ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42109

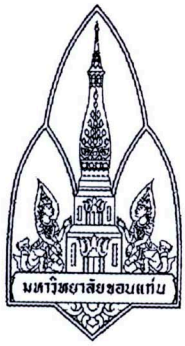
STUDY ON METHOD FOR DETERMINATION OF MELAMINE AND UREA-FORMALDEHYDE AND THEIR DIETARY SUPPLEMENTATION EFFECTS ON PRODUCTIVE PERFORMANCE AND INTERNAL ORGAN LESIONS IN BROILERS AND LAYERS

MRS. SRISUDA SIRILAOPHAISAN

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY
2011

b00256195

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42109



STUDY ON METHOD FOR DETERMINATION OF MELAMINE AND UREA-FORMALDEHYDE AND THEIR DIETARY SUPPLEMENTATION EFFECTS ON PRODUCTIVE PERFORMANCE AND INTERNAL ORGAN LESIONS IN BROILERS AND LAYERS

MRS. SRISUDA SIRILAOPHAISAN

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY
2011

STUDY ON METHOD FOR DETERMINATION OF MELAMINE AND UREA-FORMALDEHYDE AND THEIR DIETARY SUPPLEMENTATION EFFECTS ON PRODUCTIVE PERFORMANCE AND INTERNAL ORGAN LESIONS IN BROILERS AND LAYERS

MRS. SRISUDA SIRILAOPHAISAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2011

THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN ANIMAL SCIENCE

Thesis Title: Study on method for determination of melamine and urea-formaldehyde and their dietary supplementation effects on productive performance and internal organ lesions in broilers and layers

Author: Mrs. Srisuda Sirilaophaiisan

Thesis Examination Committee

Asst. Prof. Dr. Winai Jaikan	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Supaporn Isariyodom	Member
Assoc. Prof. Dr. Jowaman Khajarern	Member
Assoc. Prof. Dr. Bundit Tengjarernkul	Member

Thesis Advisors:

..... Advisor

(Assoc.Prof. Dr. Jowaman Khajarern)

..... Co-Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Bundit Tengjarernkul)

.....

(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)

Dean, Graduate School

.....

(Assoc. Prof. Dr. Anan Polthanee)

Dean, Faculty of Agriculture

Copyright of Khon Kaen University

ศรีสุดา ศิริเหล่าไพศาล. 2554. **การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารเมลามีนและยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์และการเสริมในอาหารที่มีผลกระทบต่อสมรรถนะการผลิตและการเกิดวิการของอวัยวะภายในของไก่เนื้อและไก่ไข่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. เยาวมาลย์ ค้าเจริญ,
รศ. ดร. บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล

บทคัดย่อ

E 42109

งานทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาถึงวิธีการวิเคราะห์สารเมลามีนและยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ โดยการดัดแปลงใช้วิธีการวัดด้วยสเปคโตโฟโตมิเตอร์ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง (กากถั่วเหลือง ถั่วเหลืองไขมันเต็ม ส่วนผสมเท่ากันของกากถั่วเหลืองและถั่วเหลืองไขมันเต็ม) อาหารไก่เนื้อ และอาหารไก่ไข่ ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า ให้ผลของความเข้มข้นเมลามีนและยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตาม Beer's Low โดยให้ค่า $R^2 = 0.9857$ สำหรับการวัดเมลามีน และให้ค่า $R^2 = 0.9641$ สำหรับการวัดยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองและอาหารไก่ พบว่า การดัดแปลงวิธีวิเคราะห์โดยใช้สเปคโตโฟโตมิเตอร์ ให้ค่า R^2 ระหว่าง 0.9121 ถึง 0.9986 ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และราคาถูกในการนำมาใช้วิเคราะห์หาสารเมลามีน และยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลือง และอาหารสัตว์ปีก

