บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 ปลาทดลอง

1.1.1 ปลาดุกพันธุ์ผสม

ลูกปลาดุกพันธุ์ผสม น้ำหนักเฉลี่ย 1.5-2.5 กรัม จากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืด ปัตตานี อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี

1.1.2 ปลานิลแดงแปลงเพศ

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 1.0-1.5 กรัม จากสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของร่างกายปลาทดลอง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก.1)

1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัสและแคลเซียมของร่างกายปลา กระดูกปลา มูลปลา และอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก.1)

1.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลาทดลอง (ภาคผนวก ก.1)

1.2.4 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาของปลาทดลอง (ภาคผนวก ก.1)

1.2.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในมูลปลา และอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก.1)

1.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก.2)

1.2.7 สารเคมีสำหรับการป้องกันและรักษาโรคปลา ได้แก่ ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ฟอร์มาลิน (formalin) มาลาไคท์กรีน (malachite green)

1.2.8 สารเคมีสำหรับสลบปลา คือ ควินาลดีน (quinaldine, 2-Methylquinoline)

1.3 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นทดลอง

อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาดุกพันธุ์ผสมและปลานิลแดงแปลงเพศก่อนเริ่มการทดลอง ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮ-เกรด ของบริษัทเอส ดับบลิว ที เบอร์ 9961 ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ คือ โปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 12 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้วันละ 2 ครั้ง ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น.

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 2 ลูกบาศก์เมตร

2.1.2 ตู้กระจกทดลองขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตร ความจุน้ำ 235 ลิตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้ด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบทั้ง 3 ด้าน เพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากภายนอก

2.1.3 ระบบกรองน้ำแบบปิด ประกอบด้วย ถังไฟเบอร์กลาสกลมที่บรรจุถ่าน ทราย เปลือกหอยและ ใยแก้ว บ่อคอนกรีตสำหรับพักน้ำ ประกอบด้วย ถ่าน เปลือกหอย อวน เครื่องให้อากาศและเครื่องปั๊มน้ำ

2.1.4 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.1.5 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำได้แก่ สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

2.1.6 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ขันพลาสติก ถังพลาสติก

2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.1 เครื่องมือเตรียมอาหารทดลอง ของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร และขวดสำหรับฉีดพ่นเอนไซม์

2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

2.2.3 ตู้แช่แข็ง ใช้เพื่อเก็บอาหารทดลองระหว่างรอนำมาใช้

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.3.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ คือ เทอร์โมมิเตอร์

2.3.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) คือ เครื่อง DO meter ของ YSI model 57

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

2.3.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรทและชุดจับบิวเรท

2.3.5 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความกระด้าง (hardness) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรทและชุดจับบิวเรท

2.3.6 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าฟอสฟอรัส ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ หลอดแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรทและชุดจับบิวเรท หม้อนึ่ง (autoclave) ของ Tomy รุ่น SS320 และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201V

2.3.7 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ได้แก่ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ กระดาษกรองGF/C และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ของ Shimadzu รุ่น UV 1201V

2.3.8 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าไนไตรท์ ได้แก่ ชุดกรองสูญญากาศ คอลัมน์แคดเมียม บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระดาษกรองGF/C ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ของ Shimadzu รุ่น UV 1201V

2.3.9 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าไนเตรท ได้แก่ ชุดกรองสูญญากาศ คอลัมน์แคดเมียม บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระดาษกรองGF/C ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ของ Shimadzu รุ่น UV 1201V

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและตัวปลา

2.4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่

2.4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.5 อุปกรณ์วิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์เยื่อใย รุ่น Fibertec System ถ้วยแก้ว (glass crucible) เบอร์ 1 ตู้อบ เตาเผา โถดูดความชื้น เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.6 อุปกรณ์วิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่ ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง แผ่นให้ความร้อน เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง ขวดรูปชมพู่ ขวดพลาสติกและหลอดแก้ว

2.4.7 อุปกรณ์วิเคราะห์แคลเซียม ได้แก่ ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ขวดรูปชมพู่ ขวดพลาสติก หลอดแก้ว และเครื่องatomic absorption spectrophotometer และ flame photometer ของ GBC Scientific Equipment รุ่น Avanta PM S/N 5063

2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

2.5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

2.5.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ของ Jung AG Heidelberg ตู้อบ อ่างน้ำอุ่น (warm bath) เตาร้อน (hot plate) สไลด์

2.5.4 กล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ของ Olympus รุ่น C-35 AD

