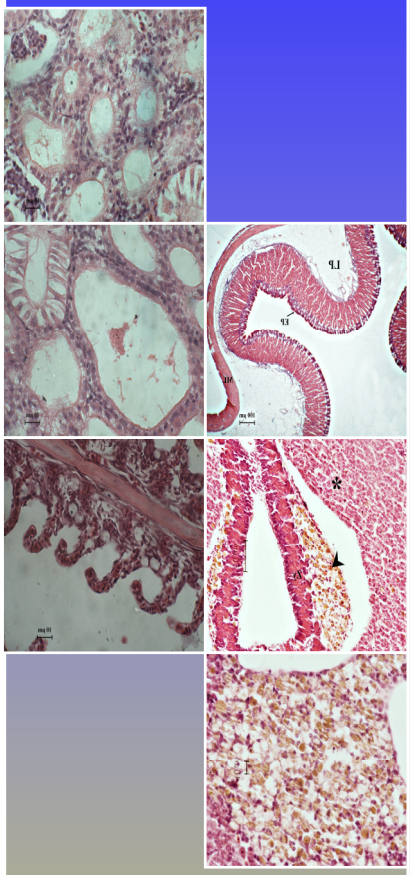
2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา และการตกค้างในปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)

Effects of melamine on growth performance, histological changes and melamine residue in sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)



รศ.ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง
Wutiporn Phromkunthong

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนวิจัย จากเงินรายได้วิทยาเขตหาดใหญ่ ประจำปี 2552

ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา และการตกค้างในปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)

วุฒิพร พรหมขุนทอง[1,*]

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือด การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ และปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวมของปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 5.63 กรัมต่อตัว ทำการทดลองในตู้กระจกความจุน้ำ 150 ลิตร ใช้ปลาจำนวน 25 ตัวต่อตู้ ปลาได้รับอาหารวันละ 2 มื้อ ระยะเวลาในการทดลอง 8 สัปดาห์ แบ่งการทดลองเป็น 7 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยผสมเมลามีนลงในอาหารตามความเข้มข้น 7 ระดับคือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าเมลามีนที่เสริมในอาหารในระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารได้แก่ FCR, PER และ ANPU เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน โดยความรุนแรงจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร นอกจากนี้พบความผิดปกติที่เกิดขึ้นเช่น ลำตัวซีดขาวหรือดำเข้มขึ้น ครีบกร่อน เบื่ออาหาร และเซื่องซึม ทั้งนี้พบในปลาที่ได้รับเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สอดคล้องกับอัตรารอดตายที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาพบว่าปริมาณไขมันที่สะสมในตัวปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนมีแนวโน้มลดลง ต่างจากเถ้าและโปรตีนที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน เมลามีนที่ปลาได้รับยังส่งผลต่อองค์ประกอบเลือดโดยส่งผลให้ฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินลดลง ส่วนโซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ไอออนในเลือดมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างปลาที่ได้รับอาหารที่มีหรือไม่มีเมลามีน จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อซึ่งความผิดปกติที่แสดงให้เห็นชัดเจนในเนื้อเยื่อตับ ไต และเหงือก เนื้อเยื่อตับพบการตายของเซลล์ตับเป็นบริเวณกว้าง เกิดช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมและปรากฏ bile pigment แทรกตัวอยู่ในเซลล์ตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อไตพบว่าท่อไตขยายใหญ่กว่าปกติ เซลล์ในส่วนของท่อไตเกิดการเสื่อมสลายคล้ายกับมีสิ่งแปลกปลอมไปอุดตันอยู่ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนปริมาณสูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์และไม่พบผลึกของเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อเยื่อไต เนื้อเยื่อเหงือกพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) บริเวณ primary และ secondary lamellae และเมื่อได้รับ

เมลามีนในปริมาณสูงขึ้นพบการตกเลือด ซี่เหงือกบิดงอและเสียสภาพ เซลล์เกิดการหลุดลอก เมลา-มีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร โดยพบตกค้างในเครื่องในมากกว่าในเนื้อปลา

คำสำคัญ : เมลามีน, ปลานิลแดงแปลงเพศ, ตับ, ไต, เหงือก, เนื้อเยื่อวิทยา

[1]Ph.D. (Aquatic Animal Nutrition) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

*Corresponding e-mail: wutipornp@yahoo.com

Effects of melamine on growth performance, histological changes and melamine residue in sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)

Wutiporn Phromkunthong

Abstract

A study was conducted on the effects of different levels of melamine on growth performance, feed efficiency, histopathological changes and residue in fillet and viscera in sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). The trial comprised 7 treatments with 3 replications each. Fingerling tilapia with an average initial weight of 5.63 g were released into a glass aquarium containing 150 liters of water with the stocking density of 25 fish/tank. Trial feeds were given twice daily for an 8 week period. Melamine was included in the diets at 7 different levels followed by 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3%, respectively. The results indicated that the fish which received diets containing melamine showed the worst growth performance, and feed efficiency. Tilapia which received melamine diets had the worst FCR, PER and ANPU compared to the control (without melamine). The decrease of growth response related with an increase in levels of melamine in the diets. Fish which were fed on experimental diets with the inclusion of melamine levels from 0.5% onwards showed symptoms such as retarded growth, paling and darkening, fin erosion, anorexia and inactive swimming. The survival of fish in melamine groups was significantly lower than that of the fish in control group. The chemical composition of the whole body in fish fed with higher amounts of melamine had less lipid contents compared to the lower melamine inclusions, while ash and protein contents were significantly higher. Furthermore, hematocrit and hemoglobin of fish fed on mlemine containing diets were significantly lower than that of the control, whereas there was no difference of Na^+, K^+ and Cl^- in blood among treatments. Histopathological alterations were evident in liver, kidney and gill of fish fed diets containing melamine and these alterations showed that the severe lesions were related to the melamine dosage in the diets. Interestingly, histological lesions in liver tissues from fishes fed melamine supplemented diets were more prominent than those observed in

kidneys. Compared with the livers of the control group, obvious lesions were present in the livers of fishes fed diets supplemented with all levels of melamine i.e. the vacuolization in hepatocytes as well as the finding of rounded-shape brown granules like bile pigment in liver and hepatopancreatic cells of fish fed on diets containing high dosages of melamine in the feed. An enlargement and degenerated of renal tubules was observed in the kidney of the fish fed with ≥ 1% of melamine in the feed whereas melamine crystals were not found in the kidneys of any fish. The most remarkable feature which appeared in the gill of fish fed diets containing melamine was epithelial hyperplasia of primary and secondary lamellae. Frequently, the anomalies found were considered to be at severe stage when fish fed on diets containing high dosages of melamine; these included blood congestion, lamellar disorganization and the detachment of respiratory epithelium from underlying tissues. Melamine concentration in fish flesh and viscera reflected the levels of melamine included in the diet, the content of which was higher in the viscera than in the fish flesh.

Keywords: melamine, sex-reversed red tilapia, liver, kidney, gill, histopathology

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและพัฒนาที่สนับสนุนเงินอุดหนุนวิจัยจากเงินรายได้วิทยาเขตหาดใหญ่ ประจำปี 2553 ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณดร.มะลิ บุณยรัตผลิน ที่ปรึกษา กรมประมงที่กรุณาให้คำปรึกษาและ ขอขอบคุณนายนัทท์ นันทพงศ์ที่ช่วยตรวจแก้ไขต้นฉบับให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	-2-
Abstract	-4-
กิตติกรรมประกาศ	-6-
สารบัญ	-7-
รายการตาราง	-9-
รายการภาพประกอบ	-11-
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 ตรวจเอกสาร	2
1.2.1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเมลามีน	2
1.2.2 เมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีน	3
1.2.3 กระบวนการผลิตเมลามีน	5
1.2.4 ความสำคัญของเมลามีนต่อภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม	7
1.2.5 พิษวิทยา เมทาบอลิซึม และกลไกการออกฤทธิ์ของเมลามีน	8
1.2.6 รายงานการปนเปื้อนเมลามีนในอาหารสัตว์	18
1.2.7 การตรวจสอบและการวิเคราะห์หาเมลามีนในตัวอย่าง	21
1.2.8 ปลานิลและปลานิลแดงแปลงเพศ	24
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	31
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	31
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา	32
2.1 วัสดุ	32
2.1.1 ปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้ในการทดลอง	32
2.1.2 สารเคมี	32
2.1.3 อาหารสำหรับอนุบาลปลาก่อนทำการทดลอง	32
2.2 อุปกรณ์	33

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	**หน้า**
2.3 วิธีการทดลอง	34
2.3.1 การเตรียมปลาทดลอง	34
2.3.2 การเตรียมอาหารทดลอง	34
2.3.3 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง	35
2.3.4 แผนการทดลอง	39
2.3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล	39
2.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	42
3. ผลการศึกษา	43
3.1 ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการสังเกตลักษณะภายนอกและพฤติกรรมของปลานิลแดงแปลงเพศในระหว่างการทดลอง	43
3.2 การเจริญเติบโต	48
3.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว	48
3.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	50
3.2.3 อัตรารอดตาย	51
3.2.4 ปริมาณอาหารที่ปลากินและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	54
3.2.5 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ	54
3.2.6 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา	58
3.2.7 องค์ประกอบเลือด	60
3.2.8 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลานิลแดงแปลงเพศ	62
3.2.9 ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวม	86
4. วิจารณ์ผลการศึกษา	87
5. สรุปผลการศึกษา	98
เอกสารอ้างอิง	100

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติและองค์ประกอบบางประการของเมลามีนและอนุพันธ์	4
2	รูปแบบการนำเมลามีนไปใช้ประโยชน์ในแต่ละพื้นที่ของโลก	7
3	การศึกษาความเป็นพิษของเมลามีนในหนูทดลองที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ	9
4	ระยะเวลาที่สุกรขับเมลามีนจากภายในตัวทิ้งภายหลังได้รับจนกระทั่งปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในตัวอยู่ในระดับที่ปลอดภัย	10
5	ผลของเมลามีนและกรดไซยานูริคในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการตกค้างในไก่ไข่	14
6	ผลการวิเคราะห์เมลามีนและอนุพันธ์ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์	20
7	เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เมลามีน	22-23
8	องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร (%as fed basis)	36
9	ส่วนประกอบและปริมาณของวัตถุดิบในอาหารทดลองแต่ละสูตร	37
10	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (%as fed basis)	38
11	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง	47
12	น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์	49
13	การเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์	52
14	ปริมาณอาหารที่กินและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์	56
15	องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์	59

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16.	องค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์	61
17	ความผิดปกติที่พบในแต่ละอวัยวะภายหลังปลาได้รับอาหารที่มีเมลามีนในระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	63
18	ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมของปลานิลแดงแปลงเพศภายหลังได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	86

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของเมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีน	4
2	ปฏิกิริยาสุทธิที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ยูเรียเป็นสารตั้งต้น	5
3	การเกิดปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ความร้อนและความดันสูง	6
4	การเกิดปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ความดันต่ำ	6
5	แสดงระยะเวลาที่สุกรขับเมลามีนจากภายในตัวทิ้งภายหลังได้รับเมลามีนปริมาณ 5.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	11
6	ผลึกของเมลามีนและกรดไซยานูริคที่พบในเนื้อเยื่อบริเวณท่อไตของสุกรที่ได้รับเมลามีนและกรดไซยานูริคที่ผสมกันในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	13
7	ลักษณะผลึกของเมลามีนที่พบในผู้ป่วย	16
8	ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 1	25
9	ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3	26
10	พ่อแม่พันธุ์ปลานิลแดงสายพันธุ์จากสถานีประมงน้ำจืดกำแพงเพชร	26
11	เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของตัวปลาในระหว่างการทดลอง	44
12	ลักษณะผิดปกติภายนอกที่พบในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน	45
13	รูปร่างและลักษณะภายนอกของปลาที่ได้รับอาหารทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	46
14	เปรียบเทียบน้ำหนักน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาในแต่ละชุดการทดลองกับน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	50

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	เปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8	53
16	เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8	53
17	เปรียบเทียบปริมาณอาหารทั้งหมดที่ปลากินตลอดระยะเวลาทดลอง 8 สัปดาห์	57
18	เปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8	57
19	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตรในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8	58
20	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์	64
21	เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์	64
22	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	65
23	เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	65
24	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	66
25	ลักษณะผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนและตับ ของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5% เป็นเวลา 8 สัปดาห์	67
26	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	68
27	เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของตับกับลักษณะเนื้อเยื่อที่ผิดปกติของปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนในระดับที่สูงกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	69
28	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	70
29	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	70
30	เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนสูงกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	71
31	การสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม เป็นเวลา 8 สัปดาห์	72
32	การสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	72

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

33. การสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับปลาภายหลังได้รับอาหารที่มีเมลามีนระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์และ 3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 73
34. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 74
35. เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 75
36. เนื้อเยื่อของไตปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 76
37. ความผิดปกติเนื้อเยื่อของไตปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ 76
38. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 77
39. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 77
40. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 77
41. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 78
42. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 77
43. เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 79
44. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 80
45. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 81
46. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 82
47. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 83
48. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 83
49. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 84
50. เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 84
51. เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 85

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

โปรตีนในอาหารสัตว์น้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดคุณภาพและราคาของอาหาร จากสถานการณ์ในปัจจุบันที่วัตถุดิบหลักที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์น้ำมีราคาสูงขึ้นและมีปริมาณที่ไม่เพียงพอกับความต้องการใช้เนื่องจากสาเหตุบางประการเช่น วัตถุดิบจากพืชที่เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารสัตว์น้ำบางชนิดเช่น กากถั่วเหลืองและข้าวโพดถูกนำไปใช้เพื่อผลิตเป็นพลังงานรองรับความต้องการด้านพลังงานทดแทน และปลาป่นซึ่งเป็นวัตถุดิบโปรตีนที่มีความสำคัญมากที่สุดมีปริมาณการผลิตที่ลดลงอย่างมากจากปัญหาความเสื่อมโทรมของระบบนิเวศและทรัพยากร จากปัญหาที่กล่าวมาส่งผลทำให้ราคาอาหารสัตว์น้ำมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (ณัฐชนก, 2552; FAO, 2006; Tacon and Metian, 2008; Wisner, 2009) จึงมีความพยายามที่จะลดต้นทุนในส่วนนี้ลงโดยใช้โปรตีนจากแหล่งอื่นที่มีราคาถูกกว่าทดแทน (El-Sayed,1999; Francis *et al*., 2001; Fasakin *et al*., 2005) แต่มีกลุ่มคนบางกลุ่มปลอมปนวัตถุดิบบางชนิดลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูงแต่สัตว์น้ำไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้การตรวจสอบการปลอมปนทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบหรืออาหารสัตว์จะวิเคราะห์ในรูปของไนโตรเจน ในตัวอย่างคูณด้วยค่าคงที่ จึงไม่สามารถบ่งบอกบ่งบอกคุณภาพของโปรตีนและการปลอมปนได้ (Wiles *et al*., 1998) ล่าสุดได้มีผู้ผลิตที่ผิดจรรยาบรรณทำการปลอมปนเมลามีนซึ่งเป็นสารประกอบในอุตสาหกรรมพลาสติกลงในอาหารสัตว์เพื่อหวังผลให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะเมลามีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยน้ำหนักสูงถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนจะสูงถึง 416.66 เปอร์เซ็นต์ (Baynes *et al*., 2008) อีกทั้งการตรวจวิเคราะห์เมลามีนที่ปลอมปนในตัวอย่างมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง (เยาวมาลย์, 2550ข; Anderson *et al*., 2007) วัตถุดิบที่ตรวจพบการปลอมปนได้แก่ ปลาป่น ข้าวโพดป่น รำ corn gluten wheat gluten โปรตีนจากข้าวและถั่วเหลือง (OECD, 2002) พบรายงานการปลอมปนเมลามีนลงในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ในประเทศต่างๆ มากกว่า 47 ประเทศ (Gossner *et al*., 2009) จากรายงานการสำรวจ

โรงงานผลิตอาหารสัตว์ที่ขึ้นทะเบียนต่อกรมปศุสัตว์ภายในประเทศของ ณัฐชนก (2552) จำนวน 41 โรงงาน ใน 14 จังหวัดได้แก่ กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรปราการ ชลบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบุรี นครปฐม ลำพูน เชียงใหม่ อุบลราชธานี และสงขลา พบว่าร้อยละ 47.8 พบการปนเปื้อนของเมลามีนในวัตถุดิบอาหาร แต่อยู่ในระดับที่ไม่น่าวิตกเพราะมีมาตรการตรวจสอบที่เข้มงวด อย่างไรก็ตามในต่างประเทศยังมีการตรวจพบรายงานการปลอมปนของเมลามีนอย่างต่อเนื่อง และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ในประเทศไทยส่วนใหญ่ก็มีการนำเข้าจากต่างประเทศ ความน่าจะเป็นที่จะมีวัตถุดิบที่มีการปลอมปนของเมลามีนเข้ามาภายในประเทศจึงยังคงมีอยู่

จากสถานการณ์การปนเปื้อนของเมลามีนในผลิตภัณฑ์อาหารทำให้องค์การต่างๆ ทั่วโลกติดตามและเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด ในประเทศไทยรายงานการศึกษาถึงพิษของเมลามีนในสัตว์น้ำยังค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ปลานิลแดงแปลงเพศเป็นปลาทดลอง เนื่องจากต้องการใช้เป็นตัวแทนของปลาในกลุ่มที่มีเกล็ด อีกทั้งปลาในกลุ่มปลานิลยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศและเป็นที่นิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลาย ประเทศไทยมีศักยภาพทั้งในด้านการผลิตและส่งออก ปริมาณการเลี้ยงปลานิลของประเทศมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 12 เปอร์เซ็นต์ต่อปี และประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นผู้รับซื้อปลานิลแหล่งใหญ่ที่สุดในโลกมีแนวโน้มที่จะสั่งนำเข้าปลานิลจากประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เพราะปลานิลจากประเทศไทยเป็นสินค้าที่มีคุณภาพและได้รับการยอมรับจากตลาดโลก จัดเป็นสินค้าเกษตรที่มีอนาคตและนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากมาย (เบญจมาศ, 2551; สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2552)

1.2 ตรวจเอกสาร

1.2.1 ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเมลามีน

เมลามีน (melamine, 2,4,6-amino-*s*-triazine, CAS No. 108-78-1) เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมเรซินและพลาสติก (NTP, 1983; IARC, 1999; Baynes *et al*., 2008) ในกระบวนการผลิตเมลามีนจะใช้ยูเรียเป็นสารตั้งต้นซึ่งผลผลิตที่ได้คือเมลามีน แอมโมเนีย และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (IARC, 1999) เมื่อนำเมลามีนมาทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ภายใต้สภาวะที่มีความร้อนและความดันสูงจะได้เมลามีนเรซิน (Melamine resin) ซึ่งเป็นพลาสติกที่มีความทนทาน (Clapp *et al*., 2007) เมลามีนถูกนำมาใช้ในการผลิตโฟมทำความสะอาดพื้นผิว วัสดุเคลือบผิว (laminate) แผ่นฟอร์ไมกา กาว จานชาม ไวท์บอร์ด สารกันความร้อน (flame retardants) ยาฆ่าแมลง (pesticides) ปุ๋ย และผลิตภัณฑ์อื่นๆ อีกมากมาย (Nemil *et al*., 2005; Zhang and Horrocks, 2005; Anderson *et al*., 2007) คุณลักษณะที่สำคัญของเมลามีนคือ มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว มี

น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 126.12 ดาลตัน ละลายน้ำได้น้อย ทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ดี มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยน้ำหนักประมาณ 66.67 เปอร์เซ็นต์ มีค่า pK_b เท่ากับ 9 และมีความเป็นขั้วเนื่องจากอิทธิพลของหมู่เอไมน์ (NH_2) ที่แขนทั้ง 3 ข้าง (ภาพที่ 1) (NTP, 1983 อ้างโดย Baynes *et al*., 2008) สลายตัวในดินได้ช้า (Shelton *et al*., 1997) และไม่มีพิษที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม (nongenotoxic) (Hack and Tyl, 1985) ที่สำคัญคือเมลามีนไม่ได้รับอนุญาตจากหน่วยงานอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US-FDA) ให้ใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในอาหารสัตว์ (WHO, 2009)

1.2.2 เมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีน

เมลามีนประกอบด้วยอนุพันธ์ได้แก่ ไตรคลอโรเมลามีน (Trichloromelamine) แอมมีลีน (ammeline) แอมมีไลด์ (ammelide) และกรดไซยานูริก (cyanuric acid) (WHO, 2009) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ไตรคลอโรเมลามีน (Trichloromelamine, CAS No. 7673-09-8) (ภาพที่ 1) เป็นอนุพันธ์หนึ่งของเมลามีน ถูกนำมาใช้ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารและอุปกรณ์เครื่องใช้ นอกจากนี้สำนักงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งประเทศสหรัฐอเมริกาหรือ Environmental Protection Agency (USEPA) อนุญาตให้ใช้ไตรคลอโรเมลามีนเป็นน้ำยาทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวผลิตภัณฑ์และใช้สำหรับการล้างผักและผลไม้ (WHO, 2009)

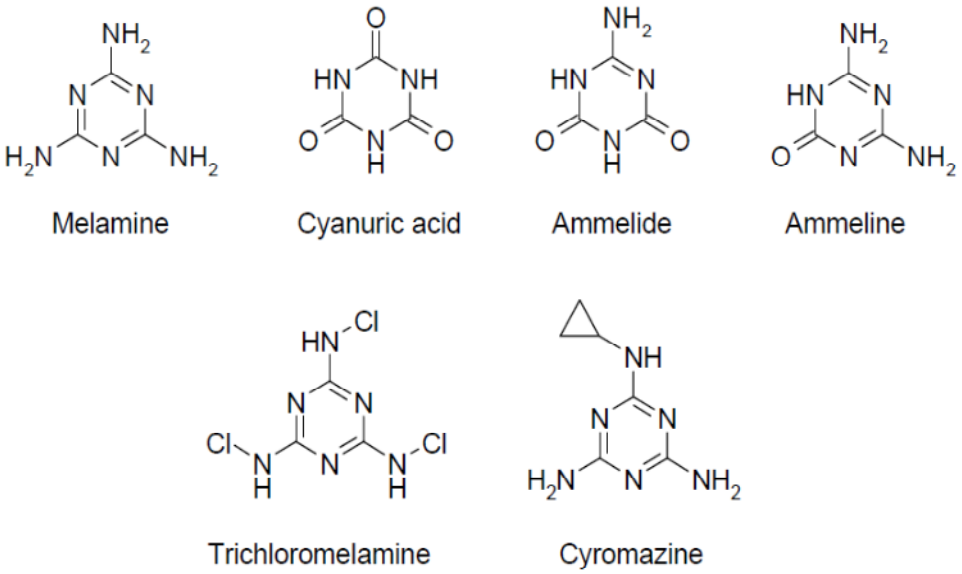
กรดไซยานูริค (cyanuric acid, CAS No. 108-80-5) (ภาพที่ 1) เป็นอนุพันธ์ตัวหนึ่งของเมลามีนซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนการสังเคราะห์เมลามีน ได้รับอนุญาตจากหน่วยงานอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US-FDA) ให้ใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องได้แก่ โค แกะ แพะ และวัวไบซัน เป็นต้น (Karbiwnyk *et al*., 2009) นอกจากนี้กรดไซยานูริคยังถูกใช้เป็นสารคงสภาพคลอรีนในสระว่ายน้ำ ช่วยลดการสูญเสียคลอรีนทำให้คลอรีนอยู่ในน้ำได้นานขึ้น (Burakevich, 1979 อ้างโดย Patel and Jones, 2007)

แอมมีไลด์ (ammelide, CAS No. 645-93-2) และแอมมีลีน (ammeline, CAS No. 645-92-1) (ภาพที่ 1) เป็นสารประกอบในกลุ่ม monoamino และ diaminooxytriazine เป็นอนุพันธ์ของเมลามีนซึ่งเกิดจากการย่อยสลายเมลามีนด้วยจุลินทรีย์ แอมมีลีนถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำมันหล่อลื่น ส่วนแอมมีไลด์ยังไม่พบรายงานการนำไปใช้ประโยชน์ (WHO, 2009)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติและองค์ประกอบบางประการของเมลามีนและอนุพันธ์

คุณสมบัติและองค์ประกอบ	เมลามีน	กรดไซยานูริก	แอมมิไลด์	แอมมิลีน
สูตรทางเคมี	$C_3H_6N_6$	$C_3H_3N_3O_3$	$C_3H_4N_4O_2$	$C_3H_5N_5O$
น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)	126.12	129.07	128.09	127.10
ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก)	66.6	32.6	43.7	55.1
ลักษณะ	ผงหรือผลึกละเอียดสีขาว	ผงหรือผลึกละเอียดสีขาว	ผงหรือผลึกละเอียดสีขาว	ผงหรือผลึกละเอียดสีขาว
สภาพการละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	3240	2000	76.9	75
PK_a	5.35 (25^0C)	4.74 (25^0C)	-	9.65 (40^0C)

ที่มา : WHO (2009)

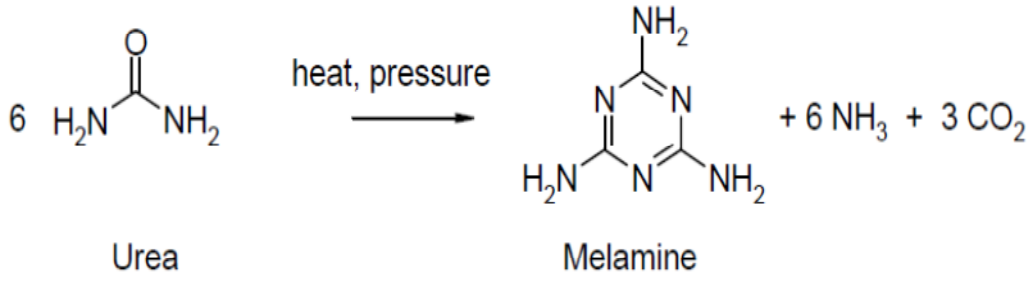


ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของเมลามีนและอนุพันธ์ของเมลามีน

ที่มา : WHO (2009)

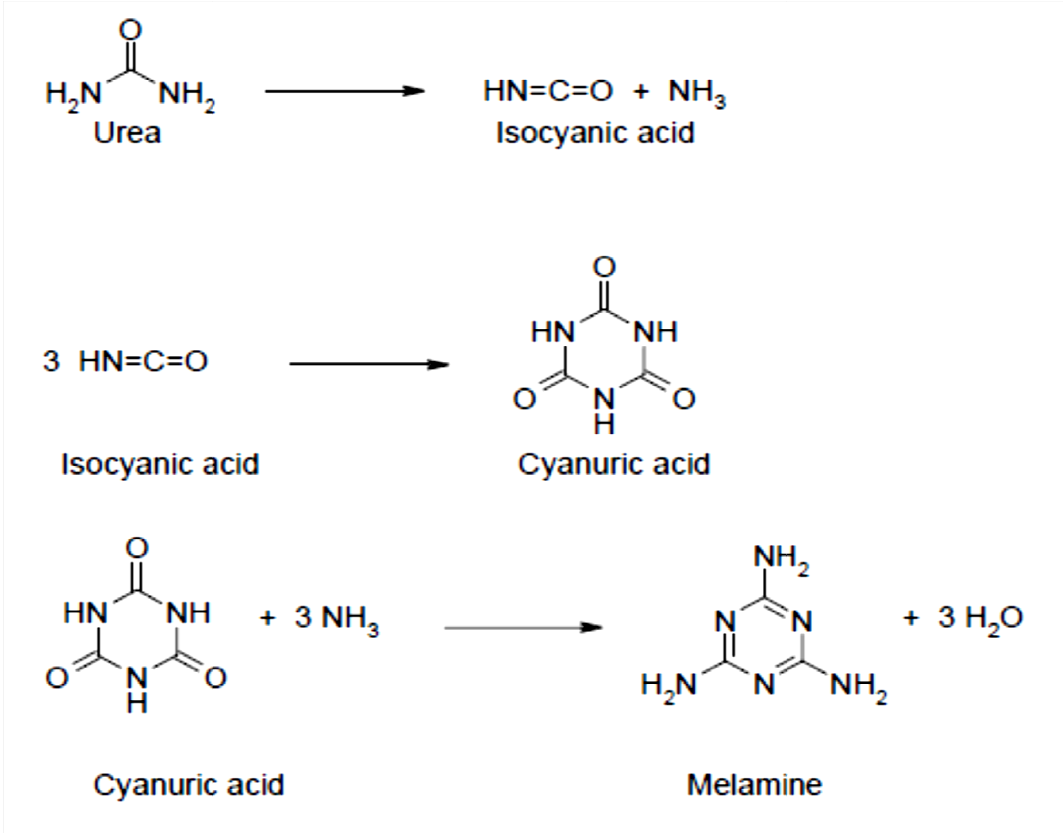
1.2.3 กระบวนการผลิตเมลามีน

เมลามีนสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นที่แตกต่างกันเช่น ยูเรีย dicyandiamide หรือ hydrogen cyanide แต่การผลิตในเชิงพาณิชย์นิยมใช้ยูเรียเป็นสารตั้งต้น (Maxwell, 2007; Bizzari and Yokose, 2008 อ้างโดย WHO, 2009) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเมลา-มีนดังนี้

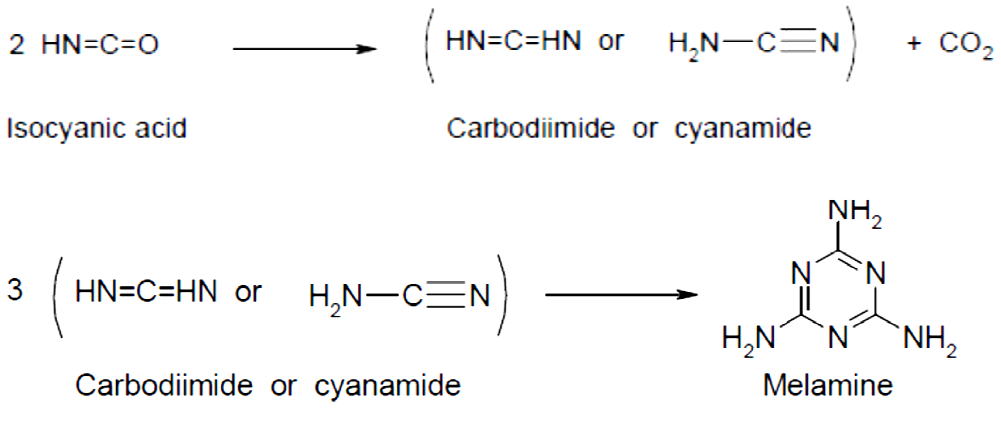


ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาสุทธิที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ยูเรียเป็นสารตั้งต้น
ที่มา : WHO (2009)

กระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ความร้อนและความดันสูง (อุณหภูมิ 380-450 องศา-เซลเซียส ความดัน 90-150 บาร์) ปฏิกิริยาจะเกิดในเฟสของเหลวโดยไม่จำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาเริ่มที่ยูเรียเปลี่ยนเป็น isocyanic acid จากนั้น isocyanic acid จะเกิดการปฏิกิริยา oligomerizes เปลี่ยนเป็น cyanuric acid และทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียได้เป็นเมลา-มีนและน้ำ (ภาพที่ 3) ส่วนกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ความดันต่ำ ปฏิกิริยาจะเกิดในเฟสก๊าซโดยมี aluminium oxide หรือ aluminosilicate ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 350-450 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาขั้นแรกยูเรียจะถูกเปลี่ยนเป็น isocyanic acid จากนั้น ในขั้นตอนที่สอง isocyanic acid จะเกิดปฏิกิริยากับตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็น cyanamide หรือ carbodiimide และเปลี่ยนเป็นเมลามีน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ความร้อนและความดันสูง
ที่มา : WHO (2009)



ภาพที่ 4 การเกิดปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมลามีนโดยใช้ความดันต่ำ
ที่มา : WHO (2009)

1.2.4 ความสำคัญของเมลามีนต่อภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม

ในปัจจุบันเมลามีนเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์มากมายหลายชนิด (Nemil *et al*., 2005; Zhang and Horrocks, 2005; Anderson *et al*., 2007) ในแต่ละภูมิภาคของโลกก็มีความต้องการและวัตถุประสงค์ของการใช้เมลามีนเพื่อผลิตเป็นสิ่งของในรูปแบบที่ต่างกัน (ตารางที่ 2) ทั่วโลกมีบริษัทที่ผลิตเมลามีนมากกว่า 90 บริษัท ประเทศจีนเป็นประเทศผู้ผลิตเมลามีนที่สำคัญของโลก มีบริษัทผู้ผลิตภายในประเทศกว่า 70 บริษัทที่สามารถผลิตเมลามีนออกสู่ตลาดโลกได้เพิ่มขึ้นทุกปี ส่วนใหญ่ส่งออกไปยังยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Bizzari and Yokose, 2008 อ้างโดย WHO, 2009) ปัจจุบันประเทศจีนได้ออกนโยบายกระตุ้นเศรษฐกิจ ตลอดจนมีการพัฒนาเทคโนโลยีและกฎระเบียบที่เคร่งครัดมากขึ้นในการผลิตเมลามีนเนื่องจากปัญหาการปลอมปนเมลามีนในอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์เมื่อปีค.ศ. 2008 จึงเป็นที่คาดการณ์ว่าอุตสาหกรรมเมลามีนของจีนจะมีอัตราการขยายตัวที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้ประเทศจีนยังคงเป็นฐานการผลิตเมลามีนที่สำคัญของโลกในปัจจุบัน และมีแนวโน้มว่าการแข่งขันของธุรกิจเมลามีนในตลาดโลกจะมีการแข่งขันระหว่างประเทศที่สูงมากในอนาคตเนื่องจากหลายประเทศให้ความสำคัญและทุ่มงบประมาณลงทุนในอุตสาหกรรมเมลามีนค่อนข้างสูง

ตารางที่ 2 รูปแบบการนำเมลามีนไปใช้ประโยชน์ในแต่ละพื้นที่ของโลก

การนำไปประยุกต์ใช้	การนำไปใช้ประโยชน์ (เปอร์เซ็นต์)			
	ยุโรปและแอฟริกา	อเมริกา	เอเชีย	ทั้งโลก
ลามิเนต	53	45	14	38
กาวและวัสดุยึดติด	24	5	50	30
ภาชนะพลาสติก	6	7	18	10
งานเคลือบผิววัตถุและผลิตภัณฑ์	7	22	11	11
งานถักทอ, เรซิน, คอนกรีตผสมเสร็จ, วัสดุทนความร้อน	10	21	7	11

ที่มา : FESYP (1998) อ้างโดย WHO (2009)

1.2.5 พิษวิทยา เมทาบอลิซึม และกลไกการออกฤทธิ์ของเมลามีน

มีรายงานการศึกษาถึงการเกิดพิษ เมทาบอลิซึม และกลไกการออกฤทธิ์ของเมลามีนในสัตว์หลายชนิดดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.2.5.1 รายงานการศึกษาในหนู

Mast และคณะ (1983) ศึกษากระบวนการเมทาบอลิซึม การแพร่กระจาย และการขับถ่ายของเมลามีนในหนู Fischer 344 เพศผู้ โดยให้เมลามีนที่ติดฉลากด้วยคาร์บอน 14 [^{14}C] ทางปาก (single oral dose) ในขนาด 0.38 มิลลิกรัม และทำการตรวจวัดเมลามีนในตัวหนูภายหลังได้รับ พบว่า เมลามีนจะมีความเข้มข้นสูงสุดในกระแสเลือดหลังจากกินเข้าไป 1 ชั่วโมง และเมลามีนจะแพร่กระจายผ่านทางระบบสารน้ำเข้าสู่อวัยวะต่างๆ ไตและกระเพาะปัสสาวะจะมีความเข้มข้นของเมลามีนมากที่สุด ส่วนในเลือด พลาสมา และตับพบเพียงเล็กน้อย ภายใน 24 ชั่วโมง 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ได้รับจะถูกขับออกทางปัสสาวะ ส่วนที่เหลือถูกขับออกทางลมหายใจและอุจจาระ ทั้งนี้เมลามีนที่ถูกขับทิ้งยังคงมีโครงสร้างและความบริสุทธิ์ที่ใกล้เคียงกับตอนที่ได้รับ (97-100 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าหนู Fischer 344 ไม่สามารถ metabolize เมลามีนได้หรืออีกนัยหนึ่งคือเมลามีนจะไม่มีการเปลี่ยนรูปเป็นสารตัวอื่นเมื่อเข้าสู่ตัวหนู ค่าครึ่งชีวิตของเมลามีนในกระแสเลือดและปัสสาวะของหนู Fischer 344 มีค่าใกล้เคียงกันคือ 2.7 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ

การศึกษาความเป็นพิษของเมลามีนในหนูทดลองที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ รายละเอียดดังตารางที่ 3 จากรายงานค่า lethal dose (LD_{50}) ในหนูมีค่าเท่ากับ 3,161 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และค่า no-observed-adverse-effect-levels (NOAELs) ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารเคมีที่มากที่สุดซึ่งได้รับทุกวันแล้วไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษหรือผลเสีย (adverse effects) ใดๆ ต่อร่างกาย (สุเทพ, 2551) อยู่ที่ 63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (ระยะเวลาทดลอง 13 สัปดาห์ ได้รับโดยการกิน) 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (ระยะเวลาทดลอง 28 วัน ได้รับโดยการกิน) 417 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (ระยะเวลาทดลอง 28 วัน ได้รับโดยการกิน) (US-FDA, 2007) Hack และ Tyl (1985) รายงานว่า เมลามีนทำให้เกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะของหนูได้ โดยหนูวัยอ่อนที่เพิ่งหย่านมมีโอกาสที่จะเกิดนิ่วสูงกว่าหนูตัวเต็มวัยเนื่องจากระบบการขับถ่ายของเสียของหนูวัยอ่อนยังไม่มีประสิทธิภาพมากพอที่จะขับเมลามีนทิ้งได้ สอดคล้องกับเหตุการณ์การปนเปื้อนของเมลามีนในนมสำหรับเลี้ยงเด็กในประเทศจีนซึ่งเป็นสาเหตุให้เด็กเสียชีวิต และล้มป่วยเป็นจำนวนมากนั้น เนื่องจากนมเป็นอาหารหลักสำหรับเด็กในวัยนี้และต้องบริโภคในแต่ละวันในปริมาณมากอีกทั้งระบบอวัยวะต่างๆ รวมทั้งระบบขับถ่ายและกำจัดของเสียยังพัฒนาไม่เต็มที่ (Chan *et al*., 2008)

ตารางที่ 3 การศึกษาความเป็นพิษของเมลามีนในหนูทดลองที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาทดลอง	สัตว์ทดลอง : ความเข้มข้นของเมลามีนที่ได้รับ	ความผิดปกติของสัตว์ทดลอง
ได้รับทางปากเพียงครั้งเดียว (Single dose study)	Male และ female rats : 2,150, 3,160, 4,640, 6,810, และ 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยผสมเมลามีนลงในน้ำมันข้าวโพดแล้วกรอกปากผ่านทางท่อ Male mice : 1,470, 2,150, 3,160, 4,640, 6,810, 10,000 และ 14,700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยผสมเมลามีนลงในน้ำมันข้าวโพดแล้วกรอกปากผ่านทางท่อ	หนูทดลองทั้ง 2 ชนิด (rats และ mice) ที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 6,810 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ตายทั้งหมด พบผลึกสีขาวในระบบทางเดินอาหารของหนูทดลองทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเมลามีนในทุกระดับความเข้มข้น โดยจะพบมากเมื่อระดับของเมลามีนที่ได้รับเพิ่มสูงขึ้น
14 วัน	Rats: 0, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000, และ 30,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร Mice: 0, 5,000, 7,500, 10,000, 12,500, 15,000, และ 30,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร โดยให้กินจนอิ่ม	ไม่พบการตายในหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนทุกระดับ แต่พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวในชุดควบคุม (ไม่ใส่เมลามีน) นอกจากนี้ยังตรวจพบผลึกสีขาวในกระเพาะปัสสาวะและไตในหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
13 สัปดาห์	การทดลองที่ 1 (rats and mice): 0, 6,000, 9,000, 12,000, 15,000, และ 18,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร การทดลองที่ 2 : 0, 10,000, และ 18,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร; 0, 10,000 และ18,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร + 1 % ammonium chloride ในน้ำดื่ม (เฉพาะ rats)	การทดลองที่ 1 หนูทดลองทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเมลามีน 18,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการกินอาหารลดลง 10-20 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบก้อนแข็งที่มีลักษณะคล้ายผลึกในกระเพาะปัสสาวะ การทดลองที่ 2 หนูทดลองทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเมลามีน 18,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม + 1% ammonium chloride ในน้ำดื่ม มีน้ำหนักตัวและอัตราการกินอาหารลดลง นอกจากนี้ยังตรวจพบก้อนแข็งที่มีลักษณะคล้ายผลึกในกระเพาะปัสสาวะ แต่หนูทดลองที่ได้รับอาหารที่ไม่ใส่เมลามีน + 1% ammonium chloride ในน้ำดื่ม ไม่พบลักษณะผิดปกติ
2 ปี	Female rats : 0, 4,500 และ 9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร Male rats, male และ female mice: 0, 2,250, และ 4,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหาร โดยให้กินจนอิ่ม	ในสัปดาห์ที่ 20 เป็นต้นไปพบว่า น้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนลดลง อัตราการกินอาหารลดลง 2-3 เปอร์เซ็นต์ ในหนูทดลองที่ได้รับเมลามีนเกินกว่า 4,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารตรวจพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อในส่วนของไตและกระเพาะปัสสาวะ

ที่มา : NTP (1983)

1.2.5.2 รายงานการศึกษาในลิง

Liu และคณะ (2010) รายงานกลไกการออกฤทธิ์ของเมลามีนใน rhesus monkey (*Macaca mulatta*) อายุ 4 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 5.77 กิโลกรัมที่ได้รับเมลามีนโดยการกินเพียงครั้งเดียวในปริมาณ 1.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวพบว่า ค่าครึ่งชีวิตของเมลามีนในพลาสมาภายหลังได้รับเมลามีนมีค่าเท่ากับ 4.41 ชั่วโมง โดยเมลามีนที่ rhesus monkey ได้รับจะเข้าสู่กระแสเลือดอย่างรวดเร็วและถูกขับออกจากกระแสเลือดอย่างรวดเร็วเช่นกัน ภายหลังได้รับเมลามีนโดยการกินเมลามีนส่วนใหญ่จะถูกขับทิ้งออกทางปัสสาวะภายหลังได้รับ

ในการทดลองครั้งนี้ยังได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างเมลามีนและกรดไซยานูริคซึ่งเป็นอนุพันธ์รูปแบบหนึ่งของเมลามีน จากการตรวจวัดปริมาณของกรดไซยานูริคในเลือดของลิงก่อนและหลังได้รับเมลามีนพบว่า ปริมาณของเมลามีนที่ลิงได้รับผ่านการกินไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไซยานูริค หรืออาจกล่าวได้ว่าเมลามีนจะไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไซยานูริคในร่างกายของสิ่งมีชีวิต

