ผลของแร่ธาตุสังกะสี ต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ความต้านทานโรค และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในปลานิลแดงแปลงเพศ

(*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. ชุติมา ตันติกิตติ

ผู้ร่วมวิจัย รศ.ดร. กิจการ ศุภมาตย์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนสนับสนุนจากงบปรมาณแผ่นดิน ปี 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(2)
รายการตาราง	(3)
รายการภาพประกอบ	(5)
บทคัดย่อ	(6)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การทดลองที่ 1	3
- วิธีการทดลอง	3
- ผลการทดลอง	8
- วิจารณ์ผลการทดลอง	26
การทดลองที่ 2	30
- วิธีการทดลอง	30
- ผลการทดลอง	34
- วิจารณ์ผลการทดลอง	38
สรุปผลการทดลอง	41
ข้อเสนอแนะ	42
กิติกรรมประกาศ	42
เอกสารอ้างอิง	42

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของอาหารทดลอง (เปอร์เซ็นต์)	4
2	ปริมาณสังกะสีในอาหารทดลองแต่ละสูตรที่วิเคราะห์ได้ (มก./กก.)	8
3	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีในระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)	9
4	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตายของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์	11
5	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์	12
6	ปริมาณสังกะสีในกระดูก สังกะสีในกล้ามเนื้อ สังกะสีในซีรัม เหล็กในซีรัม และแคลเซียมในซีรัมของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์	13
7	ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิล พลาสมาโปรตีน และกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์	14
8	ระดับที่เหมาะสมของสังกะสีแต่ละชนิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสังกะสีในอาหารกับตัวแปรต่างๆ	15
9	อัตราการรอดตาย และค่า RPS ของปลานิลแดงแปลงเพศแต่ละชุดการทดลองหลังจากเหนี่ยวนำให้ปลานิลแดงแปลงเพศติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยการฉีดเป็นเวลา 10 วัน	17
10	ลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ (liver) ปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน (Zn-amino) และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์	18
11	ลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อไต (kidney) ปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน (Zn-amino) และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์	22

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ใช้ในการทดลองที่ 2 (เปอร์เซ็นต์)	31
13	ปริมาณสังกะสีในอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลอง (มก./กก.)	34
14	น้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาแต่ละชุดการทดลอง	35
15	ปริมาณ glutathione peroxidase lysozyme activity และ complement activity ในซีรัม ของปลาแต่ละชุดการทดลอง	36
16	การจับกินสิ่งแปลกปลอมและปริมาณ malonaldehyde ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสังกะสี	37
17	อัตราการรอดตายหลังจากการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* และความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ การรอด (Relative Percent Survival; RPS) ของปลาในแต่ละชุดการทดลอง	38

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง	19
2	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไตปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง	23

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดและระดับของสังกะสีอะมิโน (Zn-amino) และสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ของปลานิลแดงแปลงเพศ และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลแดงแปลงเพศ และการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสังกะสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและความต้านทานจากเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลแดงแปลงเพศ โดยเลือกความเข้มข้นของสังกะสีอะมิโน (Zn-amino) และสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) ที่ 2 ระดับ คือ 60 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดลองที่ 1 เลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.35 กรัม ด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าการเสริมสังกะสีในอาหารปลาทำให้การเจริญเติบโตของปลาดีขึ้น โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุม ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตในระดับที่สูงให้ผลเชิงลบแก่การเจริญเติบโตของปลา ปริมาณสังกะสีในซีรัมและกระดูกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตาม ระดับของสังกะสีซัลเฟตที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหารมีผลทำให้ปริมาณสังกะสีที่สะสมในเนื้อเยื่อปลาลดลง การทดลองที่ 2 เลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 2.01 กรัม ด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้น้ำหนักปลาและอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น แต่ส่งผลให้เกิดออกซิเดชั่นของไขมัน (lipid oxidation) เพิ่มสูงขึ้นในตับของปลามากกว่าชุดอื่นๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ไลโซไซม์ และคอมพลีเม้นท์ ในซีรัมของปลาแต่ละชุดการทดลองไม่พบความแตกต่างทางสถิติ หลังจากทดสอบความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* โดยการฉีด พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีอัตราการอดตายสูงกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การเลือกระดับสังกะสีที่เหมาะสมผสมในอาหารปลาควรคำนึงถึงข้อมูลการเจริญเติบโต สุขภาพ และความต้านทานโรคของปลา

Abstract

This project was composed of two experiments. The first experiment studied on levels of zinc from zinc amino acid (ZnAA) and zinc sulfate ($ZnSO_4$) on growth performance, blood parameters, disease resistance to *Streptococcus agalactiae* of red tilapia and histological tissue change. The second experiment studied on the effects of two levels of ZnAA and $ZnSO_4$ (60 and 120 mg/kg) on growth performance, immune responses and *S. agalactiae* resistance of red tilapia.

Initial weight of tilapia were 0.35 grams and fed with trial diets for 12 weeks in the first experiment. Supplementation of Zn in fish diet has positive effects on growth performance. Tilapia fed with ZnAA at 60 mg/kg had a better growth than those of the control group while diets containing high level of $ZnSO_4$ showed negative effects. Serum and bone Zn contents increased when fed diets supplemented with both ZnAA and $ZnSO_4$, however, a reduction of tissue Zn contents was observed when levels of $ZnSO_4$ in the diet were increased. Initial weight of tilapia were 2.01 grams and fed with trial diets for 12 weeks in the second experiment. Fish fed the diet supplemented with $ZnSO_4$ at 120 mg/kg showed the best final body weight and FCR but lipid oxidation in liver of fish were higher than other treatments. No significant differences were observed for glutathione peroxidase activity, lysozyme activity and complement activity among different groups of fish. After *S. agalactiae* challenge test by injection, fish fed with Zn supplemented diets had higher survival rate than those of the control group but it was not statistically different. However, the optimum level of Zn in the diet should be considered from combination of parameters such as growth, health status and disease resistance.

ผลของแร่ธาตุสังกะสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ความต้านทานโรค และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)

บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลขยายตัวอย่างรวดเร็วในประเทศไทยมีผลผลิตต่อปีสูงถึง 150,000 ตัน โดยผลผลิตรวมจากการเลี้ยงทั่วโลกประมาณ 1.4 ล้านตัน สามารถทำรายได้ให้แก่ผู้เลี้ยงในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก และเป็นที่ยอมรับของตลาดต่างประเทศ โดยส่วนมากมีการนำปลานิลไปบริโภคทดแทนปลาที่มีเนื้อสีขาว เช่น ปลากะพงแดง เป็นต้น ซึ่งมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคในต่างประเทศ จึงทำให้มีการเลี้ยงในระบบหนาแน่นกันเป็นส่วนมาก เพื่อให้มีปริมาณผลผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดผู้บริโภค ซึ่งปัจจัยของระดับปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุหลัก ได้มีการวิจัยกันมากถึงระดับความต้องการที่เหมาะสมในปลานิล แต่ระดับปริมาณที่เหมาะสมของแร่ธาตุรอง (trace element) ยังมีการศึกษาวิจัยน้อยในปลานิลแดงแปลงเพศ

แร่ธาตุรองหรือแร่ธาตุที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณน้อย ซึ่งแร่ธาตุรองมีทั้งหมด 15 ชนิด แต่สัตว์น้ำต้องการเพียง 7 ชนิด คือ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส ซีลิเนียม สังกะสี ไอโอดีน และโคบอลต์ โดยปลาต้องการแร่ธาตุเพื่อเป็นองค์ประกอบของร่างกาย ช่วยรักษาความสมดุลของกรดและด่างในร่างกาย ช่วยในการทำงานของระบบการหายใจ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อที่เป็นส่วนแข็งของร่างกาย เช่น กระดูก ก้านครีบ และฟัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และฮอร์โมนด้วย (วุฒิพร, 2541; วีรพงศ์, 2536) ปลานิลมีความต้องการแร่ธาตุที่สำคัญ 5 ชนิด คือ แมงกานีส สังกะสี ซีลีเนียม ทองแดง และเหล็ก (Watanabe *et al*., 1997) ซึ่งสังกะสีเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เช่น สังกะสีเป็นโคเฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์มากกว่า 200 ชนิด (Watanabe *et al*., 1997) ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเอนไซม์หลายชนิด (Scarpa and Gatlin, 1992) และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเมตัลโลเอนไซม์ (metalloenzymes) ประมาณ 20 ชนิด ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส (superoxide dismutase) คาร์บอกซิเปปทิเดส (carboxypeptidase) และคาร์บอนิค แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) เป็นต้น (Hayashi *et al*., 2001) อีกทั้งสังกะสียังช่วยในการป้องกันการแข็งตัวของเนื้อเยื่ออีพีทีเลียม (epithelium) และกระบวนการเมแทบอลิซึมของพรอสตาแกรนดิน (prostaglandin) (วีระพงศ์, 2536) และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ฮอร์โมนกลูคาร์กอน (glucagons) อินซูลิน (insulin) ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต (growth hormone) และฮอร์โมนเพศ (Kucukbay *et al*., 2006) ซึ่งทั้งหมดนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของร่างกายที่สำคัญ ตลอดจนส่งผลต่อ

สุขภาพของสิ่งมีชีวิต และบทบาทที่สำคัญอีกประการหนึ่งของสังกะสีที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ คือ มีหน้าที่สำคัญในระบบการกำจัดอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์ metallothionein และ cysteine-rich protein ซึ่งสารทั้งสองนี้มีหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Powell, 2000)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสังกะสีอะมิโน (Zn-amino; ZnAA) และสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันวิทยา การต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างรุนแรงในปลานิลแดงแปลงเพศ และลักษณะทางเนื้อเยื่อในปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารผสมสังกะสีที่ระดับต่างๆ ซึ่งทำให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำมาใช้พัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศให้มีผลผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศได้สูงสุดและยั่งยืนที่สุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์ (bioavailability) จากสังกะสีที่เสริมในอาหารในการเจริญเติบโต และ อัตรารอดของปลานิลแดงแปลงเพศ

2. เพื่อศึกษาผลของสังกะสีที่เสริมในอาหารต่อองค์ประกอบเลือด และความต้านทานโรคในปลานิลแดงแปลงเพศ

โครงการวิจัยที่ศึกษาได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

1. การศึกษาชนิดและระดับของสังกะสีต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ การใช้ประโยชน์ของสังกะสีรูปแบบต่างๆ ในตัวปลา องค์ประกอบเลือด ความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลแดงแปลงเพศ

2. ผลของสังกะสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลแดงแปลงเพศ

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดและระดับของสังกะสีต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ การใช้ประโยชน์ของสังกะสีรูปแบบต่างๆ ในตัวปลา องค์ประกอบเลือด ความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลแดงแปลงเพศ

วิธีการทดลอง

1. ปลานิลแดงแปลงเพศ

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 0.35±0.01 ถึง 0.36±0.01 กรัมต่อตัว นำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 18x36x18 นิ้ว บรรจุน้ำ 100 ลิตร ที่มีการให้อากาศตลอดระยะเวลาเพื่อให้ปลาปรับสภาพและสร้างความคุ้นเคย และให้อาหารปลา วันละ 2 ครั้ง คือ 9.00 น. และ 16.00 น. ซึ่งในแต่ละครั้งให้ปลากินอาหารจนอิ่ม ซึ่งสังเกตจากพฤติกรรมของปลา เมื่อปลาไม่สนใจอาหารจึงหยุดการให้อาหาร (วิมล และกิจจา, 2535)

2. อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 11 สูตร (ตารางที่ 1) แตกต่างกันที่ชนิดและระดับของสังกะสีที่เสริมในอาหาร คือ อาหารชุดทดลองที่เสริมสังกะสีอะมิโน (Zn-amino; ZnAA) และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) โดยแต่ละชนิดเสริมที่ระดับ 30, 60, 90, 120 และ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มก./กก.) ตามลำดับ สำหรับอาหารชุดควบคุมไม่มีการเสริมสังกะสีในอาหาร โดยเริ่มต้นการทำอาหารชุดควบคุมก่อน แล้วจึงทำอาหารชุดทดลองที่เสริมสังกะสีที่ระดับความเข้มข้นจากต่ำไปสูง นำวัตถุดิบอาหารแต่ละสูตรผสมในเครื่องผสมอาหารจนวัตถุดิบเข้ากันดี แล้วนำมาอัดเม็ด จากนั้นจึงนำไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บรรจุใส่ถุงพลาสติกพร้อมติดฉลากอาหารแต่ละสูตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง (เปอร์เซ็นต์)

วัตถุดิบ	ชุดควบคุม	ZnAA (มก./กก.)					$ZnSO_4$ (มก./กก.)				
	T1	30 (T2)	60 (T3)	90 (T4)	120 (T5)	150 (T6)	30 (T7)	60 (T8)	90 (T9)	120 (T10)	150 (T11)
ปลาป่น (CP 65%)	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47
กากถั่วเหลือง	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4
รำข้าว	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
รำข้าวสาลี	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
ข้าวโพดป่น	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08
มันเส้น	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
แป้งข้าวเจ้า	0.368	0.343	0.318	0.293	0.268	0.243	0.355	0.342	0.328	0.315	0.302
น้ำมันปลา	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
น้ำมันถั่วเหลือง	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
วิตามมินผสม[1]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุผสม[2]	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632
โคลีคลอไรด์	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
เกลือ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Zinc amino (12%)	0	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0	0	0	0	0
$ZnSO_4.7H_2O$	0	0	0	0	0	0	0.013	0.026	0.04	0.053	0.066
รวม	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[1]Vitamin mix (g/kg premix): Vit.A 5,000,000 IU, Vit.D 1,000,000 IU, Vit.E 100 g, Vit.K3 10 g, Vit.B1 10 g, Vit. B2 15 g, Vit. B6 30 g, Vit. B12 15 mg, Niacin 150 g, Pathothenic acid 25 g, Folic acid 3 g, Biotin 200 mg, Inositol 135 g, Vitamin C 105 g, BHT 200 mg

