บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. ปลาทดลอง

ปลานิลแดงแปลงเพศ

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 13-15 กรัม จำนวน 3,000 ตัว จากฟาร์มเอกชน ต.ลำปำ อ.เมือง จ.พัทลุง

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการอาหารทดลอง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของซากปลาทดลอง (ภาคผนวก ก)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ (ภาคผนวก ข)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันปลา (ภาคผนวก ข)

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

2.5 สารเคมีสำหรับสลบปลา คือ ควินาลดีน (quinaldine, 2-Methylquinoline)

3. อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นทดลอง

อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลานิลแดงแปลงเพศก่อนเริ่มการทดลอง ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไทยลักซ์ เบอร์ 8941 ซึ่งเป็นอาหารปลาดุกเล็ก (รุ่น) ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ คือ

โปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 12 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้วันละ 2 ครั้ง ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น.

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร

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

1.3 เครื่องปั๊มน้ำ

1.4 อุปกรณ์ให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

1.5 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำได้แก่ สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

1.6 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ขันพลาสติก ถังพลาสติก

1.7 อุปกรณ์ในระบบกรองน้ำ ประกอบด้วยท่อพลาสติก แผ่นใยกรอง และถังไฟ-เบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร ภายในบรรจุเปลือกหอยขนาดใหญ่ เปลือกหอยขนาดเล็ก และถ่าน บ่อคอนกรีตสำหรับพักน้ำ เครื่องให้อากาศ และเครื่องปั๊มน้ำ

2. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.1 เครื่องมือเตรียมอาหารทดลอง ของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีก-เกอร์ ถาดเตรียมอาหาร และโกร่งบด

2.3 ตู้แช่แข็ง ใช้เพื่อเก็บอาหารทดลองระหว่างรอนำมาใช้

3. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและตัวปลา

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

3.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่ เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

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

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

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

4. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

4.1 อุปกรณ์เก็บเลือดปลา ได้แก่ เข็มขนาด 26 g และหลอดฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร และหลอดใส่เลือด (ependorf)

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

4.3 อุปกรณ์นับเม็ดเลือด ได้แก่ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) RBC-diluting pipette

4.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

5. อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์

อุปกรณ์วิเคราะห์คาโรทีนอยด์ ได้แก่ โกร่งบด, กรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร, บีก-เกอร์, หลอดหยด, ลูกยาง กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตรและเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบสแกน (scan- spectrophotometer) ของ Perkin Elmer รุ่น Lambda 25

6. อุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน (reciprocal titer)

ประกอบด้วยเข็มฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็มขนาด 26 g เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ยี่ห้อ Heraeus รุ่น Biofuge 13R และถาดหาค่าไตเตอร์ชนิดหลุมก้นกลม (microtiter plate)

7. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

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

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

อุปกรณ์การทดลองประกอบด้วย ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตร ความจุน้ำ 235 ลิตร โดยทำความสะอาด และ ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ เติมน้ำจากบ่อพักน้ำที่ปราศจากคลอรีนลงในตู้ทดลอง ให้ได้ปริมาตร 180 ลิตร ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิด ประกอบด้วย ถังกรองน้ำซึ่งเป็นถังไฟเบอร์กลาสกลมปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และแผ่นใยกรองจำนวน 2 ถัง บ่อพักน้ำเป็นบ่อคอนกรีต บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และเครื่องให้อากาศ มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลของน้ำ 1.2 ลิตรต่อนาที น้ำที่ไหล

เวียนในระบบจะล้นออกทางท่อน้ำล้นซึ่งติดอยู่ในตู้ทดลอง และไหลไปรวมกันในท่อน้ำทิ้งลงสู่ถังกรองน้ำจากถังกรองน้ำไหลลงสู่บ่อบำบัดน้ำ จากนั้นก็จะถูกสูบขึ้นไปยังบ่อพักน้ำ และไหลกลับมายังตู้ทดลอง