1.2.5.3 รายงานการศึกษาในสุกร

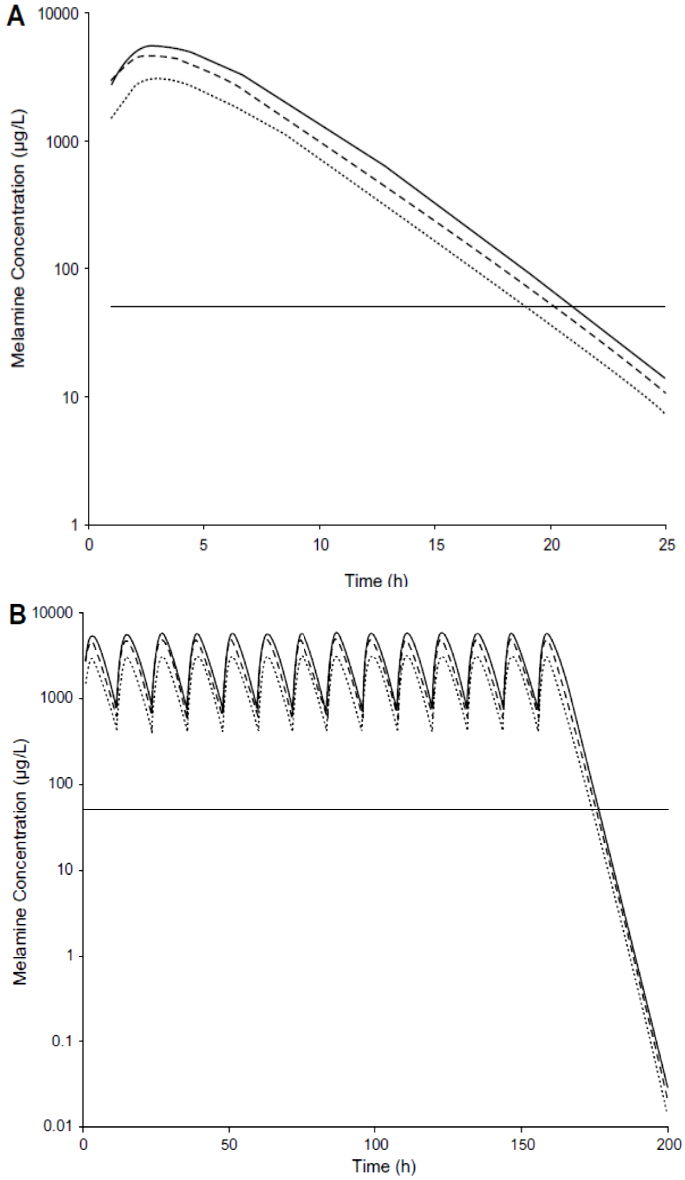
Buur และคณะ (2008) รายงานระยะเวลาที่สุกรขับเมลามีนจากภายในตัวทิ้งภายหลังได้รับจนกระทั่งปริมาณเมลามีนที่ตกค้างภายในตัวอยู่ในระดับที่ปลอดภัย (ระดับที่ปลอดภัยคือระดับที่เมลามีนตกค้างในไตไม่เกิน 50 ppb) รายละเอียดดังตารางที่ 4 และภาพที่ 5

ตารางที่ 4 ระยะเวลาที่สุกรขับเมลามีนจากภายในตัวทิ้งภายหลังได้รับจนกระทั่งปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในตัวอยู่ในระดับที่ปลอดภัย

ปริมาณเมลามีนที่ได้รับ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	รูปแบบการได้รับ	ระยะเวลาที่ขับทิ้งจนอยู่ในระดับที่ปลอดภัย (ชั่วโมง)
3.3	ได้รับเพียงครั้งเดียว	19.2
	ต่อเนื่อง 7 วันๆ ละ 2 ครั้ง	20.0*
5.12	ได้รับเพียงครั้งเดียว	20.9
	ต่อเนื่อง 7 วันๆ ละ 2 ครั้ง	21.3*

ที่มา : Buur และคณะ (2008)

*ระยะเวลาที่รายงานเริ่มนับภายหลังได้รับเมลามีนครั้งที่ 2 ของวันที่ 7 จนกระทั่งปริมาณเมลามีนอยู่ในระดับที่ปลอดภัย



ภาพที่ 5 แสดงระยะเวลาที่สุกรขับ เมลามีนจากภายในตัวทิ้งภายหลังได้รับเมลามีนปริมาณ 5.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

(A) ได้รับเพียงครั้งเดียว

(B) ได้รับต่อเนื่อง 7 วันๆ ละ 2 ครั้ง

เส้นทึบหนา : ปริมาณเมลามีนในไต

เส้นประ : ปริมาณเมลามีนในตับ

เส้นจุดไข่ปลา : ปริมาณเมลามีนในพลาสมา

เส้นทึบบาง : ระดับที่ปลอดภัย

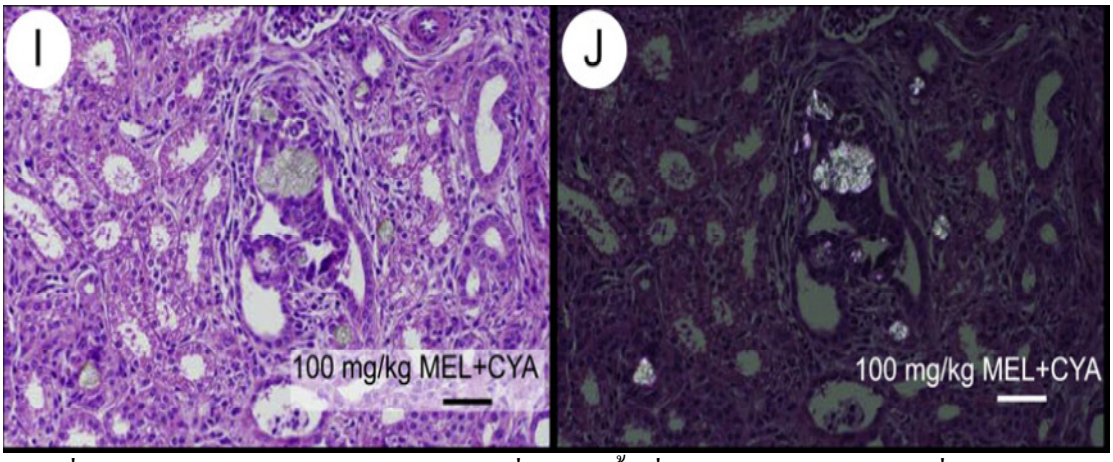
ที่มา : Buur และคณะ (2008)

จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเมื่อสุกรได้รับเมลามีนในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นในรูปแบบการได้รับเดียวกัน ระยะเวลาที่ร่างกายใช้ในการขับทิ้งจะนานเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ทางผู้เขียนได้จำลองรูปแบบเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics model) ของเมลามีนเมื่อเข้าสู่ตัวสุกรผ่านการกินพบว่า เมื่อเมลามีนเข้าสู่กระเพาะอาหารการส่งผ่านต่อไปยังลำไส้เล็กจะถูกควบคุมโดย gastric emptying time (gastric emptying time คือช่วงเวลาตั้งแต่กระเพาะอาหารส่งอาหารและน้ำย่อยที่คลุกเคล้ากันออกจากกระเพาะอาหารไปสู่ลำไส้เล็กตอนต้นได้หมด) และจะถูกดูดซึมจากลำไส้เล็กไปยังตับในอัตราคงที่ จากนั้นจะถูกส่งต่อไปยังไตเพื่อขับออกสู่ร่างกาย

การที่เมลามีนสามารถผ่านและแพร่กระจายไปตามอวัยวะภายในต่างๆ ภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตได้นั้น Sugita และคณะ (1991) อ้างโดย Buur และคณะ (2008) รายงานว่าเมลามีนมีค่า octanol:water partition coefficient ($logP_{ow}$) เท่ากับ -2.03 (ค่า $logP_{ow}$ คือค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอล ซึ่งชั้นออกทานอลเป็นตัวแทนของไขมันหรือสภาพที่ไม่มีขั้ว ถ้าค่าเป็นลบแสดงว่ากระจายตัวและแพร่ไปได้ดีในน้ำ (hydrophilic) ถ้าค่าเป็นบวกแสดงว่ากระจายตัวและแพร่ไปได้ดีในไขมันหรือสภาพไม่มีขั้ว (lipophilic) ตัวอย่างเช่น Acetamide มีค่า $logP_{ow}$ เท่ากับ -1.16 จึงกระจายตัวและแพร่ไปได้ดีในน้ำ ส่วน 2,2',4,4',5-Pentachlorobiphenyl มีค่า $logP_{ow}$ เท่ากับ 6.41จึงกระจายตัวและแพร่ไปได้ดีในไขมัน) จากการที่เมลามีนมีสภาพความเป็นขั้วสูง(ค่า $logP_{ow}$ เท่ากับ -2.03) เนื่องจากอิทธิพลของหมู่เอไมน์ (NH_2) ที่แขนทั้ง 3 ข้าง (ภาพที่ 1) จึงส่งผลให้เมลามีนสามารถแพร่กระจายไปในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ดีผ่านทางระบบสารน้ำ

จากการทดลองของ Stine และคณะ (2011) โดยให้สุกรกินเมลามีนและกรดไซยานูริคที่ผสมกันในอัตราส่วนแต่ละชนิดเท่ากับ 0, 1, 3.3, 10, 33 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน และเมลามีนและกรดไซนานูริคแยกกันที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน โดยให้กินต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่าเกิดผลึกที่เกิดจากเมลามีนและกรดไซยานูริค (melamine-cyanurate crystals) ในเนื้อเยื่อไตส่วน renal medulla และ cortex โดยผลึกจะไปอุดอยู่บริเวณท่อไต (renal tubule) (ภาพที่ 6) ซึ่งอาการผิดปกติดังกล่าวจะพบในสุกรที่ได้รับเมลามีนและกรดไซนานูริคผสมที่ความเข้มข้นแต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวขึ้นไป

ในส่วนการทดลอง 28 วันโดยให้สุกรกินเมลามีนและกรดไซยานูริคที่ผสมกันในอัตราส่วนแต่ละชนิดเท่ากับ 0, 1 และ 3.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก และเมลามีนที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน พบผลึกที่เกิดจากเมลามีนและกรดไซยานูริคในเนื้อเยื่อไตเมื่อได้รับสารทั้งสองที่ระดับ 3.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก ส่วนสุกรที่ได้รับเมลา-มีนที่ความเข้มข้นชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันไม่พบผลึกเกิดขึ้นในส่วนของเนื้อเยื่อไต จากการทดลองครั้งนี้พบว่าค่า NOAEL ของเมลามีนและกรดไซยานูริคในสุกรมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ซึ่งเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเมลามีนและ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของกรดไซยานูริคในอาหารตามลำดับ



ภาพที่ 6 ผลึกของเมลามีนและกรดไซยานูริคที่พบในเนื้อเยื่อบริเวณท่อไตของสุกรที่ได้รับเมลา-มีนและกรดไซยานูริคที่ผสมกันในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพทางซ้ายถ่ายด้วยแสงธรรมดา ภาพทางขวาถ่ายด้วยแสง polarized) (Ethanol fixation; H&E; bars = 50 µm).
ที่มา : ดัดแปลงจาก Stine และคณะ (2011)

1.2.5.4 รายงานในสัตว์ปีก

อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ของแอฟริกาใต้ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของเมลามีนใน วัตถุดิบที่ใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมเช่น maize gluten ถั่วเหลือง ปลาป่น wheat gluten และ rice protein (CBC News, 2007; Weise *et al*., 2007) Basson (2011) ศึกษาผลของเมลามีนและกรดไซยานูริคในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการตกค้างในไก่ไข่โดยใช้อาหารทดลอง 5 สูตร สูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุมที่ไม่ใส่เมลามีน สูตรที่ 2-4 มีเมลามีน (Sigma-Aldrich M2659) 50, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสูตรที่ 5 มีกรดไซยานูริค 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยไก่ไข่จะได้รับอาหารที่มีเมลามีนและกรดไซยานูริคดังรายละเอียดข้างต้นเป็นเวลา 10 วันหลังจากนั้นจะให้อาหารสูตรควบคุมที่ไม่มีเมลามีนและกรดไซยานูริคต่อไปอีก 10 วัน รวมระยะเวลาทดลอง 20 วัน ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของเมลามีนและกรดไซยานูริคในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการตกค้างในไก่ไข่

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	อาหารทดลองแต่ละสูตร (ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)				
	สูตรควบคุม	เมลามีน 50	เมลามีน 100	เมลามีน 500	กรดไซยานูริค 4
การเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยจาก 6 คอกในแต่ละชุดการทดลอง)					
วันที่ 1	7.8	7.8	7.6	7.7	7.9
วันที่ 20	7.4	7.4	7.4	7.5	7.5
การกินอาหาร (กิโลกรัม)					
วันที่ 1-10	4.3	4.5	4.7	4.2	4.6
วันที่ 10-20	3.4	3.6	3.6	3.5	3.6
น้ำหนักไข่เฉลี่ยในช่วง 20 วัน (กรัม)					
วันที่ 1-20	53.1	53.7	53	52.5	53.1
ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในไข่(ค่าเฉลี่ยจาก 6 คอกในแต่ละชุดการทดลอง)					
วันที่ 4	ND	2.8±1.5	3.7 ±0.5	16.7±2.8	-
วันที่ 7	ND	1.5±0.2	3.2±0.5	12.9±1.4	-
วันที่ 10	ND	0.8±0.4	2.3±1.2	9.0 ± 2.9	-
วันที่ 12	ND	0.1 ±0.02	0.5±0.08	0.9 ± 4.1	-
วันที่ 16	ND	0.04±0.02	0.02±0.01	0.04±0.01	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Basson (2011) ND = Not detected

จากตารางที่ 5 จะพบว่าเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้นการเจริญเติบโต การกินอาหารและน้ำหนักของไข่จะมีค่าลดลง ส่วนปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในไข่จะมีค่าค่อนข้างคงที่และลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 10 ของการทดลองที่หยุดให้อาหารที่มีเมลามีน ปริมาณเมลา-มีนที่ตกค้างในไข่ก็มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง Bai และคณะ (2010) ศึกษาการตกค้างของเมลามีนในไข่เมื่อไก่ไข่ได้รับเมลามีนที่ระดับ 0, 100, 250, 500, 1000 และ 2000 มก./กก. เป็นเวลา 34 วัน พบว่าระดับของเมลามีนในไข่มีค่าอยู่ในช่วง 1.6-28.7 มก./กก. ในทุกชุดการทดลองในวันที่ 4 ภายหลังได้รับเมลามีน และจะคงที่อยู่ในระดับนี้ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก สอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2010) ที่รายงานว่าเมลามีนที่ตกค้างในไข่จะค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 15 วันแรกหลังจากได้รับ

1.2.5.5 รายงานการศึกษาในมนุษย์

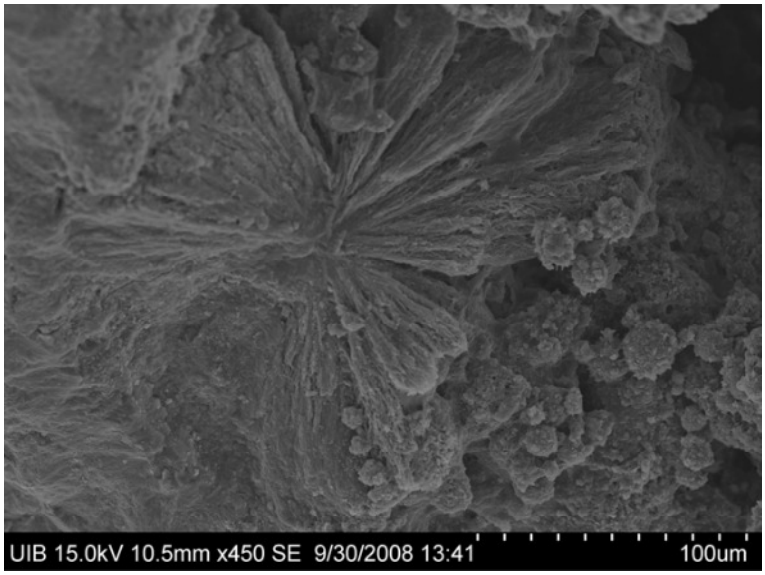
พิษของเมลามีนในมนุษย์หากสูดดมหรือสัมผัสที่ผิวหนังจะมีผลให้เกิดการอักเสบและระคายเคือง การได้รับเมลามีนจากการบริโภคต่อเนื่องเป็นเวลานานส่งผลให้ระบบสืบพันธุ์ถูกทำลาย เกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะหรือไต เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) และเสียชีวิตได้ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเมลามีนเป็นสารก่อมะเร็งหรือเนื้องอก (carcinogenesis) จากรายงานของ HSDB (2007) ยืนยันว่า เมลามีนไม่จัดว่า เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) ในมนุษย์

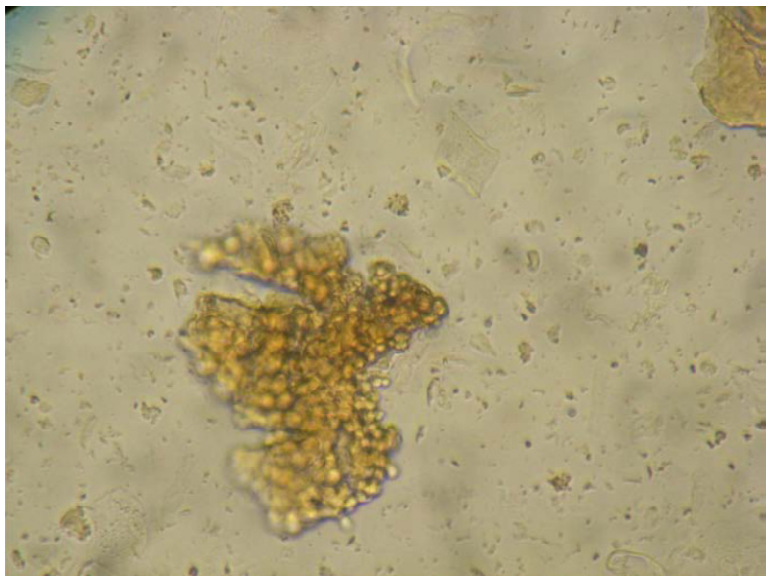
Zhou และคณะ (2010) รายงานว่าจากการเก็บเลือดและปัสสาวะของเด็กทารกที่ได้รับนมที่ปนเปื้อนเมลามีนพบว่าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้แก่ immunoglobulin M ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระดับของ $CD3^{+}$, $CD4^{+}$ มีความผิดปกติโดยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเด็กที่ไม่ได้รับนมที่ปนเปื้อน และยังพบอาการ leukocyturia ซึ่งเป็นอาการที่มีเม็ดเลือดขาวออกมามากในปัสสาวะ แสดงว่ามีการอักเสบติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ

He และคณะ (2009) รายงานอาการป่วยในเด็กที่ได้รับนมที่ปนเปื้อนเมลามีนจำนวน 15,577 คนซึ่งมีอายุเฉลี่ย 22 เดือน พบนิ่วในเด็กจำนวน 562 คนคิดเป็น 3.6 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเด็กที่เข้ารับการรักษาตัวทั้งหมด จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคอัลตร้าซาวด์ (Ultrasonographic) ผลึกที่เกิดจากเมลามีนจะต่างจากผลึกที่เกิดจาก calcium oxalate ซึ่งเป็นเป็นนิ่วที่พบได้บ่อยที่สุด

Guan และคณะ (2009) รายงานว่าเด็กทารกที่ตรวจพบผลึกของเมลามีนในไตจากการได้รับนมที่ปนเปื้อนเมลามีน จะมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด (hematuria) และพบเม็ดเลือดขาวปนออกมากับปัสสาวะ (leukocyturia) ซึ่งเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของโกลเมอรูลัสที่ทำหน้าที่กรองของเสียออกจากร่างกาย แต่องค์ประกอบเลือดได้แก่ creatinine urea nitrogen และกิจกรรมของเอนไซม์ alanine aminotransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่บ่งชี้การทำงานของตับยังคงเป็นปกติ

Panfeng และคณะ (2011) รายงาน case study ของการรักษาเด็กจำนวน 619 คน โดยเด็กจำนวน 577 คนได้รับการรักษาแบบประคับประคอง (conservative treatment) (เป็นการรักษาการทำหน้าที่ของอวัยวะในระบบทางเดินปัสสาวะให้เป็นปกติ หลักการรักษาคือ การดื่มน้ำอย่างน้อยวันละ 3 ลิตร จำกัดอาหารที่มีกรดยูริกหรือแคลเซียมสูง ให้ยาแก้ปวดและยาปฏิชีวนะหากมีการติดเชื้อเป็นต้น) ซึ่งมีเด็กหายจากอาการป่วย 454 คน คิดเป็น 78.7 เปอร์เซ็นต์ วิธีที่ 2 คือการรักษาโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงสลายนิ่วให้แตกเป็นอนุภาคเล็กๆ มีเด็กหายจากอาการป่วย 61 คนจาก 81 คนคิดเป็น 75.3 เปอร์เซ็นต์





ภาพที่ 7 ลักษณะผลึกของเมลามีนที่พบในผู้ป่วย ภาพซ้ายบนแสดง melamine-uric acid crystals ที่พบในเด็กหญิงชาวจีนที่ได้รับนมที่ปนเปื้อนเมลามีน ภาพขวาบนแสดงผลึกจากการถ่ายด้วย scanning electron microscopy (Grases *et al*., 2009) ภาพขวาล่าง แสดงผลึกของเมลามีนที่พบในผู้ป่วยจากการตรวจด้วยกล้อง light microscopy (Lam *et al*., 2009)

1.2.5.6 รายงานการศึกษาในสัตว์น้ำ

ความเป็นพิษของเมลามีนในสัตว์น้ำ จากรายงานของเยาวมาลย์ (2550ก) พบว่า ปลาดุกที่ได้รับอาหารที่มีการปลอมปนเมลามีน ผิวหนังจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ในปลานิลเกล็ดจะหลุดลอก เกล็ดที่ขึ้นทดแทนจะมีลักษณะอ่อน ในกุ้งหัวจะโตผิดปกติและพบจุดขาว ลำตัวบวม เมื่อผ่าดูอวัยวะภายในพบว่า ลำไส้และระบบสืบพันธุ์มีลักษณะโป่งพองผิดปกติ และสังเกตเห็นผลึกในส่วนของระบบสืบพันธุ์

ปวีณา และคณะ (2552) รายงานความผิดปกติของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับเมลามีนในอาหารที่ระดับ 0.5-3 เปอร์เซ็นต์ พบความผิดปกติที่เกิดขึ้นทั้งในด้านการเจริญเติบโต ลักษณะภายนอก และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ โดยปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนเริ่มมีน้ำหนักต่างจากปลาที่ได้รับอาหารควบคุมที่ไม่ใส่เมลามีนตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งน้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีค่ามากกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีนสูงสุด (3 เปอร์เซ็นต์) ถึง 20 กรัม และพบความผิดปกติของลักษณะภายนอกที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนคือ ลำตัวมีสีดำคล้ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อพบว่าบริเวณเหงือกเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากผิดปกติ (hyperplasia) มีการแยกตัวของ epithelial cell ของ secondary lamellae เนื้อเยื่อตับพบการเสื่อมสลายของเซลล์ตับบางส่วนทำให้เซลล์ไม่เกาะตัวกัน มีการตายของเซลล์ตับ ลักษณะเนื้อเยื่อไตมีการเสื่อมสลายของ epithelial cell บริเวณท่อไต มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (glomerrulus) และจากการทดลองพบว่าระดับของเมลามีนในอาหารมีความสัมพันธ์ต่อการตกค้างของเมลามีนในเนื้อปลาดุกพันธุ์ผสม โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 0.5 -3 เปอร์เซ็นต์ มีสารเมลามีนตกค้างในเนื้ออยู่ระหว่าง 63-450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อปลา

ชลอ และคณะ (2552) รายงานความผิดปกติของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของเมลามีนและกรดไซยานูริคจากปลาป่นและกลูเต้นจากแป้งสาลี โดยอาหารจะมีเมลามีน ระหว่าง 100-120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีกรดไซยานูริคประมาณ 80-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับกลุ่มควมคุมใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมผลิตจากบริษัทที่มีมาตรฐานสูงและผ่านการวิเคราะห์ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเมลามีนและกรดไซยานูริค จากการทดลองพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนพบความผิดปกติที่สังเกตได้จากภายนอกเช่น หัวบวม โตกว่าปกติ การเจริญเติบโตลดลง มีจุดหรือส่วนที่มีสีขาวในส่วนของตับและตับอ่อนซึ่งไม่ใช่เนื้อเยื่อปกติของกุ้ง เมื่อทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบผลึกจำนวนมากใน antennal gland จะไปอุดตันระบบการขับถ่ายของเสีย และส่งผลให้กุ้งมีลักษณะส่วนหัวบวมโต

1.2.6 รายงานการปนเปื้อนเมลามีนในอาหารสัตว์

จากรายงานในปีพ.ศ. 2550 พบการปนเปื้อนของเมลามีนในอาหารสัตว์เลี้ยงเป็นสาเหตุการตายของสุนัขและแมวเป็นจำนวนมากในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ทำให้ต้องเรียกคืนอาหารสัตว์เลี้ยงหลายรายการเพื่อตรวจสอบและทำลาย โดยเมลามีนที่พบในอาหารปนเปื้อนมากับโปรตีนจากแป้งสาลีที่นำเข้ามาจากประเทศจีน (Burns, 2007a,b; Bhalla *et al.*, 2009; Heiene *et al.*, 2009) สำหรับสถานการณ์การปนเปื้อนในอาหารสัตว์เลี้ยงของประเทศไทย ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคงและคณะ (2552) รายงานการตรวจหาสารเมลามีนปนเปื้อนในอาหารสัตว์เลี้ยงสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับสุนัขและแมว จำนวน 71 ตัวอย่าง จาก 3 แหล่งที่มาคือ อาหารราคาแพงที่นำเข้าจากต่างประเทศ 28 ตัวอย่าง อาหารราคาปานกลางที่นำเข้าจากต่างประเทศและผลิตภายในประเทศ 23 ตัวอย่าง และอาหารราคาถูกชนิดตักแบ่งขายผลิตภายในประเทศ 20 ตัวอย่าง จากการสำรวจและวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี ELISA พบว่าอาหารทั้ง 3 แหล่งมีการปนเปื้อนเมลามีนในระดับ 2.5-10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งอาหารที่มีการปนเปื้อนเมลามีนในระดับ 7.5-10 ppm ส่วนใหญ่จะพบมากในอาหารกลุ่มราคาแพงที่นำเข้าจากต่างประเทศ

จากรายงานพบการปนเปื้อนของเมลามีนในวัตถุดิบอาหารได้แก่ โปรตีนจากแป้งสาลี (wheat gluten) โปรตีนจากแป้งข้าวโพด (corn gluten) และโปรตีนจากข้าวเข้มข้น (rice protein concentrate) ซึ่งนำเข้ามาจากประเทศจีน และเมื่อขยายผลเพิ่มเติมก็พบการปนเปื้อนของเมลามีนในวัตถุดิบอาหารสำหรับสัตว์อีกหลายประเภท ทำให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องในหลายประเทศมีมาตรการเฝ้าระวังวัตถุดิบที่คาดว่าจะมีการปลอมปนได้แก่ โปรตีนจากแป้งสาลี โปรตีนจากแป้งข้าวโพด ข้าวโพดป่น กากถั่วเหลือง รำข้าว และโปรตีนจากข้าวเข้มข้น (Squadrone *et al.*, 2010) รายงานการตรวจสอบวัตถุดิบอาหารสัตว์ในประเทศในปีพ.ศ. 2550 ของสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ พบรายงานการปนเปื้อนของเมลามีนในวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้แก่ ตับหมึกป่นจากประเทศจีนและเกาหลีใต้ ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 15.18-736.36 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แป้งสาลีจากประเทศสิงคโปร์ปริมาณที่พบเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โปรตีนจากแป้งข้าวโพดจากประเทศสหรัฐอเมริกาปริมาณที่พบเท่ากับ 11.97 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อาหารกุ้งวัยอ่อนปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 178.32-242.36 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สรุปในช่วงปีพ.ศ. 2550-2552 ตรวจพบการปนเปื้อนของเมลามีนในตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์นำเข้าจำนวน 13 ตัวอย่างจากจำนวนทั้งสิ้น 1,263 ตัวอย่าง

นอกจากเมลามีนจะปนเปื้อนมาในวัตถุดิบและอาหารสัตว์โดยตรงแล้ว เมลามีนยังปนเปื้อนมาจากยากำจัดศัตรูพืชในทางการเกษตร (Cyromazine) ซึ่งตกค้างในดินและพืชโดยสัตว์จะได้รับสารดังกล่าวทางอ้อมจากการกินหญ้าหรือพืชที่ปนเปื้อน ทำให้มีการสะสมในร่างกายและใน

สารคัดหลั่งของสัตว์ เช่น น้ำนม ซึ่งเป็นสมมุติฐานในกรณีที่ตรวจพบสารดังกล่าวโดยไม่ทราบแหล่งที่มาหรือมีการเติมสารนั้นโดยไม่ตั้งใจ (Lim, 1990; WHO, 2009)

กรมประมงซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบโดยตรงต่ออาหารสัตว์น้ำ วางมาตรการเข้มงวดในการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนสารเมลามีนในอาหารสัตว์น้ำทั้งที่ผลิตเองในประเทศไทยและที่นำเข้าจากต่างประเทศ จากการสุ่มตรวจอาหารสัตว์น้ำกว่า 400 ตัวอย่างในโรงงานที่ผลิตจำนวน 45 แห่งไม่พบการปนเปื้อนของสารเมลามีนในตัวอย่างที่สุ่มตรวจ นอกจากนี้ยังได้ประชุมหารือเพื่อหามาตรการป้องกันและเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบให้สูงขึ้น (กรมประมง, 2551) จากรายงานการสำรวจโรงงานผลิตอาหารสัตว์ที่ขึ้นทะเบียนต่อกรมปศุสัตว์ภายในประเทศของ ณัฐชนก (2552) จำนวน 41 โรงงาน ใน 14 จังหวัดได้แก่ กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรปราการ ชลบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบุรี นครปฐม ลำพูน เชียงใหม่ อุบลราชธานี และสงขลา พบว่าร้อยละ 47.8 พบการปนเปื้อนของเมลามีนในวัตถุดิบอาหาร แต่อยู่ในระดับที่ไม่น่าวิตกเพราะมีมาตรการตรวจสอบที่เข้มงวด

จากประกาศกรมปศุสัตว์ เมื่อวันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2550 ไม่อนุญาตให้นำเข้า ผลิต ขายอาหารสัตว์ และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของสารเมลามีน โดยอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 รวมถึงกำหนดให้ผู้ขออนุญาตนำเข้าอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป หัวอาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์นมสำหรับสัตว์ อาหารเสริมโปรตีน และวัตถุดิบอาหารสัตว์ทุกชนิด จากประเทศที่มีรายงานว่าได้ตรวจพบสารเมลามีน ต้องแนบเอกสารจากหน่วยงานของทางราชการ ซึ่งรับรองผลิตภัณฑ์ดังกล่าวว่าปราศจากสารเมลามีน เพื่อประกอบการพิจารณาขออนุญาตนำเข้าด้วยทุกครั้งหากตรวจพบว่ามีการผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์หรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของสารเมลามีน ผู้ประกอบการจะมีความผิดฐานผลิตหรือนำเข้าอาหารสัตว์ที่ไม่ควรใช้เลี้ยงสัตว์ตามมาตรา 68 ทวิ ระวางโทษจำคุกไม่เกิน 1 ปี หรือปรับไม่เกิน 10,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ และมีความผิดตามมาตรา 62 ฐานผลิต หรือนำเข้าอาหารสัตว์ปลอมปน ต้องระวางโทษจำคุกตั้งแต่ 1 – 5 ปี โทษปรับตั้งแต่ 10,000 – 50,000 บาท หรือ ทั้งจำทั้งปรับ สำหรับผู้ขายอาหารสัตว์นอกจากจะมีความผิดฐานขายอาหารสัตว์ปลอมปนตามมาตรา 63 ระวางโทษจำคุกตั้งแต่ 6 เดือน ถึง 2 ปี หรือปรับตั้งแต่ 5,000 – 20,000 บาท หรือ ทั้งจำทั้งปรับ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551)

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์เมลามีนและอนุพันธ์ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์

ประเภทของอาหาร	ลำดับของแหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ	ปริมาณที่พบ (ppm)			
			เมลามีน	กรดไซยานูริค	แอมมิไลด์	แอมมิลีน
อาหารสุกร	1	1	Nagative	NA	NA	NA
	2	6	Negative - 120	NA	NA	NA
	3	3	Negative – 83.4	6.6 - 22.5	Negative – 10.8	Negative – 43.2
	4	2	Nagative	NS	NS	NS
	5	1	Nagative	NS	NS	NS
	6	1	Positive	NS	NS	NS
	7	3	Nagative	Nagative	Nagative	Nagative
อาหารสัตว์ปีก	8	14	Nagative	Nagative	Nagative	Nagative
	9	7	Nagative	2.11 – 2.63	13.9	Nagative
อาหารปลา	10	5	53 - 400	Nagative	2.46	Nagative

Positive หมายถึง ตรวจพบแต่ไม่ระบุค่า, Nagative หมายถึง ตรวจไม่พบ, NA หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์, NS หมายถึง ไม่ระบุไว้ในรายงาน ข้อมูลที่นำเสนอเป็นความเข้มข้นในส่วนต่อล้าน (ppm) หรือในเชิง Positive หรือ Nagative ขึ้นอยู่กับผลการรายงาน การวิเคราะห์ตัวอย่างดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการของ FDA หรือห้องปฏิบัติการของเอกชน ไม่ระบุข้อมูลเกี่ยวกับสถานที่ที่สุ่มเก็บตัวอย่าง ผลลัพธ์ที่รายงานเป็น NS ซึ่งหมายถึง ไม่ระบุไว้ในรายงาน แสดงว่าข้อมูลของตัวอย่างไม่ชัดเจนว่าถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีสำหรับอนุพันธ์ของเมลามีนที่กำหนด

ที่มา : ดัดแปลงจาก US-FDA (2007)

1.2.7 การตรวจสอบและการวิเคราะห์หาเมลามีนในตัวอย่าง

จากการปลอมปนเมลามีนลงในอาหารและวัตถุดิบอาหารโดยผู้ผลิตที่ผิดจรรยาบรรณ ส่งผลกระทบต่อความเชื่อมั่นของผู้บริโภค อีกทั้งเมลามีนมีราคาไม่สูงมากนักและสามารถหาได้ง่าย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมเรซินและพลาสติกซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีโรงงานผลิตแทบทุกประเทศ ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงสูงที่จะพบปัญหาการปนเปื้อนของเมลามีนในอาหารและวัตถุดิบอาหารอีกแม้ว่าปัจจุบันจะมีแนวทางป้องกันและตรวจสอบหลายรูปแบบก็ตาม การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อให้สามารถตรวจสอบปริมาณเมลามีนได้ในระดับต่ำมากๆ ในวัตถุดิบอาหาร หรืออาหารต่างๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และลดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ แนวโน้มในอนาคตจะมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารชนิดนี้ด้วยวิธีการมีความรวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้เครื่องมือประกอบช่วยในการวิเคราะห์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์ให้สูงขึ้น (ดลฤดี ฉายศิริ และคณะ, 2553; Heller and Nochetto, 2008; Sun *et al*., 2010a)

เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เมลามีนในปัจจุบันมีความหลากหลายและมีการปรับปรุงพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เครื่องมือและวิธีการหลักที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ ELISA, spectrophotometric, GC (Gas chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), LC (Liquid Chromatography), CE (capillary electrophoresis), UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) และ HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) เป็นต้น รายละเอียดดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เมลามีน

วิธีการวิเคราะห์	ชนิดของตัวอย่าง	LOQ	LOD	สารที่ตรวจสอบ	อ้างอิง
ELISA	Wheat gluten, อาหารสัตว์แบบเปียก อาหารสัตว์แบบแห้ง นมและนมผง	10-250 ppm 2-50 ppm 4-100 ppm 2-50 และ 10-250 ppm	10 pm 2 ppm 4 ppm 2 และ 10 ppm	เมลามีน	ELISA AgraQuant® kit Romer Labs
	เนื้อสัตว์	0.01 ppm	0.05 ppm	เมลามีน	Wang และคณะ (2010)
spectrophotometric	อาหาร วัตถุดิบอาหาร นม	-	-	เมลามีน	Rima และคณะ (2009)
	นม	0.04–3.5 ppm	0.04–3.5 ppm	เมลามีน	Liu และคณะ (2011)
GC/MS	นม นมผง และผลิตภัณฑ์ที่มีนมเป็นส่วนผสม	0.001 ppm	0.0003 ppm	เมลามีน กรดไซยานูริค แอมมิไลด์ แอมมีลีน	Li และคณะ (2009)
	วัตถุดิบอาหารและอาหารสัตว์	10 ppm	2.38 ppm	เมลามีน	Squadrone และคณะ (2010)
	ไข่	20 ppb	10 ppb	เมลามีน	Xia และคณะ (2009)

LOQ, Limit of Quantification หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่หาปริมาณได้

LOD, Limit of Detection หมายถึงความเข้มข้นหรือน้ำหนักต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด

ตารางที่ 7 (ต่อ) เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เมลามีน

วิธีการวิเคราะห์	ชนิดของตัวอย่าง	LOQ	LOD	สารที่ตรวจสอบ	อ้างอิง
GC/MS-MS	นมและผลิตภัณฑ์จากนม	0.05-0.005 ppm	0.002 ppm	เมลามีน กรดไซยานูริค แอมมิไลด์ แอมมีลีน	Miao และคณะ (2009)
	นมผง	0.5 ppb 1 ppb	0.2 ppb 0.5 ppb	เมลามีน กรดไซยานูริค	Tzing และ Ding (2010)
UPLC-MS/MS	ไข่	10 ppb	5 ppb	เมลามีน	Xia และคณะ (2009)
reversed phase HPLC	ผลิตภัณฑ์นม	60 ppb	18 ppb	เมลามีน	Sun และคณะ (2010b)
HPLC	อาหารและวัตถุดิบอาหาร	0.17 ppm	0.1 ppm	เมลามีน	ดลฤดี ฉายศิริ และคณะ (2553)
LC-EIS- MS/MS	นมผง	0.5 ppm	0.1 ppm	เมลามีน	Ibáñez และคณะ (2009)
LC/MS-MS	ดิน สตรอเบอร์รี และพืช	0.8-4.4 ppb	0.2-1.3 ppb	เมลามีน	Ge และคณะ (2011)
HILIC-UV	ผลิตภัณฑ์นม	0.003 ppm	0.005–32 ppm	เมลามีน	Zhang และคณะ (2012)

LOQ, Limit of Quantification หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่หาปริมาณได้

LOD, Limit of Detection หมายถึงความเข้มข้นหรือน้ำหนักต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด

1.2.8 ปลานิลและปลานิลแดงแปลงเพศ

1.2.8.1ข้อมูลพื้นฐาน

ปลานิลแดงสายพันธุ์ไทยพบครั้งแรกในปีพ.ศ.2511 ณ สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งได้มีการคัดปลานิลที่มีสีแดงทั้งตัวมาดำเนินการเพาะและขยายพันธุ์ ต่อมาปี พ.ศ. 2525 ได้กระจายพันธุ์ปลานิลสีแดงไปยังสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ ปี พ.ศ.2527 กรมประมงได้ส่งปลานิลสีแดงไปตรวจสอบพันธุ์ ณ มหาวิทยาลัยสเตอร์ริง ประเทศอังกฤษและมหาวิทยาลัยฟิลิปินส์ ด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) พบว่าปลานิลแดงสายพันธุ์ไทยในปัจจุบัน เป็นลูกผสมระหว่างปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) โดยมีความถี่ของยีนปลานิล 78 เปอร์เซ็นต์ และปลาหมอเทศ 22 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีลักษณะของปลานิลและปลาหมอเทศรวมกันคือ ปากเฉียงขึ้นคล้ายปลาหมอเทศแต่มีลักษณะลำตัวคล้ายปลานิล จำนวนก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อน และสัดส่วนบนลำตัวของปลาทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ปลานิลแดงสายพันธุ์ไทยมีลำตัวสีแดง ส้ม แดงส้ม ชมพู หรือขาว บางตัวมีเกล็ดสีแดงและสีเงินเป็นหย่อมๆ ปลานิลสีแดงเป็นปลาที่มีนิสัยก้าวร้าว เป็นทั้งปลากินทั้งพืชและสัตว์ เช่นเดียวกับปลานิลธรรมดา แต่ค่อนข้างจะชอบกินสัตว์มากกว่าคือ ปลานิลสีแดงจะกินปลาชนิดอื่นที่มีขนาดเล็กกว่า บางครั้งก็จะกินลูกปลาเป็นอาหาร ซึ่งพฤติกรรมเช่นนี้ไม่ปรากฏในปลานิลธรรมดา มีการผสมพันธุ์วางไข่เหมือนกับปลานิลธรรมดา ตัวเมียจะเริ่มวางไข่เมื่อมีความยาวเฉลี่ย 6.5 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 200-250 กรัม จะให้ลูกรุ่นละ 500-1,000 ตัว เมื่อวันที่ 2 มกราคม พ.ศ.2527 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารีได้ทรงปล่อยพันธุ์ปลานิลสีแดงเพื่อเพาะขยายพันธุ์ในสวนจิตรลดาและได้ทรงพระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า"ปลานิลสีแดง" ซึ่งต่อมาได้เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั่วโลกในชื่อปลานิลสีแดงหรือ Thai Red Tilapia (มานพ และคณะ, 2536; พรรณศรี, 2531)

1.2.8.2 สายพันธุ์ของปลานิลในประเทศไทย

สายพันธุ์และประวัติที่มาของปลาที่นำมาใช้เพาะขยายพันธุ์ ดังนี้

1) ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 1 เป็นสายพันธุ์ที่กรมประมงปรับปรุงด้วยวิธีการคัดพันธุ์จากปลานิลในพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน ประมาณ 7 ชั่วอายุ ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์เดิมประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชฯ พระราชทานแก่กรมประมงเพื่อเพาะขยายพันธุ์ ได้รับพันธุ์ปลาเมื่อปี 2547

ภาพที่ 8 ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 1 ตัวผู้ (บน) ตัวเมีย (ล่าง)
ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด (2551)

2) ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ สายพันธุ์ปลานิลเป็นสายพันธุ์จิตรลดา 3 ได้จากการนำปลานิลสายพันธุ์ “GIFT” เป็นปลานิลที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากการนำปลานิลพันธุ์ผสมกลุ่มต่างๆ ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างปลานิลสายพันธุ์จิตรลดาและปลานิลสายพันธุ์อื่นๆ อีก 7 สายพันธุ์ ได้แก่ อียิปต์ กานา เคนยา สิงคโปร์ เซเนกัล อิสราเอล และไต้หวัน ซึ่งมีการเจริญเติบโตเร็วและมีอัตรารอดสูง ในสภาพแวดล้อมการเลี้ยงต่างๆ ไปสร้างเป็นประชากรพื้นฐาน จากนั้นจึงดำเนินการคัดพันธุ์ในประชากรพื้นฐานต่อ โดยวิธีดูลักษณะครอบครัวร่วมกับวิธีดูลักษณะภายในครอบครัว ปลานิลชั่วอายุที่ 1 – 5 ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์โดยหน่วยงาน ICLARM ในประเทศฟิลิปปินส์ จากนั้นจึงนำลูกปลาชั่วอายุที่ 5 เข้ามาในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2538 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำจึงดำเนินการปรับปรุงปลาพันธุ์ดังกล่าวต่อ โดยวิธีการเดิมจนในปัจจุบันได้ 2 ชั่วอายุ และเรียกว่า "ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 " ปลาสายพันธุ์นี้มีลักษณะเด่น คือ ส่วนหัวเล็ก ลำตัวกว้าง สีเหลืองนวล เนื้อหนาและแน่น รสชาติดี อายุ 6 – 8 เดือน สามารถเจริญเติบโตได้ขนาด 3 – 4 ตัวต่อกิโลกรัม ให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าปลานิลพันธุ์ที่เกษตรกรเลี้ยง 40 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 9 ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ตัวผู้ (บน) ตัวเมีย (ล่าง)
ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด (2551)

3) ปลานิลแดง สายพันธุ์ที่ปรับปรุงพัฒนาโดยศูนย์ฯ /สถานีประมงน้ำจืด

ภาพที่ 10 พ่อแม่พันธุ์ปลานิลแดงสายพันธุ์จาก สถานีประมงน้ำจืดกำแพงเพชร เพศเมีย (ซ้าย) เพศผู้ (ขวา)
ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด (2551)

1.2.8.3 ความต้องการสารอาหาร

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันและแนวโน้มในอนาคตจะเปลี่ยนรูปแบบการเลี้ยงจากการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (extensive system) มาเป็นการเลี้ยงในแบบพัฒนาหรือระบบเลี้ยงแบบหนาแน่น (intensive system or super-intensive system) ซึ่งจะปล่อยสัตว์น้ำที่ระดับความหนาแน่น

สูง ทำให้ได้ผลผลิตปริมาณมากต่อการผลิตในแต่ละครั้ง การจัดการเรื่องอาหารและการให้อาหารจึงมีความจำเป็นมากยิ่งขึ้น อาหารต้องมีคุณภาพสูง และมีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วนตามความต้องการของสัตว์น้ำ (Watanabe, 2002)

1) ความต้องการโปรตีน โดยทั่วไปจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา ขนาดหรือช่วงอายุ และรูปแบบการเลี้ยง การจัดการการให้อาหาร (NRC, 1993) โดยปลานิลขนาดเล็ก มีความต้องการโปรตีนสูงกว่าปลาที่มีขนาดใหญ่ วุฒิพร และอัจฉริยา (2548) รายงานว่าอาหารสำหรับปลานิลแดงแปลงเพศควรมีโปรตีนจากสัตว์ต่อโปรตีนจากพืชในสัดส่วน 1:3 และจากการศึกษาของ Liti และคณะ (2006) พบว่าอาหารสำหรับปลานิล (*O. niloticus*) ควรมีโปรตีนจากสัตว์ในช่วง 7-15 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในอาหาร Al Hafedh (1999) ศึกษาระดับความต้องการโปรตีนในปลานิลที่มีขนาดแตกต่างกัน 4 ขนาด คือ 0.51, 45, 96 และ 264 กรัม อาหารทดลองมีระดับโปรตีน 5 ระดับ คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปลานิลขนาด 0.51 กรัมต้องการโปรตีนในอาหารที่ระดับ 40-45 เปอร์เซ็นต์ ปลานิลขนาด 45 กรัม ต้องการโปรตีนในอาหารที่ระดับ 25–35 เปอร์เซ็นต์ และในปลานิลขนาด 96 และ 264 กรัม ผลการทดลองที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างโปรตีนในแต่ละระดับ ในปัจจุบันนิยมประเมินระดับความต้องการโปรตีนโดยวิธี “Ideal Protein Concept” ซึ่งเป็นการประเมินในเชิงคุณภาพโดยใช้ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในอาหารเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของโปรตีน (Richard and Frank, 2008)

2) ความต้องการไขมัน โดยทั่วไปปลานิลที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 2 กรัมมีความต้องการไขมันประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลามีน้ำหนักมากกว่า 2 กรัมขึ้นไป ความต้องการไขมันจะลดลงมาอยู่ที่ประมาณ 6-8 เปอร์เซ็นต์ (Fitzsimmons, 2005) ปลานิลมีความต้องการกรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมกา 6 (18:2n-6) มากกว่าโอเมกา 3 (18:3n-3) ที่อยู่ในรูป 18:2n-6 หรือ 20:4n-6 พบมากในวัตถุดิบจำพวก ไขมัน น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันข้าวโพด ปริมาณที่ต้องการในอาหารอย่างน้อย 0.5 - 1 เปอร์เซ็นต์ (Chou and Shiau, 1996) จากรายงานของ Ng และ Bahurmiz (2009) พบว่าชนิดของน้ำมันที่เสริมลงในอาหารไม่มีผลต่อคุณภาพเนื้อและองค์ประกอบของไขมันภายหลังการแปรรูป

3) ความต้องการคาร์โบไฮเดรต ปลานิลมีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์จากสารอาหารที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูง ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น อายุและขนาดของปลา ชนิดของคาร์โบไฮเดรต และความถี่ของการให้อาหาร (Shiau, 1997) Shiau และ Liang (1995) ศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาร์โบไฮเดรตจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลมอลโตส ซูโครส แลกโตส กลูโคส และแป้งในอาหารสำหรับปลานิล (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) พบว่าปลานิลนำแป้งไปใช้ประโยชน์ได้ดีที่สุด แต่มีรายงานการศึกษาที่พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตเกินกว่า 35 เปอร์เซ็นต์จะมีผลทำให้การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการ

ใช้อาหาร และประสิทธิภาพการย่อยสารอาหารลดลง นอกจากนี้การทำแป้งให้สุกทำให้ประสิทธิภาพการย่อยเพิ่มขึ้นอีก 25-30 เปอร์เซ็นต์ (Shiau, 1997; Qing *et al*., 2003) Shiau และ Peng (1993) พบว่าสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่เป็นแป้งหรือเด็กตรินเป็นแหล่งพลังงานทดแทนโปรตีนในอาหารได้แต่ต้องไม่เกิน 41 เปอร์เซ็นต์

4) ความต้องการวิตามินและแร่ธาตุ ความต้องการวิตามินของปลานิล Fitzsimmons (2005) รายงานว่า ปลานิลมีความต้องการวิตามินเอ วิตามินดี 3 และวิตามินอีปริมาณ 4,400, 2,200 และ 66 IU/อาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ วิตามินซีเป็นวิตามินที่มีความจำเป็นอย่างมากในอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลในระบบที่ไม่มีอาหารธรรมชาติ Lovell และ Limsuwan (1982) พบว่าปลานิลสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ขึ้นมาได้ อย่างไรก็ตามในปลานิลขนาดเล็กยังคงมีความต้องการวิตามินบี 12 จากอาหาร สอดคล้องกับรายงานของ Shiau (2002) ที่พบว่าไม่จำเป็นต้องเสริมวิตามินบี 12 ลงในอาหาร

5) ความต้องการแร่ธาตุซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือแร่ธาตุที่สัตว์น้ำต้องการปริมาณมากหรือแร่ธาตุหลัก (macro minerals) และแร่ธาตุที่สัตว์น้ำต้องการในปริมาณน้อยหรือแร่ธาตุรอง (trace elements) ในส่วนของแร่ธาตุหลักที่นิยมศึกษากันมากได้แก่ ฟอสฟอรัสและแคลเซียม ซึ่งในปัจจุบันมีความพยายามที่จะใช้วัตถุดิบจากพืชในอาหารสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น ทำให้ประสบกับปัญหาสารต้านโภชนาการ (ไฟเตท) ที่ขัดขวางการนำแร่ธาตุไปใช้ประโยชน์ จากการศึกษาความสามารถในการย่อยไฟเตทของปลานิล (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) พบว่าปลานิลสามารถย่อยฟอสฟอรัสจากโครงสร้างของไฟเตทในอาหารได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Ellestad, 2002 อ้างโดย Debnath *et al*., 2005) จากการทดลองของ Phromkunthong และ Udom (2008) พบว่าอาหารสำหรับปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้วัตถุดิบจากพืชทั้งหมดเป็นแหล่งโปรตีนหลักควรมีฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ในช่วง 0.76 ถึง 0.79 เปอร์เซ็นต์ Shiau และ Tseng (2007) ศึกษาความต้องการแคลเซียมในปลานิล (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) พบว่าการเสริมแคลเซียมแลคเตทปริมาณ 3.7 กรัมในอาหารส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุด และระดับของแคลเซียมที่เหมาะสมในอาหารอยู่ในช่วง 3.5-4.2 กรัม Fitzsimmons (2005) รายงานว่า ปลานิลมีความต้องการแมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และทองแดงในปริมาณ 0.5, 0.15, 0.20 และ 0.003 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งบางส่วนปลาสามารถดูดซึมจากแหล่งน้ำทั้งที่อยู่ในน้ำจืดและน้ำเค็มได้

1.2.8.4 สถานการณ์และแนวโน้มการเลี้ยงปลานิลในระดับโลก

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีผู้นิยมบริโภคมากและขยับขึ้นเป็นปลาที่มีผู้นิยมบริโภคเป็นอันดับที่ 5 ของอาหารทะเลในประเทศสหรัฐอเมริกา FAO (2010) รายงานมูลค่าผลผลิตของปลานิลในระดับโลกนั้นมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่ปีพ.ศ. 2541 โดยในปี พ.ศ. 2549 มี

มูลค่าผลผลิตของกลุ่มปลานิล 2,451 ล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งแยกเป็นปลานิลจากการเพาะเลี้ยงมูลค่า 2,220 ล้านดอลล่าร์ คิดเป็นร้อยละ 90.58 และเป็นปลานิลที่มาจากการจับจากธรรมชาติมูลค่าประมาณ 231 ล้านดอลลาร์ คิดเป็นร้อยละ 9.42 ของมูลค่าผลผลิตปลานิลทั้งหมด ประเทศจีนเป็นประเทศผู้นำทั้งในด้านการผลิตและบริโภคปลานิลของโลก จากข้อมูลผลผลิตปลานิลในปีค.ศ. 2009 พบว่าประเทศจีนสามารถผลิตปลานิลได้มากเป็นอันดับ 1 ของโลกเท่ากับ 1.15 ล้านตันซึ่งคิดเป็น 46 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งโลก โดยเพิ่มขึ้นจากปีค.ศ. 2007 ที่ผลิตได้ 1.13 ล้านตัน

1.2.8.5 สถานการณ์และแนวโน้มของการเพาะเลี้ยงปลานิลในระดับภูมิภาค

FAO (2006) รายงานว่าประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้เป็นอันดับที่ 4 ของภูมิภาคเอเชียในปีพ.ศ. 2549เป็นจานวน 153,000 ตัน รองลงมาจากประเทศจีนจำนวน 1,111,461 ตัน ฟิลิปปินส์จำนวน 160,482 ตัน และอินโดนีเซีย จำนวน 179,934 ตัน ซึ่งประเทศเหล่านี้ล้วนเป็นประเทศที่อาจจะเป็นคู่แข่งที่สำคัญทางการค้าได้ในอนาคต โดยเฉพาะประเทศจีนเป็นประเทศที่ส่งออกปลานิลไปจำหน่ายที่สหรัฐอเมริกามากเป็นอันดับ 1 คิดเป็นร้อยละ 67 ของปริมาณปลานิลนำเข้าทั้งหมด รองมาเป็นประเทศไต้หวันซึ่งมีการส่งออกไปสหรัฐอเมริกาคิดเป็นร้อยละ 10 ของปริมาณปลานิลนำเข้าทั้งหมด โดยส่งในรูปของปลาสดและแปรรูป หากเทียบกับประเทศไทยยังคงส่งออกปลานิลน้อยมากเพราะทั้งประเทศจีนและไต้หวันนั้นมีผลผลิตครองตลาดไปกว่าร้อยละ 50-60 ของตลาดโลก และอีกประเทศที่น่าจับตามองคือ เวียดนาม เพราะทางการของเวียดนามนั้นให้การสนับสนุนอย่างงจริงจังและได้แหล่งน้ำที่มาจากแม่น้ำโขง ต่างจากประเทศไทยที่ต้องพึ่งจากธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่และต้นทุนการผลิตทั้งค่าวัตถุดิบและค่าแรงงานก็สูงกว่ามาก (กรมประมง, 2554)

1.2.8.6 สถานการณ์และแนวโน้มของการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย

จากแผนยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล พ.ศ. 2553-2557 (กรมประมง, 2554) รายงานว่าประเทศไทยมีจุดแข็งในการผลิตและการตลาดปลานิลในหลายด้านเช่น มีการพัฒนาสายพันธุ์ปลาเทคโนโลยี องค์ความรู้ด้านการเพาะเลี้ยง และการแปรรูปผลิตภัณฑ์อย่างต่อเนื่อง โดยกรมประมงภาครัฐ และภาคเอกชนมีนโยบายและการดำเนินการที่ชัดเจนในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงอย่างจริงจัง มีการจัดทำมาตรฐานการปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงที่ดี (GAP) และมีเครือข่ายภาครัฐในการควบคุม กำกับ และดูแลด้านมาตรฐานการผลิตและการแปรรูป ส่งผลให้ประเทศไทยมีภาพลักษณ์ที่ดี และเป็นที่ยอมรับว่าเป็นแหล่งผลิตปลานิลที่มีคุณภาพของโลก มีตลาดผู้บริโภคภายนอกประเทศกว้างขวางและสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์ได้หลายรูปแบบ และที่สำคัญผู้ประกอบการของไทยสามารถแปรรูปผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายและได้คุณภาพมาตรฐานตามความต้องการของประเทศคู่ค้า ประเทศไทยตั้งเป้าหมายว่าในปีพ.ศ. 2557 จะต้องมีปริมาณผลผลิตปลานิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ให้ได้ถึง 300,000 ตัน มีการรวมกลุ่มของผู้เลี้ยงปลานิลในรูปสหกรณ์, วิสาหกิจชุมชนหรือชมรม 300 กลุ่ม มีระบบตรวจสอบสินค้าตลอดสายการผลิต และมีปลานิลที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานสำหรับการส่งออก 60,000 ตัน

สำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยนั้น มีอัตราการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น โดยส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเพื่อการบริโภคภายในประเทศ แต่ได้มีความพยายามปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีลักษณะและคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดต่างประเทศ เช่น ปลานิลแปลงเพศ ปลานิลทริพลอยด์ และการเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีความเค็มต่ำเพื่อแก้ไขปัญหากลิ่นสาบโคลน เป็นต้น

ความต้องการปลานิลในตลาดผู้บริโภคยังคงเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากประชากรมีอัตราการเจริญเติบโตสูงจึงส่งผลต่อแนวโน้มการเลี้ยงปลาชนิดนี้ให้มีลู่ทางแจ่มใสต่อไปโดยไม่ต้องกังวลปัญหาทางด้านการตลาดเนื่องจากเป็นปลาที่มีราคาดี เป็นที่นิยมบริโภคและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในทุกภูมิภาค เพราะสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายรูปแบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันปลานิลสามารถส่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศในลักษณะของปลาแล่เนื้อ ตลาดที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น อเมริกา อิตาลี เป็นต้น ดังนั้น การเลี้ยงปลานิลให้มีคุณภาพ ปราศจากกลิ่นโคลนย่อมจะส่งผลดีต่อการบริโภค การจำหน่าย และการให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าที่สุด

สำหรับสถานการณ์และแนวโน้มของผลผลิตปลานิลในประเทศไทยนั้นมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปจากปีพ.ศ. 2540 ถึง 2545 ซึ่งผลผลิตจะอยู่ในช่วง 67,800-98,300 ตัน และมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วในปีพ.ศ. 2547 ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 160,200 ตัน และยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงปีพ.ศ. 2551 มีผลผลิตปลานิลสูงถึง 217,200 ตัน ซึ่งมาจากบ่อเลี้ยง 178,649 ตัน และจากกระชัง 31,366 ตัน (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2551)

ราคาปลานิลที่เกษตรกรขายได้ที่หน้าฟาร์มเฉลี่ยตั้งแต่เดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2552 ของปลาโดยปลาขนาดใหญ่ราคาเฉลี่ย 46.30 บาทต่อกิโลกรัม ปลาขนาดกลางราคาเฉลี่ย 32.11 บาทต่อกิโลกรัม ปลาขนาดเล็กราคาเฉลี่ย 22.50 บาทต่อกิโลกรัม ราคาจำหน่ายที่หน้าฟาร์มขึ้นกับความสดและคุณภาพ ขนาด และปลามีชีวิตจะขายได้ราคาดีกว่าปลาตาย ส่วนราคาขายส่งในช่วงเวลาเดียวกันปลาขนาดใหญ่ราคาเฉลี่ย 53.27 บาทต่อกิโลกรัม ปลาขนาดกลางราคาเฉลี่ย 42.82 บาทต่อกิโลกรัม ปลาขนาดเล็กราคาเฉลี่ย 32.06 บาทต่อกิโลกรัม และราคาขายปลีกเฉลี่ยตั้งแต่เดือนมกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2552 ปลาขนาดใหญ่ราคาเฉลี่ย 55.27 บาทต่อกิโลกรัม ปลาขนาดกลางราคาเฉลี่ย 43.10 บาทต่อกิโลกรัม (กระทรวงพาณิชย์; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) จากข้อมูลจากกรมศุลกากร รายงานปริมาณการนำเข้าปลานิลปีพ.ศ. 2551 รวมทั้งสิ้น 198,440 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 27,155,531 บาท เพิ่มขึ้นจากปีพ.ศ. 2550 ร้อยละ 264 ซึ่งมีปริมาณนำเข้า 57,471

กิโลกรัม มูลค่า 5,329,395 บาท ในขณะที่ปริมาณการส่งออกปลานิลปี 2551 รวมทั้งสิ้น 19,745,188 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 1,298,986,629 บาท ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปีพ.ศ. 2550 ร้อยละ 55 ซึ่งมีปริมาณการส่งออกปลานิลรวมทั้งสิ้น 12,733,959 กิโลกรัม มูลค่า 668,803,306 บาท จากข้อมูลทางสถิติจะเห็นได้ว่าปลานิลมีปริมาณการส่งออกเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545 ถึง 2549 โดยการส่งออกส่วนใหญ่จะอยู่ในหลายรูปแบบ

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารในปลานิลแดงแปลงเพศ

1.3.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาจากความเป็นพิษในปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับเมลามีนในระดับต่างๆ

1.3.3 เพื่อศึกษาการตกค้างของเมลามีนในเนื้อปลาซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.4.1 ทราบถึงผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารในปลานิลแดงแปลงเพศ

1.4.2 ทราบถึงผลเมลามีนที่มีผลต่อองค์ประกอบเลือดและผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อในปลานิลแดงแปลงเพศ

1.4.3 ทราบถึงผลของเมลามีนต่อการตกค้างและสะสมในเนื้อและเครื่องในรวมในปลานิลแดงแปลงเพศที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค

1.4.4 คาดว่าจะสามารถนำผลการศึกษาที่ได้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดค่าความปลอดภัยของเมลามีนในอาหารสำหรับเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

2.1 วัสดุ

2.1.1 ปลานิลแดงแปลงเพศที่ใช้ในการทดลอง

ปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ย 0.5-1 กรัมต่อตัวจากหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง จำนวน 3,000 ตัว นำมาอนุบาลจนกระทั่งปลามีน้ำหนักเฉลี่ย 5-6 กรัมต่อตัว

2.1.2 สารเคมี

2.1.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้สำหรับทำอาหารทดลอง อาหารทดลอง และตัวปลาทดลอง

2.1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดพื้นฐานของตัวปลาทดลอง

2.1.2.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา

2.1.2.4 ยาและสารเคมีสำหรับรักษาโรคในระหว่างการอนุบาลและการทดลอง ได้แก่ ฟอร์มาลีน

2.1.2.5 น้ำมันกานพลู สำหรับใช้สลบปลาในระหว่างการชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่าง

2.1.2.6 คลอรีนผง และโซเดียมไธโอซัลเฟต สำหรับเตรียมน้ำเลี้ยงปลา

2.1.3 อาหารสำหรับอนุบาลปลาก่อนทำการทดลอง

ใช้ปลาป่นและรำละเอียดที่ผ่านการร่อนผ่านตะแกรงขนาดตา 30 mesh สำหรับการอนุบาลลูกปลาในช่วงแรก หลังจากนั้นจึงลดปริมาณปลาป่นและรำละเอียดลงโดยเริ่มให้อาหารทดลองสูตรที่ 1 ที่บดให้มีขนาดเล็กพอที่ปลาจะสามารถกินได้เพื่อฝึกให้ปลาคุ้นเคยกับอาหารทดลอง (รายละเอียดเพิ่มเติมดังข้อ 2.3.2)

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาดความจุน้ำ 1,000 ลิตร

2.2.2 ตู้กระจกสำหรับเลี้ยงปลาทดลองขนาด 45 x 91 x 45 เซนติเมตรพร้อมขาตั้ง ความจุน้ำโดยประมาณ 184 ลิตร ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้ทดลองด้วยแผ่นพลาสติกสีเขียวทึบทั้ง 3 ด้าน เพื่อลดการถูกรบกวนของปลาทดลองจากปัจจัยแวดล้อมภายนอก

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารทดลอง ได้แก่เครื่องผสมและอัดเม็ดอาหาร HOBART A200 mixer ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา กระบอกตวง และถาดสำหรับใส่อาหาร

2.2.4 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหารได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO รุ่น PB3002) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO รุ่น PB303-S)

2.2.5 เครื่องบดวัตถุดิบอาหาร rotor beater mill (RETSCH รุ่น SK100 comfort rostfrei) และตะแกรงร่อนขนาดตา 30 mesh

2.2.6 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง สวิงตักปลา ขันและถังสำหรับขนย้ายปลา

2.2.7 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในวัตถุดิบอาหาร อาหารทดลอง และตัวปลา

2.2.7.1 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ และบิวเรต กระดาษชั่งตัวอย่างปราศจากไนโตรเจน

2.2.7.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง

2.2.7.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) Gallenkamp โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง

2.2.7.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ตู้อบ (hot air oven) ของบริษัท Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible)

2.2.8 อุปกรณ์สำหรับศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

2.2.8.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด กรรกไกร ปากคีบ

2.2.8.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

2.2.8.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อคือ ไมโครโตม (microtome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposable Microtome Blades) อ่างน้ำอุ่น (warm bath) และสไลด์

2.2.8.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวร คือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Sunyo, Program Oven) ชุดสำหรับใส่สีย้อม และแผ่นปิดสไลด์

2.2.8.5 เครื่องเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

2.2.8.6 เตาร้อน (hot plate)

2.2.8.7 กล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลานิลแดงแปลงเพศน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.5-1 กรัม จำนวน 3,000 ตัวอนุบาลในบ่อคอนกรีต โดยเติมน้ำในบ่อให้ได้ปริมาตร 2 ลูกบาศก์เมตร อนุบาลลูกปลาโดยให้ปลาป่นและรำละเอียดที่ผ่านการร่อนผ่านตะแกรงขนาดตา 30 mesh ในอัตราส่วนปลาป่น 2 ส่วนต่อรำละเอียด 1 ส่วนวันละ 4-5 ครั้ง (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2551) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ จึงเริ่มให้ปลาป่นและรำละเอียดควบคู่กับอาหารทดลองสูตรควบคุมที่ไม่ใส่เมลามีนที่บดให้มีขนาดเล็กพอที่ปลาจะสามารถกินได้ เพื่อฝึกให้ปลาคุ้นเคยกับอาหารทดลอง จากนั้นจึงค่อยๆ ลดปริมาณปลาป่นและรำละเอียดลงจนกระทั่งเหลือแต่อาหารทดลองเพียงอย่างเดียว โดยให้วันละ 2 ครั้ง เวลา 8.00-9.00 น. และ 15.00-16.00 น. เมื่อปลาที่อนุบาลไว้มีน้ำหนักเฉลี่ย 5-6 กรัมต่อตัว (จากการสุ่มชั่ง) จึงคัดปลาที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันลงในตู้ทดลองจำนวนตู้ละ 25 ตัว ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ก่อนชั่งน้ำหนักงดให้อาหารปลาเป็นเวลา 1 วัน) บันทึกข้อมูลน้ำหนักปลาเริ่มต้นเพื่อนำไปคำนวณการเจริญเติบโต ปรับสภาพปลาให้มีความคุ้นเคยกับตู้ทดลองและให้กินอาหารทดลองสูตรควบคุม (ไม่ใส่เมลามีน) เป็นเวลา 3 วัน

2.3.2 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 7 สูตร เป็นอาหารเม็ดจมที่เตรียมขึ้นเอง สูตรที่ 1 เป็นสูตรควบคุมไม่ใส่เมลามีน สูตรที่ 2-7 ใส่เมลามีนลงในอาหารตามปริมาณในแต่ละสูตรคือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยลดปริมาณแป้งมันสำปะหลังลงตามระดับของเมลา-มีนที่ใส่ลงไป กำหนดให้อาหารทุกสูตรมีโปรตีน 32 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานที่ย่อยได้ประมาณ 3,300 กิโลแคลอรี/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยค่าพลังงานที่ย่อยได้คำนวณโดยใช้ค่าซึ่ง

ประยุกต์มาจากค่าที่ใช้ในปลานิลคือ 4.4 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสำหรับโปรตีน 9.0 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัมสำหรับไขมัน และ 3.7 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับคาร์โบไฮเดรต (Stickney, 1979) อาหารทุกสูตรมีส่วนประกอบของวัตถุดิบที่เหมือนกัน

2.3.3 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง

2.3.3.1 นำวัตถุดิบที่ใช้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อสร้างสูตรอาหาร (ตารางที่ 8) โดยคำนวณให้มีโปรตีน ไขมัน และพลังงานใกล้เคียงกัน

2.3.3.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการร่อนจากตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) ส่วนน้ำมัน วิตามินและแร่ธาตุ ชั่งแยกใส่ถุงไว้สำหรับอาหารทดลองแต่ละสูตร (ตารางที่ 9)

2.3.3.3 นำเมลามีนไปบดกับแป้งสำปะหลังในโกร่งบดสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำวัตถุดิบอาหารทั้งหมดยกเว้นน้ำมัน มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหารประมาณ 20 นาที จึงเติมน้ำมันปลาและน้ำมันถั่วเหลืองลงไป ผสมต่ออีกประมาณ 10 นาทีจึงเติมน้ำกลั่นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ผสมต่ออีกประมาณ 10 นาที

2.3.3.4 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

2.3.3.5 นำอาหารที่ผ่านการอัดเม็ดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกจากตู้อบ เลือกเศษและเม็ดอาหารที่ไม่ต้องการทิ้งไป

2.3.3.6 บรรจุอาหารที่ผ่านการอบแล้วในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

2.3.3.7 สุ่มเลือกอาหารทดลองไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกซ์ (nitrogen free extract, NFE) คำนวณจากสูตร (รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 10)

$$NFE = 100 - (\%\text{ความชื้น} + \%\text{โปรตีน} + \%\text{ไขมัน} + \%\text{เถ้า} + \%\text{เยื่อใย})$$

ก่อนการทดลองจะส่งอาหารตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมลามีน ณ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพมหานคร ตามวิธีการของ USFDA LIB No.4422 (2008) ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เพื่อยืนยันว่าปริมาณเมลามีนที่ใส่ลงไปในอาหารมีค่าใกล้เคียงกับที่คำนวณไว้ และเพื่อยืนยันว่าวัตถุดิบอาหารที่นำมาใช้ในการทดลองปราศจากเมลามีนปลอมปน โดยอาหารทดลองในสูตรที่ 1 หรือสูตรควบคุมจะต้องตรวจไม่พบเมลามีน (รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 10)

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหาร (%as fed basis)[1]

วัตถุดิบ	ความชื้น	โปรตีน[2]	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE
ปลาป่น	10.06±0.05	64.45±0.51	12.48±0.25	11.22±0.24	-	1.82±0.15
กากถั่วเหลือง	9.68±0.89	49.69±0.74	2.07±0.12	4.90±0.21	5.90±0.28	30.70±0.34
ข้าวโพดป่น	9.27±0.32	10.28±0.53	2.07±0.10	1.78±0.11	2.43±0.43	74.08±0.17
รำละเอียด	6.50±0.22	15.95±0.68	15.63±0.50	7.24±0.24	6.95±0.19	54.34±0.13
แป้งมันสำปะหลัง	1.82±0.12	0.20±0.07	0.20±0.02	1.17±0.21	0.72±0.08	97.35±0.29
[3]เมลามีน	-	412.5±0.13	-	-	-	-

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

[2]ปริมาณไนโตรเจน x 6.25 ในส่วนของเมลามีนค่าที่แสดงจะเป็นโปรตีนเทียม (Fake protein)

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบและปริมาณของวัตถุดิบในอาหารทดลองแต่ละสูตร (กรัมต่ออาหาร 100 กรัม)

วัตถุดิบ	สูตรอาหาร						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
ส่วนประกอบของอาหาร							
ปลาป่น	12	12	12	12	12	12	12
กากถั่วเหลือง	43	43	43	43	43	43	43
ข้าวโพดป่น	10	10	10	10	10	10	10
รำละเอียด	12	12	12	12	12	12	12
น้ำมันปลาและน้ำมันถั่วเหลือง (1:1)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
โคลีนคลอไรด์ (60 เปอร์เซ็นต์)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
วิตามินผสม[1]	1	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุผสม (ไม่มีฟอสฟอรัส)[2]	3	3	3	3	3	3	3
โมโนโซเดียมฟอสเฟต[3]	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
แป้งมันสำปะหลัง	15.3	14.8	14.3	13.8	13.3	12.8	12.3
เมลามีน[4]	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร (ค่าจากการคำนวณ, เปอร์เซ็นต์)							
โปรตีน (ไนโตรเจน x6.25 ไม่รวมไนโตรเจนจากเมลามีน)	32.07	32.07	32.07	32.07	32.07	32.07	32.07
โปรตีน (ไนโตรเจน x6.25 รวมไนโตรเจนจากเมลามีน)	32.07	34.13	36.20	38.26	40.32	42.38	44.44
ไขมัน	7	7	7	7	7	7	6.99
พลังงานที่ย่อยได้ (กิโลแคลอรีต่ออาหาร 100 กรัม)	361.7	359.9	358	356.1	354.3	352.4	350.6

[1]วิตามินผสม, DSM Nutritional Product, สมุทรปราการ, ประเทศไทย (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร): Thiamine (B1) 1; Riboflavin (B2) 2; Pyridoxine (B6) 1; Cobalamin (B12) 0.005; Retinal (A) 400,000 IU; Cholecalciferol (D3) 200,000 IU; Menadione sodium bisulfite (K3) 8; Folic acid 0.5; Calcium pantothenate 4; Inositol 40; Niacin 15; Tocopherol (E) 15; Ascorbic acid (C) 50; Biotin 0.1

[2]แร่ธาตุผสม, DSM Nutritional Product, สมุทรปราการ, ประเทศไทย (กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร): Na 3.278; Mg 25.25; K 76.612; Ca 49.096; Fe 4.821; Zn 0.667; Mn 0.433; Cu 0.069; Co 0.002; I 0.015

[3]Monobasic sodium phosphate, Ajax Finechem Pty Ltd, Australia

[4]Chang Chun Petrochemical CO.,LTD, Taipei Taiwan (purity 99.5%)

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (%as fed basis)[1]

สูตรอาหาร	ความชื้น	โปรตีน[2]	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	NFE	ปริมาณเมลามีนที่วิเคราะห์ได้ในอาหาร[3]
T1	5.57±0.01	31.20±0.14	7.11±0.30	6.24±0.12	4.52±0.34	45.26±0.39	ND
T2	5.82±0.31	32.80±0.05	7.05±0.06	6.29±0.05	4.44±0.29	43.60±0.44	0.40
T3	6.04±0.17	34.23±0.87	6.89±0.20	6.13±0.22	4.38±0.81	42.36±0.13	1.10
T4	6.22±0.03	36.55±0.36	7.18±0.10	6.27±0.14	4.40±0.72	39.57±0.14	1.56
T5	5.20±0.04	38.05±0.89	7.02±0.25	6.09±0.03	4.72±0.11	38.97±0.53	2.07
T6	5.11±0.17	40.53±0.90	6.94±0.20	5.97±0.25	4.39±0.27	37.09±0.68	2.50
T7	5.73±0.13	43.43±0.63	7.07±0.08	6.01±0.08	4.21±0.64	33.78±0.39	3.12

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

[2] ปริมาณไนโตรเจน x6.25 (รวมไนโตรเจนจากเมลามีน)

[3] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าที่รายงานจากการสุ่มอาหารจำนวน 500 กรัม โดยใช้วิธีวิเคราะห์ In house method based on USFED LIB No.4422 (2008) โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS

2.3.4 แผนการทดลอง

ศึกษาผลของเมลามีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ และการตกค้างในปลานิลแดงแปลงเพศ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ อาหารทดลองมีทั้งหมด 7 สูตร โดยอาหารทุกสูตรมีส่วนประกอบของวัตถุดิบที่เหมือนกัน ดำเนินการทดลองโดยเตรียมตู้ทดลองจำนวน 21 ตู้เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 150 ลิตรต่อตู้ สุ่มจับฉลากหาตำแหน่งที่วางตู้เพื่อไม่ให้สภาพแวดล้อมภายนอกมีผลต่อการทดลอง เมื่อเริ่มต้นการทดลองคัดเลือกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีสุขภาพดีจากบ่ออนุบาล จำนวน 25 ตัวลงในตู้ทดลองแต่ละตู้ ชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูล ระหว่างการทดลองให้อาหารทดลองแต่ละสูตรวันละ 2 ครั้งเวลา 08.00-09.00 น. และ 15.00-16.00 น. โดยให้ปลากินอาหารจนอิ่ม เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนของเสียออกด้วยวิธีกาลักน้ำทุกวัน แล้วเติมน้ำให้ถึงระดับเดิมทุกครั้ง บันทึกน้ำหนักปลาทดลองในแต่ละตู้ทุกๆ 2 สัปดาห์ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการบันทึกข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผล

2.3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.3.5.1 การตรวจสอบลักษณะภายนอกและพฤติกรรม

บันทึกลักษณะภายนอกและพฤติกรรมของปลาได้แก่ การว่ายน้ำ การยอมรับอาหาร สีของลำตัว การตกเลือด การเกิดบาดแผลบริเวณครีบ ลำตัว และการกินอาหารตลอดระยะเวลาทดลอง

2.3.5.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโต

ชั่งน้ำหนักรวมด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของปลาแต่ละตู้ทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อบันทึกน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น โดยงดให้อาหารปลา 1 มื้อก่อนทำการชั่ง ก่อนชั่งปลาจะสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 50 ppm (Lewbart, 2001) เพื่อลดความเครียดและอาการช้ำจากการชั่งและการเคลื่อนย้ายให้น้อยที่สุด นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ

อัตรารอดตาย (survival rate %) คำนวณจากสมการ

$$\text{อัตรารอดตาย} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)}} \text{ X } 100$$

การเจริญเติบโต คำนวณตามวิธีของ Hardy และ Barrows (2002) ได้แก่
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG) (เปอร์เซ็นต์) คำนวณจากสมการ

$$WG = \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) คำนวณจากสมการ

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

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) คำนวณตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1966) จากสมการ

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง (กรัม)}}$$

อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) (เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน) คำนวณตามวิธีของ Yone และ Fujii (1975) จากสมการ

$$\text{rate of feed intake} = \frac{F \times 100}{\frac{W_0 + W_1}{2} \times \frac{N_0 + N_1}{2} \times t}$$

F = น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน (กรัม)
W_0 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม)
W_1 = น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย (กรัม)
N_0 = จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)
N_1 = จำนวนปลาสุดท้าย (ตัว)
t = ระยะเวลาที่ปลาได้รับอาหารทดลอง (วัน)

น้ำหนักที่เปลี่ยนไปเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (weight change, WC) (เปอร์เซ็นต์) คำนวณตามวิธีของ NTP (1983) จากสมการ

$$WC = \frac{(\text{น้ำหนักที่เปลี่ยนไปของชุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักที่เปลี่ยนไปของชุดควบคุม (กรัม)})}{\text{น้ำหนักที่เปลี่ยนไปของชุดควบคุม (กรัม)}} \times 100$$

2.3.5.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลา

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนการทดลองจำนวน 20 ตัว นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มตัวอย่างปลาจากแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 12 ตัว (ตู้ละ 4 ตัว) ไปวิเคราะห์หาความชื้น โปรตีน และไขมัน และนำค่าโปรตีนที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net protein utilization, ANPU) ตามวิธีการของ Hardy และ Barrows (2002) จากสมการ

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

$$PER = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}} \times 100$$

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (เปอร์เซ็นต์)

$$ANPU = \frac{(\%\text{โปรตีนเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \%\ \text{โปรตีนเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{น้ำหนักโปรตีนจากอาหารที่ปลากิน (กรัม)}} \times 100$$

2.3.5.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างปลา 9 ตัวจากแต่ละชุดการทดลอง(ตู้ละ 3 ตัว) เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในส่วนของเหงือกและอวัยวะภายใน ได้แก่ กระเพาะอาหาร ตับ และไต ตรวจสอบความผิดปกติภายนอกของเนื้อเยื่อ เช่น การตกเลือด สี และขนาด พร้อมบันทึกข้อมูล จากนั้นรักษาสภาพของเนื้อเยื่อในน้ำยา 10% neutral buffer formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำยารักษาสภาพเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์จนกว่าจะถึงขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ จากนั้นเก็บตัวอย่างเพิ่มชุดการทดลองละ 6 ตัว เพื่อศึกษาปริมาณไกลโคเจนในตับ โดยใช้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) เป็นน้ำยารักษาสภาพ นำตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมดผ่าน

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Automatic Tissue Processor ฝังในพารา-พลาสต์ ตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (sliding microtome) หนา 3 ไมครอน ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Bancroft (1967) เนื้อเยื่อตับย้อมเพื่อศึกษาไกลโคเจนตามวิธีของ Mallory (1942) เพื่อนำไปทำสไลด์ถาวร ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

2.3.5.5 การศึกษาผลของเมลามีนต่อองค์ประกอบเลือดในปลา

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มปลาชุดการทดลองละ 6 ตัว (ตู้ละ 2 ตัว) สลบด้วยน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 50 ppm สังเกตอาการจนปลาไม่เคลื่อนไหว เจาะเลือดบริเวณโคนหางด้วยเข็มขนาด 25Gx1 ใส่หลอดไมโครทิวป์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีเพื่อให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะตัวอย่างซีรัมวิเคราะห์ปริมาณ blood urea nitrogen (BUN) creatinine (Cr) และแร่ธาตุที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของไต ได้แก่ โซเดียม (Na) คลอไรด์ (Cl) และโปแตสเซียม (K) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Beckman Cx-3 delta ตามวิธีการของวรรณี และคณะ (2550)

2.3.5.6 การวิเคราะห์เมลามีนตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวม

เก็บตัวอย่างปลาชุดการทดลองละ 15 ตัว (ตู้ละ 5 ตัว) หลังจากทำการทดลองครบ 8 สัปดาห์ แล่เอาเฉพาะส่วนของเนื้อและเครื่องในรวม (เก็บตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้ รวมไต) นำตัวอย่างทั้ง 2 ส่วนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นส่งตรวจวิเคราะห์หาเมลามีนที่ตกค้าง ณ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด กรุงเทพฯ ตามวิธีการของ USFDA LIB No.4422 (2008) ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

2.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบจำแนกทางเดียว (one way Analysis of Variances) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Duncan, 1955) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 11.0)

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการสังเกตลักษณะภายนอกและพฤติกรรมของปลานิลแดงแปลงเพศในระหว่างการทดลอง

จากการติดตามสังเกตลักษณะภายนอกและพฤติกรรมพบว่า ในช่วงสัปดาห์แรกที่ปลาได้รับอาหารทดลอง ปลาในทุกชุดการทดลองมีการกินอาหารและพฤติกรรมต่างๆ ที่เป็นปกติ โดยจะเริ่มแสดงอาการผิดปกติภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5, 6 และ 7 (มีเมลามีน 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารตามลำดับ) จะพบความผิดปกติที่เกิดขึ้น 2 รูปแบบในปลากลุ่มนี้ กล่าวคือสีบริเวณลำตัวเข้มขึ้นหรือไม่ก็ซีดขาวมากผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม (ไม่ใส่เมลามีน) ดังภาพที่ 11 นอกจากนี้ปลาในกลุ่มดังกล่าวยังมีพฤติกรรมเฉื่อยชา หลบซ่อนตามมุมตู้ทดลอง กินอาหารลดลง ลำตัวผอม บางส่วนของครีบสึกกร่อน อาการความผิดปกติของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5, 6 และ 7 เริ่มปรากฏให้เห็นในสัปดาห์ที่ 4 โดยพบอาการเกล็ดนิ่มและหลุดลอก บางจุดบริเวณลำตัว อันเป็นสาเหตุให้เกิดบาดแผลเนื่องจากการเข้าทำลายของปรสิตภายนอกได้แก่ ปลิงใส (Monogenea: *Gyrodactylus* sp.) (ภาพที่ 12) ปลากินอาหารลดลง บางตัวไม่สามารถควบคุมการทรงตัวและว่ายน้ำให้เป็นปกติได้ และในสัปดาห์ที่ 4 พบความผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 4 (มีเมลามีน 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารตามลำดับ) รุนแรงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5, 6 และ 7 มีอาการผิดปกติที่สังเกตได้เกินครึ่งหนึ่งของจำนวนปลาที่เหลืออยู่ทั้งหมด รายละเอียดความผิดปกติเพิ่มเติมดังตารางที่ 11 และขนาดของปลาที่ได้รับอาหารทดลองในแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 13)

