บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1.วัสดุ

1.1 พันธุ์ปลานิล

ลูกปลานิลพันธุ์จิตรลดา น้ำหนักเฉลี่ย 2 กรัม จากศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด จังหวัดสุราษฎร์ธานี กรมประมง

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของร่างกายปลานิล และอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก)

1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัสและแคลเซียมของร่างกายปลานิล และ อาหารทดลอง (ภาคผนวก ก)

1.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลานิล (ภาคผนวก ก)

1.2.4 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล (ภาคผนวก ก)

1.2.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โครมิคออกไซด์ (ภาคผนวก ก)

1.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก)

1.2.7 สารเคมีสำหรับการป้องกันและรักษาโรคปลา ได้แก่ ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ฟอร์มาลิน (formalin) มาลาไคท์กรีน (malachite green) ยาสลบ (2-phenoxyethanol)

1.3 อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มต้นทดลอง

การเตรียมอาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาก่อนเริ่มการทดลองอ้างอิงจากวุฒิพรและคณะ (2540)

2.อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 2 ลูกบาศก์เมตร

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

2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำได้แก่ สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม (submarine pump)

2.1.5 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ขันพลาสติก

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 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

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

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและตัวปลา

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 อุปกรณ์วิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่ ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง แผ่นให้ความร้อน เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง ขวดรูปชมพู่ ขวดพลาสติกและหลอดแก้ว

2.4.6 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 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ 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 เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง

2.7 อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิคออกไซด์ในอาหารและมูลปลา

7.1 อุปกรณ์เก็บมูลปลา ได้แก่ สายยาง ถุงผ้าขาวบาง

7.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับข้อ 4.2

7.3 เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง

2.8 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

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

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 100 x 50 x 47 เซนติเมตรความจุน้ำ 235 ลิตร (หน่วยทดลอง) ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์แล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ให้ได้ปริมาตร 120 ลิตร ปิดตู้ด้วยผ้าพลาสติกสีทึบ 3 ด้านเพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง

3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกปลานิลจำนวน 2,000 ตัวมาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุ 2 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ลูกปลาปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของการวิจัย โดยฝึกหัดให้กินอาหารทดลอง (อาหารสูตร 1) วันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 8.30 น. และ 16.30 น. สังเกตพฤติกรรมการยอมรับอาหาร ก่อนเริ่มการทดลองนำลูกปลาไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก ลูกปลาที่ใช้ทดลองต้องมีสุขภาพดี ไม่มีโรคใดๆ ทำการคัดปลาใส่ตู้ทดลอง ปริมาตรน้ำ 120 ลิตร จำนวน 30 ตัวต่อตู้ ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้และอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน หลังจากปลาคุ้นเคยกับสภาพตู้และอาหารทดลองแล้ว ทำการชั่งหาน้ำหนักเริ่มต้นของปลา ชั่งโดยวิธีการแทนที่น้ำ

3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองทั้งหมดมี 8 ชุดการทดลองแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสในระดับที่แตกต่างกัน 5 ระดับคือ 0, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ยูนิตต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มที่เสริมด้วยอนินทรีย์ฟอสเฟตต่างกันซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ โมโนแคลเซียมฟอสเฟต ไดแคลเซียมฟอสเฟต และไตรแคลเซียมฟอสเฟต โดยเสริมรูปแบบละ 0.46 เปอร์เซ็นต์ คำนวณสูตรอาหารให้มีระดับโปรตีน ไขมันและระดับพลังงานเท่ากันทุกชุดการทดลอง คือมีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 10-11 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานที่ย่อยได้ 3,900 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยค่าพลังงานที่ย่อยได้ในอาหารคำนวณโดยใช้ค่าต่างๆ ซึ่งประยุกต์มาจากค่าที่ใช้ในปลานิลคือ 4.4 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสำหรับโปรตีน 9.0 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับไขมัน และ 3.7 กิโลคาลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับคาร์โบไฮเดรต (Stickney, 1979)

วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการรวมทั้งฟอสฟอรัสและแคลเซียมของวัสดุอาหารที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารทดลอง โดยวิธี AOAC (1990) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

