารทดลองแต่ละสูตรมาสเปรย์เอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0,

250, 500 และ1,000 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยเอนไซม์จะอยู่ในรูปของสารละลายที่ประกอบไปด้วย เอนโด-1,3(4)-เบตา-กลูคาเนส ความว่องไวของเอนไซม์ 120 FBG ต่อมิลลิลิตร เฮมิเซลลูเลส และเพคติเนส การสเปรย์ใช้เอนไซม์ในปริมาณ 0, 0.25, 0.50 และ 1.0 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมเอนไซม์ให้เข้ากับน้ำ นำเอนไซม์ที่ได้มาคลุกเคล้ากับอาหารทดลอง โดยนำอาหารทดลองใส่ในเครื่องผสมอาหาร ปรับอัตราเร็วของเครื่องให้ต่ำที่สุด ค่อยๆพ่นเอนไซม์ลงบนเม็ดอาหาร เพื่อให้เอนไซม์กระจายทั่วเม็ดอาหาร วางอาหารไว้ให้แห้งนาน 15 นาที เก็บรักษาอาหารที่เตรียมเสร็จแล้ว ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหาร[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 1)

วัสดุอาหาร	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)
ปลาป่น	68.92±0.20	12.56±0.48	18.33±0.05	0.48±0.17	0.00±0.00
ปลายข้าว	7.75±0.44	1.00±0.08	7.86±0.10	0.46±0.06	82.93±0.49
อัลฟา-สตาช (alfa-starch)	0.43±0.003	0.37±0.16	0.12±0.08	0.00±0.00	99.14±0.08
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	12.66±0.26	10.83±0.43	3.70±0.02	17.21±1.10	55.61±1.27
กากถั่วเหลือง	45.95±0.68	4.63±0.91	9.09±0.11	4.66±0.15	36.14±0.66

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของอาหารสูตรอ้างอิง (การทดลองที่ 1)

ส่วนประกอบ	% ในอาหาร
ปลาป่น	63.0
ปลายข้าว	20.0
อัลฟา- สตาช	10.0
แกลบ	2.8
น้ำมันถั่วเหลือง	2.4
วิตามิน ซี	0.1
วิตามินรวม[1]	0.1
โคลีน คลอไรด์ (choline chloride)	0.1
แร่ธาตุรวม[2]	0.5
โครมิกออกไซด์	1.0
รวม	100

[1]วิตามินรวม (มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย วิตามิน เอ (vitamin A), 2,000,000 IU; วิตามิน ดี (vitamin D), 650,000 IU; วิตามิน อี (vitamin E), 50; วิตามิน เค (vitamin K), 10; ไทอามีน (thiamin), 5.44; ไรโบฟลาวิน (riboflavin), 7.5; ไพริโดซีน (pyridoxine), 6.1; วิตามิน ซี (vitamin C), 142.86; แพนโต (panto),11.11; ไนอะซีน (niacin), 30; กรดโฟลิก (folic acid), 1.25; ไบโอติน (biotin), 12.5; อินโนซิทอล (inositol), 100; โคลีน (choline), 500; แอนตี-เคกกิง (anti-caking), 20; แอนตี-ออกซิแดนซ์ (anti-oxidant), 0.2

[2]แร่ธาตุรวม (มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย $FeSO_4.H_2O$, 38.71; $MgCO_3$, 16.13; KI, 1.62; $CuSO_4.5H_2O$, 2.40; $ZnSO_4$, 38.46; $CoSO_4$, 0.32; Selinica, 6.0

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบอาหารทดลอง (การทดลองที่ 1)

ส่วนประกอบ	ชุดการทดลองที่							
(กรัม ต่ออาหาร100 กรัม)	1	2	3	4	1	2	3	4
อาหารสูตรอ้างอิง	70	70	70	70	70	70	70	70
กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม								
น้ำมัน	30	30	30	30	-	-	-	-
กากถั่วเหลือง	-	-	-	-	30	30	30	30
โรโนไซม์ วีพี (ไมโครลิตร								
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	0	250	500	1000	0	250	500	1000