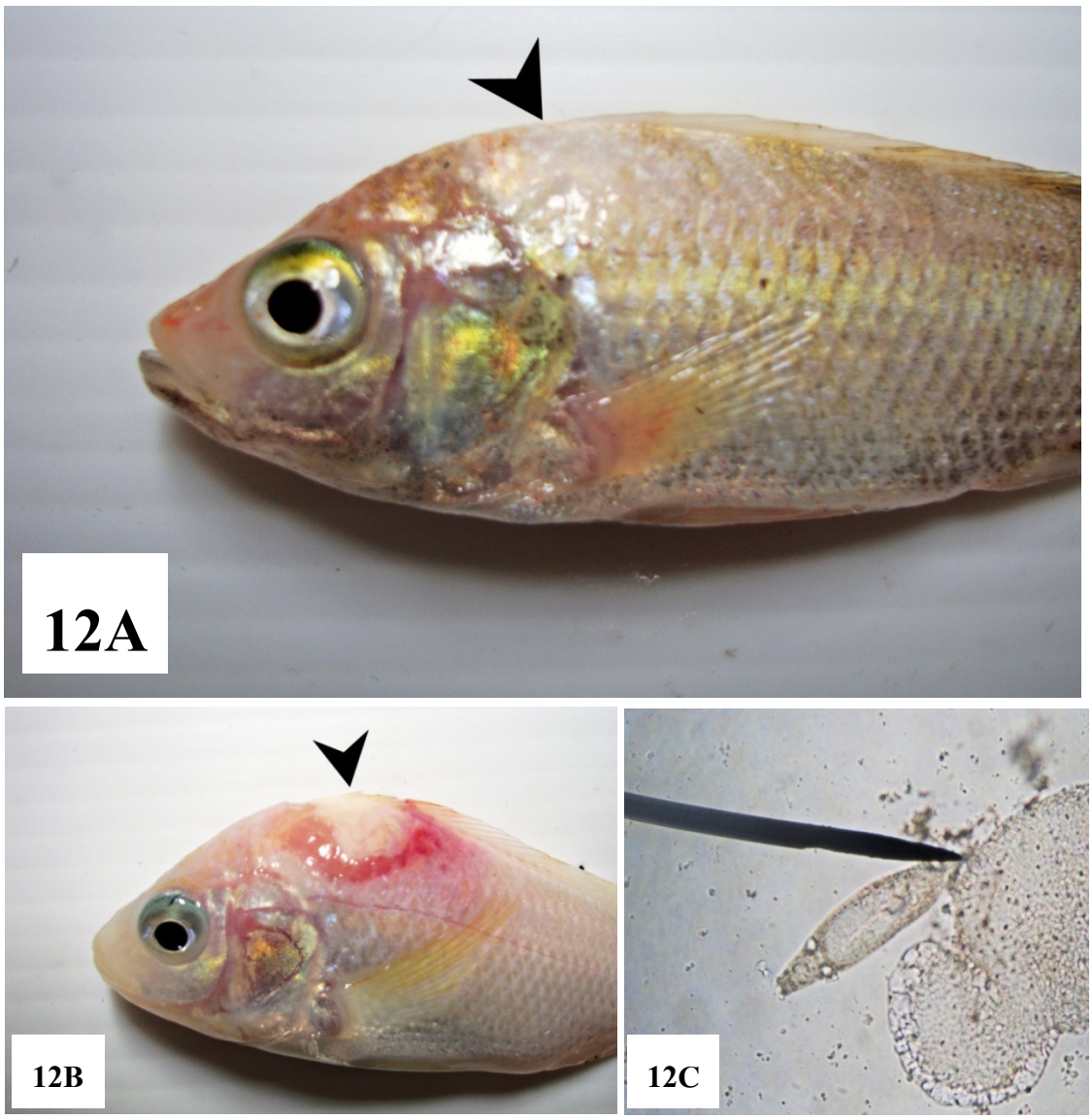
ทั้งนี้ตลอดการทดลองไม่พบอาการผิดปกติที่ได้กล่าวมาทั้งหมดรวมถึงสภาพที่ปลาอ่อนแอและเกิดบาดแผลเนื่องจากปรสิตภายนอกในปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม (ตารางที่ 11) ซึ่งปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีความสมบูรณ์แข็งแรง มีพฤติกรรมและการกินอาหารที่เป็นปกติตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดลอง

11A

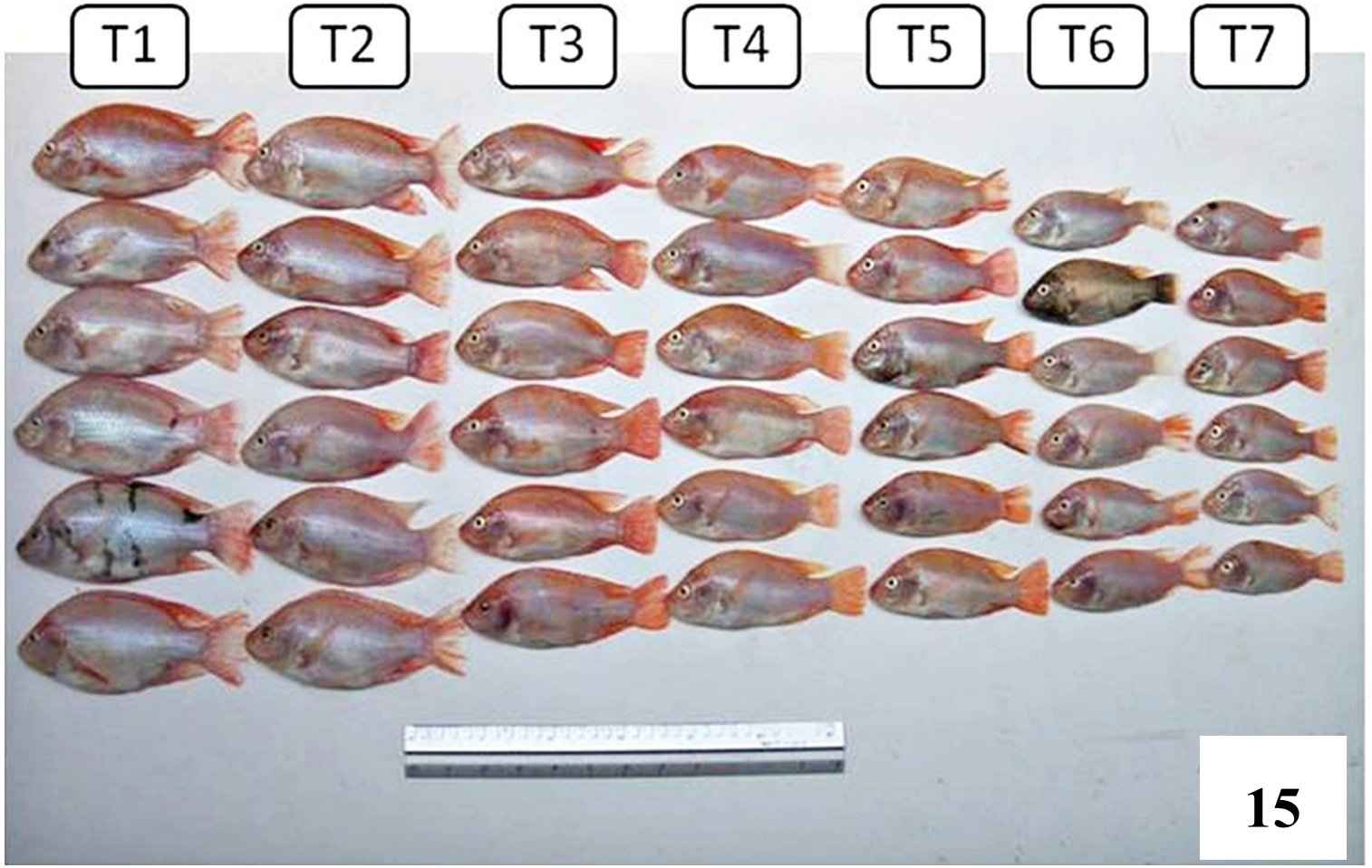
11B

11C

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของตัวปลาในระหว่างการทดลอง ปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีรูปทรงลำตัวปกติ สีของลำตัวเป็นสีแดงชมพู (11A) ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีนซึ่งผอมและสีของลำตัวซีดขาว (11B) หรือมีสีคล้ำขึ้นในบางบริเวณของลำตัว (11C)



ภาพที่ 12 ลักษณะผิดปกติภายนอกที่พบในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน พบลักษณะของเกล็ดที่นิ่มและหลุดลอก (12A) ทำให้เกิดบาดแผลจากการเข้าทำลายเนื้อเยื่อโดยประสิตภายนอก เกิดเป็นแผลขนาดใหญ่ (12B) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปลาตาย ปรสิตภายนอกที่พบได้แก่ปลิงใส (Monogenea: *Gyrodactylus* sp.) (12C)



ภาพที่ 13 รูปร่างและลักษณะภายนอกของปลาที่ได้รับอาหารทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง[1]

ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีนในอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	ลักษณะภายนอกและพฤติกรรมที่ผิดปกติจากการสังเกต			
		สัปดาห์ที่ 0-2	สัปดาห์ที่ 2-4	สัปดาห์ที่ 4-6	สัปดาห์ที่ 6-8
T1	สูตรควบคุม	ไม่พบความผิดปกติ (0/25)(0/25)(0/25)[2]	ไม่พบความผิดปกติ (0/25)(0/25)(0/25)	ไม่พบความผิดปกติ (0/25) (0/25)(0/25)	ไม่พบความผิดปกติ (0/25) (0/24)(0/25)
T2	0.5	ไม่พบความผิดปกติ (0/25)(0/25)(0/25)	พบความผิดปกติ 13.33% (4/25)(4/25)(2/25)	พบความผิดปกติ 24.72% (6/24)(7/24)(5/25)	พบความผิดปกติ 34.95% (8/23)(9/22)(7/24)
T3	1	พบความผิดปกติ 1.33% (0/25)(1/25)(0/25)	พบความผิดปกติ 13.56% (2/25)(4/24)(4/25)	พบความผิดปกติ 30.36% (10/25)(6/23)(6/24)	พบความผิดปกติ 44.93% (12/23)(10/23)(9/23)
T4	1.5	พบความผิดปกติ 1.33% (0/25)(0/25)(1/25)	พบความผิดปกติ 16.17% (5/25)(4/25)(3/24)	พบความผิดปกติ 30.56% (7/24)(7/24)(8/24)	พบความผิดปกติ 43.28% (12/24)(10/23)(8/22)
T5	2	พบความผิดปกติ 6.67% (1/25)(2/25)(2/25)	พบความผิดปกติ 20.17% (3/24)(7/25)(5/25)	พบความผิดปกติ 36.50% (9/24)(10/25)(8/25)	พบความผิดปกติ 55.93% (13/22)(13/23)(12/23)
T6	2.5	พบความผิดปกติ 12.00% (3/25)(4/25)(2/25)	พบความผิดปกติ 24.67% (5/24)(7/24)(6/25)	พบความผิดปกติ 32.77% (5/22)(9/24)(8/21)	พบความผิดปกติ 53.17% (9/21)(10/20)(14/21)
T7	3	พบความผิดปกติ 14.67% (3/25)(3/25)(5/25)	พบความผิดปกติ 28.46% (4/23)(9/25)(8/25)	พบความผิดปกติ 42.39% (7/21)(11/24)(12/25)	พบความผิดปกติ 56.75% (13/21)(11/22)(14/24)

[1]ค่าความผิดปกติ (%) คำนวณจากจำนวนปลาที่มีลักษณะผิดปกติ (ซ้ำที่ 1+2+3) หารด้วยจำนวนปลาที่เหลือทั้งหมด (ซ้ำที่ 1+2+3) ในแต่ละชุดการทดลอง

[2]ตัวเลขในวงเล็บเรียงตามลำดับซ้ำที่ 1, 2 และ 3 ในแต่ละชุดการทดลอง (จำนวนปลาที่มีลักษณะผิดปกติ/จำนวนปลาที่สังเกตทั้งหมดในช่วงเวลานั้น)

3.2 การเจริญเติบโต

3.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลแดงแปลงเพศตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 8 สัปดาห์แสดงไว้ในตารางที่ 12 พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวในแต่ละชุดการทดลองเริ่มมีความแตกต่างทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ภายหลังได้รับอาหารทดลอง ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (สูตรควบคุม) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด (10.93±0.20 กรัม) (p<0.05) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมีแนวโน้มลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุดในกลุ่มปลาชุดการทดลองที่ได้รับเมลามีน (9.36±0.81 กรัม) (p<0.05) และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุด (7.86±0.35 กรัม) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตร 3, 4, 5 และ 6 (p>0.05) ในช่วงสัปดาห์เป็นช่วงที่เริ่มพบความผิดปกติภายนอกในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน เมื่อดำเนินการทดลองถึงสัปดาห์ที่ 4 เริ่มพบความแตกต่างที่ชัดเจนของน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวระหว่างปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) (20.24±1.00 กรัมต่อ 9.58±0.26 กรัมตามลำดับ) น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวยังคงมีแนวโน้มลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (สูตรควบคุม) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด (54.29±2.30 กรัม) (p<0.05) รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุด (14.63±1.78 กรัม) (p<0.05)

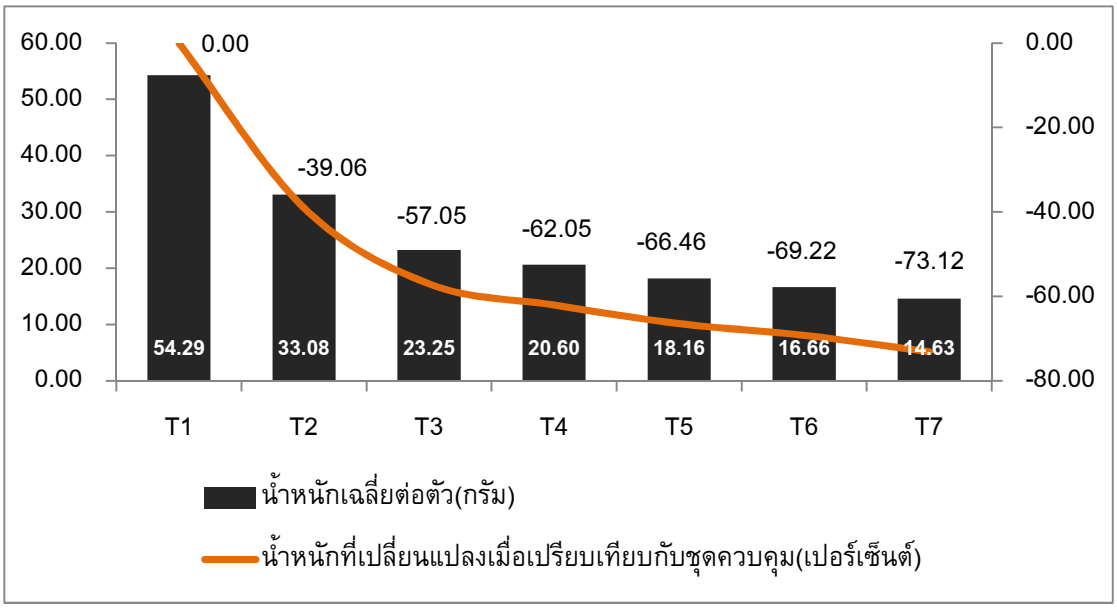
เมื่อนำค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวในสัปดาห์ที่ 8 มาคำนวณเป็นค่าน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลดลงเท่ากับ -39.06, -57.05, -62.05, -66.46, -69.22 และ -73.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลาจะมีการเจริญเติบโตลดลงมากกว่า 39 เปอร์เซ็นต์เมื่อปลาได้รับเมลามีนในระดับที่สูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร และการได้รับเมลามีนในระดับที่สูงขึ้นจะยิ่งส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 12 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีนในอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (กรัม)				
		น้ำหนักเริ่มต้น	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
T1	สูตรควบคุม	5.63±0.02	10.93±0.20^{c}	20.24±1.00^{e}	36.25±2.05^{f}	54.29±2.30^{e}
T2	0.5	5.63±0.01	9.36±0.81^{b}	15.03±0.88^{d}	23.81±1.58^{e}	33.08±2.04^{d}
T3	1	5.63±0.01	8.46±0.63^{a}	12.23±1.08^{c}	18.21±1.52^{d}	23.25±3.43^{c}
T4	1.5	5.63±0.01	8.32±0.45^{a}	11.34±0.98^{bc}	16.05±0.89^{cd}	20.60±1.62^{bc}
T5	2	5.63±0.01	8.27±0.23^{a}	10.58±0.12^{ab}	14.44±0.51^{bc}	18.16±1.10^{ab}
T6	2.5	5.63±0.01	7.91±0.20^{a}	10.19±0.88^{ab}	13.44±0.78^{ab}	16.66±1.19^{a}
T7	3	5.63±0.01	7.86±0.35^{a}	9.58±0.26^{a}	11.63±1.02^{a}	14.63±1.78^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาในแต่ละชุดการทดลองกับน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลแดงแปลงเพศเมื่อสิ้นสุดการทดลองใน 8 สัปดาห์แสดงไว้ในตารางที่ 13 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีแนวโน้มเป็นไปในแนวทางเดียวกับน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (865.30±43.89 เปอร์เซ็นต์) (p<0.05) รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) (488.01±36.73 เปอร์เซ็นต์) และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำที่สุด (159.78±32.20 เปอร์เซ็นต์) (p<0.05) เมื่อพิจารณาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเปรียบเทียบในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองพบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมีแนวโน้มต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมตั้งแต่ช่วง 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง (ภาพที่ 15) ซึ่งในช่วงเวลานี้เป็นช่วงเวลาที่ปลาในทุกชุดการทดลองเริ่มแสดงอาการผิดปกติภายนอกให้เห็น เมื่อเข้าสู่ช่วงสัปดาห์ที่ 4 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มต่ำกว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรก โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด (4.05±0.08 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) (p<0.05) รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) (3.16±0.11 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3.0 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด (1.70±0.22 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) (p<0.05) เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเปรียบเทียบในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองพบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมีแนวโน้มต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมตั้งแต่ช่วง 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง (ภาพที่ 16) ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด แนวโน้มยังคงเป็นเช่นนี้ในช่วงสัปดาห์ที่ 4-8 ทั้งนี้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในช่วงสัปดาห์ที่ 4-8 ของปลาในแต่ละชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงสัปดาห์ที่ 0-4

3.2.3 อัตรารอดตาย

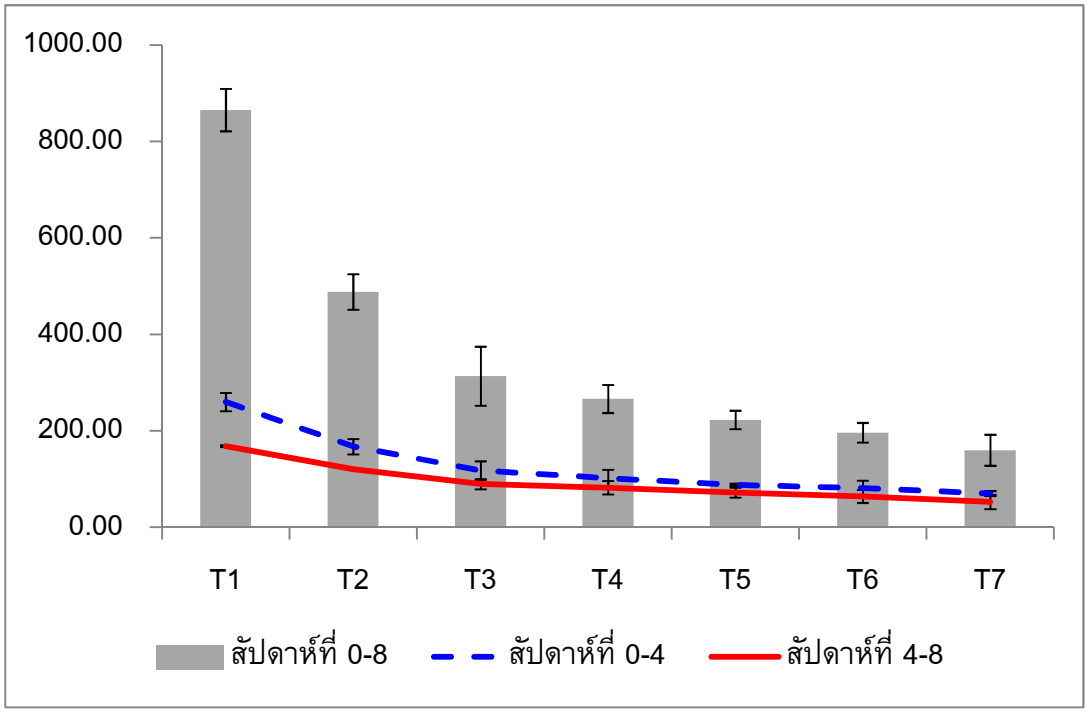
เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีอัตรารอดตายสูงที่สุด (98.67±2.31 เปอร์เซ็นต์) (p<0.05) ส่วนปลาในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนมีอัตรารอดตายอยู่ในช่วง (74.67±2.31 - 81.33±4.62 เปอเซ็นต์) ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 เริ่มมีการตายตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และเริ่มตายมากขึ้นเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 ซึ่งเป็นช่วงที่พบอาการผิดปกติภายนอก (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

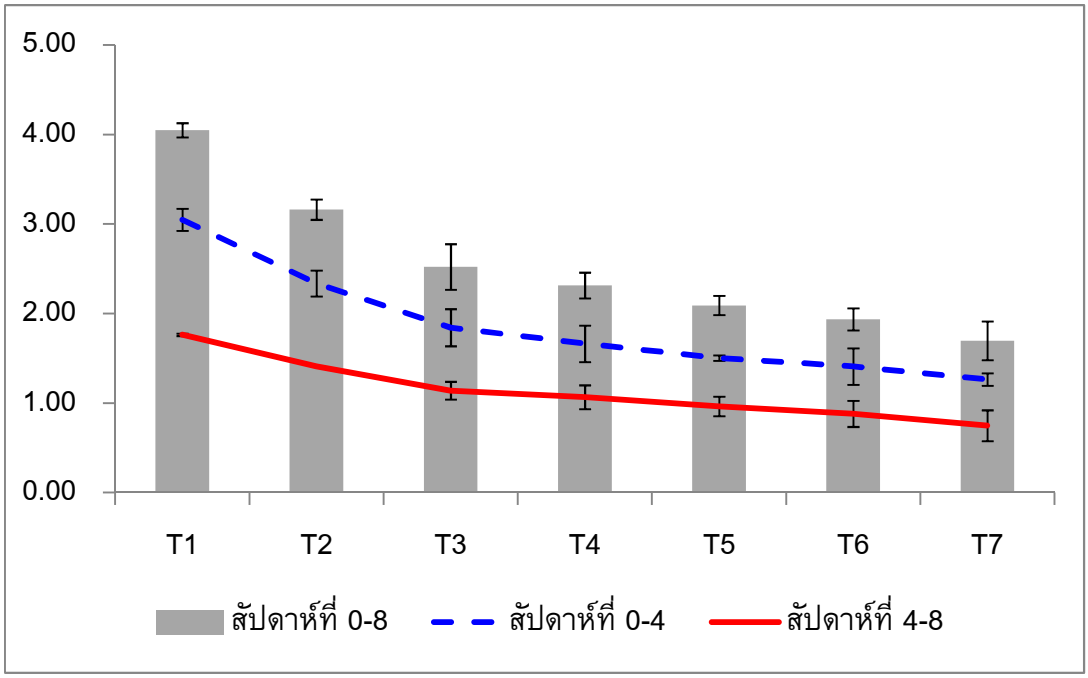
ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีนในอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
T1	สูตรควบคุม	865.30±43.89^{e}	4.05±0.08^{f}	98.67±2.31^{c}
T2	0.5	488.01±36.73^{d}	3.16±0.11^{e}	80.00±4.00^{b}
T3	1	313.19±61.30^{c}	2.52±0.26^{d}	80.00±4.00^{b}
T4	1.5	266.04±28.94b^{c}	2.31±0.14^{cd}	81.33±4.62^{b}
T5	2	222.74±19.02^{ab}	2.09±0.11^{bc}	74.67±2.31^{ab}
T6	2.5	195.99±20.45^{a}	1.93±0.12^{ab}	69.33±4.62^{a}
T7	3	159.78±32.20^{a}	1.70±0.22^{a}	76.00±6.93^{ab}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8



ภาพที่ 16 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8

3.2.4 ปริมาณอาหารที่ปลากินและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

รายละเอียดปริมาณอาหารที่ปลากินในแต่ละช่วงเวลาแสดงไว้ในภาพที่ 17 และตารางที่ 14 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีการกินอาหารเป็นปกติตลอดระยะเวลาที่ทดลอง ปริมาณอาหารที่กินเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยง ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีนตั้งแต่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เริ่มมีพฤติกรรมไม่ยอมรับอาหารและกินอาหารลดลงในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุม เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมีการกินอาหารลดลง และจะค่อยๆเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ปลากินอาหารเฉลี่ยต่อตัว 62.49±1.35 กรัม ซึ่งสูงที่สุดในทุกชุดการทดลอง (p<0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) กินอาหารเฉลี่ยต่อตัวน้อยที่สุด (25.34±2.70 กรัม) เมื่อนำปริมาณอาหารที่ปลากินมาคำนวณอัตราการกินอาหารพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 3.20±0.09 ถึง 3.85±0.25 เปอร์เซ็นต์ต่อตัวต่อวัน

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.28±0.03 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.43±0.05 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของเมลามีนในอาหาร โดยมีค่าสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.86±0.34 (ตารางที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงเวลาของการเลี้ยงพบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 0-4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละชุดการทดลองมีค่าต่ำกว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 4-8 นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 และ 7 (เมลามีน 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในช่วง 4 สัปดาห์แรกและ 4 สัปดาห์สุดท้ายที่ค่อนข้างต่างกันมาก (ภาพที่ 18)

3.2.5 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ

เมื่อพิจารณาค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนภายหลังสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงที่สุด (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 2.50±0.07 และค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีแนวโน้มลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 (เมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์) และสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนไม่ถึง 1 โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนปลาเท่ากับ 0.94±0.09 และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 มีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนต่ำที่สุดเท่ากับ 0.81±0.09 (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงเวลาของการเลี้ยงพบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 0-4 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ในแต่ละชุดการทดลองมีค่าต่ำกว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 4-8 นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่

ได้รับอาหารสูตรที่ 6 และ 7 (เมลามีน 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพการใช้โปรตีนในช่วง 4 สัปดาห์แรกและ 4 สัปดาห์สุดท้ายที่ค่อนข้างต่างกันมาก (ภาพที่ 19)

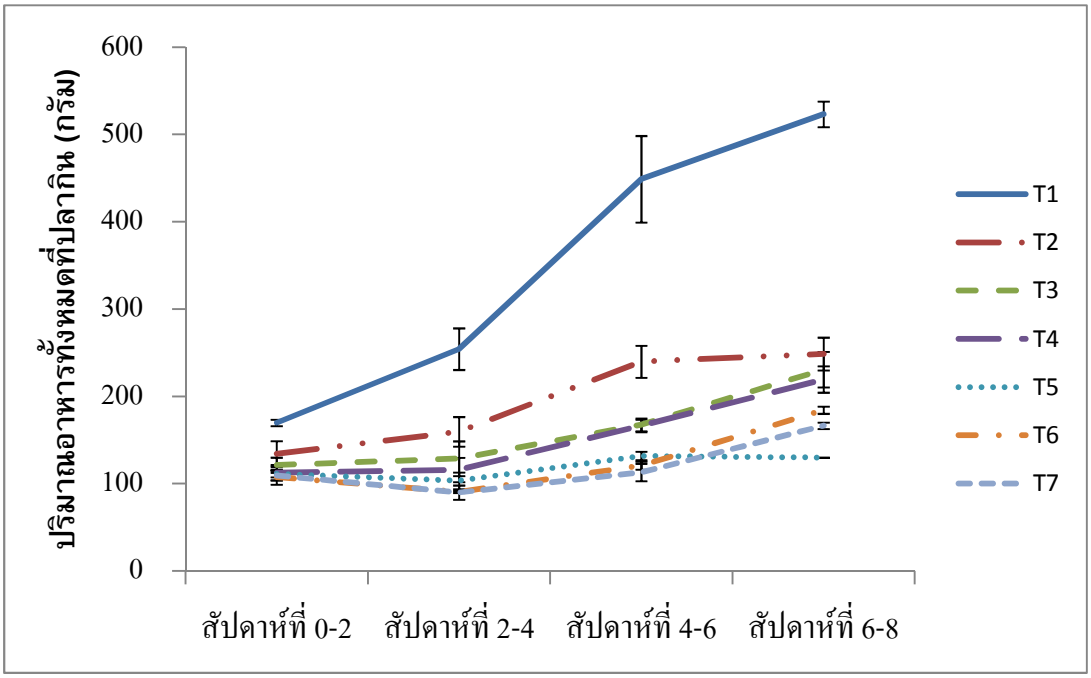
การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิเป็นไปในแนวทางเดียวกับประสิทธิภาพการใช้โปรตีนโดยมีค่าสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม (p<0.05) มีค่าเท่ากับ 38.41±1.69 เปอร์เซ็นต์และค่าการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิมีแนวโน้มลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยจะมีค่าต่ำสุดในทางสถิติ (p<0.05) ในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 (เมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์) และสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.96±1.34 และ 12.45±1.88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ปริมาณอาหารที่กินและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

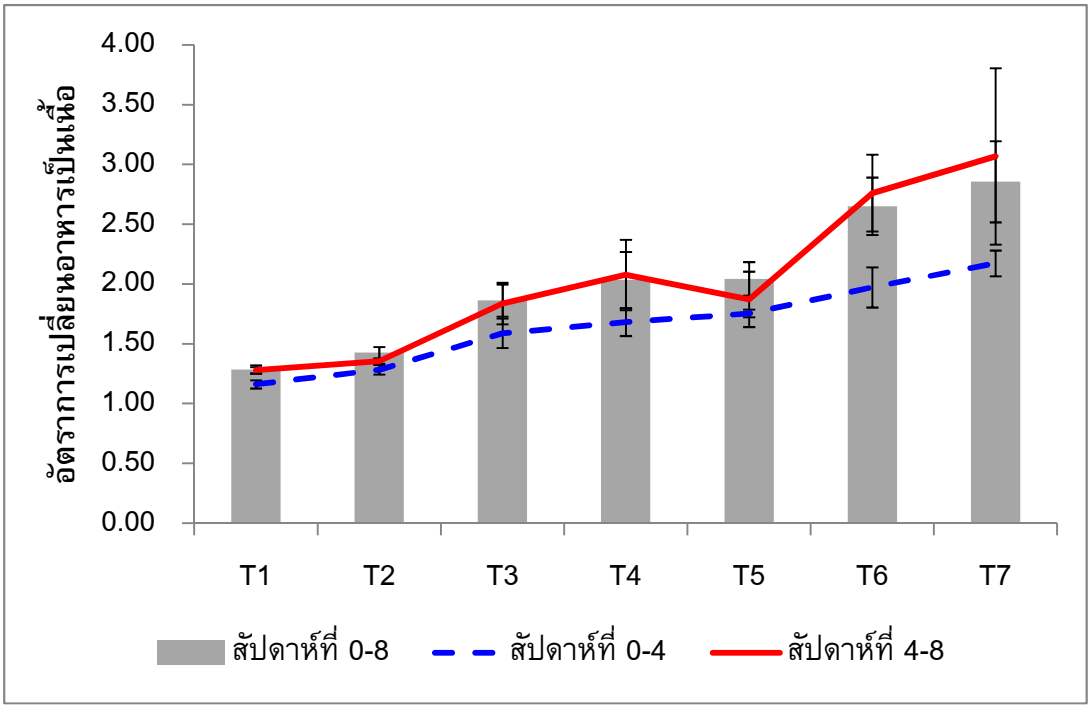
ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)	อัตราการกินอาหาร (เปอร์เซ็นต์/ตัว/วัน)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (เปอร์เซ็นต์)
T1	สูตรควบคุม	62.49±1.35^{d}	3.51±0.06^{bc}	1.28±0.03^{a}	2.50±0.07^{e}	38.41±1.69^{e}
T2	0.5	39.13±3.33^{c}	3.20±0.09^{a}	1.43±0.05^{a}	2.14±0.07^{d}	33.30±2.24^{d}
T3	1	32.52±4.08^{b}	3.57±0.08^{cd}	1.86±0.13^{b}	1.57±0.11^{c}	23.81±2.09^{c}
T4	1.5	30.21±0.95^{b}	3.69±0.15^{cde}	2.03±0.24^{b}	1.36±0.15^{b}	19.79±1.26^{b}
T5	2	25.53±1.37^{a}	3.28±0.12^{ab}	2.04±0.14^{b}	1.29±0.09^{b}	19.35±2.49^{b}
T6	2.5	29.08±1.57^{ab}	3.81±0.11^{ef}	2.65±0.24^{c}	0.94±0.09^{a}	13.96±1.34^{a}
T7	3	25.34±2.70^{a}	3.85±0.25^{f}	2.86±0.34^{c}	0.81±0.09^{a}	12.45±1.88^{a}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

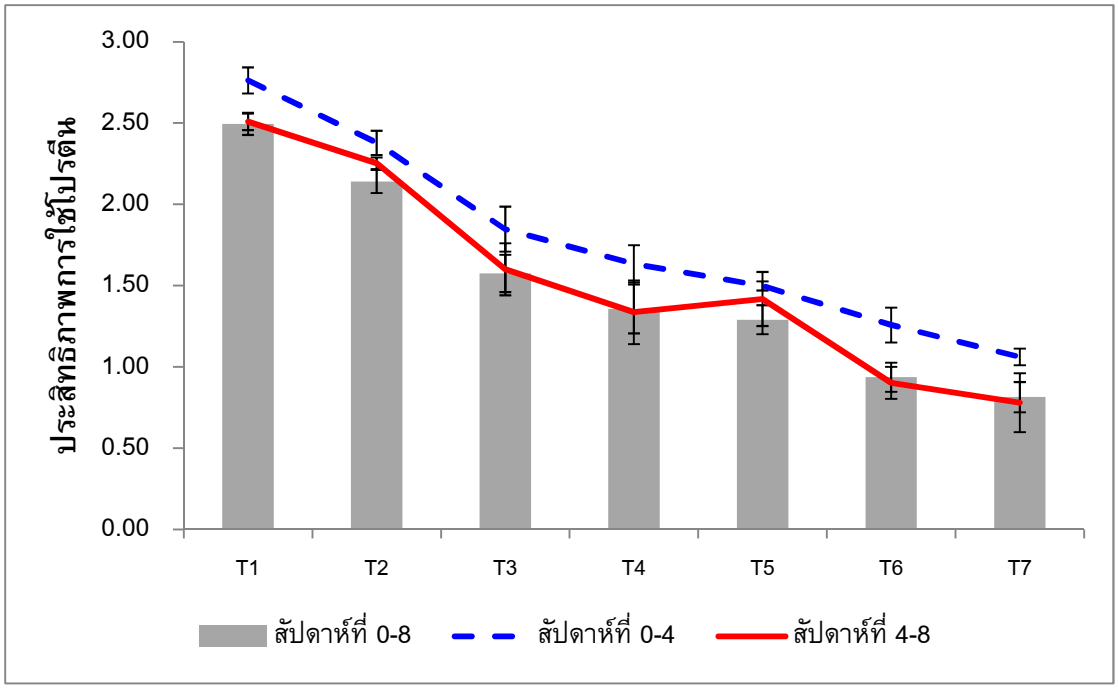
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)



ภาพที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณอาหารทั้งหมดที่ปลากินตลอดระยะเวลาทดลอง 8 สัปดาห์



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8



ภาพที่ 19 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตรในแต่ละช่วงเวลาของการทดลองได้แก่ สัปดาห์ที่ 0-4, สัปดาห์ที่ 4-8 และสัปดาห์ที่ 0-8

3.2.6 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาภายหลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ข้อมูลแสดงไว้ในตารางที่ 15 พบว่า ความชื้นในตัวปลาในแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 74.57±1.00-77.92±1.58 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในตัวปลามีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหารที่เพิ่มขึ้น ปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีโปรตีนในตัวต่ำที่สุด (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 56.44±1.86 เปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) มีโปรตีนในตัวสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 63.17±1.66 เปอร์เซ็นต์ ค่าโปรตีนในตัวปลามีแนวโน้มที่ต่างจากค่าไขมันในตัวปลา ปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีไขมันในตัวสูงที่สุด (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 20.06±1.39 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3.0 เปอร์เซ็นต์) มีไขมันในตัวต่ำที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 8.90±1.84 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในตัวปลาพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 และ 7 (เมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) มีปริมาณเถ้าในตัวสูงที่สุด (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 17.99±3.58 และ 18.20±2.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณเถ้าในตัวต่ำที่สุด (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 13.82±1.19 และ 13.19±0.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลา (เปอร์เซ็นต์) ของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ปลาก่อนทดลอง	-	77.01±0.57	56.04±0.31	16.37±1.79	15.93±0.32
T1	สูตรควบคุม	74.57±1.00^{a}	56.44±1.86^{a}	20.06±1.39^{d}	13.82±1.19^{a}
T2	0.5	75.01±1.22^{a}	57.18±1.64^{ab}	15.09±1.49^{c}	13.19±0.90^{a}
T3	1	75.57±0.74^{a}	57.26±2.02^{ab}	13.97±1.57^{c}	15.11±2.03^{abc}
T4	1.5	76.90±1.45^{a}	58.82±1.47^{b}	13.67±0.32^{bc}	14.75±4.25^{ab}
T5	2	76.52±1.74^{a}	59.17±1.41^{b}	13.51±0.80^{bc}	17.34±1.01^{bc}
T6	2.5	76.87±2.63^{a}	59.28±1.03^{b}	11.24±2.27^{ab}	17.99±3.58^{c}
T7	3	77.92±1.58^{a}	63.17±1.66^{c}	8.90±1.84^{a}	18.20±2.29^{c}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

3.2.7 องค์ประกอบเลือด

องค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์แสดงไว้ในตารางที่ 16 พบว่าค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) โดยมีค่าเท่ากับ 29.30±2.62 และ 5.59±0.24 g/dl ตามลำดับ ค่าฮีมาโตคริตในปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและสูตรที่มีเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 32.39±3.14-33.80±2.05 g/dl ส่วนค่าฮีโมโกลบินมีค่าสูงสุด (p<0.05) ในปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) โดยมีค่าเท่ากับ 6.69±0.45 และ 6.46±0.18 g/dl ตามลำดับ

ปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง7 สูตรมีปริมาณไอออนในซีรัม (Na+, K^+ และ Cl^-) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) โซเดียมไอออนมีค่าอยู่ในช่วง 167.85±0.49-173.00±1.27 mmol/L โดยมีค่าสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์) โปแตสเซียมไอออนมีค่าอยู่ในช่วง 1.81±0.63-2.62±0.68 mmol/L โดยมีค่าสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 (เมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์) และมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 (เมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์) และคลอไรด์ไอออนมีค่าอยู่ในช่วง 134.15±1.20-141.10±1.13 mmol/L (ตารางที่ 16) โดยมีค่าสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 (เมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์) และมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์)

ส่วนปริมาณ BUN และ Cr นั้นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของเครื่องมือที่จะยอมรับได้ (เครื่องอัตโนมัติ Beckman Cx-3 delta) ซึ่งในตารางที่ 16 จะแสดงด้วยตัวอักษร “P”กำหนดว่า BUN และ Cr ต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 2.0 และ 0.2 mg% ตามลำดับ

ตารางที่ 16 องค์ประกอบเลือดของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	BUN (mg%)	Cr (mg%)	Na^+ (mmol/L)	K^+ (mmol/L)	Cl^- (mmol/L)
T1	สูตรควบคุม	P	P	173.00±1.27[a]	1.83±0.42[a]	139.85±3.89[a]
T2	0.5	P	P	171.25±2.62[a]	2.08±0.81[a]	139.20±2.12[a]
T3	1	2.25±0.35	P	172.65±3.04[a]	1.81±0.63[a]	140.30±0.99[a]
T4	1.5	2.30±0.28	P	172.45±1.34[a]	1.72±0.13[a]	141.10±1.13[a]
T5	2	P	P	170.75±3.32[a]	2.62±0.68[a]	139.00±0.57[a]
T6	2.5	P	P	170.95±0.21[a]	2.25±0.81[a]	139.35±1.20[a]
T7	3	P	P	167.85±0.49[a]	2.00±0.59[a]	134.15±1.20[a]

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

P = Pending หมายถึง ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของเครื่องมือที่จะยอมรับได้ โดยกำหนดว่า BUN และ Cr ต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 2.0 และ 0.2 mg% ตามลำดับ

3.2.8 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลานิลแดงแปลงเพศ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อตับ ไต เหงือก และกระเพาะอาหารของปลานิลแดงแปลงเพศภายหลังได้รับอาหารทดลองในแต่ละสูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ ไต และเหงือกในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน มีแนวโน้มว่าจะพบความผิดปกติเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร ความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับพบช่องว่างเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม เซลล์ตับตายและมัน พบผลึกสีน้ำตาล-เหลืองและก้อนลักษณะคล้ายไขมันแทรกตัวอยู่ภายในเซลล์ตับในบางบริเวณ มีเม็ดเลือดแดงแทรกตัวภายในเซลล์มากผิดปกติ ความผิดปกติจะพบในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และมีแนวโน้มว่าปริมาณไกลโคเจนในตับจะลดลงเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีเมลามีนในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม

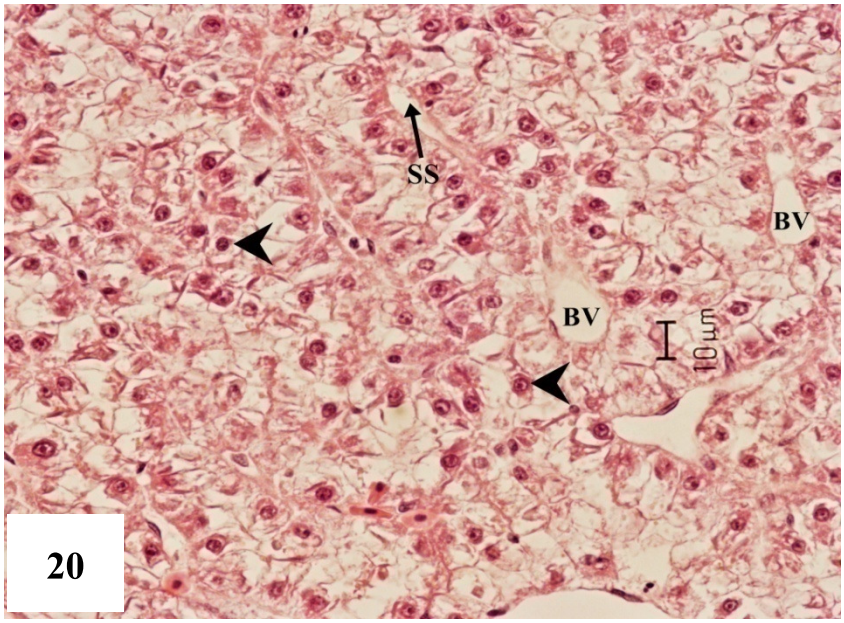
ในส่วนของเนื้อเยื่อไต เริ่มพบความผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ 1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยพบว่าท่อไตมีขนาดใหญ่กว่าปกติ เซลล์ท่อไตเกิดการตายและเสื่อมสลาย เกิดช่องว่างในส่วนของท่อไต แต่ไม่พบผลึกของเมลามีนตกค้างในส่วนของท่อไตในปลาที่ได้รับอาหารทุกชุดการทดลอง เนื้อเยื่อเหงือกเริ่มพบความผิดปกติในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยความผิดปกติที่พบมากได้แก่ การหลุดลอกและเกิด hyperplasia ของ epithelial cell ตกเลือด และ secondary lamellae บิดงอและเสียสภาพ ส่วนเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารไม่พบความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารในทุกชุดการทดลอง รายละเอียดความผิดปกติเพิ่มเติมแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ความผิดปกติที่พบในแต่ละอวัยวะภายหลังปลาได้รับอาหารที่มีเมลามีน เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

