

วิธีการ

การดำเนินการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) จำนวน 5 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ใช้ปลาจำนวน 50 ตัวต่อซ้ำ ได้แก่

- ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมเลี้ยงปลาด้วยอาหารซึ่งไม่ผสมกากยีสต์ลงไป
- ชุดการทดลองที่ 2 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
- ชุดการทดลองที่ 3 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
- ชุดการทดลองที่ 4 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์
- ชุดการทดลองที่ 5 ชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนการเตรียมอาหารปลา

ประกอบอาหารปลาโดยผสมสูตรอาหารตามตารางที่ 3 แล้วนำไปอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดเม็ดอาหารชนิดจมน้ำ นำไปผึ่งลมในที่ร่มเป็นเวลา 1 วัน ในห้องที่มีอากาศถ่ายเท เมื่ออาหารแห้งบรรจุในถุงพลาสติกปิดผนึกเพื่อลดการสัมผัสอากาศและนำเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมอาหารจะใช้โปรแกรมไมโครซอฟท์เอกเซลในการคำนวณสูตรอาหาร ซึ่งเป็นโปรแกรมอยู่ในชุดของไมโครซอฟท์ออฟฟิศที่อยู่ในโปรแกรมเอกเซล การใช้โปรแกรมไมโครซอฟท์เอกเซลในการคำนวณสูตรอาหารนั้น เพื่อต้องการคำนวณปริมาณสารอาหารในสูตรอาหาร โดยการทำคำนวณจะใช้สูตรในการคำนวณ คือ

$$\text{ปริมาณสารอาหาร} = \text{น้ำหนักวัตถุดิบ} \times \text{ปริมาณสารอาหาร}$$

ซึ่งในการประกอบสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองจะใช้วัตถุดิบทั้งหมด 8 ชนิดคือ ปลาป่น รำละเอียด กากถั่วเหลือง ปลาขี้ขาว แป้งมัน กากยีสต์ น้ำมัน และวิตามินรวม โดยส่วนประกอบทั้งหมดจะมีการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีก่อนจะนำมาคำนวณในโปรแกรมไมโครซอฟท์เอกเซล โดยในสูตรอาหารที่จะใช้ในการทดลองจะเสริมกากยีสต์ลงไปในการอาหารที่ 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ และลดปริมาณของปลาป่น โดยจะใช้โปรตีน 30 % เมื่อคำนวณแล้วได้ค่าในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การคำนวณสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมี	ปลาป่น		รำละเอียด		กากถั่วเหลือง		แป้งมัน		ปลายข้าว		กากยีสต์		Oil	premix	PROX-COM
	com	add	com	add	com	add	Com	add	com	add	com	add			
		25		25		40		3		3		0	2	2	100.00
โปรตีน	52.30	13.08	11.91	2.98	35.24	14.10	0.29	0.01	7.76	0.23	42.55	0.00			30.39
ไขมัน	7.59	1.90	14.86	3.72	2.08	0.83	0.83	0.02	1.11	0.03	1.54	0.00			8.50
เถ้า	27.15	6.79	6.98	1.75	5.24	2.10	0.06	0.00	0.56	0.02	8.72	0.00			12.65
เยื่อใย	2.48	0.62	5.45	1.36	8.02	3.21	4.50	0.14	4.64	0.14	6.53	0.00			5.46
ความชื้น	10.13	2.53	8.37	2.09	9.96	3.98	8.55	0.26	11.74	0.35	5.40	0.00			9.22
NFE	0.35	0.09	52.43	13.11	39.46	15.78	85.77	2.57	74.19	2.23	35.26	0.00			33.78
รวม	100		100		100		100		100		100				

ซึ่งในการคำนวณสูตรอาหารแบบใช้โปรแกรมไมโครซอฟท์ เอกเซลเป็นการคำนวณปริมาณเพื่อนำไปใช้ในการประกอบสูตรอาหาร แต่ในการผสมอาหารจริงได้มีการบวกเปอร์เซ็นต์ความชื้นของปลาป่นและกากยีสต์เพิ่มลงไปในการสูตรอาหาร โดยจะใช้อัตราส่วนของวัตถุดิบในสัดส่วนที่คำนวณได้ในตารางที่ 3 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ใช้ในการประกอบอาหารปลา