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.6.1 อุปกรณ์เก็บเลือดปลา ได้แก่ เข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเคลือบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA)

2.6.2 อุปกรณ์แยกพลาสมา ได้แก่ ไมโครปิเปต เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ Beckman รุ่น Avanti™

2.6.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.7 อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในอาหารทดลองและมูลปลาทดลอง

2.7.1 อุปกรณ์เก็บมูลปลา ประกอบด้วย สายยางเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร และถุงผ้าบาง

2.7.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วย เครื่องย่อย เครื่องกลั่น หลอดย่อยโปรตีน กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต ขาตั้ง ชุดจับบิวเรต ปิเปต หลอดหยด และขวดรูปชมพู่

2.7.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง และขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด100 มิลลิลิตร

2.8 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น B 3100 S ถังน้ำบรรจุ 20 ลิตร ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร ขันพลาสติก และสวิงช้อนปลา

3. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาระดับของเอนไซม์ไฟเตสและฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟต ที่เหมาะสมต่อการใช้ฟอสฟอรัสในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยศึกษาถึงการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ได้แก่ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (ANPU) อัตราการรอดตาย การศึกษาองค์ประกอบเลือด การศึกษาทางเนื้อเยื่อ และการสะสมฟอสฟอรัสและแคลเซียมในเลือดและในร่างกายปลา สำหรับการทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาสัดส่วนของโปรตีนสัตว์ต่อโปรตีนพืช 5 ระดับ คือ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 เปอร์เซ็นต์ ควบคู่กับศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์ไฟเตสในอาหารต่อประสิทธิภาพการใช้ฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืช โดยนำอาหารที่มีสัดส่วนของโปรตีนสัตว์ต่อโปรตีนพืชแต่ละสูตรแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตส และส่วนที่ 2 เสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 1,000 ยูนิตต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (ได้แก่ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ) อัตราการรอดตาย การศึกษาองค์ประกอบเลือด การศึกษาทางเนื้อเยื่อ และการสะสมฟอสฟอรัสและแคลเซียมในเลือด ในมูลและร่างกายปลาระหว่างกลุ่มที่ไม่เสริมเอนไซม์และกลุ่มที่เสริมเอนไซม์ไฟเตส การทดลองทั้ง 2 การทดลองใช้วัสดุ

และอุปกรณ์การทดลองเหมือนกัน จะต่างกันเฉพาะการวางแผนการทดลอง ดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การทดลองที่ 1: ผลของเอนไซม์ไฟเตสและฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟตระดับต่าง ๆ ต่อปลาดุกพันธุ์ผสม

3.1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตรความจุน้ำ 235 ลิตร (หน่วยทดลอง) ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์แล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนให้ได้ปริมาตร 180 ลิตร ปิดตู้ด้วยผ้าพลาสติกสีทึบ 3 ด้านเพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง โดยระบบทดลองเป็นระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด ระบบกรอง ประกอบด้วย ถังไฟเบอร์กลาสที่บรรจุถ่าน ทราย เปลือกหอยและใยแก้ว บ่อคอนกรีตสำหรับพักน้ำ ประกอบด้วย ถ่าน เปลือกหอย อวน เครื่องให้อากาศ และเครื่องปั๊มน้ำ ปรับอัตราการไหลของน้ำในตู้ทดลองให้เป็น 0.8 ลิตรต่อนาที

3.1.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลาดุกพันธุ์ผสมน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 1.5-2.5 กรัม จำนวน 3,000 ตัว มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลมขนาดความจุน้ำ 2 ลูกบาศก์เมตร โดยผสมยาออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ลงในน้ำ แช่ปลาไว้ตลอดเวลา เพื่อป้องกันการติดเชื้อและรักษาอาการบอบช้ำจากการลำเลียงขนย้าย เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันแล้วใส่ยาใหม่ เมื่อครบ 3 วัน นำลูกปลามาตรวจโรค ปรากฏว่าไม่พบเชื้อ จึงอนุบาลต่อไปโดยใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮ-เกรด เบอร์ 9961 วันละ 2 ครั้ง คือ 9.00 น. และ 16.00 น. เป็นเวลา 1 เดือน จนกระทั่งปลามีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 5 กรัม ทำการคัดปลาใส่ตู้ทดลอง จำนวน 20 ตัวต่อตู้ ปริมาตรน้ำทุกตู้ในตู้ทดลอง 180 ลิตร ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และฝึกให้กินอาหารทดลอง (สูตร 1) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากปลาคุ้นเคยกับสภาพตู้และอาหารทดลองแล้ว ทำการชั่งหาน้ำหนักเริ่มต้นของปลา โดยสลบปลาด้วยควินาลดีน และชั่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น B 3100 S