การทดลองที่ 2 การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาผลการเสริมเมลามีน ยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ (UF) และส่วนผสมของทั้งสองชนิดในอาหารไก่เนื้อต่อสมรรถนะในการผลิต คุณภาพซาก พิษตกค้าง การเปลี่ยนแปลงทางกล้องจุลทรรศน์ และจุลวิทยาในเนื้อเยื่อของไก่เนื้อตลอดช่วงอายุการเลี้ยง 1-42 วัน ใช้ลูกไก่เนื้ออาร์เบอร์เอเคอร์คละเพศ 1,040 ตัว แบ่งเป็น 13 กลุ่มๆละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีลูกไก่เนื้อ 20 ตัว สูตรอาหารประกอบด้วยการเสริมเมลามีน หรือ UF หรือส่วนผสมของทั้งสองชนิด 4 ระดับ (0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00%) และกลุ่มควบคุมไม่มีการให้สารเสริม ผลการทดลองพบว่า อาหารที่กิน (FI) ในทุกกลุ่มทดสอบไม่มีผลแตกต่างกัน ($P>0.05$) ทางสถิติ การเสริมเมลามีนในอาหาร $\geq$ 0.75% มีผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (BWG) ลดลง ($P<0.05$) และลดลงมากที่สุดเมื่อไก่เนื้อเสริมด้วยเมลามีน1.00% ในสูตรอาหาร การเสริมผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า BWG มีผลแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) BWG จะลดลงเป็นเส้นตรง ($P<0.05$) เมื่อระดับเมลามีน ในสูตรอาหารเพิ่มขึ้น ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 3 ชนิด จะมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารให้เป็นเนื้อได้ต่ำกว่า ($P<0.05$)

E 42109

ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยสูตรควบคุม อัตราการเลี้ยงรอดลดลง ($P<0.05$) เมื่อเสริมด้วยเมลามีน ทั้ง 4 ระดับ หรือเลี้ยงด้วยอาหารที่มี UF $\geq$ 0.50% หรือส่วนผสมของทั้งสอง 1.00% เมื่อเปรียบเทียบกับไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยสูตรควบคุม ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเสริมเมลามีน จะให้อัตราการเลี้ยงรอดต่ำกว่า ($P<0.05$) ไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่เสริม UF หรือส่วนผสมของทั้งสองชนิด ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไก่เนื้อสามารถทนต่อสาร UF ได้ในระดับสูงกว่า เมลามีน การเสริมเมลามีนในอาหารทั้ง 4 ระดับ แสดงผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ (Productive index, PI หรือ European production efficiency factor, EPEF) ต่ำกว่า ($P<0.05$) ไก่เนื้อที่เสริมด้วย UF หรือส่วนผสมของทั้งสองชนิดหรือสูตรควบคุม การเสริมผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด จะแสดงผล PI ลดลงเป็นทั้งเส้นตรง (linear, $P<0.05$) และเส้นโค้ง (quadratic, $P<0.05$) ต่อระดับการเสริมของแต่ละผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้นในสูตรอาหาร คุณภาพของซากไก่เนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลองเมื่อวัดเป็นเปอร์เซ็นต์ซากตกแต่ง (Dressing percentage) และ ปริมาณเนื้อทั้งหมด (Total carcass yield) พบว่า ให้ผลไม่แตกต่างกันต่อทุกกลุ่มที่ทดสอบ การตกค้างของ เมลามีนในเนื้ออกและตับไม่สามารถตรวจวัดได้เมื่อ ไก่เนื้อกินอาหารที่เสริมเมลามีน ต่ำกว่า 0.50% การตกค้างของเมลามีน ในเนื้อเยื่อของเนื้ออกและตับจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของการเสริมเมลามีน ในอาหารเพิ่มขึ้น เนื้อเยื่อตับจะมีเมลามีน ตกค้างสูงกว่า ($P<0.05$) เนื้อเยื่อของเนื้ออก การตกค้างของเมลามีน ในเนื้อเยื่อของเนื้ออกและตับจะหมดหรือไม่พบเมื่อถอนเมลามีนออกจากอาหารเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไก่สามารถขับเมลามีน ที่สะสมในกล้ามเนื้อออกจากร่างกายได้รวดเร็ว ผลการตรวจสอบเมลามีนคริสตอลโดยกล้องจุลทรรศน์ในเนื้อเยื่อของตับ ไต และม้าม แสดงผลอย่างเด่นชัดต่อสหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณและขนาดคริสตอลสีน้ำตาลทองที่พบในเนื้อเยื่อต่อระดับของเมลามีน ที่เสริมเพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าสารเมลามีนมีผลทำให้ตับ และม้าม บวม เลือดคั่ง ขอบเขตของเซลไม่ชัดเจน เนื้อเยื่อไตพบผลึกเมลามีนในเนื้อเยื่อ ในไก่เนื้อที่เสริมเมลามีน 1.00% ในอาหาร การทดสอบครั้งนี้สรุปได้ว่าอาหารที่เสริมเมลามีน UFและส่วนผสมของทั้งสองชนิดในระดับ $\geq$ 0.75% ทำให้สมรรถนะการผลิตลดลง เห็นการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อทางกล้องจุลทรรศน์และพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 3 การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาผลการเสริมเมลามีน ยูเรียฟอร์มาลดีไฮด์ (UF) และส่วนผสมของทั้งสองชนิดในอาหารต่อสมรรถนะการผลิต ในไก่ไข่อายุ 12-18, 19-34 และ37-52 สัปดาห์ คุณภาพไข่ (อายุ 19-34 และ 37-52 สัปดาห์) การเปลี่ยนแปลงทางกล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อของไก่ไข่ (อายุ 34 และ 52 สัปดาห์) ใช้ไก่ไข่พันธุ์อีซ่า บราวน์จำนวน 312 ตัว แบ่งเป็น 13 กลุ่มๆละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีไก่ไข่ 6 ตัว สูตรอาหารประกอบด้วยการเสริมเมลามีน หรือ