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผสมอาหารทดลอง

ค่าองค์ประกอบทางเคมี	ควบคุม	2%	4%	6%	8%
ปลาป่น	27.53	25.53	23.53	21.53	19.53
กากถั่วเหลือง	40	40	40	40	40
รำละเอียด	25	25	25	25	25
แป้งมัน	3	3	3	3	3
ปลายข้าว	3	3	3	3	3
กากยีสต์	0	2.11	4.22	6.32	8.43
Fish Oil	2	2	2	2	2
Min. premix	2	2	2	2	2
PROX-COM	102.53	102.64	102.75	102.85	102.96
โปรตีน	31.71	31.56	31.42	31.26	31.12

เมื่อทำการประกอบสูตรอาหารตามตารางที่ 3 แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารแต่ละสูตรอาหารได้ค่าดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่ใช้ในการทดลองสูตรต่างๆ (หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์)

ค่าองค์ประกอบทางเคมี	ความชื้น	เถ้า	โปรตีน	ไขมัน	เยื่อใย
ควบคุม	10.70 ± 0.53 ^a	8.90 ± 0.08 ^c	30.30 ± 0.16 ^a	6.81 ± 0.33 ^a	3.32 ± 0.19 ^a
2%	11.38 ± 0.18 ^a	9.11 ± 0.03 ^c	30.23 ± 0.19 ^a	6.39 ± 0.33 ^a	3.64 ± 0.22 ^a
4%	11.35 ± 0.72 ^a	8.75 ± 0.08 ^{bc}	30.22 ± 0.20 ^a	6.39 ± 0.49 ^a	3.22 ± 0.01 ^a
6%	10.91 ± 0.37 ^a	8.36 ± 0.04 ^b	30.38 ± 0.19 ^a	6.48 ± 0.07 ^a	3.16 ± 0.17 ^a
8%	11.25 ± 0.48 ^a	7.40 ± 0.25 ^a	30.42 ± 0.21 ^a	6.27 ± 0.78 ^a	2.93 ± 0.03 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)

ขั้นตอนการเลี้ยงปลา

เลี้ยงปลาในบ่อซีเมนต์ทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 95 x 95 เซนติเมตรบรรจุน้ำ 1,000 ลิตรจำนวน 15 บ่อ บ่อละ 50 ตัว ให้อาหารปลากินจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง คือ 09.30 และ 16.00 นาฬิกาตามลำดับ เปลี่ยนถ่ายน้ำทั้งหมดทุก 2 วัน วัดความยาว (เซนติเมตร) และชั่งน้ำหนัก (กรัม) ปลาทุกตัวทั้ง 15 บ่อ ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตและสุ่มปลาจำนวน 3 ตัวต่อบ่อ ในสัปดาห์ที่ 4 8 และ 12 เพื่อใช้วิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ค่าภูมิคุ้มกัน และเก็บเนื้อเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์คุณภาพเนื้อของปลานิล และนำปลาที่เหลือจากการทดลองมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 10 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเจริญเติบโต

วัดการเจริญเติบโตของปลานิล ปลาทุกตัวทั้ง 15 บ่อ ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ นำข้อมูลต่างๆ มาวิเคราะห์ผลการตอบสนองของปลาต่ออาหารทดลองแต่ละสูตรโดยพิจารณาจากค่าต่างๆ ตามวิธีที่การกล่าวอ้างโดย วีรพงศ์ (2536) ดังนี้

- อัตราการรอดตาย (%) = $\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}} \times 100$
- คำนวณอัตราการเจริญเติบโต โดยพิจารณาจาก
 - (2.1) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain, WG)
$$WG = \text{น้ำหนักปลาสุดท้าย} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น}$$
 - (2.2) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR)
$$SGR (\%/วัน) = \frac{(\ln \text{น้ำหนักปลาสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลาทดลอง}} \times 100$$

(2.3) อัตราการแลกเนื้อ (Feed conversion ratio, FCR) ตามสมการ

$$\text{FCR} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

2. ค่าโลหิตวิทยา

2.1 การศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต

นำเลือดที่จะจะได้จากปลานิลแต่ละตัวใส่ลงใน microhaematocrit tube จำนวน 2 หลอด อุดปลายข้างหนึ่งด้วยดินน้ำมันสีขาว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง haematocrit centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Vazquez and Guerrero, 2007) แล้วนำเลือดที่ปั่นแล้วมาวัดด้วยเครื่อง haematocrit accessory จำนวนค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ความยาวของชั้นเม็ดเลือดแดง} \times 100}{\text{ความยาวของเลือดทั้งหมด}}$$

