การเจริญเติบโตและสุขภาพของปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุย ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเมลามีน และยูเรียฟอร์มัลดีไฮด์

Growth performance and health of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) fed with supplemental melamine and urea formaldehyde diets

อรุณีพงศ์ ศรีสถาพร[1], เยาวมาลย์ ค้าเจริญ[2*], ประภาส โฉลกพันธ์รัตน์[1] และ บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล[3]

Aruneepong Srisathaporn[1], Jowaman Khajarern[2*], Prapas Chalorkpunrut[1] and Bundit Tengjroenkul[3]

บทคัดย่อ: การเสริมเมลามีน (melamine; Me) หรือยูเรียฟอร์มัลดีไฮด์ (ureaformaldehyde; UF) ในอาหารปลาดุกบิ๊กอุย ชนิดละ 3 ระดับ (0.5, 1.0 และ 2.0%) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เสริมสารใดๆ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ใช้ปลาจำนวน 336 ตัว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 9.7 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม Me และ UF มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยการเสริมที่ระดับตั้งแต่ 1.0% ขึ้นไป การเจริญเติบโตของปลาลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและการเสริมที่ระดับ 2.0%ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) ส่วนอัตราการรอดตายและค่าดัชนีการผลิต มีค่าลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทุกระดับการเสริมแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) สุขภาพของปลาผิดปกติจากกลุ่มควบคุมพบสีผิวหนังของปลา มีสีเข้มขึ้นและไม่มีเม็ดสีในกลุ่มที่ได้รับ Me และ UF ตามลำดับ พบเลือดออกตามครีบและใต้ท้อง ซึ่งสังเกตได้ภายใน 2 สัปดาห์ ตับ ไต และม้าม พบรอยโรคคือ มีเลือดออกกระจาย สีแดงสด ชมพูเข้ม จางซีด ตับ ไต บวมโตขยาย ขนาดและรูปร่างผิดปกติ และมีสีซีดในกลุ่มที่ได้รับ UF ในระดับสูง การตรวจสอบเนื้อเยื่อสด และทางจุลพยาธิวิทยา พบเนื้อเยื่อเสียหายเซลล์ถูกทำลายรวมทั้งพบผลึกสีเข้มแวววาวและสีเขียวอ่อน ผลการตรวจเลือดมีค่าผิดปกติจากกลุ่มควบคุม (P<0.05) ทุกระดับการเสริม ผลการตรวจพบดังกล่าวใช้เป็นหลักฐานบ่งชี้การปนเปื้อนของสารทั้งสองในอาหารและการเกิดพิษในปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยได้

คำสำคัญ: เมลามีน, ยูเรียฟอร์มัลดีไฮด์, สุขภาพ, ปลาดุก, จุลพยาธิวิทยา

ABSTRACT: An experiment was conducted to investigate the effects of three graded levels (0.5, 1.0 and 2.0%) of melamine (Me) and urea formaldehyde (UF) in hybrid catfish. The treatment diets were conducted with one control (no addition) in a completely randomized design. Three hundred and thirty six hybrid catfish with the initial weight of 9.70 g were assigned to 7 dietary treatments and fed for 8 weeks. Significant difference (P<0.05) in growth performance and feed efficiency between the control and the fish fed with Me and UF were observed. The growth performance of the fish fed with 1.0% and 2.0% Me and UF in diets were significantly lower than that of the control while at the level of 2.0% in diets, the feed efficiency was significantly less (P<0.05). The survival rate (SR) and the economic loss index (ELI) as determined by the production index (PI) showed no significant decrease (P>0.05) although the values were found to have decreased with the increase of both Me and UF in diets. Abnormality of skin coloration when

[1] Department of Fishery, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[2] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[3] Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

* Corresponding author: jowaman@kku.ac.th

compared to the control was observed within 2 weeks: darker color in some fish fed with Me diets while colorlessness were observed in fish fed with UF diets. The lesion and degeneration of liver, kidney and spleen were found to have diffused hemorrhage, enlargement, abnormal shape, and obvious coloration change. Microscopic examinations of wet mount tissue and of histological changes of those tissue organs found them to be degenerated and damaged with numerous dark brown or transparent crystals, or some light green crystals. Blood parameters (BUN, uric acid and creatinine) showed significant abnormality ($P<0.05$) from the control. These results provided evidence of correlation between the amounts and the sizes of crystals, the degrees of damage, and the levels of Me and UF in diets. The degeneration of tissue organs and crystals provided strong evidence in the prediction of Me and UF contamination in diets, and of their toxicity in hybrid catfish.
Keywords: melamine, urea-formaldehyde, health, catfish, histology, production index