1.2 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 8 สูตร โดยจัดเตรียมเป็นอาหารเม็ดแบบชื้น วัตถุดิบที่ใช้ คือ กาก-ถั่วเหลือง, ปลายข้าว, ปลาป่น, กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน, แป้งข้าวเจ้า, น้ำมันปลา, วิตามินรวม, แร่ธาตุรวม, โคลีนคลอไรด์ และแกลบ โดยใช้สูตรอาหารสูตรพื้นฐาน (ดัดแปลงจาก วุฒิพร และ อัจฉริยา, 2548) ผสมกับสไปรูไลนาแห้งและคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ให้ได้ระดับคาโรทีนอยด์ในปริมาณต่างๆ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตรพื้นฐาน (สูตรควบคุม)
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสูตรพื้นฐานผสมแอสตาแซนทิน 200 มก./อาหาร 1 กก.
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารสูตรพื้นฐานผสมซีแซนทิน 200 มก./อาหาร 1 กก.
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารสูตรพื้นฐานผสมเบตา-แคโรทีน 200 มก./อาหาร 1 กก.
ชุดการทดลองที่ 5 อาหารสูตรพื้นฐานผสมสไปรูไลนาให้มีคาโรทีนอยด์รวม 50 มก./อาหาร 1 กก.
ชุดการทดลองที่ 6 อาหารสูตรพื้นฐานผสมสไปรูไลนาให้มีคาโรทีนอยด์รวม 100 มก./อาหาร 1 กก.
ชุดการทดลองที่ 7 อาหารสูตรพื้นฐานผสมสไปรูไลนาให้มีคาโรทีนอยด์รวม 150 มก./อาหาร 1 กก.
ชุดการทดลองที่ 8 อาหารสูตรพื้นฐานผสมสไปรูไลนาให้มีคาโรทีนอยด์รวม 200 มก./อาหาร 1 กก.

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลองมีดังต่อไปนี้

1) วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน, ไขมัน, เยื่อใย, เถ้า, ความชื้น และ คาร์โบไฮเดรต โดยจะทำการวิเคราะห์คาโรทีนอยด์ในสไปรูไลนาแห้ง ซึ่งคาโรทีนอยด์ที่ได้จากสไปรูไลนาแห้งมีความเข้มข้นประมาณ 1,706 ppm ส่วนคาโรทีนอยด์สังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท DSM Nutritional Products จะใช้ แคโรฟิลล์พิงค์ซึ่งมีแอสตา-แซนทิน 10 เปอร์เซ็นต์ ซีแซนทินสังเคราะห์มีซีแซนทิน 5 เปอร์เซ็นต์ และเบตา-แคโรทีนสังเคราะห์มีเบตา-แคโรทีน 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) และสร้างสูตรอาหาร ซึ่งสูตรที่เสริมคาโรที-

นอยด์สังเคราะห์จะคำนวณปริมาณการใช้ให้ได้ระดับตามต้องการ และเพิ่มปริมาณคาโรทีนอยด์จากระดับที่คำนวณได้อีก 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ใช้ทั้งหมด เนื่องจากในกระบวนการทำอาหารจะทำให้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์สูญเสียได้ง่าย ส่วนในสูตรอาหารที่เสริมสไปรูไลนาแห้งจะทำการปรับลดปลาป่น และกากถั่วเหลืองลง เนื่องจากสไปรูไลนาแห้งมีโปรตีนและไขมันสูงใกล้เคียงกับปลาป่น อาหารทุกสูตรปรับให้มีระดับโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ พลังงานที่ย่อยได้ 3,600 กิโลคาลอรี/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยค่าพลังงานที่ย่อยได้คำนวณโดยใช้ค่าต่างๆ ซึ่งประยุกต์มาจากค่าที่ใช้ในปลานิลคือ 4.4 กิโลคาลอรี/สำหรับโปรตีน 1 กรัม 9.0 กิโลคาลอรี/สำหรับไขมัน 1 กรัม และ 3.7 กิโลคาลอรี/ สำหรับคาร์โบไฮเดรต 1 กรัม (Stickney, 1979) ดังตารางที่ 4

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

3) นำส่วนผสมทั้งหมด ได้แก่ กากถั่วเหลือง, ปลายข้าว, ปลาป่น, กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน, แป้งข้าวเจ้า, วิตามินรวม, แร่ธาตุรวม, โคลีนคลอไรด์, สไปรูไลนา, คาโรทีนอยด์สังเคราะห์ และแกลบ ยกเว้นน้ำมัน โดยในสูตรที่เสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์จะต้องนำมาบดให้ละเอียดในโกร่งบดผสมกับแป้งข้าวเจ้าก่อนเพื่อให้คาโรทีนอยด์สังเคราะห์กระจายในอาหารอย่างทั่วถึงจากนั้นจึงนำไปผสมกับวัตถุดิบตัวอื่นและคลุกเคล้าให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสมอาหาร (Hobart Model A200T) ประมาณ 6-7 นาที จึงเติมน้ำมันลงไป เมื่อส่วนผสมเข้ากันดี เติมน้ำกลั่นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (วุฒิพร และคณะ, 2547)

4) นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

5) อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

6) เก็บอาหารที่ผ่านการอบแล้วบรรจุในถุงพลาสติกเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร และคณะ, 2540)

