บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 พันธุ์ปลานิล

ลูกปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 0.3-0.6 กรัมจำนวน 5,000 ตัว จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครศรีธรรมราช กรมประมง

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของตัวปลาและอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก 1)

1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลานิล (ภาคผนวก ก 2)

1.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โครมิคซ์ออกไซด์ (ภาคผนวก ก 3)

1.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก 4)

1.2.5 ยาสลบ (2 - Methylquinoline) สำหรับสลบปลาในขณะทำการชั่งน้ำหนัก

1.3 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นทดลอง

ในช่วงอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มทดลอง ใช้อาหารลูกปลาดุกขนาดเล็กยี่ห้อไฮ-เกร็ด (Hy-grade) เบอร์ 9961 ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการคือ โปรตีน 40 % ไขมัน 6 % ความชื้น 12 % และกาก 5 %

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1.0 ลูกบาศก์เมตร

2.1.2 ตู้กระจกทดลองขนาด 95 × 45 × 45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 192 ลิตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้กระจกทดลองด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบทั้ง 3 ด้าน เพื่อป้องกันการรบกวนจาก

ภายนอก

2.1.3 อุปกรณ์ระบบน้ำ เป็นระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ระบบกรอง ประกอบด้วย แผ่นกรอง ถ่าน ทราย และเปลือกหอย และบ่อพักน้ำประกอบด้วยเปลือกหอย อวนไนล่อน ภายในบ่อพักน้ำมีการให้อากาศตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลเวียนของน้ำ 0.8 ลิตรต่อนาที

2.1.4 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.1.5 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

2.1.6 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ขันพลาสติก

2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลองของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

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 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำ (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

2.3.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรต และชุดจับบิวเรต

2.3.5 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความกระด้างของน้ำ (hardness) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรตและชุดจับบิวเรต เตาร้อน (hot plate)

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาและอาหารทดลอง

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

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

2.4.5 อุปกรณ์วิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์เยื่อใยรุ่น FIWE ของ VELP ถ้วย (glass crucible) เตาเผา เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง โถดูดความชื้น และตู้อบ

2.5 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

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

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

2.5.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิกซ์ออกไซด์ในอาหารและมูลปลา

2.7.1 อุปกรณ์เก็บมูลปลา ได้แก่ สายยาง ถุงผ้าขาวบาง

2.7.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.7.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.7 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังน้ำบรรจุ 20 ลิตร ถังพลาสติก ขนาด 3 ลิตร กะละมังพลาสติก และสวิงช้อนปลา

2.8 วัตถุดิบพืช ได้แก่ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน ข้าวโพด รำละเอียด และมันสำปะหลังป่น ปลายข้าว กากถั่วเหลือง (ซื้อมาจากร้านจำหน่ายวัตถุดิบอาหารสัตว์ในอำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา) กากมะพร้าว (ซื้อมาจากโรงงานผลิตน้ำมันพืช จ. สุราษฎร์ธานี)

3. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลานิลแดงแปลงเพศจากวัตถุดิบพืช 5 ชนิด คือ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน กากมะพร้าว ข้าวโพด รำละเอียด และมันสำปะหลังป่น สำหรับการทดลองที่ 2 เป็นการนำผลการทดลองที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันมาทดสอบ 5 ระดับ คือ 0, 10, 20, 30 และ 40 % เพื่อหาระดับที่เหมาะสมที่ทำให้ปลานิลแดงแปลงเพศมีการเจริญเติบโตและมีประสิทธิภาพการย่อยอาหารดีที่สุด โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การทดลองที่ 1