E 42109

UF หรือส่วนผสมของทั้งสองชนิด 4 ระดับ (0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00%) และกลุ่มควบคุมไม่มีการให้สารเสริม ผลการทดลองพบว่า อาหารที่กิน (FI) และอัตราการเลี้ยงรอดในทุกกลุ่มทดสอบไม่มีผลแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ไก่ไข่อายุ 12-18 สัปดาห์ น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (BWG) มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) BWG จะลดลงเมื่อระดับเมลามีนในสูตรอาหารเพิ่มขึ้นและลดลงมากที่สุดเมื่ออาหารไก่ไข่เสริมเมลามีน 1.00% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม UF และการเสริมร่วมกัน การเสริมผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารให้เป็นไข่ (FCR) ($P>0.05$) ไก่ไข่อายุ 19-34 และ37-52 สัปดาห์ พบว่าผลผลิตไข่ (EP) น้ำหนักไข่ (EW) มวลไข่ (EM) และจำนวนไข่ลดลงแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) และลดลงมากที่สุดเมื่อไก่ไข่เสริมด้วยเมลามีน 1.00% ในสูตรอาหาร EP, EW, EM และจำนวนไข่ลดลงเป็นเส้นตรง ($P<0.05$) เมื่อระดับเมลามีน UF และส่วนผสมของทั้งสองชนิดในสูตรอาหารเพิ่มขึ้น ไก่ไข่ที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คุณภาพของไข่ไก่อายุ 19-34 สัปดาห์ พบว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดมีผลทำให้ EW และค่าคุณภาพของไข่ขาว (Haugh Unit, HU) ลดลงแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) และลดลงมากที่สุดเมื่ออาหารไก่ไข่เสริมด้วยเมลามีน 1.00% คุณภาพของไข่ไก่อายุ 37-52 สัปดาห์ พบว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดมีผลทำให้ค่าความถ่วงจำเพาะ EW และ HU ลดลงแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) และลดลงมากที่สุดเมื่ออาหารไก่ไข่เสริมด้วยเมลามีน 1.00% การเสริมเมลามีน UF หรือส่วนผสมของทั้งสองชนิดในอาหารระดับ $\geq$ 0.75% แสดงผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ (PI) ต่ำกว่า ($P<0.05$) ไก่ไข่สูตรอาหารควบคุม UF และการเสริมร่วมกัน ผลการตรวจสอบเมลามีนคริสตอลในเนื้อเยื่อของตับ ไต ม้าม และไข่ แสดงผลอย่างเด่นชัดต่อสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและขนาดคริสตอลสีน้ำตาลทองที่พบในเนื้อเยื่อต่อระดับของเมลามีนที่เสริมเพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าสารเมลามีนมีผลทำให้ตับ และม้าม บวม มีเลือดคั่ง ขอบเขตของเซลไม่ชัดเจน เนื้อเยื่อไตพบผลึกเมลามีนในเนื้อเยื่อในไก่ไข่ที่เสริมเมลามีน 1.00% ในอาหาร ลักษณะจุลพยาธิวิทยาของไข่ พบว่าทำให้ไซโตปลาสซึม (cytoplasm) ของไข่มีรูปร่างผิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การทดสอบครั้งนี้สรุปได้ว่าอาหารที่เสริมเมลามีน UFและส่วนผสมของทั้งสองชนิดในระดับ $\geq$ 0.75% ทำให้สมรรถนะการผลิต คุณภาพไข่ลดลง และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกล้องจุลทรรศน์และพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