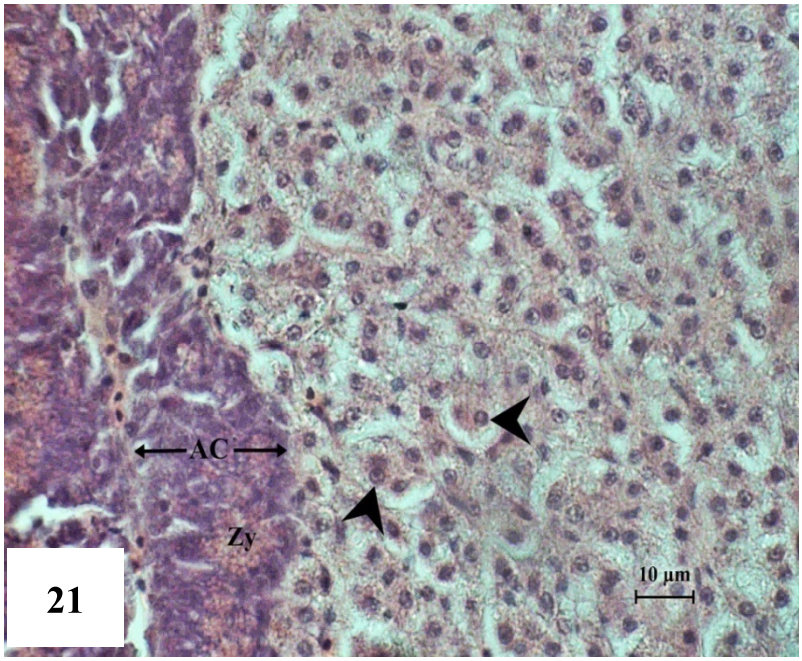
ความผิดปกติที่พบในแต่ละอวัยวะ	ปริมาณเมลามีนในอาหาร						
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3
เนื้อเยื่อตับ (H&E)							
- พบช่องว่างภายในไซโตพลาสซึม	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
- เซลล์ตับตาย	-	-	+	++	+++	+++	+++
- พบผลึกสีน้ำตาล	-	-	-	+	+++	+++	+++
- พบก้อนคล้ายไขมัน	-	-	-	-	-	++	++
- มีเม็ดเลือดแดงแทรกตัวภายในเซลล์มากผิดปกติ	-	-	-	+	++	+++	+++
- ผลึกที่เกิดจากเมลามีน	-	-	-	-	-	-	-
เนื้อเยื่อตับ (Best'carmine)							
- ไม่พบความผิดปกติใดๆเกิดขึ้น	-	-	-	-	-	-	-
เนื้อเยื่อไต (H&E)							
- เกิดช่องว่างในส่วนท่อไต	-	-	++	++	+++	+++	+++
- ท่อไตมีขนาดใหญ่กว่าปกติ	-	-	++	++	+++	+++	+++
- มีเม็ดเลือดแดงแทรกตัวภายในเซลล์มากผิดปกติ	-	-	+	+	++	++	++
- ผลึกที่เกิดจากเมลามีน	-	-	-	-	-	-	-
เนื้อเยื่อเหงือก (H&E)							
- Hyperplasia และเซลล์หลุดลอก	-	++	++	+++	+++	+++	+++
- ตกเลือด	-	-	+	+	+++	+++	+++
- secondary lamellae บิดงอและเสียสภาพ	-	-	+	++	+++	+++	+++
เนื้อเยื่อกระเพาะ(H&E)							
- ไม่พบความผิดปกติใดๆเกิดขึ้น	-	-	-	-	-	-	-

[1] - หมายถึง ไม่พบอาการผิดปกติ, + หมายถึงพบอาการผิดปกติ < 50%, ++ หมายถึงพบอาการผิดปกติอยู่ในช่วง 50-80%, +++ หมายถึงพบอาการผิดปกติมากกว่า 80%

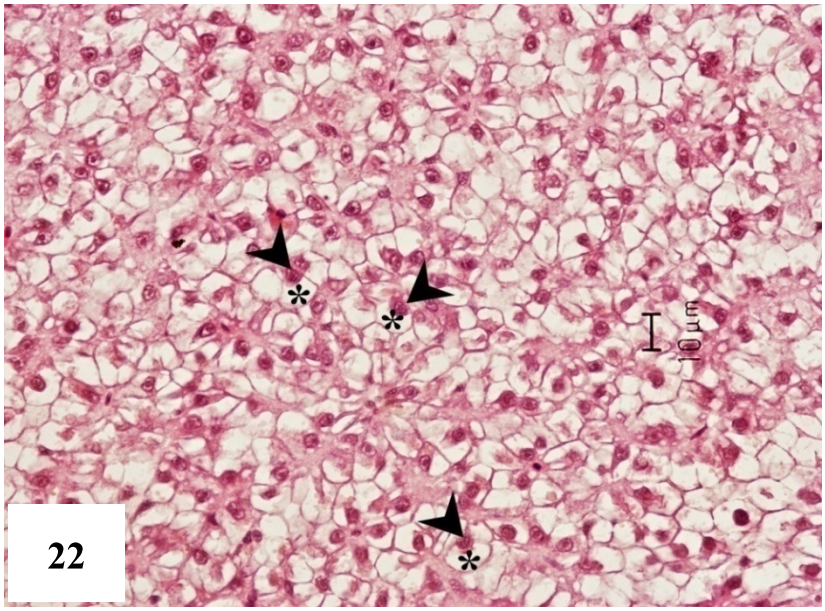
3.2.8.1 เนื้อเยื่อตับ



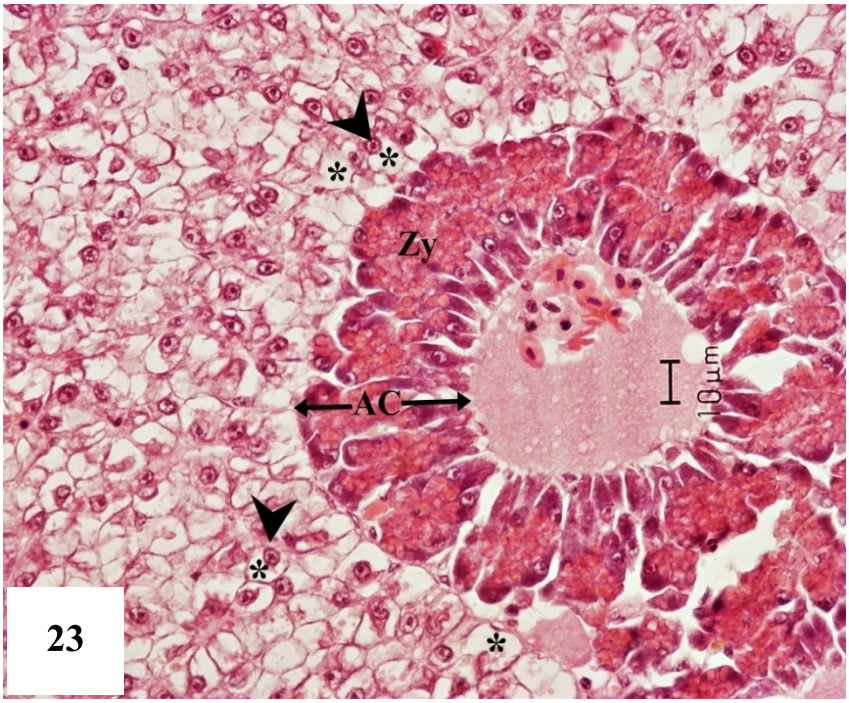
ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างเซลล์ตับ (arrow head) ที่เป็นปกติ นิวเคลียสย้อมติดสีชัดเจน; sagittal section through sinusoids-SS, branch of portal vein-BV (H&E, Bar=10µm, 400×)



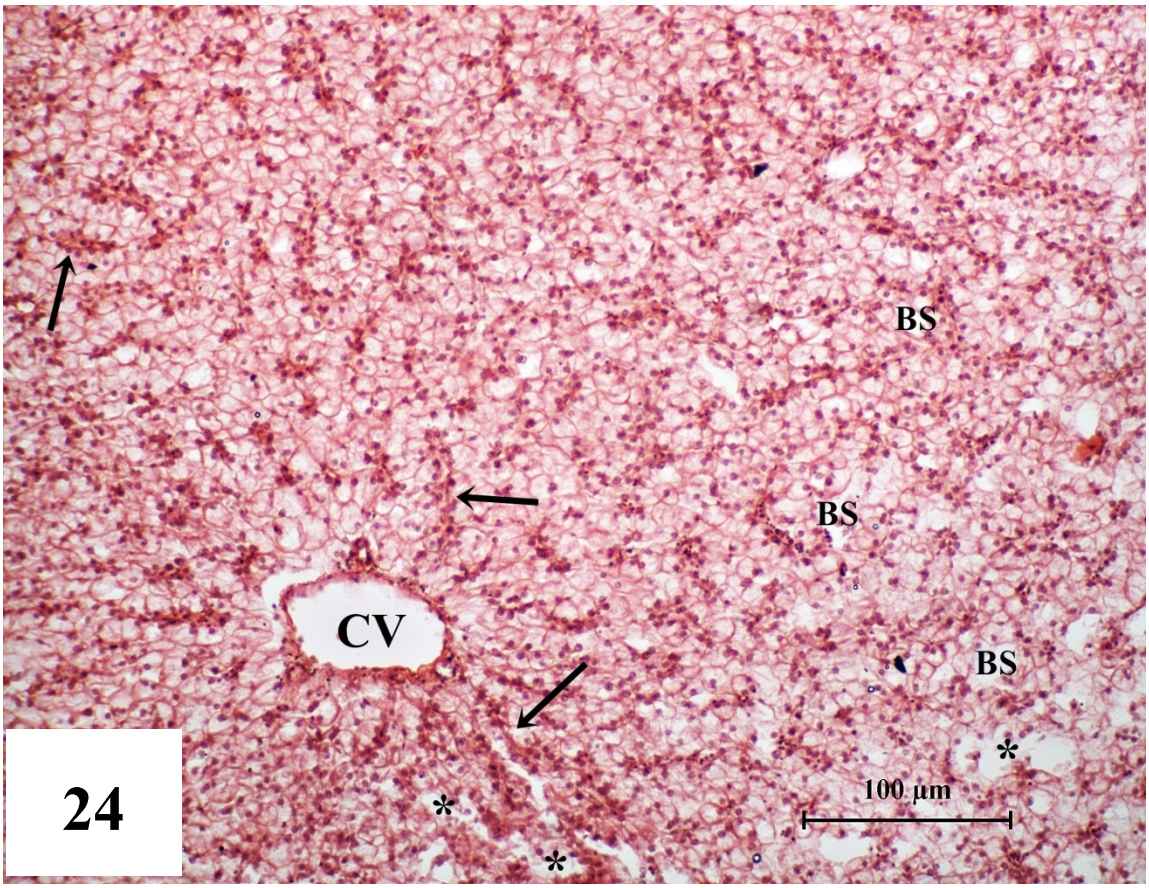
ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างเซลล์ตับ (arrow head) และตับอ่อนที่เป็นปกติ นิวเคลียสย้อมติดสีชัดเจน; zymogen granules-Zy, acinar cells-AC (H&E, Bar=10µm, 400×)



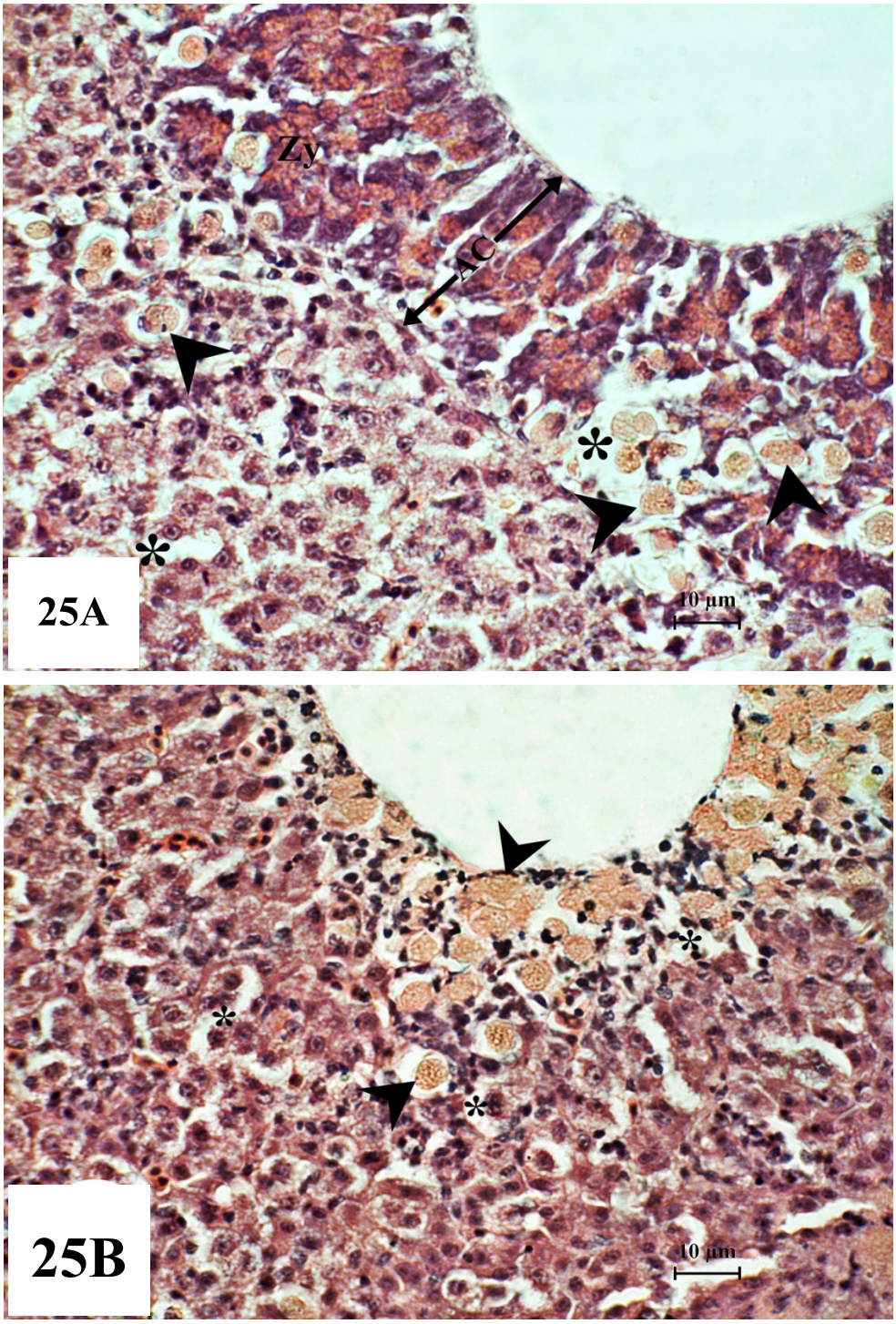
ภาพที่ 22 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติคือเซลล์ตับมีขนาดใหญ่กว่าปกติ มีช่องว่าง (asterisk) เกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ (arrow head) เป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบการตายของเซลล์ นิวเคลียสย้อมติดสีชัดเจน; (H&E, Bar=10µm, 400×)



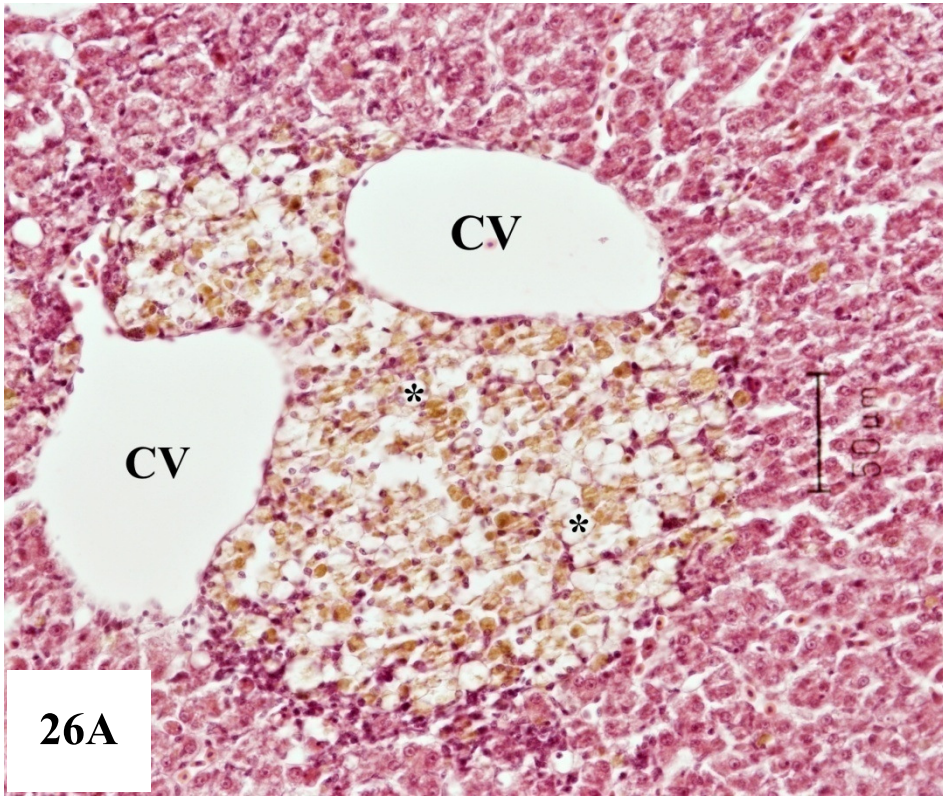
ภาพที่ 23 แสดงเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติคือเซลล์ตับมีขนาดใหญ่กว่าปกติ มีช่องว่าง (asterisk) เกิดขึ้นภายในไซโต-พลาสซึมของเซลล์ตับ (arrow head) เป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบการตายของเซลล์ นิวเคลียสย้อมติดสีชัดเจน; zymogen granules-Zy, acinar cells-AC (H&E, Bar=10µm, 400×)

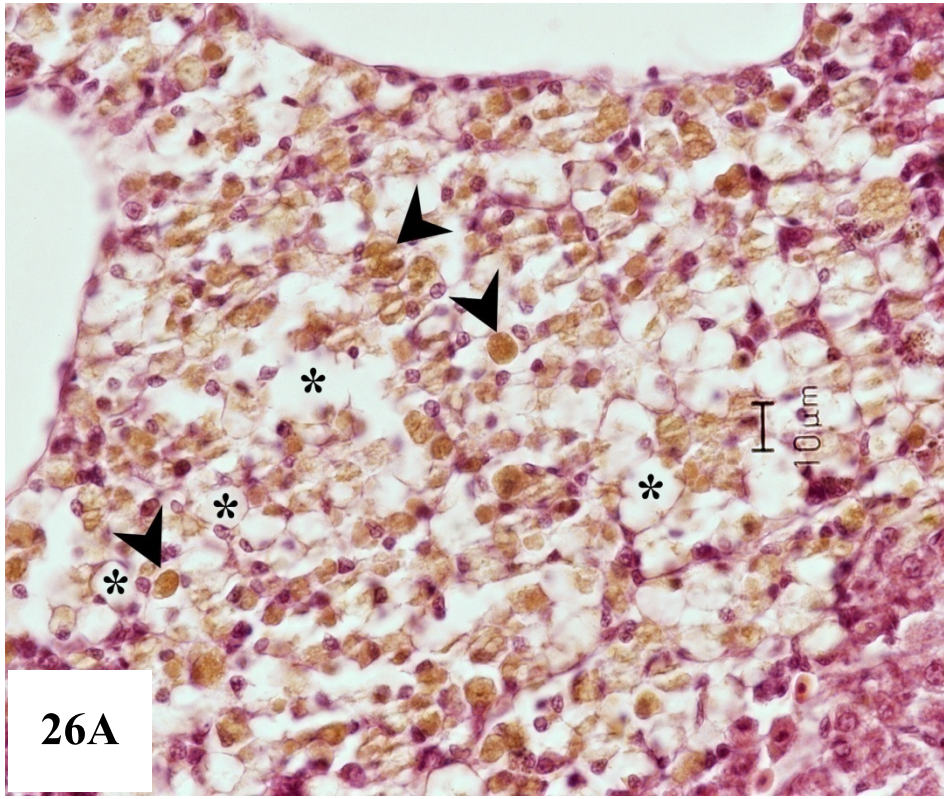


ภาพที่ 24 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบช่องว่างเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับเป็นจำนวนมาก เซลล์ตับมีขนาดใหญ่กว่าปกติ บางบริเวณพบเซลล์เกิดการเสื่อมสลายทำให้เซลล์บางส่วนไม่เกาะตัวกัน (asterisk) และมีเม็ดเลือดแดงแทรกตัวอยู่ในเนื้อเยื่อตับเป็นจำนวนมาก (arrow); central vein-CV, blood sinusoids-BS (H&E, Bar=100µm, 100×)

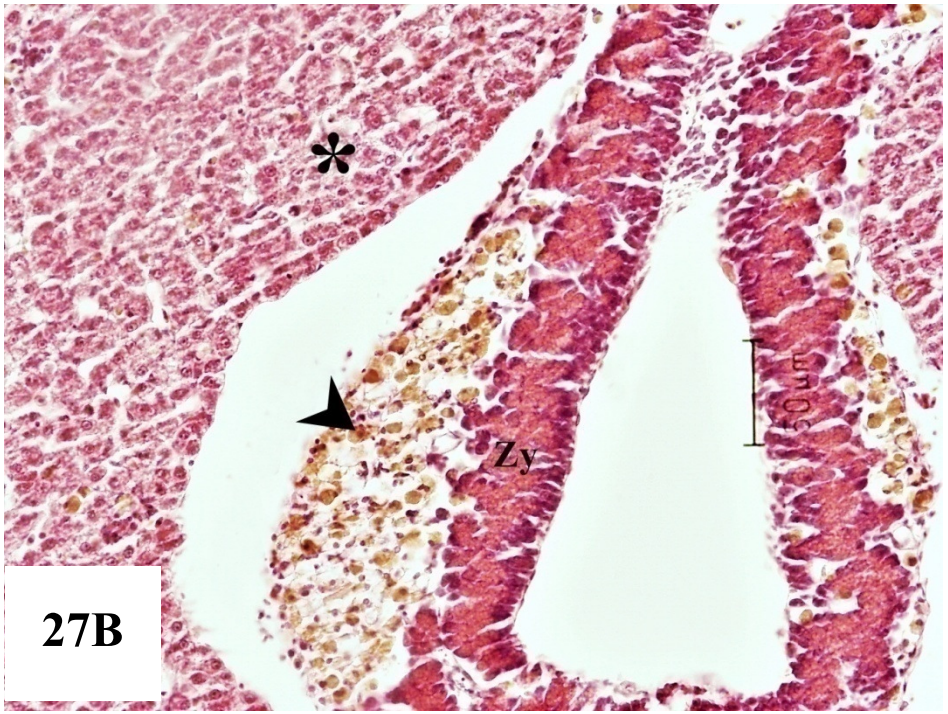


ภาพที่ 25 ลักษณะผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนและตับของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการเสื่อมสลายทำให้เซลล์บางส่วนไม่เกาะตัวกัน (asterisk) และพบผลึกสีน้ำตาลแทรกตัวอยู่ภายในเซลล์ตับอ่อน (25A) และตับ (25B) ในบางบริเวณเป็นจำนวนมาก (arrow head) เซลล์ตับมีการตายและนิวเคลียสสลายไป; zymogen granules-Zy, acinar cells-AC (H&E, Bar=10µm, 400×)

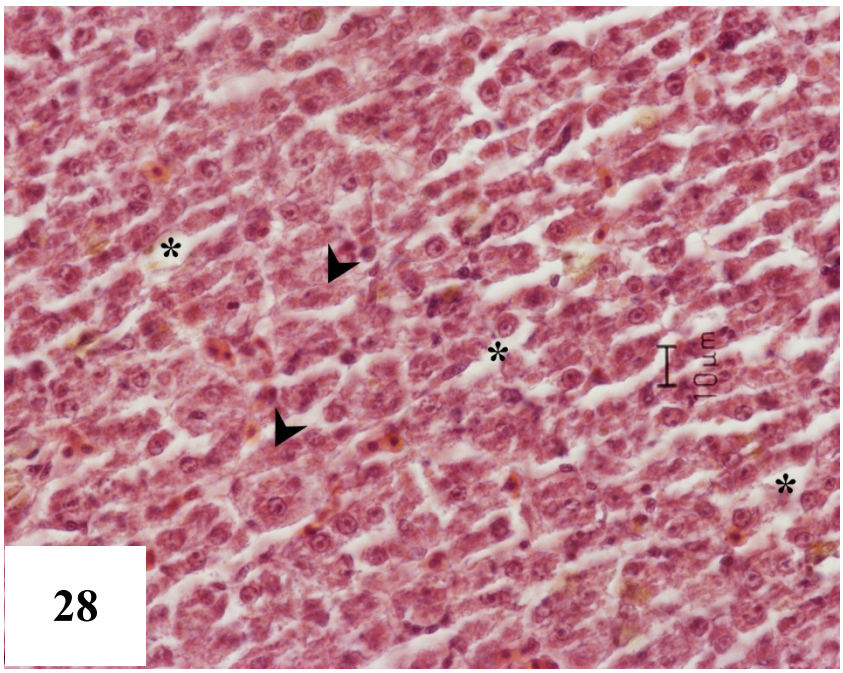




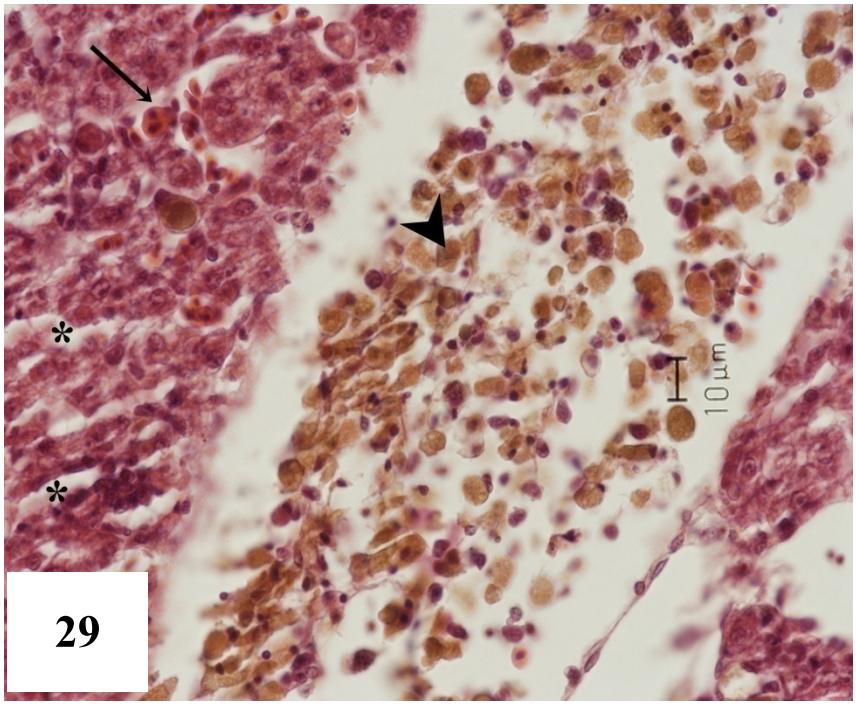
ภาพที่ 26 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบก้อนผลึกสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อตับ (arrow head) แทรกตัวอยู่โดยทั่วไปในเซลล์เนื้อเยื่อตับเป็นบริเวณกว้าง นอกจากนี้ยังพบเซลล์ตับที่ตายเป็นบริเวณกว้างและเซลล์บางส่วนไม่เกาะตัวกัน (26A) central vein-CV (H&E, Bar=50µm, 200×) เมื่อเพิ่มกำลังขยายจะพบช่องว่างเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ (asterisk) และพบก้อนผลึกสีน้ำตาลแทรกตัวอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ (arrow head) (26B) (H&E, Bar=10µm, 400×)



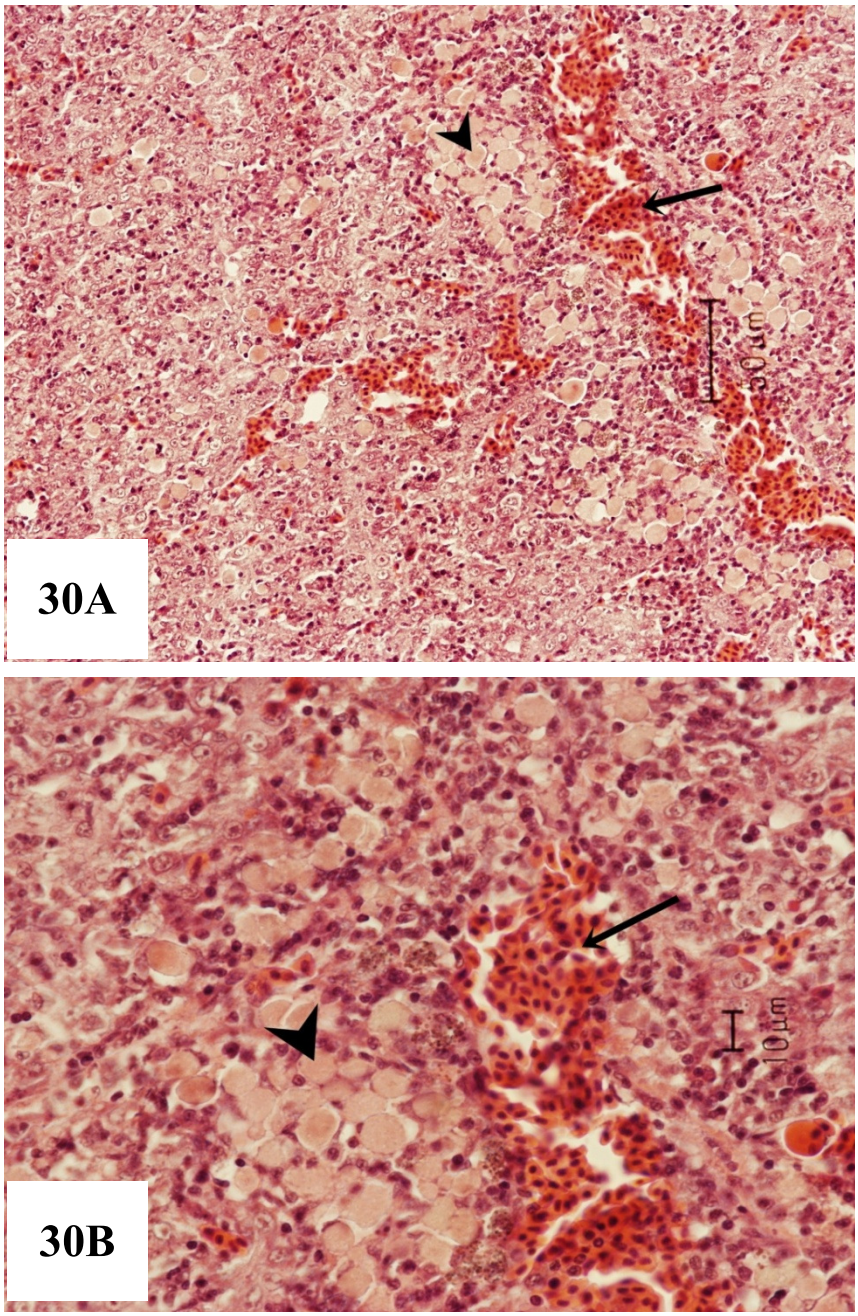
ภาพที่ 27 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของตับกับลักษณะเนื้อเยื่อที่ผิดปกติของปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนในระดับที่สูงกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบลักษณะผิดปกติภายนอกของตับ โดยตับมีสีเขียวคล้ำและมีขนาดใหญ่ผิดปกติ (27A) สอดคล้องกับลักษณะเนื้อเยื่อตับอ่อนที่ผิดปกติ โดยพบก้อนผลึกสีน้ำตาล แทรกตัวอยู่โดยทั่วไปในเซลล์เนื้อเยื่อตับอ่อนเป็นบริเวณกว้าง (arrow head) เซลล์ตับโดยรอบตายเป็นบริเวณกว้างและมีช่องว่างเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ตับ (asterisk) (27B); zymogen granules-Zy (H&E, Bar=50µm, 200×)



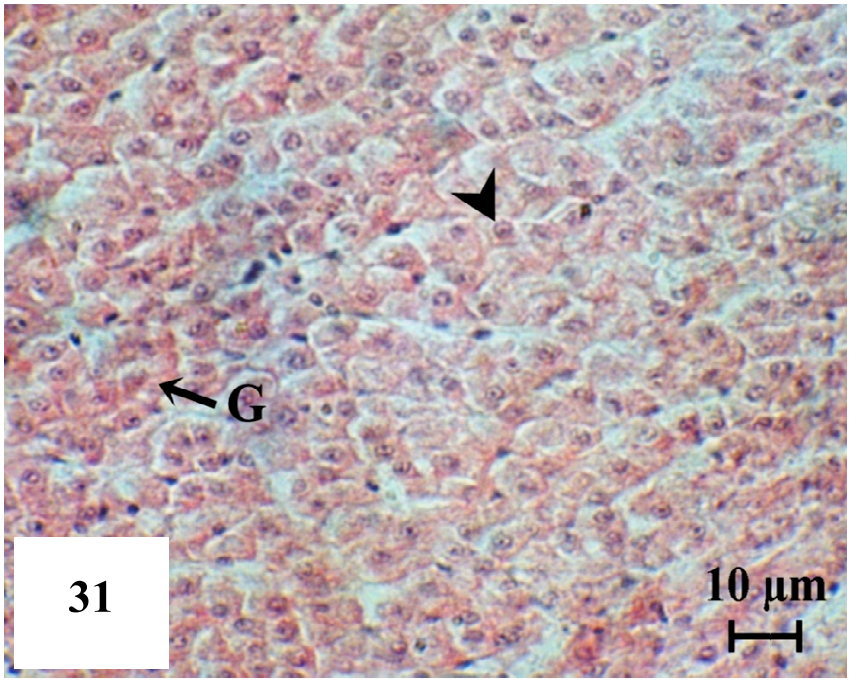
ภาพที่ 28 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบเนื้อเยื่อเซลล์ตับตายและเซลล์บางส่วนไม่เกาะตัวกัน (arrow head) ทำให้เกิดช่องว่างภายในเซลล์ (asterisk) (H&E, Bar=10µm, 400×)



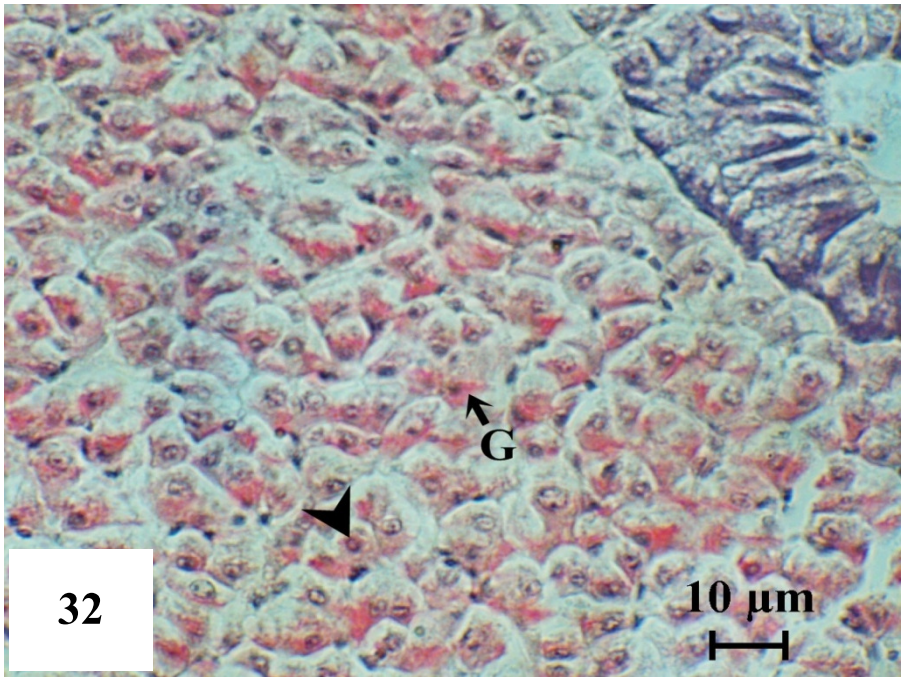
ภาพที่ 29 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบก้อนผลึกสีน้ำตาลแทรกตัวอยู่โดยทั่วไปในเซลล์เนื้อเยื่อตับเป็นบริเวณกว้าง (arrow head) เซลล์ตับโดยรอบตายเป็นบริเวณกว้างและมีช่องว่างเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ตับ (asterisk) และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่ภายในเนื้อเยื่อ (arrow); zymogen granules-Zy (H&E, Bar=10µm, 400×)



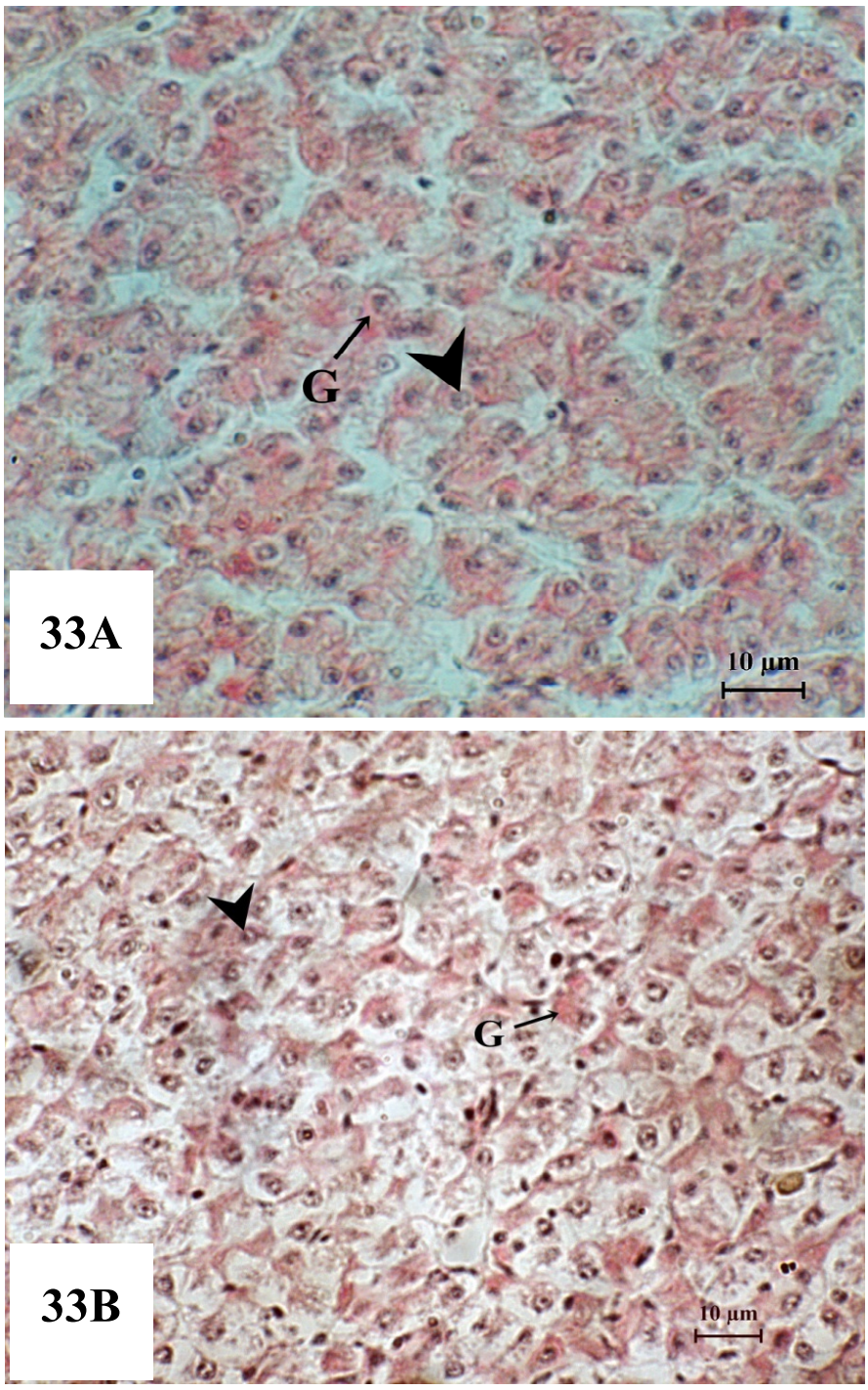
ภาพที่ 30 เนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนมากกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบก้อนลักษณะคล้ายไขมันแทรกตัวอยู่ในเซลล์ตับ (arrow head) เซลล์ตับโดยรอบตายเป็นบริเวณกว้างและมีช่องว่างเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ตับและพบเซลล์เม็ดเลือดแดงแทรกตัวอยู่ภายในเนื้อเยื่อตับมากผิดปกติ (arrow) (H&E, Bar=50µm, 200×) (30A) เมื่อเพิ่มกำลังขยายในบริเวณเดียวกัน พบก้อนลักษณะคล้ายไขมันแทรกตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ (arrow head) และพบเซลล์เม็ดเลือดแดงแทรกตัวอยู่ภายในเนื้อเยื่อตับมากผิดปกติ (arrow) (H&E, Bar=10µm, 400×) (30B)



ภาพที่ 31 การสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบเซลล์ตับมีลักษณะปกติ ย้อมติดสีนิวเคลียส (arrow head) มีไกลโคเจนสะสมในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับซึ่งจะย้อมติดสีชมพูแดง (Best's Camine, Bar=10µm, 400×)