3.1.1 การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลานิลแดงแปลงเพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 0.3-0.6 กรัม จำนวน 2,500 ตัว จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครศรีธรรมราช มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อให้ปลาปรับสภาพให้เหมาะสมต่อสภาพของการทดลอง โดยใช้อาหารลูกปลาดุกขนาดเล็กยี่ห้อไฮ-เกร์ดเบอร์ 9961 ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการคือ โปรตีน 40 % ไขมัน 6 % ความชื้น 12 % และกาก 5 % โดยให้วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เวลา 9.00 น. และ 16.30 น. สังเกตพฤติกรรมการยอมรับอาหารจนปลาทดลองมีขนาดน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ในช่วงตัวละ 3.14-3.20 กรัม ก่อนเริ่มทำการทดลองนำลูกปลาไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก ลูกปลาที่ใช้ทดลองต้องมีสุขภาพดีไม่มีโรคใด ๆ ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน เริ่มทำการทดลอง

3.1.2 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมวัตถุดิบอาหารที่ใช้ทดลองโดยนำกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน กากมะพร้าว ข้าวโพด รำละเอียด มันสำปะหลังป่น ปลาป่น และปลายข้าว ไปบดให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 30 mash จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (ตาราง 3) จากนั้นทำการเตรียมอาหารสูตรอ้างอิง โดยชั่งวัสดุอาหารแต่ละอย่างและนำอาหารสูตรอ้างอิงมา 70 % ผสมกับวัตถุดิบพืชที่

ต้องการทดสอบ 30 % คือ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันกากมะพร้าว ข้าวโพด รำละเอียด และมันสำปะหลังป่น ทำการผสมส่วนประกอบวัสดุอาหารให้เข้ากันดี (ตาราง 4) โดยใช้เครื่องผสมอาหาร (Hobart mixer รุ่น Model A200T) เติมน้ำลงไป 40 % เพื่อให้วัสดุอาหารมีความชื้นและเกาะตัวกันดี นำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงบรรจุในถุงพลาสติกสีดำ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรกซ์, Nitrogen free extract, NFE) หาได้จากการคำนวณตามสูตร 100 – (% โปรตีน + % ไขมัน + % เถ้า + % เยื่อใย + % ความชื้น) (ตาราง 5) ก่อนนำไปใช้ในการทดลองเลี้ยง

ตาราง 3 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหารจากการทดลองที่ 1 โดยการวิเคราะห์ [1] (หน่วย % น้ำหนักแห้ง)

วัสดุอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE
ปลาป่น	6.77±0.02	69.77±0.33	13.17±0.53	16.40±0.14	0	0.86±0.76
ปลายข้าว	8.29±0.11	6.77±0.21	1.62±0.05	0.75±0.03	0.40±0.02	82.17±0.45
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	5.05±0.02	15.16±0.12	13.29±0.51	3.90±0.00	18.75±0.66	43.85±1.26
กากมะพร้าว	4.10±0.14	19.44±0.28	13.39±0.33	7.71±0.05	11.48±0.45	43.96±0.71
ข้าวโพด	8.69±0.22	7.38±0.24	6.63±0.18	1.61±0.03	2.58±0.12	73.10±0.49
รำละเอียด	6.15±0.09	11.54±0.21	20.35±0.22	13.42±0.24	8.50±0.19	40.07±0.41
มันสำปะหลังป่น	10.43±0.01	2.69±0.15	2.87±0.10	5.39±0.09	4.76±0.08	73.86±0.16

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

NFE : Nitrogen free extract

ตาราง 4 สูตรอาหารของการทดลองที่ 1

วัตถุดิบอาหาร (กรัม)	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
ปลาป่น	441	441	441	441	441
ปลายข้าว	144.2	144.2	144.2	144.2	144.2
อัลฟา-สตาร์ท (alfa-starch)	70	70	70	70	70
น้ำมันถั่วเหลือง	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8
วิตามินและแร่ธาตุผสม [1]	21	21	21	21	21
โครมิกซ์ออกไซด์	7	7	7	7	7
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	300				
กากมะพร้าว		300			
ข้าวโพด			300		
รำละเอียด				300	
มันสำปะหลังป่น					300
รวม	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
พลังงาน (DE)(kcal/kg feed)[2]	3,121.50	3,133.80	3,115.60	3,174.30	2,960.60