Srisuda Sirilaophaisan. 2011. **Study on Method for Determination of Melamine and Urea-formaldehyde and their Dietary Supplementation Effects on Productive Performance and Internal Organ Lesions in Broilers and Layers.** Doctor of Philosophy Thesis in Animal Science, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Jowaman Khajarern,
Assoc. Prof. Dr. Bundit Tengjarernkul

ABSTRACT

E 42109

Experimant I. Ultraviolet and visible spectrophotometric methods for the determination of micro amounts of melamine and urea-formaldehyde (UF) in aqueous media, soybean protein products (soybean meal, fullfat soybean meal and equal mixture of both) and also chicken feeds (broiler and layer) have been modified in order to obtain the rapid desired detectability in soybean protein products and chicken diets. The results of the detection of melamine and UF are obeyed Beer's Low with good linear regression were obtain with R^2 = 0.9817 for melamine and R^2 = 0.9641 for UF. The linear regression analysis of soybean products and chicken feeds were obtained with R^2 0.9121 to 0.9986. The results of these studies demonstrate that both melamine and UF can be detected by these fast and cheap cost instrument for detection and characterization of melamine and UF compounds in soybean protein products and chicken feeds.

Experiment II. A study was conducted to determine the effects of dietary graded levels of melamine, urea-formaldehyde (UF) and their mixtures on growth performance, carcass quality, melamine residues, microscopic and histopathology changes in broiler tissues from d-1 to d-42 followed by a 7-d feeding of withdrawal diets. One thousand and forty 1-d-old equal mixed-sex Arber Acres broiler were assigned to 13 dietary treatments with 4 replicate pens of 20 chicks assigned to each treatment. The diets of melamine, UF and their mixture contained four graded levels (0.25, 0.50, 0.75 and 1.00%) but no melamine or UF was added to the control diet. There was no difference (P>0.05) in feed intake (FI) among controls and chickens fed on the three products (melamine or UF or

E 42109

their equal mixtures). Body weight gain (BWG) decreased significantly ($P<0.05$) in birds fed $\geq$ 0.75% melamine, with the greatest decrease in BWG observed in birds fed 1.00% melamine. There was a difference ($P<0.05$) in BWG between the basal diet and chickens fed on the three products. BWG decreased linearly ($P<0.05$) with increasing levels of dietary melamine. Chickens that are fed on the three products were less efficient ($P<0.05$) in converting feed to gain compared with the controls. Survival percentage decreased ($P<0.05$) in chickens fed all four levels of melamine or fed $\geq$ 0.50% UF or fed 1.00% or equal mixture of both compared with the controls. Birds fed with melamine showed a decreased ($P<0.05$) survival percentage compared with chicks fed UF or equal mixture of both. These findings demonstrate that UF has a higher toleration level than melamine. Chickens fed the four levels of melamine showed a lower ($P<0.05$) Productive index (PI) or European production efficiency factor (EPEF) compared with birds fed UF, the equal mixture or the controls. The influence of melamine, UF or their equal mixtures showed both linear ($P<0.05$) and quadratic ($P<0.05$) economic lost effects as the level of either melamine, UF or their equal mixtures in the diet increased. There was no difference in carcass dressing percentage and total carcass yield among treatments. Residue levels of melamine in meat and liver tissues were below the detection limit when the diet contained less than 0.50% melamine supplementation in the diets. Tissue melamine levels increased ($P<0.05$) in both meat and liver tissues with the increasing levels of melamine in the diets. The melamine residues in the liver were higher ($P<0.05$) than in the breast tissues. A withdrawal period of 7-d was found to clear the tissues of melamine, which means that chickens had an ability to quickly deplete the melamine that accumulated in their tissues. Microscopic examination of the melamine crystal on liver, kidney and spleen tissues provided evidence of a strong correlation between the amount and size of golden brown crystals and diets containing melamine concentration which are useful in the prediction of dietary melamine dosage in the diets. Pathological examination of the melamine crystal on liver and spleen tissues showed hepatocyte swelling, congestion, cell membrane less prominent. Photomicrograph showed brown melamine crystals deposited in the interstitial tissue surrounding the renal tubules of laying hens fed

E 42109

1.00% melamine contaminated in diet. These results indicated that dietary melamine or UF or their equal mixtures when fed at the level of ≥ 0.75% depressed growth performance, microscopic and histopathological changes in broilers.

