บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. พันธุ์ปลา

ลูกปลาดุกพันธุ์ผสม น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 1-2 กรัม จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด จังหวัดสงขลา

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ ส่วนประกอบทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหาร อาหารทดลอง และซากปลา (ภาคผนวก ก.1)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก.2)

2.3 สารเคมีสำหรับป้องกัน และ รักษาโรคปลา ได้แก่ ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) ฟอร์มาลิน (formalin) ด่างทับทิม (potassium permanganate) ($KMnO_4$) และยาสลบ (2-phenoxyethanol)

3. อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาดุกพันธุ์ผสมก่อนเริ่มการทดลอง

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

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร

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

1.3 อุปกรณ์ให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง และหัวทราย

1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วย สายยาง และเครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

1.5 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ประกอบด้วย สวิงช้อนปลา ถังพลาสติก และ ขันพลาสติก

1.6 อุปกรณ์ในระบบกรองน้ำ ประกอบด้วย ท่อพลาสติก แผ่นใยกรอง และ ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร ภายในบรรจุเปลือกหอยขนาดใหญ่ เปลือกหอยขนาดเล็ก ถ่าน และ ทรายละเอียด

2. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.1 เครื่องมือผสมอาหารและอัดเม็ดอาหารของ Hobart Model A200T ประกอบด้วย ชุดเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัตถุดิบอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ และ ถาดเตรียมอาหาร

3. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ คือ เทอร์โมมิเตอร์

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

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

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

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

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

3.7 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์และไนเตรท ได้แก่ กระบอกแก้วแยกไนเตรท (reduction column) หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปต ลูกยาง หลอดหยด ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

4. อุปกรณ์วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง และปลาทดลอง

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

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

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

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

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

5. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร ขันพลาสติก และสวิงช้อนปลา

6. อุปกรณ์วิเคราะห์เลือด

ประกอบด้วยเข็มฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็มขนาด 26 g เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกส่วนประกอบเลือด (haematocrit centrifuge) และ ฮีมาโตไซโตมิเตอร์(haematocytometer)

7. อุปกรณ์วิเคราะห์เนื้อเยื่อ

ประกอบด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ(automatic tissue processor)ยี่ห้อ Autotechnicon Mono รุ่น MOD.2A และ เครื่องตัดเนื้อเยื่อยี่ห้อ Jung AG Heidelberg

8. อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์

ประกอบด้วย หลอดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิตร บีกเกอร์ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร หลอดหยด ลูกยาง เครื่องทำความร้อน (hot plate) และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบสแกน(scan spectrophotometer) ของ Perkin Elmer รุ่น Lambda 25

9. อุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน (reciprocal titer)

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

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

อุปกรณ์การทดลองประกอบด้วย ตู้กระจกขนาด 100×50×47 เซนติเมตร ความจุน้ำ 235 ลิตร โดยทำความสะอาด และ ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ เติมน้ำจากบ่อพักน้ำที่ปราศจากคลอรีนลงในตู้ทดลอง ให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิด ประกอบด้วย ถังกรองน้ำซึ่งเป็นถังไฟเบอร์กลาสกลมปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และแผ่นใยกรอง จำนวน 2 ถัง บ่อพักน้ำเป็นบ่อคอนกรีต บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และเครื่องให้อากาศ มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลของน้ำ 1.2 ลิตรต่อนาที น้ำที่ไหลเวียนในระบบจะล้นออกทางท่อน้ำล้นซึ่งติดอยู่ในตู้ทดลอง และไหลไปรวมกันในท่อน้ำทิ้งลงสู่ถังกรองน้ำจากถังกรองน้ำไหลลงสู่บ่อบำบัดน้ำ จากนั้นก็จะถูกสูบขึ้นไปยังบ่อพักน้ำ และไหลกลับมายังตู้ทดลอง

1.2 การเตรียมสาหร่ายสไปรูไลนา

นำหัวเชื้อสาหร่ายสไปรูไลนาจาก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา มาเพาะเลี้ยงในขวดโหลความจุน้ำ 10 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงตามสูตรของธิดา (2545) ซึ่งประกอบด้วย

1.2.1 โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	150	กรัม / น้ำ 1,000 ลิตร
1.2.2 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Na_2HPO_4)	30	กรัม / น้ำ 1,000 ลิตร
1.2.3 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2HCO_3)	1,000	กรัม / น้ำ 1,000 ลิตร
1.2.4 อามิ-อามิ(กากผงชูรสชนิดเข้มข้น)	100	กรัม / น้ำ 1,000 ลิตร

