อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

ปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) ขนาด 7-10 เซนติเมตร น้ำหนัก 10-15 กรัม จำนวน 800 ตัว

2. อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ทดลองได้แก่สูตรอาหารปลาดุกลูกผสมที่ใช้ ข้าวโพด และมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบแหล่งพลังงาน โดยสูตรอาหารทดลองมี 4 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารใช้ข้าวโพดเป็นแหล่งพลังงานหลัก
สูตรที่ 2 อาหารใช้มันเส้นทดแทนข้าวโพด 50 เปอร์เซ็นต์
สูตรที่ 3 อาหารใช้มันเส้นเป็นแหล่งพลังงานหลัก
สูตรที่ 4 อาหารเม็ดสำเร็จรูปลอยน้ำที่ผลิตในทางการค้า

อาหารทดลองสูตรที่ 1-3 ทำการผลิตและอัดเม็ดลอยน้ำโดยการใช้เครื่องเอ็กทรูดเดอร์ขนาดเล็ก ณ ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาการผลิตปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม อาหารทุกสูตรให้ในรูปอาหารอัดเม็ดลอยน้ำ

อาหารสูตรที่ 1-3 คำนวณให้มีองค์ประกอบทางโภชนะครบตามความต้องการของปลาดุกลูกผสม แนะนำโดย เวียง (2542) แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สูตรอาหารและองค์ประกอบทางโภชนะในอาหารปลาดุกลูกผสม

วัตถุดิบอาหาร	ข้าวโพด 100%	มันเส้น 50%	มันเส้น 100%	ราคา[1] (บาท/กก.)
ปลาป่น (60% โปรตีน)	15	15	15	26.30
กากถั่วเหลือง (44% โปรตีน)	40.4	43.83	45.23	12.50
ข้าวโพด	40.25	18	-	8.00
มันสำปะหลัง	0	18.22	34.22	4.50
ดีแอล-เมทไธโอนีน	0	0.1	0.2	70.00
น้ำมันพืช	3	3.5	4	29.25
เกลือ	0.35	0.35	0.35	2.38
หัวไวตามิน-แร่ธาตุ (พรีมิกซ์)[2]	1	1	1	47.90
รวม	100	100	100	
ค่าการผลิตอาหารลอยน้ำ (บาท/กก.)	2.00	2.00	2.00	
ต้นทุนอาหาร (บาท/กก.)	15.58	15.31	15.00	
องค์ประกอบทางโภชนะโดยการคำนวณ				
โปรตีน (%)	30.00	30.09	30.00	
พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (กิโลแคลอรี/กิโลกรัม)	3267.38	3210.47	3331.21	
ไขมัน (%)	5.90	5.99	5.97	
เยื่อใย (%)	3.98	4.34	4.68	
แคลเซียม (%)	0.86	1.01	0.90	
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้ (%)	0.65	0.65	0.63	
ไลซีน (%)	1.93	1.91	2.00	
เมทไธโอนีน+ ซิสตีน (%)	1.01	1.08	1.13	
ทริปโตเฟน (%)	0.37	0.38	0.37	
ทรีโอนีน (%)	1.01	1.18	1.19	

<u>หมายเหตุ</u> [1] ราคาวัตถุดิบ ณ เดือนมิถุนายน 2550 และราคาอาหารสำเร็จรูปลอยน้ำ 18.30 บาท

[2] พรีมิกซ์ 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย vitaminA 6,700,000 IU, vitaminD 1,350,000 IU/, vitaminE 67 g, vitaminK3 3.4g, vitaminB1 6.7 g, vitaminB2 10 g, vitaminB6 8 g, vitaminB12 13.5 mg, niacin 53 g, pantothenic acid 26.5 g, folic acid 3.3 g, biotin 335 mg, inositol 135 g, vitaminC 35%