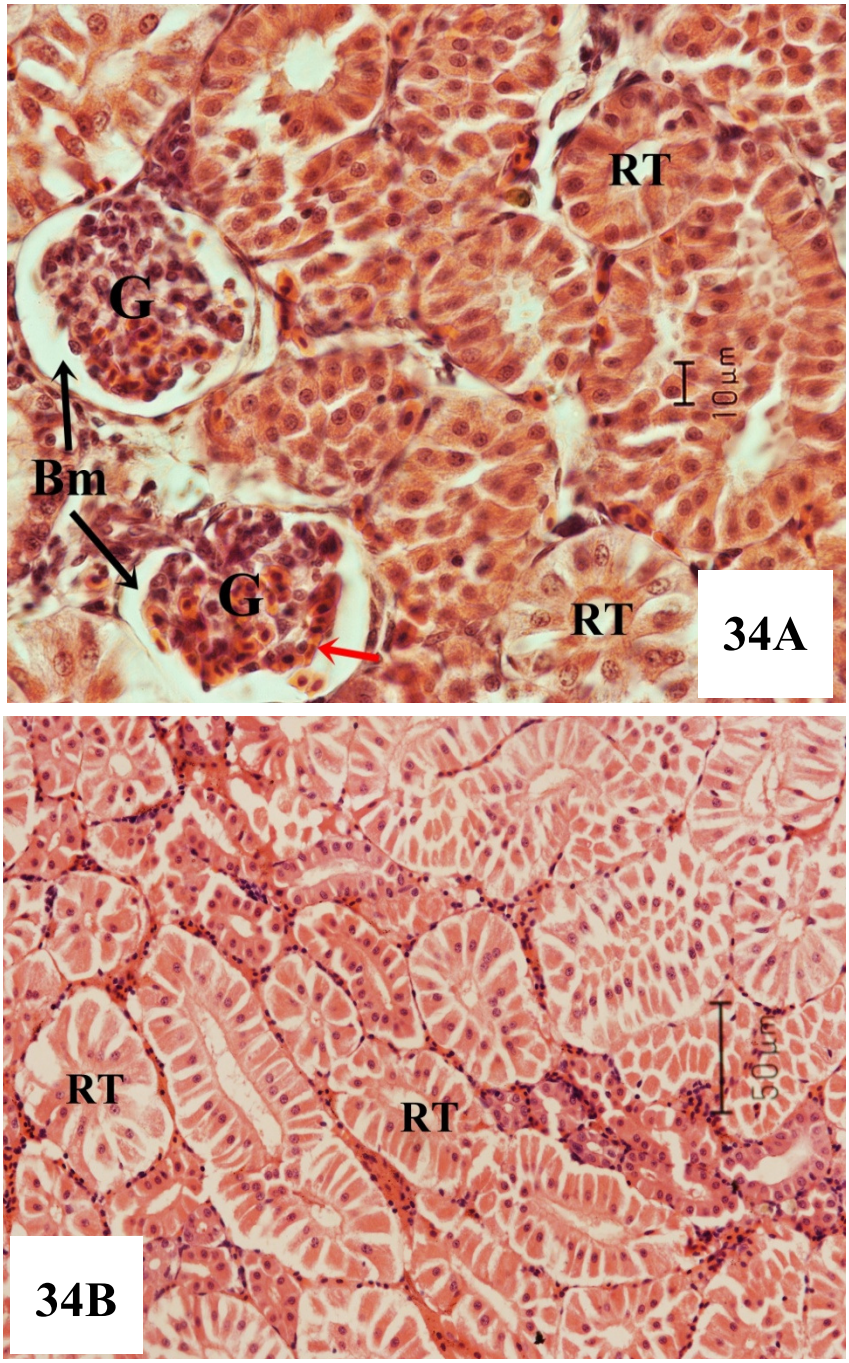


ภาพที่ 32 การสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบเซลล์ตับมีลักษณะปกติ ย้อมติดสีนิวเคลียส (arrow head) มีไกลโคเจนสะสมในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับซึ่งจะย้อมติดสีชมพูแดง (Best's Camine, Bar=10µm, 400×)

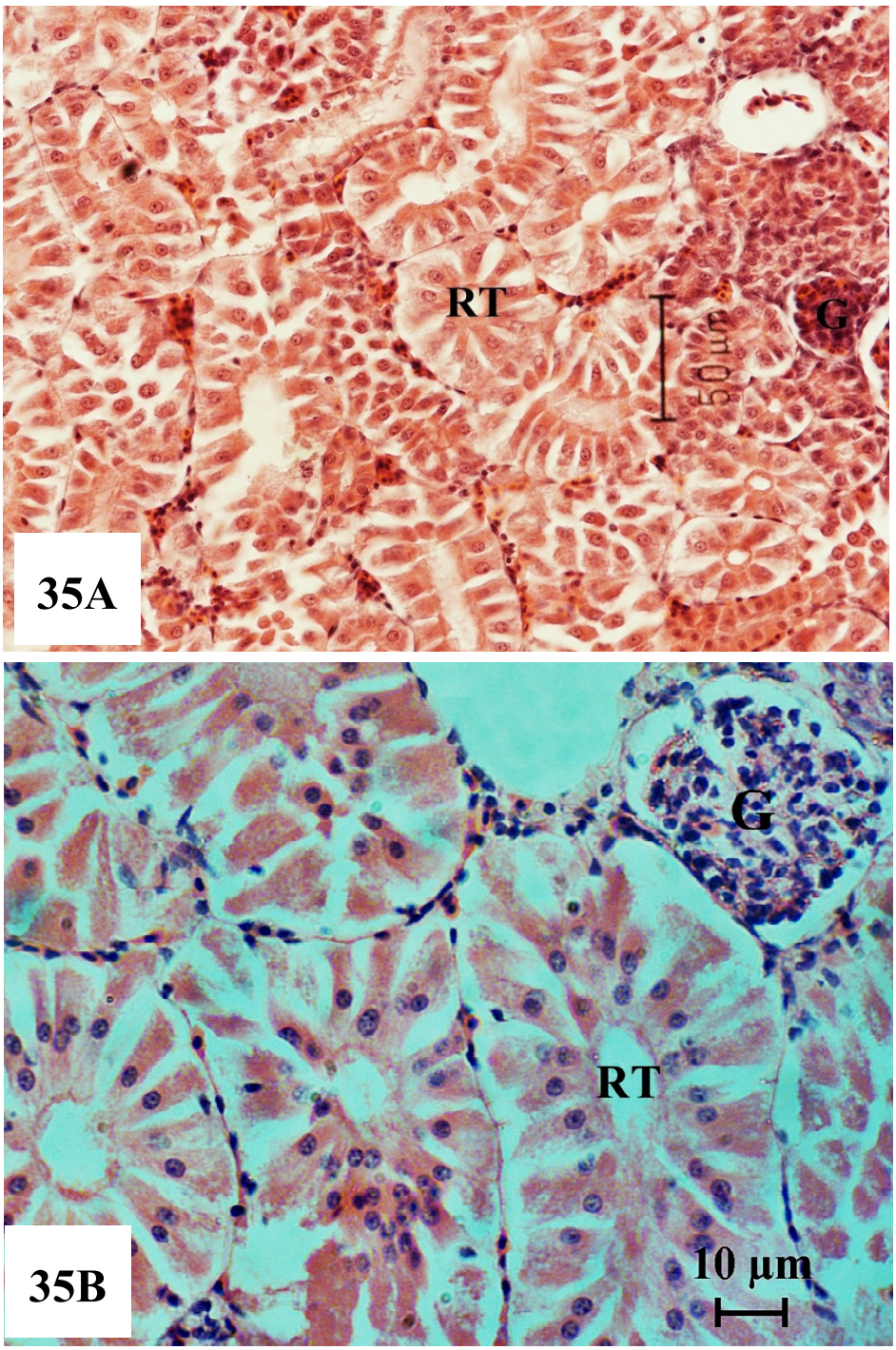


ภาพที่ 33 การสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อตับปลาภายหลังได้รับอาหารที่มีเมลามีนระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (33A) และ 3 เปอร์เซ็นต์ (33B) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบเซลล์ตับมีลักษณะปกติ ย้อมติดสีนิวเคลียส (arrow head) มีไกลโคเจนสะสมในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับซึ่งจะย้อมติดสีชมพูแดง (Best's Camine, Bar=10µm, 400×)

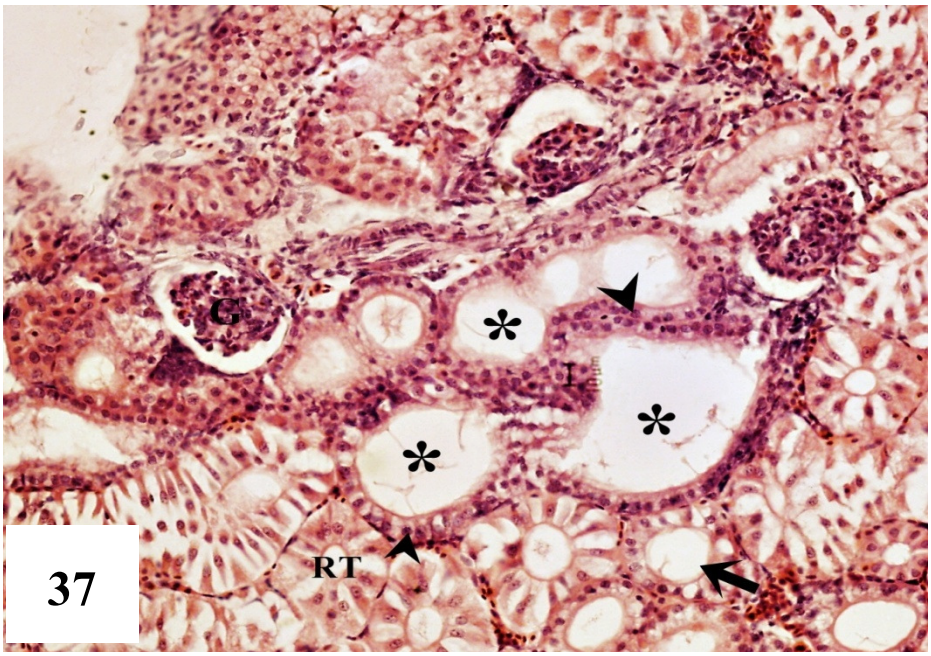
3.2.8.2 เนื้อเยื่อไต



ภาพที่ 34 เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างเซลล์บริเวณท่อไตและโกลเมอรูลัสเป็นปกติ; glomerulus-G, Bowman's space-Bm, renal tubules –RT, red blood cell in capillary (red arrow) (36A: H&E, bar=10 µm, 400×, 36B: H&E, bar=50 µm, 200×)

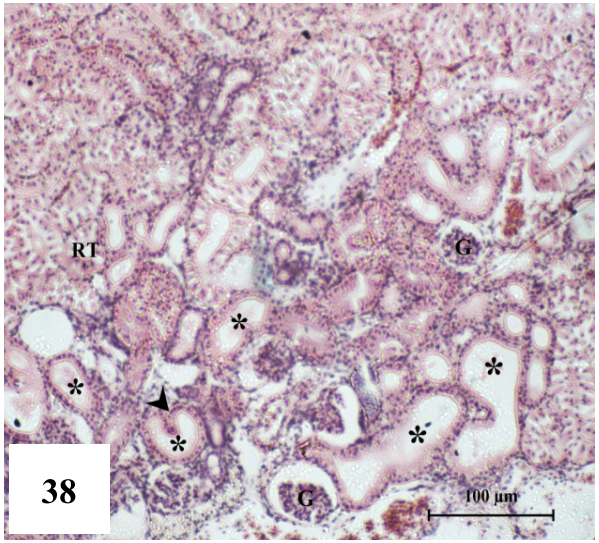


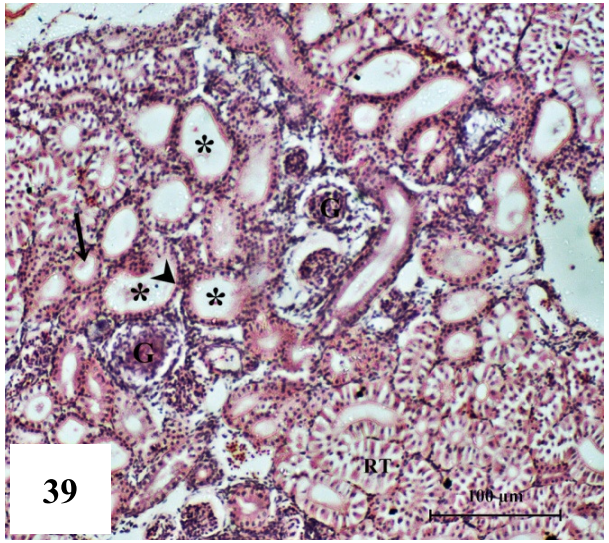
ภาพที่ 35 เนื้อเยื่อไตปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างเซลล์บริเวณท่อไตและโกลเมอรูลัสเป็นปกติ; glomerulus-G, renal tubules–RT (37A: H&E, bar=50 µm, 200×, 37B: H&E, bar=10 µm, 400×)

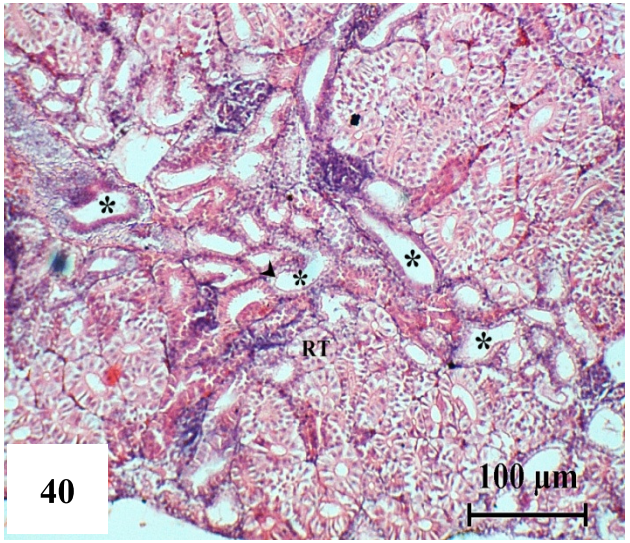


ภาพที่ 36 เนื้อเยื่อของไตปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติของเซลล์บริเวณท่อไตที่เกิดการเสื่อมสลายส่งผลให้เกิดช่องว่างในท่อไต (asterisk) เมื่อเปรียบเทียบกับท่อไตที่ยังปกติ (RT) เมื่อเพิ่มกำลังขยายให้สูงขึ้นในบริเวณท่อไตที่ผิดปกติ (asterisk) (H&E, bar=100 µm, 100×)

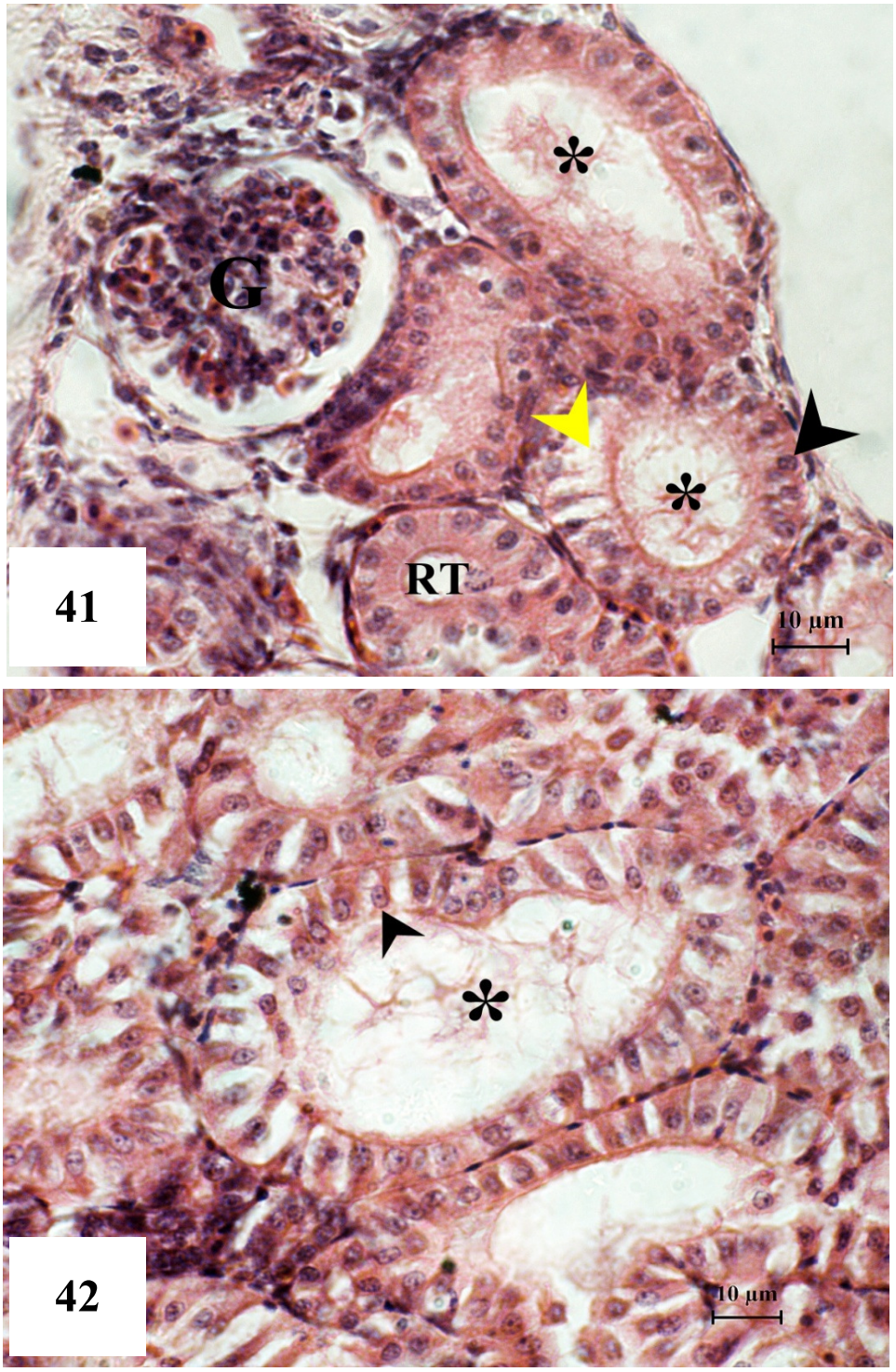
ภาพที่ 37 ความผิดปกติเนื้อเยื่อของไตปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ ท่อไตมีขนาดใหญ่ขึ้นและ columnar cell ถูกดันมาอยู่ชิด epithelial cell (arrow head) เมื่อเปรียบเทียบกับท่อไตที่เริ่มแสดงความปกติให้เห็น (arrow) และท่อไตที่ยังปกติ (RT); glomerulus (G); renal tubules (RT) (H&E, bar=10 µm, 400×)



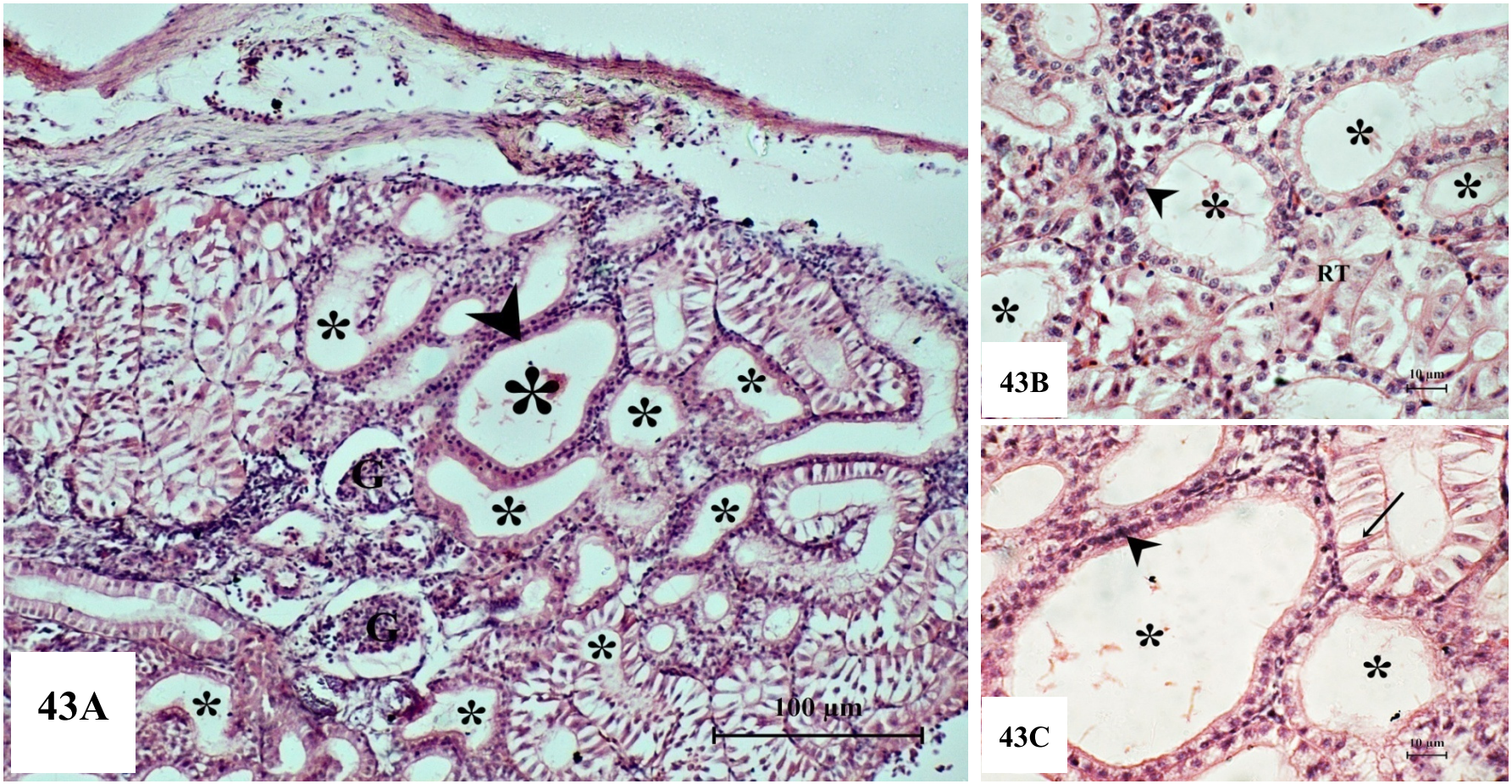




ภาพที่ 38 - 40 เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบความผิดปกติของเซลล์บริเวณท่อไตที่เกิดการเสื่อมสลายส่งผลให้เกิดช่องว่างในท่อไต (asterisk) หรือ columnar cell ถูกดันมาอยู่ชิด epithelial cell (arrow head) ท่อไตมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับท่อไตที่ยังปกติ (RT) คล้ายกับมีสิ่งแปลกปลอมไปอุดตันบริเวณท่อไต นอกจากนี้ยังพบว่า epithelial cell ที่บุรอบท่อไตบางบริเวณยังพบนิวเคลียสเป็นปกติแสดงว่าท่อไตยังไม่ได้เกิดการเสื่อมสลายหรือตายทั้งหมด และมีแนวโน้มว่าอาการผิดปกติจะแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อปลาได้รับเมลามีนในระดับที่สูงขึ้น; glomerulus (G); renal tubules (RT) (ภาพที่ 38, 39 และ 40 H&E, bar=100 µm, 100×)

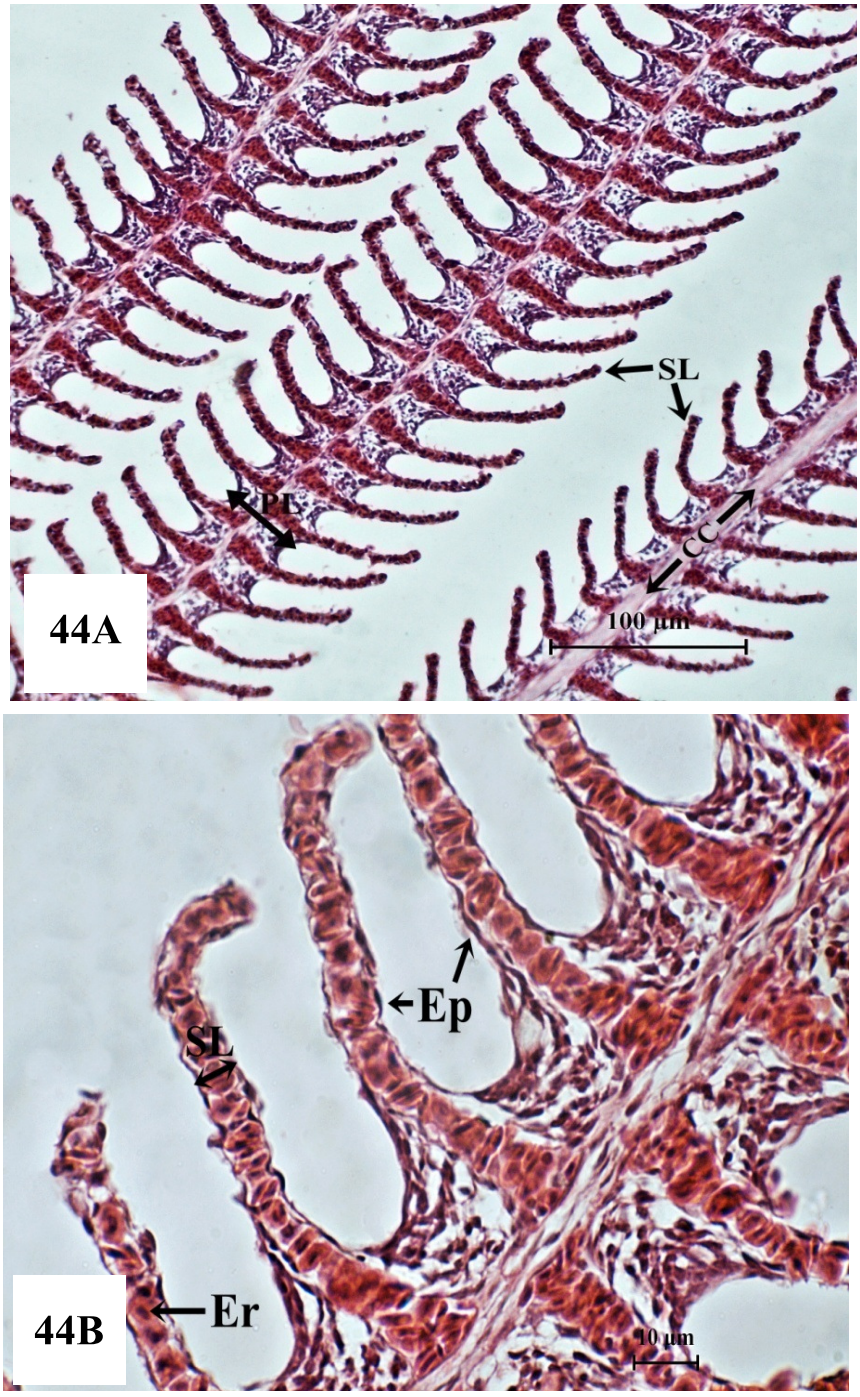


ภาพที่ 41 และ 42 เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบความผิดปกติของท่อไตซึ่ง columnar cell ถูกดันออกมาอยู่ชิด epithelial cell (arrow head) คล้ายกับมีสิ่งแปลกปลอมไปอุดตันบริเวณท่อไต และบางเซลล์เกิดการเสื่อมสลายไป (yellow arrow head) ส่งผลให้เกิดช่องว่างในท่อไต (asterisk); glomerulus-G, renal tubules -RT (ภาพที่ 41 และภาพที่ 42 H&E, bar=10 µm, 400×)

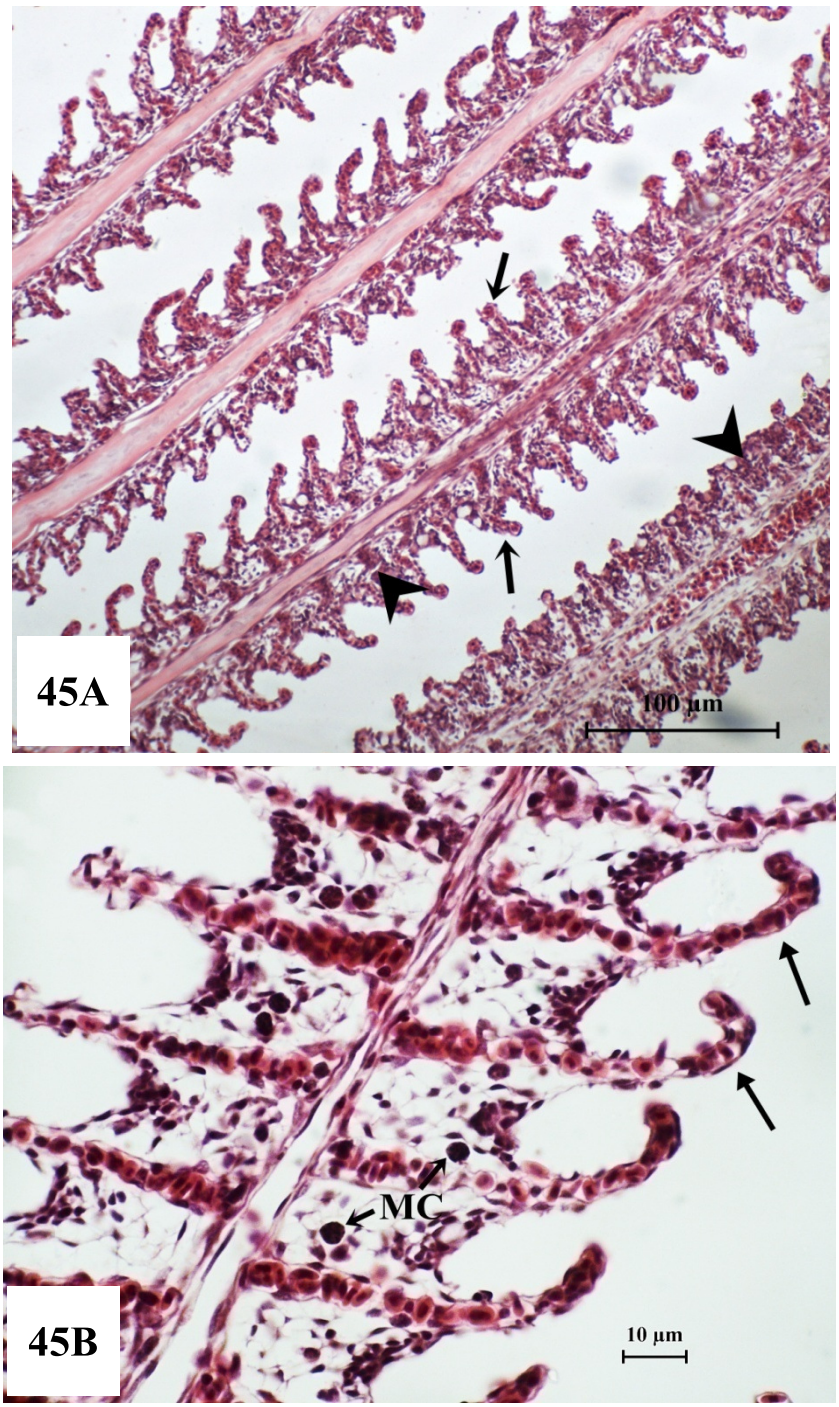


ภาพที่ 43 เนื้อเยื่อไตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบความผิดปกติของท่อไตขยายขนาด เกิดช่องว่างขนาดใหญ่คล้ายกับมีสิ่งแปลกปลอมไปอุดตันบริเวณท่อไต (asterisk) เป็นบริเวณกว้าง; glomerulus-G (43A, H&E, bar=100 µm, 100×) เมื่อเพิ่มกำลังขยายในส่วนของท่อไตที่ผิดปกติพบว่า columnar cell ถูกดันออกมาอยู่ชิด epithelial cell (arrow head) และเซลล์เกิดการลีบฝ่อ (arrow) (43B และ 43C: H&E, bar=10 µm, 400×)

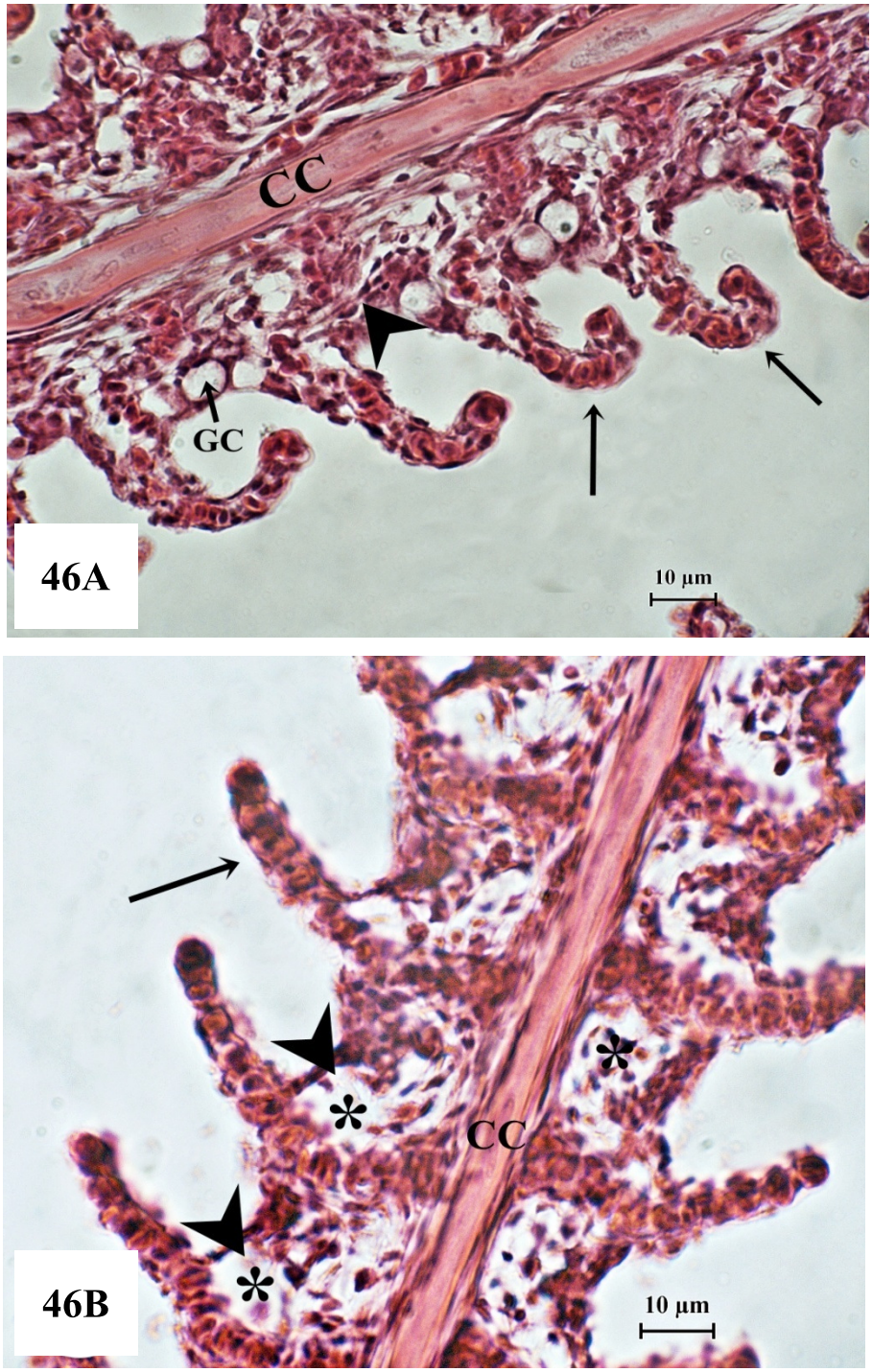
3.2.8.3 เนื้อเยื่อเหงือก



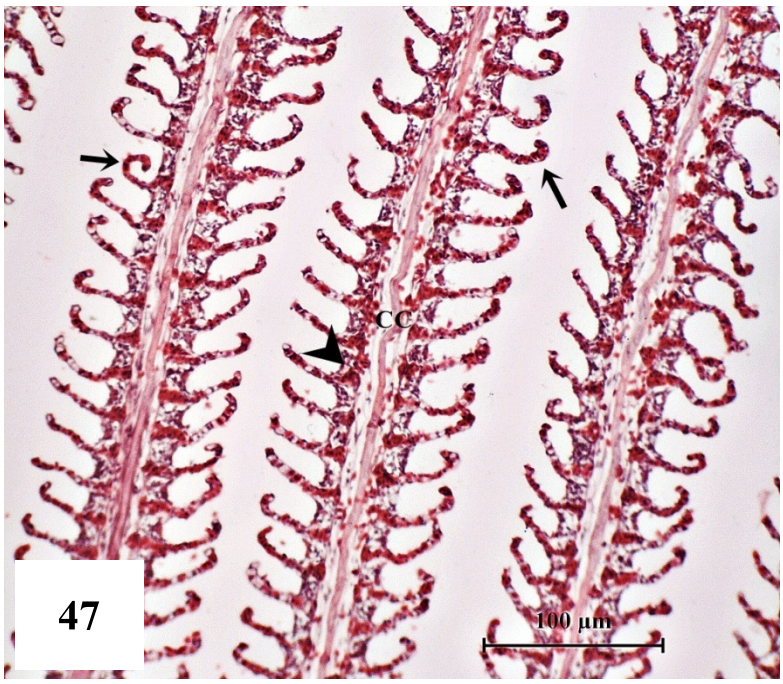
ภาพที่ 44 เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบเนื้อเยื่อในส่วนของ primary lamella (PL) และ secondary lamella (SL) มีการจัดเรียงตัวที่เป็นปกติ (44A) (H&E, bar=100 µm, 100×) เมื่อเพิ่มกำลังขยายให้สูงขึ้นไม่พบการแบ่งที่ผิดปกติของ epithelial cell (Ep) (44B); erythrocyte-Er (H&E, bar=10 µm, 400×)

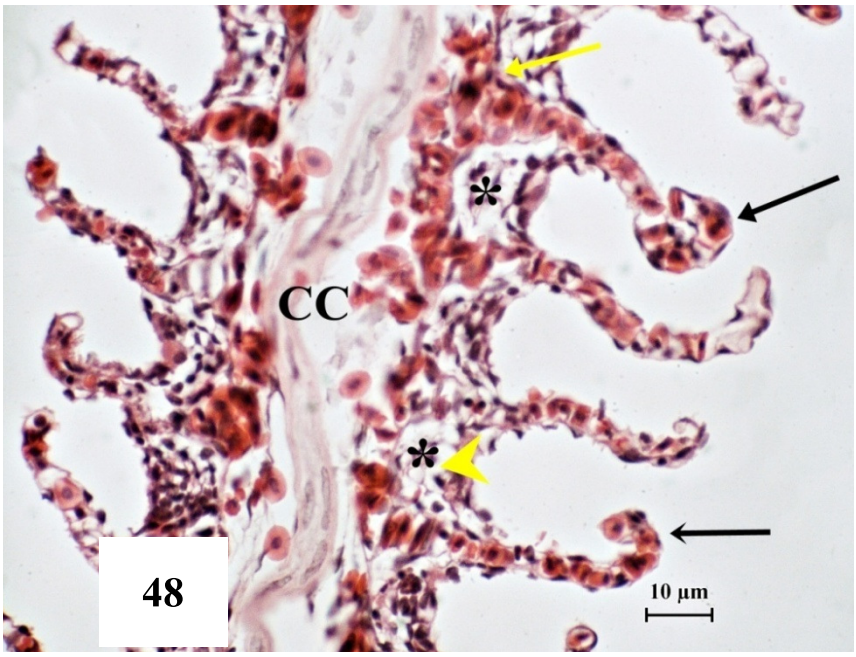


ภาพที่ 45 เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อในส่วนของ epithelial cell เกิดการ hyperplasia (arrow head) และหลุดลอก secondary lamella (SL) เกิดการบิดงอและเสียรูปร่าง (arrow) (45A) (H&E, bar=100 µm, 100×) พบ mucous cell-MC (45B) (H&E, bar=10 µm, 400×)



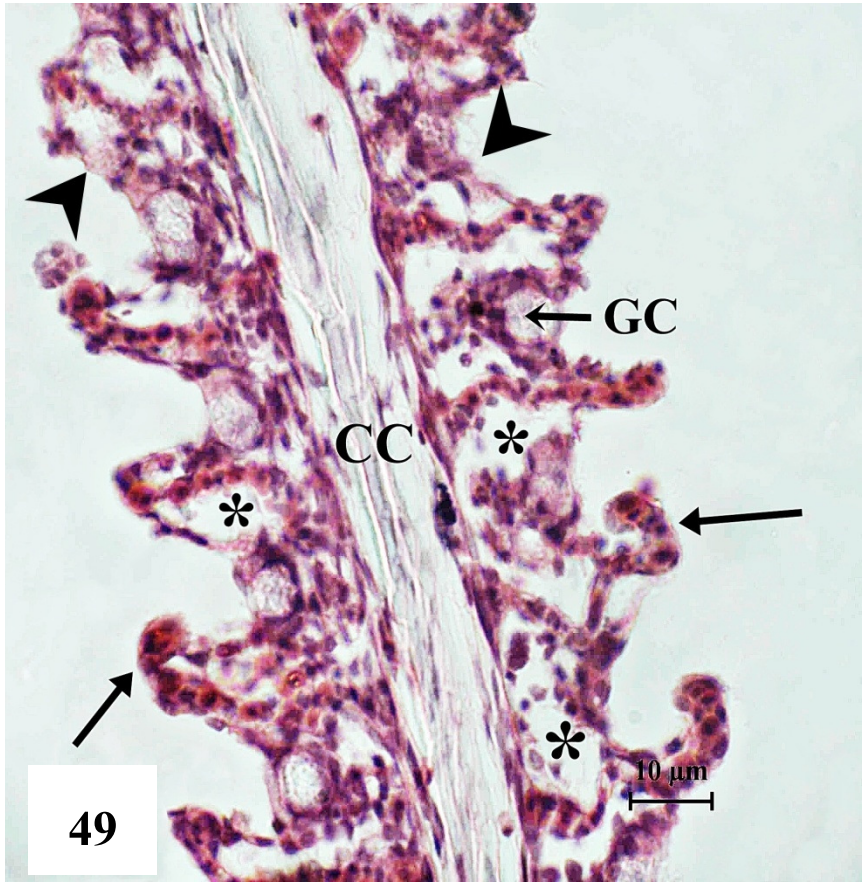
ภาพที่ 46 เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติโดยเกิดการ hyperplasia (arrow head) ของ epithelial cell พบเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเมือก (Goblet cell-GC) secondary lamella (SL) เกิดการบิดงอและเสียรูปร่าง (arrow) (46A) (H&E, bar=10 µm, 400×) epithelial cell หลุดลอกเกิดเป็นช่องว่าง (asterisk) (46B); cartilaginous core (CC) (H&E, bar=10 µm, 400×)