3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 9 สูตรแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสในระดับที่แตกต่างกัน 5 ระดับคือ 0, 250, 500, 750 และ 1,000 ยูนิตต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (สูตรที่ 2-6 ตามลำดับ) และกลุ่มที่ 2 เสริมฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟต 3 ระดับ คือ 0.1%, 0.2% และ 0.3% (สูตรที่ 7-9 ตามลำดับ) อาหารสูตรที่ 2-9 ไม่ใส่ปลาป่น และมีสูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุมซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาดุกโดยใช้ปลาป่นและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน

อาหารทดลองที่ใช้เป็นอาหารเม็ดแบบชื้น จัดเตรียมขึ้นมาเอง โดยมีวัตถุดิบอาหาร คือ ปลาป่น กากถั่วเหลือง กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน ข้าวโพด น้ำมันพืช วิตามิน แร่ธาตุรวม (ยกเว้นฟอสฟอรัส) และไดแคลเซียมฟอสเฟต

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลองมีดังต่อไปนี้

3.1.3.1 นำวัตถุดิบที่ใช้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ตารางที่ 1) และสร้างสูตรอาหาร โดยคำนวณให้มีระดับโปรตีน ไขมันและระดับพลังงานเท่ากันทุกชุดการทดลอง คือมีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 3,400 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

3.1.3.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรง ขนาด 30 เมช (mesh) ส่วนน้ำมัน วิตามินและแร่ธาตุ (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2) ชั่งแยกใส่ถุงไว้สำหรับอาหารทดลองแต่ละสูตร

3.1.3.3 นำส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมัน และเอนไซม์ไฟเตส (สูตร 2-6) มาผสมรวมกันและคลุกเคล้าให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสมอาหารประมาณ 6-7 นาที จึงเติมน้ำมันลงไป เมื่อส่วนผสมเข้ากันดี เติมน้ำกลั่นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์

3.1.3.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (สำหรับเลี้ยงปลาในสัปดาห์ที่ 0-4) และหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร (สำหรับเลี้ยงปลาในสัปดาห์ที่ 5-12) โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

3.1.3.5 อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.1.3.6 นำอาหารสูตรที่ 2-6 ซึ่งอบแห้งแล้ว มาฉีดพ่นเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 250, 500, 750 และ 1,000 ยูนิตต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยชั่งเอนไซม์ไฟเตส 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ ผสมกับน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) 40 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ฉีดพ่นเอนไซม์ไฟเตสบนเม็ดอาหาร สำหรับสูตรที่ไม่มีการเสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสจะทำการฉีดพ่นเม็ดอาหารด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาณ 40 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1

กิโลกรัมเช่นกัน เพื่อให้ทุกสูตรมีความชื้นใกล้เคียงกัน ผึ่งอาหารให้แห้งแล้วบรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพรและคณะ, 2540) เอนไซม์ไฟเตสที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทบีเอเอสเอฟ (BASF) ประเทศเยอรมนี โดยเป็นผลผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีชื่อทางการค้าว่า นาทูฟอส (Natuphos 5,000 G) มีไฟเตสแอคติวิตี 5,000 เอฟทียูต่อกรัม [เอฟทียู (FTU) เป็นหน่วยของเอนไซม์ไฟเตส โดย 1 เอฟทียูหมายถึง การปลดปล่อยหรือย่อย 1 ไมโครโมล ของอนินทรีย์ฟอสฟอรัสต่อนาที จากโซเดียมไฟเตท (sodium phytate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5] (Soares and Hughes, 1995) ส่วนไดแคลเซียมฟอสเฟตมีเนื้อแคลเซียม 36.36 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัส 17.75 เปอร์เซ็นต์

3.1.3.6 นำอาหารทดลอง ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์, nitrogen free extract, NFE) คำนวณได้จากสูตร 100 - (ความชื้น+โปรตีน+ ไขมัน+เถ้า+เยื่อใย) วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการรวมทั้งฟอสฟอรัสและแคลเซียมของวัสดุอาหารที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง โดยวิธี AOAC (1990) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหารทดลองของการทดลองที่ 1 (%,โดยการวิเคราะห์)[1]

วัสดุอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	ฟอสฟอรัส	แคลเซียม
ปลาป่น	6.77±0.02	69.77±0.33	13.17±0.53	16.40±0.14	0.15±0.07	1.86±2.77	2.67±0.02	3.07±0.21
กากถั่วเหลือง	9.38±0.02	45.61±0.64	3.85±0.52	7.87±0.94	4.15±0.07	38.53±2.00	0.85±0.02	0.35±0.01
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	5.05±0.02	15.16±0.12	13.29±0.51	3.90±0.00	18.39±0.31	49.26±0.61	0.33±0.01	0.24±0.02
ปลายข้าว	8.29±0.11	6.77±0.21	1.62±0.05	0.75±0.03	0.30±0.14	0.77±0.18	0.13±0.02	0.31±0.01
รำข้าว	6.15±0.09	11.54±0.21	18.88±1.44	13.42±0.24	13.85±0.21	42.31±1.37	0.50±0.69	0.03±0.00
ข้าวโพด	11.64±0.02	7.38±0.24	6.63±0.18	1.61±0.03	1.85±0.21	82.53±0.30	0.32±0.04	0.08±0.00
แป้งข้าวเจ้า	7.43±0.19	7.05±0.59	0.87±0.01	0.47±0.02	0.30±0.00	91.31±0.60	0.08±0.01	0.04±0.00
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	-	-	-	-	-	-	17.48±0.03	32.76±1.25

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE: nitrogen free extract

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของอาหารแต่ละสูตรของการทดลองที่ 1

ส่วนประกอบ	สูตรอาหาร								
(ก./อาหาร 100 ก.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ปลาป่น	23	-	-	-	-	-	-	-	-
กากถั่วเหลือง	25	60	60	60	60	60	60	60	60
ข้าวโพด	14.5	13	13	13	13	13	13	13	13
กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม	0	15	15	15	15	15	15	15	15
น้ำมัน									
ปลายข้าว	7	-	-	-	-	-	-	-	-
รำข้าว	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-
แป้งข้าวเจ้า	12	-	-	-	-	-	-	-	-
น้ำมันถั่วเหลือง	1	1	1	1	1	1	1	1	1
วิตามินผสม[1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุผสม[2]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
วิตามินซี	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
โคลีนคลอไรด์	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
แกลบ	11.4	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.14	7.57	7.01
ไฟเตส	-	-	0.005	0.010	0.0150	0.020	-	-	-
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	-	-	-	-	-	-	0.56	1.13	1.69

[1] วิตามินผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กก.) ประกอบด้วย Retinal (A) 1.20 มิลลิกรัม (4,000 IU); Cholecalciferol (D_3) 0.51 มิลลิกรัม (2,000 IU); Tocopherol (E) 50 มิลลิกรัม; Menadione sodium bisulfite 10 มิลลิกรัม; Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม; Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม; Pyridoxine (B_6) 20 มิลลิกรัม; Cyanocobalamin 0.2 มิลลิกรัม; Calcium pantothenate 200 มิลลิกรัม; Niacin 150 มิลลิกรัม; Folic acid 5 มิลลิกรัม; Biotin 2 มิลลิกรัม; Inositol 400 มิลลิกรัม

[2] แร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กก.) ประกอบด้วย $MnSO_4.H_2O$ 25 มิลลิกรัม; $ZnSO_4.7H_2O$ 20 มิลลิกรัม; $FeSO_4.7H_2O$ 30 มิลลิกรัม; KIO_3 5 มิลลิกรัม; $CuSO_4.5H_2O$ 5 มิลลิกรัม; $CoCl_2.6H_2O$ 0.05 มิลลิกรัม; Na_2SeO_3 0.3 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีเอนไซม์ไฟเตสและฟอสฟอรัสในรูปไดแคลเซียมฟอสเฟตในระดับต่างๆ (% โดยการวิเคราะห์)[1]