3. อุปกรณ์การเลี้ยงปลา

3.1 โรงเรือนสำหรับเลี้ยงปลา

3.2 บ่อซีเมนต์ เพื่อการอนุบาลปลา

3.3 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 500 ลิตร

3.4 ระบบเติมอากาศในบ่อปลา เช่น สายยางต่อกับหัวทราย

3.5 อุปกรณ์การเปลี่ยนถ่ายน้ำ

3.6 ตู้ปลาขนาดความจุ 100 ลิตร

4. อุปกรณ์การทำอาหารทดลอง

4.1 วัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารทดลอง

4.2 เครื่องบดวัตถุดิบ

4.3 เครื่องชั่ง

4.4 เครื่องผสมอาหาร

4.5 เครื่องเอ็กทรูดเดอร์ขนาดเล็กสำหรับอัดเม็ดอาหาร

5. อุปกรณ์และสารเคมี

5.1 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบโภชนะของอาหารทดลอง

5.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาเมื่อเริ่มและสิ้นสุดการทดลอง

5.3 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดของปลาดุกลูกผสม

5.3.1 กระบอกฉีดยาขนาด 3 และ 5 มิลลิลิตร

5.3.2 เข็มฉีดยาขนาด 1 นิ้ว เบอร์ 24 และเบอร์ 25

5.3.3 Heparin

5.3.4 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

5.3.5 แอลกอฮอล์ 70%

5.3.6 น้ำมันกานพลู

5.3.7 สำลี และ ถุงมือ

5.4 อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

5.4.1 เชื้อ *Aeromonas hydrophila* (กรมประมง)

5.4.2 Aromonas medium base (RYAN) (Oxiod)

5.4.3 Nutrient broth

5.4.4 Petri dish

5.4.5 Test tube

5.4.6 Autoclave

5.4.7 Centrifuge

5.4.8 เครื่องเขย่า

5.4.9 loop ใช้ในการเขี่ยเชื้อ

5.4.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

5.5 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาการเจริญพัฒนาของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิดที (T-lymphocyte)

5.5.1 Iscove modified dulbecco medium (IMDM) (Gibthai co., ltd.)

5.5.2 Ficoll-paque plus (Amersham Bioscience)

5.5.3 Fetal calf serum

5.5.4 Antibiotic (penicillin และ streptomycin)

5.5.5 Concanavalin A (Sigma)

5.5.6 WST-8 working solution (cell counting kit-8; Dojindo Molecular Technologies Incorporation)

5.5.7 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

5.5.8 Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

5.5.9 Microtube ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.5.10 Pasteur pipette

5.5.11 Flat-bottomed 96 well plates

5.5.12 Auto-pipette (single channel และ multi-channels)

5.5.13 Centrifuge

5.5.14 Biohazard hood

5.5.15 CO_2 incubator

5.5.16 Counting chamber

5.5.17 กล้องจุลทรรศน์

5.5.18 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ELIZA reader)

5.6 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาปริมาณกลูตาไธโอน (glutathione) ในเม็ดเลือดแดงของปลาดุกลูกผสม

5.6.1 Glutathione assay kit (Cayman Chemical)

5.6.2 Metaphosphoric acid (Aldrich)

5.6.3 Triethanolamine (Aldrich)

5.6.4 HPLC-grade water

5.6.5 Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

5.6.6 Microtube ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.6.7 Pasteur pipette

5.6.8 Auto-pipette (single channel และ multi-channels)

5.6.9 เครื่อง vortex

5.6.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ELIZA reader)

5.6.11 ตู้ดูดไอสารพิษ (fume hood)

5.6.12 เครื่องชั่งสารเคมี

5.7 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษา phagocytic activity (PA)