วิธีการเตรียมอาหารทดลองโดยชั่งวัสดุอาหารแต่ละอย่างได้แก่ กากถั่วเหลือง รำข้าว ปลายข้าว แกลบ วิตามิน แร่ธาตุผสมยกเว้นฟอสเฟต และอนินทรีย์ฟอสเฟต ตามสูตรที่คำนวณไว้ (ตารางที่ 2) สำหรับน้ำมันข้าวโพดใส่ลงไปในระหว่างการผสมอาหาร เมื่อผสมส่วนประกอบวัสดุอาหารให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมอาหาร นำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วอบที่อุณหภูมิ 60

องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งเอนไซม์ไฟเตสตามปริมาณที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตร หน่วยของไฟเตส คือ เอฟทียู (FTU) โดย 1 เอฟทียูหมายถึง การปลดปล่อยหรือย่อย 1 ไมโครโมล ของอนินทรีย์ฟอสฟอรัสต่อนาที จากโซเดียมไฟเตท (sodium phytate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5 (Soares and Hughes, 1995) ไฟเตสที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทบีเอเอสเอฟ (BASF) ประเทศเยอรมนี ซึ่งเป็นผลผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีชื่อทางการค้าว่านาทูฟอส (Natuphos 5,000 G) มีไฟเตสแอคติวิตี้ 5,000 เอฟทียูต่อกรัม นำเอนไซม์มาละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) โดยใช้น้ำปริมาณ 50 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ฉีดพ่นเอนไซม์ไฟเตสบนเม็ดอาหาร สำหรับสูตรที่ไม่มีการเสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตสจะทำการฉีดพ่นเม็ดอาหารด้วยน้ำปริมาณ 50 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเช่นกัน เพื่อให้ทุกสูตรมีความชื้นใกล้เคียงกัน ผึ่งอาหารให้แห้งแล้วบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร และคณะ, 2540) และตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่เตรียมเสร็จแล้ว (โปรตีน ไขมัน เยื่อใย ความชื้น เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตหาได้จากการคำนวณตามสูตร 100 - (ความชื้น+โปรตีน+ไขมัน+เถ้า+เยื่อใย) ก่อนนำไปใช้ในการทดลองเลี้ยง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัสดุอาหารทดลองโดยการวิเคราะห์ [1] (บนฐานของวัตถุแห้ง)

วัสดุอาหาร	คุณค่าทางโภชนาการ (%)						
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	คาร์โบไฮเดรต	ฟอสฟอรัส	แคลเซียม
กากถั่วเหลือง	48.37±0.36	7.30±0.20	7.85±0.03	4.84±0.06	30.21±0.70	0.69±0.02	34.00±1.51
ปลายข้าว	8.15±0.08	1.39±0.13	0.79±0.00	0.40±0.02	86.77±0.12	0.14±0.00	ไม่พบ
รำข้าว	13.50±0.12	21.95±0.57	8.61±0.01	8.30±0.26	45.14±1.05	1.63±0.05	ไม่พบ
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต	-	-	-	-	-	20.07±0.52	21.72±1.45
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	-	-	-	-	-	17.67±0.41	62.56±0.45
ไตรแคลเซียมฟอสเฟต	-	-	-	-	-	16.47±0.25	66.94±0.84

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของอาหารทดลองแต่ละสูตร

ส่วนประกอบ	สูตรอาหาร							
(ก. /อาหาร 100 ก.)	1	2	3	4	5	6	7	8
กากถั่วเหลือง	54	54	54	54	54	54	54	54
ปลายข้าว	21	21	21	21	21	21	21	21
รำข้าว	19	19	19	19	19	19	19	19
น้ำมันข้าวโพด	1	1	1	1	1	1	1	1
วิตามินและแร่ธาตุผสม*	3	3	3	3	3	3	3	3
เอนไซม์ไฟเตส	0	0.01	0.02	0.04	0.08	0	0	0
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต	0	0	0	0	0	0.46	0	0
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	0	0	0	0	0	0	0.46	0
ไตรแคลเซียมฟอสเฟต	0	0	0	0	0	0	0	0.46
โครมิคออกไซด์	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
แกลบป่น	1.50	1.49	1.48	1.46	1.42	1.04	1.04	1.04

* วิตามินและแร่ธาตุผสม (ปริมาณ/อาหาร 1 กก.) 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 6,000 มิลลิกรัม; Ascorbic acid (C) 500 มิลลิกรัม; Anticaking 200 มิลลิกรัม; Antioxidant 2 มิลลิกรัม; Acetate(A) & Cholecalciferol (D_3) 14 มิลลิกรัม; 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.

4. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) โดยจัดให้แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ทำการสุ่มโดยวิธีจับฉลาก โดยจับหน่วยทดลองทั้งหมด 24 หน่วย เมื่อเริ่มต้นการทดลองสุ่มปลาจากถังอนุบาลมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นเก็บปลาชุดดังกล่าวนี้ไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ความชื้น และองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ปล่อยปลาในตู้ทดลอง ตู้ละ 30 ตัว ใช้ลูกปลาทั้งหมด 720 ตัวโดยสุ่มปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.40 กรัมต่อตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือช่วงเช้าเวลา 8.30 น. และช่วงเย็นเวลา 16.30 น. โดยให้ปลากินอาหารจนอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง และตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ตลอดการทดลองตามวิธีของ Boyd and Tucker (1992) ได้แก่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ออกซิเจน (dissolved oxygen, DO) อุณหภูมิ ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง (total hardness) ปริมาณฟอสฟอรัส (total phosphorus)

ในการศึกษาความสามารถของการย่อย (digestibility)โดยเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรเดิมและเสริมโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5 % ในสัปดาห์ที่ 5 และเก็บมูลในสัปดาห์ที่ 6-8 โดยใช้วิธีกาลักน้ำ (Siphoning) ดำเนินการเก็บมูลหลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง (Shiau and Liang, 1994) ทุกๆ วัน รวบรวมมูลนำไปเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง (freezer) เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

5. การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

ในระหว่างการทดลองสังเกตลักษณะภายนอกทั่วไปของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรค ตามสภาพของปลา ทำการดูดตะกอน ทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆ 2 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำ เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

5.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

การชั่งน้ำหนักปลาดำเนินการทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นโดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ในวันที่ชั่งน้ำหนักงดให้

อาหารเป็นเวลา 1 วัน) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการปลาตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกไว้ จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตรารอด (survival rate) โดยสมการ

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

คำนวณอัตราการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจาก

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain %)

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

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR %)

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

คำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) ตามวิธีการของ Dupree 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

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

โดย

F = น.น อาหารแห้งที่ปลากิน N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น

W_o = น.น.ปลาเฉลี่ยเริ่มต้น N_t = จำนวนปลาสุดท้าย

W_t = น.น.ปลาเฉลี่ยสุดท้าย t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง

5.3 การหาค่าดัชนีตับต่อตัว (Hepatosomatic Index)

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

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

5.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มการทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันทีและนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณ เถ้า ไขมัน โปรตีน ฟอสฟอรัสและแคลเซียมตามวิธีการของ AOAC (1990) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละตู้ทดลองๆ ละ 6 ตัว ไปวิเคราะห์หาความชื้นของตัวปลาตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) และนำปลา 10 ตัว จากแต่ละตู้ทดลอง (แบ่งปลาเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งแล่เอาเฉพาะเนื้อ อีกส่วนหนึ่งใช้ปลาทั้งตัว) ไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดย อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียมตามวิธีการของ AOAC (1990) แล้วบันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 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

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

5.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับและไต จากตัวอย่างปลาตู้ทดลองๆ ละ 2 ตัวมาแช่ในสารละลายบูแอง (Bouin's fluid) 1 สัปดาห์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อของ Humason (1972) ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin Eosin (HE) (Bancroft, 1967) จากนำเนื้อเยื่อไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.6 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

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

- Hemoglobin โดยใช้วิธี Cyanmet-haemoglobin ของ Larsen and Snieszko (1961)
- Hematocrit โดยวิธีดัดแปลงจาก Blaxhall and Daisley (1973)
- Plasma protein โดยวิธีดัดแปลงจาก Lowry *et al.* (1951)