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

นำเลือดมาถ่ายลงใน diluting pipette จนถึงขีด 0.5 แล้วเจือจางด้วยน้ำยา Yokoyama's white cell fluid จนถึงขีด 101 จะได้เลือดที่มีความเจือจางเท่ากับ 1 : นำไปหยดลงบน counting chamber และนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่องจากจุดตรงกลาง (25 ช่อง) ที่กำลังขยายสูง 40X ส่วนการนับจำนวนเม็ดเลือดขาว นับเฉพาะสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ (16 ช่อง) ที่ตำแหน่งมุมทั้ง 4 แล้วนำไปคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{จำนวนเม็ดเลือดแดง} &= \text{จำนวนที่นับได้} \times 5 \text{ ช่อง} \times 10 \times 200 \\ &= \text{ } 10^6 / \text{ มม}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{จำนวนเม็ดเลือดขาว} &= \text{จำนวนที่นับได้} \times \text{เฉลี่ยต่อช่อง} \times 10 \times 200 \\ &= \text{ } 10^4 / \text{ มม}^3 \end{aligned}$$

2.3 การวิเคราะห์เพื่อแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

โดยการทำ blood smear และปล่อยเลือดให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาย้อมสีด้วยน้ำยา Wright และ Giemsa ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เพื่อนับเปอร์เซ็นต์และแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

2.4 การวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบินในเลือด

โดยใช้เลือดปริมาณ 20 ไมโครลิตรผสมลงในสารละลาย Drabkin's reagent ปริมาณ 4.98 มิลลิลิตรเข้าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณค่าฮีโมโกลบินเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานตามวิธีของ Wedemeyer and Yasutake (1977)

3. คำภูมิคุ้มกัน

3.1 การวิเคราะห์การทำลายเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Respiratory burst) ตามวิธีของ Anderson *et al.*, (1995)

ดูดเลือดปลาปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงใน Eppendorf แล้วเติม 0.2 เปอร์เซ็นต์ Nitrobluetetrazolium (NBT) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายใน Eppendorf ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน Eppendorf ใหม่ จากนั้นเติมสาร N , N - dimethyl formamide (DMF) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดเอาส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.2 การทดสอบความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของซีรัม

ดูดเลือดปลาแล้วใส่ใน Eppendorf หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บซีรัม หลังจากนั้นนำซีรัมปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^7 CFU/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) 1 : 10 เท้าไปเรื่อยๆ ลงใน Eppendorf แล้วนำไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในซีรัมโดยวิธี indirect ELISA (ดัดแปลงจากวิธีของ Adams, 1991)

1) การเคลือบ plate ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

เคลือบกันหลุมของ 96 well microtitre plate ด้วยสารละลาย Poly - L - Lysine ใน 0.05 M carbonate / bicarbonate buffer pH 9.6 เข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate 3 ครั้ง ด้วย low salt wash buffer (0.02M TRIZMA base 0.38M NaCl 0.01 เปอร์เซ็นต์ Thimerosal 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20) pH 7.4 ทำให้ plate แห้งโดยเคาะ plate ลงบนกระดาษซับ เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ใน PBS pH 7.2 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร เท่ากับ $1.0 (3.80 \times 10^9 \text{ CFU/ml})$ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ใน PBS pH 7.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงไปโดยที่ไม่ต้องเอา supernatant ออกจากหลุม ทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง plate 3 ครั้งด้วย low salt wash buffer เคาะ plate ให้แห้ง แล้วเติม blocking solution (1 เปอร์เซ็นต์ bovine serum albumin ใน 0.05 M carbonate / bicarbonate buffer) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเก็บ plate ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2) การทำ indirect ELISA