7) นำอาหารทดลองไปวิเคราะห์ ความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, เยื่อใย และ เถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณ ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (nitrogen free extract, NFE) คำนวณได้จากสูตร 100 - (%ความชื้น+ %โปรตีน+ % ไขมัน+ %เถ้า+ %เยื่อใย) วิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์รวม ตามวิธีการของ Sommer และคณะ (1991a) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหารทดลองโดยการวิเคราะห์[1] (% บนฐานวัตถุแห้ง)

วัสดุอาหาร	คุณค่าทางโภชนาการ (เปอร์เซ็นต์)						
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	คาโรทีนอยด์
ปลาป่น	5.97±0.01	70.90±0.94	9.53±0.06	19.14±0.12	0.76±0.01	0.29±0.08	-
กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม	4.50±0.01	16.86±0.33	10.60±0.35	4.25±0.01	16.93±0.21	51.36±0.20	-
กากถั่วเหลือง	7.91±0.01	45.74±0.55	2.59±0.18	7.36±0.00	5.73±0.07	38.58±0.43	-
แป้งข้าวเจ้า	7.90±0.36	7.97±0.12	1.24±0.11	0.29±0.00	0.27±0.01	90.24±0.23	-
ปลายข้าว	9.54±0.03	9.03±0.01	2.69±0.05	4.33±0.05	0.81±0.01	83.15±0.11	-
สไปรูไลนา	4.57±0.07	54.29±0.01	5.36±0.00	6.87±0.04	1.96±0.05	31.54±0.01	1,706.86 ppm
แคโรฟิลล์พิงค์	-	-	-	-	-	-	100,000* ppm
ซีแซนทิน	-	-	-	-	-	-	50,000* ppm
เบตา-แคโรทีน	-	-	-	-	-	-	100,000* ppm

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE: nitrogen free extract * : ค่าที่ได้จากฉลากผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4 สูตรอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศ (% as fed)

วัตถุดิบอาหาร	ชุดการทดลองที่							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
กากถั่วเหลือง	40	40	40	40	38	35	32	29
ปลาป่น	12	12	12	12	10	9	8	7
ปลายข้าว	10	10	10	10	10	10	10	10
กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม	14	14	14	14	14	14	14	14
แป้งข้าวเจ้า	10	10	10	10	10	10	10	10
น้ำมันปลา	2	2	2	2	2	2	2	2
วิตามิน	1	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุผสม	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
แอสตาแซนทิน	-	0.24	-	-	-	-	-	-
ซีแซนทิน	-	-	0.48	-	-	-	-	-
เบตา-แคโรทีน	-	-	-	0.24	-	-	-	-
สไปรูไลนา	-	-	-	-	3.57	7.14	10.71	14.28
แกลบ	7.4	7.16	6.92	7.16	7.83	8.26	8.69	9.12
รวม	100	100	100	100	100	100	100	100
พลังงานที่ย่อยได้ (กิโลแคลอรี /อาหาร 1 กก.)	3,610.8	3,601.8	3,662.9	3,678.1	3,589.5	3,638.9	3,579.8	3,634.6

วิตามินผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กก.) ประกอบด้วย Thiamine(B_1) 10 mg; Riboflavin(B_2) 20 mg; Pyridoxine (B_6) 10 mg; Cobalamine (B_{12}) 2 mg; Retinal (A) 4,000 IU; Cholecalciferol (D_3) 2,000 IU; Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium Pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; Tocopherol (E) 50 mg ; Biotin 1 mg; Ascorbic acid (C) 500 mg

แร่ธาตุรวม (ปริมาณ/แร่ธาตุผสม 1 กก.) ประกอบด้วย Na 3.278 g.; Mg 25.25 g.; K 76.612 g.; Ca 49.096 g.; Fe 4.821 g.; Zn 0.667 g.; Mn 0.433 g.; Cu 0.069 g.; Co 0.00198 g.; I 0.01 g

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบทางโภชนะของอาหารทดลองโดยการวิเคราะห์[1](% บนฐานวัตถุแห้ง)