อาหารทดลอง ประกอบด้วย อาหารทดลองที่มีกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่สเปรย์เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ และอาหารทดลองที่มีกากถั่วเหลืองที่สเปรย์เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ส่งตัวอย่างอาหารวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ ด้วยวิธีของ Nelson (1944) ที่ BIOPRACT GmbH ประเทศเยอรมนี ดังแสดงในตารางที่ 4 วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของAOAC(1990)วิเคราะห์พลังงานด้วยเครื่องวิเคราะห์พลังงานรุ่น Gallenkamp Autobomb (BA-305) ส่งตัวอย่างอาหารวิเคราะห์ปริมาณไลซีน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ที่ Pacific Laboratory Services ประเทศสิงคโปร์ และคำนวณปริมาณไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (Nitrogen free extract : NFE) ตามสูตร ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ = 100 - (โปรตีน + ไขมัน + เถ้า + ความชื้น + เยื่อใย) ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองในการทดลองที่ 1 แสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของโรโนไซม์ในอาหารทดลอง[1] (การทดลองที่ 1)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ความเข้มข้นโรโนไซม์ วีพี ที่ใช้ (ไมโครลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	มิลลิกรัม โรโนไซม์ วีพี ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
1	กากเนื้อเมล็ดใน ปาล์มน้ำมัน	0	19±0.00
2		250	324±1.00
3		500	441±4.00
4		1,000	824±30.00
1	กากถั่วเหลือง	0	26±1.00
2		250	295±5.00
3		500	503±0.00
4		1,000	894±15.00

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบทางโภชนาการ และไลซีน ของอาหารทดลองที่มีกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 1)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ระดับของโรโนไซม์ (ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)	พลังงาน (กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ไลซีน (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม)
1	กากเนื้อ	0	34.65±0.31	10.24±0.24	10.95±0.03	7.31±0.73	36.84±1.16	4,662.95±52.93	24.02±0.64
2	เมล็ด	250	35.28±0.58	10.01±0.08	11.05±0.03	7.80±0.24	35.86±0.46	4,678.43±28.04	23.54±0.77
3	ในปาล์ม	500	35.47±0.34	10.32±0.23	11.02±0.03	8.37±0.44	34.77±0.50	4,629.02±20.89	23.47±0.47
4	น้ำมัน	1,000	34.97±0.73	10.62±0.43	11.59±0.66	6.84±0.06	35.98±0.27	4,753.09±21.85	24.11±0.27

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบทางโภชนาการ และไลซีน ของอาหารทดลองที่มีกากถั่วเหลือง[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 1)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ระดับของโรโนไซม์ (ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)	พลังงาน (กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ไลซีน (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม)
1	กากถั่ว	0	44.69±0.52	8.27±0.02	12.23±0.06	3.43±0.16	31.38±0.58	4,634.24±37.77	30.12±0.93
2	เหลือง	250	44.95±0.36	8.24±0.36	12.22±0.02	3.33±0.07	31.26±0.38	4,700.45±50.61	30.95±0.09
3		500	44.81±0.56	7.61±0.47	12.19±0.04	3.19±0.16	32.21±0.38	4,705.18±45.15	30.38±0.63
4		1,000	44.70±0.64	8.59±1.05	12.24±0.03	3.01±0.03	31.45±1.58	4,590.84±40.22	30.46±0.55

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

1.3.2 การทดลองที่ 2 วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหาร ที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหาร[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 2)

วัสดุอาหาร	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)
ปลาป่น	70.04±0.45	18.62±0.36	13.62±0.05	0.48±0.17	0.00±0.00
ปลายข้าว	7.28±0.59	1.38±0.31	11.64±0.42	0.46±0.06	79.24±0.95
อัลฟา-สตาช	0.43±0.003	0.37±0.16	0.12±0.08	0.00±0.00	99.14±0.08
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	12.66±0.26	10.83±0.43	3.70±0.02	17.21±1.10	55.61±1.27
กากถั่วเหลือง	45.95±0.68	4.63±0.91	9.09±0.11	4.66±0.15	36.14±0.66