จากนั้นจึงขยายลงในตู้กระจกขนาดความจุ 250 ลิตร โดยเตรียมน้ำเลี้ยงตามสูตรของธิดา (2545) ให้ได้ปริมาตรน้ำ 200 ลิตร ความหนาแน่นของสาหร่ายเริ่มต้น 250 มิลลิกรัมต่อน้ำเลี้ยงสาหร่าย 1 ลิตร เก็บเกี่ยวผลผลิตของสาหร่ายทุก 7 วัน นำสาหร่ายที่ได้ไปขยายปริมาณต่อในท่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร สูง 46 เซนติเมตร ความจุ 300 ลิตรจำนวน 12 ท่อ และเติมอาหารสูตรธิดา(2545) วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าดูดกลืนแสง(OD_{560})ทุก 2 วัน ตรวจลักษณะภายนอกและป้องกันการเจริญของสาหร่ายชนิดอื่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระหว่างการเลี้ยงทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ และเก็บเกี่ยวผลผลิต อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อแห้งสนิทจึงนำมาบดให้ละเอียดและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมไว้เพื่อผสมในอาหารทดลอง ต่อไป

1.3 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลาดุกพันธุ์ผสมมาจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา โดยใช้ปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวขนาด 1-2 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ลูกบาศก์เมตร โดยเติมน้ำในถังให้ได้ปริมาตร 400 ลิตร เลี้ยงปลาให้มีน้ำหนักประมาณ 7 กรัม จึงเริ่มทำการทดลอง ก่อนเริ่มทดลองปรับสภาพให้ปลาคุ้นเคยกับอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ โดยใช้อาหารสูตรควบคุม สังเกตพฤติกรรมการยอมรับอาหาร เมื่อลูกปลายอมรับอาหารแล้วนำมาเลี้ยงในตู้ทดลองความจุน้ำ 200 ลิตร จำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ (60 ตัวต่อชุดการทดลอง) แต่ละตู้ทดลอง มีอากาศพ่นจากเครื่องให้อากาศตลอดเวลา ระบบการทดลองเป็นแบบปิดโดยใช้ แผ่นใยกรอง ทราย เปลือกหอย และถ่านเป็นตัวกรอง

1.4 การเตรียมอาหารทดลอง

วิเคราะห์วัตถุดิบอาหาร ได้แก่ สาหร่าย สไปรูไลนา ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลายข้าว รำ ตามวิธีของ AOAC(1990) ดังตารางที่ 1 หลังจากนั้นสร้างสูตรอาหารให้มีคุณค่าทางโภชนาการให้แต่ละสูตรมีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 300 กิโลคาลอรี/อาหาร 100 กรัม จะต่างกันเพียงปริมาณของสาหร่ายสไปรูไลนาที่เสริมในอาหารทดลอง ดังตารางที่ 2 ตามลำดับ อาหารทดลองมีทั้งหมด 7 สูตร โดยสูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุม และ สูตร 2–7 เป็นอาหารทดลองที่มีระดับสาหร่ายสไปรูไลนาต่างกัน ดังตารางที่ 2

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

1.4.1 ขั้นตอนการเตรียมอาหารทดลอง

1.4.1.1 นำวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการวิเคราะห์ และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิดดังตารางที่ 2 และนำส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมันและน้ำ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (Horbart model A 200T) เป็นเวลา 15 นาที จึงเติมน้ำมันลงไป ประมาณ 10 นาที เมื่อเข้ากันดีแล้วจึงเติมน้ำกลั่นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหาร

1.4.1.2 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมเข้ากันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิลิตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

1.4.1.3 นำอาหารเม็ดที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผึ่งให้เย็น เก็บใส่ถุงพลาสติก เพื่อเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ คือ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย ตามวิธีของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือไนโตรเจนฟรีเอ็กแทร็ก (nitrogen free extract, NFE) คำนวณจาก 100-(ความชื้น+โปรตีน+ไขมัน+เถ้า+เยื่อใย) แสดง ดังตารางที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารโดยวิธี Lowry method อ้างมาจาก Chien และ Jeng (1992) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารทดลอง* (%บนฐานน้ำหนักสด)

วัตถุดิบ	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	ไนโตรเจนฟรีเอ็กแทรกซ์
สาหร่ายสไปรูไลนา	3.30±0.06	56.12±0.26	4.81±0.92	7.50±0.00	0.38±0.03	27.95±1.59
ปลาป่น	5.00±0.15	54.72±0.43	15.78±0.13	23.26±0.40	0	1.18±0.81
ถั่วเหลือง	7.41±0.03	46.13±0.60	5.79±0.30	7.48±0.78	6.54±0.07	29.55±3.65
ข้าวโพด	4.19±0.05	8.44±0.30	7.02±0.35	3.19±0.03	6.90±0.13	70.02±0.47
ปลายข้าว	4.77±0.05	8.28±0.08	3.69±0.12	8.59±0.22	0.99±0.01	73.86±0.15
รำ	5.42±0.08	12.05±0.28	15.72±0.56	15.83±0.09	4.88±0.07	45.81±0.65