บทนำ

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมรับประทานและเลี้ยงกันแพร่หลายในหมู่เกษตรทุกระดับทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่ายเจริญเติบโตไว เป็นปลาเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศ ผลผลิตปลาดุกของประเทศไทยในช่วง ปี 2549-2553 ผลิตได้ 138,700-151,800 ตัน ซึ่งเป็นอันดับสองรองจากปลานิล (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย, 2556) ปลาดุกเป็นปลากินเนื้อต้องการโปรตีนเป็นส่วนประกอบในอาหารในระดับสูงซึ่งทำให้ต้นทุนค่าอาหารสูงตาม เมลามีน (melamine; Me) และยูเรียฟอร์มัลดีไฮด์ (urea formaldehyde; UF) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบในประมาณสูง จึงมีผู้นำมาปนในวัตถุดิบอาหารสัตว์เพื่อเปลี่ยนแปลงคุณภาพและราคาของวัตถุดิบที่ใช้ปริมาณโปรตีนเป็นตัวกำหนดราคา ทำมีไนโตรเจนหรือโปรตีนเพิ่มและจำหน่ายได้ในราคาสูง แต่โปรตีนที่สูงขึ้นเป็นโปรตีนที่ร่างกายสัตว์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ US FDA (2007) รายงานการตรวจพบเมลามีนในวัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่มาจากพืช เช่น wheat gluten, corn gluten, rice gluten กากถั่วเหลือง และปลาป่น ที่นำเข้าจากประเทศจีน เมื่อวัตถุดิบนั้นถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์และนำไปเลี้ยงสัตว์ จึงส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ ดังรายงานการตายของสัตว์เลี้ยงพวกสุนัขและแมวจำนวนมากในประเทศสหรัฐอเมริกาและคานาดา ในปี 2007 ซึ่งตรวจพบผลึกในไตของสัตว์เลี้ยงจำนวนมากที่เป็นสาเหตุของภาวะไตวายและนำไปสู่การตายของสัตว์เลี้ยงดังกล่าว (US FDA, 2007) เนื่องจาก Me เคยได้รับการยอมรับมาก่อนว่าไม่มีอันตรายต่อสัตว์ และข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษในสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจมีจำกัด ในประเทศไทย เยาวมาลย์ และสาโรช (2550) รายงานการตรวจพบผลึกของ Me ในปลาดุก กุ้ง และไก่เนื้อ เป็นสาเหตุทำให้ปลามีการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง ต่อมาปาริชาติ และคณะ (2553) รายงานการพบผลึก Me ในปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี Me ในระดับ 4.0% ขึ้นไป ขณะที่ปวีณา และคณะ (2552); นัทท์ และวุฒิพร (2554) รายงานการศึกษาในปลาดุกลูกผสมและปลานิลแดงตามลำดับ เลี้ยงด้วยอาหารที่มี Me ในระดับ 0.5-3.0% การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง แต่ตรวจไม่พบผลึก Me ขณะที่ ชะลอ และคณะ (2554) รายงานผลของ Me ร่วมกับกรดไซอะนูริค (cyanuric acid; Cya) และตรวจพบผลึกของเมลามีนไซอะนูเรต (melamine cyanurate) ในกุ้งขาว นอกจากนี้มีรายงานศึกษาในสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น โดย Sirilaophaisan et al. (2010, 2011) รายงานการตรวจพบผลึกในไก่เนื้อและไก่ไข่ที่เลี้ยงด้วยอาหารมี Me และ UF ในระดับ 0.75 และ 1.0% ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน และมีการศึกษาต่อเนื่องถึงผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ รวมถึงการตกค้างของในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ ทั้งยังมีข้อกังขาว่านอกจาก Me เอง และ Me ร่วมกับ Cya แล้ว ยังมีสารไนโตรเจนสูงตัวอื่นสามารถก่อให้เกิดผลึกในตัวสัตว์ได้หรือไม่ สารประกอบไนโตรเจนสูงเช่น UF ซึ่งใช้เป็นสารเหนียวในกระบวนการผลิตอาหารเม็ดสำหรับสัตว์น้ำและสัตว์บก แต่ยังไม่มีรายงานผลกระทบต่อการเจริญเติบ

ในสัตว์น้ำมาก่อน นอกจากเรื่องกลิ่นฉุนของฟอร์มัลดีไฮด์ในอาหาร ซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิตที่ผู้บริโภคไม่ชอบ (Mashosh et al., 2005; Muylder et al., 2008) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลการใช้ Me และ UF เดี่ยวๆ ผสมในอาหารต่อการแสดงออกของปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยในด้านการเจริญเติบโต สุขภาพ รอยโรคต่างๆในอวัยวะเช่น ตับ ไต และม้าม รวมทั้งการเกิดผลึก ทั้งนี้เพื่อจะได้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการทำนายผลกระทบของสารทั้งสองชนิดต่อสมรรถนะการผลิตและใช้ลักษณะความผิดปกติที่เกิดเป็นตัวบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนหรือความเป็นพิษของสารทั้งสองในปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุย

วิธีการศึกษา

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย ชุดการทดลอง 7 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำผลิตอาหาร 7สูตร ซึ่งประกอบด้วย สูตรควบคุมที่ไม่เสริมสารใดๆ และสูตรควบคุมที่เสริมด้วย Me หรือ UF อย่างละ 3 ระดับ (0.5, 1.0 และ 2.0%) Me และ UF ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้นำเข้าจากประเทศจีน (Tianjin BASF Chemical company, China) และ UF มาจากบริษัท Luyuan Adhesive Material Co. Ltd. โดย Me มีความบริสุทธิ์ 99.5% ขึ้นไป ซึ่งสารทั้งสองชนิดอยู่ในรูปผงละเอียด รายละเอียดส่วนประกอบของอาหารและสูตรอาหารแสดงใน Table 1 และ Table 2

ใช้ปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยน้ำหนักตัวเริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ 9.70 กรัม ปล่อยเลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 30 x 40 x 22 ซม. ตู้ละ 16 ตัว จำนวน 21 ตู้ ให้กินอาหารเต็มอิ่มวันละ 2 ครั้ง เช้า 9.00 น. และบ่าย 15.00 น. ดูดเศษอาหารที่เหลือหลังจากให้อาหารไปแล้ว 30 นาที ดูดของเสียและเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 60 ของตู้ ทุกวันก่อนการให้อาหารในตอนเช้า สังเกตความผิดปกติของปลา บันทึกปริมาณอาหารที่กิน ชั่งน้ำหนักรวมทุก 2 สัปดาห์ บันทึกการตายทุกวันตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มปลาตู้ละ 3 ตัว ทำให้สลบด้วยน้ำเย็นจัด เจาะเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์ ยูเรียไนโตรเจนในเลือด (blood urea nitrogen; BUN), กรดยูริค (uric acid) และครีเอตินีน (creatinine) โดยวิธี Kinetic Method วัดที่ความยาวคลื่น 340, 520, 530, nm ตามลำดับ จากนั้นผ่าเปิดซากเพื่อเก็บอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต และม้าม ส่วนหนึ่งเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบรอยโรค (lesion) และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อสด (wet mount slide) อีกส่วนหนึ่งแช่เก็บใน 10% buffer formalin ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมและตัดเนื้อเยื่อแล้วย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (ศุภลักษณ์, 2545) เพื่อนำไปตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา (histological examination) ส่องดูการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อสดและผลึก (crystals) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอลที่ยึดติดกับกล้องจุลทรรศน์ รุ่น Motic SFC-11with Sony color video camera; Model SSC-E458P ส่วนการตรวจทางจุลพยาธิใช้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Motic BA210, with Sony color video camera; Model SSC-E458P