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

การเตรียมอาหารทดลองเหมือนการทดลองที่ 1 อัดเม็ดอาหารให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการ และวิเคราะห์ค่าอื่นๆเหมือนการทดลองที่ 1 ปริมาณเอนไซม์ในอาหารทดลอง แสดงในตารางที่ 8 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองในการทดลองที่ 2 แสดงในตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของโรโนไซม์ในอาหารทดลอง[1] (การทดลองที่ 2)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ความเข้มข้นโรโนไซม์ วีพี ที่ใช้ (ไมโครลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	มิลลิกรัมโรโนไซม์ วีพี ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
1	กากเนื้อเมล็ดใน ปาล์มน้ำมัน	0	17±0.00
2		250	219±6.00
3		500	478±18.00
4		1,000	927±7.00
1	กากถั่วเหลือง	0	5.5±0.70
2		250	227±1.00
3		500	485±2.00
4		1,000	1,153±40.00

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบทางโภชนาการ และไลซีน ของอาหารทดลองที่มีกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 2)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ระดับของโรโนไซม์ (ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)	พลังงาน (กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ไลซีน (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม)
1	กากเนื้อ	0	35.83±0.71	12.53±0.27	9.30±0.09	8.45±0.21	34.10±0.33	4,910.49±27.84	21.75±0.06
2	เมล็ด	250	35.72±0.65	12.28±0.17	9.14±0.10	9.65±0.07	32.99±0.28	4,966.74±56.74	22.41±0.02
3	ในปาล์ม	500	35.44±0.61	12.72±0.19	8.98±0.04	9.45±0.21	33.40±1.32	4,933.05±65.54	25.42±0.13
4	น้ำมัน	1,000	35.65±0.58	12.25±0.23	8.90±0.05	10.15±0.07	33.21±0.00	4,825.56±29.13	25.72±0.01

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบทางโภชนาการ และไลซีน ของอาหารทดลองที่มีกากถั่วเหลือง[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 2)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ระดับของโรโนไซม์ (ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)	พลังงาน (กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ไลซีน (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม)
1	กากถั่ว	0	45.06±0.17	10.28±0.49	10.28±0.09	4.83±0.06	29.85±0.53	4,750.43±73.51	31.70±0.18
2	เหลือง	250	45.28±0.68	10.41±0.49	10.23±0.06	4.71±0.08	29.78±0.93	4,837.89±68.84	30.91±0.25
3		500	45.21±0.05	10.44±0.24	10.16±0.04	4.77±0.02	29.32±0.04	4,800.45±81.80	32.11±0.03
4		1,000	45.40±0.07	10.13±0.25	10.11±0.06	4.84±0.05	29.52±0.29	4,802.35±97.50	34.08±0.18

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

1.3.3 การทดลองที่ 3 วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหาร ที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) แสดงไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหาร[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 3)

วัสดุอาหาร	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)
ปลาป่น	65.67±0.80	12.94±0.76	13.43±0.12	1.94±0.02	5.18±0.14
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	13.69±0.13	12.59±0.22	4.39±0.08	25.55±1.72	43.70±1.83
กากถั่วเหลือง	41.78±0.60	4.86±0.54	7.62±0.10	6.03±0.10	40.40±0.33

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

เตรียมอาหารทดลองโดยมีส่วนประกอบของวัสดุอาหาร แสดงในตารางที่ 12 ผสมกับวัตถุดิบพืชที่ต้องการทดสอบ คือ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน และกากถั่วเหลือง แสดงในตารางที่ 13 นำอาหารทดลองแต่ละสูตรมาสเปรย์เอนไซม์ อาหารทดลอง ประกอบด้วยอาหารทดลองที่มีกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่สเปรย์เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ และอาหารที่มีกากถั่วเหลืองที่สเปรย์เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการ และวิเคราะห์ค่าอื่นๆเหมือนการทดลองที่ 1 ปริมาณเอนไซม์ในอาหารทดลองแสดงในตารางที่ 14 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองในการทดลองที่ 3 แสดงในตารางที่ 15 และ16