ชุดการทดลองที่	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)						
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	คาโรทีนอยด์ (ppm)
1 (ชุดควบคุม)	6.76±0.02	30.70±0.26	6.13±0.23	10.24±0.01	7.80±0.03	45.13±0.07	3.79±0.24
2 (แอสตาแซนทิน 200 ppm)	7.25±0.00	30.66±0.43	6.35±0.42	10.30±0.03	7.56±0.35	45.14±0.37	185.63±3.94
3 (ซีแซนทิน 200 ppm)	5.55±0.15	30.32±0.52	6.27±0.38	10.17±0.05	7.52±0.67	45.72±0.75	199.18±1.17
4 (เบตา-แคโรทีน 200 ppm)	5.25±0.06	30.17±0.20	6.38±0.36	10.19±0.03	7.63±0.10	45.62±0.22	200.42±4.31
5 (คาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา 50 ppm)	8.16±0.14	30.88±0.15	6.50±0.48	9.98±0.05	7.83±0.20	44.82±0.38	56.71±2.83
6 (คาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา 100 ppm)	6.61±0.09	30.57±0.09	6.37±0.10	9.95±0.10	7.86±0.16	45.24±0.25	108.22±1.49
7 (คาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา 150 ppm)	8.22±0.06	30.45±0.84	6.29±0.16	9.80±0.02	7.93±0.03	45.54±0.63	150.51±4.94
8 (คาโรทีนอยด์จากสไปรูไลนา 200 ppm)	6.47±0.03	30.35±0.18	6.13±0.07	9.82±0.00	7.96±0.23	45.74±0.49	201.66±1.26

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE: nitrogen free extract

1.3 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลแดงแปลงเพศขนาด 13-15 กรัม อนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อไทยลักซ์ เบอร์ 8941 อาหารปลาดุกเล็ก (รุ่น) ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการ คือ โปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 12 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 8 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 9.00 น. และ 16.00 น. จนลูกปลามีน้ำหนักประมาณ 20 กรัม หลังจากนั้นจึงทำการคัดลูกปลาที่ทำการอนุบาลไว้ ทำการชั่งหาน้ำหนักเริ่มต้นของปลาและบันทึกผล

1.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1.4.1 แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่เลี้ยงในระบบธรรมชาติ

แยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วยที่แสดงลักษณะอาการลำตัวสีคล้ำและตกเลือดที่บริเวณลำตัวโดยทำการผ่าท้องปลาด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต สมอง และตา มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) หรือ blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Peres *et al.,* 2004) สุ่มเลือกโคโลนีจากจานเพาะเชื้อมาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มสเตรฟโตคอคคัส จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อ (stock) ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ที่มีกลีเซอรีน (glycerin) ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาเตรียมเพื่อทำวัคซีน

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

นำเชื้อสเตรฟโตคอคคัสบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อที่ได้ มาเลี้ยงต่อในอาหาร tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลินให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร TSB เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการเกลี่ยสารละลายแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อเจริญให้นำสารละลายมาเติมฟอร์มาลินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเชื้อ

ไม่เจริญ ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอน เทส่วนสารละลายทิ้ง และล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนครบ 3 ครั้ง จากนั้นทดสอบการปลอดเชื้อ (sterile) ของวัคซีน โดยนำวัคซีนที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร เพื่อทดสอบว่าเชื้อที่เป็นวัคซีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ถ้าหากเชื้อไม่เจริญก็สามารถนำมาเป็นวัคซีนได้ โดยจะทำการเติมฟอร์มาลิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เก็บวัคซีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 การวางแผนการทดลอง

ศึกษาผลของคาโรทีนอยด์สังเคราะห์และสไปรูไลนา โดยใส่สไปรูไลนาแห้งในอาหารทดลองให้ได้คาโรทีนอยด์ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบกับอาหารชุดที่เสริมคาโรทีนอยด์สังเคราะห์ 3 ชนิดคือ แอสตาแซนทิน ซี-แซนทิน และ เบตา-แคโรทีน 200 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (Amar *et al.,* 2004) ในปลานิลแดงแปลงเพศ ปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ การเจริญเติบโต, ประสิทธิภาพการใช้อาหาร, องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา, ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน, องค์ประกอบเลือด, การวัดค่าสี และปริมาณคาโรทีน-นอยด์รวมในตัวปลา ทำการแบ่งการทดลองเป็น 8 ชุดการทดลอง (treatment) แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ (replication) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ดำเนินการทดลองโดยเติมน้ำลงในตู้ที่เตรียมไว้ประมาณ 180 ลิตรต่อตู้ ระบบน้ำเป็นแบบไหลเวียนแบบปิด เมื่อเริ่มต้นทดลองสุ่มปลาที่เตรียมไว้ลงเลี้ยงในตู้ทดลอง โดยใช้ปลาเริ่มต้นน้ำหนักประมาณ 21 กรัม/ตัว ตู้ละ 20 ตัว ทำการสุ่มหน่วยทดลองโดยวิธีจับฉลาก โดยจัดหน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วยทดลอง ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และช่วงเย็นเวลา 16.00 น. โดยในแต่ละมื้อให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุก 2 สัปดาห์ตลอดการทดลอง ทำการชั่งปลาทุกๆ 2 สัปดาห์ ก่อนให้อาหารช่วงเย็นจะดูดตะกอนทำความสะอาดตู้ปลาโดยวิธีกาลักน้ำแล้วเติมน้ำจากบ่อพักน้ำให้เท่าเดิมทุกครั้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