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 2 สูตรอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงปลาดุกพันธุ์ผสมเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ส่วนประกอบ (กรัม/อาหาร 100 กรัม)	สูตรที่ 1	2	3	4	5	6	7
สไปรูไลนา	0	5	10	15	20	25	30
ปลาป่น	28	25	20	15	10	7	0
ถั่วเหลือง	25	22	22	23	23	23	23
ข้าวโพด	15	15	13	13	14	10	10
รำละเอียด	6	10	9	11	9	9	11
ปลายข้าว	9	6	7	4	6	5	6
ไขมัน	0	0	1	1	1	2	2
วิตามิน[1]	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุ[2]	1	1	1	1	1	1	1
แกลบ	15	15	16	16	15	17	16
รวม	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**
โปรตีน(%)[3]	30.95	30.81	30.44	30.72	30.55	30.21	30.11
ไขมัน(%)[3]	7.37	7.57	7.91	7.77	7.20	7.71	7.43
พลังงาน(กิโลคาลอรี/อาหาร100กรัม)[3]	300.63	301.12	303.00	303.27	306.87	308.74	308.65

[1] Vitamin mixture (ปริมาณต่ออาหาร 1 กก.): Acetate(A) 4,000 IU; Cholecalciferol (D_3) 2,000 IU; DL-alpha-tocopherol (E) 50 มก.; Menadione sodium bisulfite (K_3) 10 มก.; Thiamine (B_1) 20 มก.; Riboflavin (B_2) 20 มก.; Niacin 150 มก.; Calcium pantothenate 200 มก.; Folic acid 5 มก.; Pyridoxine (B_6) 20 มก.; Cyanocobalamin (B_{12}) 0.2 มก.; Biotin 2 มก.; Inositol 400 มก.; Choline chloride 2,000 มก.; Ascorbic acid (C) 1,000 มก.

[2] Mineral mixture (ปริมาณต่ออาหาร 1 กก.): Manganese 25 มก.; Zinc 20 มก.; Copper 5 มก.; Iodine 5 มก.; Cobalt 0.05 มก.; Selenium 0.3 มก.; Iron 30 มก.

[3] จากการคำนวณ

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง 7 ชุดการทดลอง ที่มีการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาต่างกัน 7 ระดับ* (% บนฐานน้ำหนักสด)

ชุดการทดลอง	สาหร่ายสไปรูไลนา	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์
1	0	0.50±0.07	31.91±0.41	7.50±0.26	15.30±0.18	9.93±0.23	34.92±0.68
2	5	2.89±0.21	31.52±0.28	7.80±0.16	15.23±0.70	9.57±0.98	32.87±0.98
3	10	1.25±0.24	31.11±0.67	7.30±0.16	14.33±0.04	11.44±0.16	37.27±2.40
4	15	0.46±1.12	30.93±0.22	7.49±0.59	13.66±0.26	11.02±1.12	35.68±0.31
5	20	0.47±0.12	30.21±0.26	7.95±0.13	12.46±0.23	9.28±1.19	39.65±0.12
6	25	1.71±0.05	31.80±0.81	7.72±0.18	11.90±0.21	10.96±0.93	36.43±0.41
7	30	1.45±0.05	31.03±0.50	7.52±0.32	10.05±0.54	9.47±0.03	40.73±0.75

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ตารางที่ 4 ปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารทดลองที่มีการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 7 ระดับ* (บนฐานของน้ำหนักแห้ง)

ชุดการทดลอง	สาหร่ายสไปรูไลนา(%)	ปริมาณคาโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/อาหาร 1 กรัม)
1	0	0.02±0.03
2	5	0.23±0.03
3	10	0.76±0.08
4	15	0.98±0.07
5	20	1.40±0.33
6	25	1.65±0.30
7	30	2.85±0.61

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

1.5 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* บริสุทธิ์ เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) นำเชื้อมาทดสอบ pathogenic โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ $3X10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับ Macfarland ฉีดเข้าช่องท้อง และกล้ามเนื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต่อปลา 1 ตัว เก็บตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อและเพิ่งตาย นำมาเขี่ยเชื้อ 3 บริเวณ คือ แผล ตับ และม้าม ในอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีเดียวและมีลักษณะสีเหลืองขุ่นมาทำการเลี้ยงบนอาหารใหม่หลายๆครั้ง (subculture) และนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบแบบ api 20 E (bioMe' rieuxsa) แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร TSA เก็บไว้ในการทดลองต่อไป

2. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(CRD: Completely Randomized Design) โดยแบ่งการทดลองเป็น 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ทดสอบผลของสาหร่ายสไปรูไลนาต่อระบบภูมิคุ้มกัน และ ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกพันธุ์ผสม โดยผสมสาหร่ายไปรูไลนาแห้ง 7 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25และ 30 เปอร์เซ็นต์ในอาหารทดลองสูตรที่ 1-7 ตามลำดับ โดยสูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุม โดยให้อาหารทดลอง 2 เวลา คือ 8.30 น. และ 16.30 น. โดยให้ปลากินจนอิ่ม

2.2 การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก

ในขณะทำการทดลองสังเกตลักษณะภายนอกทั่วไปของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ การบวมบริเวณกกหู การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่ ผิวหนัง ครีบ และ อวัยวะภายนอกอื่นๆ รวมทั้งพฤติกรรมของปลา ใช้ยา และ สารเคมีเพื่อป้องกันโรคตามสภาพของปลา ดูดตะกอน และทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆวัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละ 30 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรน้ำทั้งหมด เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง

2.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ คำนวณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และบันทึกอัตราการรอดตายของปลาทุกชุดการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหาร 1 มื้อก่อนวันที่ชั่งน้ำหนักปลา) นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการของปลาตลอดการทดลอง พร้อมจดบันทึก จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้คำนวณการรอดตาย (survival , %) ตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000)

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

คำนวณอัตราการเจริญเติบโต ตามวิธีการของ De Silva และ Anderson (1995) โดยพิจารณาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, %)

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

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: SGR, %ต่อวัน)

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

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

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

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

$$\text{อัตราการกินอาหาร (\%ต่อตัวต่อวัน)} = \frac{F \times 100}{\frac{(Wo + Wt)}{2} \times \frac{(No+Nt)}{2} \times t}$$

เมื่อ F = น.น อาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)

No = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

Nt = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

Wo = น.น.ปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)

Wt = น.น.ปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)

t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

2.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในปลาทดลอง

เมื่อเริ่มการทดลองสุ่มปลา 30 ตัว นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีของ AOAC(1990) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 3 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นหลังจากเสร็จสิ้นการทดลอง และสุ่มปลาอีกตู้ละ 3 ตัวไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับปลาก่อนทดลอง นำข้อมูลน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักอาหารที่ปลากิน ปริมาณโปรตีนในอาหาร และโปรตีนในซากปลามาคำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER: Protein Efficiency Ratio)(Zeitoun *et al.*, 1973) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (ANPU: Apparent Net Protein Utilization)(Robinson and Wilson, 1985) โดยใช้สูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลา(กรัม)}}{\text{น้ำหนักของโปรตีนที่ปลากิน(กรัม)}}$$

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (%)

$$= \frac{\text{(โปรตีนในตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง-โปรตีนในตัวปลาเมื่อเริ่มต้น) (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง(กรัม)}} \times 100$$

2.2.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 6 ตัว สลบด้วย 2-ฟีนอกซิเอทินอล (2-phenoxyehenol) เจาะเลือดบริเวณโคนหางโดยใช้ เอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethelenediaminetetraacetic acid; EDTA) 1 เปอร์เซ็นต์ ป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด คือ ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) โดยวิธี Cyanmet-hemoglobin ของ Lersen และ Snieszko (1961) หาปริมาณของเม็ดเลือดขาวโดยการเจือจางด้วย Yokoyama's fluid และนับตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley (1973) หาค่าฮีมาโตคริต (hematocrit) วัดโดย microhematocrit method (Larsen and Snieszko, 1961)

เซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง (Klesius *et al.*, 2000) ศึกษาการตกตะกอน และ บันทึกผล (Klesius *et al.*, 2000)

2.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' s Multiple Range Test (DMRT) และหาค่าสหสัมพันธ์ของระดับการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนากับค่าไตเตอร์โดยวิธี Pearson correlation (Steel and Torrie, 1980)

2.2.9 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

วิเคราะห์คุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง 3 บริเวณ คือ ตู้ทดลอง บ่อพักน้ำ และบ่อบำบัดน้ำ โดยแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เป็นเวลาสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยน้ำตัวอย่างจะทำการเก็บในช่วงเช้าหลังการดูดตะกอนและทำความสะอาดตู้ โดยทำการวัดคุณภาพน้ำปลา ตามวิธีของ Boyd และ Tucker (1992) ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen; DO) ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง(hardness) แอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) และ ไนเตรท (nitrate) (ตารางผนวก ข)