[2]Mineral mix (g/kg premix): Calcium-L-lactate 223.78, $NaH_2PO_4.2H_2O$ 191.87, $MgSO_4.7H_2O$ 308.13, K_2SO_4 253.80, $MnSO_4.H_2O$ 1.41, Amino-Fe(12%) 19.00, Amino-Cu(10%) 1.90, $Na_2O_3Se.5H_2O$ 0.0376

3. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการศึกษาการเจริญเติบโตวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 11 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำๆ ละ 30 ตัว โดยชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดควบคุม ไม่มีการเสริมสังกะสี ชุดการทดลองที่ 2-6 เสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับความเข้มข้น 30, 60, 90, 120 และ 150 มก./กก. และ ชุดการทดลองที่ 7-11 เสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 30, 60, 90, 120 และ 150 มก./กก. ตามลำดับ เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมทั้งในแง่ของการเจริญเติบโตและการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงความสามารถในการต้านทานเชื้อ *S. agalactiae*

3.1 การเจริญเติบโต การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตรารอดตาย

ดำเนินการเก็บข้อมูลโดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละชุดการทดลองทุก 2 สัปดาห์ และนับจำนวนปลาทั้งหมดในตู้ทดลอง ในช่วงของการทดลอง 12 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าที่ต้องการศึกษาโดยใช้สมการต่างๆ ดังนี้

3.1.1 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, %)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง})}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

3.1.2 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: SGR, % ต่อวัน)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง})}{\text{ระยะเวลา (วัน)}} \times 100$$

3.1.3 อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake, % ต่อวัน) $= \dfrac{F \times 100}{\frac{(W_0 + W_t)}{2} \times \frac{(N_0 + N_t)}{2} \times t}$

เมื่อ F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)

N_o = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)

N_t = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)

W_o = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)

W_t = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)

3.1.4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate: FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)}}$$

3.1.5 อัตรารอดตาย (survival, %) $= \dfrac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}}$

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

นำข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักอาหารที่ปลากินเฉลี่ย ปริมาณโปรตีนในอาหาร และค่าโปรตีนในซากปลาก่อนทดลอง และหลังจากทดลองแต่ละชุดการทดลองที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ โดยใช้สมการต่างๆ ดังนี้

3.2.1 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio: PER) ตามวิธีการของ Zeitoun และคณะ (1973)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}$$

3.2.2 ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization: ANPU, %) ตามวิธีการของ Robinson และ Wilson (1985)

$$= \frac{(\text{โปรตีนของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง-โปรตีนของปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}) \times 100}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

3.3 การศึกษาการใช้ประโยชน์ของสังกะสีในตัวปลา

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงปลาทดลอง สุ่มปลาทดลองตู้ละ 3 ตัว สลบปลาด้วยควินาดีน (quinaldine) เมื่อปลาสลบนำมาเจาะเลือดบริเวณโคนหาง เพื่อแยกซีรัมไปวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีในซีรัม โดยใช้เครื่อง Individual coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) นำปลาที่เจาะเลือดแล้วมาผ่าตัดแยกเอาส่วนของกล้ามเนื้อ และกระดูกสันหลัง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำให้แห้งเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีที่เก็บสะสม โดยส่วนของกระดูกสันหลังจะต้องทำความสะอาดให้ปราศจากเนื้อเยื่อและไขมัน โดยการนำไปต้มด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงทำความสะอาด จากนั้นนำไปสกัดเอาไขมันออกด้วยเครื่องวิเคราะห์ไขมัน เมื่อสกัดไขมันแล้วอบตัวอย่างให้แห้ง และนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

หลังจากเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างปลาแต่ชุดการทดลองละ 12 ตัว สลบด้วยควินาดีน เมื่อปลาสลบนำมาเจาะเลือดบริเวณโคนหางด้วยกระบอกฉีดยาที่เคลือบด้วยเอทีลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (กิจการ และคณะ, 2539) แล้ววิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบเลือด คือ

1. ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Haematocrit, Hct) ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Blaxhall และ Daisley (1973) โดยบรรจุเลือดใน capillary tube 2 หลอด ปั่นด้วย haematocentrifuge ด้วยความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำเลือดที่ปั่น วัดค่าด้วยเครื่อง haematocrit accessory ค่าที่ได้จะเป็นเปอร์เซ็นต์ Haematocrit

2. ปริมาณฮีโมโกลบินรวม (total haemoglobin) ใช้วิธี Cyanmethaemoglobin โดยนำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ มาผสมรวมกับ Drabkin's solution เขย่าให้เข้ากันดี แล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์เพื่อขจัดเศษเซลล์เม็ดเลือด (cell debris) และ fibrin ต่างๆ นำส่วนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้ Drabkin's solution เป็น blank (Larsen and Snieszko, 1961)

3. ปริมาณโปรตีนในพลาสมา ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951) โดยดูดส่วนของพลาสมา 5 ไมโครลิตร เติมลงในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 995 ไมโครลิตร เติม alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 10 นาที แล้วเติมสารละลาย folin reagent 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

3.5 การศึกษาความต้านทานโรคของปลานิลแดงแปลงหลังจากได้รับอาหารทดลอง

หลังจากเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* โดยนำปลาแต่ละชุดการทดลองละ 20 ตัว ฉีดเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LD_{50} (10^7 CFU/ml) เข้าช่องท้องของปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บันทึกการรอดตายของปลาในแต่ละวัน แล้วนำไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการกินอาหาร อัตรารอดตาย ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA แบบ CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์หาระดับของสังกะสีที่เหมาะสม ด้วยการวิเคราะห์จุดตัดในสมการเชิงเส้น Quadratic model (Robbins *et al.,* 1979; Robbins *et al.,* 2006) และเปรียบเทียบค่าการใช้ประโยชน์ได้จากสังกะสีทั้งสองชนิด คือ สังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟต ตามวิธีการของ Littell และคณะ (1995)

5. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิลแดงแปลงหลังจากได้รับอาหารทดลอง

หลังจากเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลา 10 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง โดยเก็บเนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ และไต รักษาสภาพเนื้อเยื่อในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นำอวัยวะทั้งหมดผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราพลาสก์ แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (sliding microtome) ความหนา 3 ไมครอน ตามวิธีของ Humason (1979) และย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ตามวิธีของ Bancroft (1967) เพื่อนำมาทำเป็นสไลด์ถาวร และนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษา

1. ปริมาณสังกะสีในอาหารอาหารทดลอง

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีในอาหารทดลอง พบว่าปริมาณสังกะสีในอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟตมีปริมาณที่สูงกว่าอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ยกเว้นอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 60 มก./กก. สำหรับอาหารชุดควบคุมมีปริมาณสังกะสีเพียง 58.80 มก./กก. ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสังกะสีในอาหารทดลองแต่ละสูตรจากการวิเคราะห์ (มก./กก.)

ชุดทดลอง	ปริมาณสังกะสี (มก./กก.)
T1 control	58.80
T2 ZnAA 30	82.90
T3 ZnAA 60	130.00
T4 ZnAA 90	156.00
T5 ZnAA 120	184.00
T6 ZnAA 150	215.00
T7 $ZnSO_4$ 30	83.40
T8 $ZnSO_4$ 60	126.00
T9 $ZnSO_4$ 90	163.00
T10 $ZnSO_4$ 120	196.00
T11 $ZnSO_4$ 150	227.00

2. ผลของสังกะสีต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารที่เสริมสังกะสี

หลังจากเลี้ยงปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.35 กรัม ด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารเสริมสังกะสี แต่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับอื่นๆ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยที่สุดใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 150 มก./กก. แต่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีในระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)

ชุดทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยของปลานิลทุก 2 สัปดาห์ (กรัม/ตัว)						
	0	2	4	6	8	10	12
T1 control	0.35±0.01^{a}	1.12±0.06^{a}	3.34±0.27^{ab}	6.96±1.05^{bc}	14.72±1.25^{a}	29.52±2.46^{b}	51.20±3.34^{a}
T2 ZnAA 30	0.36±0.01^{a}	1.17±0.05^{a}	3.51±0.53^{ab}	7.59±1.07^{abc}	15.61±1.41^{a}	30.88±2.37^{ab}	53.94±4.88^{a}
T3 ZnAA 60	0.35±0.01^{a}	1.23±0.09^{a}	3.60±0.29^{a}	7.55±1.04^{abc}	16.04±1.77^{a}	31.49±2.23^{ab}	57.23±2.52^{a}
T4 ZnAA 90	0.36±0.00^{a}	1.15±0.07^{a}	3.42±0.22^{ab}	7.44±0.54^{bc}	15.33±0.94^{a}	31.16±1.83^{ab}	55.38±1.99^{a}
T5 ZnAA 120	0.35±0.01^{a}	1.13±0.05^{a}	3.52±0.33^{ab}	7.17±1.56^{bc}	15.32±0.30^{a}	30.98±1.03^{ab}	54.05±1.98^{a}
T6 ZnAA 150	0.36±0.00^{a}	1.20±0.01^{a}	3.74±0.21^{a}	8.72±0.93^{a}	16.08±1.00^{a}	32.87±1.35^{a}	56.12±2.13^{a}
T7 ZnS 30	0.36±0.01^{a}	1.18±0.05^{a}	3.57±0.22^{a}	8.05±0.55^{ab}	16.28±1.40^{a}	32.85±2.38^{a}	58.23±4.81^{a}
T8 ZnS 60	0.35±0.01^{a}	1.16±0.09^{a}	3.51±0.46^{ab}	8.09±1.08^{ab}	16.49±1.62^{a}	33.28±2.09^{a}	58.48±3.05^{a}
T9 ZnS 90	0.36±0.00^{a}	1.16±0.02^{a}	3.64±0.28^{a}	7.97±1.33^{ab}	15.99±0.31^{a}	32.14±1.67^{ab}	55.33±3.16^{a}
T10 ZnS 120	0.36±0.01^{a}	1.14±0.07^{a}	3.39±0.26^{ab}	6.85±0.66^{bc}	14.30±1.16^{a}	29.46±1.82^{b}	52.35±1.93^{a}
T11 ZnS 150	0.35±0.01^{a}	1.11±0.07^{a}	3.00±0.24^{b}	6.65±0.59^{c}	14.17±0.99^{a}	29.26±1.55^{b}	51.53±2.41^{a}
Zinc type	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Level of zinc	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Zinc type x Level	NS	NS	P<0.05	P<0.05	NS	P<0.05	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้งสองชนิดทุกระดับมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม เมื่อสังเกตน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับอื่นๆ และปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม หากเสริมสังกะสีซัลเฟตในอาหารที่ระดับ 150 มก./กก. ทำให้ปลามีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้งสองชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น ยกเว้นปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 150 มก./กก. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด แต่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 150 มก./กก. มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 30-90 มก./กก. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับต่างๆ อัตราการกินอาหารของปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีค่าแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 60 มก./กก. และสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60-90 มก./กก. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ยกเว้นปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม อัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารเสริมและไม่เสริมสังกะสีมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม แต่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 150 มก./กก. และปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 90 มก./กก. มีอัตรารอดสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 และ 150 มก./กก. ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตายของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ชุดทดลอง	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)	อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์/วัน)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
T1 control	14,347.49±1,119.59^{a}	7.44±0.05^{cd}	2.43±0.11^{x}	1.05±0.03^{ab}	97.14±4.04^{ab}
T2 ZnAA 30	15,020.98±1,254.11^{a}	7.46±0.06^{abc}	2.41±0.09^{xyz}	1.06±0.03^{a}	95.00±4.29^{ab}
T3 ZnAA 60	16,058.70±317.56^{a}	7.53±0.00^{ab}	2.36±0.10^{z}	1.02±0.03^{abc}	96.19±4.36^{ab}
T4 ZnAA 90	15,566.79±318.82^{a}	7.48±0.01^{abc}	2.35±0.04^{yz}	1.03±0.03^{abc}	93.33±4.36^{ab}
T5 ZnAA 120	15,233.54±553.58^{a}	7.48±0.04^{abc}	2.39±0.03^{xy}	1.04±0.02^{abc}	96.43±3.60^{ab}
T6 ZnAA 150	15,626.54±616.78^{a}	7.54±0.04^{a}	2.34±0.06^{xyz}	1.00±0.02^{bc}	98.57±2.86^{a}
T7 $ZnSO_4$ 30	16,260.05±1,440.47^{a}	7.50±0.02^{abc}	2.28±0.10^{xyz}	1.02±0.02^{abc}	93.57±5.41^{ab}
T8 $ZnSO_4$ 60	16,392.55±756.68^{a}	7.50±0.07^{abc}	2.23±0.02^{z}	1.00±0.01^{c}	90.71±2.74^{b}
T9 $ZnSO_4$ 90	15,390.38±969.31^{a}	7.52±0.05^{ab}	2.34±0.08^{yz}	1.00±0.03^{bc}	98.57±1.65^{a}
T10 $ZnSO_4$ 120	14,623.36±721.88^{a}	7.45±0.05^{bc}	2.47±0.11^{xy}	1.06±0.05^{a}	96.43±4.29^{ab}
T11 $ZnSO_4$ 150	14,537.62±494.81^{a}	7.38±0.06^{d}	2.36±0.08^{xyz}	1.05±0.04^{a}	91.43±4.67^{b}
Zinc type	NS	NS	NS	NS	NS
Level of zinc	NS	NS	P<0.05	NS	NS
Zinc type x Level	NS	P<0.05	NS	P<0.05	P<0.05