2.2 การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

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

2.2.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น และบันทึกอัตรารอดตายของปลาทุกชุดการทดลอง โดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดอาหารก่อนการชั่งน้ำหนักปลาเป็นเวลา 18 ชั่วโมง) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการของปลาตลอดการทดลอง พร้อมจดบันทึก จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการรอดตาย

อัตราการรอดตาย (survival rate) คำนวณอ้างตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000) จากสมการ

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

การเจริญเติบโต คำนวณอ้างตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) จากสมการ

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

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน (average daily gain, ADG) (กรัม/ตัว/วัน)} = \frac{(\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{เวลา (วัน)} \times \text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}$$

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

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

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)

2.2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาทดลอง

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในซากทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน และ เถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัว ไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) เช่นเดียวกับปลาก่อนทดลอง แล้วบันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

นำข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักอาหารที่ปลากินเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในอาหาร และค่าโปรตีนในซากปลาก่อนทดลอง และหลังจากทดลองแต่ละชุดการทดลองที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

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

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

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

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

2.2.5 การวัดการเปลี่ยนแปลงสีของตัวปลา

หลังจากสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างปลาตู้ทดลองละ 2 ตัว สลบด้วย ควินาลดิน และนำปลาไปแช่น้ำแข็ง นำตัวอย่างปลาเพื่อไปตรวจสอบสีปลาแต่ละตัวโดยวัดค่าความสว่าง (L) ความแดง (a) ความเหลือง (b) ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Hunter® Colormeter)

2.2.6 การวัดการสะสมคาโรทีนอยด์ในตัวปลา

นำตัวอย่างปลาก่อนทดลอง 10 ตัว และหลังจากสิ้นสุดการทดลองนำตัวอย่างปลาตู้ทดลองละ 2 ตัว ชุดการทดลองละ 6 ตัว รวมกันมาทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dry) จนแห้ง และบดตัวอย่างให้ละเอียดเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำไปสกัดด้วยอะซิโตน (acetone) น้ำกลั่น และ อีเธอร์ (ether) ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นโดยใช้กรวยแยก และทำการแยกเอาชั้นที่เป็นอีเธอร์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่นระหว่าง 400-600 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดมาคำนวณหาค่าปริมาณคาโรทีนอยด์รวม ตามวิธีการของ Sommer และคณะ(1991a)

2.2.7 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ตู้ทดลองละ 3 ตัว มาสลบด้วยควินาลดีน เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางโดยใช้กรดเอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก

(ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 1 % ป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือดปลาแต่ละตัวและนำมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง คือ

- ฮีโมโกลบินโดยใช้วิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961)
- ฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)
- โปรตีนในพลาสมา โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)
- เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวโดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973)

2.2.8 การศึกษาภูมิคุ้มกัน

สุ่มตัวอย่างปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ตัว ในแต่ละชุดการทดลอง ทำการสลบด้วย ควินาลดิน (quinaldin) 1-2 หยด ต่อน้ำ 1 ลิตร ทำการฉีดวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยทำการเตรียมจากวิธีของ Klesius และคณะ (2000) หลังจากฉีดวัคซีน 15 วัน จึงทำการเก็บซีรัม ตามวิธีของ Roberts (1978) โดยทำการสลบปลาด้วยควินาลดิน เจาะเลือดบริเวณหาง (caudal vein) โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 26 g x 1 นิ้ว โดยเลือดที่เจาะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (Robertsen *et al*., 1990) ตรวจวัดค่า reciprocal titer ปลาแต่ละตัว (Klesius *et al*., 2000) โดยจะทำการเจือจางซีรัมแบบ 2 เท่า (two-fold dilution) ซึ่งใช้สารเจือจางซีรัม ได้แก่ 0.85%NaCl + 0.1%formalin ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร (µl) ในถาดหาค่าไตเตอร์ชนิดหลุมก้นกลม (microtiter plate) นำแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เช่นกันใส่ลงในถาดไตเตอร์หลุมละ 50 ไมโครลิตร ผสมโดยใช้ไมโครปิเปต (micropipet) ให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง ศึกษาการตกตะกอน และบันทึกผล (Klesius *et al*., 2000)

2.2.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA แบบ CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์