5.7 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารทดลองของปลานิล

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนของปลานิล โดยเติมโครมิคออกไซด์ (Cr_2O_3) 0.5 % ของน้ำหนักอาหารเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ และลดปริมาณแกลบป่นในอาหาร ทำการเก็บรวบรวมมูลปลาใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Boonyaratpalin and Phromkunthong (2000)โดยเก็บรวบรวมมูลปลาหลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง เพราะปลานิลจะขับมูลออกมาเมื่อมีการกินอาหารเข้าไปใหม่ ทำการเก็บรวบรวมมูลในน้ำด้วยการใช้สายพลาสติกขนาดเล็กดูดมูลปลาออกจากตู้แล้วกรองด้วยถุงกรองที่ผูกติดไว้กับสายยางอีกด้าน และนำไปแช่แข็ง เก็บรวบรวม

มูลในสัปดาห์ที่ 6–8 เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ อบมูลปลาให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างนั้นไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัสและแคลเซียมตามวิธีการ AOAC (1990) วิเคราะห์ปริมาณโครมิคออกไซด์ในอาหารและในมูลตามวิธีของ Furukawa and Tsukahara (1966) คำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยโดยสมการ

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

$$= 100\text{-}100\ [\%\ \text{มาร์กเกอร์ในอาหาร} / \%\ \text{มาร์กเกอร์ในมูล}]$$

% ความสามารถในการย่อยสารอาหาร (nutrient digestibility)

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

คำนวณหาประสิทธิภาพการดูดซึมฟอสฟอรัสตามวิธีของ Haug and Lantzsch (1983) โดยสมการ

% การดูดซึมฟอสฟอรัส (net absorption of phosphorus)

$$= 100 \times \left\{ 1 - \frac{[\%\ \text{มาร์กเกอร์ในอาหาร} \times \%\ \text{ฟอสฟอรัสในมูล}]}{[\%\ \text{มาร์กเกอร์ในมูล} \times \%\ \text{ฟอสฟอรัสในอาหาร}]} \right\}$$

5.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

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

5.9 การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ในขณะทดลอง ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในตู้ทดลองทุก 2 สัปดาห์ โดยวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำโดยใช้ DO meter และใช้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1 ลิตร เก็บตัวอย่างน้ำก่อนถ่ายเปลี่ยนน้ำ นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH

meter และวิเคราะห์ความเป็นด่าง ความกระด้างของน้ำและปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำตามวิธีการของ Boyd and Tucker (1992)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองที่มีเอนไซม์ไฟเตสในระดับต่างๆ และอนินทรีย์ฟอสเฟต 3 รูปแบบ โดยการวิเคราะห์[1] (บนฐานของวัตถุแห้ง)

สูตรที่	เอนไซม์ไฟเตส	ส่วนประกอบ (%)						
		โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	คาร์โบไฮเดรต	ฟอสฟอรัส	แคลเซียม
1	0	30.28±0.23	11.18±0.22	6.66±0.01	5.54±0.12	42.59±0.17	0.77±0.03	19.64±1.43
2	500	30.22±0.27	11.39±0.08	6.68±0.01	5.78±0.15	41.97±0.26	0.75±0.01	16.76±0.33
3	1,000	30.35±0.30	11.12±0.08	6.71±0.02	6.29±0.07	42.02±0.39	0.79±0.02	20.05±0.64
4	2,000	30.80±0.13	10.46±0.32	6.85±0.00	5.66±0.18	42.56±0.30	0.79±0.02	18.33±1.10
5	4,000	30.64±0.17	11.38±0.33	6.83±0.01	5.28±0.52	42.63±0.72	0.80±0.01	18.22±1.04
6	Monocalcium Phosphate	30.46±0.35	10.84±0.20	6.95±0.13	5.55±0.22	42.84±0.26	0.92±0.03	23.64±0.87
7	Dicalcium Phosphate	30.61±0.12	11.30±0.06	6.92±0.08	5.70±0.26	42.50±0.37	0.89±0.01	32.97±0.37
8	Tricalcium Phosphate	30.67±0.25	11.26±0.75	7.02±0.04	5.36±0.19	42.73±0.62	0.87±0.04	31.83±0.41

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)