[1]วิตามินและแร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม; Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม; Pyridoxine (B_6) 10 มิลลิกรัม; Cyanocobalamin (B_{12}) 2 มิลลิกรัม; Cholecalciferol (D_3) 29.2 มิลลิกรัม; Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 มิลลิกรัม; Folic acid 5 มิลลิกรัม; Calcium pantothenate 40 มิลลิกรัม; Inositol 400 มิลลิกรัม; Niacin 150 มิลลิกรัม; DL-alpha-tocopherol (E) 60 มิลลิกรัม; Choline chloride 600 มิลลิกรัม; Ascorbic acid (C) 500 มิลลิกรัม; Anticaking (SiO_2) 200 มิลลิกรัม; Antioxidant (BHT) 2 มิลลิกรัม; Acetate (A) & Cholecalciferol (AD_3) 500/100 700,000 IU; NaCl 0.25 กรัม; $MgCO_3$ 3.75 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

[2] พลังงาน (DE)(kcal/kg feed) จากการคำนวณ

ตาราง 5 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหาร จากการทดลองที่ 1 โดยการวิเคราะห์[1](หน่วย % น้ำหนักแห้ง)

สูตรที่	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE
1. กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	3.10±0.05	35.72±0.19	10.68±0.34	9.47±0.02	15.87±0.62	25.16+0.74
2. กากมะพร้าว	2.10±0.13	37.49±0.44	11.25±0.20	10.60±0.04	10.37±0.17	28.19+0.76
3. ข้าวโพด	5.65±0.16	33.47±0.24	7.59±0.36	8.83±0.03	1.42±0.06	43.04±0.22
4. รำละเอียด	3.10±0.04	35.21±0.35	13.60±0.21	11.67±0.03	3.08±0.01	33.34+0.17
5. มันสำปะหลังป่น	9.63±0.12	31.29±0.35	7.75±0.22	9.88±0.06	2.41±0.01	39.04±0.48

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

NFE : Nitrogen free extract

3.1.3 แผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัตถุดิบพืช 5 ชนิด คือ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน กากมะพร้าว ข้าวโพด รำละเอียด และมันสำปะหลังป่น เพื่อทดสอบว่าวัตถุดิบชนิดใดมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลานิลแปลงเพศดีที่สุด แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (treatment) แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 4 ซ้ำ (replications) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 6 สัปดาห์ ดำเนินการทดลองโดยเติมน้ำลงในตู้ที่เตรียมไว้ประมาณ 180 ลิตรต่อตู้ ระบบน้ำเป็นแบบไหลเวียนแบบปิด มีเครื่องพ่นอากาศตลอดเวลาในตู้ เมื่อเริ่มต้นการทดลองทำการสุ่มปลาที่เตรียมไว้ (น้ำหนักเฉลี่ย 3.14-3.20 กรัมต่อตัว) ลงเลี้ยงในตู้ทดลองตู้ละ 20 ตัว จำนวน 20 ตู้ นำปลาจำนวน 20 ตัว ไปวิเคราะห์หาความชื้น และองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) ให้อาหารปลาทดลองวันละ 2 ครั้ง คือช่วงเช้า เวลา 09.00 น. และช่วงเย็น เวลา 16.00 น.โดยให้ปลากินจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุก 2 สัปดาห์ตลอดการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักปลาทุกๆ 2 สัปดาห์โดยวิธีการแทนที่น้ำ และตรวจวัดคุณภาพน้ำก่อนการเลี้ยงและทุกๆ 2 สัปดาห์ตลอดการทดลองตามวิธีการของ Boyd and Tucker (1992) ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ออกซิเจน (dissolved oxygen, DO) อุณหภูมิน้ำ ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง (total hardness) แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท

3.1.4 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

3.1.4.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะภายนอกของปลา

ในระหว่างการทดลองสังเกตลักษณะภายนอกของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรค ตามสภาพของปลา ทำการดูดตะกอน ทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆ 2 วันโดยเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 30 % เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