นำ plate ที่เคลือบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ออกจากตู้เย็นแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที แล้วล้าง plate 3 ครั้งด้วย low salt wash buffer เดิมซีรัม(แอนติบอดี) ที่ต้องการตรวจสอบต่อไป โดยเจือจางแบบ two – fold dilution ด้วย PBS pH 7.2 จนได้ระดับความเข้มข้นของซีรัมในแต่ละหลุมตามต้องการในปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม สองแถวสุดท้ายเป็น negative control เดิม PBS และ normal serum อย่างละแถว ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้าง plate 3 ครั้ง ด้วย high salt wash buffer (0.02M TRIZMA base 0.38M NaCl 0.01เปอร์เซ็นต์ Thimerosol 0.05เปอร์เซ็นต์ Tween 20) pH 7.4 หลังจากการล้างครั้งสุดท้ายเดิม high salt wash buffer ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเคาะให้แห้งทุกครั้งเดิม Monoclonal antibody (MAP8F7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องล้าง plate 5 ครั้ง ด้วย high salt wash buffer หลังจากนั้นทิ้งไว้ นาน 5 นาทีเดิม conjugate (HRP anti - mouseIgGcomolagulperoxidase 101k9260)ที่เจือจาง 1 : 1000 ใน conjugatebuffer)จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องล้าง plate 5 ครั้ง ด้วย high salt wash buffer หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เป็ยกนาน 5 นาทีในการล้างครั้งสุดท้ายเดิม 1 เปอร์เซ็นต์ Chromogenใน substrate buffer จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มเป็นเวลา 5 นาที (หรือจนกว่าจะเกิดเป็นสีฟ้า) ที่อุณหภูมิห้องหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution จำนวน 50 ไมโครลิตรต่อหลุม(เกิดเป็นสีเหลือง)นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรระดับแอนติบอดีของซีรัมที่ทำการตรวจสอบจะเท่ากับส่วนกลับของ dilution ในหลุมที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด

3.4 การตรวจวัดกิจกรรมไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

ดูดเลือดปลาใส่ใน Eppendorf หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเก็บพลาสมา นำพลาสมาที่ได้มาปริมาตร 75 ไมโครลิตรเดิมในสารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml ใน 0.05 M Sodium Phosphate buffer, pH 6.2) 300 ไมโครลิตรใน Eppendorf นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยวัดทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 5 นาทีที่ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ต่อนาที (ดัดแปลงจากวิธีของ Harikrishnan และคณะ , 2010)

3.5 การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

นำปลาที่เหลือจากการทดสอบมานัดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) โดยฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของตัวปลาตัวละ 0.1 มิลลิตรสังเกตอาการปลาและบันทึกการตายของปลาทุกวันเป็นเวลา 10 วันนำผลการทดลองที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณหาความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (Relative Percent Survival, RPS) ตามวิธีของ Ellis (1982) ด้วยสูตร

$$RPS = 1 - \left\{ \frac{\text{อัตราการตายเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารผสมกากยีสต์} \times 100}{\text{อัตราการตายเฉลี่ยของปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมกากยีสต์}} \right\}$$

นำปลาที่ตายระหว่างการทดสอบไปเพาะเชื้อเพื่อตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* และยืนยันว่าปลาตายจากการติดเชื้อ ส่วนปลานิลที่รอดตายหลังจากการทดสอบความต้านทานโรคแล้วทุกชุดการทดลอง นำมาเจาะเลือดและตัดไตส่วนหน้ามาเพาะหาเชื้อ *S. agalactiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการติดเชื้อ *S. agalactiae*

4. การศึกษาคุณภาพของเนื้อปลานิลแดงที่ได้รับอาหารผสมกากยีสต์

4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (proximate composition)

เป็นการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลาเช่น ความชื้น โปรตีน ไขมันและเถ้า ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองเลี้ยง สุ่มตัวอย่างปลานิลแดงที่ได้มาล้างทำความสะอาด นำเฉพาะส่วนเนื้อมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้นตามวิธีของ AOAC. (2000)

1) วิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำขวดชั่งอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในขวดชั่งที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วเกลี่ยตัวอย่างแผ่ออกอย่างสม่ำเสมอ นำขวดชั่งพร้อมตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

$$\text{วัตถุแห้ง(\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ} - \text{น้ำหนักขวดชั่ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

2) วิเคราะห์ปริมาณเถ้า

เผาถ้วยกระเบื้องที่ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างเผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน นำเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 450 - 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะได้เถ้าสีเทาอ่อน หรือสีขาวสม่ำเสมอ ไม่มีส่วนที่เป็นสีดำเหลืออยู่ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักถ้วยกระเบื้องก่อนเผา} - \text{น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังเผา}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

3) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัมใส่ในหลอดย่อยโปรตีน เติม Catalyst mixture 7 กรัม และกรดซัลฟริกเข้มข้น($\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}$)ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยโปรตีน จนได้สารละลายสีฟ้าใส หรือสีเขียวใส ค่อยๆเติมน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในหลอดย่อย เขย่าสารที่ตกผลึกให้ละลาย ทิ้งให้เย็น เติมกรดบอริก 4 % ปริมาตร 75 มิลลิลิตร หยด Mixed indicator 2-3 หยดในขวดรูปชมพูนาค 600 มิลลิลิตรนำไปวางใต้เครื่องกลั่นให้ปลาย condenser จุ่มในขวดรูปชมพู่ ทำการกลั่นโดยเติม NaOH จนสารละลายเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือดำทำการกลั่นนาน 7 นาทีหรือจนหมดแอมโมเนีย นำสารละลายที่ได้ขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟริก 0.1 N จนได้สีชมพูแล้วบันทึกปริมาตรของกรดซัลฟริกนำไปคำนวณตามสูตร

$$\% \text{ Crude protein} = \frac{1.4 (V_2 - V_1) N \times 6.25}{W}$$

W

N = ความเข้มข้นของ H_2SO_4

W = น้ำหนักของตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดซัลฟริกที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

V_1 = ปริมาตรของกรดซัลฟริกที่ใช้ในการไตเตรท Blank

4) วิเคราะห์ปริมาณไขมัน

อบ Flask ก้นกลมที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมใส่ในกระดาศกรอง ห่อด้วยกระดาศกรองใส่ใน Extraction thimble นำไปอบไล่ความชื้นที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงในตู้อบ เปิดเครื่องทำความเย็นที่ 20 องศาเซลเซียส นำ Extraction thimble ใส่ใน Soxhlet เติม Petroleum ether ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงใน Flask ก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน สวม Flask ก้นกลมเข้ากับ Soxhlet ที่ต่อกับ condenser ปรับระดับความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส สักเป็นเวลา 4-8 ชั่วโมง นำ thimble นำตัวอย่างออกแล้วเก็บ Petroleum ether ที่เหลือ ไขมันที่ถูกสกัดที่เหลืออยู่ในถ้วย จะถูกทำให้แห้งที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไปคำนวณตามสูตร

$$\% \text{ Crude fat ของอาหาร} = \frac{(b-a)}{w} \times 100$$

a = น้ำหนักของ Flask ก้นกลม (g)

b = น้ำหนักของ Flask ก้นกลมและไขมันหลังอบ (g)

$w =$ น้ำหนักของตัวอย่างอาหาร(g)

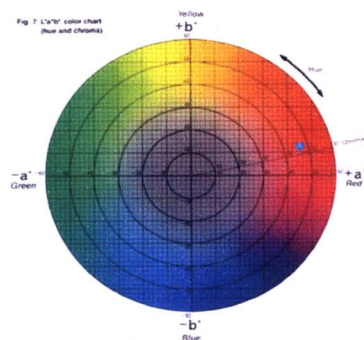
4.2 ศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อปลานิลแดง

นำตัวอย่างปลานิลแดงเฉพาะส่วนเนื้อมาทดสอบ วัดสีโดยใช้เครื่องวัดสี วัดค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดง (a^*) และค่าสีเหลือง (b^*) (ภาพที่ 4) ของเนื้อปลานิลแดง ทุกๆ 4 สัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดย สุ่มปลาซ้ำละ 3 ตัว ตลอดการเลี้ยง 12 สัปดาห์ เพื่อหาค่าของสีที่เปลี่ยนแปลงแบบ CIE $L^*a^*b^*$ (Van der Salm และคณะ, 2004) วัดค่าของ “ L^* ”, “ a^* ” และ “ b^* ” ซึ่งมีความหมายดังนี้

L^* แสดงถึงความสว่างของสี (Lightness) มีค่าระหว่าง 0 – 100 (สีดำถึงสีขาว)

a^* แสดงถึงค่าความเข้มของสีแดง (+) และ สีเขียว (-) มีค่าระหว่าง -100 ถึง +100

b^* แสดงถึงค่าความเข้มของสีเหลือง (+) และ สีน้ำเงิน (-) มีค่าระหว่าง -100 ถึง +100



ภาพที่ 4 แบบจำลองสามมิติของการวัดสี ระบบ $L^*a^*b^*$

ที่มา : Van der Salm *et al.*, 2004

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค่าการเจริญเติบโต (อัตราการเจริญเติบโต , อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) ค่าโลหิตวิทยา (ค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต, ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวและชนิดของเม็ดเลือดขาว) ภูมิคุ้มกัน ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และค่าคุณภาพเนื้อ (องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพทางด้านกายภาพของเนื้อปลานิลแดง) ของแต่ละชุดการทดลอง นำมาทดสอบการกระจายของข้อมูลแล้วเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน(ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ. นนทบุรี เขต ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร