**นิพนธ์ต้นฉบับ**

# ผลของสาหร่ายสไปรูไลนาต่อการเจริญเติบโตและระดับแอนติบอดีในปลาดุกพันธุ์ผสม (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus* (Burchell))

**วุฒิพร พรหมขุนทอง[1] และ อัญชลี พิพัฒนวัฒนากุล[2]**


## Abstract

**Phromkunthong, W. and Pipattanawattanakul, A.**

**Effects of *Spirulina* sp. on growth performance and antibody levels in hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus* (Burchell)**

**Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 115-132**

**A 8-wk feeding trial was carried out for hybrid catfish with an initial average weight of 7 g in 235-l glass tanks attached to closed-recirculating system with 0.8 l/min flow rate. Feeds containing varying percentages of dry *Spirulina* sp. 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30% were tested with three replications for each treatment. All the feeds were formulated to contain dietary requirement for the catfish i.e. 30% protein, 7% fat and 360 kcal gross energy/ 100 g feed. The results showed that the feed with 10% *Spirulina* sp. achieved the best performance on weight gain, specific growth rate, feed conversion ratio, apparent net protein utilization and development of antibody levels against bacteria *Aeromonas hydrophila*. The total carotenoid**



**Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand**

[1]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Nutrition) รองศาสตราจารย์ [2]วท.ม. (วาริชศาสตร์) ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : wutiporn.p@psu.ac.th


รับต้นฉบับ 23 สิงหาคม 2547 รับลงพิมพ์ 16 พฤศจิกายน 2547

**contents in fish flesh increased with the level of *Spirulina* sp. supplemented. The supplementation of *Spirulina* sp. resulted in no changes of blood parameters or histology.**

**Key words :** *Spirulina* sp., immune, hybrid catfish, *Aeromonas hydrophila*

## บทคัดย่อ

**วุฒิพร พรหมขุนทอง และ อัญชลี พิพัฒนวัฒนากุล**

**ผลของสาหร่ายสไปรูไลนาต่อการเจริญเติบโตและระดับแอนติบอดีในปลาดุกพันธุ์ผสม (*Clarias macrocephalus* (Günther) x *Claraias gariepinus* (Burchell))**

**ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 115-132**

**การทดลองนี้ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวประมาณ 7 กรัม โดยใช้ตู้ทดลองที่มีความจุน้ำ 235 ลิตร ระบบน้ำเป็นระบบไหลเวียนแบบปิดโดยมีอัตราการไหล 0.8 ลิตร/นาที อาหารทดลองมี 7 สูตร แต่ละสูตรมี 3 ซ้ำ โดยอาหารสูตรที่ 1-7 มีส่วนผสมของสาหร่ายสไปรูไลนาแห้งที่ระดับ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30% ตามลำดับ ปรับสารอาหารทุกสูตรให้มีระดับของโปรตีน ไขมัน และ พลังงานใกล้เคียงกัน (โปรตีน 30% ไขมัน 7% และพลังงานที่ย่อยได้ 360 กิโลคาลอรี/อาหาร 100 กรัม) ใช้เวลาเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของสาหร่ายสไปรูไลนา 10% มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมสาหร่ายชนิดนี้มีผลทำให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เพิ่มขึ้น จากการวิเคราะห์ปริมาณของคาร์โรทินอยด์รวม (total carotenoid) ในเนื้อปลาพบว่า เพิ่มขึ้นตามระดับของสาหร่ายสไปรูไลนาที่เสริมในอาหารและการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารไม่ส่งผลต่อค่าฮีโมโกลบินรวม แต่ส่งผลให้เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นและไม่พบความผิดปกติทางเนื้อเยื่อวิทยาของปลา**

สาหร่ายสไปรูไลนา เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีคุณสมบัติในการเสริมสุขภาพ เนื่องจากมี มีรงควัตถุในปริมาณสูง เช่นคาโรทีนอยด์ (carotenoid) ซึ่งพบว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมี ได้แก่ ช่วยทำลายอนุมูลอิสระ (free radical) ของออกซิเจนที่มีพิษซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการทำงานของเซลล์ (Miki, 1991) และป้องกันมิให้องค์ประกอบเซลล์ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระโดยการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) (Gabaudan, 1996) จึงมีผลส่งเสริมประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันจำเป็น คือ กรดแกมมาลิโนเลนิค (γ-(gamma)-linolenic acid; 18:3 ω-6) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดิน (prostagrandin) มีหน้าที่สำคัญคือควบคุมการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล ควบคุมการอักเสบ การบวม และ การงอกของเซลล์ (Richmond, 1986) นอกจากนี้ สไปรูนายังมีโปรตีนสูงถึง 50-70% ของน้ำหนักแห้ง จึงใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำคัญในอาหารมนุษย์และสัตว์ จากการศึกษาการใช้ประโยชน์ในสัตว์น้ำที่ผ่านมา พบว่ามีการนำสไปรูไลนาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน (Nakamura, 1982) แหล่งสารเร่งสีในปลาสวยงาม (วุฒิพร, 2527; มะลิ และ นันทิยา, 2528) และกุ้ง (สุกิจ และ พูนสิน, 2538) แหล่งโปรตีนในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) (บานชื่น, 2532) นอกจากนี้มีการนำสาหร่าย สไปรูไลนาเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นเพื่อเร่งการเจริญเติบโตอีกด้วย โดย Nandeesha และคณะ (2001) ทดลองนำสาหร่ายสไปรูไลนาแทนที่ปลาป่น 5 ระดับ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100% ในอาหารปลา 2 ชนิด คือ ปลา catla (*Catla catla*) และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) พบว่าในปลา catla การแทนที่ปลาป่นด้วยสาหร่ายสไปรูไลนาทุกระดับในอาหารไม่มีผลต่อน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญ

เติบโตจำเพาะ อัตราแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน แต่ในปลายี่สกเทศ พบว่าการแทนที่ปลาป่นด้วยสาหร่ายสไปรูไลนาในระดับที่สูงกว่า 25% ส่งผลต่อน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีที่สุดและอัตราการแลกเนื้อมีค่าต่ำที่สุด จึงกล่าวได้ว่าสาหร่ายสไปรูไลนาเป็นแหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพ ที่สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยมีโปรตีนสูงและประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น วิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะ *Spirulina platensis* ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) จึงทำให้ง่ายต่อการย่อยและดูดซึม (Becker and Venkataraman, 1984; Nandeesha *et al*., 1998)

จากการศึกษาของ Lee (1999) เกี่ยวกับผลด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบว่าเมื่อเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 0.1% ในอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ส่งผลให้กุ้งมีระบบภูมิต้านทานดีขึ้น โดยมีค่าการจับกินโดยวิธีการโอบล้อม (phagocyte activity) สูงขึ้น ต่อมา Lee และคณะ (2003) พบว่าการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 0.3% ในอาหารกุ้งกุลาดำ สามารถเพิ่มการเหนี่ยวนำเม็ดเลือดให้มาโอบล้อมเชื้อโรคได้ดีขึ้นและเพิ่มค่าฟาโกไซทิก แอกติวิตี (phagocytic activity) สูงขึ้นในวันที่ 4 หลังจากกุ้งได้รับอาหารทดลองเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา และนอกจากนี้ Lee และคณะ (2003) ศึกษาในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด กรานูลาร์ (granular cell) สามารถเกิดดีกรานูเลชัน (degranulation) ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 45 - 60 นาที และพบว่าเมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อโรค (challenged test) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ความเข้มข้น $1x10^4$ CFU/มล. ผลคือกุ้งในชุดควบคุมซึ่งได้รับอาหารที่ไม่มีการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาตายทั้งหมดภายในเวลา 14 วัน ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย 0.3% ตายเพียง 10% ส่วน Duncan และ Klesius (1996) พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เพิ่มขึ้นเมื่อปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 2.7% ของน้ำหนักอาหาร