สูตรที่	เอนไซม์ไฟเตส (ยูนิตต่ออาหาร 1 กก.)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	ฟอสฟอรัส	แคลเซียม
1	ชุดควบคุม	3.60 ± 0.16	30.30 ± 0.01	10.51 ± 0.12	10.61 ± 0.02	8.11 ± 0.04	36.82 ± 0.08	1.11 ± 0.06	0.05 ± 0.00
2	0	5.27 ± 0.27	30.56 ± 0.10	7.19 ± 0.13	8.11 ± 0.03	8.63 ± 0.09	40.14 ± 0.23	0.59 ± 0.05	0.02 ± 0.00
3	250	6.26 ± 0.07	30.72 ± 0.04	7.12 + 0.30	8.02 ± 0.01	8.80 ± 0.05	39.19 ± 0.16	0.58 ± 0.02	0.02 ± 0.00
4	500	6.18 ± 0.22	30.59 ± 0.19	7.10 ± 0.32	8.02 ± 0.04	8.81 ± 0.06	39.54 ± 0.19	0.60 ± 0.03	0.02 ± 0.00
5	750	6.67 ± 0.12	30.55 ± 0.16	7.00 ± 0.33	7.88 ± 0.21	8.68 ± 0.01	39.26 ± 0.69	0.60 ± 0.01	0.02 ± 0.00
6	1,000	6.19 ± 0.24	30.55 ± 0.22	7.27 ± 0.39	8.01 ± 0.06	8.73 ± 0.07	38.87 ± 0.32	0.60 ± 0.02	0.02 ± 0.00
7	0.1% DCP	1.98 ± 0.19	31.85 ± 0.16	7.31 ± 0.41	8.69 ± 0.13	8.19 ± 0.01	42.20 ± 1.06	0.62 ± 0.04	0.03 ± 0.00
8	0.2% DCP	3.41 ± 0.12	31.54 ± 0.22	7.45 ± 0.30	8.91 ± 0.03	8.08 ± 0.14	40.35 ± 0.34	0.69 ± 0.04	0.03 ± 0.01
9	0.3% DCP	5.10 ± 0.13	30.82 ± 0.20	7.39 ± 0.20	9.13 ± 0.07	7.73 ± 0.07	39.93 ± 0.16	0.85 ± 0.02	0.04 ± 0.01

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE: nitrogen free extract

3.1.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 10 สัปดาห์ โดยเป็นการทดสอบระดับของเอนไซม์ไฟเตส 5 ระดับ และไดแคลเซียมฟอสเฟต 3 ระดับ โดยจัดให้แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ รวม 9 ชุดการทดลองทำการสุ่มหน่วยทดลองโดยวิธีจับฉลาก มีหน่วยทดลองทั้งหมด 27 หน่วย เมื่อเริ่มต้นการทดลองสุ่มปลาจากถังอนุบาลมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นเก็บปลาชุดดังกล่าวนี้ไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ความชื้น และองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ปล่อยปลาในตู้ทดลอง ตู้ละ 20 ตัว ใช้ลูกปลาดุกพันธุ์ผสมทั้งหมด 480 ตัวโดยสุ่มปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 5-6 กรัมต่อตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง ก่อนให้อาหารช่วงเย็นจะดูดตะกอนทำความสะอาดตู้ปลาโดยวิธีกาลักน้ำแล้วเติมน้ำใหม่ให้เท่าเดิมทุกครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง และตรวจสอบคุณภาพน้ำจากบ่อพักน้ำ บ่อบำบัด และตู้ทดลองโดยสุ่มชุดการทดลองละ 2 ตู้ ทุกๆ 2 สัปดาห์ตลอดการทดลอง ตามวิธีของ Boyd and Tucker (1992) ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) อุณหภูมิ ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง (total hardness) ปริมาณแอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) ไนเตรท (nitrate) ปริมาณฟอสฟอรัส (total phosphorus)

3.1.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1.5.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะภายนอก

ในระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ การว่ายน้ำ การยอมรับอาหาร และสังเกตลักษณะภายนอก ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรค ตามสภาพของปลา

3.1.5.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นโดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ในวันที่ชั่งน้ำหนักงดให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ จนสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการรอด (survival rate) (Nankervis *et al.*, 2000) ตามสมการ

$$\text{อัตรารอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}} \times 100$$

การเจริญเติบโต คำนวณตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) จากสมการ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain)

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

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% specific growth rate, SGR)

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

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) คำนวณตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) จากสมการ

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{น.น.อาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) คำนวณตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการ

$$\text{อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน)} = \frac{F \times 100}{\frac{W_o + W_t}{2} \times \frac{N_o + N_t}{2} \times t}$$

โดย

F = น.น. อาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม) N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

W_o = น.น.ปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม) N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

W_t = น.น.ปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม) t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

3.1.5.3 การคำนวณค่าดัชนีตับต่อตัว

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆละ 6 ตัว นำปลาแต่ละตัวไปชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าดัชนีตับต่อตัว ตามวิธีของ Anwar และ Jafri (1995) โดยสมการ

$$\text{ดัชนีตับต่อตัว (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตับปลา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวปลา (กรัม)}} \times 100$$