Experiment III. An experiment was conducted to investigate the effects of melamine or urea-formaldehyde or their equal mixtures on performance in laying hens (12-18, 19-34 and 37-52 wk of age). Determine egg quality (19-34 and 37-52 wk of age), microscopic changes and histopathology changes in laying hens (34 and 52 wk of age). Three hundred and twelve ISA Brown laying hens were allocated into thirteen dietary treatments, with four replications and with six hens each were fed with feeding trial. The diets were formulated to contain four graded levels (0.25, 0.50, 0.75 and 1.00%) of melamine or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures and also with no added for negative control. There were no significant effects on feed intake and survival rate ($P>0.05$) among each group. Body weight gain (BWG) of hens (12-18 wk of age) decreased significantly ($P<0.05$), with the greatest decrease in BWG observed in hens fed 1.00% melamine when compared with the controls, UF or their equal mixtures. Feed conversion ratio (FCR) was no difference ($P>0.05$). Laying hens (19-34 and 37-52 wk of age) fed three products were decreased significant ($P<0.05$) in egg production (EP), egg weight (EW), egg mass (EM) and number of egg, with the greatest decrease in hens fed 1.00% melamine. EP, EW, EM and number of egg decreased linearly ($P<0.05$) with increasing levels of dietary melamine or UF or their equal mixtures. Hens that are fed on three products were less efficient ($P<0.05$) in FCR compared with the controls. Egg quality of hens (19-34 wk of age) were decreased significant ($P<0.05$) in EW and HU, with the greatest decrease in hens fed 1.00% melamine. Egg quality of hens (37-52 wk of age) were decreased significant ($P<0.05$) in specific gravity, EW and HU, with the greatest decrease in hens fed 1.00% melamine. Hens fed melamine or UF or their equal mixtures showed a lower ($P<0.05$) PI compared with hens fed the controls. Microscopic examination of the melamine crystal on liver, kidney and spleen tissues provided evidence of a strong correlation between the amount and size of golden brown crystals and diets containing melamine concentration which are useful in the prediction of dietary

E 42109

melamine dosage in the diets. Pathological examination of the melamine crystal on liver and spleen tissues showed hepatocyte swelling, congestion, cell membrane less prominent. Photomicrograph showed brown melamine crystals deposited in the interstitial tissue surrounding the renal tubules of laying hens fed 1.00% melamine contaminated in diet. Egg tissues photomicrograph, ooplasm of oocyte of laying hens, with 1.00% melamine in the diet showed spherical in shape. The ooplasm exhibits a heterogeneous appearance compared to a homogeneous and lightly stained as of the laying hens fed control treatment diet. These results indicated that dietary melamine, UF or their equal mixtures when fed at the level of $\geq$ 0.75% depressed productive performance, egg quality, microscopic and histopathological changes in laying hen tissues.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my supervisor, Associate Professor Dr. Jowaman Khajarern for her kindness in providing an opportunity to her advisee. I am also appreciated for her valuable supervision, suggestions, encouragement, supporting, guidance and criticism throughout the course of my study. I would like to express my greatest appreciation and sincere gratitude to my co-advisor, Associate Professor Dr. Bundit Tengjarernkul for his valuable advices, kindness useful comment and suggestion. Sincere thanks and appreciation are also due to my thesis committee, Associate Professor Dr. Supaporn Isariyodom and Assistant Professor Dr. Winai Jaikan for useful comments and suggestions this thesis to complete.

This study was supported by the Office of the Higher Education Commission, Thailand for supporting by grant fund under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D Program Thai Doctoral degree for this research.

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my dear parents and all members of family for their encouragement. I would like to express my gratitude to all those anonymous people whose names may not appear here-in who helped me to complete this thesis. Lastly, my loving family, Narongchai, Yotsapol, and Nichapat for their understanding, forever caring, cheering and continued love me on.

Srisuda Sirilaophaisan

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	viii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Background and justifications	1
1.2 Hypothesis	3
1.3 Objectives	4
1.4 Expected outcomes	4
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	5
2.1 Melamine	5
2.2 Urea-formaldehyde	15
2.3 Avian urinary system	18
2.4 Methods for the analysis of melamine and its analogues	24
2.5 Effect of melamine in animals diets	28
2.6 Effect of urea-formaldehyde in animal diets	35
CHAPTER III EXPERIMENT I RAPID MODIFIED SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF MELAMINE AND UREA-FORMALDEHYDE IN SOYBEAN PROTEIN PRODUCTS AND CHICKEN FEEDS	36
3.1 Introduction	36
3.2 Materials and methods	37
3.3 Results and discusstion	40

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER IV EXPERIMENT II EFFECTS OF DIETARY MELAMINE OR UREA-FORMALDEHYDE OR THEIR MIXTURES ON PERFORMANCE, CARCASS QUALITY, MELAMINE RESIDUES, MICROSCOPIC AND HISTOPATHOLOGY CHANGES IN BROILER TISSUES	45
4.1 Introduction	45
4.2 Materials and methods	48
4.3 Results	51
4.4 Discussion	72
4.5 Conclusion	75
CHAPTER V EXPERIMENT III EFFECTS OF DIETARY MELAMINE OR UREA-FORMALDEHYDE OR THEIR MIXTURES ON PERFORMANCE, EGG QUALITY, MICROSCOPIC AND HISTOPATHOLOGY CHANGES IN LAYING HEN TISSUES	77
5.1 Introduction	77
5.2 Materials and methods	79
5.3 Results	84
5.4 Discussion	99
5.5 Conclusion	102
CHAPTER VI GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSION	103
REFERENCES	109
VITAE	119

LIST OF TABLES

		Page
Table 2.1	Physical and chemical properties of melamine and analogues	7
Table 2.2	Summary of published methods for detecting melamine in food products	28
Table 3.1	Composition and nutrient contents in the basal chicken feeds	41
Table 3.2	Prediction of melamine (M) or UF from standard soybean meal (SBM), fullfat soybean (FFSB), mixture (1:1) of SBM and FFSB, broiler and layer feeds	42
Table 4.1	Composition of the basal diets (as-fed basis)	49
Table 4.2	Analyzed nutritive composition of the experimental diets, during 1-14d, 15-28d, 29-35d and 36-42d of age	51
Table 4.3	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on feed intake of broilers from 1-14d and 15-28d of age	53
Table 4.4	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on feed intake of broilers from 29-35d, 36-42d and overall of age	54
Table 4.5	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on body weight gain of broilers from 1-14d and 15-28d of age.	56
Table 4.6	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on body weight gain of broilers from 29-35d, 36-42d and overall of age	57
Table 4.7	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on feed conversion ratio of broilers from 1-14d and 15-28d of age	59

LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
Table 4.8	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on feed conversion ratio of broilers from 29-35d, 36-42d and overall of age	60
Table 4.9	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on growth performance, survival rate and Productive index (PI) of broiler	63
Table 4.10	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on carcass quality at termination (42d)	64
Table 4.11	Effects of melamine (M), urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on carcass quality at termination (42d)	65
Table 4.12	Effects of melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on composition of breast meat of broilers at termination	67
Table 4.13	Concentration of melamine (M) residues in breast meat and liver fed diets containing graded levels of two products (mg/kg of dry weight)	68
Table 5.1	Composition and nutrient contents in the basal diet (12-16 wk)	82
Table 5.2	Composition and nutrient contents in the basal diet (18-52 wk)	83
Table 5.3	Analyzed nutritive composition of the experimental diets, during 12-18wk and 18-52 wk of age	84
Table 5.4	The effects of dietary melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on performance parameters (12-18wk)	86

LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
Table 5.5	The effects of dietary melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on egg production parameters (19-34 wk)	87
Table 5.6	The effects of dietary melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on egg production parameters (37-52 wk)	88
Table 5.7	The effects of dietary melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on egg quality parameters (19-34 wk)	90
Table 5.8	The effect of dietary melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their mixtures on egg quality parameters (37-52 wk)	91
Table 5.9	The effects of dietary melamine (M) or urea-formaldehyde (UF) or their equal mixtures on productive index of laying hen (19-34 and 37-52 wk)	92