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

x, y, z: Level zinc

3. ผลของสังกะสีต่อประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 30 มก./กก. มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงสุด ส่วนปลาที่ได้รับสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 120 และ 150 มก./กก. มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนลดลง ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 30 มก./กก. แต่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิของปลาที่ได้รับ

อาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 150 มก./กก. มีค่าสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมและปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีชุดอื่นๆ ยกเว้นปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 90 มก./กก. และพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 150 มก./กก. มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิต่ำที่สุด แตกต่างกันอย่างมียัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 150 มก./กก. ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ชุดทดลอง	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ (เปอร์เซ็นต์)
T1 control	3.24 ± 0.13^{abc}	47.52 ± 1.03^{c}
T2 ZnAA 30	3.19 ± 0.08^{bc}	48.27 ± 1.38^{c}
T3 ZnAA 60	3.28 ± 0.08^{abc}	48.72 ± 1.43^{bc}
T4 ZnAA 90	3.22 ± 0.09^{abc}	47.75 ± 1.52^{c}
T5 ZnAA 120	3.23 ± 0.05^{abc}	47.78 ± 0.98^{c}
T6 ZnAA 150	3.35 ± 0.08^{ab}	52.39 ± 1.88^{a}
T7 $ZnSO_4$ 30	3.39 ± 0.10^{a}	48.90 ± 2.03^{bc}
T8 $ZnSO_4$ 60	3.35 ± 0.05^{ab}	48.51 ± 1.70^{c}
T9 $ZnSO_4$ 90	3.33 ± 0.10^{ab}	51.23 ± 1.30^{ab}
T10 $ZnSO_4$ 120	3.13 ± 0.19^{c}	47.47 ± 2.84^{c}
T11 $ZnSO_4$ 150	3.14 ± 0.12^{c}	46.14 ± 1.49^{c}
Zinc type	NS	NS
Level of zinc	NS	NS
Zinc type x Level	P<0.05	P<0.05

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

4. การใช้ประโยชน์ของสังกะสีรูปแบบต่าง ๆ ในปลานิลแดงแปลงเพศ

การเสริมสังกะสีในอาหารทั้งในรูปของสังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟต มีผลทำให้สังกะสีในซีรัมและสังกะสีในกระดูกของปลานิลแดงแปลงเพศสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่ไม่มีผลต่อระดับสังกะสีในกล้ามเนื้อของปลา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับของสังกะสีชนิดเดียวกัน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 150 มก./กก.

มีปริมาณสังกะสีในซีรัมสูงกว่าระดับอื่นๆ (p>0.05) ส่วนปลาที่ได้รับสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 120 มก./กก. มีปริมาณสังกะสีในซีรัมสูงกว่าระดับอื่นๆ (p>0.05) สำหับปริมาณสังกะสีในกระดูก ปลาที่ได้รับสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. มีปริมาณสูงกว่าระดับอื่นๆ (109.8 มก./กก.) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 30 มก./กก. มีปริมาณาณสังกะสีในกระดูกสูงกว่าระดับอื่นๆ (97.42 มก./กก.) แต่มีค่าน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และยังพบว่าปลาที่ได้รับสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60, 90, 120 และ 150 มก./กก. ทำให้ปริมาณสังกะสีในกระดูกลดลง และการเสริมสังกะสีทั้งสองชนิดในอาหาร มีผลทำให้ปริมาณเหล็กและแคลเซียมในซีรัมของปลานิลแดงแปลงเพศสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณสังกะสีในกระดูก สังกะสีในกล้ามเนื้อ สังกะสีในซีรัม เหล็กในซีรัม และแคลเซียมในซีรัมของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ชุดทดลอง	สังกะสีในกระดูก (มก./กก.)	สังกะสีในกล้ามเนื้อ (มก./กก.)	สังกะสีในซีรัม (มก./กก.)	เหล็กในซีรัม (มก./กก.)	แคลเซียมในซีรัม (มก./กก.)
T1 control	82.19±2.38^{d}	25.32±0.62^{a}	13.17±2.23^{c}	1.11±0.25^{a}	49.75±4.96^{a}
T2 ZnAA 30	94.50±5.45^{bc}	24.73±1.39^{a}	16.43±0.89^{ab}	1.38±0.26^{a}	54.61±3.14^{a}
T3 ZnAA 60	92.81±3.63^{c}	26.15±0.78^{a}	17.95±1.60^{a}	1.52±0.31^{a}	53.46±7.70^{a}
T4 ZnAA 90	102.81±4.64^{ab}	26.12±3.15^{a}	16.72±1.30^{ab}	1.43±0.24^{a}	50.02±5.75^{a}
T5 ZnAA 120	109.80±2.99^{a}	26.22±2.31^{a}	16.40±0.85^{ab}	1.48±0.29^{a}	51.27±4.67^{a}
T6 ZnAA 150	94.39±1.36^{bc}	26.24±1.51^{a}	17.31±1.32^{ab}	1.40±0.25^{a}	51.03±3.73^{a}
T7 $ZnSO_4$ 30	97.42±9.03^{bc}	24.07±1.69^{a}	15.64±1.04^{b}	1.47±0.22^{a}	52.34±2.80^{a}
T8 $ZnSO_4$ 60	94.43±3.97^{c}	24.68±1.73^{a}	16.07±0.86^{ab}	1.48±0.28^{a}	53.06±3.60^{a}
T9 $ZnSO_4$ 90	96.33±6.57^{bc}	23.22±1.18^{a}	17.24±1.67^{ab}	1.36±0.30^{a}	53.19±5.04^{a}
T10 $ZnSO_4$ 120	93.25±3.25^{c}	23.12±1.18^{a}	17.64±1.41^{ab}	1.45±0.25^{a}	52.35±5.28^{a}
T11 $ZnSO_4$ 150	95.70±3.24^{bc}	23.73±1.40^{a}	16.28±2.38^{ab}	1.35±0.19^{a}	52.76±5.18^{a}
Zinc type	P<0.05	NS	NS	NS	NS
Level of zinc	P<0.05	NS	NS	NS	NS
Zinc type x Level	P<0.05	NS	P<0.05	NS	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

5. ผลของสังกะสีต่อองค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศ

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้งสังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟตทุกๆ ระดับ มีค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และพลาสมาโปรตีน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. มีระดับของกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงที่สุด และสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตทุกระดับ (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิล พลาสมาโปรตีน และกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ชุดทดลอง	ฮีมาโตคริต (เปอร์เซ็นต์)	ฮีโมโกลบิล (กรัม/เดซิลิตร)	พลาสมาโปรตีน (กรัมเปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ยูนิต/ลิตร)
T1 control	42.54±8.45^{a}	8.83±0.51^{a}	264.24±48.34^{a}	25.20±2.59^{bx}
T2 ZnAA 30	43.04±8.66^{a}	8.64±0.68^{a}	269.04±58.30^{a}	26.40±2.61^{ax}
T3 ZnAA 60	40.90±9.36^{a}	8.56±0.48^{a}	272.72±75.92^{a}	26.00±1.83^{ax}
T4 ZnAA 90	44.55±8.87^{a}	8.58±0.40^{a}	262.68±33.73^{a}	25.50±2.38^{ax}
T5 ZnAA 120	40.04±4.74^{a}	8.53±0.56^{a}	245.99±27.50^{a}	28.60±2.30^{ax}
T6 ZnAA 150	38.38±2.74^{a}	8.64±0.40^{a}	251.24±41.92^{a}	27.75±2.36^{ax}
T7 $ZnSO_4$ 30	42.96±4.55^{a}	8.62±0.75^{a}	240.85±62.66^{a}	25.00±1.41^{bx}
T8 $ZnSO_4$ 60	39.13±3.30^{a}	8.32±0.62^{a}	245.80±57.73^{a}	26.75±3.10^{bx}
T9 $ZnSO_4$ 90	41.71±7.37^{a}	8.21±0.46^{a}	233.23±55.16^{a}	23.50±1.76^{bx}
T10 $ZnSO_4$ 120	39.50±6.57^{a}	8.54±0.60^{a}	250.32±71.03^{a}	24.25±1.26^{bx}
T11 $ZnSO_4$ 150	38.50±5.50^{a}	8.86±0.69^{a}	247.85±56.34^{a}	26.33±2.73^{bx}
Zinc type	NS	NS	NS	P<0.05
Level of zinc	NS	NS	NS	NS
Zinc type x Level	NS	NS	NS	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

a b : Zinc type, x, y : Level of zinc

6. ระดับที่เหมาะสมของการเสริมสังกะสีทั้งสังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟต

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสังกะสีทั้งสองชนิดโดยพิจารณาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น สังกะสีในซีรัม สังกะสีในกระดูก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ ด้วย broken-line regression analysis โดยใช้รูปแบบความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (Quadratic broken-line model) พบว่าระดับที่เหมาะสมสำหรับสังกะสีอะมิโนมีค่าอยู่ระหว่าง 87.72-125.07 มก./กก. สำหรับสังกะสีซัลเฟตมีค่าอยู่ระหว่าง 68.02-110.66 มก./กก. ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ระดับที่เหมาะสมของสังกะสีแต่ละชนิดจากการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสังกะสีในอาหารกับตัวแปรต่างๆ

Criteria	Zinc sources	Regression[1]	Breakpoints (ppm)	Requirements (ppm)	R^2	Relative bioavailability[2] (%)
Weight gain	Zn AA	Y= 15621.37-27.95(104.38-X)*	104.38	104.38±26.07	0.8022	125.75[x]
	$ZnSO_4$	Y= 16884.93-77.75(91.44-X)-19.05(X-91.44)**	91.44	91.44±5.63	0.9574	100
Serum Zn	Zn AA	Y=17.09-0.13(87.82-X)*	87.82	87.82±6.66	0.8983	200[y]
	$ZnSO_4$	Y=16.81-0.10(94.98-X)*	94.98	94.98±26.28	0.8638	100
Bone Zn	Zn AA	Y=99.95-0.51(93.57-X)*	93.57	93.57±24.58	0.5772	92.77[y]
	$ZnSO_4$	Y=95.13-0.55(83.17-X)*	83.17	83.17±0.00	0.9012	100
Specific growth rate	Zn AA	Y= 7.495-0.00083(125.07-X)	125	125±35.73	0.453	99.54[y]
	$ZnSO_4$	Y= 7.47-0.032(68.02-X)	68.02	68.02±0.00	0.05	100
ANPU	Zn AA	Y=48.13-0.0346(76.90-X)*	76.90	76.90±0.00	0.4388	61.78[y]
	$ZnSO_4$	Y=50.43-0.056(110.66-X)-0.031(X-110.66)**	110.66	110.66±61.41	0.4301	100
Serum Fe	Zn AA	Y=1.46-0.011(89.82-X)*	89.82	89.82±6.69	0.9194	73.33[y]
	$ZnSO_4$	Y=1.42-0.015(79.30-X)*	79.30	79.30±0.00	0.8397	100
Serum Ca	Zn AA	Y=52.08-0.277(67.20-X)*	67.20	67.20±0.00	0.2399	263[y]
	$ZnSO_4$	Y=52.84-0.105(88.15-X)*	88.15	88.15±4.63	0.9482	100

[1]Quadratic broken-line model (Robbins *et al*., 1979; Robbins *et al*., 2006) was used to estimate the requirement of dietary zinc. The equation used in the model was as follows: (where Y is the value of the parameter, L is the maximum value of the parameter, U and V is the slope, X is the level of dietary zinc in the diet and R is the requirement value)

*Y=L+U(R-X); Where (R-X) is zero at values of X>R.