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบของวัสดุอาหาร (การทดลองที่ 3)

ส่วนประกอบ	% ในอาหาร
ปลาป่น	19.24
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน หรือ กากถั่วเหลือง	76.96
สารเหนียว (CMC)	2.0
วิตามิน ซี	0.1
วิตามินรวม[1]	0.1
โคลีน คลอไรด์	0.1
แร่ธาตุรวม[2]	0.5
โครมิกออกไซด์	1.0
รวม	100

[1]วิตามินรวม (มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย วิตามิน เอ (vitamin A), 2,000,000 IU; วิตามิน ดี (vitamin D), 650,000 IU; วิตามิน อี (vitamin E), 50; วิตามิน เค (vitamin K), 10; ไทอามีน (thiamin), 5.44; ไรโบฟลาวิน (riboflavin), 7.5; ไพริโดซีน (pyridoxine), 6.1; วิตามิน ซี (vitamin C), 142.86; แพนโต (panto),11.11; ไนอะซีน (niacin), 30; กรดโฟลิก (folic acid), 1.25; ไบโอติน (biotin), 12.5; อินโนซิทอล (inositol), 100; โคลีน (choline), 500; แอนตี-เคกกิง (anti-caking), 20; แอนตี-ออกซิแดนซ์ (anti-oxidant), 0.2

[2]แร่ธาตุรวม (มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย $FeSO_4.H_2O$, 38.71; $MgCO_3$, 16.13; KI, 1.62; $CuSO_4.5H_2O$, 2.40; $ZnSO_4$, 38.46; $CoSO_4$, 0.32; Selinica, 6.0

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง (การทดลองที่ 3)

ส่วนประกอบ	ชุดการทดลองที่							
(กรัม ต่ออาหาร100 กรัม)	1	2	3	4	1	2	3	4
ปลาป่น	20	20	20	20	20	20	20	20
กากเนื้อเมล็ดใน ปาล์มน้ำมัน	80	80	80	80	-	-	-	-
กากถั่วเหลือง	-	-	-	-	80	80	80	80
โรโนไซม์ วีพี (ไมโครลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	0	250	500	1000	0	250	500	1000

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นของโรโนไซม์ในอาหารทดลอง[1] (การทดลองที่ 3)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ความเข้มข้นโรโนไซม์ วีพี ที่ใช้ (ไมโครลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	มิลลิกรัมโรโนไซม์ วีพี ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
1	กากเนื้อเมล็ดใน ปาล์มน้ำมัน	0	272±26.00
2		250	516±23.00
3		500	735±21.00
4		1,000	1,107±58.00
1	กากถั่วเหลือง	0	12±2.83
2		250	210±1.00
3		500	451±8.00
4		1,000	928±22.00

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 15 ส่วนประกอบทางโภชนาการ และไลซีน ของอาหารทดลองที่มีกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 3)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ระดับของโรโนไซม์ (ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)	พลังงาน (กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ไลซีน (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม)
1	กากเนื้อ	0	24.67±0.20	12.16±0.19	7.32±0.04	28.24±0.26	27.45±0.55	4,777.25±67.73	10.88±0.04
2	เมล็ด	250	25.08±0.49	12.02±0.31	7.34±0.03	28.29±0.46	26.95±0.29	4,758.13±24.01	10.57±0.00
3	ในปาล์ม	500	24.78±1.14	12.21±0.15	7.33±0.04	27.84±0.59	27.47±0.55	4,647.61±332.97	11.23±0.04
4	น้ำมัน	1,000	24.96±0.43	11.95±0.44	7.39±0.04	28.24±0.44	27.49±0.37	4,762.53±57.08	10.81±0.06