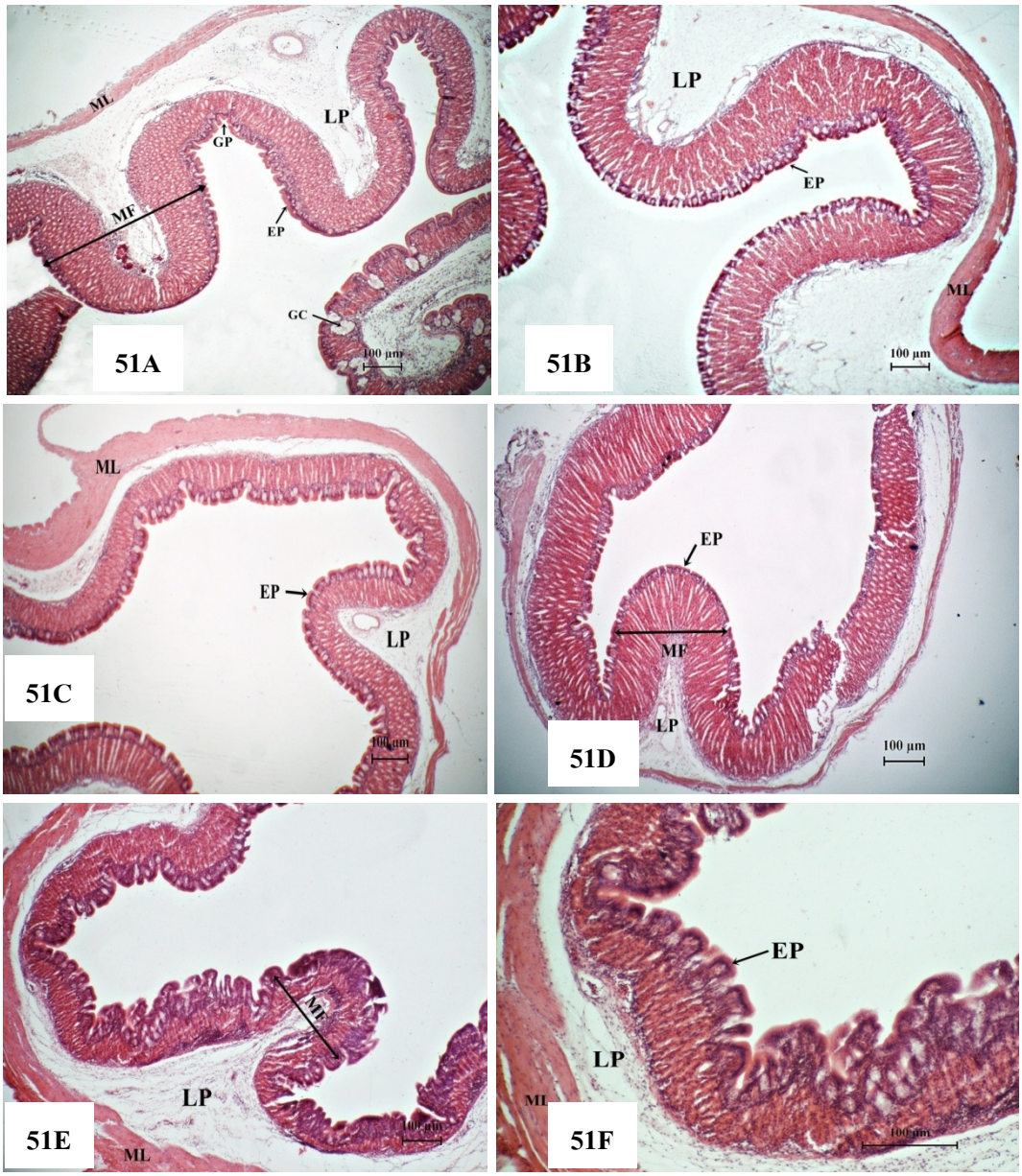
ภาพที่ 47 เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติโดยเกิดการ hyperplasia (arrow head) ของ epithelial cell ในส่วนsecondary lamella (SL) เกิดการบิดงอและเสียรูปร่าง (arrow) แกนกระดูกอ่อน (cartilaginous core-CC) เกิดการบิดงอ (H&E, bar=10 µm, 100×)

ภาพที่ 48 เนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ secondary lamella (SL) เกิดการบิดงอและเสียรูปร่าง (arrow) epithelial cell เกิดการหลุดลอก (asterisk) พบการตกเลือด (yellow arrow) แกนกระดูกอ่อน (CC) เกิดการบิดงอ (H&E, bar=10 µm, 100×)



ภาพที่ 49 และภาพที่ 50 แสดงเนื้อเยื่อเหงือกปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบความผิดปกติโดยเกิดการ hyperplasia (arrow head) และหลุดลอก (asterisk) ของ epithelial cell พบ globlet cell (GC) บนส่วนฐานของ secondary lamella (SL) และ SL เกิดการบิดงอและเสียรูปร่าง (arrow); cartilaginous core (CC) (H&E, bar=10 µm, 400×)

3.2.8.4 เนื้อเยื่อกระเพาะ



ภาพที่ 51 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบลักษณะของเซลล์บริเวณต่างๆ ที่เป็นปกติ (A และ B) สูตรควบคุม, (C) เมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์, (D) เมลา-มีน 1.5, (E และF) เมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์; mucosal fold (MF), epithelium (EP), gastric pit (GP), lamina propria (LP), mucular layer (ML), Goblet cell (GC) (H&E, bar=100 µm, 100×)

3.2.9 ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวม

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวมของปลานิลแดงแปลงเพศเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ข้อมูลแสดงในตารางที่ 18 พบว่า ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวมมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามระดับเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (เมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวมต่ำสุดเท่ากับ 65 และ 442.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ และปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 7 (เมลามีน 3.0 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวมสูงสุดเท่ากับ 332 และ 1,517.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมไม่พบว่ามีเมลามีนตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวม

ตารางที่ 18 ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมของปลานิลแดงแปลงเพศภายหลังได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ปริมาณเมลามีน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณเมลามีนที่ตกค้าง (มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)	
		เนื้อปลา	เครื่องในรวม
T1	สูตรควบคุม	ND	ND
T2	0.5	65	442.5
T3	1	148	1,005
T4	1.5	168	1,022.5
T5	2	188	1,090
T6	2.5	198	1,220
T7	3	332	1,517.5

ND = not detected

[1]ตัวเลขที่นำเสนอมาจากการเก็บตัวอย่างเนื้อและเครื่องในปลาจำนวน 15 ตัวต่อชุดการทดลอง

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองในครั้งนี้พบความผิดปกติของปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารที่มีเมลา-มีนในระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยจะเริ่มแสดงอาการผิดปกติภายหลังได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ลักษณะผิดปกติที่พบได้แก่ ลำตัวผอม กินอาหารลดลง ว่ายน้ำช้าลง มักจะหลบอยู่บริเวณพื้นตู้ทดลอง เกล็ดหลุดลอกได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของสีบริเวณลำตัว ซึ่งไม่พบลักษณะผิดปกติทั้งหมดดังที่กล่าวมาในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่ใส่เมลามีน จากการศึกษารายงานความเป็นพิษของเมลามีนโดย OCED (2002) พบว่าเมลามีนมีความเป็นพิษที่ค่อนข้างต่ำในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่างจากที่มีรายงานในสัตว์น้ำเช่น จากรายงานของปวีณา จันทร์เล็ก และคณะ (2552) รายงานความผิดปกติที่เกิดขึ้นในปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 0.5-3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าภายหลังได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 สัปดาห์จะพบลักษณะสีของลำตัวที่ดำคล้ำมากผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.5 เปอร์เซ็นต์) จะพบความผิดปกติภายหลังได้รับอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และมีแนวโน้มว่าความผิดปกติที่สังเกตพบจะเพิ่มตามระดับของเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร และ Xue และคณะ (2011a) พบความผิดปกติในปลา darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) เมื่อได้รับอาหารที่มีเมลามีนในระดับ 0.2, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยสีบริเวณลำตัวจากปกติที่มีสีเข้มจะซีดจางลง

กระบวนการสร้างเม็ดสีในปลากระดูกแข็งถูกควบคุมโดยระบบประสาทและฮอร์โมน ฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนกลาง (pituitary gland) คือ melanin-concentrating hormone เรียกย่อว่า MCH ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีของผิวหนังและเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการกินอาหาร (Kawauchi and Baker, 2004; Matsuda *et al*., 2006; Amano and Takahashi, 2009) และ alpha-melanocyte-stimulating hormone เรียกย่อว่า α-MSH สร้างจากเซลล์เมลาโนไซท์ (melanotropic cell) ในพาร์สอินเตอร์มีเดียของต่อมใต้สมอง ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ที่ผิวหนัง (Fujii and Oshima,1986; Burton *et al*., 1995) ทั้ง MCH และ α-MSH เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของสีในตัวปลา (Eberle, 1988; Baker, 1993; Miller *et al*., 1993; Gröneveld *et al*., 1995) α-MSH จะกระตุ้นการสร้างเม็ดสีทำให้ผิวหนังของปลาคล้ำขึ้น ส่วน MCH จะยั้บยั้งการทำงานของ α-MSH ทำให้ปลามีสีซีดลง Mizusawa และคณะ (2011)

กระบวนการสร้างเม็ดสีเกิดขึ้นภายในเซลล์เมลาโนไซท์โดยเริ่มต้นจาก α-MSH ไปจับบริเวณ receptor-MC1R และส่งสัญญาณ (cAMP) ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ให้ทำงานในขั้นตอนการออกซิไดซ์ tyrosin เป็น dopachrome จากนั้น dopachrome ถูกออกซิไดซ์เป็นเมลานินตามลำดับ (Fujii, 1969; García-Carmona *et al*., 1982; Hearing and Jimenez, 1987) เอนไซม์ tyrosinase และเมลานินมีความเชื่อมโยงไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือ ปริมาณเอนไซม์ tyrosinase ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เมลานินเพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Chen and Chavin, 1967; Seikai *et al*., 1987; ZhuGe *et al*., 2007) แต่จากการทดลองของ Xue และคณะ (2011a) พบว่าปลา darkbarbel catfish ที่ได้รับเมลามีนในระดับที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 0.2 เป็น 1 เปอร์เซ็นต์จะส่งผลให้ค่าความสว่าง (*L**) ของผิวหนังเพิ่มขึ้นซึ่งหมายถึงปริมาณเมลานินบนผิวหนังลดลง แต่จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase พบมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงและมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้นในปลาที่ได้รับเมลามีนไม่ได้เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างเมลามีนและกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase หรืออาจกล่าวได้ว่าเมลามีนไม่ไปส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase ดังนั้นลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลจากปัจจัยอื่นซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้อาการผิดปกติภายนอกที่พบอีกประการหนึ่งคือ การว่ายน้ำและการควบคุมการเคลื่อนที่ที่ผิดปกติ ซึ่งอาจมีผลมาจากระบบประสาท Wu และคณะ (2009a) รายงานว่าพบเมลามีนตกค้างในสมอง ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่ควบคุมกิจกรรมต่างๆ ของปลารวมทั้งการเคลื่อนที่และการว่ายน้ำ (Eaton *et al*., 2001) Yang และคณะ (2010) รายงานว่าเมลามีนเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity) โดยจะไปเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าของ Na^+ และ K^+ ตรงบริเวณ ion channel ส่งผลให้กระบวนการส่งผ่านสัญญาณไฟฟ้าของเซลล์ต่างๆ สูญเสียไป ทำให้เกิดความผิดปกติจะทำให้ระบบประสาทส่วนกลางได้รับความเสียหาย จึงมีผลต่ออาการผิดปกติภายนอกได้ (Schroder *et al*., 2000; Du *et al*., 2008)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) มีแนวโน้มลดลงตามปริมาณของเมลามีนในอาหารที่เพิ่มขึ้น และต่ำที่สุดในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่ทำการเก็บข้อมูลทุกๆ 2 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเริ่มมีการเจริญเติบโตที่ลดลงและแตกต่างจากปลาที่ไม่ได้รับเมลามีนตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ภายหลังได้รับอาหาร การเจริญเติบโตที่ลดลงในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนสอดคล้องกับรายงานในปลาดุกพันธุ์ผสม (ปวีณา จันทร์เล็ก และคณะ, 2552) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (ธานินทร์ เกตุประกอบ และวุฒิพร พรหมขุนทอง, 2554) ปลา Japanese sea bass (Liu *et al*., 2009) ปลา darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) (Xue *et al*., 2011a)

ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เป็นค่าที่นิยมใช้ในการประเมินการเจริญเติบโตของปลา (Bureau *et al*., 2002) ค่าที่รายงานในกลุ่มปลานิลจะอยู่ในช่วง 1.1-5 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่แตกต่างกันในช่วงนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น รูปแบบการเลี้ยง ชนิดและรูปแบบของอาหารที่ปลาได้รับ ช่วงอายุของปลา เป็นต้น (Romana-Eguia and Eguia, 1999; Bureau *et al*., 2002; Chakraborty and Banerjee, 2009; Abdel-Tawwab *et al*., 2010) จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่ใส่เมลามีนมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 4.05 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมในการทดลองครั้งนี้มีการเจริญเติบโตที่เป็นปกติ การเจริญเติบโตที่ลดลงเมื่อปลาได้รับเมลามีนในอาหาร สาเหตุเกิดจากเมลามีนเป็นวัตถุดิบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบแต่ไม่ใช้โปรตีนที่แท้จริง (non-protein nitrogen ; NPN) ซึ่งสัตว์น้ำไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และไม่มีผลช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต เมื่อปลาได้รับจากอาหารจะถูกดูดซึมผ่านระบบทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดแต่จะไม่ถูกนำมาเผาผลาญเป็นพลังงานที่ตับเหมือนกรดอะมิโนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกันทั่วไป (Smith *et al*., 1994) และจากรายงานล่าสุดของ Ma และคณะ (2011) ที่พบว่าเมลามีนไปรบกวนการทำงานของโปรตีนบางตัวเช่น Glutathione peroxidase 1 ในวัฏจักร glutathione metabolism, S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme และ Aminoadipic semialdehyde dehydrogenase ในวัฏจักร arginine และ proline metabolism และ Alcohol dehydrogenase, Glycolysis/gluconeogenesis l-lactate dehydrogenase A chain, Aminoadipic semialdehyde dehydrogenase ในวัฏจักร glycolysis/gluconeogenesis pathway ซึ่งวัฏจักรทั้งหมดเหล่านี้เป็นวัฏจักรที่มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ การสังเคราะห์และการซ่อมแซม DNA และ RNA ระบบภูมิคุ้มกัน ตลอดจนการนำสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและเผาผลาญเป็นพลังงาน (Lovell, 1998; Metón *et al*., 2003; Peña-Llopis *et al*., 2003) ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลง

คุณภาพของวัตถุดิบและองค์ประกอบของสารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ชี้วัดคุณภาพของอาหาร การเจริญเติบโตของปลามีความสัมพันธ์กับคุณภาพของอาหารที่ปลาได้รับ มีค่าที่ใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของอาหารหลายค่า ที่นิยมใช้ได้แก่ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (ANPU) และโปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ (PPV) ซึ่งเรียกรวมค่าทั้งหมดเหล่านี้ว่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Bureau *et al*., 2002) ในการสร้างสูตรอาหารปลาสิ่งที่จำเป็นต้องทราบคือบทบาทหน้าที่ที่เหมาะสมของสารอาหารแต่ละชนิด สารอาหารที่ให้พลังงานมี 3 กลุ่มหลักได้แก่โปรตีน ไขมัน และ

คาร์โบไฮเดรต โดยไขมันให้พลังงานต่อหน่วยสูงที่สุดรองลงมาคือโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ (Bureau *et al*., 2002) ทั้งนี้ในหลักปฏิบัติควรใช้ไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งของพลังงานเพื่อให้โปรตีนถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ หรือที่เรียกว่า protein sparing effect (Kumar Singh *et al*., 2006; Ng *et al*., 2008) แต่จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าเมลามีนจะไปรบกวนกระบวนการหรือวัฏจักร glycolysis/gluconeogenesis pathway ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานจากแหล่งของคาร์โบไฮเดรตในปลา ทำให้พลังงานที่ปลาควรจะได้รับตรงส่วนนี้โดนบั่นทอนไป นอกจากนี้ไขมันซึ่งเป็นแหล่งที่ให้พลังงานสูงสุดก็มีแนวโน้มว่าจะถูกนำไปใช้เพื่อสลายเป็นพลังงานในกระบวนการกำจัดสารพิษซึ่งก็คือเมลามีนออกจากตัวปลา ดังจะเห็นได้จากปริมาณไขมันในตัวปลาที่มีแนวโน้มลดลงอย่างมากในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารปกติ ดังนั้นเมื่อไขมันและคาร์โบไฮเดรตถูกนำไปใช้เป็นแหล่งของพลังงานและยังไม่เพียงพอกับความต้องการ ปลาจึงนำโปรตีนไปใช้เพื่อเป็นแหล่งของพลังงานแทนที่จะนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลงและมีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (Lupatsch *et al*., 2003) ส่งผลไปถึงค่า PER และ ANPU ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ชี้วัดการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในปลา โดย PER และ ANPU ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนทุกระดับมีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารปกติที่ไม่ใส่เมลามีน เป็นเครื่องยืนยันสมมติฐานข้างต้นได้ว่าไนโตรเจนหรือโปรตีนเทียมจากเมลามีนซึ่งทำให้โปรตีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้นไม่ได้ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตหรือก่อให้เกิดประโยชน์แก่ตัวปลา ในทางตรงกันข้ามกลับทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ลดลง นอกจากนี้เมลามีนที่ปลาได้รับยังไปตกค้างและสร้างความเสียหายต่อเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องและทำงานร่วมกันในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ร่างกายนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ลดลง สอดคล้องกับค่า FCR ในปลาได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจนถึง 3 เปอร์เซ็นต์มีค่า FCR อยู่ในช่วง 1.43-2.86 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน FCR เป็นค่าที่มีความสำคัญที่ใช้บ่งชี้คุณภาพของอาหารและการเลี้ยงซึ่งมีผลต่อค่าตอบแทนที่ผู้เลี้ยงปลาจะได้รับ FCR โดยทั่วไปมีค่าอยู่ในช่วง 0.8 ถึง 1.5 (Hardy and Barrows, 2002) แสดงให้เห็นว่าปลาไม่สามารถนำเอาสารอาหารไปใช้ประโยชน์เพื่อการเจริญเติบโตได้

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาภายหลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ปริมาณโปรตีนในตัวปลามีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร โปรตีนในตัวปลามีค่าสูงที่สุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์และมีค่าต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่ใส่เมลามีน ปริมาณโปรตีนในตัวปลามีความสัมพันธ์กับขนาดและน้ำหนักตัวปลา (Jobling *et al*., 1994) โดยเกิดจากหลายปัจจัยเช่น การเจริญเติบโต การกินอาหาร คุณภาพของโปรตีนในอาหาร ประสิทธิภาพการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ โดยสามารถชี้

วัดได้จากค่าเบื้องต้นนั่นคือค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER) ซึ่งจะมีค่าสูงในปลาที่มีการเจริญเติบโตดีและการกินอาหารที่ดี (Pechsiri and Yakupitiyage, 2005) จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่ใส่เมลามีนหรือสูตรควบคุมมีค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนสูงที่สุด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด และมีปริมาณการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง แต่กลับมีปริมาณโปรตีนในตัวปลาต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนในทุกระดับ ซึ่งขัดแย้งกับสมมติฐานในข้างต้น ทั้งนี้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างมาจากปริมาณไนโตรเจนคูณด้วย 6.25 จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมพบมีเมลามีนตกค้างอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน จากรายงานในลิงและหนูพบว่าเมื่อเมลามีนเข้าสู่ร่างกายโดยการกินจะไม่มีการเปลี่ยนรูปหรือโครงสร้างไปเป็นสารชนิดอื่น แต่จะแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆของร่างกายก่อนจะถูกขับทิ้งออกมา (Mast *et al*., 1983; Hsieh *et al*., 2009; Liu *et al*., 2010) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ปลาได้รับเมลามีนจากอาหารต่อเนื่องเป็นเวลา 8 สัปดาห์ทำให้เกิดการสะสมในตัวในปริมาณสูง ดังนั้นโปรตีนที่วิเคราะห์ได้สูงกว่าความเป็นจริงจึงมีที่มาจากไนโตรเจนที่มีอยู่ในโครงสร้างของเมลามีนหรือที่เรียกว่าโปรตีนเทียม

ไขมันที่ปลาได้รับจากอาหารจะถูกนำไปใช้เพื่อเป็นแหล่งของพลังงานในการดำรงชีวิตและทำกิจกรรมต่างๆ โดยปลาจะสะสมไขมันส่วนหนึ่งเป็นเนื้อเยื่อไขมันในตับ กล้ามเนื้อ และช่องท้องไว้ใช้เป็นแหล่งของพลังงานเมื่อจำเป็นเช่นในช่วงที่อดอาหารหรือมีอาหารไม่เพียงพอ (Sargent *et al*., 2002) โดยที่ตับจะเป็นอวัยวะที่มีความไวและตอบสนองต่อไขมันที่มีในอาหารเมื่อปลาได้รับ (Bell *et al*., 1995; Guillou *et al*., 1995) ปริมาณไขมันที่เหมาะสมในอาหารสำหรับปลานิลอยู่ในช่วง 6-10 เปอร์เซ็นต์ (Jauncey and Ross, 1982) ปริมาณไขมันที่ปลาได้รับจากอาหารจะส่งผลต่อไขมันที่สะสมในตัวปลา (Chou and Shiau, 1996; Willea *et al*., 2002) สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์เท่ากันทุกสูตร ใช้วัตถุดิบอาหารจากแหล่งเดียวกันในปริมาณที่เท่ากัน (ยกเว้นเมลามีนและแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณเฉพาะในแต่ละสูตร) โดยแหล่งของไขมันหลักมาจากน้ำมันปลา น้ำมันถั่วเหลือง และไขมันในวัตถุดิบอาหารตัวอื่นๆ ซึ่งตามสมมติฐานแล้วปริมาณไขมันที่สะสมในตัวปลาควรจะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน แต่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าปริมาณไขมันในตัวปลามีแนวโน้มลดลงเมื่อปลาได้รับเมลามีนจากอาหารในปริมาณที่สูงขึ้น ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 3 เปอร์เซ็นต์วิเคราะห์ไขมันในตัวปลาได้เพียง 8.90 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีนถึง 2 เท่า แสดงว่าเกิดความผิดปกติขึ้นกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน สอดคล้องกับรายงานของ Geyer และคณะ (1993) รายงานว่าเมื่อปลาได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายมีแนวโน้มว่าไขมันในตัวจะลดลง และตรงกับรายงานในปลาที่ได้รับสารพิษจากอาหารแล้ว

ส่งผลให้ไขมันในตัวลดลงเช่น ปลากดอเมริกันที่ได้รับสารพิษ gossypol จากเมล็ดฝ้าย (Yildirim *et al*., 2003) และปลานิลพันธุ์ผสม (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) ที่ได้รับสารพิษ aflatoxin B1 (Deng *et al*., 2003) ทั้งนี้มีแนวโน้มว่าปลาจะมีการกินอาหารลดลงเมื่อได้รับสารพิษจากอาหาร เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ที่ปลาไม่อยากกินอาหารและมีการกินอาหารที่ลดลงเมื่อได้รับอาหารที่มีเมลามีนเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารปกติที่ปริมาณอาหารที่กินเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยง Tran-Duy และคณะ (2008) รายงานว่าการกินอาหารมีผลต่อปริมาณไขมันที่สะสมในตัวปลาทั้งนี้เพราะแหล่งของไขมันหลักที่ปลาได้รับมาจากอาหาร อีกสาเหตุที่สำคัญคือไขมันที่ปลาสะสมไว้ภายในตัวจะถูกสลายและเปลี่ยนเป็นพลังงานในกระบวนการ β-oxidation เพื่อใช้ในขั้นตอนของการกำจัดสารพิษส่งผลให้ปริมาณไขมันที่สะสมในตัวลดลง (Harris and Corcoran, 1995; Adam, 1999) มีรายงานการศึกษาที่พบว่าปลามีแนวโน้มที่จะสำรองพลังงานไว้ในตัวเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตหรือได้รับสารพิษ (Kelly and Janz, 2008) นอกจากนี้ไขมันยังมีหน้าที่สำคัญในการซ่อมแซมเซลล์ส่วนที่ถูกทำลายรวมถึงป้องกันอันตรายจากสารพิษหรืออนุมูลอิสระที่จะเข้ามาทำลายเซลล์ (Sargent *et al*., 2002; Campbell *et al*., 2003) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ไขมันในตัวปลาที่ได้รับเมลามีนลดลงปริมาณไขมันที่ปลาสะสมไว้มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามต่อปริมาณน้ำในตัวปลา ทั้งนี้เพราะกระบวนการสลายไขมันในตัวปลาเพื่อใช้เป็นแหล่งของพลังงานจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Sargent *et al*., 2002) จากการวิเคราะห์ความชื้นในตัวปลาในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีแนวโน้มที่ปริมาณความชื้นจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณเมลามีนที่ปลาได้รับจากอาหาร ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากปริมาณไขมันที่ลดลงในตัวปลาส่งผลให้ปริมาณน้ำในตัวปลาเพิ่มขึ้น Yeannesaand และ Almandos (2003) รายงานความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีในปลาจำนวน 187 ชนิดพบว่า ไขมันและปริมาณน้ำในตัวปลามีความสัมพันธ์กันในทางตรงกันข้าม กล่าวคือถ้าในตัวปลามีปริมาณไขมันมากปริมาณน้ำในตัวจะลดลง

องค์ประกอบเลือดซึ่งเป็นค่าที่ใช้ชี้วัดสุขภาพของปลาจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินมีค่าลดลงเมื่อระดับของเมลามีนในอาหารเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่มีเมลามีน โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินต่ำที่สุด สอดคล้องกับรายงานของปวีณา จันทร์เล็ก และคณะ (2552) ซึ่งรายงานว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนส่งผลกระทบในเชิงลบต่อองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินรวม โปรตีนในซีรัม และปริมาณเม็ดเลือดขาว ซึ่งมีแนวโน้มลดลงทั้งหมด โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีน 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าฮีโมโกลบินลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน แสดงให้เห็นว่าปลาที่

ได้รับอาหารที่มีเมลามีนต่อเนื่องเป็นเวลานานเกิดสภาวะเครียดและมีภูมิต้านทานลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลาอีกหลายชนิดส่งผลกระทบในเชิงลบต่อองค์ประกอบเลือดเมื่อปลาได้รับสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำสารพิษ (อรอุษา อุสันโน, 2546) การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมซึ่งไม่เหมาะสมกับสภาพการดำรงชีวิตปกติ (Chen *et al*., 1996; Speers-Roesch *et al*., 2010) การกินอาหารและความไม่สมดุลของโภชนะที่ปลาได้รับ (Lim *et al*., 2000)

ค่า BUN และ creatinine เป็นค่าที่ใช้ในการชี้วัดการทำงานของไต หากในเลือดมีค่า BUN และ creatinine เพิ่มสูงขึ้นผิดปกติแสดงว่าไตมีการทำงานที่ผิดปกติ ทั้งนี้เพราะ BUN และ creatinine เป็นของเสียในเลือดที่จะต้องถูกกรองออกโดยไตและถูกขับทิ้ง จากรายงานการศึกษาในหนูเมื่อท่อไตเกิดการเสื่อมสภาพและเซลล์ท่อไตถูกทำลายจะส่งผลให้ค่า BUN และ creatinine เพิ่มสูงขึ้นผิดปกติ (Ali *et al*., 1994; Elfarra *et al*., 1994) ซึ่งผลที่ได้ตรงกับที่พบรายงานเช่นเดียวกันในปลา (Zhang *et al*., 2007) อย่างไรก็ตามค่า BUN และ creatinine ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่เครื่องมือยอมรับจึงไม่สามารถรายงานและวิจารณ์ผลที่เกิดขึ้นได้

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อที่ศึกษาในการทดลองครั้งนี้พบว่า เมลามีนสร้างความเสียหายต่อเนื้อเยื่อตับ ไต และเหงือก แต่ไม่ส่งผลต่อเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากกระเพาะอาหารเป็นเพียงทางผ่านของเมลามีนและในบริเวณนี้ไม่มีการย่อยและดูดซึมสารอาหาร (Buur *et al*., 2008) อีกทั้งกระเพาะอาหารไม่ใช่อวัยวะเป้าหมายหลักของเมลามีน (Mast *et al*., 1983) ทำให้ไม่เกิดความผิดปกติในเนื้อเยื่อกระพาะอาหาร ส่วนความผิดปกติที่เกิดขึ้นในอวัยวะอื่นๆที่เหลืออธิบายได้ว่า เมลามีนสามารถแพร่กระจายไปในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ดีผ่านทางระบบเลือดและสารน้ำ (Hsieh *et al*., 2009) อนงค์ บิณฑวิหค (2546) กล่าวถึงกลไกการได้รับสารพิษไว้ว่า เมื่อสารพิษเข้าสู่ร่างกายโดยการกินจะผ่านระบบทางเดินอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดจากนั้นจะมีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งความรุนแรงของสารพิษจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลเวียนของเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ และความสามารถของสารพิษในการจับเกาะกับเนื้อเยื่อ และผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าสารพิษสามารถกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว จะทำให้ความเข้มข้นของสารพิษในกระแสเลือดลดลง ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารพิษต่อเซลล์ของอวัยวะต่างๆทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่โครงสร้างหรือการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย (Shimojo and Iwaoka, 2000) Ma และคณะ (2011) รายงานว่า เมลามีนส่งผลกระทบโดยตรงต่อไตหรือเป็นพิษต่อไต (Nephrotoxicity) จากรายงานในเด็กที่ได้รับนมปนเปื้อนเมลามีนพบความผิดปกติของไตที่เกิดขึ้นเช่น กระวนกระวาย ปัสสาวะขัดและปัสสาวะลำบาก ปวดเป็นระยะๆ และมีเม็ดเลือดแดงปนออกมากับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบอาการความดันโลหิตสูง ตกเลือด และปัสสาวะออกน้อย (Hau *et al*., 2009) และพบผลึกตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อไตซึ่งพบรายงานที่ตรงกันในมนุษย์และสัตว์อีกหลายชนิด (Dobson *et*

al., 2008; Chen *et al*., 2009; Guan *et al*., 2009; Reimschuessel *et al*., 2009; Kim *et al*., 2010) เมื่อผลึกตกค้างในท่อไตและไปอุดตันทำให้เนื้อเยื่อบริเวณท่อไตเกิดการตายส่งผลให้ไตทำงานผิดปกติ (Conger *et al*., 1976 อ้างโดย Reimschuessel *et al*., 2010) ทั้งนี้ไตจัดเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักของเมลามีนดังที่มีรายงานการศึกษาในสัตว์หลายชนิดก่อนหน้านี้ (Mast *et al*., 1983; Baynes *et al*., 2008; Reimschuessel *et al*., 2009; Liu *et al*., 2010) ความผิดปกติในเนื้อเยื่อไตที่พบจากการทดลองในครั้งนี้ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในส่วนของท่อไตซึ่งแสดงลักษณะที่ผิดปกติคือส่วนของท่อไตเสื่อมสภาพ เกิดเป็นช่องว่าง ท่อไตบวมโต คล้ายกับมีสิ่งแปลกปลอมเข้าไปอุดจนทำให้ท่อไตไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ทั้งนี้ฮอร์โมนบางตัวที่ปลาสร้างขึ้นรวมถึงฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบขับถ่ายจะถูกควบคุมโดยการทำงานของไตหรือมีไม่ก็ความเกี่ยวข้องกับไตเช่น glucocorticoid ซึ่งทำหน้าที่ในด้านการเจริญเติบโตและ mineralocorticoid ซึ่งทำหน้าที่ในด้านการรักษาสมดุลของร่างกาย โดยเฉพาะ mineralocorticoid ที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของน้ำและแร่ธาตุช่วยในการทำงานของไตในการดูดกลับโซเดียมและคลอไรด์ภายในท่อไต ถ้าฮอร์โมนตัวนี้ทำงานผิดปกติจะทำให้ปลาสูญเสียน้ำและโซเดียมไปพร้อมกับปัสสาวะ (De Rouffignac *et al*., 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Warne *et al*., 2002) ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณโซเดียมในเลือดที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มลดลงในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน ซึ่งเป็นอาการผิดปกติอย่างหนึ่งที่พบเมื่อไตมีการทำงานที่ผิดปกติ

ปวีณา จันทร์เล็ก และคณะ (2552) รายงานความผิดปกติในเนื้อเยื่อไตของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับเมลามีนในระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่ามีการเสื่อมสลายของ epithelium cell มีการหดตัวของโกลเมอรูลัส (Glomerrulus) มีการเสื่อมสลายของท่อไต และมีการตายของอวัยวะสร้างเม็ดเลือดแต่ไม่พบผลึกเมลามีนในเนื้อเยื่อไต เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ที่ไม่พบผลึกของเมลามีนในเนื้อเยื่อไต แต่มีร่องรอยที่ปรากฏว่ามีสิ่งแปลกปลอมอยู่ในส่วนของท่อไต แต่ได้หายไปในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการศึกษาทางเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการรักษาสภาพตัวอย่างจะใช้ฟอร์มาลินเป็นน้ำยารักษาสภาพ ทำให้ผลึกของเมลามีนที่เกิดจากเมลามีนและกรดยูริคถูกชะออกไปในขั้นตอนนี้ ทำให้ไม่พบผลึกของเมลามีนในเนื้อเยื่อไต (Reimschuessel *et al*., 2009) Ogasawara และคณะ (1995) ที่รายงานว่าพบผลึกขนาดเล็กในปัสสาวะของหนูแต่ไม่พบผลึกในเนื้อเยื่อไตเมื่อทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อ

เหงือกปลามีหน้าที่สำคัญในการกำจัดของเสีย แลกเปลี่ยนก๊าซ และควบคุมการทำงานของระบบ osmoregulation (Evan, 1975) สารประกอบไนโตรเจนซึ่งส่วนใหญ่ได้รับจากอาหาร เป็นของเสียหลักที่ถูกขับทิ้งออกจากตัวปลาผ่านทางเหงือก ตับ และไต (Flis, 1968; Wilkie, 1997) ของเสียที่อยู่ในรูปของไนโตรเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเช่น แอมโมเนียและยูเรียจะถูกขับทิ้งทางเหงือก

ประมาณ 75–93 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด (Isaia, 1982) อย่างไรก็ตามเหงือกปลาไม่ใช่อวัยวะที่ใช้สำหรับขับทิ้งสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เช่นเมลามีน (Eckert and Randall, 1988 อ้างโดย Xue *et al*., 2011b) แต่ในการทดลองครั้งนี้กลับพบความผิดปกติในเหงือกเมื่อศึกษาด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนตั้งแต่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป อาการผิดปกติส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ การแบ่งตัวมากผิดปกติของ epithelial cell บริเวณ secondary lamella เกิดเป็นช่องว่างและ epithelial cell หลุดลอก พบ globlet cell บนส่วนฐานของ secondary lamella และ secondary lamella เกิดการบิดงอและเสียรูปทรง ซึ่งไม่พบลักษณะผิดปกติดังกล่าวในเหงือกของปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน ลักษณะความผิดปกติของเหงือกที่พบในการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานความผิดปกติที่พบในปลาที่ขาดสารอาหารหรือทุโภชนาการ (Phromkunthong *et al*., 1997; Barrows *et al*., 2008) การได้รับสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร (อรอุษา อุสันโน, 2546; ปวีณา จันทร์เล็ก และคณะ, 2552) ทั้งนี้ปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ ซึ่งเป็นอาการของปลาที่ขาดสารอาหาร อีกทั้งพบความผิดปกติของพฤติกรรมและลักษณะภายนอกซึ่งเป็นอาการของปลาที่ได้รับสารพิษ โดยไม่พบอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่มีเมลามีน ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่าเมลามีนก่อให้เกิดความผิดปกติต่อเนื้อเยื่อเหงือกได้ นอกจากนี้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่เหงือกน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความผิดปกติที่พบที่ไต เนื่องจากไตเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ควบคุมระบบสารน้ำในตัวปลา เช่นระบบเลือดและสิ่งขับถ่าย รวมถึงสารพิษในกระแสเลือด ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนโดยเฉพาะที่ได้รับในปริมาณสูงจะพบความผิดปกติที่เกิดขึ้นบริเวณท่อไต ไตเป็นอวัยวะสำคัญที่ใช้ในการขับถ่ายของเสียในรูปไนโตรเจน (Bureau *et al*., 2002; Xue *et al*., 2011b) Zaki และคณะ (2010) รายงานว่าภาวะที่ไตทำงานผิดปกติจะส่งผลให้มีปริมาณยูเรียในกระแสเลือดมากผิดปกติ ซึ่งส่งผลให้เหงือกต้องทำงานหนักขึ้นในการขับทิ้งยูเรียออกจากร่างกาย และจากรายงานของ Yang และคณะ (2010) รายงานว่าเมลามีนเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity) เพราะไปรบกวนการทำงานของของ Na^+ และ K^+ ตรงบริเวณ ion channel ซึ่งบริเวณเหงือกของปลามี ion channel เป็นจำนวนมากสำหรับใช้แลกเปลี่ยนสารต่างๆ (Hirose *et al*., 2003) จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เหงือกปลาเกิดความผิดปกติได้

สารประกอบไนโตรเจนจะถูกส่งไปที่ตับเพื่อเข้าสู่กระบวนการ metabolic partways (Kucuk, 1999) ซึ่งมีทั้งที่ถูกนำไปเปลี่ยนเป็นพลังงานเช่นกรดอะมิโนและของเสียที่ถูกนำไปกำจัดเช่นแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียที่มากเกินไปทำให้เกิด liver glycogen vacuolation ซึ่งมีผลต่อการนำพลังงานไปใช้ในระดับเซลล์ (Thurston et al., 1978) แอมโมเนียส่งผลกระทบโดยตรงต่อเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่มีในตับปลา (Hegazi *et al*., 2010) Ueno (1983) ที่พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง

ของเซลล์ตับ เช่นการเสื่อมสลาย และการตายของเซลล์ตับทำให้การใช้ประโยชน์ของโภชนะในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลงส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ตามมา นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติในเนื้อเยื่อตับอีกประการหนึ่งในปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนในระดับที่สูงกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์คือลักษณะของผลึกที่มีลักษณะกลม สีน้ำตาลทอง หรือน้ำตาลแดงซึ่งเป็นลักษณะของ bile pigment (Kubota *et al*., 1982) โดยพบในส่วนของเซลล์เนื้อเยื่อตับ (hepatocyte) bile pigment เกิดจากเม็ดเลือดแดงที่สิ้นอายุขัยในการทำงานซึ่งจะถูกส่งไปทำลายที่ตับ ม้าม และไขกระดูก เมื่อ hemoglobin จากเม็ดเลือดแดงสลายตัวส่วนของ heme (heme catabolism) ได้เป็น biliverdin (สีเขียวเข้ม) และจะถูกเปลี่ยนเป็น bilirubin (สีเหลืองทอง) โดยจะจับกับ albumin จากนั้นจะถูกส่งไปที่ตับ โดยตับจะเปลี่ยน bilirubin ให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และจะถูกขับออกมาพร้อมกับน้ำดีในระบบทางเดินอาหารก่อนจะถูกขับทิ้งออกนอกร่างกายผ่านทาง urine และ feces (Grossbard *et al*., 1987) การพบ bile pigment ในเนื้อเยื่อตับเป็นจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงภาวะที่ตับมีการทำงานผิดปกติ เซลล์ตับเกิดการตาย หรือมีสิ่งแปลกปลอมไปอุดตันบริเวณท่อที่เชื่อมต่อระหว่างตับกับถุงน้ำดี (Smith and Hafer, 2004) จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าตับของปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีนในระดับที่สูงกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์มีสีเขียวเข้มต่างจากสีปกติซึ่งจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเกิดการตกค้างของ biliverdin ทั้งนี้ตับเป็นอวัยวะหนึ่งที่เป็นอวัยวะเป้าหมายของเมลามีน (Mast *et al*., 1983)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อปลาและเครื่องในรวมของปลานิลแดงแปลงเพศเพื่อหาปริมาณเมลามีนที่ตกค้างหลังจากได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเมลามีนในระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณที่ปลาได้รับจากอาหาร โดยมีค่าอยู่ในช่วง 65-332 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งและ 442.5-1,517.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ค่าเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลามีค่าใกล้เคียงกับรายงานของปวีณา จันทร์เล็ก และคณะ (2552) ที่ทดลองในปลาดุกพันธุ์ผสมและพบเมลามีนตกค้างในเนื้อปลา 63 - 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อปลาได้รับอาหารที่มีปริมาณเมลามีน 0.5-3 เปอร์เซ็นต์ ตามค่ามาตรฐานจากประกาศของกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 311 พ.ศ. 2551 ระบุว่าผลิตภัณฑ์นมและอาหารที่มีนมเป็นส่วนประกอบต้องมีปริมาณเมลามีนไม่เกิน 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และอาหารประเภทอื่นๆ จะต้องมีปริมาณเมลามีนไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นค่าที่ตั้งไว้ในระดับที่ปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค หากเปรียบเทียบกับปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมจากการทดลองครั้งนี้พบว่ามีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานที่กระทรวงสาธารณสุขประกาศไว้มาก ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

Reimschuessel และคณะ (2009) รายงานค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ของเมลามีนในปลากดอเมริกัน, *Ictalurus punctatus* และปลาเรนโบว์ เทร้าท์, *Oncorhynchus mykiss* มีค่าอยู่ในช่วง 1.5 ถึง 4 วัน ซึ่ง

นานกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีค่าครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ของเมลามีนเท่ากับ 4.04 ชั่วโมงในสุกร (Baynes *et al*., 2008) 4.41 ชั่วโมงในลิง (Liu *et al*., 2010) และ 2.7 ชั่วโมงในหนู (Mast *et al*., 1983) ทั้งนี้เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น กระบวนการเมทาบอลิซึมในตัวจึงขึ้นอยู่กับอุณหภูมิแวดล้อมภายนอก ทำให้กระบวนการขับทิ้งเมลามีนเกิดช้ากว่า (Reimschuessel *et al*., 2005; 2007) จากรายงานของ Reimschuessel และคณะ (2009) พบว่าหลังจากที่ปลากดอเมริกันและปลาเรนโบว์เทร้าท์ได้รับเมลามีนปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวปลาจะสามารถขับทิ้งออกให้เหลือน้อยกว่า 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้ภายใน 7 และ 14 วันตามลำดับ แต่ในการทดลองครั้งนี้ปลาได้รับเมลามีนจากอาหารทุกวันส่งผลให้ปลาไม่สามารถขับทิ้งได้ทันจึงเกิดการตกค้างในปริมาณสูง และจากการเก็บผลในการทดลองครั้งนี้ซึ่งเก็บตัวอย่างเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ทำให้ไม่ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อปลาและเครื่องในรวมในช่วงเวลาต่างๆ ระหว่างการทดลอง

ในสภาพการเลี้ยงจริงการให้อาหารอยู่กับเทคนิคของผู้เลี้ยงแต่ละรายซึ่งอาจให้ทุกวันหรือวันเว้นวันขึ้น อย่างไรก็ตามปลาก็ได้รับอาหารอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ปลาโตเร็วเป็นไปตามจุดมุ่งหมายของผู้เลี้ยง หากอาหารที่ใช้เลี้ยงปลามีการปนเปื้อนของเมลามีนอาจส่งผลให้เกิดการตกค้างได้ เนื่องจากระยะเวลาการเลี้ยงปลาจนกระทั่งถึงระยะเวลาการจับจำหน่าย แม้จะไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับขนาดของปลาที่ปล่อยและความต้องการของตลาด แต่โดยทั่วไปจะใช้เวลามากกว่า 3 เดือนขึ้นไป ซึ่งก็เป็นช่วงเวลาที่นานพอจะทำให้เกิดการตกค้างในตัวปลาได้

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองผลของเมลามีนในอาหารที่ระดับ 0.5-3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ใส่เมลามีนต่อปลานิลแดงแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 5.63 กรัม โดยปลาได้รับอาหารวันละ 2 ครั้งโดยให้กินจนอิ่มเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถสรุปผลในประเด็นต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้

ความผิดปกติและพฤติกรรมภายนอก

สามารถตรวจพบลักษณะที่ผิดปกติภายนอกเช่น สีของลำตัวที่เปลี่ยนแปลงไป ลักษณะของเกล็ดที่หลุดลอก การกินอาหารที่ลดลง รวมถึงการตายในปลาที่ได้รับอาหารที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปภายหลังได้รับอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลามีน 1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเริ่มมีการตายภายหลังได้รับอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์

การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ระดับของเมลามีนที่ส่งผลต่อปลาอยู่ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปภายหลังได้รับอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อปลาได้รับเมลามีนในระดับที่สูงขึ้น การเจริญเติบเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารจะยิ่งแย่ลง

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ

ภายหลังปลาได้รับอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ระดับของเมลามีนที่ส่งผลต่อเนื้อเยื่อตับอยู่ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่วนเนื้อเยื่อไตและเหงือกอยู่ที่ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ทั้งนี้ไม่พบความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ความผิดปกติของเนื้อเยื่อที่พบมีแนวโน้มรุนแรงขึ้นเมื่อปลาได้รับเมลามีนในระดับที่สูงขึ้น

องค์ประกอบเลือด

จากการทดลองในครั้งนี้ค่า BUN และ creatinine ไม่สามารถนำมาใช้ในการวิจารณ์และสรุปผลได้ เนื่องจากค่าที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่ยอมรับได้ของเครื่องมือ ส่วนปริมาณไอออนในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยระหว่างปลาที่ได้รับอาหารปกติกับปลาที่ได้รับอาหารที่มีเมลา-มีนระดับต่างๆ

องค์ประกอบทางเคมีในตัวปลาและการตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวม

ไขมันในตัวปลามีแนวโน้มลดลงตามระดับของเมลามีนที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ต่างจากโปรตีนและเถ้าที่มีแนวโน้มในทิศทางตรงกันข้ามคือจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระดับของเมลามีนที่ปลาได้รับ

สอดคล้องกับปริมาณของเมลามีนที่ตกค้างในเนื้อและเครื่องในรวมซึ่งจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระดับของเมลามีนของในอาหารที่ปลาได้รับ

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2554. ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล (พ.ศ. 2553-2557). กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. กระทรวงเกษตรฯ ย้ำชัด สินค้าปศุสัตว์ไทยปลอดภัยจากเมลามีนหลังดำเนินการควบคุมการนำเข้าตั้งแต่ต้นทาง พร้อมตรวจเข้มในวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำนมดิบต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2550. ข่าวประชาสัมพันธ์ 2551. เข้าถึงได้จาก http://www.moac.go.th/ewt_news.php?nid=2329&filename=index. (20 สิงหาคม 2554).