นำข้อมูลมาประเมินการเจริญเติบโต ด้านน้ำหนักตัว น้ำหนักตัวที่เพิ่ม WG, % (Percent of weight gain = (Final Weight -Initial weight) x100 /Initial weight); ADG, % (Average daily gain, %) = (Final Weight -Initial weight)*100 /(Initial wt.* day) ค่าดัชนีสัมพันธ์การเจริญเติบโต RGI, % (Relative growth index, %) = (Weight gain of treatment) x100/Weight gain of control ปริมาณอาหารที่กิน อัตรารอดตาย (Survival rate; SR %), = No. of fish alive x 100/ Initial no. of fish ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (Feed conversion efficiency; FCE, %) = Weight gain (g) x 100/Feed intake และประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio; PER, %) = Weight gain (g) x100 /Protein intake (g)* PI (Productive index) = Weight gain x Survival rate (%) / (FCR) นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1995)

Table 1 Composition of the basal diet (as-fed basis)

Ingredients	Percentage; %
Fish meal 63.5% CP	26.0
Soybean meal 46% CP	17.7
Full fat soybean 36% CP	10.0
Cassava chip 2.0% CP	10.0
Corn meal 7.85% CP	10.0
Rice bran 13% CP	19.0
Wheat flour 14% CP	4.0
Dicalcium phosphate, P18	1.0
DL-Methionine 98%	0.2
L-Lysine 98%	0.1
Vitamin-mineral premix[1]	2.0
Total	100.0
Calculated analysis:	
CP, %	32.20
ME, kcal/kg[2]	3,001.00

[1]Supplied per kilogram of diet: Vitamin premixed: Vitamin A; 30,000 IU, D3; 6,000 IU, E; 90 mg, K3; 6 mg, B1; 8 mg, B2; 10 mg, B12; 0.02 mg, Pantothenic acid; 30 mg, Nicotinic acid; 60 mg, Folic acid; 3 mg, Biotin; 0.6 mg, Vitamin C; 150 mg, Preservative; 2 mg, Anti-caking; 10 mg, Carrier added up to 1000 mg and Choline Chloride 50% N; 1 g. Mineral premixed: Mn; 20 mg, Zn; 10.5 mg, Cu; 4 mg, Co; 5 mg, Se; 0.3 mg, Fe; 75 mg, I; 3 mg, Mg; 90 mg, Anti-caking; 10 mg Carrier; added up to 1,000 mg

[2] Metabolize energy

Table 2 Experimental diets and chemical composition as calculation

	Diets						
Composition (%)	**Control (0%)**	**Me (0.5%)**	**Me (1.0%)**	**Me (2.0%)**	**UF (0.5%)**	**UF (1.0%)**	**UF (2.0%)**
Basal diet*	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Me	0.0	0.5	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0
UF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	2.0
Total	100	100.5	101	102	100.5	101	102
CP by calculation (%):							
Basal diet	32.2	32.2	32.2	32.2	32.2	32.2	32.2
CP from Me	0.0	2.1	4.2	8.4	0.0	0.0	0.0
CP from UF	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	2.2	4.4
CP/Total diet,	32.2	34.13	36.4	40.6	33.3	34.4	36.6
CP/100Kg	32.2	33.96	36.04	39.80	33.13	34.05	35.88
CP by proximate analysis (%)							
	32.2	33.63	36.33	38.33	33.33	34.21	36.16

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

หลังจากเลี้ยงปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลามีอัตราการเจริญเติบโต ลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยการเสริมสารทั้งสองที่ระดับ ตั้งแต่ 1.0-2.0% ในอาหารทำให้ BW, WG, WG, % และ ADG, % ลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และลดลงตามปริมาณของ Me หรือ UF ที่เพิ่มขึ้นในอาหารและการเสริมที่ระดับ 2.0% UF มีผลทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุดและต่ำกว่า Me อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในทุกพารามิเตอร์ เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความสัมพันธ์ของการเจริญเติบ (RGI) กลุ่มที่ได้รับ UF ที่ระดับ 1.0 และ 2.0% มีค่าการเจริญเติบโตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยมีค่าต่ำกว่า 15.01 และ 27.79% ตามลำดับ และขณะที่กลุ่มที่ได้รับ Me มีการเจริญเติบโตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม 12.41 และ 16.75% ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลแสดงใน **Table 3**

Table 3 Growth performances of hybrid catfish fed diets containing of the graded levels of Me or UF for 8 weeks

Me and UF	Growth parameters				
in diets	BW (g)	WG (g)	WG (%)	ADG (%)	RGI (%)
Control (0%)	45.24^{a}	35.56^{a}	367.09^{a}	6.44^{a}	100.00^{a}
Me (0.5%)	42.26^{ab}	32.59^{ab}	335.97^{ab}	5.92^{ab}	91.78^{ab}
Me (1.0%)	41.20^{b}	31.51^{b}	324.82^{b}	5.70^{b}	88.59^{ab}
Me (2.0%)	39.17^{b}	29.47^{b}	303.67^{b}	5.33^{b}	83.25^{bc}
UF (0.5%)	45.02^{a}	35.35^{a}	365.68^{a}	6.42^{a}	99.54^{a}
UF (1.0%)	39.88^{b}	30.17^{b}	311.02^{b}	5.46^{b}	84.99^{b}
UF (2.0%)	35.26^{c}	25.60^{c}	264.81^{c}	4.65^{c}	72.21^{c}
SEM	1.11	1.11	10.15	0.2005	3.64
P-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.001

Mean within the column with different letters superscript differ significant (P<0.05)

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยที่ได้รับอาหารที่มีการเสริม Me หรือ UF มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมในระดับ 2.0% ค่า FCR และ ค่า PER มีค่าต่ำที่สุดกว่าทุกกลุ่ม ซึ่งข้อมูลแสดงใน **Table 4** การเสริมที่ระดับเดียวกัน ตั้งแต่ 0.5-1.0% ในอาหาร Me มีผลทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่า UF แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ให้ผลแตกต่างการทดลองในปลานิลที่พบว่าการเสริม Me ที่ระดับ 1.0-2.0% ในอาหารถึงจะทำให้ค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า PER ของปลานิลต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริม UF ที่ระดับเดียวกัน (Srisathaporn et al., 2013) ซึ่งแสดงว่า Me มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารมากกว่า UF

ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ ปวีณา และคณะ (2552) ที่ทดลองให้ Me ผสมในอาหารในอาหาร 6 ระดับ ตั้งแต่ 0.5-3.0% เลี้ยงปลาดุกลูกผสม รายงานว่าปลาดุกที่ได้รับอาหารที่มี Me เป็นส่วนประกอบทุกระดับ มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และทิศทางการลดลงของการเจริญเติบโตจะสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ Me ที่เสริมในอาหาร นอกจากนี้ในงานทดลองของ ปาริชาติ และคณะ (2553) ทดสอบการเลี้ยงปลาดุกด้วยอาหารที่มี Me ในระดับสูงขึ้น 5 ระดับ คือ ตั้งแต่ 2-16% ในอาหาร พบการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาลดลง การทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี Me เนื่องจากงานทดลองการเสริม UF ในอาหารปลาดุกยังไม่มีการรายงานมาก่อน ดังนั้นการเปรียบเทียบผลของ UF จึงมีข้อจำกัด อย่างไรก็ตามจากรายงานการใช้ Me ร่วมกับ UF เสริมในอาหารเลี้ยงปลานิลของ Srisathaporn et al. (2013) ที่พบว่าการเสริมสารทั้งสองร่วมกันในอาหารมีผลทำให้เสริมฤทธิ์กันทำให้พิษรุนแรงเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลลดลงรุนแรงมากกว่าการเสริมแบบเดี่ยวๆ ผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่า UF ที่ระดับ 0.5% ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุย ในขณะที่การเสริม UF ในระดับตั้งแต่ 1.0-2.0% ขึ้นไป มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลามากกว่าการเสริมด้วย Me ที่ระดับเดียวกัน ซึ่งจากรายงานของ Javed et al. (2008) ที่รายงานว่าการให้ UF ในอาหารในระดับสูงเลี้ยงสัตว์ เป็นเวลาต่อเนื่องยาวนาน จะมีผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์และสมรรถนะการผลิตของสัตว์

ผลต่ออัตรารอดตายและดัชนีการให้ผลผลิต

อัตราการรอดตาย (SR) และค่าดัชนีการให้ผลผลิต (PI) ของปลากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเสริม Me หรือ UF พบว่ามีผลไปในทิศทางเดียวกัน คือมีค่าลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับปวีณา และคณะ (2552) ปาริชาติ และคณะ (2553) และ นัทท์ และวุฒิพร (2554) ที่รายงานว่า Me ในระดับตั้งแต่ 0.5-3.0% ในอาหารไม่มีผลต่ออัตราการรอดตายแตกต่างกัน สุรพงษ์ และบัณฑิต (2553) รายงานยืนยันให้เห็นว่า Me มีพิษต่ำ โดยรายงานระดับของ Me ที่ทำให้ปลานิลตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่าสูงถึง 27.1% (27.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร)

ค่าดัชนีการให้ผลผลิตของในการทดลองครั้งนี้มีทิศทางลดลงตามระดับการเสริมของสารที่เพิ่มในอาหารอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้นจากการที่เลี้ยงปลาดุกด้วยอาหารที่มีการปนเปื้อนสารทั้งสองในทุกระดับ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการทดลองในปลานิลที่รายงานโดย Srisathaporn et al. (2013) ที่การเสริมสารทั้งสองในระดับ 2.0% มีผลทำให้ความสูญเสียทางเศรษฐกิจสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Table 4 Feed efficiency, survival rate (SR), and productive index (PI) of hybrid catfish fed with diets containing of the graded levels of Me or UF for 8 weeks

Me and UF	Feed efficiency parameters				
in diets	FCR	FCE (%)	PER (%)	SR (%)	PI
Control (0%)	1.44^{c}	69.45^{a}	2.31^{a}	84.31	2082
Me (0.5%)	1.52^{bc}	65.24^{ab}	2.18^{ab}	80.39	1724
Me (1.0%)	1.57^{abc}	65.01^{ab}	2.17^{ab}	80.39	1613
Me (2.0%)	1.74^{ab}	55.71^{b}	1.86^{b}	70.59	1196
UF (0.5%)	1.37^{c}	74.38^{a}	2.48^{a}	64.71	1670
UF (1.0%)	1.43^{c}	68.82^{a}	2.29^{a}	90.2	1903
UF (2.0%)	1.82^{a}	53.72^{b}	1.79^{b}	78.43	1103
SEM	0.09	3.96	0.13	41.92	292.8
P-value	0.022	0.024	0.024	0.664	0.245

Mean within the column with different letters superscript differ significant (P<0.05)

ผลต่อสุขภาพของปลา

ผลการวิเคราะห์เลือด พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีการเสริม Me หรือ UF มีค่า BUN ค่า uric acid และค่า creatinine ผิดปกติจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งข้อมูลแสดงใน Figure 1 โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มี Me หรือ UF จะมีค่าพารามิเตอร์ทั้งสามในทิศทางตรงข้ามกันและที่ระดับการเสริม 2.0% ค่า BUN และค่า uric acid มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนค่า creatinine กลุ่มที่ได้รับ Me จะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ UF มี ค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ Me อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) การที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับ UF มีค่า BUN สูง Javed et al. (2002) อธิบายว่า เป็นเพราะสาร non-protein nitrogen เช่น ยูเรียที่ได้จากการสลายตัวของฟอร์มัลดีไฮด์ ในอาหารกระจายเข้าสู่กระแสเลือดทำให้ตรวจพบค่า BUN ในเลือดสูงตามระดับของ UF ในอาหาร ซึ่งเป็นข้อด้อยของการใช้ UF ที่พบว่ามีการปลดปล่อยฟอร์มัลดีไฮด์อิสระออกมาสู่สิ่งแวดล้อมตลอดอายุการใช้งาน ทำให้อาหารมีกลิ่นฉุนและเป็นอันตรายต่อสุขภาพสัตว์จนนำไปสู่การห้ามใช้ในอเมริกาและยุโรป (Javed et al., 2002; Maslosh et al., 2005; Muylder et al., 2008) ค่า BUN ในการทดลองครั้งนี้ มีความสอดคล้องกับรายงานของปวีณา และคณะ (2552) และ ปาริชาติ และคณะ (2553) ที่พบว่า ค่าการตรวจเลือดผิดปกติจากกลุ่มควบคุม แต่ค่า BUN ตามรายงานของ ปาริชาติ และคณะ (2553) มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับของ Meที่เสริมในอาหาร (0-16%) ค่าส่วนประกอบทางเคมีของเลือดทั้งสามค่าดังกล่าวหากมีค่าผิดปกติ ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสุขภาพ การทำงานของตับและไตเสื่อมลงและผิดปกติ (Coway and Walton, 1989; Puschner, et al., 2007) จากการตรวจครั้งนี้ มีค่าเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมแสดงว่าทั้ง Me และ UF มีผลทำให้การทำงานของอวัยวะดังกล่าว รวมถึงม้ามเสื่อมลงและส่งผลทำให้สุขภาพโดยรวมของปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยอ่อนแอลง

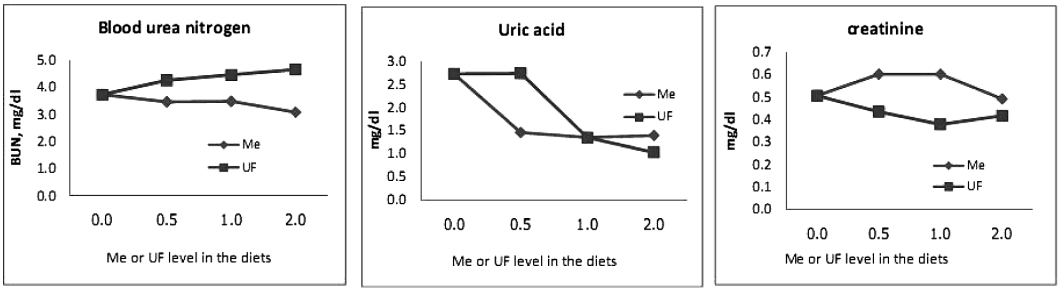

Figure 1 Blood urea nitrogen (BUN), uric acid and creatinine after feeding hybrid catfish with the graded levels of melamine (Me) and urea formaldehyde (UF) for 8 weeks

ผลต่อสุขภาพที่สังเกตได้ (Appearance characteristics) จากการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มี Me หรือ UF พบว่าสีผิวของปลาดุกบางส่วนผิดปกติจากกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ได้รับ Me มีสีเข้มขึ้น ส่วนกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี UF ในระดับสูง ผิวหนังมีสีอมชมพู หรือมีการก่อตัวของเม็ดสีเป็นจุดไม่กระจายตัว ซึ่งเห็นได้ชัดเจน ความผิดปกติดังกล่าวสังเกตได้ตั้งแต่สองสัปดาห์แรกจนสิ้นสุดการทดลอง และพบเลือดออกตามครีบต่างๆ และใต้ท้องของปลากลุ่มที่ได้รับ Me และ UF ในปริมาณที่สูง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ยืนยันรายงานของเยาวมาลย์ และสาโรช (2550) และรายงานของปวีณา และคณะ (2552) ที่รายงานว่าปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงทั้งหมดมีสีผิวเข้มขึ้นตามระดับของ Me ที่เพิ่มในอาหารโดยเห็นผลตั้งแต่สัปดาห์ที่สองของการเลี้ยง แต่ส่วนที่แตกต่างคือ ในการทดลองครั้งนี้มีปลาเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สีผิวเปลี่ยนเป็นเข้มขึ้นและผิวซีดอมชมพู Gentent et al. (2009) อธิบายว่าการที่ปลามีการเปลี่ยนแปลงสีผิวเป็นผลจากการแสดงผลร่วมกันของเม็ดสี (pigment cell type) ชนิดต่างๆ ที่รู้จักทั่วไป คือ โครมาโตฟอร์ (chromatophore) แซนโธฟอร์ (xanthophore) อิริโธฟอร์ (erythophore) และเออริโธฟอร์ (iridophore) และสารสีที่พบในเมลาโนฟอร์ คือ เมลานิน (melanin) ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้ม (black brown) ฮีโมซิเดอริน (hemosiderin) ไลโปฟูซิน (lipofusin) ซึ่งมีสีเหลืองชมพูถึงน้ำตาลทอง (yellow pink to golden brown) เมลานินยังเป็นส่วนประกอบของเมลาโนมาโครฟาจ (melanomacrophage; MM) เมลาโนมาโครฟาจ เซนเตอร์ (melanomacrophagecenter; MMC) ซึ่งเกี่ยวข้องระบบภูมิคุ้มกันในปลา ซึ่งจำนวนและขนาดของ MM และ MMC จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงและเกิดความเครียดหรือเจ็บป่วย ปลาจะตอบสนองโดยผิวหนังมีสีเข้มขึ้น หรือซีดลงออกชมพูซึ่งในการทดลองครั้งนี้แสดงว่า การได้รับ Me และ UF มีผลต่อสุขภาพของปลา และปลาตอบสนองทางการเปลี่ยนแปลงสีผิวดังกล่าว

รอยโรคหรือสภาพของอวัยวะ เช่น ตับ ไต และม้าม ผิดปกติจากกลุ่มควบคุม คือ ตับมีเลือดออก ซึ่งความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามความระดับของสารที่เสริมในอาหาร โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มี Me ตับจะบวมขยาย มีเลือดออกกระจายในระดับรุนแรง มีจุดเนื้อตาย สีเนื้อตับจะเข้ม ส่วนกลุ่มที่ได้รับ UF ตับจะมีลักษณะบวมขยาย ตับเปราะ มีเลือดออกกระจายในระดับรุนแรง เนื้อตับเหลืองซีดโดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับในระดับ 2.0% ส่วนไตพบว่ามีสีซีดบวมขยายใหญ่และมีเลือดออก ในขณะที่ม้ามมีรูปร่างและสีผิดไปจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ตั้งแต่สีแดงสดจน สีซีดจาง มีลักษณะเปราะ ระดับความผิดปกติจะพบมากในกลุ่มที่ได้รับ UF และระดับความผิดปกติสัมพันธ์กับระดับการเสริมสารทั้งสองในอาหาร รอยโรคที่พบในผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับกับการศึกษาในปลานิล แต่ความรุนแรงจะไม่มากเท่ากับการได้รับสารทั้งสองพร้อมกัน (Srisathaporn et al., 2013)

การตรวจสอบเนื้อเยื่อสด (wet mount slide) **และจุลพยาธิสภาพวิทยา** (histology) **ทางกล้องจุลทรรศน์**

ปลากลุ่มที่ได้รับการเสริม Me ในอาหารทุกระดับ เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเสียหาย เซลล์ไขมันบวม แตกกระจาย เส้นเลือดฝอยแตกแผ่กระจาย และความเสียหายของตับจะรุนแรงมากขึ้นตามระดับของ Me ที่เพิ่มในอาหาร แต่การเสริมที่ระดับเดียวกันกับ UF ที่ 2.0% ความเสียหายไม่รุนแรงเท่ากับกลุ่มที่ได้รับ UF ที่พบจุดเนื้อตายและพบการสะสมกลุ่มสารสีน้ำตาลเข้ม และผลึกแววววาวกระจายทั่วเนื้อเยื่อตับ ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ใหญ่มากมองด้วยกล้องกำลังขยายต่ำตั้งแต่ 40 เท่า จนถึงเล็กมากต้องใช้กล้องกำลังขยายสูง 400 เท่า ขนาดและจำนวนที่พบและความเสียหายจะสัมพันธ์กับระดับของ UF ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ในส่วนเนื้อเยื่อไตสามารถตรวจพบผลึกของ Me และ UF ได้ทุกระดับการเสริม โดยขนาดและจำนวนของผลึกที่พบและความเสียหายต่อเนื้อเยื่อไตจะรุนแรงเพิ่มตามปริมาณการเสริมทั้งสองในอาหาร ในส่วนของม้ามพบความเสียหายของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อตับและไต (**Figure 2**) ซึ่งผลการตรวจพบดังกล่าวจะสัมพันธ์กับรอยโรคที่สังเกตได้ของอวัยวะเหล่านั้น การที่พบความเสียหายของอวัยวะดังกล่าวในปลากลุ่มที่ได้รับ UF 2.0% มากกว่า Me ที่ระดับเดียวกัน เนื่องจาก UF สามารถปลดปล่อยแอมโมเนียและฟอร์มัลดีไฮด์ออกมา (Javed et al., 2002) ซึ่งสารทั้งสองหากมีในระดับที่สูงถือว่าเป็นพิษต่อสัตว์น้ำอวัยวะ เช่น ตับจะทำหน้าที่กำจัดสารพิษ(detoxification) จึงทำงานหนักขยายบวมโตและเนื้อเยื่อบางส่วนเสียหายมีจุดเนื้อตาย (Genter et al., 2009) และการให้ UF ในปริมาณสูงต่อเนื่องเป็นเวลานานส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์ได้ (Maslosh et al., 2005)

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิสภาพของ ตับ ไต และม้าม พบความเสียหายของเซลล์และพบผลึกสีเขียวอ่อน สีน้ำตาลเข้ม และผลึกสีแวววาวขนาดต่างๆ กระจายทั่วเนื้อเยื่อความเสียหายของเซลล์รุนแรงตามระดับสารที่เสริมในอาหาร และจะพบผลึกในตับและม้ามมากกว่าในไตทั้งนี้เนื่องจากไตถูกทำลายเสียหายมากและผลึกที่พบมีขนาดเล็กกว่าที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อสด (**Figure 3**) การพบผลึกสีเขียวอ่อนในการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ ปาริชาติ และคณะ (2553) ที่พบผลึกสีเขียวอ่อนในเนื้อเยื่อไตของปลาดุกที่ได้รับอาหารที่มี Me ตั้งแต่ 4.0% ขึ้นไป ในขณะที่ปวีณาและคณะ (2552) รายงานไม่พบผลึกในเนื้อเยื่อแต่อย่างใด ลักษณะของผลึกที่พบและความเสียหายของเนื้อเยื่อในการทดลองครั้งนี้จะคล้ายกับรายงานการตรวจพบในไก่เนื้อและไก่ไข่แม้จะเป็นสัตว์ต่างชนิดกัน (Sirilaophaisan et al., 2010; 2011) การที่ตรวจพบผลึกมีขนาดเล็กและจำนวนน้อยกว่าการเนื้อเยื่อสดนั้น Symmans et al. (1995) ได้ให้เหตุผลว่าน่าจะเป็นผลจากในกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาทำให้ผลึกของ Me หรือ UF สลายไปกับน้ำยาฟอร์มัลดีไฮด์ ในระหว่างการเตรียมและการเก็บตัวอย่าง ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณของผลึกที่ตรวจพบมีขนาดและจำนวนน้อยกว่าที่พบในเนื้อสด ความเสียหายที่เกิดกับเนื้อเยื่อของปลาในการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ ปวีณา และคณะ (2552) ที่รายงานผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยาปลาดุกลูกผสม พบว่าเนื้อเยื่อ เหงือก ตับ และไต เสื่อมสลาย มีการตายของเนื้อเยื่อ ความเสียหายรุนแรงตามระดับของ Me ที่เพิ่มในอาหารตั้งแต่ 0.5-3.0%

การตรวจสอบทางจุลพยาธิสภาพช่วยยืนยันว่าเกิดผลึกขึ้นในเนื้อเยื่อของปลาดุกจริง อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ อาจจะยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าผลึกที่เกิดขึ้นเป็นผลึกของ Me หรือ UF จริงหรือไม่ เพราะ Puschner et al. (2007) รายงานว่าเมลามีนทำปฏิกิริยากับยูริคเกิดเป็น kidney stone ซึ่งสามารถทำลายเนื้อเยื่อของไตได้เช่นกัน

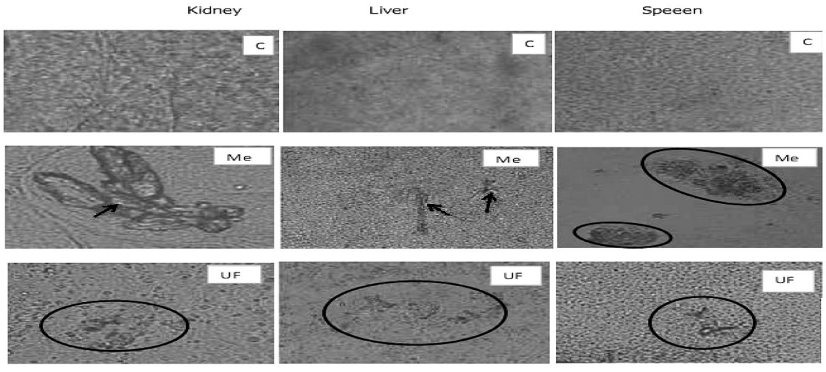

Figure 2 Wet mount slide examination of kidney, liver and spleen tissue of hybrid catfish fed with 2.0% of Me and UF diets for 8 weeks compared with the control diet (C). Tissue damage was found to be very severe. Crystals were found in different shapes and sizes (arrows and circles) (400X).

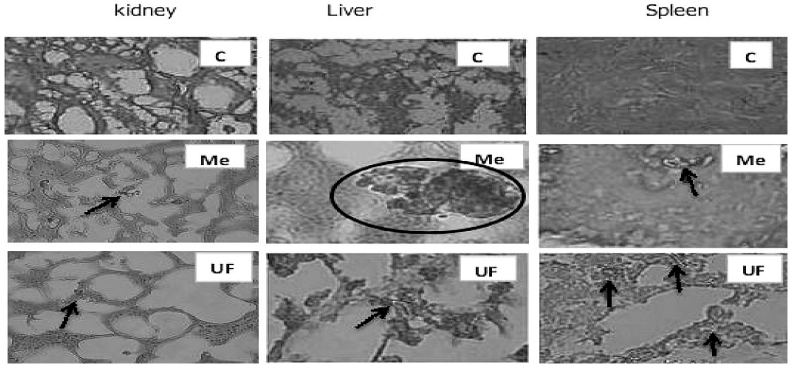

Figure 3 Histological view of crystals in the kidney, liver and spleen of hybrid catfish fed with the graded levels of melamine (Me) and urea formaldehyde (UF) for 8 weeks compared with the control (C). Kidney, liver and spleen were degeneration, less prominent cell membrane. The light green crystal, golden brown and transparent materials (arrows and circle) were detected under an inverted microscope (400X).