**Y=L+U(R-X)+V(X-R); where(R-X) is zero at values of X>R and (X-R) is zero at levels of X>R.

[x]Relative bioavailability (RBV) of supplemental zinc in diets; ratio between the regression lines slopes from the supplemental standard

zinc source($ZnSO_4$) and the supplemental test zinc source (ZnAA) x100 (Littell *et al*., 1995)) by the “three point assay”

[y]Relative bioavailability (RBV) of supplemental zinc in diets; ratio between the slope of the test zinc source (Zn AA) broken-line equation to standard zinc source ($ZnSO_4$) x 100 (Paripatannanont and Lovell, 1995)

7. ผลของสังกะสีต่อความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ของปลานิลแดงแปลงเพศ

หลังจากเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศด้วยอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ที่ระดับ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 มก./กก. ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นนำปลามาทดสอบความต้านทานเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* และบันทึกอัตราการรอดตาย หลังจากเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 30, 60 และ 90 มก./กก. สามารถต้านทานเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม และปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับความเข้มข้น 30 มก./กก. มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด คือ 80.00±14.14 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตไม่สามารถต้านทานเชื้อก่อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อัตราการรอดตาย และค่า RPS ของปลานิลแดงแปลงเพศแต่ละชุดการทดลอง หลังจากเหนี่ยวนำให้ปลานิลแดงแปลงเพศติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยการฉีด เป็นเวลา 10 วัน

ชุดทดลอง	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	RPS (เปอร์เซ็นต์)
T1 control	50.00 ± 14.14	-
T2 ZnAA 30	80.00 ± 14.14	60
T3 ZnAA 60	75.00 ± 35.35	50
T4 ZnAA 90	65.00 ± 21.21	30
T5 ZnAA 120	50.00 ± 0.00	0
T6 ZnAA 150	45.00 ± 35.35	-10
T7 $ZnSO_4$ 30	48.75 ± 15.91	-2.5
T8 $ZnSO_4$ 60	30.00 ± 0.00	-40
T9 $ZnSO_4$ 90	45.00 ± 7.07	-10
T10 $ZnSO_4$ 120	50.00 ± 28.28	0
T11 $ZnSO_4$ 150	45.00 ± 21.21	-10

ค่าเฉลี่ยจากข้อมูล 2 ซ้ำ จำนวนปลา 20 ตัวต่อชุดทดลอง

8. ผลของสังกะสีต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อของปลานิลแดงแปลงเพศ

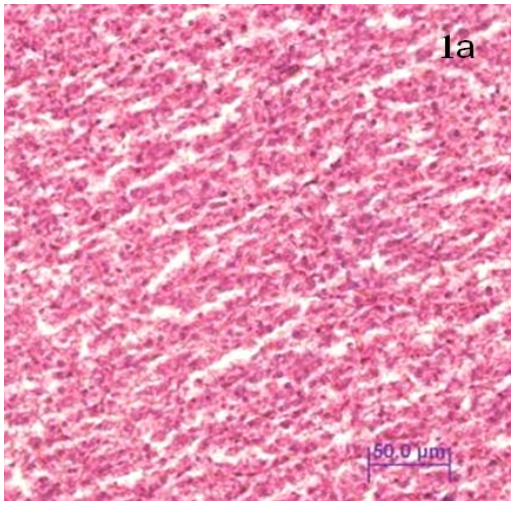
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ และไต หลังจากเลี้ยงปลาด้วยอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ที่ระดับ 30, 60, 90 120 และ 150 มก./กก. ตามลำดับ และอาหารชุดควบคุมที่ไม่ได้เสริมสังกะสีในอาหาร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ ดังตารางที่ 10 และ 11

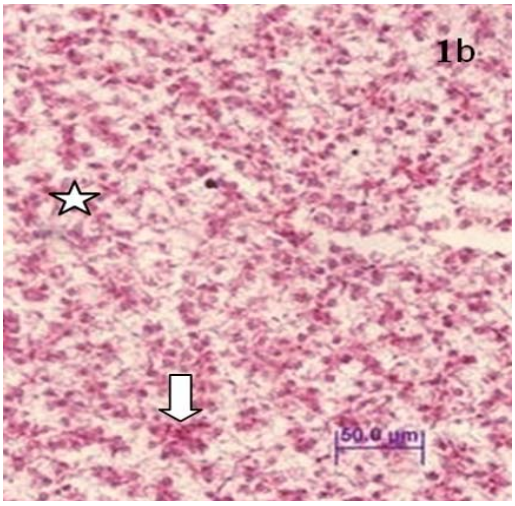
จากการศึกษาเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต พบว่าเนื้อเยื่อเหงือกของปลาทุกชุดการมดลองมีสภาพปกติ แต่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสี คือ hepatic sinusoid เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และมีช่องว่างในเนื้อตับมากขึ้น เกิดการตายของเซลล์ตับ พบเซลล์ตับหดลีบ เล็กลง (atrophy) มีช่องว่างในเซลล์ตับ และมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดมากขึ้น ซึ่งเนื้อเยื่อตับของปลาชุดควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 1

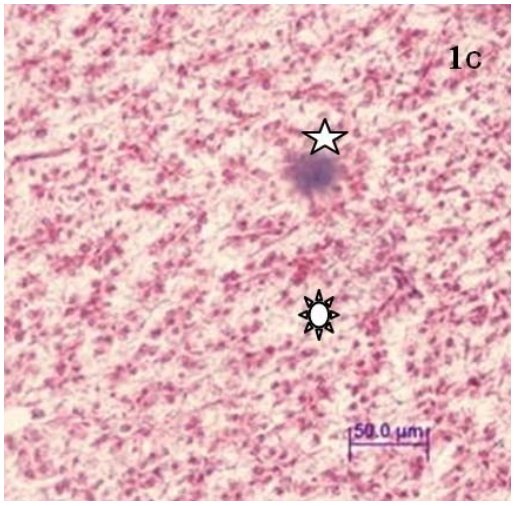
ตารางที่ 10 ลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ (liver) ปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์[1]

ชุดทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับ		
	การแทรกตัวของเม็ดเลือด	การเสื่อมสลายของเซลล์	การเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์
T1 control	0	0	0
T2 ZnAA 30	10	10	10
T3 ZnAA 60	20	30	20
T4 ZnAA 90	30	30	40
T5 ZnAA 120	50	50	50
T6 ZnAA 150	50	60	60
T7 $ZnSO_4$ 30	10	20	10
T8 $ZnSO_4$ 60	20	40	30
T9 $ZnSO_4$ 90	30	40	40
T10 $ZnSO_4$ 120	50	60	60
T11 $ZnSO_4$ 150	60	70	80

[1]% ความผิดปกติ = (จำนวนปลาผิดปกติ/จำนวนปลาทั้งหมด) X 100







ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

1a เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

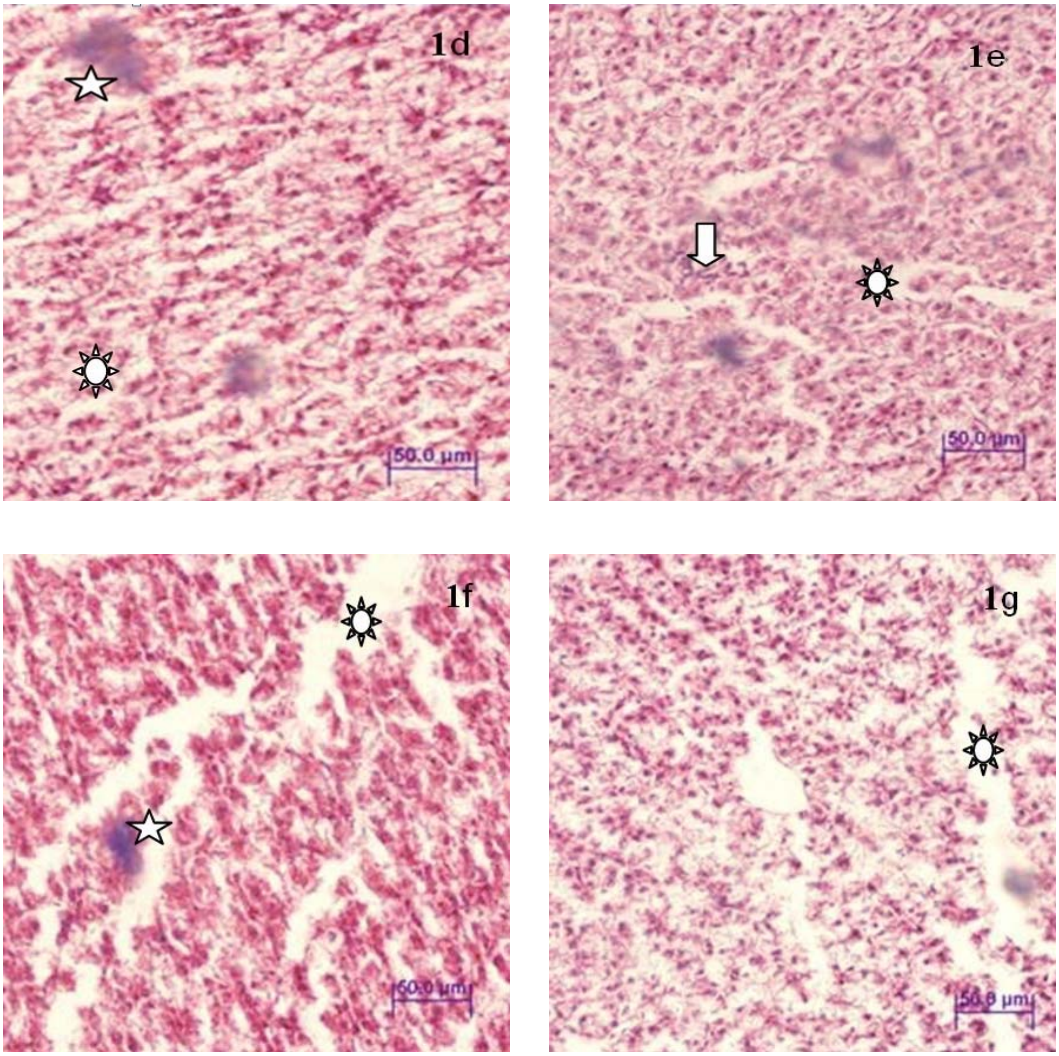
1b เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 30 มก./กก.

1c เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 30 มก./กก.

☼ มีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วน ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน

☆ มีการตายของเซลล์ตับ

⇩ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดมากขึ้น



ภาพที่ 1 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

1d เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 60 มก./กก.

1e เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 60 มก./กก.

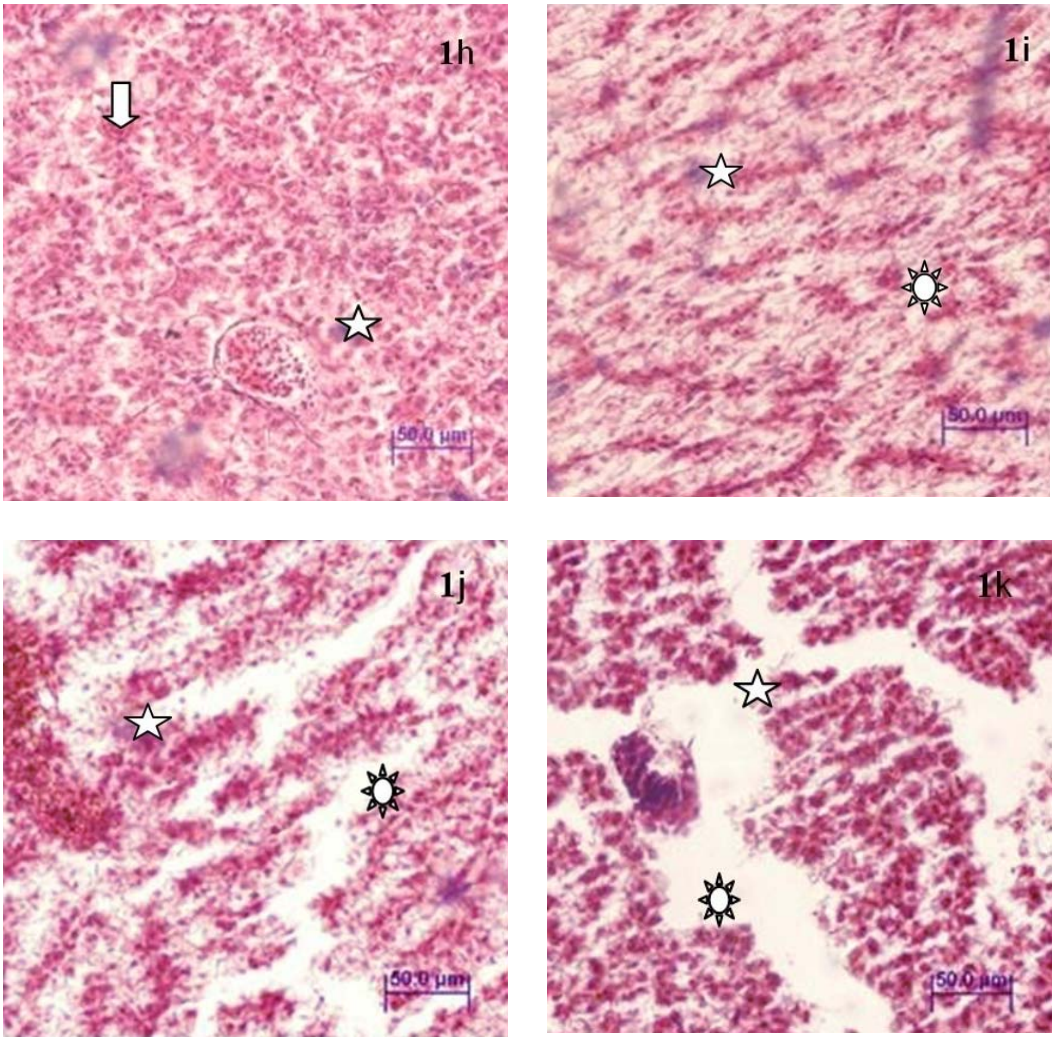
1f เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 90 มก./กก.

1g เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 90 มก./กก.

☼ มีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วน ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน

☆ มีการตายของเซลล์ตับ

⇩ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดมากขึ้น



ภาพที่ 1 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

1h เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 120 มก./กก.

1i เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 120 มก./กก.

1j เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 150 มก./กก.

1k เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 150 มก./กก.