3.1.5.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) แล้วบันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และนำค่าโปรตีนที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) คำนวณตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973)

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

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

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

3.1.5.5 การวิเคราะห์แคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูก

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 5 ตัว แล่เอาเฉพาะกระดูกบริเวณกะโหลก กระดูกสันหลัง และหาง ไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดย อบที่อุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990)

3.1.5.6 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับ จากตัวอย่างปลาตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัวมาแช่ในฟอร์มาลีน 10% (formalin) 1 สัปดาห์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อของ Humason (1972) ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin Eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD

3.1.5.7 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว มาสลบด้วยควินาลดีน เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางโดยใช้กรดเอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 1 % เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด คือ

- ฮีโมโกลบิน โดยใช้วิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961)
- ฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)
- โปรตีนในพลาสมา โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)
- เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)

3.1.5.8 การศึกษาปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในซีรัม

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 2 ตัว เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางประมาณ 3 มิลลิลิตร ใส่หลอด eppendorf ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี molybdate UV และวิเคราะห์แคลเซียมด้วยวิธี o-cresolphthalein complexone ตามวิธีของ AOAC (1990)

3.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955)

3.1.7 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ในขณะทดลอง ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในตู้ทดลอง บ่อพักน้ำ และบ่อบำบัดน้ำ ทุก 2 สัปดาห์ (โดยสุ่มชุดการทดลองละ 2 ตู้) แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ซึ่งจะเก็บตัวอย่างน้ำก่อนเปลี่ยนถ่ายน้ำ โดยวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำโดยใช้ DO meter และเก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH meter และวิเคราะห์ความเป็นด่าง ความกระด้างของน้ำ ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) (ภาคผนวก ก.2)

3.2 การทดลองที่ 2: ผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อการเพิ่มการใช้ฟอสฟอรัสจากวัตถุดิบพืชในปลานิลแดงแปลงเพศ

3.2.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.1)

3.2.2 การเตรียมปลาทดลอง

ใช้ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวอยู่ในช่วง 1.0-1.5 กรัม จำนวน 5,000 ตัว มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลมขนาดความจุน้ำ 2 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 1 เดือน ด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไฮ-เกรด เบอร์ 9961 โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.3 การเตรียมอาหารทดลอง

การเตรียมอาหารทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการรวมทั้งฟอสฟอรัสและแคลเซียมของวัสดุอาหารที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 จากนั้นจึงสร้างสูตรอาหารให้มีสัดส่วนโปรตีนสัตว์ต่อโปรตีนพืชแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 โดยแบ่งอาหารแต่ละสูตรเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งจะทำการสเปรย์น้ำ และส่วนที่สองจะสเปรย์เอนไซม์ที่ระดับ 1,000 ยูนิตต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชั่งเอนไซม์ไฟเตส 0.20 กรัม ละลายน้ำปราศจากไอออน ปริมาณ 40 มิลลิลิตร) (ตารางที่ 5) นำอาหารทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม โดยวิธีการของ AOAC (1990) (ตารางที่ 6)

ในสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง จะเติมโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหาร โดยทำการเจือจางโครมิคออกไซด์ 98 เปอร์เซ็นต์ ด้วยแกลบป่นให้ได้ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (โครมิคออกไซด์ 51 กรัม ต่อแกลบ 49 กรัม) เติมโครมิคออกไซด์ที่เจือจางแล้วในอาหารสูตรละ 1% ของน้ำหนักอาหาร และลดปริมาณแกลบป่นในอาหาร

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหารทดลองของการทดลองที่ 2 (%,โดยการวิเคราะห์) [1]

วัสดุอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	ฟอสฟอรัส	แคลเซียม
ปลาป่น	6.77±0.02	69.77±0.33	13.17±0.53	16.40±0.14	0.15±0.07	1.86±2.77	2.67±0.02	3.07±0.21
กากถั่วเหลือง	9.38±0.02	45.61±0.64	3.85±0.52	7.87±0.94	4.15±0.07	38.53±2.00	0.85±0.02	0.35±0.01
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	8.11±0.04	17.16±0.11	19.60±0.34	3.81±0.01	12.45±0.07	46.98±0.44	0.58±0.02	0.26±0.02
ข้าวโพด	7.76±0.08	8.13±0.02	6.84+0.92	11.35±0.10	1.65±0.21	72.03±1.01	0.49±0.14	0.09±0.01
แป้งข้าวเจ้า	6.08±0.01	7.59±0.18	1.50±0.05	0.42±0.01	0.35±0.07	90.14±0.14	0.08±0.00	0.02±0.00

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE: nitrogen free extract

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของอาหารทดลองแต่ละสูตรของการทดลองที่ 2 (ก. /อาหาร 100 ก.)

AP:PP[1]	1:1		1:2		1:3		1:4		1:5	
Phytase (ยูนิต/อาหาร 1 กก.)	0	1,000	0	1,000	0	1,000	0	1,000	0	1,000
ปลาป่น	20	20	15	15	12	12	9	9	7.2	7.2
กากถั่วเหลือง	30	30	35	35	40	40	45	45	50	50
ข้าวโพด	12	12	10	10	12.5	12.5	10	10	13.8	13.8
แป้งข้าวเจ้า	18	18	15	15	10	10	10	10	7	7
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	8	8	14	14	14.5	14.5	15	15	11	11
วิตามินผสม[2]	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
แร่ธาตุผสม[3]	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
โคลีนคลอไรด์	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
โครมิคออกไซด์	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
แกลบ	7.5	7.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
ไฟเตส	0	0.020	0	0.020	0	0.020	0	0.020	0	0.020

[1] AP: Animal protein, PP: Plant protein, NFE: Nitrogen free extract

[2] วิตามินผสม (ปริมาณ/อาหาร1 กก.) ประกอบด้วย Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม; Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม; Pyridoxine (B_6) 10 มิลลิกรัม; Cabolamin (B_{12}) 0.05 มิลลิกรัม; Retinal (A) 4 มิลลิกรัม; Cholecalciferol (D_3) 0.4 มิลลิกรัม; Phylloquinone (K_1) 80 มิลลิกรัม; Folic acid 5 มิลลิกรัม; Calcium pantothenate 40 มิลลิกรัม; Inositol 400 มิลลิกรัม; Niacin 150 มิลลิกรัม; Tocopherol (E) 60 มิลลิกรัม; Choline 6,000 มิลลิกรัม; Ascorbic acid (C) 500 มิลลิกรัม; Biotin 3 มิลลิกรัม; *Para*-aminobenzoic acid 25 มิลลิกรัม

[3] แร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร1 กก.) ประกอบด้วย NaCl 0.25 กรัม; $MgSO_4$ 3.75 กรัม; KH_2PO_4 8 กรัม; $Ca(H_2PO_4)$ 5 กรัม; $FeSO_4$ 0.72 กรัม; $(CH_3COO)_2$ $Ca.5H_2O$ 0.88 กรัม; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.088 กรัม; $MnSO_4.4H_2O$ 0.040 กรัม; $CuSO_4.5H_2O$ 0.008 กรัม; $CoCl_2.6H_2O$ 0.00025 กรัม; $KIO_3.6H_2O$ 0.00075 กรัม

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองของการทดลองที่ 2 (%, โดยการวิเคราะห์) [1]

สูตรที่	โปรตีนสัตว์ต่อโปรตีนพืช	เอนไซม์ไฟเตส (ยูนิต/อาหาร 1 กก.)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	ฟอสฟอรัส	แคลเซียม
1	1:1	0	9.19±0.20	31.21±0.40	6.25±0.03	10.41±0.05	6.65±0.07	36.29±0.44	1.17±0.03	1.55±0.05
2	1:1	1,000	8.38±0.08	31.27±0.17	6.26±0.05	10.44±0.03	6.40±0.14	37.25±0.14	1.19±0.05	1.58±0.01
3	1:2	0	7.51±0.29	30.35±0.24	7.23±0.05	10.00±0.01	7.30±0.14	37.60±0.14	1.14±0.00	1.43±0.08
4	1:2	1,000	7.88±0.11	30.45±0.45	7.35±0.21	9.89±0.04	7.15±0.21	37.27±0.47	1.10±0.05	1.38±0.08
5	1:3	0	8.02±0.06	30.60±0.38	8.32±0.30	9.99±0.21	6.95±0.21	36.12±0.29	1.10±0.03	1.44±0.01
6	1:3	1,000	7.60±0.10	30.20±0.25	8.49±0.11	10.13±0.06	6.80±0.14	36.78±0.27	1.10±0.02	1.42±0.09
7	1:4	0	11.76±0.10	30.20±0.14	6.50±0.41	9.49±0.13	6.85±0.35	35.20±0.52	1.00±0.00	1.19±0.03
8	1:4	1,000	11.70±0.19	30.07±0.16	6.58±0.34	9.51±0.03	6.90±0.14	35.24±0.46	1.03±0.00	1.26±0.09
9	1:5	0	9.53±0.03	31.16±0.15	5.93±0.21	10.15±0.04	6.65±0.07	36.58±0.24	1.00±0.03	1.26±0.03
10	1:5	1,000	12.58±0.10	31.10±0.04	5.92±0.33	9.78±0.07	6.90±0.14	33.71±0.29	1.00±0.02	1.31±0.05