3.1.4.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ โดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละตู้ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ในวันที่ชั่งน้ำหนักปลางดให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการปลาตลอดการทดลองพร้อมทั้งจดบันทึกไว้ จนสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตรารอด โดยสมการ

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

คำนวณการเจริญเติบโต จากสูตร
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain %)

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

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR%)

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

คำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) ตามวิธีการของ Durpree and Sneed (1966) โดยสมการ

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

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

$$\text{อัตราการกินอาหาร (\% ต่อตัวต่อวัน)} = \frac{F \times 100}{\frac{W_0 + W_t}{2} \times \frac{N_0 + N_t}{2} \times t}$$

โดย

F = น.น. อาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม) N_O=จำนวนปลาเริ่มต้น (กรัม)
W_O = น.น. ปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม) N_t=จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)
W_t = น.น. ปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม) t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

3.1.4.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) แล้วบันทึกเป็นองค์ประกอบทางโภชนาการของตัวปลาเริ่มต้นการทดลอง จากนั้นจึงนำมาคำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน ตามวิธีการของ Zeitoun *et al.,* (1973)

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

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

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (%)

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

3.1.4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารทดลองของปลานิล

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลานิล โดยเติมโครมิกซ์ออกไซด์ 1 % ของน้ำหนักอาหารเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งเตรียมโดยเจือจางโครมิคซ์ออกไซด์บริสุทธ์ 98 % ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 % โดยใช้แกลบเป็นส่วนผสม 49 % กับโครมิคซ์ออกไซด์ 51 % ทำการเก็บรวบรวมมูลปลาโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Boonyaratpalin and Phromkunthong (2000) โดยเก็บรวบรวมมูลปลาวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้า และเย็นหลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง ก่อนเก็บมูลปลาทำความสะอาดตู้เพื่อกำจัดเศษอาหารและมูลปลาที่ตกค้างในตู้ วิธีการเก็บมูลปลาโดยใช้สายพลาสติกขนาดเล็กดูดมูลปลาออกจากตู้แล้วกรองด้วยถุงกรองที่ผูกติดไว้กับสายยางอีกด้านหนึ่งแล้วนำไปแช่แข็ง เก็บรวบรวมมูลในสัปดาห์ที่ 4-6 เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ อบมูลปลาให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) วิเคราะห์ปริมาณโครมิกซ์ออกไซด์ในอาหารและในมูลตามวิธีของ Furukawa and Tsukahara (1966) คำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยโดยสมการ

ประสิทธิภาพในการย่อย (บนฐานของวัตถุแห้ง) (dry matter digestibility or total digestibility)

$$= 100 - 100 \frac{\%\ Cr_2O_3 \text{ ในอาหาร}}{\%\ Cr_2O_3 \text{ ในมูล}}$$

ประสิทธิภาพในการย่อยสารอาหาร (nutrient digestibility)

$$= 100 - 100 \frac{[\%Cr_2O_3 \text{ ในอาหาร} \times \%\ \text{สารอาหารในมูล}]}{[\%Cr_2O_3 \text{ ในมูล} \times \%\ \text{สารอาหารในอาหาร}}$$

3.1.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 10.0 วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955)

3.1.4.6 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ในขณะทดลอง ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในตู้ทดลองทุก 2 สัปดาห์ โดยวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำโดยใช้ DO meter วัดค่าการนำไฟฟ้าโดยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า และใช้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 0.5 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำก่อนเปลี่ยนถ่ายน้ำ นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340 และวิเคราะห์ความเป็นด่าง ความกระด้างของน้ำ แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทในน้ำตามวิธีการของ Boyd and Tucker (1992) (ภาคผนวก ข)

3.2 การทดลองที่ 2

3.2.1 การเตรียมปลาทดลอง

ใช้ลูกปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวอยู่ในช่วง 0.3-0.6 กรัม จำนวน 2,500 ตัว มาอนุบาลและเตรียมการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