☼ มีการเสื่อมสลายของเซลล์บางส่วน ทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน

☆ มีการตายของเซลล์ตับ

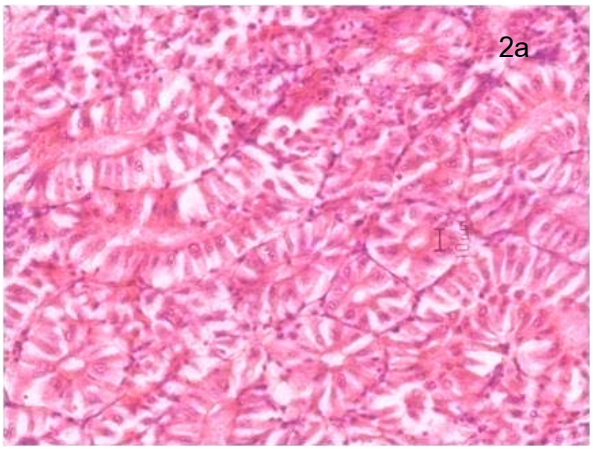
⇩ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดมากขึ้น

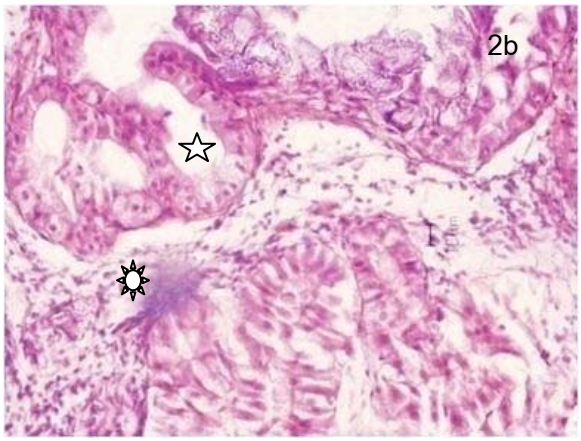
สำหรับเนื้อเยื่อไตของปลาชุดทดลองที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีการเปลี่ยนแปลงคือ การเสื่อมสลายของท่อไต การเสื่อมสลายของ epithelium cell และมีการหดตัวของ glomerrulus ซึ่งเนื้อเยื่อไตของปลาชุดควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 2

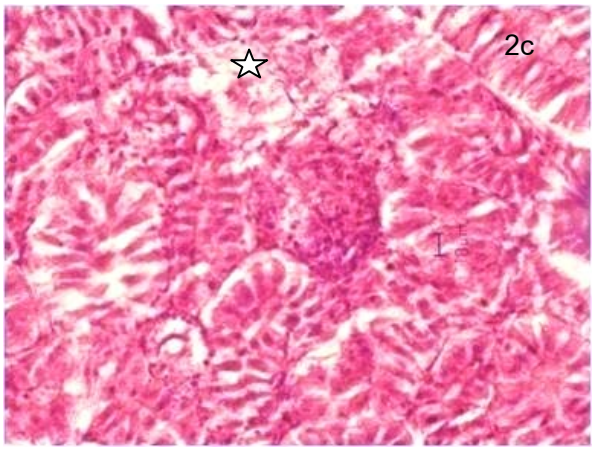
ตารางที่ 11 ลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อไต (kidney) ปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์[1]

ชุดทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไต	
	การเสื่อมสลายของท่อไต	การเสื่อมสลายของ epithelium cell และมีการหดตัวของ glomerrulus
T1 control	0	0
T2 ZnAA 30	10	10
T3 ZnAA 60	30	20
T4 ZnAA 90	40	30
T5 ZnAA 120	50	50
T6 ZnAA 150	60	60
T7 $ZnSO_4$ 30	20	10
T8 $ZnSO_4$ 60	40	30
T9 $ZnSO_4$ 90	40	40
T10 $ZnSO_4$ 120	60	60
T11 $ZnSO_4$ 150	80	70

[1]% ความผิดปกติ = (จำนวนปลาผิดปกติ/จำนวนปลาทั้งหมด) X 100
จำนวนปลาทั้งหมด = 10 ตัวต่อชุดทดลอง







ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไตปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

2a เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

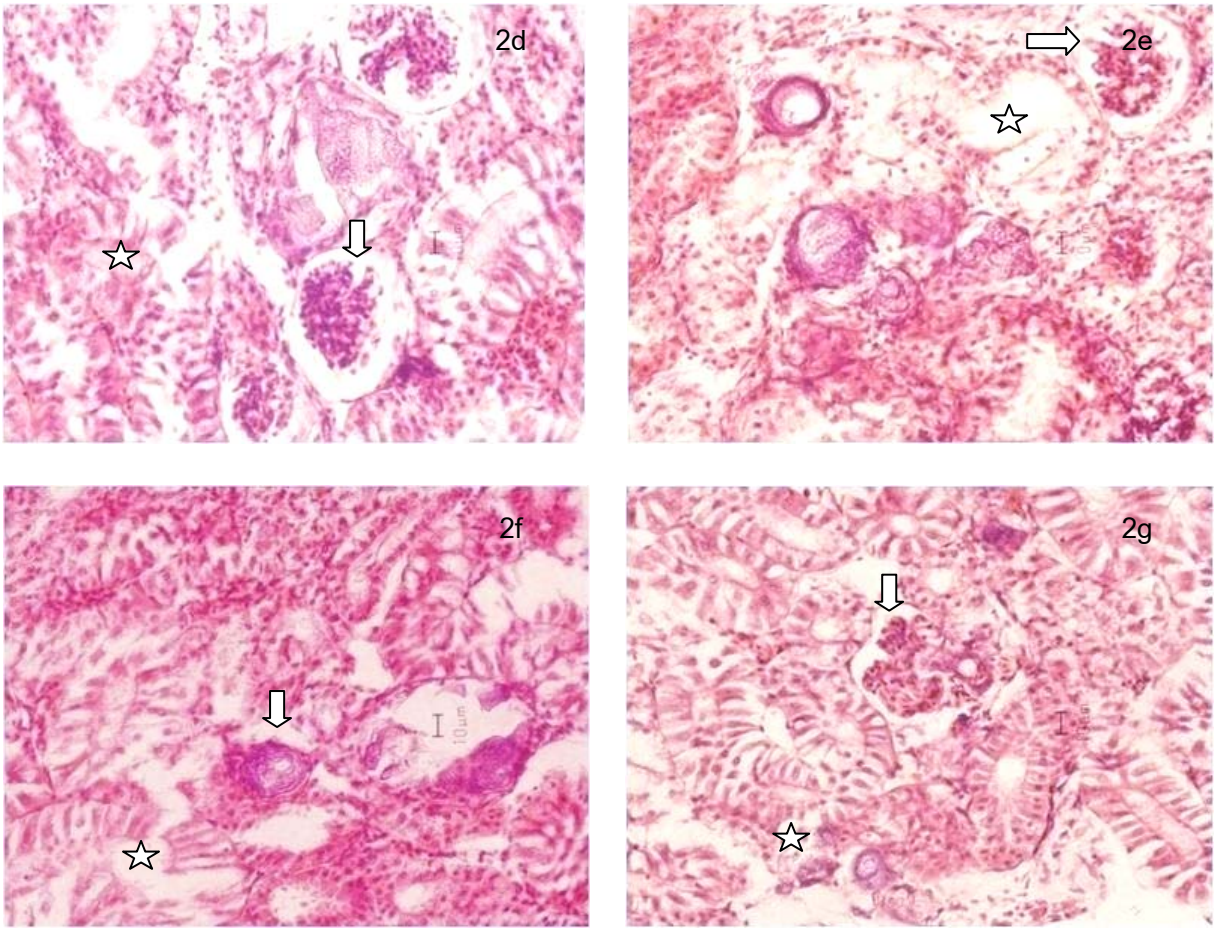
2b เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 30 มก./กก.

2c เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 30 มก./กก.

☼ มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือด

☆ มีการเสื่อมสลายของท่อไต

⇩ มีการเสื่อมสลายของ epithelium cell และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus)



ภาพที่ 2 **(ต่อ)** การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไตปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

2d เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 60 มก./กก.

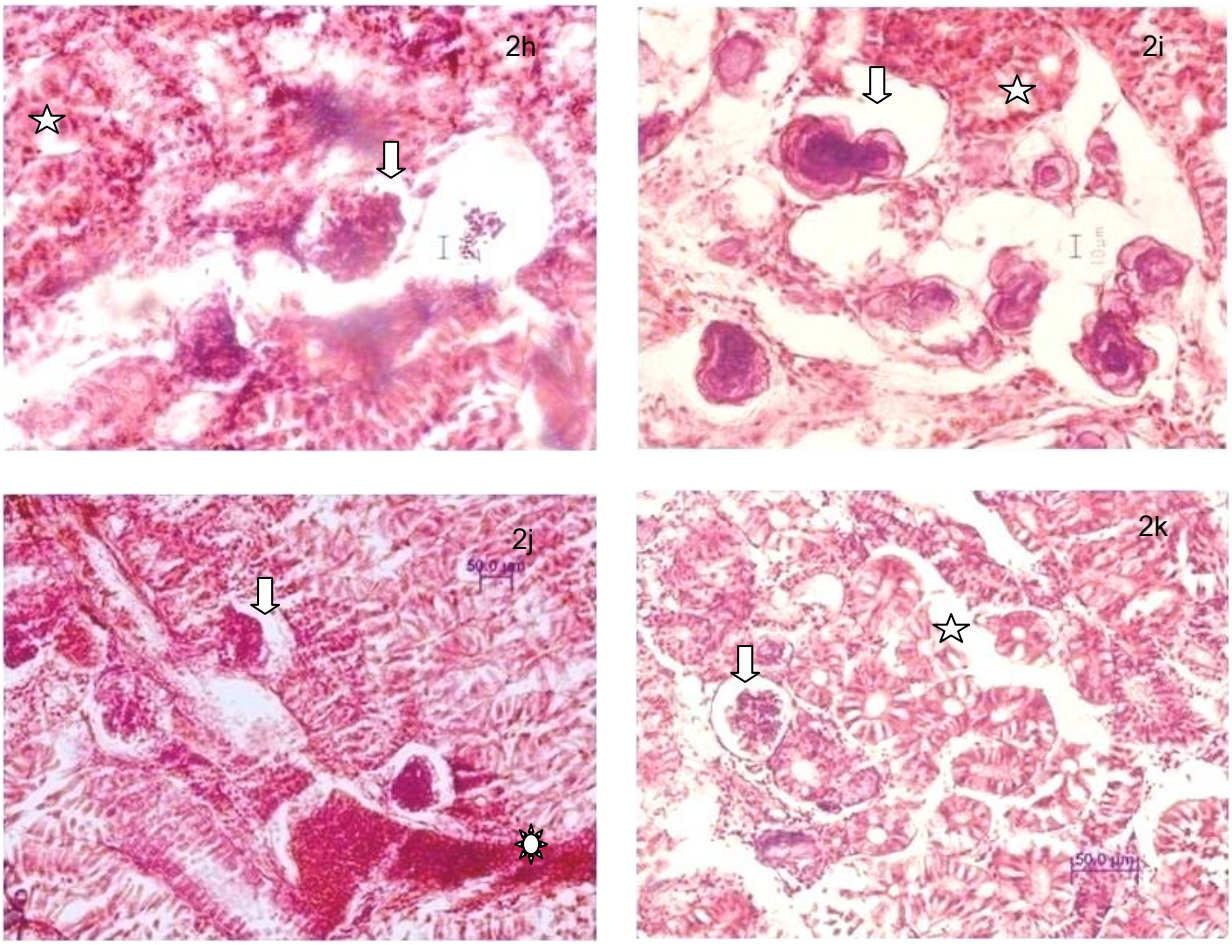
2e เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 60 มก./กก.

2f เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 90 มก./กก.

2g เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 90 มก./กก.

☆ มีการเสื่อมสลายของท่อไต

⇩ มีการเสื่อมสลายของ epithelium cell และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus)



ภาพที่ 2 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไตปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

2h เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 120 มก./กก.

2i เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 120 มก./กก.

2j เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน 150 มก./กก.

2k เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต 150 มก./กก.

☼ มีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือด

☆ มีการเสื่อมสลายของท่อไต

⇩ มีการเสื่อมสลายของ epithelium cell และมีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus)

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1

สังกะสีเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อปลาสำหรับการเจริญเติบโตและจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีอยู่ในอาหารปลา (Yamaguchi, 1998; Watanabe *et al*., 1988) ดังผลการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าปลานิลแดงแปลงเพศที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 0.35 กรัม ที่ได้รับอาหารอาหารที่เสริมสังกะสีที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารเสริมสังกะสี ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีที่ระดับอื่นๆ โดยปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยที่สุดใกล้เคียงกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับสูง คือ 150 มก./กก. (p>0.05) และปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 150 มก./กก. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 150 มก./กก. มีอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้ปรตีนสูงที่สุด เช่นเดียวกับการรายงานของ Zhao และคณะ (2009) ซึ่งพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ($ZnSO_4$) และสังกะสีเมทไธโอนีน (ZnMet) ที่ระดับ 60 มก./กก. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงกว่าปลานิลชุดควบคุม และปลานิลที่ได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 มก./กก. ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมสังกะสีทั้ง 2 รูปแบบส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลา และสังกะสีอะมิโนมีแนวโน้มที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า ซึ่งการใช้สังกะสีอะมิโนซึ่งเป็นรูปอินทรีย์ในอาหารสัตว์น้ำ นับว่ามีผลดีต่อสิ่งแวดล้อม ดังรายงานของ Environment Protection Agency หรือ EPA ซึ่งเป็นหน่วยงานของรัฐบาลในประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีหน้าที่รับผิดชอบด้านสิ่งแวดล้อมได้สนับสนุนให้ผู้เลี้ยงสัตว์น้ำใช้แร่อินทรีย์ (organic minerals) มากขึ้น ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่ผลิตโดยกระบวนการใช้พันธะทางเคมี (chelation) รวมกับอินทรียสารต่างๆ เช่น โปรตีน เปปไทด์ หรือกรดอะมิโน ที่มีคุณสมบัติดีเยี่ยมต่อการยึดแร่ธาตุไม่ให้ทำปฏิกิริยากับอณูของธาตุอื่นๆ ในทางเดินอาหาร ทำให้อัตราการดูดซึมเพิ่มขึ้นในสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดสิ่งตกค้างในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ ตลอดจนลดมลพิษที่เกิดจากสารเคมีตกค้างในธรรมชาติ เมื่อสัตว์บริโภคเข้าไปแล้วจะเจริญเติบโตดี มีภูมิต้านทานโรคสูง และทำให้อัตราการตายในสัตว์เหล่านั้นน้อยกว่าแร่ธาตุจากแหล่งอนินทรียสาร (inorganic sources) เช่น สังกะสีซัลเฟต (zinc sulfate) หรือสังกะสีออกไซด์ (zinc oxide) เป็นต้น (Henny และคณะ, 1992; Aoyagi และ Baker, 1992)