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบถึงคุณสมบัติที่ให้ผลในเชิงบวกของสาหร่ายสไปรูไลนาผู้วิจัยจึงให้ความสนใจ ในการนำสาหร่ายสไปรูไลนามาเป็นแหล่งโปรตีนและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทดแทนสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นสารเคมี ซึ่งมีราคาแพง อาจส่งผลต่อผู้บริโภคสัตว์น้ำและมีข้อควรระวังในการใช้หลายประการ เช่นในกรณีของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันประเภทยาปฏิชีวนะหากมีการใช้ติดต่อเป็นเวลานานจะมีผลทำให้สัตว์น้ำดื้อยาและมีการตกค้างของยาในร่างกาย (Roberts, 1989) มีการศึกษานำเบตา 1,3-กลูแคน (β-1,3 glucan) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ทำให้ปลาแอตแลนติกแซลมอน (Atlantic salmon, *Salmo salar*) ทนต่อเชื้อ *Vibrio anguillarum, V. salmonicida* และ *Yersinia ruckeri* (Robertsen *et al*., 1990 ) แต่ปัญหาของการใช้เบตา-1,3 กลูแคน คือ ความไม่สะดวกในการนำมาใช้ ต้องทำให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนด้วยเอทานอล (ethanol) แล้วจึงหมุนเหวี่ยง (centrifuge) และทำอัลตราโซนิเคชัน (ultrasonication) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาผลของสาหร่ายสไปรูไลนาต่อการเจริญเติบโตและศึกษาระดับการสร้างแอนติบอดี (antibody) ในปลาดุกพันธุ์ผสม การที่เลือกใช้ปลาชนิดนี้เป็นสัตว์ทดลองเนื่องจากเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมบริโภคเป็นอันดับ 1 ของประเทศ (กองเศรษฐกิจการประมง, 2546) สามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนสูงที่มีรสชาติดี อีกทั้งยังเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว เป็นที่ต้องการของตลาดและขายได้ราคาในเกณฑ์ดี

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมอุปกรณ์

อุปกรณ์การทดลองประกอบด้วย ตู้กระจกขนาด 100x50x47 ซม. ความจุน้ำ 235 ลิตร โดยทำความสะอาดและติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศเติมน้ำจากบ่อพักน้ำที่ปราศจากคลอรีนลงในตู้ทดลอง ให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิด ประกอบด้วย ถังกรองน้ำซึ่งเป็นถังไฟเบอร์กลาสกลมปริมาตร 1 ลบ.เมตร บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และแผ่นใยกรองจำนวน 2 ถัง บ่อพักน้ำเป็นบ่อคอนกรีต บรรจุถ่าน เปลือกหอย ทรายละเอียด และเครื่องให้อากาศ มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา โดยมีอัตราการไหลของน้ำ 1.2 ลิตร/นาที น้ำที่ไหลเวียนในระบบจะล้นออกทางท่อน้ำล้นซึ่งติดอยู่ในตู้ทดลอง และไหลไปรวมกันในท่อน้ำทิ้งลงสู่ถังกรองน้ำจากถังกรองน้ำไหลลงสู่บ่อบำบัด

น้ำ จากนั้นก็จะถูกสูบขึ้นไปยังบ่อพักน้ำ และไหลกลับมายังตู้ทดลอง

**2. การเตรียมสัตว์ทดลอง**

นำปลาดุกพันธุ์ผสม 2,000 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา โดยใช้ปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวขนาด 1-2 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ลบ.เมตร โดยเติมน้ำในถังให้ได้ปริมาตร 400 ลิตร เลี้ยงปลาให้มีน้ำหนักประมาณ 7 กรัม ก่อนเริ่มทดลองปรับสภาพให้ปลาคุ้นเคยกับอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ โดยใช้อาหารสูตรควบคุม ที่ใช้ในการทดลองนี้ (อาหารสูตรที่ 1) วันละ 2 ครั้ง คือเวลา 8.30 น. และ 16.30 น. สังเกตพฤติกรรมการยอมรับอาหาร และนำลูกปลาไปตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตภายนอก โดยลูกปลาที่ใช้ทดลองต้องมีสุขภาพดี ไม่มีโรคใดๆ จากนั้นจึงคัดขนาดให้ใกล้เคียงกันและจึงนำมาเลี้ยงในตู้ทดลองความจุน้ำ 200 ลิตร จำนวน 20 ตัว/ซ้ำ (60 ตัว/ชุดการทดลอง) แต่ละตู้ทดลองมีอากาศพ่นจากเครื่องให้อากาศตลอดเวลา ระบบการทดลองเป็นแบบปิดโดยใช้ แผ่นใยกรอง ทราย เปลือกหอย และถ่านเป็นตัวกรอง

**3. การเตรียมสาหร่ายสไปรูไลนา**

นำหัวเชื้อสาหร่ายสไปรูไลนาจากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา มาเพาะเลี้ยงในขวดโหลแก้วความจุน้ำ 10 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงตามสูตรของธิดา (2545) จากนั้นจึงขยายลงในตู้ขนาดความจุ 250 ลิตร และขยายลงถังไฟเบอร์ความจุ 1 ตัน ความหนาแน่นของสาหร่าย เริ่มต้น 250 มก./น้ำเลี้ยงสาหร่าย 1 ลิตร เก็บเกี่ยวผลผลิตของสาหร่ายทุก 7 วัน นำสาหร่ายที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อแห้งสนิทจึงนำมาบดให้ละเอียดและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เตรียมไว้เพื่อผสมในอาหารทดลองต่อไป

**4. การเตรียมอาหารทดลอง**

เตรียมวัตถุดิบได้แก่ สาหร่ายสไปรูไลนา ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลายข้าว รำ วิตามิน และ แร่ธาตุรวมโดยการบดและร่อนวัตถุดิบอาหารที่ยังไม่ละเอียด คือ ถั่วเหลือง และปลายข้าว ด้วยตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) หลังจากนั้นนำวัตถุดิบอาหารทั้งหมด (ไม่รวมถึงวิตามินและแร่ธาตุรวม) มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) ดังแสดงใน Table 1 และคำนวนสูตรอาหารให้มีคุณค่าทางโภชนาการให้แต่ละสูตรดัง Table 2 โดยอาหารทดลองมี 7 สูตร แต่ละสูตรมีโปรตีน 30%, ไขมัน 7% ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือไนโตรเจนฟรีเอ็กแทร็ก (nitrogen free extract, NFE) คำนวณจาก 100-(ความชื้น+โปรตีน+ไขมัน+เถ้า+เยื่อใย) และ พลังงาน (gross energy) 353-360 กิโลคาลอรี/อาหาร 100 กรัม (โดยคำนวณจาก โปรตีน x 5.65, ไขมัน x 9.45, คาร์โบไฮเดรต x 4.1 (De Silva and Anderson, 1995)) สูตรอาหารแต่ละสูตรต่างกันเพียงปริมาณของสาหร่ายสไปรูไลนาที่แทนที่ปลาป่นในอาหาร 7 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30% วิธีการทำอาหารดำเนินการโดยชั่งวัตถุดิบ และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมอาหาร (Hobart Model A200T) เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำมันถั่วเหลืองตามปริมาณที่ใช้ใน

**Table 1. Proximate analysis of feed ingredients (% as fed basis) ***

| Feed ingredients | Moisture | Protein | Fat | Ash | Fiber | NEF |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Spirulina | 3.30±0.06 | 56.12±0.26 | 4.81±0.92 | 7.50±0.00 | 0.38±0.03 | 27.95±1.59 |
| Fish meal | 5.00±0.15 | 54.72±3.33 | 15.78±0.13 | 23.26±0.40 | 0 | 1.18±0.81 |
| Soybean meal | 7.41±0.03 | 46.13±0.60 | 5.79±0.30 | 7.48±0.78 | 6.54±0.07 | 29.55±3.65 |
| Corn | 4.19±0.05 | 8.44±0.30 | 7.02±0.35 | 3.19±0.03 | 6.90±0.13 | 70.02±0.47 |
| Rice bran | 4.77±0.05 | 8.28±0.08 | 3.69±0.12 | 8.59±0.22 | 0.99±0.01 | 73.86±0.15 |
| Rice flour | 5.42±0.08 | 12.05±0.28 | 15.72±0.56 | 15.83±0.09 | 4.88±0.07 | 45.81±0.65 |

***Mean ± standard deviation of three replications; NFE : Nitrogen free extract**

**Table 2. Composition of experimental diets ***

| Ingredient (g/ 1000 g feed) | Diet formulae | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Spirulina | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| Fish meal | 280 | 250 | 200 | 150 | 100 | 70 | 0 |
| Soybean meal | 250 | 220 | 220 | 230 | 230 | 230 | 230 |
| Corn | 150 | 150 | 130 | 130 | 140 | 100 | 100 |
| Rice bran | 60 | 100 | 90 | 110 | 90 | 90 | 110 |
| Rice flour | 90 | 60 | 70 | 40 | 60 | 50 | 60 |
| Soybean oil | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 20 | 20 |
| Vitamin mix[1] | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Mineral mix[2] | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Rice hull | 150 | 150 | 160 | 160 | 150 | 170 | 160 |
| **Total** | **1000** | **1000** | **1000** | **1000** | **1000** | **1000** | **1000** |
| **Gross energy (Kcal/1000 g feed)** | **3,532.4** | **3,535.7** | **3,551.7** | **3,557.8** | **3,599.4** | **3,614.6** | **3,614.4** |