เป็นการนำเอาผลจากการทดลองที่ 1 ที่ได้จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารโดยนำวัตถุดิบที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน มาจัดระดับเป็น

ส่วนผสมในสูตรอาหารทดลอง ซึ่งมี 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เสริมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน ชุดการทดลองที่ 2 – 5 มีระดับของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน 10, 20, 30 และ 40 % ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการเตรียมวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด แป้งข้าวเจ้า นำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า)โดยวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) (ตาราง 6) และเตรียมอาหารทดลองตามสูตรที่คำนวณไว้โดยให้มีโปรตีน 30 % ไขมันไม่เกิน 9 % และพลังงาน 3,200 กิโลคาลอรี / อาหาร 1 กิโลกรัม วิธีการเตรียมอาหารทดลอง โดยการชั่งวัสดุอาหารแต่ละอย่างได้แก่ กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด แป้งข้าวเจ้า น้ำมันถั่วเหลือง วิตามินและแร่ธาตุผสมอัลฟาสตาร์ท โครมิกซ์ออกไซด์ และแกลบ ซึ่งเป็นวัสดุเติมเต็ม ตามสูตรที่คำนวณไว้ ทำการผสมส่วนประกอบวัสดุอาหารให้เข้ากันดี นำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดโดยมีขั้นตอนและวิธีการเหมือนกับการเตรียมอาหารทดลองที่ 1 (ตาราง 7) และนำอาหารที่ผ่านการอบแห้งไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ (ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า) ตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (1990) (ตาราง 8)

ตาราง 6 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหารทดลอง ของการทดลองที่ 2 โดยการวิเคราะห์ [1] (หน่วย % น้ำหนักแห้ง)

วัสดุอาหาร	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	5.05±0.02	15.16±0.12	13.29±0.51	3.90±0.00	18.75±0.66	43.85±1.26
ปลาป่น	6.77±0.02	69.77±0.33	13.17±0.53	16.40±0.14	0	0.86±0.76
กากถั่วเหลือง	11.76±0.21	40.84±0.29	2.18±0.06	8.02±0.26	5.62±0.28	31.58±0.00
รำละเอียด	6.15±0.09	11.54±0.21	20.35±0.22	13.42±0.24	8.50±0.19	40.07±0.41
แป้งข้าวเจ้า	7.91±0.15	7.09±0.12	0.81±0.08	0.31±0.01	0.13±0.11	83.75±1.20

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

NFE : Nitrogen free extract

ตาราง 7 สูตรอาหารทดลองของการทดลองที่ 2

วัตถุดิบอาหาร (กรัม)	สูตรอาหาร				
	1	2	3	4	5
กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน	0	100	200	300	400
ปลาป่น	180	160	140	115	90
กากถั่วเหลือง	360	380	400	420	432.5
รำละเอียด	170	125	80	30	0
แป้งข้าวเจ้า	130	80	30	10	0
น้ำมันถั่วเหลือง	21	21	22.5	15	0
วิตามินและแร่ธาตุผสม [1]	30	30	30	30	30
อัลฟา-สตาร์ท	10	10	10	10	10
โครมิกซ์ออกไซด์	10	10	10	10	10
แกลบ	89	84	77.5	60	27.5
รวม	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
พลังงาน (DE)(kcal/kg feed)[2]	3,208.60	3,208.60	3,208.40	3,202.90	3,208.70

[1] วิตามินและแร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม; Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม; Pyridoxine (B_6) 10 มิลลิกรัม; Cyanocobalamin (B_{12}) 2 มิลลิกรัม; Cholecalciferol (D_3) 29.2 มิลลิกรัม; Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 มิลลิกรัม; Folic acid 5 มิลลิกรัม; Calcium pantothenate 40 มิลลิกรัม; Inositol 400 มิลลิกรัม; Niacin 150 มิลลิกรัม; DL-alpha-tocopherol (E) 60 มิลลิกรัม; Choline chloride 600 มิลลิกรัม; Ascorbic acid (C) 500 มิลลิกรัม; Anticaking (SiO_2) 200 มิลลิกรัม; Antioxidant (BHT) 2 มิลลิกรัม; Acetate (A) & Cholecalciferol (AD_3) 500/100 700,000 IU; NaCl 0.25 กรัม; $MgCO_3$ 3.75 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