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตารางที่ 16 ส่วนประกอบทางโภชนาการ และไลซีน ของอาหารทดลองที่มีกากถั่วเหลือง[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง) (การทดลองที่ 3)

ชุดการทดลองที่	วัตถุดิบ	ระดับของโรโนไซม์ (ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม : ppm)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	เยื่อใย (%)	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (%)	พลังงาน (กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)	ไลซีน (มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม)
1	กากถั่ว	0	49.26±0.58	6.00±0.75	9.49±0.06	5.41±0.02	30.00±0.11	4,633.271±156.15	32.85±0.04
2	เหลือง	250	50.39±0.94	6.40±0.58	9.39±0.06	5.35±0.25	29.14±1.40	4,564.15±21.72	31.91±0.07
3		500	49.58±1.14	5.34±0.15	9.58±0.11	5.45±0.14	30.59±0.54	4,585.08±24.62	33.57±0.18
4		1,000	49.15±0.72	5.35±0.37	9.48±0.14	5.25±0.40	30.37±0.76	4,574.62±47.02	31.85±0.08

[1]ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

2. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ทำการสุ่มตู้ทดลองโดยวิธีจับฉลาก

2.1.1 การทดลองที่ 1 เป็นการทดลองผลของเอนไซม์โรโนไซม์ 4 ระดับ (0, 250, 500 และ 1,000 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) โดยใช้วัตถุดิบ 2 ชนิด คือ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน และกากถั่วเหลือง ใช้ปลานิลดำแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 4-5 กรัมต่อตัว การทดลองมี 8 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ หน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วย อัตราการปล่อยปลา 20 ตัวต่อตู้ ใช้ปลาทั้งหมด 480 ตัว

2.1.2 การทดลองที่ 2 เหมือนการทดลองที่ 1 ใช้ปลานิลดำแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 150-200 กรัมต่อตัว การทดลองมี 8 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ หน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วย อัตราการปล่อยปลา 12 ตัวต่อตู้ ใช้ปลาทั้งหมด 288 ตัว

2.1.3 การทดลองที่ 3 เหมือนการทดลองที่ 1 ใช้ปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 150-200 กรัมต่อตัว การทดลองมี 8 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ หน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วย อัตราการปล่อยปลา 20 ตัวต่อตู้ ใช้ปลาทั้งหมด 480 ตัว

2.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.1 การตรวจสอบพฤติกรรม และลักษณะที่แสดงออกภายนอก

ในระหว่างการทดลองสังเกตลักษณะภายนอกทั่วไปของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ รวมทั้งพฤติกรรมของปลา ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรคตามสภาพของปลา ดูดตะกอน และทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆวัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละ 30 % ของปริมาตรน้ำทั้งหมด เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

2.2.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาในการทดลองที่ 1 ทุก 2 สัปดาห์ ในการทดลองที่ 2 และ 3 ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหาร 1 มื้อก่อนวันที่ชั่งน้ำหนักปลา) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการของปลาตลอดการทดลอง พร้อมจดบันทึก จนสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้

คำนวณอัตราการรอดตาย (survival rate, %) ตามวิธีการของ Pouomogne และคณะ (1997)

$$\text{อัตราการรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}} \times 100$$

คำนวณอัตราการเจริญเติบโต ตามวิธีการของ De Silva และ Anderson (1995) โดยพิจารณาจาก

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, %)

$$= \frac{(\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{น.น. ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR %)

$$= \frac{(\ln \text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{ระยะเวลา (วัน)}} \times 100$$

คำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) โดยสมการ

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)

$$= \frac{\text{น.น.อาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)}}$$

คำนวณอัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) ตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) โดยสมการ

$$\text{อัตราการกินอาหาร (\%ต่อตัวต่อวัน)} = \frac{F \times 100}{\frac{W_o + W_t}{2} \times \frac{N_0 + N_t}{2} \times t}$$

เมื่อ F = น.น อาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)