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE: nitrogen free extract

3.2.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบเฟกเตอร์เรียล (Factorial design; Completely Randomized Design: CRD) เป็นแบบ 5X2 โดยศึกษา 2 ปัจจัย (Factor) คือ ปัจจัยที่ 1 ทำการศึกษาสัดส่วนของโปรตีนสัตว์ต่อโปรตีนพืช 5 ระดับ คือ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 โดยมีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ และใช้กากถั่วเหลือง ข้าวโพด กากปาล์ม และแป้งข้าวเจ้า เป็นแหล่งโปรตีนจากพืช ปัจจัยที่ 2 คือ การเสริมและไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตสในอาหาร โดยทำการแบ่งอาหารที่มีสัดส่วนโปรตีนสัตว์ต่อโปรตีนพืชสูตรเดียวกันเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งจะไม่เสริมเอนไซม์ไฟเตสและอีกส่วนเสริมเอนไซม์ไฟเตสที่ระดับ 1,000 ยูนิตต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ใช้เวลาทดลอง 10 สัปดาห์ การทดลองนี้ประกอบด้วย 10 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลอง ประกอบด้วย 3 ซ้ำ ใช้ลูกปลานิลแดงแปลงเพศทั้งหมด 600 ตัว โดยสุ่มปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 4.5 กรัมต่อตัว และเก็บตัวอย่างปลาก่อนทดลองไว้เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ฟอสฟอรัส และแคลเซียม ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) รายละเอียดอื่นๆ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ในข้อ 3.1.4)

3.2.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.5) แต่ต่างกันที่การทดลองที่ 2 จะเพิ่มการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยอาหาร (digestibility) ของปลานิลด้วย โดยในสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลองจะให้อาหารที่มีส่วนผสมของโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5% และเก็บมูลปลาหลังจากให้อาหารมื้อเช้าในสัปดาห์ที่ 8-10 ทุกๆ วัน ดำเนินการโดยทำความสะอาดตู้ด้วยวิธีกาลักน้ำ (Siphoning) หลังจากให้อาหารเสร็จเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อดูดเศษอาหารที่ตกค้าง จากนั้นทิ้งระยะเวลา 1 ชั่วโมง จึงเก็บมูลปลาโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Boonyaratpalin และ Phromkunthong (2000) โดยใช้ถุงกรองรองรับน้ำจากปลายสายยางข้างหนึ่งโดยวิธีกาลักน้ำ รวบรวมมูลนำไปเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง (freezer) และอบมูลปลาให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (มูลปลาที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัสและแคลเซียมจะทำการรวบรวมในสัปดาห์ที่ 6-7 ก่อนการให้อาหารที่เติมโครมิคออกไซด์) วิเคราะห์ปริมาณโครมิคออกไซด์ในอาหารและในมูลตามวิธีของ Furukawa และ Tsukahara (1966) คำนวณหาความสามารถในการย่อย ตามวิธีของ Maynard และ Loosli (1969) จากสมการ

ความสามารถในการย่อย (บนฐานของวัสดุแห้ง) (dry matter digestibility or total digestibility)

$$= 100 - 100 \left[\frac{\% \text{ มาร์กเกอร์ในอาหาร}}{\% \text{ มาร์กเกอร์ในมูล}} \right]$$

% ความสามารถในการย่อยสารอาหาร (nutrient digestibility)

$$= 100 - 100 \left[\frac{\% \text{ มาร์กเกอร์ในอาหาร}}{\% \text{ มาร์กเกอร์ในมูล}} \right] \times \left[\frac{\% \text{ สารอาหารในมูล}}{\% \text{ สารอาหารในอาหาร}} \right]$$

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 2 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์แบบ Factorial (5X2) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955)

3.2.7 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำ 2 ครั้ง คือ ก่อนเริ่มทำการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง กระทำการเก็บตัวอย่างน้ำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.7) โดยการทดลองที่ 2 นี้ ทำการตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ วัดอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเป็นด่าง ความกระด้างของน้ำ และปริมาณแอมโมเนีย ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) (ภาคผนวก ก. 2)