5.7.1 Iscove modified dulbecco medium (IMDM) (Gibthai co., ltd.)

5.7.2 Ficoll-paque plus (Amersham Bioscience)

5.7.3 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

5.7.4 95% methanol

5.7.5 Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

5.7.6 Centrifuge

5.7.7 สีย้อม wright giemsa straining

5.7.8 Auto-pipette (single channel)

5.7.9 แผ่นสไลด์ และ cover slip

5.7.10 กล้องจุลทรรศน์

5.9 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวัดคุณภาพน้ำ

5.9.1 D.O. test kit (Advance phama)

5.9.2 NH_3 test kit (Advance phama)

5.9.3 NO_2^- test kit (Advance phama)

5.9.4 pH meter

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลการใช้มันสำปะหลังในสูตรอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตของปลาดุกลูกผสม

1. แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design; CRD) โดยใช้ปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) ขนาด 7-10 เซนติเมตร น้ำหนัก 10-15 กรัม จำนวน 800 ตัวแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มประกอบไปด้วย 4 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ตัว ปลาแต่ละกลุ่มได้กินอาหารที่มีองค์ประกอบทางโภชนะตามความต้องการ ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้ กลุ่มที่ 1 อาหารสูตรข้าวโพด กลุ่มที่ 2 อาหารสูตรมันสำปะหลัง 50 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 อาหารสูตรมันสำปะหลัง และกลุ่มที่ 4 อาหารสำเร็จรูปลอยน้ำ

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ทำการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในบ่อซีเมนต์ก่อนเริ่มทำการทดลอง เพื่อฝึกให้ปลาคุ้นเคยกับอาหารและสภาพแวดล้อม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยให้อาหารวันละ 3 ครั้ง เช้า- กลางวัน- เย็น เวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 16.00 น. จากนั้นคัดปลาที่มีความยาว 7-10 เซนติเมตร น้ำหนักอยู่ระหว่าง 10-15 กรัม เลี้ยงในถังพลาสติก พร้อมสายยางต่อกับหัวทรายสำหรับให้อากาศทุกบ่อ แต่ละบ่อใส่ปลา 50 ตัว รวมทั้งสิ้น 16 ถัง ใช้ลูกปลาทั้งสิ้น 800 ตัว

3. การจัดการอาหารและน้ำระหว่างการเลี้ยง

ให้อาหารปลาแต่ละสูตรวันละ 3 ครั้ง คือ เช้า เวลา 8.00 น. กลางวัน เวลา 12.00 น. และเย็น เวลา 16.00 น. (ยกเว้นวันที่ทำการชั่งวัดจะงดให้อาหาร) โดยให้อาหารในอัตราร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว ใน 2 สัปดาห์แรก และปรับการให้อาหารภายหลังการชั่งวัดแต่ละครั้งโดยให้อาหารในอัตราร้อยละ 3, 2.5 และ 2 ของน้ำหนักตัว ในสัปดาห์ที่ 4, 6 และ 8 ตามลำดับ และให้ในอัตราร้อยละ 2 ต่อไปจนสิ้นสุดการทดลอง การเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนก้นบ่อกระทำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

4. การบันทึกข้อมูล

เก็บข้อมูลคุณภาพอาหาร สมรรถภาพการผลิต คุณภาพซาก คุณภาพน้ำ และองค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา ดังนี้

4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองแบบ proximate analysis โดยวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ฟอสฟอรัส แคลเซียม พลังงานรวม ตามวิธีของ A.O.A.C (1990)

4.2 การเก็บข้อมูลสมรรถภาพการผลิต ทำการเก็บข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังนี้

1. น้ำหนักเฉลี่ย
2. น้ำหนักเพิ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (weight gain, WG)
3. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (specific growth rate, SGR)
4. อัตราการกินอาหาร (feed intake, FI)
5. ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ย
6. ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน
7. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio, FCR)
8. ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER)
9. การใช้ประโยชน์โปรตีนสุทธิ (net protein utilization, NPU)
10. ต้นทุนการผลิต

4.3 การเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำ

1. วัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ
2. วัดค่าแอมโมเนีย
3. วัดค่าไนไตรท์
4. วัดค่าพีเอช

4.4 การเก็บข้อมูลคุณภาพซากของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยสุ่มปลามาซ้ำละ 2 ตัวแล้วแบ่งซากออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนเนื้อ หัวครีบกระดูก อวัยวะภายใน และไขมันในช่องท้อง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ซากแต่ละส่วนต่อน้ำหนักตัวปลา

4.5 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา โดยใช้วิธีการ proximate analysis เมื่อเริ่มการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง โดยสุ่มปลามาซ้ำละ 2 ตัว นำตัวอย่างปลามาสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสรวมเป็นตัวอย่างเดียวกัน จากนั้นนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างและนำไปวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า ตามวิธีของ A.O.A.C (1990) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicate)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธีการ analysis of variance และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s new multiple range test

6. สถานที่ทำการทดลอง

6.1 สถานีวิจัยประมงน้ำจืด กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

6.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

7. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลอง: 6 มิถุนายน 2550
สิ้นสุดการทดลอง: 8 พฤศจิกายน 2550

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลการใช้มันสำปะหลังในสูตรอาหารต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลาดุกลูกผสม

ศึกษาผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลาดุกลูกผสม โดยใช้การเจริญพัฒนาของเซลล์ lymphocyte เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-medieted immunity; CMI) ใช้การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมเป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity) ใช้ระดับ glutathione ในเม็ดเลือดแดงเป็นตัวบ่งชี้สภาวะของเซลล์ในปลาดุกลูกผสม

1. การทดลองการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

1.1. ศึกษาการเจริญพัฒนาของเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิดที (T-lymphocyte)

ใช้ปลาดุกลูกผสมที่กินอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แยกปลาใส่ในตู้ปลาที่มีปริมาตรน้ำ 70 ลิตร ตามจำนวนซ้ำของหน่วยทดลอง ให้อาหารตามปกติ กระตุ้นการเกิดโรคของปลาด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยวิธีการละลายเชื้อโรคลงในน้ำในตู้ปลา ในวันที่ 0, 3 และ 6 วัน หลังจากได้รับการกระตุ้น เก็บตัวอย่างเลือดจากปลายหางหรือปลายลำตัว (caudal vain) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (2 ซ้ำต่อตัวอย่าง) ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin) หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ได้มาทำการแยกเม็ดเลือดขาวโดยการใช้ ficoll-paque แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเม็ดเลือดขาวด้วย PBS (Phosphate buffer saline) 3 ครั้ง จากนั้นเตรียมตัวอย่างเซลล์เพื่อตรวจหาการเจริญพัฒนาของเซลล์ลิมโฟซัยท์ตามขั้นตอนของ Tadashi *et al.* (2002) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

1.2. วิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนรวม (total glutathione)

เมื่อปลาดุกลูกผสมมีอายุ 8, 10 และ 12 สัปดาห์ เก็บเลือดจากปลายหางหรือปลายลำตัว (caudal vain) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin) นำตัวอย่างเลือดมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 3,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกพลาสม่าและเซลล์ลิมโฟซัยท์ออก เติม HPLC-grade water แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 3,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบน (erythocyte lysate)

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอน โดยใช้ชุดทดสอบ glutathione assay kit นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาความเข้มข้นของกลูตาไธโอนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.3 ศึกษาการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytotic activity)

ใช้ตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวจากข้อ 1.1 ที่แยกได้โดยการใช้ ficoll-paque หยดเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบน cover slip 2 แผ่นต่อหนึ่งตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติมยีสต์ที่ต้มในน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบนเซลล์ ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วล้างด้วย 95% เมทานอล ประมาณ 3–5 วินาที แล้วชะล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปศึกษาการจับกินของเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธีการ analysis of variance และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3. สถานที่ทำการทดลอง

3.1 สถานีวิจัยประมงน้ำจืดกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.2 ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.3 ห้องปฏิบัติการซีรั่มวิทยา หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

4. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลอง: 12 ตุลาคม 2550
สิ้นสุดการทดลอง: 20 พฤศจิกายน 2550