N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

W_o = น.น.ปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)

W_t = น.น.ปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)

t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2.2.3 การศึกษาส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลอง นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันที และนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัวได้แก่ โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลอง ๆ ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้นของปลาทั้งตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) จากนั้นจึงคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973)

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER)} = \frac{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}}$$

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีของ Robinson และ Wilson (1985) โดยสมการ

$$\text{การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (\%)} = \frac{(\%\text{โปรตีนในตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \%\text{โปรตีนในตัวปลาเริ่มต้นทดลอง})}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

2.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลานิล

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยของปลานิล เติมโครมิกออกไซด์ในอาหารทดลองปริมาณ 1.0 % เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ การเตรียมโครมิกออกไซด์ เนื่องจากโครมิกออกไซด์ที่ใช้มีความเข้มข้น 98 % ต้องการเนื้อโครมิกออกไซด์ 50 กรัม ชั่งโครมิกออกไซด์ 51 กรัม นำไปผสมกับแกลบ 49 กรัม เมื่อเติมโครมิกออกไซด์ 1.0 % ในอาหารทดลองจะมีเนื้อโครมิกออกไซด์ 0.5 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม การเก็บรวบรวมมูลปลาใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Boonyaratpalin และ Phromkunthong (2000) เก็บรวบรวมมูลปลาหลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง เพราะปลานิลจะขับมูลออกมาเมื่อมีการกินอาหารเข้าไปใหม่ ทำการเก็บรวบรวมมูลปลาในน้ำโดยใช้สายยางพลาสติกขนาดเล็กดูดมูลปลาออกจากตู้ กรองด้วยถุงผ้าบางที่ผูกติดไว้กับสายยางอีกด้านหนึ่ง และนำไปแช่แข็ง เก็บรวบรวมมูลปลาในสัปดาห์ที่ 2-4 เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ อบมูลปลาให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมูลปลาไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์พลังงานด้วยเครื่องวิเคราะห์พลังงาน ส่งตัวอย่างมูลปลาวิเคราะห์ปริมาณไลซีน ตามวิธีมาตรฐานของ

AOAC (1990) ที่ Pacific Laboratory Services ประเทศสิงคโปร์ วิเคราะห์ปริมาณโครมิกออกไซด์ในอาหาร และในมูลตามวิธีของ Furukawa และ Tsukahara (1966)

คำนวนประสิทธิภาพการย่อยตามวิธีการของ De Silva และ Anderson (1995)

ความสามารถในการย่อย (บนฐานของวัตถุแห้ง) (%) (dry matter digestibility or total digestibility)

$$= 100 - 100 \left\{ \frac{\%\ \text{ตัวบ่งชี้ในอาหาร}}{\%\ \text{ตัวบ่งชี้ในมูล}} \right\}$$

ความสามารถในการย่อยสารอาหาร (%) (nutrient digestibility)

$$= 100 - 100 \left\{ \frac{\%\ \text{ตัวบ่งชี้ในอาหาร}}{\%\ \text{ตัวบ่งชี้ในมูล}} \times \frac{\%\ \text{สารอาหารในมูล}}{\%\ \text{สารอาหารในอาหาร}} \right\}$$

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)

4. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง บ่อพักน้ำ และบ่อบำบัดน้ำ ขณะทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์ แสดงในภาคผนวก ข ที่ 1 - 5 การทดลองที่ 2 วิเคราะห์คุณภาพน้ำเหมือนการทดลองที่ 1 เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง แสดงในภาคผนวก ข ที่ 6 - 7 และการทดลองที่ 3 วิเคราะห์คุณภาพน้ำเหมือนการทดลองที่ 2 แสดงในภาคผนวก ข ที่ 8 - 9 วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำโดยใช้ DO meter ใช้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 0.5 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำไปวัดความเป็นกรดด่างโดยใช้ pH meter ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง ความกระด้าง และปริมาณแอมโมเนีย ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992)