สรุป

การปนเปื้อน Me หรือ UF ในอาหารในระดับ 0.5% ในอาหารแม้ไม่แสดงผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมบิ๊กอุยแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม แต่การปนเปื้อนในระดับตั้งแต่ 1.0-2.0% พบว่ามีผลทำให้ปลาเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อเลี้ยงต่อเนื่องจนถึง 8 สัปดาห์ ผลของ UF จะแสดงออกรุนแรงมากกว่า Me อย่างไรก็ตาม Me แสดงผลกระทบต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FCR, FCE, PER) มากกว่า UF ที่ระดับการเสริม 0.5-1.0% ในอาหาร แต่การเสริมที่ระดับ 2.0% ทั้ง Me และ UF มีผลทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การได้รับ Me และ UF ในอาหารมีผลกระทบต่อสุขภาพปลา โดยปลาแสดงความเครียดและแสดงความผิดปกติของสีผิว ความผิดปกติของส่วนประกอบทางเคมีของเลือด การพบรอยโรคและ

การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ สามารถตรวจพบความผิดปกติได้ที่ระดับการเสริมที่ 0.5% เป็นต้นไป และการตรวจพบผลึกในเนื้อเยื่อของของ ตับ ไต และม้าม สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนสารทั้งสองได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, สุธี วงศ์มณีประทีป, เกศินี หลายสุทธิสาร, ปัทมา วิริยะพัฒนทรัพย์ และแก้วตา ลิ้มเฮง. 2554. การศึกษาลักษณะภายนอกและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปผลิตจากวัตถุดิบที่ปนเปื้อนของเมลามีนและกรดไซยานูริค. ศูนย์วิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ.

นัทท์ นันทพงศ์ และวุฒิพร พรหมขุนทอง. 2554. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาในปลานิลแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus x O. mossambicus)*. The 12th Graduate Research Conference Khon Kaen University, 2011.

ปวีณา จันทร์เล็ก, มะลิ บุณยรัตผลิน และวุฒพร พรหมขุนทอง. 2552. ผลของเมลามีน (melamine) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในปลาดุกพันธ์ผสม {*Clarias macrocephalus* (Gunther) x *Clarias gariepinus* (Burchell)}. ว.การประมง. 62: 331-340.

ปาริชาติ กุบแก้ว, บัณฑิต เต็งเจริญกุล, อุไร เต็งเจริญกุล และพีรพล สุขอ้วน. 2553. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโต ระดับภูมิคุ้มกัน ค่าโลหิตวิทยา และพยาธิสภาพในปลาดุกลูกผสม ว.สัตวแพทยศาสตร์ มข. 20: 54-164.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และสาโรช ค้าเจริญ. 2550. เมลามีนภัยร้ายในอาหารสัตว์ที่ผู้เลี้ยงต้องระวัง. ว.สัตว์เศรษฐกิจ. 25: 8-15.

ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. 2545. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สถิติการประมงแห่งประเทศไทย. 2556. ปริมาณสัตว์น้ำจืดที่จับได้ทั้งหมด (รวมการเพาะเลี้ยง) จำแนกเป็นรายชนิด ปี 2549-2553. แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/it-stat. ค้นเมื่อ 19 พฤศจิกายน 2556.

สุรพงษ์ โยวะราช และบัณฑิต เต็งเจริญกุล. 2553. ผลของเมลามีนต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพและขนาดของเมลามีนที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง. ว.สัตวแพทย์ศาสตร์ มข. 20: 34-44.

Cowey, B. and M. J. Walton. 1989. Intermediary metabolism. P. 259-329. In: J. E. Halver. Fish Nutrition. 2nd Ed. Academic Press Inc., Washington.

Genten, F., E. Terwinghe, and A. Dangny. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Javed, M.T., M.A. Sarwar, R. Kausar, and I. Ahmad. 2002. Effects of feeding different levels of formalin (37% formaldehyde) and urea on broiler health and performance. Vet. arhiv. 72: 285-302.

Maslosh, V. Z., V.V. Kotava, and O. V. Maslosh. 2005. Decreasing the content of free formaldehyde in urea formaldehyde resins. Russian Journal of applied Chemistry. 78: 685-687.

Muylder, E.D., H. Hage, and G.van der Velden. 2008. Binders: Gelatin as alternative for urea formaldehyde and wheat gluten in the production of water stable shrimp feeds. Aquafeed International Magazine 11(2). Available: http://goo.gl/sGaw4I. Accessed Sep. 12, 2012.

Puschner, B., R. H. Poppenga, L. J. Lowenstine, M. S. Filigenzi, and P. A. Pesavento. 2007. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. J. Vet. Diagn. Inverst. 19: 616-624.

SAS.1995. SAS User's Guide Statistics. Statistical Analysis System. Inst.

Sirilaophaisan, S., J. Khajaren, and B. Tengjaroenkul. 2010. Effect of Dietary Melamine or urea-formaldehyde or their mixtures on performance, carcass quality, melamine residues and microscopic change in broiler tissues. Thai J. Vet. Med. 40: 367-375.

Sirilaophaisan, S., J. Khajaren, and B. Tengjaroenkul. 2011. Effect of melamine or urea formaldehyde or their mixture on performance in laying hens. Khon Kaen Agr. J. 39 (Suppl.): 10-16.

Srisathaporn, A., J. Khajarern, P. Chalorkpunrut, and B. Tengjroenkul. 2013. Effects of Melamine and Urea formaldehyde contamination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets on growth performance, economic loss and toxicity appearance characteristic index. Khon Kaen Agr. J. 41: 521-534.

Stilborn, H. L., J. K. Skeeles, and P. W. Waldroup. 1991. The effects of a urea-formaldehyde resin pellet binder in diets for laying hens on performance and blood parameters. Nutrition Research. 11: 599-605.

Symmans, PJ., K. Brady, and CE. Keen. 1995. Calcium oxalate crystal deposition in epithelioid histiocytes of granulomatous lymphadenitis: analysis by light and electron microscopy. Histopathology. 27: 423- 429.

US-FDA. 2007. Import Alert #99-29 “Detention without physical examination of all vegetable protein products from China for animal or human food use due to the presence of Melamine and/or Melamine analogs”. Available: http://fda zeiglerfeed.com/pdf/Article-s1. pdf-Microsoft. Accessed Aug. 30, 2007.