แหล่งของสังกะสีที่นิยมใช้เสริมลงในอาหารส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ เช่น ZnO $ZnSO_4.H_2O$ และมีบางชนิดที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ เช่น Zn-methionine, Zn-propionate, Zinc amino acid complex ซึ่งสังกะสีแต่ละชนิดก็มีค่าของการใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน (Do Carmo E Sa´ *et al*., 2005; Kucukbay *et al*., 2006) ซึ่งจากการทดลองพบว่าการเสริมสังกะสีทั้งสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟต มีผลทำให้สังกะสีในซีรัม และสังกะสีในกระดูกของปลาสูงกว่าชุดควบคุม (p<0.05)

ไม่มีผลต่อสังกะสีในกล้ามเนื้อของปลา โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน 120 มก./กก. มีปริมาณสังกะสีในกระดูกสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่น ($p<0.05$) นอกจากนี้การเสริมสังกะสีทั้งสองชนิดในอาหาร มีผลทำให้เหล็กในซีรัมของปลาเพิ่มขึ้นแตกต่างกับชุดควบคุม แต่ไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมในซีรัม แต่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟตทุกระดับมีปริมาณเหล็กในซีรัมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งจากการรายงานของ Do Carmo E Sa´ และคณะ (2005) พบว่าการเก็บสะสมของสังกะสีแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน เนื่องจากกระบวนการดูดซึมของสังกะสีในลำไส้มีค่าแตกต่างกัน และมีการขับทิ้งของสังกะสี (urinary zinc excretion) ไม่เท่ากัน ส่งผลให้ปลามีความต้องการใช้ประโยชน์จากสังกะสีชนิดต่างๆ เพื่อกระบวนการเมทาบอลิซึมได้ไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาการใช้ประโยชน์ของสังกะสีในตัวปลา (bioavailability) ยังมีข้อมูลไม่มากนัก ทั้งนี้การใช้ประโยชน์ได้ของแร่ธาตุที่มีในอาหารจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น รูปแบบของโมเลกุลของสาร ค่าการละลายน้ำ และกระบวนการดูดซึมแร่ธาตุ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย และไม่ละลายน้ำของแร่ธาตุในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ในวัตถุดิบพืชที่นิยมนำมาทำเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่จะมีส่วนที่เป็นกรดไฟติก (phytic acid) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นคีเลต (chelate) สามารถรวมตัวกับสังกะสีที่มีในวัตถุดิบและอาหาร ส่งผลให้สัตว์น้ำสามารถนำสังกะสีจากอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง (Francis *et al.,* 2001; Do Carmo E Sa´ *et al*., 2005) เป็นผลให้มีความจำเป็นต้องศึกษาปริมาณความต้องการสังกะสีในอาหารของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของวัตถุดิบพืช เนื่องจากข้อมูลการศึกษาความต้องการแร่ธาตุส่วนใหญ่จะทำการศึกษาโดยการใช้อาหารทดลองบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นอาหารทดลองที่ไม่มีสิ่งรบกวนการใช้ประโยชน์จากแร่ธาตุในอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับความต้องการสังกะสีที่เหมาะสมของปลานิลจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงจริง การรายงานถึงปริมาณที่ไม่เพียงพอของสังกะสีในฟาร์มเลี้ยงปลายังมีอย่างต่อเนื่องในอดีต (Ketola, 1979; Watanabe *et al*., 1980; Satoh *et al*., 1983) โดยปลาแต่ละชนิดมีความต้องการสังกะสีที่ระดับความเข้มข้นประมาณ 15-30 มิลลิกรัม Zn/น้ำหนักอาหารแห้ง 1 กิโลกรัม (วีระพงศ์, 2536 ; Clearwater and Meyer, 2002) โดยระดับความต้องการสังกะสีในปลาเรนโบว์เทร้า 15-30 มิลลิกรัม Zn/น้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม (Ogino and Yang, 1978) ปลานิลและปลากดหลวง เท่ากับ 20 มิลลิกรัม Zn/น้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม (McClain and Gatlin, 1988) ซึ่งสังกะสีแต่ละชนิดก็มีค่าของการใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน (Do Carmo E Sa´ *et al*., 2005; Kucukbay *et al*., 2006) การศึกษาการใช้ประโยชน์จากสังกะสีสามารถทำได้โดยการหาปริมาณของสังกะสีที่ถูกดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายของปลาด้วยการศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณสังกะสีในซีรัม ในตัวปลา ในกระดูก ในกล้ามเนื้อ และในตับ ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างสังกะสีจากแหล่งต่างๆ โดยทำการหาค่า Relative

bioavailability value (RBV) จะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของสังกะสีรูปแบบต่างๆ (Littell *et al*., 1995)

ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งใช้ปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 0.35 กรัม เมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสังกะสีทั้งสองชนิดต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น สังกะสีในซีรัม สังกะสีในกระดูก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ ด้วย broken-line regression analysis โดยใช้รูปแบบความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic broken-line model) พบว่าระดับที่เหมาะสมสำหรับสังกะสีอะมิโนที่เหมาะสมมีค่าระหว่าง 87.72-125.07 มก./กก. สำหรับสังกะสีซัลเฟตมีค่าระหว่าง 68.02-110.66 มก./กก. ซึ่งจากรายงานอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในบราซิล ได้มีการเสริมสังกะสีในอาหารปลากินเนื้อปริมาณ 30-150 มิลลิกรัม Zn / อาหาร 1 กิโลกรัม (zinc oxide) อย่างไรก็ตาม ปริมาณที่เหมาะสมของปลานิลยังมีข้อมูลที่ไม่เพียงพอ (Ketola, 1979; Satoh *et al*., 1987; Maage and Julshamn, 1993; Ramseyer *et al*., 1999; Maage *et al*., 2001) Eid และ Ghonim (1994) รายงานว่าความต้องการของสังกะสีในปลานิลวัยอ่อน มีค่าเท่ากับ 30 มิลลิกรัม Zn/อาหาร 1 กิโลกรัม (อาหารทดลองบริสุทธิ์, purified diet) เช่นกัน จนกระทั่ง Do Carmo E Sa´ และคณะ (2004) ได้ศึกษาระดับสังกะสีที่เหมาะสมในอาหารปลานิลที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 13.3$\pm$1.13 กรัม โดยใช้อาหารปลากินพืชที่เสริม zinc sulfate monohydrate ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50,100, 150, 200, 300, และ 400 มิลลิกรัม Zn/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าระดับสังกะสีที่เหมาะสม คือ 79.51 มิลลิกรัม Zn/อาหาร 1 กิโลกรัม

จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้งสังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟตทุกๆ ระดับ มีค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และพลาสมาโปรตีนไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม (p>0.05) แต่พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้งสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟตมีค่าแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงที่สุด และสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 90 และ 120 มก./กก. ซึ่งจากรายงานของ วีระพงศ์ (2536) กล่าวว่าสังกะสีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญเมตัลโลเอนไซม์ประมาณ 20 ชนิด ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส คาร์บอกซิเปปทิเดส และคาร์บอนิคแอนไฮเดรส เป็นต้น และจากรายงานของ Do Carmo E Sa´ และคณะ (2004) พบว่าฮีมาโตคริต และฮีโมโกลบิน มีค่าลดลงเมื่อระดับของสังกะสีเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีค่าแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และระดับการเสริมสังกะสีที่เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 25-400 มก./กก. มีผลทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้นตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

หลังจากที่ปลานิลแดงแปลงเพศได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 มก./กก. ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำปลามาทดสอบความต้านทานเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 มก./กก. สามารถต้านทานเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าชุดควบคุม และปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับความเข้มข้น 30 มก./กก. มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด คือ 80.00±14.14 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ และไต พบว่าเนื้อเยื่อเหงือกของปลาแต่ละชุดการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลง แต่เนื้อเยื่อตับของปลาชุดทดลองมีการเปลี่ยนแปลงคือ hepatic sinusoid เรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีช่องว่างในเนื้อตับมากขึ้น เกิดการตายของเซลล์ตับ บางครั้งทำให้เซลล์ตับหดลีบ เล็กลง (atrophy) มีช่องว่างในเซลล์ตับและมีการแทรกตัวของเม็ดเลือดมีมากขึ้น เนื้อเยื่อไตของปลาชุดทดลองมีการเปลี่ยนแปลงคือ การเสื่อมสลายของท่อไต การเสื่อมสลายของ epithelium cell และมีการหดตัวของ glomerrulus เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อตับปลาชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลง หากสังเกตจากการทดลองพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีในระดับที่สูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับและไตเพิ่มสูงขึ้น แต่ Duffus (1980) และ Robinson (1996) รายงานว่าสังกะสีเป็นโลหะหนักที่เป็นอันตรายน้อย นอกจากนี้จากการรายงานของ Hinton และ Lauren (1990) พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาบริเวณเซลล์ตับของปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) จากการได้รับสังกะสี 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ของเซลล์ตับ ซึ่งเป็นผลมาจากการสูญเสียพลังงาน การเรียงตัวไม่เป็นระเบียบของไมโครทิวบูล รวมถึงเกิดการบวมของเซลล์จนถึงขั้นการเสียสภาพ และการสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้งหรือถูกรบกวนในกระบวนการสังเคราะห์ (Cheville, 1994)

การทดลองที่ 2 ผลของสังกะสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลแดงแปลงเพศ

การทดลองที่ 2 ได้นำผลจากการทดลองแรกมาประกอบการพิจารณาโดยเลือกระดับความเข้มข้นของสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟต คือ ระดับที่เหมาะสมสำหรับสังกะสีอะมิโนมีค่าอยู่ระหว่าง 87.72-125.07 มก./กก. และสังกะสีซัลเฟตมีค่าอยู่ระหว่าง 68.02-110.66 มก./กก. ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงกำหนดระดับความเข้มข้นของสังกะสีทั้งสองชนิดใน 2 ช่วง คือ ช่วงต่ำ ที่ระดับ 60 มก./กก. และช่วงสูง ที่ระดับ 120 มก./กก.

วิธีการทดลอง

1. **ปลานิลแดงแปลงเพศ**

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 2.01±0.00 ถึง 2.02±0.01 กรัมต่อตัว นำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 18x36x18 นิ้ว บรรจุน้ำ 100 ลิตร ในระบบการเลี้ยงให้อากาศตลอดระยะเวลา เพื่อให้ปลาปรับสภาพและสร้างความคุ้นเคย และให้อาหารปลา วันละ 2 ครั้ง คือ 9.00 น. และ 16.00 น. ซึ่งในแต่ละครั้งให้ปลากินอาหารจนอิ่ม โดยสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของปลาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2. **อาหารทดลอง**

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 5 สูตร (ตารางที่ 12) แตกต่างกันที่ชนิดและระดับความเข้มข้นของสังกะสีที่เสริมในอาหารแต่ละชุดการทดลอง คือ อาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 60 และ120 มก./กก. ตามลำดับ และอาหารชุดควบคุมไม่มีการเสริมสังกะสีในอาหาร โดยเริ่มต้นการทำอาหารชุดควบคุมก่อน แล้วจึงทำอาหารชุดทดลองที่เสริมสังกะสีที่ระดับความเข้มข้นจากต่ำไปสูง นำวัตถุดิบอาหารแต่ละสูตรผสมในเครื่องผสมอาหารจนวัตถุดิบเข้ากันแล้วนำมาอัดเม็ด จากนั้นจึงนำไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บรรจุลงถุงพลาสติกพร้อมติดฉลากอาหารแต่ละสูตร และเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ใช้ในการทดลองที่ 2 (เปอร์เซ็นต์)

วัตถุดิบอาหาร	ชุดควบคุม	สังกะสีอะมิโน (มก./กก.)		สังกะสีซัลเฟต (มก./กก.)	
		60	120	60	120
ปลาป่น (CP 65%)	23.47	23.47	23.47	23.47	23.47
กากถั่วเหลือง	29.4	29.4	29.4	29.4	29.4
รำข้าว	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
รำข้าวสาลี	12	12	12	12	12
ข้าวโพดป่น	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08
มันเส้น	5	5	5	5	5
แป้งข้าวเจ้า	0.368	0.318	0.268	0.342	0.315
น้ำมันปลา	1	1	1	1	1
น้ำมันถั่วเหลือง	1	1	1	1	1
วิตามินผสม[1]	1	1	1	1	1
แร่ธาตุผสม[2]	2.632	2.632	2.632	2.632	2.632
โคลีคลอไรด์	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
เกลือ	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Zinc amino (12%)	0	0.05	0.1	0	0
$ZnSO_4.7H_2O$	0	0	0	0.026	0.053
รวม	100	100	100	100	100

[1]Vitamin mix (g/kg premix): Vit.A 5,000,000 IU, Vit.D 1,000,000 IU, Vit.E 100 g, Vit.K3 10 g, Vit.B1 10 g, Vit. B2 15 g, Vit. B6 30 g, Vit. B12 15 mg, Niacin 150 g, Pathothenic acid 25 g, Folic acid 3 g, Biotin 200 mg, Inositol 135 g, Vitamin C 105 g, BHT 200 mg

[2]Mineral mix (g/kg premix): Calcium-L-lactate 223.78, $NaH_2PO_4.2H_2O$ 191.87, $MgSO_4.7H_2O$ 308.13, K_2SO_4 253.80, $MnSO_4.H_2O$ 1.41, Amino-Fe(12%) 19.00, Amino-Cu(10%) 1.90, $Na_2O_3Se.5H_2O$ 0.0376

3. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

หลังจากที่ปลานิลแดงแปลงเพศได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ที่ระดับ 0, 60 และ120 มก./กก. ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นจึงศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลแดงแปลงเพศ โดยเก็บตัวอย่างเลือดปลา และเตรียมตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 เก็บเลือดปลาโดยใช้สารกันเลือดแข็งตัว แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (plasma) เพื่อนำไปวิเคราะห์ activity of selenium dependent GSHPx

ส่วนที่ 2 ไม่ใช้สารกันเลือดแข็งตัว โดยนำเลือดที่เจาะได้เกิดการแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงเก็บส่วนใสคือซีรัม ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ **ได้แก่** Lysozyme activity และ Complement activity

3.1 Glutathione peroxidase

นำตัวอย่างพลาสมาไปวิเคราะห์ activity of selenium dependent GSHPx โดยวัดการลดลงของปริมาณ NADPH ในการเปลี่ยนไปเป็นกลูตาไธโอนในสภาพรีดิวส์ (GSH) ซึ่งสามารถทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไม่ให้เปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 340 นาโนเมตร (Glutathione peroxidase activity assay kit, Sigma)

3.2 Lysozyme activity

วิเคราะห์ปริมาณ Lysozyme activity ตามวิธีการของ Obach และ คณะ (1993) โดยวัดการลดลงของความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (0.03 เปอร์เซ็นต์) หลังจากเติมซีรัมในปริมาณที่เท่ากัน ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที เป็นเวลา 20 นาที นำค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) คำนวณหาค่า Lysozyme activity และรายงานเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยหนึ่งยูนิตเท่ากับปริมาณซีรัมที่ทำให้ค่า OD ลดลง 0.001 ต่อนาที

3.3 Complement activity

การทำงานของคอมพลีเมนท์แบบไม่จำเพาะ (alternative pathway) อาศัยแมกนีเซียมในการกระตุ้นการทำงาน ดังนั้นจึงหยุดการทำงานของแคลเซียมโดยการเติมกรดเอทิลีน ไกลคอล เตตระอะซิติก

(EGTA) โดยคำนวณปริมาณคอมพลีเมนท์ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแกะมาตรฐานแตกไป 50 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ Yano (1992) ซึ่งคำนวณหาปริมาณ ACH_{50} หน่วย/มิลลิลิตร

3.4 Phagocytic index

ตัวอย่างปลาที่เก็บเลือดแล้วแต่ละตัว ทำการผ่าโดยตัดไตส่วนหน้า (Head kidney) ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร จากนั้นกรองผ่านผ้ากรองไนลอนขนาดตา 100 ไมโครเมตร จะได้สารละลายเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้า จากนั้นโหลดเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ลงบน Percoll gradient 34/51 เปอร์เซ็นต์ แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวตรงรอยต่อระหว่าง 34-51 percoll ปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ 2×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ใส่ในหลุม (well plate) 24 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม latex bead จำนวน 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมดังกล่าวข้างต้น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมกลูตาราลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ และย้อมด้วย Diff Quick นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่กิน latex bead จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด และจำนวน latex bead เพื่อหาค่า Phagocytic index ตามวิธีการของ Phillips และคณะ (1979)

4. **ออกซิเดชั่นของไขมัน** (lipid oxidation)

การวัดผลผลิตที่เกิดในช่วงหลังของการเกิด lipid oxidation โดยเป็นค่าที่ตรวจวิเคราะห์ในรูปของสาร malonaldehyde (malondialdehyde) ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบต่อเนื่องจากสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นสารประกอบจำพวกอัลดีไฮด์ ทั้งนี้เพราะสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ไม่เสถียร จะสลายตัว ทำให้ได้สารประกอบที่มีจำนวนคาร์บอน (C) น้อยลง เนื่องจากสารประกอบ malonaldehyde ส่วนใหญ่จะพบในรูปที่จับกับสารอื่น ซึ่งถูกแยกออกได้โดยการใช้ความร้อน สาร malonaldehyde ดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับ TBA เกิดเป็นสีแดงได้ จึงใช้เป็นวิธีทดสอบการเกิด lipid oxidation โดยค่า TBA จะวัดเป็นค่า mg malonaldehyde ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง ตามวิธีการของ Buege และ Aust (1978)

5. **การศึกษาความต้านทานโรคของปลานิลแดงแปลงเพศ**

หลังจากเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ทำการทดสอบความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* โดยนำปลาแต่ละชุดการทดลองละ 20 ตัว ฉีดเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LD_{50} (10^7 CFU/ml) เข้าช่องท้องของปลา ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บันทึกการรอดตายของปลาในแต่ละวัน แล้วนำไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) ตามวิธีการของ Ellis (1988)

ผลการทดลอง

1. ปริมาณสังกะสีในอาหารทดลอง

พบว่าปริมาณสังกะสีในอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟตมีปริมาณที่สูงกว่าอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สำหรับอาหารชุดควบคุมมีปริมาณสังกะสีเพียง 47.32±0.59 มก./กก. ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณสังกะสีในอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลอง (มก./กก.)

ชุดทดลอง	ปริมาณสังกะสีในอาหารทดลอง (มก./กก.)
T1 control	47.32±0.59
T2 ZnAA 60	87.83±1.58
T3 ZnAA 120	129.49±2.40
T4 $ZnSO_4$ 60	91.63±8.98
T5 $ZnSO_4$ 120	134.02±3.41

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ผลของสังกะสีต่อการเจริญเติบโตของปลานิลแดงแปลงเพศ

2.1 น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

การทดลองนี้ใช้ปลานิลแดงแปลงเพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 2.01±0.00 ถึง 2.02±0.01 กรัม หลังจากเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลอง เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับต่าง ๆ และชุดควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ใกล้เคียงกัน (p>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 น้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาแต่ละชุดการทดลอง

ชุดทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ
T1 control	2.01±0.00[a]	56.49 ±0.82[a]	0.89±0.01[a]
T2 ZnAA 60	2.01±0.01[a]	57.48 ±2.75[a]	0.88±0.04[a]
T3 ZnAA 120	2.01±0.01[a]	57.24 ±0.44[a]	0.89±0.01[a]
T4 $ZnSO_4$ 60	2.01±0.01[a]	56.96 ±1.55[a]	0.89±0.04[a]
T5 $ZnSO_4$ 120	2.02±0.01[a]	58.62 ±0.55[a]	0.87±0.01[a]
Zinc type	NS	NS	NS
Level of zinc	NS	NS	NS
Zinc type x Level	NS	NS	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 4 ซ้ำ)
สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

3. ผลของสังกะสีต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

หลังจากเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลอง เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา โดยวิเคราะห์ปริมาณ glutathione peroxidase, lysozyme activity และ complement activity ในซีรัม และการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index) ของเม็ดเลือดในปลาแต่ละชุดการทดลอง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีค่า glutathione peroxidase ในซีรัมสูงที่สุด คือ 55.65±17.33 นาโนโมล NADPH ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. มีค่าต่ำที่สุด คือ 29.72±15.72 นาโนโมล NADPH ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 35.30±19.33 นาโนโมล NADPH ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 120 มก./กก. มีค่า lysozyme activity ในซีรัมสูงที่สุด คือ 17.59±4.81 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีค่าต่ำที่สุด คือ 14.11±2.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 15.58 ±2.62 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) และปลาที่ได้รับอาหารเสริม

สังกะสีอะมิโนที่ระดับ 60 มก./กก. มีค่า complement activity ในซีรัมสูงที่สุด คือ 192.17±9.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. มีค่าต่ำที่สุด คือ 162.68±31.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุมมีค่ากับ 189.07±36.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ปริมาณ glutathione peroxidase, lysozyme activity และ complement activity ในซีรัมของปลาแต่ละชุดการทดลอง

ชุดทดลอง	Glutathione peroxidase (nmol NADPH/min/ mg protein)	Lysozyme activity (unit/ml)	Complement (ACH_{50} value, unit/ml)
T1 control	35.30±19.33[a]	15.58 ±2.62[a]	189.07±36.97[a]
T2 ZnAA 60	48.16±19.42[a]	17.34±3.25[a]	192.17±9.39[a]
T3 ZnAA 120	29.72±15.72[a]	15.94±3.66[a]	162.68±31.74[a]
T4 $ZnSO_4$ 60	55.65±17.33[a]	14.11±2.16[a]	180.64±25.47[a]
T5 $ZnSO_4$ 120	39.28±12.19[a]	17.59±4.81[a]	170.96±27.79[a]
Zinc type	NS	NS	NS
Level of zinc	NS	NS	NS
Zinc type x Level	NS	NS	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 4 ซ้ำ)
สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index) ของเม็ดเลือดในปลาแต่ละชุดการทดลอง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุด คือ 6.59±0.33 รองลงมา คือปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. มีปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอม คือ 6.38±0.34 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 60 มก./กก. และอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 120 มก./กก. ซึ่งมีค่าคือ 5.11±0.65, 4.59±0.33 และ 4.32±0.91 ตามลำดับ และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 16

การเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน (lipid oxidation) ในตับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 120 มก./กก. ซึ่งวัดเป็นค่าปริมาณ malonaldehyde มีค่าสูงที่สุด คือ 1.48±0.38 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. ซึ่งมีค่า คือ 0.62±0.26 และ 0.68±0.22 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การจับกินสิ่งแปลกปลอมและปริมาณ malonaldehyde ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสังกะสี

ชุดทดลอง	Phagocytic index	Malonaldehyde (nmol/ml)
T1 control	5.11±0.65[a]	0.92±0.48[ab]
T2 ZnAA 60	4.59±0.33[a]	0.62±0.26[a]
T3 ZnAA 120	6.38±0.34[b]	1.48±0.38[b]
T4 $ZnSO_4$ 60	6.59±0.33[b]	0.68±0.22[a]
T5 $ZnSO_4$ 120	4.32±0.91[a]	1.04±0.31[ab]
Zinc type	NS	NS
Level of zinc	NS	P<0.05
Zinc type x Level	P<0.05	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 4 ซ้ำ)
สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

5. ผลของสังกะสีต่อความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ของปลานิลแดงแปลงเพศหลังจากได้รับอาหารทดลอง

หลังจากที่ปลานิลแดงแปลงเพศได้รับอาหารที่เสริมสังกะสีอะมิโน และอาหารที่เสริมสังกะสีซัลเฟต ที่ระดับ 0, 60 และ 120 มก./กก. ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำปลามาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* และบันทึกอัตราการรอดตาย หลังจากเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีอัตราการรอดตายหลังจากการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (p>0.05) ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสี

ซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด คือ 55.00±7.07 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอด (RPS) เท่ากับ 40.00±9.43 ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียง 25.00±7.07 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 อัตราการรอดตายหลังจากการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* และความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอด (Relative Percent Survival; RPS) ของปลาในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดทดลอง	อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)	RPS (เปอร์เซ็นต์)
T1 control	25.00±7.07[a]	0.00±0.00[a]
T2 ZnAA 60	30.00±0.00[a]	6.67±0.00[a]
T3 ZnAA 120	50.00±14.14[a]	33.33±18.86[a]
T4 $ZnSO_4$ 60	55.00±7.07[a]	40.00±9.43[a]
T5 $ZnSO_4$ 120	45.00±21.21[a]	26.67±28.28[a]
Zinc type	NS	NS
Level of zinc	NS	NS
Zinc type x Level	NS	NS

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 4 ซ้ำ)
สดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p>0.05)

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2

สังกะสีเป็นธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อยซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการทางชีวเคมีเป็นอย่างมาก และเป็นส่วนประกอบของโปรตีนกว่าร้อยชนิด และรวมไปถึงการเผาผลาญพลังงาน ฮอร์โมน การขับถ่าย และระบบภูมิคุ้มกัน ในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสังกะสีอะมิโน และสังกะสีซัลเฟต ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีทั้ง 2 รูปแบบ มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ชี้ให้เห็นว่าการเสริมสังกะสีในอาหารมีแนวโน้มทำให้ปลามีน้ำหนักตัวที่เพิ่มสูงขึ้น และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น ซึ่งจากการทดลองของ Zhao และคณะ (2009) รายงานว่าการเสริมสังกะสีซัลเฟต หรือสังกะสีเมทไธโอนีน อาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตของปลาที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเรตปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลการนำไปใช้ประโยชน์ของสังกะสีของปลานิลแสดงถึงความไม่แตกต่างทางสถิติ

ทั้งในรูปของสังกะสีซัลเฟต หรือสังกะสีเมทไธโอนีน ส่วนผลการทดลองของ Do Carmo E Sa´ (2005) รายงานว่าการเสริมสังกะสีในรูปของสารอนินทรีย์ หรือสารอินทรีย์ รวมถึงการเสริมสังกะสีที่ระดับ 150 มก./กก. ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิล ซึ่ง Forbes และคณะ (1984) รายงานว่า ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างทางสถิติ อาจจะอธิบายจากค่าความแปรปรวนที่มีการตอบสนองในระดับต่ำจากการประเมินสถานะของสังกะสีในตัวสัตว์

สังกะสีเป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึมของสัตว์ รวมถึงการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยป้องกันการเกิดปฏิกิริยา radical reaction ที่มีเหล็กเป็นตัวช่วยทำปฏิกิริยาและช่วยลดความเป็นพิษของออกซิเจนในกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นในเซลล์ ซึ่งร่างกายมีการต่อต้านความเจ็บป่วยจากอนุมูลอิสระผ่านระบบต่อต้านอนุมูลอิสระซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD), คาตาเลส (catalase) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidasesม GSH-Px) และ สารประกอบที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น กลูตาไธโอน (GSH) (Hidalgo *et al*. 2002) จากการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่า ในสภาวะที่ปลาได้รับอาหารที่ขาดสังกะสี (1-4 mg Zn /kg diet) ทำให้เกิด oxidative stress ในตับและทำให้ SOD มีปฏิกิริยาลดลง (Ogino *et al*., 1978; Wekell *et al*., 1983)

ระบบภูมิคุ้มกันในปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีทั้งระบบแบบไม่จำเพาะเจาะจงและจำเพาะเจาะจงซึ่งมีการตอบสนองด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ (cellular) และส่วนที่เป็นสารน้ำหรือของเหลวในร่างกาย (humoral components) อย่างไรก็ตาม ในปลามีกลไกการป้องกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงมากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากผลของ Hung และคณะ (2007) รายงานว่าระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่ได้รับวิตามินและแร่ธาตุส่งผลให้ความต้านทานโรคดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองครั้งนี้หลังจากให้อาหารทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ นำปลาแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับ 60 มก./กก. มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม จากผลการทดลองของ Ahmad และคณะ (2000) รายงานว่าการที่กิจกรรมเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้นเป็นผลมาจากการชักนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเปลี่ยนมาจากซุปเปอร์ออกไซด์ เรดิคอล นอกจากนี้ค่าคอมพลีเมนต์ของปลาที่ได้รับอาหารผสมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 60 มก./กก. มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับปลาชุดควบคุม ซึ่งค่าคอมพลีเมนต์มีความสำคัญมากที่สุดในกลไกการป้องกันตัวจากเชื้อโรค เพราะมีหน้าที่เชื่อมโยงเป็นกระบวนการในการเพิ่มการจับกินสิ่งแปลกปลอม โดยทำให้มีการอักเสบเกิดขึ้น ซึ่งเป็นวิธีการอย่างหนึ่งในการต่อต้านเชื้อโรค มีการชักนำเม็ดเลือดขาวและกระตุ้นทำให้เกิดการกินเซลล์สิ่งแปลกปลอมโดยฟาโกซัยท์ ซึ่งมีบทบาทในการกำจัดแบคทีเรีย คอมพลีเมนต์เป็นกลุ่มของโปรตีนในน้ำเหลือง ซึ่งทำงานร่วมกัน

ประกอบด้วยโปรตีน 12 ตัว ในทางชีวเคมีพบว่าคอมพลีเมนต์ที่พบในปลามีความคล้ายคลึงกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งในปลาพบคอมพลีเมนต์ในน้ำเลือดและพบที่สารคัดหลั่งเมือก (Sakai, 1992)

สำหรับการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของอัตรารอดในปลาที่ได้รับสังกะสีหลังจากได้รับการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* ในชุดทดลองสูงกว่าชุดควบควบคุม ซึ่งหลายๆ งานทดลองที่ให้ผลการทดลองทำนองเดียวกันคือ สังกะสีช่วยลดอัตราการตาย และเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับสัตว์น้ำ Paripatananont และ Lovell (1995b) ได้ศึกษาผลของสังกะสีต่อความต้านทานโรค ESC (Enteric Septicaemia of Catfish) ซึ่งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมปลาดุกในประเทศสหรัฐอเมริกา การทดลองนี้ทำโดยการเสริมธาตุสังกะสี 2 ชนิดในอาหาร คือ สังกะสีเมทไธโอนีนและสังกะสีซัลเฟต ในระดับ 0, 5, 10, 15 และ 30 มก./กก. เลี้ยงปลา นานเป็นเวลา 10 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาฉีดด้วยเชื้อ *Edwardsiella ictaluri* ที่เป็นเชื้อก่อโรค จากการทดลองพบว่าปลาที่ไม่ได้รับสังกะสีในอาหารเลยตายทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ จากการติดเชื้อโรค ESC ปลาที่ได้รับสังกะสีจากอาหารอย่างเพียงพอคือ สังกะสีเมทไธโอนีน 5 มก./กก. หรือสังกะสีซัลเฟต 30 มก./กก. มีอัตรารอดสูงสุดคือ 70-75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาที่ได้รับสังกะสีซัลเฟตต่ำกว่า 30 มก./กก. มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย 20 เปอร์เซ็นต์ Rougier และคณะ (1992) พบว่าการแช่ปลา zebrafish ในสารละลายสังกะสีก่อนและหลังการติดเชื้อ *Listeria monocytogenes* นาน 1 สัปดาห์ ทำให้ปลาตายเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปลาที่ไม่ได้แช่ตายไปถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Scarpa และคณะ (1992) พบว่าในช่วงที่ปลาดุกอเมริกันเข้าสู่ฤดูที่ *Aeromonas hydrophilla* ระบาด ปลาที่ได้รับสังกะสีในอาหารมีอัตราการรอดสูงกว่าปลาที่ขาดการเสริมธาตุสังกะสี

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

1. ระดับที่เหมาะสมสำหรับสังกะสีอะมิโนมีค่าอยู่ระหว่าง 87.72-125.07 มก./กก. สำหรับสังกะสีซัลเฟตมีค่าอยู่ระหว่าง 68.02-110.66 มก./กก. โดยพิจารณาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น สังกะสีในซีรัม สังกะสีในกระดูก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสุทธิ
2. การเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 60 มก./กก. ในอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตของปลานิลแดงแปลงเพศดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลแดงแปลงเพศที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม ขณะที่การเสริมสังกะสีซัลเฟตในระดับความเข้มข้นสูงในอาหารให้ผลการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากปลานิลแดงแปลงเพศที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม
3. สังกะสีในซีรัมและกระดูกมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เมื่อปลานิลแดงแปลงเพศได้รับอาหารที่เสริมด้วยสังกะสีอะมิโนและสังกะสีซัลเฟต อย่างไรก็ตามจากการสังเกต พบว่าเมื่อเสริมสังกะสีซัลเฟตในระดับที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหาร มีผลต่อการลดลงของสังกะสีในเนื้อเยื่อ
4. ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยสังกะสีอะมิโนที่ระดับ 30-90 มก./กก.มีผลให้ความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* เพิ่มสูงขึ้น

การทดลองที่ 2

1. ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 120 มก./กก. มีน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายสูงที่สุด และมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด เมื่อเทียบกับชุดอื่นๆ (p>0.05) แต่มีปริมาณ malonaldehyde ในตับของปลาสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)
2. ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีปริมาณไลโซไซม์สูงกว่าปลาชุดควบคุม ยกเว้นปลาชุดทดลองที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 60 มก./กก. และปลาชุดทดลองที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีอะมิโนที่ระดับความเข้มข้น 60 มก./กก. มีปริมาณคอมพลีเมนต์สูงกว่าปลาชุดควบคุม ส่วนชุดการทดลองอื่นๆ มีค่าต่ำกว่า (p>0.05)
3. ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีมีอัตราการรอดตายหลังจากการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* สูงกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารเสริมสังกะสีซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 60 มก./กก. มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด คือ 55.00±7.07 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอด (RPS) เท่ากับ 40.00±9.43 ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียง 25.00±7.07 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

1. วัตถุดิบพืชที่นำมาทำเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิล ส่วนใหญ่จะมีส่วนที่เป็นกรดไฟติก (phytic acid) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นคีเลต (chelate) สามารถรวมตัวกับสังกะสีที่มีในวัตถุดิบและอาหาร จึงควรคำนึงถึงซึ่งจะส่งผลให้สัตว์น้ำนำสังกะสีจากอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง
2. ข้อมูลที่ควรพิจารณาถึงระดับที่เหมาะสมของสังกะสีอะมิโนสำหรับการเสริมในอาหาร คือ น้ำหนักของปลาที่เริ่มต้นเลี้ยง อัตราการเจริญเติบโต สุขภาพของปลา และความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค
3. การศึกษาความต้องการแร่ธาตุส่วนใหญ่จะทำการศึกษาโดยการใช้อาหารทดลองบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นอาหารทดลองที่ไม่มีสิ่งรบกวนการใช้ประโยชน์จากแร่ธาตุในอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเปรียบเทียบระดับความต้องการสังกะสีที่เหมาะสมของปลานิลจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงจริง

กิติกรรมประกาศ

ขออุทิศคุณประโยชน์ที่เกิดจากงานวิจัยชิ้นนี้ให้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ ผู้ริเริ่มโครงการวิจัยชิ้นนี้ ด้วยความระลึกยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. คู่มือปฏิบัติการโรคและพยาธิปลา. สงขลา: ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิมล จันทรโรทัย และ กิจจา ใจเย็น. 2535. การศึกษาชนิดของอาหารสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเลี้ยงลูกปลานิลแดงแปลงเพศ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 123/2535. กรุงเทพ ฯ : สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดจตุจักร กรุงเทพฯ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 216 หน้า.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2541. โภชนาศาสตร์สัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 221 หน้า.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London: Butterworths.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J.Fish. Biol. 5: 771-781.

Buege, J.A. and Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroridation. Method Enzymo. 52: 302-304.

Cheville, N.F., 1994. Pathology: An Introduction to Interpretation. Iowa State University Press, Ames.

Duffus, J.H., 1980. Environmental Toxicology, Resource and Environmental Sciences Series. Edward Arnold Publishers Ltd., London, England: pp. 164.

Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. London: Academic Press Limited.

Hayashi, K., Hara, H., Asvarujanon, P., Aoyama, Y. and Luangpituksa, P., 2001. Ingestion of insoluble dietary fibre increased zinc and iron absorption and restored growth rate and zinc absorption suppressed by dietary phytate in rats. Br. J. Nutr. 86: 443– 451.

Hidalgo, M.C., Exposito, A., Palma, J.M. and Higuera, M.D.L. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Inter. J. Biochem. Cell Biol. 34: 183–193

Hinton, D.E. and Lauren, D.J., 1990. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. Am. Fish. Soc. Symp. 8: 51–66.

Humason, G.L. 1979. Animal tissue techniques. San Francisco: W.H. Freeman and Company.

Kucukbay, Z. Yazlak, H., Sahin, C., Tuzcu, M., Cakmak, M.N., Gurdogan, F., Juturu, V. and Sahin, K. 2006. Zinc picolinate supplementation decreases oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 257: 465-469.

Larsen, H.M. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of the microhaematocrit technique with trout blood. Trans. Am. Fish. Soc. 90: 139-142.

Littell, R.C., Lewis, A.J. and Henry, P.R. 1995. Statistical evaluation of bioavailability assays. *In*: Bioavailability of Nutrients for Animals Amino acids, Minerals, and Vitamins. (Ammerman, C.B. Baker, D., Lewis, A. eds), Aacdemic Press, San Diego, CA. pp. 5-33.

Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Obach, A., Quentel, C. and Laurencin, F.B. 1993. Efect of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of seabass (*Dicentrarchus labrax*). Dis. Aquat. Org .15: 175-185.

Ogino, C. and Yang, G.Y. 1978. Requirement of rainbow trout for dietary zinc, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 44: 1015-1018.

Paripatananont, T. and Lovell, R.T. 1995. Response of channel catfish fed organic and inorganic sources of zinc to Edwardsiella ictalrui challenge. J. Aquat. Anim. Health, 7: 147-154.

Phillips, W.A., Shelton, M.J. and Hosing, C.S. 1979. A simple micro-assay for neutrophil bactericidal activity. J. Immunol. Methods 26: 187-192.

Powell, S.R. 2000. The antioxidant properties of zinc. J. Nutr. 130: 147S–1454S.

Robinson, E.H. and Wilson, R.P. 1985. Nutrition and feeding. *In* Channel Catfish Culture. (ed. Tucker C.S.). Development in Aquaculture and Fisheries Science. 15: 323-400.

Robbins, K.R., Norton, H.W., and Baker, D.H. 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. J. Nutr. 109: 1,710–1,714.

Robbins, K.R., Saxton, A.M. and Southern, L.L. 2006. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. J. Anim. Sci. 84: E155–E165.

Robinson, J., 1996. Evaluation of a health assessment index with reference to bioaccumulation of metals in *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) and aspects of the morphology of *Lernaea cyprinacea*, Linnaeus, 1758. M.Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.

Rougier, F., Menudier, A., Troutaud, D., Bosgiraud, C., Ndoye, A., Nicolas, J.A., and Deschaux, P. 1992. In vivo effect of zinc and copper on the development of listeriosis in zebrafish. Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan). J. Fish Disease 15: 453-456.

Scarpa, J. and Gatlin III, D.M. 1992. Dietary zinc requirements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, swim-up fry in soft and hard water. Aquaculture 106: 311–322.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principle and Procedures of Statistics. 2nd ed. New York: McGraw Hill.

Watanabe, T., Kiron, V. and Satoh, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture 151: 185–207.

Watanabe, T., Satoh, S. and Takeuchi, T. 1988. Availibility of Mineral in Fish Meal to Fish. Asian Fisheries Sci. 1: 175-195.

Wekell, J.C.K.D. Shearer, K.D. and Houle, C.R. 1983. High zinc supplementation of rainbow trout diets. Prog. Fish Cult. 45: 144–147

Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. *In* Techniques in Fish Immunology. (eds. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L. and Rowley, A.F.), Fair Haven: SOS Publication. pp. 131-141.

Zeitoun, I.H., Jack, P.I., Halver, I.E. and Ullrey. 1973. Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout Italia fingerling. J. Fish. Res. Board Can. 30: 1,876-1,873.