กระทรวงสาธารณสุข. 2552. รายชื่อผลิตภัณฑ์อาหาร กรณีไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด. เข้าถึงได้จาก http://www.fda.moph.go.th/www_fda/fda_melamine/index-melamine.php (20 สิงหาคม 2554).

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, สุธี วงศ์มณีประทีป, เกศินี หลายสุทธิสาร, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์ และแก้วตา ลิ้มเฮง. 2552. การศึกษาลักษณะภายนอกและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปผลิตจากวัตถุดิบที่ปนเปื้อนของเมลามีนและกรดไซยานูริค. *ใน*: เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาประมง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มี.ค. 2552. 490-499.

ณัฐชนก อมรเทวภัทร. 2552. สถานภาพอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ของประเทศไทย. *ใน*: เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มี.ค. 2552. 201-209.

ดลฤดี ฉายศิริ, วิมลรัตน์ อินศวร และ รักษ์จินดา วัฒนาลัย. 2553. การปนเปื้อนของเมลามีนในอาหารสัตว์ (Contamination of Melamine in Animal Feeds). ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 10, 153-161.

ธานินทร์ เกตุประกอบ และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2554. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และองค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) *ใน*: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี ครั้งที่ 12 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 28 มกราคม 2554. 720-728.

เบญจมาศ เอื้อพิพัฒน์. 2551. ปลานิล...สัตว์เศรษฐกิจใหม่ของไทย. สารวิจัยธุรกิจ ธนาคารกรุงไทย 12, 1-7.

ปวีณา จันทร์เล็ก, มะลิ บุณยรัตผลิน และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2552. ผลของเมลามีน (melamine) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธุ์ผสม [*Clarias macrocephalus* (Gunther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)]. วารสารการประมง 62, 331-340.

ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง, อมรเทพ อาชวกุลเทพ, ประกรณ์ จาละ และสุดธิษา เหล่าเปี่ยม. 2552. การสำรวจการปนเปื้อนสารเมลามีนในอาหารสัตว์สำเร็จรูปชนิดเม็ดสุนัขและแมวในประเทศไทย. ไทย. *ใน*: เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มี.ค. 2552. 173-177.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. 2547. การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต. ว. นานาสัตว์น้ำ 8, 18-19.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, พรรณศรี จริโมภาส, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ, วีระ วัชรกรโยธิน และวิมล จันทรโรทัย. 2536. การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 23. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2550ก. เมลามีน (Melamine) ภัยร้ายในอาหารสัตว์ที่ผู้เลี้ยงต้องระวัง. ว. สัตว์เศรษฐกิจ 25, 8-12.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2550ข. รอบรู้เรื่องเมลามีน. ว. สาส์นไก่ & สุกร 52, 21-25.

วรรณี ชยานันต์นุกูล, พิพัฒน์ชัย อภิรักษ์ธัญกร และปนัดดา มุสิกวัณณ์. 2550. เปรียบเทียบผลการตรวจอิเล็กโทรไลต์ในซีรัมระหว่างน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทและน้ำยาเตรียมเองโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ Beckman CX-3 delta. สงขลานครินทร์เวชสาร 25, 295-301.

วุฒิพร พรหมขุนทอง และอัจฉริยา มูสโกภาศ. 2548. ผลของเอนไซม์ไฟเตสต่อการเพิ่มการใช้วัตถุดิบพืชในปลานิลแดงแปลงเพศ (Oreochromis niloticus Linn.) ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27, 151-170.

สุเทพ เรืองวิเศษ. 2551. Risk Assessment เพื่อการจัดการสารเคมีของประเทศ. ใน: Risk Assessment เพื่อการจัดการสารเคมีของประเทศ" วันที่ 24 พฤศจิกายน 2551 ณ ห้องประชุม 1 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2551. การจัดทำองค์ความรู้ (Knowledge Management) เรื่องการเพาะและอนุบาลปลานิล. กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ศักยภาพการผลิตและการตลาดปลานิล. เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ 119. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการ เกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศุภมาส โชติเมธีภิรมย์, สุกัญญา จัตตุพรพงษ์ และผ่องพักตร์ อันไชยศรี. 2532. การวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของเกลือยูเรียและแอมโมเนียที่ปนปลอมในปลาป่นการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27, รายงานผลการวิจัย สาขาสัตว์ สัตวแพทย์ ประมง 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2532. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7-13.

ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. 2545. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์.พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2551. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ.2551.เอกสารฉบับที่ 12/2553. กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อรอุษา อุสันโน. 2546. ผลของอะฟลาทอกซินบี1 ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. สงขลา: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อราอะฟลาท๊อกซิน. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยาคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 322 น.

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Khattab, Y.A.E. and Shalaby, A.M.E. 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture 298: 267–274.

Adams, S.M. 1999. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. *In*: Lipids in Freshwater Ecosystems, Arts, M.T. and Wainman, B.C. (Eds.) New York: Springer-Verlag.

Agamy, E. 2011. Histopathological liver alterations in juvenile rabbitfish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil,dispersed oil and dispersant. Ecotoxicol. Environ. Saf. (Article inpress).

Al Hafedh, Y.S. 1999. Effects of dietary protein on growth and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquac. Res. 30: 385-393.

Ali, B.H. and Bashir, A.A. 1994. Effect of fish oil treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. Ann Nutr Metab. 38: 336-339.

Amano, M. and Takahashi, A. 2009. Review: Melanin-concentrating hormone: A neuropeptide hormone affecting the relationship between photic environment and fish with special reference to background color and food intake regulation. Peptides 30: 1979–1984.

Anderson, W.C, Turnispeed, S.B., Karbiwnyk, C.M. and Madson, M.R. 2007. Determination of melamine residues in catfish tissue by triple quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography. U.S. Food and Drug Administration, Animal Drug Research Center, Denver: Laboratory Information Bulletin LIB 4396.

Anna, C. 2010. China finds 170 more tons of tainted milk powder that should have been destroyed by was reused. The Canadian Press. Available: http://www.sovereignindependent.com/?p=1656 Accessed: 14 July 2010.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis 15th Edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

Bai, X., Bai, F., Zhang, K., Lv, X., Qin, Y., Li, Y., Bai, S. and Lin, S. 2010. Tissue deposition and residue depletion in laying hens exposed to melamine-contaminated diets. J. Agric. F. Chem. 58: 5414-5420.

Baker, B.I. 1993. The role of melanin-concentrating hormone in colour change. Ann NY Acad Sci 680: 279–89.

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

Barrows, F.T., Gaylord, T.G., Sealey, W.M., Porter, L. and Smith, C.E. 2008. The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 283: 148–155.

Basson, P.E. 2011. The Transmission of Melamine from Feed to Poultry Products. Master thesis. Stellenbosch University.

Baynes, R.E., Smith, G., Mason, S.E., Barrett, E., Barlow, B.M. and Riviere, J.E. 2008. Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration. Food Chem.Toxicol. 46: 1196–1200.

BBC News. 2010. China searches for 100 tonnes of melamine-tainted milk. Available: http://news.bbc.co.uk/2/hi/8503576.stm. Accessed: 14 July 2010.

Bell, J.G., Tocher, D.R., MacDonald, F.M. and Sargent, J.R., 1995. Effects of dietary borage oil [enriched in γ-linoleic acid, 18:3(n-6)] or marine fish oil [enriched in eicosapentaenoic

acid, 20:5(n-3)] on growth, mortalities, liver histopatology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiol. Biochem. 14: 373–383.

Bhalla, V., Grimm, P.C., Chertow, G.M. and Pao, A.C. 2009. Melamine nephrotoxicity: An emerging epidemic in an era of globalization. Kidney Int. 75: 774-779.

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

Bureau, D.P., Kaushik, S.J. and Cho, C.Y. 2002. Bioenergetics. *In*: Fish Nutrition. 3 Edition. Halver, J.E. and Hardy, R.W. (eds.), San Diego: Academic press.

Burns, K. 2007a. Recall shines spotlight on pet foods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230: 1285–1286.

Burns, K. 2007b. Events leading to the major recall of pet foods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230: 1600–1620.

Burton, D., Vokey, J. and Mayo, D. 1995. Adrenoceptors in cryptic patterning of flatfish, Pleuronectes americanus. Proc. R. Soc. Lond. 261B: 181–186.

Buur, J.L., Baynes, R.E. and Riviere, J.E. 2008. Estimating meat withdrawal times in pigs exposed to melamine contaminated feed using a physiologically based pharmacokinetic model. Regul. Toxicol. Pharmacol. 51: 324–331.

Campbell, P.G.C., Hontela, A., Rasmussen, J.B., Giguere, A., Gravel, A., Kraemer, L., Kovesces, J., Lacroix, A., Levesque, H. and Sherwood, G. 2003. Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. Hum. Ecol. Risk Assess. 9: 847–866.

CBC News, 2007. Tainted fish feed was used in Canada: B.C. minster. Available: http://www.cbc.ca/canada/story/2007/05/09/fish-feed.html. Accessed: 14 July 2010.

Chakraborty, S.B. and Banerjee, S. 2009. Culture of Monosex Nile Tilapia under Different Traditional and Non-Traditional Methods in India. WJFMS 1: 212-217.

Chan, E.Y.Y., Griffiths, S.M. and Chan, C.W. 2008. Public-health risks of melamine in milk products. The Lancet 372: 1444-1445.

Chen, Y.M. and Chavin, W. 1967. Comparative biochemical aspects of integumental and tumor tyrosinase activity in vertebrate melanogenesis. *In*: The Pigmentary System. Montagna, W., Hu, F. (Eds). Oxford: Pergamon.

Chen, K.C., Liao, C.W., Cheng, F.P., Chou, C.C., Chang, S.C., Wu, J.H., Zen, J.M., Chen, Y.T. and Liao, J.W. 2009. Evaluation of subchronic toxicity of pet food contaminated with melamine and cyanuric acid in rats. Toxicol. Pathol. 37: 959–968.

Chen, G.R., Sun, L.T., Lee, Y.H. and Chang, C.F. 1996. Characteristics of Blood in Common Carp, *Cyprinus carpio*, Exposed to Low Temperatures. J. Appl. Aquaculture 5: 21-31.

Chen, Y., Yang, W., Wang, Z., Peng, Y., Li, B., Zhang, L. and Gong, L., 2010. Deposition of melamine in eggs from laying hens exposed to melamine contaminated feed. J. Agric. F. Chem. 58: 3512-3516.

China Daily. 2011. 53 officials punished for melamine milk scandals. China Daily. http://www.chinadaily.com.cn/china/2011-05/03/content_12432133.htm

Chou, B.S. and Shiau, S.Y. 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*. Aquaculture 143: 185-195.

Clapp, R.W., Howe, G.K. and Jacobs, M.M. 2007. Dossier: Cancer: Influence of environment, Environmental and occupational causes of cancer: A call to act on what we know. Biomed. Pharmacother. 61: 631-639.

Colby, R.W. and Mesler Jr., R.J. 1958. Ruminant feed compositions. U.S. Patent No. 2819968.

Dan, N.C. and Little, D.C. 2000. The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. Aquaculture 184: 221-231.

Debnath, D., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Yengkokpam, S. and Mukherjee, S.C. 2005. Mineral status of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings in relation to supplemental phytase: Absorption, whole-body and bone mineral content. Aquac. Res. 36: 326-335.

Deng, S.X., Tian, L.X., Liu, F.J., Jin, S.J., Liang, G.Y., Yang, H.J., Du, Z.Y. and Liu, Y.J. 2010. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. Aquaculture 307: 233-240.

De Rouffignac, C., Roinel, N. and Elalouf, J.M. 1993. Comparative effects of peptide hormones on water and electrolyte transport along the proximal and distal tubules of the mammalian nephron *In*: New Insights in Vertebrate Kidney Function 52, Brown, J.A., Balment, R.J. and Rankin, J.C. (Eds). Soc. Exp. Biol. Seminar Series.

Dobson, R.L.M., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R.T., Baker, T.R., Pullen, A.M., Regg, B.T., Bigalow-Kern, A.S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. and Daston, G.P. 2008. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. J. Toxicol. Sci. 106: 251–262.

Du, H., Li, M. and Yang, P. 2008. Effects of 3-benzidino-6-phenylpyridazine, as an acetylcholinesterase inhibitor, on outward potassium current in acutely isolated rat hippocampal pyramidal neurons. Toxicol. Lett. 181: 104–111.

Eaton, R.C., Lee, R.K.K. and Foreman, M.B. 2001. The Mauthnercell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. Progress in Neurob. 63: 467-485.

Eberle, A.N. 1988. The Melanotropins: Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action. Basel: Karger.

Elfarra, A.A., Duescher, R.J., Sausen, P.J., O'hara, T.M. and Cooley, A.J. 1994. Methimazole protection of rats against gentamicininduced nephrotoxicity. Can. J. Physiol. Pharmacol. 72: 1238-1244.

El-Sayed, A.F.M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. Aquaculture 179: 149-168.

Environmental Protection Agency. 1988. Melamine; toxic chemical release reporting; community right-to-know. Fed. Reg. 53: 23128–23133.

Evan, D.H. 1975. Ionic exchange mechanisms in fish gills. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol. 51: 491-495.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Use of Fishery Resources as Feed Inputs to Aquaculture Development: Trends and Policy Implications. FAO Fisheries Circular No. 1018. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department.

FAO (Food and Agricultural Organization). 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department.

Fasakin, E.A., Serwata, R.D. and Davies, S.J. 2005. Comparative utilization of rendered animal derived products with or without composite mixture of soybean meal in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) diets. Aquaculture 249: 329-338.

Ferraris, Jr.C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418: 1–628.

Fitzsimmons, K. 2005. Tilapia nutrition overview feeding shrimp's partner in polyculture. Feed International 3: 24-27.

Flis, J. 1968. Anatomicohistopathological changes induced in carp by ammonia water. I. Toxic concentrations. II Sublethal concentrations. Acta Hydrobiol. 10: 205–238.

Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture 199: 197–227.

Fujii, R. 1969. Chromatophores and pigments. *In*: Fish Physiology, Vol.3. Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds). New York: Academic Press.

Fujii, R. and Oshima, N. 1986. Control of chromatophore movements in teleost fishes. Zool. Sci. 3: 13–47.

Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Pezzato, A.C., Furuya, V.R.B. and Miranda, E.C. 2004. Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquac. Res. 35: 1110-1116.

García-Carmona, F., García-Cfinovas, F. and Lozano, J.A. 1982. Kinetic study of the pathway of melanization between L-dopa and dopachrome. Biochim. Biophys. Acta 714: 124–131.

Ge, J., Zhao, L.W., Liu, C.Y., Jiang, S., Lee, P.W. and Liu, F. 2011. Rapid determination of melamine in soil and strawberry by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Control 22: 1629-1633.

Geyer, H.J., Steinberg, C.E., Scheunert, I., Brüggemann, R., Schütz, W., Kettrup, A. and Rozman, K. 1993. A review of the relationship between acute toxicity (LC_{50}) of γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. Toxicology 83: 169-179.

Gossner, C.M.E., Schlundt, J., Ben Embarek, P., Hird, S., Lo-Fo-Wong, D., Beltran, J.J.O., Ocampo Beltran, J.J., Teoh, K.N. and Tritscher, A. 2009. The Melamine Incident: Implications for International Food and Feed Safety. Environ. Health Perspect. 117: 1803-1808.

Grases, F., Costa-Bauzá, A., Gomila, I., Serra-Trespalle, S., Alonso-Sainz, F. and del Valle, J.M. 2009. Melamine Urinary Bladder Stone. Urology 73: 1262–1263.

Gröneveld, D., Balm, P.H.M., and Wendelaar Bonga, S.E. 1995. Biphasic effect of MCH on α-MSH release from the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) pituitary. Peptides 16: 945-949.

Grossbard, M.L., Boye,r J.L. and Gordon, E.R. 1987. The excretion pattern of biliverdin and bilirubin in bile of the small skate (*Raja erinacea*). J. Comp. Physiol. 157B: 61-66.

Guan, N., Fan, Q., Ding, J., Zhao, Y., Lu, J., Ai, Y., Xu, G., Zhu, S., Yao, C., Jiang, L., Miao, J., Zhang, H., Zhao, D., Liu, X. and Yao, Y. 2009. Melamine-Contaminated Powdered Formula and Urolithiasis in Young Children. N. Engl. J. Med. 360: 1067-1074.

Guillou, A., Soucy, P., Khalil, M. and Abambounou, L. 1995. Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture 136: 351–362.

Gupta, U.S. and Guha, S. 2006. Microcystin toxicity in a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Curr. Sci. 91: 1261-1271.

Hack, H.D. and Tyl, R.W. 1985. The induction of bladder stones by terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and melamine (2,4,6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol. 5: 294-313.

Hardy R.W. and Barrows, F.T. 2002. Diet Formulation and Manufacture. *In*: Fish Nutrition. 3 Edition. Halver, J.E. and Hardy, R.W. (eds.), San Diego: Academic press.

Harris, M.O. and Corcoran, J.J. 1995. Toxicological Profile for Dinitrophenols, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services.

Hau, A., Kwan, T. and Li, P. 2009. Melamine toxicity and the kidney. J. Am. Soc. Nephrol. 20: 245.

Hauck, R.D. and Stephenson, H.F. 1964. Nitrification of triazine nitrogen. J. Agric. Food Chem. 12: 147-151.

He, Y., Jiang, G.P., Zhao, L., Qian, J.J., Yang, X.Z., Li, X.Y., Du, L.Z. and Shu, Q. 2009. Ultrasonographic characteristics of urolithiasis in children exposed to melamine-tainted powdered formula. World J. pediatrics 5: 118-121.

Hearing, V.J. and Jimenez, M. 1987. Mammalian tyrosinase. The critical regulatory controlpoint in melanocyte pigmentation. Int. J. Biochem. 19: 1141–1147.

Hegazi, M.M., Attia, Z.I. and Ashour, O.A. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. Aqua. Toxicol. 99: 118-125.

Heiene, R., Rumsby, G., Ziener, M., A-Dahl, S., Tims, C., Teige, J. and Ottesen, N. 2009. Chronic kidney disease with three cases of oxalate-like nephrosis in Ragdoll cats. J. Feline Med. Surg. 11: 474-480.

Heller, D.N. and Nochetto, C.B. 2008. Simultaneous determination and confirmation of melamine and cyanuric acid in animal feed by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry. Rapid Comm. Mass Spectrom. 22: 3624–3632.

Hinton, D.E. and Lauren, O.J. 1990. Liver Structural Alterations Accompanying Chronic Toxicity in Fishes :Potential Biomarkers of Exposure. Biomarkers of Environmental Contamination. Michigan: Lewis Publishers.

Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N. and Takei, Y. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. Comp. Biochem. Physiol. 136B: 593–620.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). 2007. Melamine: Human Health Effects. Available: URL:http://toxnet.nlm.nih.gov/cgibin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@na+MelamineAccessed: 22 September 2008.

Hsieh, D.P.H., Chiang, C.F., Chiang, P.H. and Wen, C.P. 2009. Toxicological analysis points to a lower tolerable daily intake of melamine in food. Regul. Toxicol. Pharmacol. 55: 13-16.

Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. 4th Edition. San Francisco: W. H. Freeman and Company.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 1999. Some chemicals that cause tumours of the kidney, or urinary bladder in rodents and some other substances. IARC Monogr. Eval. Carcinogen. Risks. Hum. 73: 329-338.

Ibáñez, M., Sancho, J.V. and Hernández, F. 2009. Determination of melamine in milk-based products and other food and beverage products by ion-pair liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 649: 91-97.

Isaia, J. 1982. Effects of environmental salinity on branchial permeability of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Physiol. 326: 297–307.

Jauncey, K. and Ross, B. 1982. A Guide to Tilapia Feeds and Feeding. Stirling: Institute of Aquaculture.

Jobling, M., Meloy, O.H., Dos Santos, J. and Christiansen, B. 1994. The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history. Aquacult. Int. 2: 75–90.

Karbiwnyk, C.M., Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Storey, J.M., Madson, M.R., Miller, K.E., Gieseker, C.M., Miller, R.A., Rummel, N.G. and Reimschuessel, R. 2009. Determination of cyanuric acid residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 637: 101–111.

Kawauchi, H. and Baker, B.I. 2004. Review Melanin-concentrating hormone signaling systems in fish. Peptides 25: 1577–1584.

Kelly, J.M. and Janz, D.M. 2008. Altered energetic and parasitism in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting metal-mining contaminated lakes. Ecotoxicol. Environ. Saf. 70: 357–369.

Kim, C.W., Yun, J.W., Bae, I.H., Lee, J.S., Kang, H.J., Joo, K.M., Jeong, H.J., Chung,J.H., Park, Y.H. and Lim, K.M. 2010. Determination of spatial distribution of melamine-cyanuric acid crystals in rat kidney tissue by histology and imaging matrixassisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol. 23: 220–227.

Kubota, S.S., Miyazaki, T. and Egusa, S. 1982. Color atlas of fish histopathology Vol.1. Tokyo: Shinsuisan Shinbunsha.

Kucuk, S. 1999. The effect of diel un-ionised ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish and tilapia. Master thesis. Mississippi: Mississippi State University.

Kumar Singh, R., Balange, A.K. and Ghughuskar, M.M. 2006. Protein sparingeffect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. Aquaculture 258: 680-684.

Lam, C.W., Lan, L., Che, X., Tam, S., Wong, S.S.Y., Chen, Y., Jin, J., Tao, S.H., Tang, X.M., Yuen, K.Y. and Tam, P.K.H. 2009. Diagnosis and spectrum of melamine-related renal

disease: Plausible mechanism of stone formation in humans. Clin. Chim. Acta 402: 150–155.

Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1961. Comparison of various methods of determination of haemoglobin in trout blood. Prog. Fish Cult. 26: 11-15.

Lewbart, G. 2001. Anesthesia, Analgesia, and Surgery in Pet Fish. Atlantic Coast Veterinary Conference 2001 October 9 - 11, 2001 Atlantic City, New Jersey.

Li, J., Qi, H.Y. and Shi, Y.P. 2009. Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. 1216A: 5467-5471.

Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H. and Robinson, E.H. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 185: 313-327.

Lim, L., Scherer, S.J., Shuler K.D., and Toth, J.P. 1990. Disposition of cyromazine in plants under environmental conditions. J. Agric. Food Chem. 38: 864–870.

Liti, D.M., Waidbacher, H., Straif, M., Mbaluka, R.K., Munguti, J.M. and Kyenze, M.M. 2006. Effects of partial and complete replacement of freshwater shrimp meal (*Caridinea nilotocus* Roux) with a mixture of plant protein sources on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in fertilized pond. Aquac. Res. 37: 477-483.

Liu, Y., Deng, J., An, L., Liang, J., Chen, F. and Wang, H. 2011. Spectrophotometric determination of melamine in milk by rank annihilation factor analysis based on pH gradual change-UV spectral data. Food Chem. 126: 745-750.

Liu, G., Li, S., Jia, J., Yu, C., He, J., Yu, C. and Zhu, J. 2010. Pharmacokinetic study of melamine in rhesus monkey after a single oral administration of a tolerable daily intake dose. Regul. Toxicol. Pharmacol. 56: 193-196.

Liu, H.Y., Zhang, W., Xue, M., Wu, X.F., Zheng, Y.H., Guo, L.Y. and Sheng, H.J. 2009. Acute toxicity study for melamine on Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicu*). Acta Hydrobiol. Sin. 33: 157–163 (Chinese).

Lovell, T. 1998. Nutrition and Feeding of Fish. 2 Editions. Massachusetts : Kluwer Acadamic.

Lovell, R.T. and Limsuwan, T. 1982. Intestinal synthesis and dietary non-essentiality of vitamin B12 for Tilapia nilotica. Trans. Am. Fish. Soc. 111: 485-490.

Lupatsch, I., Kissil, G.W. and Sklan, D. 2003. Comparison of energy and protein efficiency among three fish species gilthead sea bream (*Sparus aurata*), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and white grouper (*Epinephelus aeneus*): energy expenditure for protein and lipid deposition. Aquaculture 225: 175-189.

Ma, C., Kang, H., Liu, Q., Zhu, R. and Cao, Z. 2011. Insight into potential toxicity mechanisms of melamine: An in silico study. Toxicology 283: 96-100.

Mallory, F.B. 1942. Pathological Technique. Philadelphia: W.B. Saunders Co.

Mast, R.W., Jeffcoat, A.R., Sadler, B.M., Kraska, R.C. and Friedman, M.A. 1983. Metabolism, disposition and excretion of [^{14}C] melamine in male Fischer 344 rats. Food Chem. Toxicol. 21: 807-810.

Matsuda, K., Shimakura, S., Maruyama, K., Miura, T., Uchiyama, M., Kawauchi, H., Shioda, S. and Takahashi, A. 2006. Central administration of melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses food intake, but not locomotor activity, in the goldfish, *Carassius auratus*. Neurosci. Lett. 399: 259-263.

Mayor, S. 2004. FAO/WHO meeting warns of contamination of powdered infant formula. BMJ 328: 426.

Mehra, S., Dubey, J. and Bhowmik, D. 2009. Hepatotoxic Responses in *Heteropneustus fossilis* (Bloch) after Oral Exposure to Microcystis under Laboratory Conditions. AEJTS 1: 50-56.

Miller, C., Hruby, V.J., Matsunga, T.O. and Bickford, P.C. 1993. Alpha-MSH and MCH are functional antagonists in a CNS auditory gating paradigm. Peptides 14: 431–440.

Ministry of Health of the People's Republic of China, September 21, 2008. Available: http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohbgt/s3582/200810/38031.htm. Accessed: 25 September 2010.

Miao, H., Fan, S., Wu, Y.N., Zhang, L., Zhou, P.P., Li, J.G., Chen, H.J. and Zhao, Y.F. 2009. Simultaneous determination of melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry. Biomed. Environ. Sci. 22: 87-94.

Metón, I., Fernández, F. and Baanante, I.V. 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis–gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 225: 99-107.

Mizusawa, K., Kobayashi, Y., Sunuma, T., Asahida, T., Saito, Y. and Takahashi, A. 2011. Inhibiting roles of melanin-concentrating hormone for skin pigment dispersion in barfin flounder, *Verasper moseri*. Gen. Comp. Endocrinol. 171: 75-81.

National Library of Medicine. 1998. Toxic Chemical Release Inventory 1987 (TRI87), Bethesda, MD.

Nemil, G., Yildiz, S. and Gezer, E.D. 2005. Effects of melamine raw paper weight, varnish type and the structure of continuous pressed laminate (CPL) on the physical, mechanical properties and decay resistance of particleboard. Int. Biodeterior. Biodegrad. 56: 166–172.

Ng, W.K. and Bahurmiz, O.M. 2009. The impact of dietary oil source and frozen storage on the physical, chemical and sensorial quality of fillets from market-size red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. Food Chem. 113: 1041–1048.

Ng, W.K., Abdullah, N. and De Silva, S.S. 2008. The dietary protein requirement of the Malaysian mahseer, *Tor tambroides* (Bleeker), and the lack of protein-sparing action by dietary lipid. Aquaculture 284: 201-206.

NRC (National Research Council). 1993. Nutrient Requirement of Fish. Washington, DC: National Academy Press.

NTP (National Toxicology Program). 1983. Carcinogenesis Bioassay of Melamine (CAS NO. 108-78-1) in F344/N Rats and B6C3F1 mice (feed study). Technical Report Series no.245. pp. 173.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2002. SIDS Analysis UNEP Publication: Melamine. Available at URL: http://www.inchem.org/document/sids/sids/108781.pdf. (22 September 2008).

Ogasawara, H., Imaida, K., Ishiwata, H., Toyoda, K., Kawanishi, T., Uneyama, C., Hayashi, S., Takahashi, M. and Hayashi, Y. 1995. Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats: correlation between carcinogenicity and urolith formation. Carcinogenesis 16: 2773–2777.

Pacheco, M. and Santos, A.M. 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 53: 331–347.

Panfeng, S., Hong, C., Zhongjin, Y., Wei, Z., Wenhui, L., Baoguang, S., Junsheng, B., Liingjun, Z. and Zizhen, H. 2011. Management of Pediatric Urolithiasis Induced by Melamine-contaminated Powdered Formula (Report of 619 Cases). Urology 78: 411-416.

Patel, K. and Jones, K. 2007. Analytical method for the quantitative determination of cyanuric acid as the degradation product of sodium dichloroisocyanurate in urine by liquid chromatography mass spectrometry: Short communication. J. Chromatogr. 853B: 360–363.

Pechsiri, J. and Yakupitiyage, A. 2005. A comparative study of growth and feed utilization efficiency of sex-reversed diploid and triploid Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquac. Res. 36: 45-51.

Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D. and Peña, J.B. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathionemetabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aqua. Toxicol. 65: 337-360.

Phromkunthong, W., Boonyaratpalin, M., Storch, V., 1997. Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin C for seabass, *Lates calcarifer*. Aquaculture 151: 225-243.

Phromkunthong, W. and Udom, U. 2008. Available phosphorus requirement of sex-reversed red tilapia fed all-plant diets. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 7-16.

Qatar Fertiliser Company. 2011. His highness Sheikh Hamad Bin Khalifa Al-Thani, the Emir, dedicates the Qatar Melamine Company to the nation. http://www.qafco.com/news.html

Qing, P., Sheng, L., Yong, G.T. and Yin, Z.B. 2003. The effect of chromium picolinate on growth and carbohydrate utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. Aquaculture 225: 421-429.

Reimschuessel, R., Evans, E.R., Stine, C.B., Hasbrouck, N., Mayer, T.D., Nochetto, C. and Gieseker, C.M. 2010. Renal crystal formation after combined or sequential oral administration of melamine and cyanuric acid. Food Chem. Toxicol. 48: 2898–2906.

Reimschuessel, R., Stewart, L., Squibb, E., Hirokawa, K., Brady, T., Brooks, B., Shaikh, B. and Hodsdon, C. 2005. Fish Drug Analysis-Phish-Pharm: a searchable database of pharmacokinetics data in fish. AAPS 7: 288–327.

Reimschuessel, R., Stewart, L., Squibb, E., Hirokawa, K., Brady, T., Brooks, B., Shaikh, B. and Hodsdon, C. 2007. Available: http://www.fda.gov/cvm/addaquainfo.htm. Accessed: 23 September 2010.

Reimschuessel, R., Evans, E., Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Mayer, T.D., Nochetto, C., Rummel, N.G., Gieseker, C.M., 2009. Residue depletion of melamine and cyanuric acid in catfish and rainbow trout following oral administration. J. Vet. Pharmacol. Therapeut. 33: 172–182.

Richard, D.M. and Frank, A.C. 2008. The Concept of Ideal Protein in Formulation of Aquaculture Feeds. Available: http://edis.ifas.ufl.edu/FA144. Accessed: 22 September 2008.

Rima, J., Abourida, M., Xu, T., Cho, K. and Kyriacos, S. 2009. New spectrophotometric method for the quantitative determination of melamine using Mannich reaction. J. Food Compos. Anal. 22: 689–693.

Romana-Eguia, M.R.R. and Eguia, R.V. 1999. Growth of five Asian red tilapia strains in saline environments. Aquaculture 173: 161-170.

Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, J.G. 2002. The Lipids. *In*: Fish Nutrition. 3 Edition. Halver, J.E. and Hardy, R.W. (eds.), San Diego: Academic press.

Schroder, W., Hinterkeuser, S., Seifert, G., Schramm, J., Jabs, R., Wilkin, G.P. and Steinhauser, C. 2000. Functional and molecular properties of human astrocytes in acute hippocampal slices obtained from patients with temporal lobe epilepsy. Epilepsia 41 (Suppl. 6): 181–184.

Seikai, T., Matsumoto, J., Shimozaki, M., Oikawa, A. and Akiyama, T. 1987. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys oli□aceus*. Pigment Cell Res. 13: 143–151.

Shiau S.Y. 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish-with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Aquaculture 151: 79-96.

Shiau, S.Y. 2002. Tilapia *Oreochromis* spp. *In*: Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. Webster, C.D. and Lim, C. (eds). New York: CAB International Publishing.

Shiau, S.Y. and Liang, H.S. 1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. J. Nutr. 125: 976-982.

Shiau, S.Y. and Peng, C.Y. 1993. Protein sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus.* Aquaculture 117: 327-334.

Shiau, S.Y. and Tseng, H.C. 2007. Dietary calcium requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, reared in fresh water. Aquac. Nutr. 13: 298-303.

Shimojo, R.Y. and Iwaoka, W.T. 2000. A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel-specific marine toxins. Toxicology 154: 1-7.

Shelton, D.R., Karns, J.S., McCarty, G.W. and Durham, D.R. 1997. Metabolism of Melamine by Klebsiella terragena. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2832–2835.

Smith, S. and Hafer, L.J. 2004. Pigments and Minerals. *In*: Guide to Special Stains. Wulff, S. (ed.). California: DakoCytomation.

Smith, J.L., Wishnok, J.S. and Deen, W.M., 1994. Metabolism and excretion of methyamines in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 125: 296–308.

Speers-Roesch, B., Sandblom, E., Lau, G.Y., Farrell, A.P. and Richards, J.G. 2010. Effects of environmental hypoxia on cardiac energy metabolism and performance in tilapia. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 298: 104–119.

Squadrone, S., Ferro, G.L., Marchis, D., Mauro, C., Palmegiano, P., Amato, G., Poma Genin, E. and Abete, M.C. 2010. Determination of melamine in feed: Validation of a gas chromatography–mass spectrometry method according to 2004/882/CE regulation. Food Control 21: 714–718.

Stickney, R.R. 1979. Principles of Warmwater Aquaculture. New York: John Wiley & Sons.

Stine, C.B., Reimschuessel, R., Gieseker, C.M., Evans, E.R., Mayer, T.D., Hasbrouck, N.R., Tall, E., Boehmer, J., da Costa, G.G. and Ward, J.L. 2011. A No Observable Adverse Effects Level (NOAEL) for pigs fed melamine and cyanuric acid. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60: 363-372.

Sun, F., Ma, W., Xu, L., Zhu, Y., Liu, L. and Peng, C. 2010a. Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. Trends Anal. Chem. 29: 1239-1249.

Sun, H., Wang, L., Ai, L., Liang, S. and Wua, H. 2010b. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. Food Control 21: 686-691.

Tacon, A. and Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285: 146-158.

Thurston, R.V., Russo, R.C. and Smith, C.E. 1978. Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. Trans. Am. Fish Soc. 107: 361–368.

Tran-Duy, A., Schrama, J.W., van Dam, A.A. and Verreth, J.A.J. 2008. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 275: 152-162.

Tzing, S.H. and Ding, W.H. 2010. Determination of melamine and cyanuric acid in powdered milk using injection-port derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry with furan chemical ionization. J. Chromatogr. 1217A: 6267-6273.

Ueno, Y. 1983. Effect of Trichothecene Mycotoxins on Farm Animals. *In*: Development in Food Science 4, Ueno, Y. (ed.) Tokyo: Elsevier.

US-FDA 2007. Interim Melamine and Analogues Safety/Risk Assessment Peer Review Report. Washington, DC.: United States Food and Drug Administration.

Wang, R. 2006. Melamine capacity is serious surplus. China Chemical Reporter. Available: http://goliath.ecnext.com/coms2/gi_0199-5152838/Melamine-capacity-is-serious-surplus.html. Accessed: 14 August 2011.

Wang, Y., Guo, J.L., Bureau, D.P. and Cui, Z.H. 2006. Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients in feeds for cuneate drum (*Nibea miichthioides*). Aquaculture 252: 476– 483.

Wang, Z., Ma, X., Zhang, L., Yang, W., Gong, L., He, P. and Li, Z. 2010. Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples. Anal. Chim. Acta 662: 69-75.

Warne, J.M., Harding, K.E. and Balment, R.J. 2002. Neurohypophysial hormones and renal function in fish and mammals. Comp. Biochem. Physiol. 132B: 231-237.

Watanabe, T. 2002. Stratgies for further development of aquatic feeds. Fish. Sci. 68: 242-252.

Weise, E. and Schmit, J. 2007. FDA: Feed no human threat. USA Today, May, 2, 2007. ISSN:07347356. Available:http://search.ebscohost.com.ez.sun.ac.za/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=J0E122276131707&site=ehost-live. Accessed: 22 July 2010.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77: 591–625.

WHO (World Health Organization). 2009. Background Paper on the Chemistry of Melamine Alone and in Combination with Related Compounds. *In*: WHO Expert Meeting on Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid. Ottawa, 1–4 December 2008.

Wiles, P.G., Gray, I.K. and Kissling, R.C. 1998. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: Review and interlaboratory study using dairy products. J. AOAC Int. 81: 620-632.

Wilkie, M.P. 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comp. Biochem. Physiol. 118A: 39-50.

Willea, K., McLean, E., Goddardb, J.S. and Byatt, J.C. 2002. Dietary lipid level and growth hormone alter growth and body conformation of blue tilapia, *Oreochromis aureus.* Aquaculture 209: 219-232.

Wisner, R. 2009. Corn and Soybean Oil Supplies-Adequacy for Biofuels Production. Oil Mill Gazetteer 115: 2-5.

Wolf, J.C. and Wolff, M.J. 2005. A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish. Toxicol. Pathol. 33: 75–85.

Wu, Y.T., Huang, C.M., Lin, C.C., Ho, W.A., Lin, L.C., Chiu, T.F., Tarng, D.C., Lin, C.H. and Tsai, T.H. 2009a. Determination of melamine in rat plasma, liver, kidney, spleen, bladder and brain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. 1216A: 7595-7601.

Wu, Y.N., Zhao, Y.F., Li, J.G. and melamine analisis group. 2009b. A Survey on Occurrence of Melamine and Its Analogues in Tainted Infant Formula in China. Biomed. Environ. Sci. 22: 95-99.

Xia, X., Ding, S., Li, X., Gong, X., Zhang, S., Jiang, H., Li, J. and Shen, J. 2009. Validation of a confirmatory method for the determination of melamine in egg by gas chromatography–

mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 651: 196-200.

Xue, J., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Yang, Y. and Liufu, Z. 2011a. Effects of melamine on growth performance and skin color of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*). Aquaculture 320: 142-146.

Xue, M., Qin, Y., Wang, J., Qiu, J., Wu, X., Zheng, Y. and Wang, Q. 2011b. Plasma pharmacokinetics of melamine and a blend of melamine and cyanuric acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Regul. Toxicol. Pharmacol. 61: 93-97.

Yang, J.J., Tian, Y.T., Yang, Z. and Zhang, T. 2010. Effect of melamine on potassium currents in rat hippocampal CA1 neurons. Toxicol. in Vitro 24: 397–403.

Yeannesa, M.I. and Almandos, M.E. 2003. Estimation of fish proximate composition starting from water content. J. Food Compos. Anal. 16: 81-92.

Yildirim, M., Lim, C., Wan, P.J. and Klesius, P.H. 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus puctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid. Aquaculture 219: 751–768.

Zaki, M.S., Sharaf, N.E. and Mostafa, H.O.E. 2010. Effect of vanadium toxicity in *Clarias lazera*. Journal of American Science 6: 291-296.

Zhang, S. and Horrocks, A.R. 2005. A review of flame retardant polypropylene fibres. Prog. Polym. Sci. 28: 1517–1538.

Zhang, X., Xie, P., Li, D. and Shi, Z. 2007. Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia. Toxicon 49: 1150-1157.

Zheng, X.L., Yu, B.S., Li, K.X. and Dai, Y.N. 2012. Determination of melamine in dairy products by HILIC-UV with NH_2 column. Food Control 23: 245-250.

Zhou, W., Jiang, Y., Shi, H., Dai, Q., Liu, J., Shen, C. and Yang, H. 2010. The characteristics of immune system changes in children who ingested melamine-contaminated powdered formula in China. Int. J. Environ. Health Res. 20: 289-297.

ZhuGe, Y., Ye, Y.T., Gao, Y.L. and Cai, C.F. 2007. The comparison of pigment and tryosinase activity in seven species of freshwater fishes. J. Shanghai Ocean Univ. 16: 431–436. (Chinese).