**[1] Vitamin mixture (per kg): Acetate(A) 4,000 IU; Cholecalciferol ($D_3$) 2,000 IU; DL-alpha-tocopherol (E) 50 mg; Menadione sodium bisulfite ($K_3$) 10 mg; Thiamine ($B_1$) 20 mg; Riboflavin ($B_2$) 20 mg; Niacin 150 mg; Calcium pantothenate 200 mg; Folic acid 5 mg; Pyridoxine ($B_6$) 20 mg; Cyanocobalamin ($B_{12}$) 0.2 mg; Biotin 2 mg; Inositol 400 mg; Choline chloride 2,000 mg; Ascorbic acid (C) 1,000 mg**
**[2] Mineral mixture (g/kg feed): Manganese 25 mg; Zinc 20 mg; Copper 5 mg; Iodine 5 mg; Cobalt 0.05 mg; Selenium 0.3 mg; Iron 30 mg**
*** by calculation**

แต่ละสูตร ผสมน้ำมัน และ วัตถุดิบอาหารให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที และ เติมน้ำ 40% ของน้ำหนักอาหาร อัดเม็ดด้วยเครื่องทำอาหาร (Hobart Model A200T) ขนาดหน้าแว่นเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม. อบอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผึ่งให้เย็น เก็บใส่ถุงพลาสติก เพื่อเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C และนำอาหารทดลองที่เตรียมเสร็จแล้วไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และ เถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) (Table 3) และวิเคราะห์ปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารโดยวิธี Lowry method อ้างมาจาก Chien และ Jeng (1992) (Table 4)

### 5. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* บริสุทธิ์ เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar ($TSA^-$) นำเชื้อมาทดสอบ pathogenic โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 20-24 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C นาน 10 นาที แล้วละลายในน้ำเกลือ 0.85% ให้มีความเข้มข้นของเชื้อ $3x10^8$ เซลล์/มล. เมื่อเทียบกับ Macfarland ฉีดเข้าช่องท้อง และกล้ามเนื้อปริมาตร 0.2 มล./ปลา 1 ตัว เก็บตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อและเพิ่งตาย นำมาเขี่ยเชื้อ 3 บริเวณ คือ แผล ตับ และม้าม ในอาหาร $TSA^-$ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีเดียวและมีลักษณะสีเหลืองขุ่นมาทำการเลี้ยงบนอาหารใหม่หลายๆ ครั้ง (subculture) และนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบแบบ api 20 E (bioMe' rieuxsa) แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร $TSA^-$ เก็บไว้ในการทดลองต่อไป

### 6. แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD: Completely Randomized Design) โดยแบ่งการทดลองเป็น 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ทดสอบผลของ

**Table 3. Proximate analysis of experimental diets (% on dry matter basis)***

| Experimental group | *Spirulina* (%) | Moisture | Protein | Fat | Ash | Fiber | NEF** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0.50±0.07 | 31.91±0.41 | 7.50±0.26 | 15.30±0.18 | 9.93±0.23 | 34.92±0.68 |
| 2 | 5 | 2.89±0.21 | 31.52±0.28 | 7.80±0.16 | 15.23±0.70 | 9.57±0.98 | 32.87±0.98 |
| 3 | 10 | 1.25±0.24 | 31.11±0.67 | 7.30±0.16 | 14.33±0.04 | 11.44±0.16 | 37.27±2.40 |
| 4 | 15 | 0.46±1.12 | 30.93±0.22 | 7.49±0.59 | 13.66±0.26 | 11.02±1.12 | 35.68±0.31 |
| 5 | 20 | 0.47±0.12 | 30.21±0.26 | 7.95±0.13 | 12.46±0.23 | 9.28±1.19 | 39.65±0.12 |
| 6 | 25 | 1.71±0.05 | 31.80±0.81 | 7.72±0.18 | 11.90±0.21 | 10.96±0.93 | 36.43±0.41 |
| 7 | 30 | 1.45±0.05 | 31.03±0.50 | 7.52±0.32 | 10.05±0.54 | 9.47±0.03 | 40.73±0.75 |

*** Mean ± standard deviation of three replications; ** NFE : Nitrogen free extract**

**Table 4. Carotenoid content in diets (% on dry matter basis)***

| Experimental group | *Spirulina* (%) | Carotenoid content (mg/g feed) |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 0.02±0.03 |
| 2 | 5 | 0.23±0.03 |
| 3 | 10 | 0.76±0.08 |
| 4 | 15 | 0.98±0.07 |
| 5 | 20 | 1.40±0.33 |
| 6 | 25 | 1.65±0.30 |
| 7 | 30 | 2.85±0.61 |

*** Mean ± standard deviation of three replications**

สาหร่ายสไปรูไลนาต่อระบบภูมิคุ้มกัน และ ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกพันธุ์ผสม เริ่มต้นการทดลองโดยการสุ่มปลาจากถังอนุบาลมาชั่งน้ำหนัก และปล่อยปลาลงตู้ๆ ละ 20 ตัว โดยที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นของปลาทดลองน้ำหนักตัวละประมาณ 7 กรัม ให้อาหารทดลอง วันละ 2 ครั้ง คือเวลา 8.30 น. และ 16.30 น. โดยให้ปลากินอาหารจนอิ่ม บันทึกปริมาณอาหารที่ปลากินทุกสัปดาห์ตลอดการทดลองและตรวจคุณภาพน้ำ ทุก 1 สัปดาห์ เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลา ตามวิธีของ Boyd และ Tucker (1992) ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen; DO) ความเป็นด่าง (total alkalinity) ความกระด้าง (hardness) แอมโมเนีย (ammonia) ไนไตรท์ (nitrite) และ ไนเตรท (nitrate)

**7. การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล**

**7.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอก**

ในขณะทำการทดลองสังเกตลักษณะภายนอกทั่วไปของปลาทุกชุดการทดลอง ได้แก่ การบวมบริเวณกกหู การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่ ผิวหนัง ครีบ และ อวัยวะภายนอกอื่นๆ รวมทั้งพฤติกรรมการกินอาหารของปลา ใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรคตามสภาพของปลา ดูดตะกอน และทำความสะอาดตู้ปลาทุกๆ วัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละ 30% ของปริมาตรน้ำทั้งหมด เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาตลอดการทดลอง

**7.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของปลา**

ชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ เพื่อทราบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยการชั่งน้ำหนักรวมของปลาด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหาร 1 มื้อก่อนวันที่ชั่งน้ำหนักปลา) และบันทึกอัตราการรอดตายของปลาทุกชุดการทดลอง นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ และสังเกตลักษณะอาการของปลาตลอดการทดลอง พร้อมจดบันทึก จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณการรอดตาย (survival) ตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000) อัตราการเจริญเติบโต ตามวิธีการของ De Silva และ Anderson (1995) โดยพิจารณาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966) อัตราการกินอาหาร (rate of feed intake) ตามวิธีการของ Yone และ Fujii (1975)

**7.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาทดลอง**

สุ่มตัวอย่างปลาก่อนเริ่มทดลองจำนวน 30 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นในร่างกายทันที และนำตัวอย่างปลาไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลา ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และ เถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) บันทึกเป็นองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลาเริ่มต้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาทดลองตู้ละ 3 ตัว นำไปวิเคราะห์ความชื้นทันที ตามวิธีของ AOAC (1990) จากนั้นสุ่มปลาทดลอง 5 ตัว/ตู้ ไปผ่านกระบวนการทำแห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 48 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คือ โปรตีน ไขมัน และ เถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) และนำข้อมูลมาคำนวณค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (PER: Protein Efficiency Ratio) (Zeitoun *et al*., 1973) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิต่อไป (ANPU: Apparent Net Protein Utilization) (Robinson and Wilson, 1985)

**7.4 การศึกษาองค์ประกอบเลือด**

สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ตัว สลบด้วย 2-ฟินอกซิเอธานอล (2-henoxyethanol) เจาะเลือดบริเวณโคนหางของปลาดุกพันธุ์ผสม โดยใช้เอธิลีนไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethelenediaminetetraacetic acid; EDTA) 1% ป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด คือ ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) โดยวิธี Cyanmet-hemoglobin ของ Larsen และ Snieszko (1961) ปริมาณของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว โดยการเจือจางด้วย Yokoyama's fluid และนับตามวิธีของ Blaxhall และ Daisley (1973) ฮีมาโตคริต (hematocrit) วัดโดย microhematocrit method (Larsen and Snieszko, 1961)

**7.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา**

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 6 ตัว เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อตับมาแช่ในฟอร์มาลีน (formalin) 10% 1 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Humason (1972) ตัดเนื้อเยื่อตับให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อตับมาย้อมสีด้วย ฮีมาทอกซ์ซิลินอีโอซิน (hematoxylin eosin; HE) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD ต่อไป

**7.6 การศึกษาปริมาณคาโรทีนอยด์**

วิเคราะห์ปริมาณของคาโรทีนอยด์โดยสุ่มปลา 6 ตัว จากทุกชุดการทดลอง มาทำการระเหยแห้งด้วยความเย็น (freeze dry) จนแห้งสนิท และบดให้ละเอียดเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกันทั้งตัว หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วย อะซิโตน (acetone) น้ำกลั่น และ อีเธอร์ (ether) ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นแล้ว จึงนำชั้นที่เป็นอีเธอร์ซึ่งมีสีเขียวมาระเหยประมาณ 1 ชั่วโมง ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน (hexane) และนำสารละลายที่ได้มาทำการหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบสแกน (scan spectrophotometer) ของ Perkin Elmer รุ่น Lambda 25 (Chien and Jeng, 1992) โดยเมื่อทราบค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่นสูงสุด ($\lambda_{max}$ = 409 nm) จึงนำไปคำนวณหาปริมาณคาโรทีนอยด์ในอาหารทดลองและปลาที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (Sommer, 1992)

**7.7 การศึกษาค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ (antibody titer)**

สุ่มตัวอย่างปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลองจำนวน 3 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองทำการสลบด้วย ควินาล์ดิน (quinaldin) 1-2 หยด/น้ำ 1 ลิตร รอประมาณ 30 วินาที ทำการฉีดวัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยทำการเตรียมจากวิธีของ Peterson และ Fryer (1974) หลังจากฉีดวัคซีน 15 วัน จึงทำการเก็บซีรัม โดยทำการสลบปลาด้วยควินาล์ดิน เจาะเลือดบริเวณหาง (caudal vein) โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มล. และเข็มฉีดยาขนาด 27 กรัม x 1 นิ้ว โดยเลือดที่เจาะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 2 ชั่วโมง (Robertsen *et al*., 1990) ตรวจวัดค่า reciprocal titer (Klesius *et al*., 2000) จากนั้นเจือจางซีรัมแบบ 2 เท่า (two-fold dilution) โดยใช้สารเจือจางซีรัม (diluent; 0.85% NaCl+0.1% formalin) ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร (µl) ในถาดหาค่าไตเตอร์ชนิดหลุมก้นกลม (microtiter plate) นำแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* เช่นกัน ใส่ลงในถาด ไตเตอร์หลุมละ 25 ไมโครลิตร ผสมโดยใช้ไมโครปิเปต (micropipet) ให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน

22 ชั่วโมง ตรวจผลการตกตะกอน และ บันทึกผล (Klesius *et al*., 2000)

## ผลการทดลอง

**1. ลักษณะภายนอกและพฤติกรรมของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ**

จากการสังเกตลักษณะภายนอก และพฤติกรรมของปลาระหว่างการทดลอง พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาทุกระดับ ไม่มีความผิดปกติ การยอมรับอาหารดีตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์

**2. การเจริญเติบโต**

**2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว**

เมื่อเริ่มต้นทดลองน้ำหนักเฉลี่ยของปลาอยู่ในช่วง 6.97±0.04 - 7.15±0.15 กรัม (Table 5) น้ำหนักของปลาเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เลี้ยงและเริ่มมีความแตกต่างทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ($p<0.05$) ของการเลี้ยง โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 5-25% มีการเจริญเติบโตดีไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 30% มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ส่วนสัปดาห์ที่ 4-6 ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 5 และ 10% มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา) ($p<0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 10% มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงที่สุด ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 30% มีค่าดังกล่าวต่ำที่สุด ($p<0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนาในระดับอื่นๆ (5%, 15%, 20%, 25%) และที่ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนามีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 5)

**3. น้ำหนักเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการกินอาหาร และการรอดตาย**

ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 10% มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ($p<0.05$) ต่างจากชุดควบคุม (สูตรที่ 1) รองลงมา คือ ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 5% (สูตรที่ 2) แต่ไม่แตกต่างกับปลาในชุดควบคุม (ไม่เสริมสไปรูไลนา, สูตรที่ 1) ส่วนชุดการทดลองที่ 4 ถึง 6 (เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 15, 20 และ 25%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($p>0.05$) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาที่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 0, 5 และ 10% ในอาหารมีค่าสูงที่สุด ($p<0.05$) รองลงมา คือปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่าย สไปรูไลนา 15-25% ($p>0.05$) และปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 30% มีค่าดังกล่าวต่ำที่สุด ($p<0.05$) (Table 6)

อัตราการกินอาหารของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 5% มีค่าไม่ต่างจากที่ไม่เสริมสไปรูไลนา และมีค่าสูงที่สุด ($p<0.05$) รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 10 และ 30% ตามลำดับ ($p<0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 15%, 20% และ 25% มีอัตราการกินอาหารต่ำที่สุด โดยไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลองดังกล่าว ($p>0.05$) (Table 6)

การรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร อยู่ในช่วง 80.00±8.66-98.33±2.89% และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 6)

**4. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio, FCR), ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) และการใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ (apparent net utilization, ANPU)**

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 10-25% มีค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์ดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ โดยไม่แตกต่างระหว่างชุดการทดลอง ($p<0.05$) รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมสไปรูไลนาและเสริมสไปรูไลนา 5% ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 30% มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด (Table 7)

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของปลาที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม โดยปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 10-25% สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ (ดีที่สุด) รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมสไปรูไลนาและเสริมสไปรูไลนา 5% ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 30% มีต่ำที่สุด ($p<0.05$) (Table 7)

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาที่ได้รับ

**Table 5. Average body weight of hybrid catfish fed the experimental diets for 8 weeks***

| Experimental group | *Spirulina* (%) | Rearing period (week) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| 1 | 0 | 7.02±0.05 | 10.08±1.10$^{bc}$ | 14.63±2.11$^{bc}$ | 19.09±3.35$^{bc}$ | 22.70±1.20$^{b}$ |
| 2 | 5 | 7.15±0.15 | 10.60±0.86$^{bc}$ | 15.13±1.14$^{cd}$ | 20.60±0.38$^{cd}$ | 28.91±1.72$^{b}$ |
| 3 | 10 | 7.08±0.11 | 11.54±1.35$^{c}$ | 16.22±2.09$^{d}$ | 23.09±3.73$^{d}$ | 33.47±4.26$^{c}$ |
| 4 | 15 | 7.04±0.08 | 10.11±0.76$^{bc}$ | 13.20±0.90$^{bc}$ | 17.23±1.11$^{bc}$ | 22.12±2.71$^{b}$ |
| 5 | 20 | 6.97±0.04 | 9.82±0.18$^{b}$ | 11.86±1.61$^{b}$ | 16.34±1.69$^{b}$ | 23.50±0.03$^{b}$ |
| 6 | 25 | 7.02±0.09 | 9.73±0.41$^{b}$ | 12.97±0.42$^{bc}$ | 17.58±1.55$^{bc}$ | 22.77±1.49$^{b}$ |
| 7 | 30 | 7.08±0.14 | 8.16±0.41$^{a}$ | 9.96±0.74$^{a}$ | 11.71±1.10$^{a}$ | 13.71±0.91$^{a}$ |

*** Mean ± standard deviation of three replications**
**Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

**Table 6. Weight gain, specific growth rate, rate of feed intake and survival of hybrid catfish fed the experimental diets***

| Experimental Group | *Spirulina* (%) | Weight gain (%) | specific growth rate (%/body weight/day) | rate of feed intake (%/body weight/day) | survival (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 248.72±48.04$^{bc}$ | 2.07 ±0.22$^{bc}$ | 3.48±0.18$^{d}$ | 88.33±12.58$^{a}$ |
| 2 | 5 | 300.10±27.11$^{c}$ | 2.31±0.11$^{cd}$ | 3.57±0.03$^{d}$ | 80.00±8.66$^{a}$ |
| 3 | 10 | 371.22±50.13$^{d}$ | 2.58±0.18$^{d}$ | 3.14±1.56$^{c}$ | 80.00±18.03$^{a}$ |
| 4 | 15 | 210.34±24.46$^{b}$ | 1.88±0.13$^{b}$ | 2.59±0.13$^{a}$ | 93.33±5.77$^{a}$ |
| 5 | 20 | 214.43±40.63$^{b}$ | 1.90±0.22$^{b}$ | 2.58±0.05$^{a}$ | 91.67±5.77$^{a}$ |
| 6 | 25 | 224.40±24.14$^{b}$ | 1.96±0.12$^{b}$ | 2.66±0.07$^{a}$ | 98.33±2.89$^{a}$ |
| 7 | 30 | 93.61±11.46$^{a}$ | 1.10±0.10$^{a}$ | 2.92±0.05$^{b}$ | 91.67±5.77$^{a}$ |

*** Mean ± standard deviation of three replications**
**Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

อาหารสูตรที่ 1-6 (ไม่เสริมสไปรูไลนาและเสริมสไปรูไลนา 5-25% ตามลำดับ) มีค่าไม่แตกต่างกัน (p>0.05) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 30% มีค่าต่ำที่สุด และแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 5-15% (p<0.05) (Table 7)

### 5. องค์ประกอบทางโภชนาการของปลาทั้งตัว

องค์ประกอบทางเคมีของซากปลาก่อนทดลอง และซากปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงไว้ใน Table 8 โดยพบว่าระดับของโปรตีนในซากปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 30% มีค่าต่ำที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากปลาที่เสริมสไปรูไลนา 25% (p>0.05) ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารเสริมไม่เสริมสไปรูไลนาและปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 5- 20% มีค่าดังกล่าวสูงกว่าและไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลองดังกล่าว (p>0.05)

ไขมันในซากปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 25% และ 30% มีค่าต่ำที่สุด คือ 11.93±0.04 และ 12.64 ± 0.24% แตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ (p<0.05) ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมสไปรูไลนามีไขมันในซากสูงที่สุดและแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ (p< 0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริม สไปรูไลนา 5, 10, 15 และ 20% มีค่าไขมันในซากค่อนข้างสูงแต่ไม่แตกต่างระหว่างชุดการทดลองดังกล่าว (p>0.05) (Table 8)

เถ้าในซากปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 25 และ 30% มีค่าสูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 10% ส่วน 0, 5, 15 และ 20% ไม่แตกต่าง

**Table 7. Feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER) and apparent net protein utilization (ANPU) of hybrid catfish fed the experimental diets for 8 weeks***

| Experimental group | *Spirulina* (%) | FCR | PER | ANPU(%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 2.04±0.21[b] | 1.58±0.15[b] | 26.29±2.77[ab] |
| 2 | 5 | 2.02±0.08[b] | 1.57±0.07[b] | 33.99±13.81[b] |
| 3 | 10 | 1.57±0.01[a] | 2.06±0.04[c] | 35.35±3.77[b] |
| 4 | 15 | 1.58±0.16[a] | 2.06±0.22[c] | 39.28±13.27[b] |
| 5 | 20 | 1.59±0.13[a] | 2.09±0.17[c] | 29.79±3.46[ab] |
| 6 | 25 | 1.53±0.80[a] | 2.06±0.08[c] | 31.98±2.57[ab] |
| 7 | 30 | 2.19±0.38[c] | 1.12±0.15[a] | 17.05±5.32[a] |

*** Mean ± standard deviation of three replications**
**Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

**Table 8. Whole body composition (%) of hybrid catfish fed the experimental diets for 8 weeks***

| Experimental group | *Spirulina* (%) | Moisture (%) | Protein (%) | Fat (%) | Ash (%) | NFE (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Fish initial | - | 79.95±0.81 | 61.62±0.59 | 14.37±0.04 | 18.33±0.66 | 5.55±1.36 |
| 1 | 0 | 74.75±1.48 | 60.91±0.37[c] | 17.66±0.28[d] | 20.44±0.17[a] | 0.79±0.29[a] |
| 2 | 5 | 72.82±3.54 | 60.59±0.41[c] | 15.83±0.22[c] | 20.53±0.23[a] | 3.06±0.04[ab] |
| 3 | 10 | 73.16±2.55 | 58.34±0.88[bc] | 14.42±0.09[bc] | 22.51±0.21[abc] | 5.27±0.26[bc] |
| 4 | 15 | 75.22±1.97 | 60.08±0.34[c] | 15.36±0.44[c] | 21.45±3.45[ab] | 3.10±3.16[ab] |
| 5 | 20 | 76.55±0.82 | 58.12±1.04[bc] | 13.55±0.36[b] | 20.28±0.72[a] | 8.27±2.54[c] |
| 6 | 25 | 74.17±1.48 | 56.38±0.40[ab] | 11.93±0.04[a] | 23.78±0.37[bc] | 7.91±0.21[c] |
| 7 | 30 | 72.71±1.22 | 55.15±0.89[a] | 12.64±0.24[a] | 25.17±0.40[c] | 7.04±1.16[c] |

*** Mean ± standard deviation of three replications**
**Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

ระหว่างชุดการทดลอง (p>0.05) (Table 8)

**6. ปริมาณคาโรทีนอยด์ในซากปลา**

ปริมาณคาโรทีนอยด์ในซากปลาทั้งตัวที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาแต่ละระดับมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของสไปรูไลนาที่เพิ่มขึ้นในอาหารทดลอง โดยปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมสไปรูไลนามีปริมาณคาโรทีนอยด์ต่ำกว่าทุกชุดการทดลอง (p>0.05) (Table 9)

**7. องค์ประกอบเลือดปลา**

องค์ประกอบเลือดปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 7 สูตร แสดงไว้ใน Table 10 โดยพบว่าปริมาณฮีโมโกลบินรวมไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (p>0.05)

ค่าฮีมาโตคริตของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 5-25% มีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา) (P>0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหาร 30% มีค่าฮีมาโตคริตในเลือดต่ำที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ

ปริมาณเม็ดเลือดขาวพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 5% มีค่าต่ำที่สุด (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และชุดการทดลองที่มีการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหาร 10, 15 และ 20% (p>0.05) และพบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 25 และ 30% มีค่าสูงที่สุด (p<0.05)

**Table 9. Carotenoid content in whole body of hybrid catfish fed the experimental diets for 8 weeks (on % dry matter basis)***

| Experimental group | *Spirulina* (%) | Carotenoid content (mg/g fish) |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 0.30±0.12[a] |
| 2 | 5 | 4.37±0.18[b] |
| 3 | 10 | 5.80±0.91[bc] |
| 4 | 15 | 6.07±1.20[bc] |
| 5 | 20 | 8.22±0.05[cd] |
| 6 | 25 | 8.75±2.11[d] |
| 7 | 30 | 9.28±0.29[d] |

*** Mean ± standard deviation of three replications**
**Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

ปริมาณเม็ดเลือดแดง มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง โดยเม็ดเลือดแดงของปลาที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนา 15% มีค่าสูงที่สุด (p<0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 5, 25 และ 30% มีปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำที่สุดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

ส่วนค่าพลาสมาโปรตีนพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 10 และ 15% มีค่าพลาสมาโปรตีนต่ำที่สุด (p<0.05) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 5, 20, 25 และ 30% มีค่าพลาสมาโปรตีนสูงไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (Table 10)

**8. ค่าไตเตอร์ แอคติวิตี (titer activity)**

จากการศึกษาค่าไตเตอร์แอคติวิตี ซึ่งเป็นค่าการจับตัวและเกิดตะกอนระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน พบว่าปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารเสริมสไปรูไลนาทุกระดับมีแนวโน้มสูงขึ้น จากการหาค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างระดับสไปรูไลนาในอาหารและระดับไตเตอร์แอคติวิตี พบว่าให้ผลเป็นไปในเชิงบวก คือ เมื่อเพิ่มสไปรูไลนาในอาหารค่าไตเตอร์แอคติวิตีในซีรัมโปรตีนจากเลือดปลาที่ได้รับอาหารทดลองจะมีค่าสูงขึ้น (Table 11)

สมการเชิงเส้นของความสัมพันธ์ ระหว่างระดับสาหร่ายสไปรูไลนา กับ ค่าไตเตอร์ คือ

$$Y = 9.473+0.99X$$

โดย Y = ค่าไตเตอร์
X = ระดับสาหร่ายสไปรูไลนา

$$\text{ไตเตอร์ แอคติวิตี (unit/ml plasma)} = \frac{\text{titer x 1000 } (\mu l)}{A\ (\mu l)}$$

โดย A (μl) = ปริมาตรซีรัม

**9. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา**

จากการศึกษาพยาธิสภาพบริเวณตับ พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณตับของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาทุกระดับมีลักษณะปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารทดลอง) (ชุดการทดลองที่ 1 ถึง 7)

**Table 10. Blood parameters of hybrid catfish fed the experimental diets***

| Experimental group | *Spirulina* powder (%) | Hemoglobin (g/dl) | Hematocrit (%) | White blood cell ($x10^4$ cell/$mm^3$) | Red blood cell ($x10^4$ cell/$mm^3$) | Plasma protein (μg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 5.55±0.55 | 34.07±3.42[ab] | 7.60±0.98[ab] | 2.50±0.31[ab] | 114.55±10.25[b] |
| 2 | 5 | 5.22±0.48 | 32.25±4.55[ab] | 5.80±1.37[a] | 2.14±0.48[ab] | 118.53±8.71[b] |
| 3 | 10 | 5.58±0.34 | 35.76±2.29[b] | 8.68±1.54[ab] | 2.87±0.52[bc] | 101.86±4.50[a] |
| 4 | 15 | 5.47±0.32 | 34.71±3.27[ab] | 8.01±1.76[ab] | 3.41±0.41[c] | 100.37±11.0[a] |
| 5 | 20 | 5.32±0.34 | 35.76±1.55[b] | 7.19±2.64[ab] | 2.44±0.68[ab] | 118.67±15.74[b] |
| 6 | 25 | 5.18±0.47 | 32.14±3.24[ab] | 10.05±4.67[b] | 2.08±0.59[a] | 108.79±5.40[ab] |
| 7 | 30 | 5.57±0.93 | 30.99±3.01[a] | 9.55±3.24[b] | 2.47±0.29[ab] | 115.62±8.81[b] |

*** Mean ± standard deviation of three replications**
**Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)**

**Table 11. Titer activity of hybrid catfish fed the experimental diets***

| Experimental group | *Spirulina* powder (%) | Titer activity (unit/ ml plasma) |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 320±0 |
| 2 | 5 | 640±0 |
| 3 | 10 | 1,280±0 |
| 4 | 15 | 1,280±0 |
| 5 | 20 | 1,280±0 |
| 6 | 25 | 1,280±0 |
| 7 | 30 | 2,560±0 |

***R= 0.424; *p*<0.05**

**วิจารณ์ผลการทดลอง**

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในสูตรอาหารของปลาดุกพันธุ์ผสม 10% ส่งผลให้การเจริญเติบโต (น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว, น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมซึ่งมีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีน (positive control) ในขณะที่สาหร่ายสไปรูไลนา 5% และ 15-25% ให้ผลไม่แตกต่างกับสูตรควบคุม เมื่อพิจารณาจากอาหารที่ใช้ทุกสูตรจากการทดลองครั้งนี้ โดยได้กำหนดให้มีสารอาหารและระดับพลังงานในอาหารใกล้เคียงกันแต่เมื่อเพิ่มระดับสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารทดลองสูงขึ้นจะส่งผลให้ระดับไขมันในอาหารสูตรนั้นๆ ลดลง จึงทำการปรับสูตรอาหารโดยการเติมน้ำมันถั่วเหลืองลงไปเพื่อให้ทุกสูตรอาหารมีระดับพลังงานใกล้เคียงกัน ซึ่งจากการผลทดลองครั้งนี้พบว่า ปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาทุกชุดการทดลองมีไขมันในซากปลาทั้งตัวต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารในสูตรควบคุม ($p<0.05$) เช่นเดียวกับ Nandeesha และคณะ (1998) พบว่าเมื่อใช้สไปรูไลนาเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาไน (*Cyprinus carpio*) จะสามารถใช้แทนที่ปลาป่นได้ 25% โดยส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากโปรตีน (net protein retention) มีค่าสูงขึ้น แต่ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และ ไขมันในซากปลาทั้งตัวลดลงเมื่อเพิ่มระดับสาหร่ายในอาหาร ส่วนในการทดลองเสริมสาหร่ายในอาหารปลาดุกพันธุ์ผสมครั้งนี้ พบว่าเมื่อปลาได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในระดับสูงกว่า 10% ทำให้อัตราการกินอาหารของปลาดุกพันธุ์ผสมลดลง เนื่องจากในสาหร่ายสไปรูไลนามีไลซีน (lysine) ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาป่น ซึ่งในสาหร่ายสไปรูไลนามีไลซีนประมาณ 3.32 กรัม/อาหาร 100 กรัม ในขณะที่ปลาป่นมีไลซีน 5.05 กรัม/อาหาร 100 กรัม โดยไลซีนเป็นกรดอะมิโนจำเป็นที่มีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นการกินอาหาร แต่ในปลาป่นพบว่ามีกรดอะมิโนชนิดนี้สูงกว่า (Olvera-novia *et al*., 1998) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เมื่อเพิ่มระดับสาหร่ายสไปรูไลนาสูงกว่า 10% ในอาหารปลาดุกพันธุ์ผสมจึงมีอัตราการกินอาหารต่ำลง เช่นเดียวกับ Olvera-novia และคณะ (1998) ที่ใช้สาหร่ายสไปรูไลนาเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารปลาหมอเทศ *(Oreochromis mossambicus)* พบว่าเมื่อทดแทนปลาป่นด้วยสาหร่ายสไปรูไลนา 20-40% ให้ผลการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่มีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนและพบว่าการเพิ่มระดับสาหร่าย 60% จนถึง 100% ส่งผลให้การยอมรับอาหารและการเจริญเติบโตลดลง และ Nandeesha และคณะ (2001) ทำการทดลองนำสาหร่ายสไปรูไลนาแทนที่ปลาป่นในอาหารปลา 2 ชนิด คือ catla (*Catla catla*) และ ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) โดยอาหารทดลองมีระดับโปรตีนเท่ากัน คือ 28% โดยแทนที่ปลาป่นในอาหาร 0, 25, 50, 75 และ 100% พบว่าสาหร่ายสไปรูไลนาไม่มีผลต่อน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราแลกเนื้อ และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน แต่ในปลายี่สกเทศกลับพบว่าการแทนที่ปลาป่นด้วยสาหร่ายสไปรูไลนาสูงกว่า 25% ส่งผลต่อ

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีที่สุด และอัตราการแลกเนื้อมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Duncan and Klesius, 1996) Ehrenberg (1980) กล่าวว่าสาหร่ายสไปรูไลนาเป็นแหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพในอาหารสัตว์ เนื่องจากมีโปรตีนสูง อีกทั้งยังประกอบด้วยวิตามินและเกลือแร่ในปริมาณสูง นอกจากนี้ผนังเซลล์ยังมีองค์ประกอบที่ง่ายต่อการย่อย เนื่องจากไม่มีเซลลูโลส อย่างไรก็ตามระดับการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารปลาแต่ละชนิดมีระดับแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกินอาหารของปลา และการย่อยโปรตีนจากพืชของปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน (De Silva and Anderson, 1995) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำสาหร่ายชนิดอื่นเสริมในอาหารปลาเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต เช่น Bai และคณะ (2001) ที่ศึกษาการเสริมสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) ในอาหารปลา Korean rockfish (Seabastes schlegeli (Hilgendorf)) พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายคลอเรลลา 0.5% ส่งผลให้ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และประสิทธิภาพการใช้โปรตีนดีที่สุด Corazon และคณะ (1989) ศึกษาการนำสาหร่ายออสซิลาทอเรียสด (*Oscillatoria* sp.) เสริมในอาหารในปลานวลจันทร์ทะเล (*Chanos chanos*) พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรควบคุมซึ่งมีแหล่งโปรตีนเป็นปลาป่นมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเสริมสาหร่ายออสซิลาทอเรียสด

จากการศึกษาพบว่าการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารปลาดุกพันธุ์ผสม มีผลในการเพิ่มระดับแอนติบอดี โดยเมื่อปลาดุกพันธุ์ผสมได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา ในแต่ละระดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และทำการฉีดวัคซีนหรือเชื้อตายของ *Aeromonas hydrophila* ทำให้ค่าไตเตอร์ แอคติวิตี ซึ่งเป็นค่าการเกิดตะกอนระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน โดยค่าแอนติบอดีแอคติวิตีที่ดีคือค่าที่แอนติเจนเกิดตะกอนกับแอนติบอดีที่ความเจือจางสูงสุด โดยในการทดลองครั้งนี้พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาทุกระดับมีค่าไตเตอร์ แอคติวิตี สูงกว่าค่าไตเตอร์ แอคติวิตีของปลาดุกพันธุ์ผสมที่ได้รับอาหารทดลองในชุดควบคุม (ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยหาค่าสัมประสิทธ์ของความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสาหร่ายสไปรูไลนาและค่าไตเตอร์แอคติวิตี พบว่าการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนามีผลในเชิงบวกต่อค่าไตเตอร์ แอคติวิตี โดยเมื่อเพิ่มระดับสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารปลาดุกพันธุ์ผสมส่งผลให้ค่าไตเตอร์แอคติวิตี มีค่าสูงขึ้น ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าสาหร่ายสไปรูไลนามีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแอนติบอดี โดยให้แอนติบอดีจับแอนติเจนและเกิดตะกอนได้ในขณะที่แอนติบอดีมีความเจือจางสูง สอดคล้องกับการทดลองของ Direkbusarakom และ Danayadol (1999) ที่ศึกษาการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนาในอาหารปลากะพงขาว (seabass, *Lates calcarifer*) ขนาด 200 กรัม พบว่าเมื่อเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 0.5% ทำให้เกิดการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่ง Hayashi และคณะ (1994) พบว่าหนูที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายสไปรูไลนามีการเพิ่มปริมาณของแอนติบอดี เช่นเดียวกันกับ Duncan และ Klesius (1996) พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เพิ่มขึ้นเมื่อปลากดอเมริกัน (channel catfish, *Ictalurus punctatus*) ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 2.7% ของน้ำหนักอาหาร และ Lee (1999) ที่พบว่าเมื่อเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 0.1% ในอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ส่งผลให้กุ้งมีระบบภูมิต้านทานดีขึ้นโดยมีค่าการจับกินโดยวิธีการโอบล้อม (phagocytotic activity) สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากสาหร่ายสไปรูไลนามีสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น รงควัตถุ คาโรทีนอยด์ และไฟโคไซยานิน โดยพบว่าคาโรทีนอยด์มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมี คือ สามารถป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระคือ ช่วยทำลายอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่มีพิษซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการทำงานของเซลล์ (Miki, 1991) และป้องกันมิให้องค์ประกอบเซลล์ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระโดยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) (Gabaduan, 1996) นอกจากนี้ยังมีผลในการเพิ่มปริมาณของแมคโครฟาจ (macrophage) ที ลิมโฟไซท์ (T-lymphocytes) และ บี ลิมโฟไซท์ (B-lymphocytes) เมื่อแมคโครฟาจ ที ลิมโฟไซท์ และ บี ลิมโฟไซท์ เพิ่มมากขึ้นก็จะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคสูงขึ้น และป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์

เม็ดเลือดขาว จากกระบวนการออกซิเดชัน และกระบวนการนี้ก่อให้เกิดฟรีเรดดิเคิล (free radical) ซึ่งมีผลในการทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ (Miki, 1991 อ้างโดย Thompson *et al*, 1995) ส่วนไฟโคไซยานิน มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยเป็นสารแอนตีออกซิแดนเช่นเดียวกัน (Vadiraja and Madyastha, 2000) โดยไฟโคไซยานินจะไปยับยั้งการแตกตัวของไขมัน (lipid peroxidation) จากการศึกษาโดยนำไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายสไปรูไลนามาผสมอาหารในหนู พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณตับของหนูที่ได้รับอาหารผสมไฟโคไซยานินสกัดไม่มีความผิดปรกติ ส่วนหนูที่ไม่ได้รับอาหารผสมไฟโคไซยานินมีการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อผิดปรกติ (Vadiraja and Madyastha, 2000) นอกจากนี้จากการทดลองนำสาหร่ายชนิดอื่นโดย Amar และคณะ (2004) พบว่า เมื่อนำเบตาคาโรทีนที่สกัดจากสาหร่าย ดูนาลิเอลา (*Dunaliella salina*) เสริมในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ 10% ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยค่า lysozyme activity และค่าการจับกินโดยวิธีการโอบล้อมสูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ Richmond (1986) ยังพบว่าที่บริเวณผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูไลนามีโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีลักษณะเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับสาหร่ายสไปรูไลนา ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันกระตุ้นการสร้าง บี ลิมโฟไซท์ ที่บริเวณม้ามและไขสันหลัง เพื่อกำจัดและจดจำ (memory) เมื่อได้รับเชื้อโรค ก็จะส่งผลให้กระบวนการกำจัดเชื้อเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว มีการจับกินหรือค่าการจับกินโดยวิธีการโอบล้อมเพิ่มขึ้น (Sakai, 1999) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา 30% ส่งผลให้แอนติบอดีมีค่าเจือจางที่สุดที่สามารถเกิดตะกอนกับแอนติเจนได้

นอกจากนี้มีการทดลองนำลามินาแรน (laminaran) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันประเภทโพลีแซคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Laminaria hyperborea*) พบว่ามีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันปลาแอตแลนติกแซลมอน โดยมีผลไปเสริมการทำงาน และเพิ่มการเหนี่ยวนำการสร้างแมคโครฟาจในบริเวณตับ และไต (Dalmo and Seljelid, 1995) สอดคล้องกับ มลฤดี และคณะ (2543) พบว่าการนำกลูแคนซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์บริเวณผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เสริมในอาหาร ส่งผลบวกต่อระบบภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ โดย Vargas และคณะ (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังของเซลล์แบคทีเรีย และรา (fungi) คือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccaride) จะมีผลส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลลูลาร์ให้ดีขึ้น เช่น ฟาโกซัยโตซีส เมลาไนเซชัน (melanization) เอ็นแคปซูลเลชัน (encapsulation) และกระบวนการแข็งตัวของเลือดสอดคล้องกับ Knaap (1993) ที่กล่าวว่าสารไมโครเบียลโพลีแซคคาไรด์ (microbial polysaccharide) เช่น เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบตากลูแคน มีผลในการกระตุ้นฮีโมลิมพ์ให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนส่งไปกระตุ้นตัวรับบนเมมเบรน (membrane receptor) ของเซมิกลานูลาเซลล์ (semi granular cell) ให้เกิดการหลั่งเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase)

จากการศึกษานี้ยังพบว่าระดับของคาโรทีนอยด์ในเนื้อปลามีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับที่เสริมในอาหาร ซึ่งอยู่ในรูปของคาโรทีนอยด์รวม (total carotenoids) โดยการสะสมของคาโรทีนอยด์ในปลาพบว่า มีการสะสมบริเวณผิวหนัง เนื้อ ไข่ และ ตับ (Sato and Regier, 1971) ทั้งนี้ Hata และ Hata (1975) ทดลองนำเบตาคาโรทีน ลูทีน (lutein) และซีเอแซนทีน ที่มีคาร์บอนกัมมันตรังสี (radioactive carbon) ผสมในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ (Salmo gairdneri) จากนั้น 48 ชั่วโมง สามารถตรวจพบคาโรทีนอยด์ทั้ง 3 ชนิด ที่บริเวณผิวหนัง เนื้อ ตับ และ ระบบทางเดินอาหาร สอดคล้องกับ Liao และคณะ (1993) และ Latscha (1991) กล่าวว่าสาหร่ายสไปรูไลนามีผลต่อการเกิดสีในหนังและเนื้อของสัตว์น้ำ โดยขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลา (Cuzon *et al*., 1985) และคาโรทีนอยด์มีผลต่อสุขภาพของปลา โดยสามารถลดความเครียด ทำให้ปลามีสุขภาพดี สามารถทนต่อเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้ดีขึ้น (Nakano *et al*., 2003) ส่วนค่าองค์ประกอบเลือด พบว่าค่าฮีโมโกลบินจากทุกชุดการทดลองที่เสริมสาหร่ายชนิดนี้ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (ไม่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนา มีปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีน)แต่ปริมาณเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มสูงขึ้นในชุดการทดลองที่เสริมสาหร่ายสไปรูไลนาทุกระดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Duncan และ Klesius

(1996) พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้นเมื่อปลากดอเมริกันได้รับอาหารเสริมสาหร่ายสไปรูไลนา เนื่องจากสาหร่ายสไปรูไลนามีสารสีอยู่สูงโดยเฉพาะคาโรทีนอยด์และไฟโคไซยานิน (Richmond, 1986) โดยสารสีดังกล่าวส่งผลให้ร่างกายมีการสร้างเซลล์ชนิดกรานูลาร์ (granular) เพิ่มขึ้น เช่น แมคโครฟาจ ที ลิมโฟไซท์ และ บี ลิมโฟไซท์ (Gabaduan, 1996) โดยสารสีจะมีการกระตุ้นการทำงานของซีรัมแอนติโปรติเอส (serum antiprotease) และซีรัมคอมพลีเมน (serum complement) ให้มีความว่องไวขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Zhang (1994) พบว่า ไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายสไปรูไลนา มีผลไปเหนี่ยวนำให้ stem cell บริเวณไขกระดูกหนูทดลองผลิตเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น

## สรุป

1. สามารถใช้สาหร่ายสไปรูไลนาแห้งทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกพันธุ์ผสมได้ถึง 25% โดยช่วยเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารแต่ระดับของสไปรูไลนาที่เหมาะสมที่สุด คือ 10%

2. การเสริมสาหร่ายสไปรูไลนามีผลต่อการเพิ่มระดับแอนติบอดีของปลาดุกพันธุ์ผสม โดยระดับสาหร่ายที่สามารถส่งผลต่อระดับแอนติบอดีได้ดีที่สุด คือ 30%

### เอกสารอ้างอิง

กองเศรษฐกิจการประมง. 2546. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2543. เอกสารฉบับที่ 4/2546. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธิดา เพชรมณี. 2545. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. สถาบันวิจัยการเพาะ เลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา.

บานชื่น ชลสวัสดิ์. 2532. การใช้สาหร่ายเกลียวทองสดเป็นส่วนประกอบของอาหารผสมสำหรับเลี้ยงปลาตะเพียนทองและปลาดุกอุย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มะลิ บุณยรัตผลิน, กิจการ ศุภมาตย์ และ ชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์. 22: 641-652.

มะลิ บุณยรัตผลิน และนันทิยา อุ่นประเสริฐ. 2528. ผลของสิ่งที่ได้จากแหล่งต่างๆ ต่อการเปลี่ยนสีและการเจริญเติบโตของปลานิลสีแดง. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2528 กรมประมง 16 - 18 กันยายน 2528: 39-44.

มลฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และ กิจการ ศุภมาตย์. 2543. การสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ว. สงขลานครินทร์ วทท., 22: 653-662.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2527. ผลของรงควัตถุคาโรทีนอยด์ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนสีของปลาแฟนซี คาร์ฟ, *Cyprinus carpio*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกิจ รัตนวินิจกุล และ พูนสิน พานิชสุข. 2538. ผลการเสริมสไปรูไลนาและดอกดาวเรืองในอาหารต่อสีของกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2538. สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดนครศรีธรรมราช. กรมประมง.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immu., 16: 527-537.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. Washington DC.

Bai, S. C., Koo, J. W., Kim, K. W. and Kim, S. K. 2001. Effects of *Chlorella* powder as a feed additive on growth performance in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquacult. Res., 32: 92-98.

Bancroft, J. D. 1967. Histochemical Techniques. Butterworth, London.

Becker, E.W. and Venkataraman, L.V. 1984. Production and utilization of blue-green alga. *Spirulina platensis*. **In** India. Biomass., 4:105-125.

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

Boyd, C. E. and Tucker, C. S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquacult. Auburn University, Alabama.

Chien, Y. H. and Jeng, C. J. 1992. Pigmentation of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by

various pigment sources and levels and feeding regimes. Aquacult., 10: 333-346.

Corazon, B. S., Julia, B. P,. Susana, F. B. and Ofelia, S. R. 1989. Milkfish (*Chanos chanos*) fingerling production in freshwater ponds with the use of natural and artificial feed. Aquacult., 77: 307-318.

Cuzon, Z., Dos Santos, R., Hew, M. and Roullaouec, G. 1985. Use of *Spirulina* in shrimp (*Penaeus japonicus*) diet. ASFA 1., 15(2): 345-352.

Dalmo, R. A. and Seljelid, R. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, Laminaran and sulphated laminalan [β(1,3)-D-glucan] on atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. J. Fish Dis., 18: 175 – 185.

De Silva, S. S. and Anderson, T. A. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. London: Chapman&Hall.

Direkbusarakom, S. and Danayadol, Y. 1999. Effect of *Spirulina* sp. on antibody titer of seabass, *Lates calcarifer*. Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture Aquatic Animal Health for Sustainability. Philippines, 22-26 November 1999: 152-162.

Duncan, P. L. and Klesius, P. H. 1996. Effects of feeding *Spirulina* on specific and non-specific immune responses of channel catfish. J. of Aquat. Anim. Heal., 8: 308-313.

Dupree, H. K. and Sneed, K. P. 1966. Response of channel catfish fingerling to different levels of major nutrients in purified diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlife Tech. Pap. No. 9.

Ehrenberg, M. 1980. Microalgae: a fish farm feed for the future. Fish Farming International., 7: 15-18.

Faucher, O., Coupal, B. and Lenduy, A. 1979. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Can. J. Microbiol., 25: 725 – 759.

Gabaudan, J. 1996. Dietary astaxanthin improves production yield in shrimp farming. Fish. Chem., 16(1): 37-39.

Hata, M. and Hata, M. 1975. Carotenoid pigments in rainbow trout, *Salmo gairdneri* irdeus. J. Agric. Res., 26: 25-40.

Hayashi, O., Katoh, T. and Okuwaki, Y. 1994. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. J. Nutri. Vitaminol., 40: 431-441.

Humason, G. L. 1972. Animal Tissue Technique, 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Knaap, W. V. D. 1993. Defence in invertebrate in Biotol (Biotechnology by open learning). Butterworth-Heinemanm LTD. Linaese Honse, Jordan Hill. Oxford. 215 p.

Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquacult., 188: 237-246.

Larsen, H. N. and Snieszko, S. F. 1961. Modification of microhematocrit technique with trout blood. Trans. Amer. Fish. Soc., 90: 139-142.

Latscha, T. 1991. Carotenoid in aquatic animal nutrition. **In** Proceedings of the aquaculture feed processing and Nutrition Workshop. pp. 68-79. (eds. Akiyama, D.M. and Tan, R.K.H.). Thailand and Indonesia, 19-25 September 1991, Thailand.

Lee, K. 1999. *Spirulina* and immunological activity of cultured prawn. Book of Abstracts. Second Asia Pacific Psychological Forum. Chinese University of Hong Kong, China, 21-25 June 1999.

Lee, Y., Chew, P., Soh, B. and Tham, L. 2003. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguiensis* by feeding *Spirulina platensis*. J. App. Phyco. 15(4): 279-287.

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

Liao, W. L., Nur E Borhan, S., Okada, S., Matsui, T. and Yamaguchi, K. 1993. Pigmentation of culture black tiger prawn by feeding a *Spirulina* sp. supplemented diet. Nippon Suisan Gakkaishi., 59(1):165-159.

Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl. Chem., 63: 141-146.

Nakamura, H. 1982. *Spirulina* : Food for Hungry World. University of the Tress Press, Boulder Creek., California.

Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M. and Iwama, G. K. 2003. Biological effects of carotenoids in fish. International Seminar "Effective Utilization of Marine Food Resources". Songkhla, Thailand. 18 December. pp. 1-15.

Nandeesha, M. C., Gangadhara, B., Manissery, J. K. and Venkataraman, L. V. 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. Biores. Tech., 80: 117-120.

Nandeesha, M.C., Gangadhara, B., Varghese, T.J. and Keshavanath, P. 1998. Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, L. Aquacult. Res., 29: 305-312.

Nankervis, L., Matthews, S. J. and Appleford, P. 2000. Effect of dietary non-protein energy source on growth, nutrient and circulating insulin-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. Aquacult., 191: 323-335.

Olvera-novia, M. A., Dominguez-Cen, L. J. and Olivera-Castillo, L. 1998. Effect of the use of the microalgea *Spirulina maxim*a as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters) fry. Aquacult. Res., 29: 709-715.

Peterson, W.D. and Feyer, J.L. 1974. Immune response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kusutch*) to *Aeromonas salmonicida* cells administered intraperitoneally in Freud's complete adjuvant. J. Fish. Res. Board Can., 22: 713-719.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Florida. 528 p.

Roberts, J. 1989. Fish Pathology. Institute of Aquaculture, University of Sterling, Scotland.

Robertsen, B., Rorstad, G., Engetad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of non–specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. J. Fish. Dis., 13: 391 – 400.

Robinson, E. H. and Wilson, R. P. 1985. Nutrition and feeding. **In** channel catfish Culture. (ed. C.S. Tucker) Development in Aquaculture and Fisheries Science., 15: 323 – 404.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquacult., 172: 63-92.

Sato, A. and Regier, L.W. 1971. Pigmentation of brook Trout (*Savelinus fonliwafis*) by feeding dried crustacean waste. J. Fish. Res. Board. Can., 28: 509-512.

Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skijak – Braek, G., Sorgeloos, P. and Vadstein, O. 1996. Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) with high mannuronic acid (M) alginate administered through the live food organism artemia. Fish and shellfish Immu., 5: 531 – 534.

Snieszko, S. F. and Axelrod, H.R.. 1971. Diseases of fishes. **In** Book 3: The prevention and treatment of diseases of warm-water fishes under subtropical, with special emphasis on intensive fish farming. Hong Kong: T.F.H. Publications.

Sommer, T.R., D'Souza, F.M.L. and Morrisy, N.M. 1992. Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. Aquacult. 106: 63-74.

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

Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquacult., 133(2): 91-102.

Vadiraja, B. B. and Madyastha, K. M. 2000. C-phycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger *in vivo* and in vitro. Biochem. Biophys. Res. Com., 275: 20-25.

Vargas-Albores, F., Hernandez-Lopez, J., Gollas-Glvan, T., Montano-Perez, K., Jimenes-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defence function by microbial products. pp 161-166. **In** Advances in Shrimp Biotechnology. (ed. Flegel, T.W) Proceeding to the

special session on shrimp biotechnology 5th Asian fishery forum, Chiengmai, Thailand. 11-14 November 1998: 142-150.

Yone, Y. and Fujii, M. 1975. Studies on nutrition of red sea bream-XI: Effect of ω3 fatty acid supplement in corn oil diet on growth rate and feed efficiency. Bull. Jpn. Soc. Fish., 41: 73-77.

Zeitoun I.H., Tack, P.I., Halver, I.E. and Ullrey. D.E. 1973. Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* fingerling. J. Fish. Res. Board Can., 30: 1867 – 1873.

Zhang, C.W. 1994. Effect of polysaccharide and phycocyanin from *Spirulina* on blood and hematopoietic system of bone marrow in mice. p 58. **In** Second Asia Pacific conference on Algal Biotech. Univ. of Malaysia, April. 15, 1994: 214-219.