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 2.1	Structures of melamine and related triazine compounds	6
Figure 2.2	Melamine metabolic breakdown pathway attributed to *Pseudomonas* strain A and *Klebsiella terragena*	11
Figure 2.3	Urea formaldehyde molecular structure	16
Figure 2.4	Ventral view of organs and associated structures of the dorsal abdominal cavity of a rooster (male chicken). A, abdominal aorta; AE, epididymal artery; AR, cranial renal artery; C, cloaca; E, epididymis; EI, external iliac vein; P, caudal renal portal vien; R, renal vein; T, testis; TA, testicular artery; U, ureters; V, caudal vena cava; VD, ductus deferens; 1, 2, and 3, cranial, middle, and caudal lobes of the left kidney, respectively	20
Figure 2.5	Arrangement of reptilian and mammalian nephrons within a lobule. 1) An avian kidney with its three lobes. 2) A number of lobules from a lobe. 3) The inner structure of a lobule. Reptilian nephrons do not have loops of Henle. Mammalian nephron are located near the medullary cone and extend their loops of Henle into the cone. The tubular fluid from both nephron types is received by common collecting ducts that also extend into the medullary cone, where it is exposed to ISF concentration gradients similar to mammalian kidneys. All urine from a lobule leaves by a common ureteral branch	21
Figure 2.6	Metabolism of amino acids	24

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 2.7	Scematic illustration of the physiologically based pharmacokinetic model of melamine (A). This model was used in both rat and porcine species. Arrows represent mass transfer of melamine via blood flow. (B) Schematic representation of the chronic oral dosing regimen. Kst and Ka are rate of absorption, respectively	34
Figure 3.1	Standardization curve of melamine and UF	43
Figure 3.2	Standard curve of melamine and UF in SBM	43
Figure 3.3	Standard curve of melamine and UF in FFSB	43
Figure 3.4	Standard curve of melamine and UF in SBM : FFSB (1:1)	44
Figure 3.5	Standard curve of melamine and UF in broiler feed	44
Figure 3.6	Standard curve of melamine and UF in layer feed	44
Figure 4.1	A microscopic view of the graded levels of dietary melamine supplementation in broiler diets for 42 days in the tissues of the liver (A1-E1), kidney (A2-E2) and spleen (A3-E3) with magnification 400-1,000X under inverted microscopy: (A) control; (B) 0.25% melamine in the diet; (C) 0.50% melamine in the diet; (D) 0.75% melamine in the diet; (E) 1.00% melamine in the diet	70
Figure 4.2	A histological view of melamine level 1.00% supplementation in broiler diets for 42 days in the tissues of kidney with magnification 100X(A), 400X(B) and 1,000X (C) under inverted microscopy	71

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 5.1	A microscopic view of the graded levels of dietary melamine supplementation in laying hen diets for 34 weeks in the tissues of the liver (A1-E1), kidney (A2-E2) and spleen (A3-E3) with magnification 400-1000X under inverted microscopy: (A) control; (B) 0.25% melamine in the diet; (C) 0.50% melamine in the diet; (D) 0.75% melamine in the diet; (E) 1.00% melamine in the diet	94
Figure 5.2	A microscopic view of the graded levels of dietary melamine supplementation in laying hen diets for 52 weeks in the tissues of the liver (A1-E1), kidney (A2-E2) and spleen (A3-E3) with magnification 400-1000X under inverted microscopy: (A) control; (B) 0.25% melamine in the diet; (C) 0.50% melamine in the diet; (D) 0.75% melamine in the diet; (E) 1.00% melamine in the diet	95
Figure 5.3	Microscopic view on the graded levels of dietary melamine supplementation in laying hens diets for 34 weeks (A1-E1) and 52 weeks (A2-E2) in the tissues of egg with magnification 400-1000X under inverted microscopy: (A) control; (B) 0.25% melamine in the diet; (C) 0.50% melamine in the diet; (D) 0.75% melamine in the diet; (E) 1.00% melamine in the diet	96
Figure 5.4	A histological view of melamine level 1.00% supplementation in laying hens diets in the tissues of kidney with magnification 100X(A), 400X(B) and 1,000X (C) under inverted microscopy	97
Figure 5.5	A histological view of melamine supplementation in laying hens diets in the tissues of egg under inverted microscopy; (A) control and (B) 1.00% melamine in the diet	98