[2] พลังงาน (DE)(Kcal/Kg feed) จากการคำนวณ

ตาราง 8 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารจากการทดลองที่ 2 โดยการวิเคราะห์[1] (หน่วย % น้ำหนักแห้ง)

สูตรที่	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE
1	1.92±0.08	30.60±0.18	8.57±0.42	11.25±0.01	9.38±0.15	38.32±0.44
2	2.70±0.03	30.27±0.25	8.95±0.61	10.84±0.02	10.43±0.32	36.82±1.09
3	2.92±0.02	30.42±0.43	9.20±0.66	10.32±0.05	17.53±0.48	29.60±1.15
4	2.39±0.13	30.46±0.08	8.89±0.54	9.59±0.01	20.36±0.34	28.30±0.46
5	2.18±0.04	30.24±0.29	7.21±0.11	8.74±0.03	23.99±0.67	27.64±0.99

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ)

NFE : Nitrogen free extract

3.2.3 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 10 สัปดาห์ การทดลองที่ 2 นี้เป็นผลต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 เป็นการนำผลการทดลองที่ 1 คือกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ให้ผลต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารที่ดีที่สุด นำมาจัดระดับจำนวน 5 ระดับคือ 0, 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 4 ซ้ำ เติมน้ำลงในตู้ที่เตรียมไว้ประมาณ 180 ลิตรต่อตู้ ระบบน้ำเป็นแบบไหลเวียนแบบปิด มีเครื่องพ่นอากาศตลอดเวลาในตู้ เมื่อเริ่มต้นการทดลองนำปลาทดลองที่เตรียมไว้ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.02-3.04 กรัมต่อตัวปล่อยปลาลงเลี้ยงในตู้ทดลองตู้ละ 20 ตัวจำนวน 20 ตู้ ให้อาหารปลาทดลองวันละ 2 ครั้ง คือเวลาเช้าประมาณ 09.00 น. และเวลาเย็นประมาณ 16.00 น.รายละเอียดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวางแผนการทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1ข้อ 3.1.3

3.2.4 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.4.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะภายนอกของปลา กระทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.4.1)

3.2.4.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา กระทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.4.1)

3.2.4.3 การคำนวณค่าดัชนีตับต่อตัว (Hepatosomatic Index)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 6 ตัว นำปลาแต่ละตัวไปชั่งน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าดัชนีตับต่อตัว ตามวิธีของ Anwar and Jafri (1995) โดยสมการ

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

3.2.4.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา กระทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.4.3)

3.2.4.5 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 6 ตัว มาสลบด้วยน้ำยา 2-Methylquinoline เจาะเลือดจากบริเวณโคนหางโดยใช้ เอทีลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 1% เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด คือ

- ฮีโมโกลบิน โดยใช้วิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen and Snieszko (1961)
- ฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall and Daisley (1973)
- โปรตีนในพลาสมา โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry *et al.,* (1951)
- การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ตามวิธีการของกิจการ (2538)

3.2.4.6 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารทดลองของปลานิล กระทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.4.4)

3.2.4.7 การศึกษาต้นทุนการผลิต

คำนวณต้นทุนค่าอาหารต่อผลผลิตปลานิล (unit feeding cost) โดยสมการ

$$\text{ต้นทุนค่าอาหารต่อผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (ก.ก.) x ราคาอาหาร (บาท)}}{\text{น้ำหนักปลาทั้งหมด (ก.ก.)}}$$

3.2.4.8 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.4.5)

3.2.4.9 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำ 3 ครั้ง คือก่อนปล่อยปลาลงทดลอง ระหว่างการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยกระทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ข้อ 3.1.4.6) (ภาคผนวก ข)