บทที่ 2

อุปกรณ์และการดำเนินงาน

สถานที่ใช้ในการศึกษา

ใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และห้องปฏิบัติการชีวเคมีภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ (Brood stock)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้พ่อแม่พันธุ์จากบ่อเลี้ยงของฟาร์ม บริษัทกุ้งก้ามทอง จำกัด ในบริเวณคลองระบายน้ำที่ 8 ตำบลบึงบอน อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ขนาดของแม่กุ้งก้ามกรามที่ใช้มีความยาวเฉลี่ย 13.42 ± 1.24 ซ.ม. และมีน้ำหนักเฉลี่ย 26.54 ± 7.34 กรัม เป็นกุ้งที่ไข่ได้รับการผสมแล้วภายในบ่อเลี้ยงและอายุของไข่ประมาณ 10 – 15 วัน หลังผสม (สีไข่เป็นสีส้มปนเทา)

การขนส่งแม่พันธุ์จากบ่อเลี้ยงมายังห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงส่วนมากใช้ถังพลาสติกขนาด 40 ลิตร ใส่น้ำประมาณ 15 ลิตร เติมฟองอากาศ แล้วคัดพ่อแม่พันธุ์ที่แข็งแรงใส่ลงในภาชนะประมาณ 6 – 10 ตัว/ถัง ใช้เวลาเดินทางจากบ่อเลี้ยงถึงห้องปฏิบัติการประมาณ 30 นาที หลังจากปรับอุณหภูมิภายในถังและบ่อพักพ่อแม่พันธุ์ให้เท่ากัน แล้วจึงแยกพ่อแม่พันธุ์ลงในบ่อพักกุ้ง

การเตรียมกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนเพื่อใช้ทดลอง

เมื่อแม่กุ้งมีไข่แก่อายุประมาณ 17 – 18 วัน (สีไข่เป็นสีน้ำตาลปนเทา) จึงแยกแม่กุ้งออกจากบ่อพักมาเลี้ยงในตู้กระจก (aquarium) แก้วใสขนาดบรรจุน้ำ 40 ลิตร ความเค็มของน้ำ 4 – 6 ส่วนในพันส่วน เมื่อลูกกุ้งฟักออกเป็นตัวหมดจึงแยกแม่กุ้งออกแล้ว

นับจำนวนลูกกุ้งโดยวิธี Uniformly randomized sampling ด้วยการใช้อากาศพ่นให้เกิดการหมุนเวียนของน้ำภายในบ่อพักและทำให้ลูกกุ้งกระจายตัวออกเท่า ๆ กัน หลังจากนั้นจึงสุ่มตัวอย่างน้ำประมาณ 10% ของปริมาตรทั้งหมดมานับจำนวนและคำนวณหาจำนวนของลูกกุ้งวัยอ่อน โดยใช้สูตร

$$P = V.\frac{n}{v}$$

P = จำนวนลูกกุ้งวัยอ่อนทั้งหมด

V = ปริมาตรของน้ำในบ่อพักลูกกุ้ง

n = จำนวนลูกกุ้งวัยอ่อนจากการสุ่มตัวอย่าง

และ v = ปริมาตรของน้ำที่สุ่มตัวอย่าง

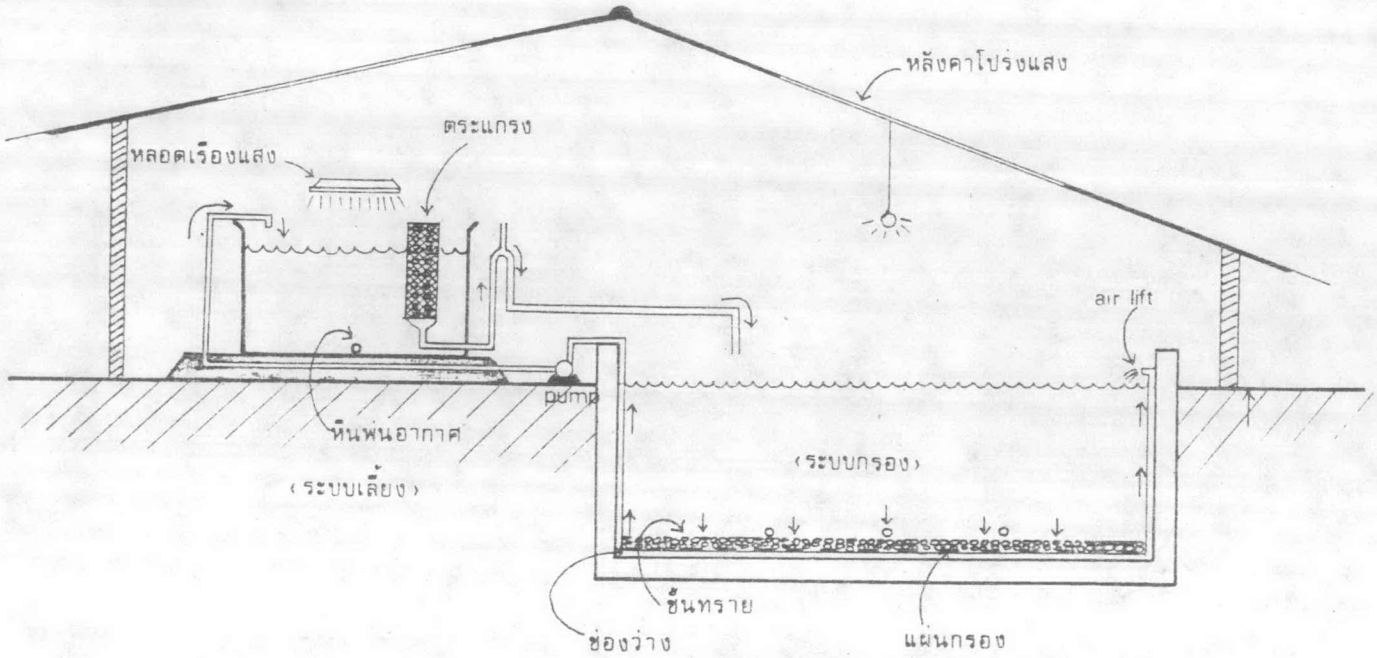
เมื่อได้จำนวนลูกกุ้งในบ่อพักแล้ว จึงค่อย ๆ แยกลูกกุ้งลงในบ่อทดลองต่อไป โดยใช้ความหนาแน่นของลูกกุ้งเท่ากับ 10 ตัว/ลิตร หรือปล่อยลูกกุ้ง 5,000 ตัว/บ่อทดลอง (ซึ่งมีขนาดความจุน้ำ 500 ลิตร)

น้ำสำหรับเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

เป็นส่วนผสมของน้ำจืด (น้ำประปาที่ผ่านการไล่คลอรีนออกแล้ว) กับน้ำทะเลที่ปล่อยให้ตกตะกอนและผ่านการกรองแล้ว ความเค็มควบคุมที่ 12 ส่วนในพันส่วนตลอดการทดลอง

ระบบและวิธีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

การศึกษาครั้งนี้ได้ปรับปรุงระบบการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการแบบระบบน้ำหมุนเวียนปิดหรือ Closed Recirculating Water System (ดังรูปที่ 1) โดยใช้บ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ม. x ความสูง 1.20 ม. จำนวน 1 บ่อ เป็นบ่อกรองน้ำ (ด้วยระบบ subsand filter) บ่อนี้ฝังอยู่ใต้ดิน 80 ซ.ม. และ



รูปที่ 1 แสดงระบบการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนแบบน้ำหมุนเวียนปิด

ขอบบ่อสูงจากพื้นดิน 40 ซ.ม. มีความสามารถจุน้ำได้ประมาณ 7,500 ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาตรของน้ำในบ่อเลี้ยงทั้งหมดรวมกันเล็กน้อย

ระบบทั้งหมดนี้ติดตั้งอยู่กลางแจ้ง โดยบ่อกรองมีหลังคาโปร่งใสคลุมตลอดบ่อ เพื่อกันน้ำฝนตกลงในบ่อ เหนือบ่อ 50 ซ.ม. ติดไฟเรืองแสง 40 วัตต์ 1 หลอด เพื่อช่วยให้แสงตอนกลางคืน ภายในบ่อจัดระบบกรองด้วยทรายและเปลือกหอยนางรม มีไม้เนื้อแข็งหนา 1 นิ้ว เป็น Filter plate หรือแผ่นกรอง ใต้แผ่นกรองมีท่อพี วี ซี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว เป็น Filter plate หรือแผ่นกรองแบบใยแมงมุม และเปิดปลายท่อออกสู่ผิวน้ำจำนวน 4 ท่อ โดย 3 ท่อจะทำหน้าที่ดูดน้ำจากใต้แผ่นกรองขึ้นข้างบนด้วยวิธีการใช้อากาศยกน้ำขึ้น หรือ Air lift method ด้วยอัตราการดูดประมาณ 10 ลิตร/นาที/ท่อ การทำเช่นนี้เพื่อทำให้เกิดการถ่ายเทของน้ำตลอดเวลาในชั้นทราย และแก้ปัญหาการเกิดสภาวะขาดออกซิเจน (anaerobic condition) ในทรายเป็นส่วน ๆ ด้วยท่อที่เหลืออีก 1 ท่อ จะต่อเข้ากับเครื่องสูบน้ำที่มีอัตราการสูบประมาณ 22 ลิตร/นาที เพื่อสูบน้ำส่งจ่ายไปยังบ่อเลี้ยงทั้ง 14 บ่อ ด้วยอัตราความเร็วเท่า ๆ กันทุกบ่อ คือประมาณ 1.50 ลิตร/นาที/บ่อ หรือประมาณ 90 ลิตร/ชั่วโมง/บ่อ ภายในบ่อกรองนี้จะให้อากาศตลอดเวลาเพื่อเพิ่มออกซิเจน

บ่อเลี้ยงคลุมด้วยหลังคาทึบแสง ด้านข้างทั้งหมดโล่งเพื่อให้แสงสว่างจากบริเวณรอบ ๆ สะท้อนเข้าบ่อเลี้ยง การจัดบ่อเลี้ยงในลักษณะนี้เพื่อป้องกันแสงแดดส่องลงในบ่อเลี้ยงโดยตรง ทำให้สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายจำพวกสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดที่เป็นอันตรายต่อลูกกุ้งวัยอ่อนได้ เหนือบ่อเลี้ยง 1.5 เมตร ติดไฟเรืองแสงขนาด 40 วัตต์ 4 บ่อ/หลอด เพื่อเปิดให้แสงตอนกลางคืน ภายในบ่อเลี้ยงทุกบ่อมีท่อกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว 1 ท่อวางในแนวตั้งฉากกับพื้นบ่อ เพื่อทำหน้าที่กรองน้ำที่ใช้แล้วจากบ่อเลี้ยงส่งไปสู่บ่อกรอง ที่ปลายเจาะเป็นรูพรุนขนาดรู 0.5 ซ.ม. แล้วบุด้วยผ้ากรองขนาด 100 ไมครอน ปลายท่อส่วนกลางต่อกับท่อขนาด 1 นิ้ว ซึ่งต่อโค้งสูงขึ้นภายนอกบ่อเพื่อใช้ควบคุมความลึกของน้ำภายในบ่อเลี้ยงให้ได้ระดับความลึก 45 ซ.ม. และจากท่อนี้จะต่อเข้ากับท่อน้ำทิ้งรวมไปสู่บ่อกรอง

เหนือบ่อเลี้ยงเป็นท่อขนาด 6/8 นิ้ว ซึ่งต่อกับปั๊มน้ำที่สูบน้ำจากใต้ทรายของบ่อกรอง ทำหน้าที่ส่งน้ำที่ผ่านการกรองแล้วมายังบ่อเลี้ยง ภายในบ่อเลี้ยงจะให้อากาศตลอดเวลาที่ทดลอง

ก่อนเริ่มการทดลองครั้งแรกบ่อเลี้ยงทุกบ่อจะล้างให้สะอาดและฆ่าเชื้อโรคที่เกาะอยู่ริมบ่อด้วยการตากแดดไว้ 1 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มเตรียมน้ำกร่อยความเค็ม 12 ส่วนในพันส่วน ลงในบ่อกรองและบ่อเลี้ยง และเดินเครื่องเป่าอากาศและเครื่องสูบน้ำให้ระบบทำงานประมาณ 7 วัน จึงจะเริ่มปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยงเพื่อการทดลองต่อไป

สำหรับการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป จะทำความสะอาดบ่อเลี้ยงด้วยการใช้วิธีกาลักน้ำ ถ่ายน้ำจากบ่อเลี้ยงลงในบ่อกรองให้หมด แล้วจึงค่อยกำจัดตะไคร่และตะกอนออก ตากให้แห้งแล้วเช็ดพื้นบ่อโดยรอบด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งให้แห้งแล้วจึงเดินเครื่องสูบน้ำเข้าบ่อ การทำความสะอาดครั้งหลังส่วนใหญ่ทำได้ทีละ 2 บ่อ เพราะถ้าทำหมดน้ำจะล้นจากบ่อกรอง

ตลอดการทดลองน้ำที่ใช้จะไม่มีการเตรียมขึ้นใหม่ นอกจากการเติมน้ำจืดลงในระบบเป็นครั้งคราวเพื่อควบคุมความเค็มของน้ำให้เท่ากับ 12 ส่วนในพันส่วนเท่านั้น

<u>แหล่งที่มาของวัตถุดิบ</u>

1. มันกุ้งแยกจากหัวกุ้งแชบ๊วย (<u>Penaeus merguiensis</u>) ซึ่งเหลือจากอุตสาหกรรมห้องเย็นมาแยกเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อและไขมัน นำไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ. เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง จนมีความชื้นเหลือประมาณ 15% โดยน้ำหนัก

2. เนื้อปลา ได้จากปลาโอหลังดำ (<u>Euthenus tongol</u>) นำมาแล่เนื้อ โดยแยกส่วนของกระดูก เอ็น และหลังออกเอาแต่เนื้อเท่านั้น

3. ถั่วเหลืองผงที่ใช้มาจากนมถั่วเหลืองผงที่มีโปรตีน 45% (หาซื้อจากองค์การอาหารสำเร็จรูป)

4. ไข่ของอาร์ทีเมีย ซาไลน่า แห้งอัดกระป๋องของ San Francisco Bay (California, U.S.A.)

5. น้ำมันตับปลา ใช้ของสก๊อต อีมัลชั่น (SCOTT'S EMULSION) ในเครือบริษัทสก๊อตและบาวน์จำกัด ประเทศอังกฤษ

6. น้ำมันปาล์ม ใช้น้ำมันตรารอยโก้

7. น้ำมันข้าวโพด ใช้น้ำมันตรามาโซล่า ของบริษัท ซี พี ซี ประเทศไทย จำกัด

8. สารโคเลสเตอรอล ($C_{27}H_{46}O$ = 386.66) ของ BDH Chemicals

9. Casein ที่ใช้คือ Casein hydrolysate (Vitamin free) ของ BDH Chemicals จำกัด ประเทศอังกฤษ

10. Carboxy Methyl Cellulose (C.M.C.) ของบริษัท เคมีวิทยาศาสตร์อุตสาหกรรม จำกัด 83 อาคาร 10 ถนนราชดำเนิน กรุงเทพมหานคร

11. วิตามินรวมและแร่ธาตุรวมสำหรับอาหารผสมคาเซอีนน้ำหนักรวม (Final diet) 300 กรัม มีสัดส่วนดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ มีที่มาดังนี้

11.1 Thiamine: HCl ของบริษัทซีแอนด์ ที จำกัด 153/14 – 15 เชิงสะพานพระปิ่นเกล้า บางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร

11.2 Riboflavin (Riboflavine tablets BP1958), Nicotinic acid BP 1968, Menadione (K) ขององค์การเภสัชกรรม ถนนพระราม 6 พญาไท กรุงเทพมหานคร

11.3 Pyridozine:HCl ของบริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐ–อเมริกา

ตารางที่ 1 วิตามินรวม (Vitamin mix) (จาก Water Soluble Vitamin Test Dict ของ Halver, 1968)

รายชื่อสาร	น้ำหนัก (ม.ก.)
Thiamine:HCl	5
Riboflavin	20
Pyridozine:HCl	5
Choline chloride	500
Nicotinic acid	75
Ca-Pantothenate	50
Inositol	200
Biotin	0.5
Folic acid	1.5
L-Ascorbic acid	100
Vitamin B_{12}	0.01
Menadione (K)	4
Alpha-tocopherol acetate (E)	40

ตารางที่ 2 แร่ธาตุรวม (Mineral mix) (ดัดแปลงจากสูตร Water Soluble Vitamin Test Diet ของ Halver, 1968)

รายชื่อสาร	น้ำหนัก (ม.ก.)
USPXII 2 plus:	5.965
(in 100 gm. of salt mixture)	
$AlCl_3$	5.965
$ZnSO_4$	119.3
CuCl	3.977
$MnSO_4$	31.816
KI	5.965
$CoCl_3$	39.77
USP XII 2	
Sodium chloride	17.3
Magnesium sulfate	54.5
Sodium biphosphate	34.7
Potassium phosphate	95.4
Calcium biphosphate	54.0
Calcium carbonate	130.0

11.4 Choline chloride, Inositol, D-Biotin crystalline ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$ = 244.31), Folic acid, Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Sodium biphosphate (Na_2HPO_4), $AlCl_3$ ($AlCl_3$ = 133.34), $ZnSO_4$ ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ = 287.54) ของบริษัท BDH Chemicals จำกัด ประเทศอังกฤษ

11.5 Ca-Pantothenate (Calcium-D (+) - Panto thenate) ของบริษัท E. Merck, ประเทศเยอรมัน

11.6 L-Ascorbic acid (Ascorbic acid U.S.A.) ($C_6H_5O_6$) ของบริษัทอุตสาหกรรม จำกัด 57 อาคาร 8 ถนนราชดำเนิน พระนคร

11.7 วิตามิน B_{12} (pure compound) ของบริษัท ICN Pharmaceuticals, Inc. Life Sciences Group, โอไฮโอ, ประเทศสหรัฐอเมริกา

11.8 Alpha-tocopherol acetate (DL-Alpha-tocop-herol acetate N.F. XIV) ของบริษัท R.P. Scherer, ประเทศออสเตรเลีย

11.9 Sodium chloride, Calcium biphosphate, CuCl, Manganese sulfate ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$), KI, $CoCl_3$, Calcium carbonate, ของบริษัท May และ Baker จำกัด ประเทศอังกฤษ

ชนิดของอาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย

1. อาหารที่มีชีวิต ได้แก่ อาร์ทีเมีย ซาไลน่า ที่ฟักออกจากไข่แล้ว 24 – 48 ชั่วโมง

2. อาหารผสม (Compound diets) ที่เตรียมขึ้นเอง ได้แก่

2.1 อาหารผสมเตรียมจากเนื้อปลาและไข่เป็ด, สูตร FE

2.2 อาหารผสมเตรียมจากเนื้อปลาและไข่เป็ดเติมโคเลสเตอรอล สูตร FEC

2.3 อาหารผสมเตรียมจากเนื้อปลาและไข่เป็ดเติมมันกุ้ง, สูตร FES

2.4 อาหารผสม, สูตร Mp (c.o.)

2.5 อาหารผสมเติมโคเลสเตอรอล, สูตร MpC (c.o.)

2.6 อาหารผสมเติมมันกุ้ง, สูตร MpS (c.o.)

2.7 อาหารผสม, สูตร Mp (p.o.)

2.8 อาหารผสมเติมมันกุ้ง, สูตร MpS (p.o.)

2.9 อาหารผสมเติมไขขาว, สูตร MpA (p.o.)

2.10 อาหารผสมเติมถั่วเหลือง, สูตร MpSoy (p.o.)

การเตรียมอาหาร

1. การเตรียมตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย

ไข่อาร์ทีเมียที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นของ San Francisco Bay (California, U.S.A.) การเตรียมตัวอ่อนทำได้โดยเพาะไข่อาร์ทีเมียในน้ำทะเล หรือน้ำเกลือที่มีความเค็ม 28 – 30 ส่วนในพันส่วน ในอัตราส่วนไข่อาร์ทีเมีย 10 กรัม/น้ำทะเล 10 ลิตร และขณะเพาะต้องใช้อากาศเป่าลงไปแรง ๆ เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของอาง เพาะไข่จะฟักออกเป็นตัวอ่อนภายใน 24 – 33 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 – 28 °ซ. เวลานำมาเลี้ยงลูกกุ้งต้องแยกเอาตัวอ่อนของอาร์ทีเมียและเปลือกไข่ออกจากกัน แล้วล้างให้สะอาด จึงนำไปเลี้ยงโดยใช้ความหนาแน่นของอาหาร 5 – 10 ตัว/น้ำ 1 ลบ.ซ.ม.

I16751784

2. การเตรียมอาหารผสม (Compound diets)

2.1 อาหารผสมเตรียมจากเนื้อปลาและไข่เป็ด (สูตร FE)

นำเนื้อปลาโอที่แกะเอ็นและกระดูกออกหมดแล้วมาปั่นให้ละเอียดด้วย blender ตีไข่เป็ดลงไปผสมในอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 3 ผสมต่อไปเรื่อย ๆ จนไข่และเนื้อปลาคลุกเคล้าเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่บนแผ่นอลูมิเนียมในถาดบาง ใช้ช้อนค่อย ๆ เกลี่ยอาหารให้แผ่ออกเป็นแผ่นบางเท่า ๆ กัน นำเข้าอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง อาหารจะสุกนำออกผึ่งให้เย็น ใส่ในกล่องสะอาด ปิดฝาสนิท และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 °ซ.

2.2 อาหารสูตร FEC และ FES

เตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร FE แต่หลังจากคลุกเคล้าไข่และปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว จึงค่อยเติมโคเลสเตอรอล (สำหรับสูตร FEC) และมันกุ้ง (สำหรับสูตร FES) ตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ในตารางที่ 3 แล้วนำเข้าอบและเก็บเช่นเดียวกับอาหารสูตร FE

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบคิดเป็นร้อยละของอาหารผสมเตรียมจากเนื้อปลาและไข่เป็ดทั้ง 3 สูตร

ส่วนประกอบ	สูตร FE	สูตร FEC	สูตร FES
เนื้อปลาโอ	80.00	79.00	60.00
ไข่เป็ด	20.00	20.00	15.00
โคเลสเตอรอล ($C_{27}H_{46}O$)	–	1.00	–
มันกุ้งอบแห้ง	–	–	25.00

2.3 การเตรียมอาหารผสมสูตรต่าง ๆ (สูตร Mp (c.o.), MpC (c.o.), Mp (p.o.), MpS (p.o.), MpA (p.o.)และ MpSoy (p.o.))

อาหารโปรตีนสำเร็จที่เตรียมขึ้นนั้นได้จากการดัดแปลงสูตรอาหารของ Halver (1967) โดยผสมส่วนประกอบอาหารต่าง ๆ ดังตารางที่ 4

กรรมวิธีในการเตรียมอาหารโปรตีนสำเร็จสูตรต่าง ๆ ทำโดยดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมส่วนประกอบอาหารต่าง ๆ ให้พร้อมตามที่ระบุในตารางที่ 4

2. ละลายวุ้น (agar) ด้วยน้ำปริมาตรตามที่กำหนดในอาหารแต่ละสูตรที่อุณหภูมิประมาณ 90 °ซ.

3. เติมส่วนผสมของอาหารต่าง ๆ ตามลำดับ คือ คาเซอีน, ถั่วเหลืองฝง (สำหรับสูตร MpSoy), ไข่ขาว (สำหรับสูตร MpA), โคเลสเตอรอล (สำหรับสูตร MpC (c.o.)), มันกุ้ง (สำหรับสูตร MpS (c.o.) และMpS (p.o.)) carboxy methyl cellulose, mineral xix และ oil mix คนส่วนผสมของอาหารต่าง ๆ เหล่านี้อย่างเร็วและแรง เพื่อให้เข้ากับวุ้นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงจนเหลือประมาณ 40 °ซ. จึงเติมวิตามินรวมลงไป แล้วคนต่อให้วิตามินเข้ากับส่วนผสมอาหารต่าง ๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน

4. นำส่วนผสมของอาหารที่ผสมเสร็จแล้ว เทลงบนแผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) ใช้ช้อนเกลี่ยอาหารออกเป็นชิ้นบาง ๆ นำเข้าแช่ในตู้เย็นจนวุ้นจับตัวแข็ง จึงแกะอาหารออกบรรจุในภาชนะสะอาด ปิดฝาให้สนิท แล้วเก็บรักษาในอุณหภูมิ 0 °ซ.

การดำเนินงานเกี่ยวกับการทดลอง

การทดลองเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนด้วยอาหารแต่ละสูตรกระทำซ้ำ 3 การทดลอง แต่ละการทดลองใช้ความหนาแน่นของลูกกุ้งเริ่มแรก 10 ตัว/ลิตร

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของอาหารโปรตีนสำเร็จสูตรต่าง ๆ

ส่วนประกอบอาหาร (กรัม)	สูตรอาหาร Halver (1967)	อาหารสูตร Mp (c.o.)	อาหารสูตร Mp (p.o.)	อาหารสูตร MpC (c.o.)	อาหารสูตร MpS (c.o.)	อาหารสูตร MpS (p.o.)	อาหารสูตร MpA (p.o.)	อาหารสูตร MpSoy (p.o.)
Vitamin free Casein	38	38	60	38	38	38	38	38
Gelatin	12	—	—	—	—	—	—	—
Agar		18	20	18	18	20	20	20
Cod liver oil	2	2	5	2	2	5	5	5
Corn oil (c.o.)	7	7	—	7	7	—	—	—
Palm oil (p.o.)	—	—	5	—	—	5	5	5
White dextrin	28	—	—	—	—	—	—	—
Alpha-cellulose mixture	9	9	4	9	9	4	4	4
Alpha cellulose	8	—	—	—	—	—	—	—
Carboxy Methyl Cellulose	—	8	2	8	8	2	2	2
Vitamins	1	1	2	1	1	2	2	2
Min ral mix	4	4	16	4	4	16	16	16
Soy bean meal (ถั่วเหลืองผง)	—	—	—	—	—	—	—	16
Albumin	—	—	—	—	—	—	165	—
Cholesterol	—	—	—	3.0	—	—	—	—
Shrimp head extract	—	—	—	—	110	110	—	—
Water	200	213	186	210	113	102	47	148
Net weight	300	300	300	300	300	300	300	300

ในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุน้ำและรูปร่างเหมือนกัน ทุก ๆ 7 วันจะตรวจสอบคุณภาพน้ำทางเคมีสกายะและชีวภาพ

การให้อาหาร

ในการทดลองครั้งนี้ การให้อาหารลูกกุ้งจะเริ่มครั้งแรกเมื่อลูกกุ้งมีอายุหลังพักเป็นตัวแล้ว 48 ชั่วโมง หรือ 2 วัน ด้วยตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย ซาไลนา อายุ 24 ชั่วโมง ทั้งเช้าและเย็น จนลูกกุ้งมีอายุได้ 8 วัน จึงเริ่มเปลี่ยนการให้อาหารเป็น 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 การทดลองให้อาหารชนิดเดียวตลอด 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการเปลี่ยนชนิดของอาหารเลย อาหารที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ ตัวอ่อนอาร์ทีเมีย, อาหารสูตร FE, FES, Mp (c.o.) และ MpS (p.o.) การให้อาหารจะให้ห่างกันครั้งละ 3 ชั่วโมง หรือตลอด 24 ชั่วโมง ให้อาหาร 8 ครั้ง (ยกเว้นตัวอ่อนอาร์ทีเมีย จะให้เฉพาะตอนเช้าและเย็นเท่านั้น)

วิธีที่ 2 การทดลองให้อาหารผสมสูตรต่าง ๆ สลับกับการให้อาร์ทีเมีย การเลี้ยงแบบนี้จะให้อาหารผสมตามสูตรต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วตอนช่วงกลางวัน (12 ชั่วโมง) โดยเริ่มให้อาหารสำเร็จมื้อแรกตอน 08.00 น. จนถึง 17.00 น. ให้อาหารแต่ละมื้อห่างกัน 3 ชั่วโมง หรือ 4 ครั้งต่อวัน ส่วนตอนกลางคืนหลังจากทำความสะอาดแล้วจะเริ่มให้อาร์ทีเมียอายุ 48 ชั่วโมงแทน โดยใช้ความหนาแน่นตามที่กล่าวมาแล้วคือ 5 – 10 ตัว/1 ลบ.ซ.ม.

การทดลองให้อาหารทั้ง 2 วิธีนี้จะใช้เวลาเลี้ยงต่อจากกุ้งอายุ 8 วัน ต่อไปอีก 40 วัน

การทำความสะอาดและดูแลกุ้ง

ทุกการทดลองการทำความสะอาดจะเริ่มครั้งแรกหลังจากเลี้ยงลูกกุ้งได้ 6 วัน การทำความสะอาดทุกครั้งจะเริ่มหลังจากการให้อาหารครั้งสุดท้ายแล้วประมาณ 30 นาที

โดยใช้สายยางดูดเอาตะกอนและเศษอาหารในบ่อเลี้ยงออกด้วยวิธีกาลักน้ำ ปลายที่ปล่อยน้ำออกจะรองด้วยกระชอนตาถี่เหนือบ่อกรอง (Filtering System) เพื่อป้องกันการสูญเสียกุ้งลงบ่อกรอง และหลังจากทำความสะอาดบ่อเลี้ยงเรียบร้อยแล้วลูกกุ้งเหล่านี้จะถูกคัดกลับลงสู่บ่อเลี้ยงเดิม เมื่อดูดตะกอนออกเรียบร้อยแล้วจะเช็คชอบบ่อเลี้ยงให้สะอาดด้วยฟองน้ำ เพื่อกำจัดเปลือกไข่อาร์ทีเมียและเศษอาหารหรือไขมันที่เกาะออก

สำหรับบ่อกรองการทำความสะอาดส่วนใหญ่จะใช้กระชอนตาถี่ช้อนเอาเศษใบไม้ ใบหญ้า และตะไคร่น้ำ หรือ filamentous algae ออกเท่านั้น

<u>การวิเคราะห์คุณภาพอาหาร</u>

<u>การวิเคราะห์หาไขมัน</u>

นำตัวอย่างของอาหารผสมสูตรต่าง ๆ มาวิเคราะห์ปริมาณไขมันตามวิธีของ Bligh และ Dyer (1959) โดยใช้ตัวอย่างอาหารหนัก 10 กรัม ปั่นให้ละเอียดกับคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร และเมธานอล 40 มิลลิลิตร ในเครื่องปั่นไฟฟ้านาน 2 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร ปั่นต่อ 30 วินาที เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปั่นต่อไปอีก 30 วินาที จึงนำไปกรองโดย Bütchner funnel ผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1, Coors No. 3) ใส่สารละลายที่กรองได้ในภาชนะแก้ว ส่วนกากและกระดาษกรองนำไปปั่นกับคลอโรฟอร์มอีกครั้งตามวิธีข้างต้นทำการกรองอีกที ใส่สารละลายครั้งที่สองรวมกับสารละลายครั้งแรกทิ้งให้คลอโรฟอร์มระเหยไปจนหมด จึงทำการวัดหาปริมาณและน้ำหนักของไขมันที่ได้

<u>การวิเคราะห์หาโคเลสเตอรอล</u>

วัสดุดิบที่จะนำมาประกอบอาหารสูตรส่วนใหญ่ได้แก่ มันกุ้งอบ, น้ำมันข้าวโพด, น้ำมันตับปลา, น้ำมันปาล์ม เป็นต้น รวมทั้งอาหารผสมปลากับไข่เป็ด, ปลากับไข่เป็ดเติมโคเลสเตอรอล และปลากับไข่เป็ดเติมมันกุ้ง จะถูกนำมาหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธีของ Parekh และ Jung (1970) ดังนี้

1. การเตรียม stock reagent

Ferric acetate - Uranium acetate reagent

เติม NH_4OH เข้มข้น 3 มิลลิลิตร ลงในภาชนะใส่ 0.5 กรัม $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ จะเกิดตะกอน $Fe(OH)_3$ นำตะกอนที่ได้ล้างน้ำแล้วละลายใน Glacial acetic acid เติม Ferric acetate 1000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม Uranium acetate 0.1 กรัม เขย่าอย่างแรง ปิดจุกขวด ทิ้งไว้ 1 คืน จึงนำมาใช้ได้

Ferric acid - Ferrous sulfate reagent

เติม Ferrous sulfate (anhydrous) 0.1 กรัม ลงใน flask ที่บรรจุ Glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นเติม Sulfuric acid เข้มข้น 100 มิลลิลิตร ลงใน flask ทันที ปล่อยให้อุณหภูมิสารละลายลดลงจนเท่าอุณหภูมิห้องจึงเติม Sulfuric acid เข้มข้นอีก 1000 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วย paraffin เก็บไว้ใช้

2. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลกับความเข้มของแสง

ละลายสารโคเลสเตอรอล ($C_{27}H_{46}O$ = 386.66) ในคลอโรฟอร์มด้วยอัตราส่วน 2 กรัม: 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ระเหยคลอโรฟอร์มออกจนเหลือประมาณ 1 หยด เติม Ferric acetate - Uranium acetate reagent ลงไป 10 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดให้แน่น เขย่าอย่างแรงจนสารละลายเข้ากันดี ทำ serial dilution ให้ได้โคเลสเตอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่สารละลายนี้ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วอีกหลอดหนึ่ง เติม Ferric acid-Ferrous sulfate reagent 2 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดให้แน่น เขย่าให้เข้ากันดีสารละลายจะเกิดสีม่วงอ่อนและม่วงแก่ตามความเข้มข้นของโคเลสเตอรอล หลอดควบคุม ใส่ Ferric

acetate - Uranium acetate 3 มิลลิลิตร กับ Ferric acid - Ferrous sulfate reagent 2 มิลลิลิตร ปิดจุกหลอดให้แน่นเขย่าให้เข้ากันดีจะได้สารละลายเป็นสีขาวใส นำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความเข้มแสง (Optical Density หรือ O.D.) 560 มิลลิไมครอน แล้วทำการเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลเป็นมิลลิกรัมกับความเข้มแสง (O.D.)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอลในส่วนประกอบของอาหาร

นำตัวอย่างของวัสดุดิบ ได้แก่ มันกุ้งอบ, น้ำมันข้าวโพด, น้ำมันตับปลา, น้ำมันปาล์ม เป็นต้น รวมทั้งอาหารผสมปลากับไข่เป็ด, ปลากับไข่เป็ดเติมโคเลสเตอรอล ปลากับไข่เป็ดเติมมันกุ้ง มาสกัดเอาไขมันตามวิธีการของ Bligh และ Dyer (1959) ที่ได้อธิบายไว้แล้วในการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน และไขมันที่ได้นี้นำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล โดยวิธีของ Parekh และ Jung (1970) เช่นเดียวกับข้อ 2 โดยวิธีเทียบค่า O.D. กับกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นโคเลสเตอรอลกับความเข้มแสง จะได้ปริมาณโคเลสเตอรอลในวัสดุดิบและอาหารผสมออกมาเป็นมิลลิกรัม

การวิเคราะห์หาโปรตีน

ตัวอย่างอาหารสูตรต่าง ๆ จะถูกส่งไปวิเคราะห์หาโปรตีนที่ห้องวิเคราะห์คุณภาพอาหารของกองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ตามวิธีการของ Horwitz, et al.,(1970)

การหาความชื้น

ใช้ตัวอย่างอาหารหนัก 5 กรัม อบที่อุณหภูมิ 60°ซ. จนแห้งสนิทดี โดยนำไปชั่งน้ำหนักทดสอบให้น้ำหนักอาหารคงที่จึงทำการเก็บข้อมูล

การหาเถ้า

ใช้ตัวอย่างอาหารหนัก 2 กรัม อบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °ซ. ในเวลา 4 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นใน Desiccator ภายใต้ภาวะสูญญากาศ

การตรวจสอบคุณภาพของน้ำ

ในการทดลองครั้งนี้คุณภาพของน้ำทั้งเคมีสภายะและชีวภาพจะถูกตรวจสอบทุก ๆ 15 วัน การตรวจสอบทางเคมีได้แก่ ส่วนประกอบของไนโตรเจน (เช่น NH_3-N, NO_2 - N และ NO_3 - N) ฟอสเฟต (PO_4 - P)และปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ การศึกษานี้ใช้วิธีการตรวจสอบตามหนังสือ Standard Methods ของ Taras et al., (1971)

การตรวจสอบทางสภายะได้แก่ อุณหภูมิและความเค็ม ตรวจสอบทุกวันด้วยเทอร์โมมิเตอร์ และ Reflective salinometer ตามลำดับ

การตรวจสอบทางชีวภาพใช้ Phytoplankton net ขนาดตา 20 ไมครอน กรองน้ำจากบ่อเลี้ยงตัวอ่อนแล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์ เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณโดยประมาณของสิ่งมีชีวิตที่พบในบ่อเลี้ยงต่อ 7 วัน

การเก็บข้อมูล

การสุ่มตัวอย่างลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ จะทำทุกสัปดาห์ โดยสุ่มตัวอย่างลูกกุ้งครั้งละ 60 ตัว/อาหาร 1 ชนิด หรือ 20 ตัว/บ่อเลี้ยง 1 บ่อ เพื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทัศน์หาขั้นตอนของการเจริญเติบโต (stages of development) ตามวิธีการของ Ling (1969) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองกุ้งที่ค่ำทุกตัวจะถูกนับเพื่อหาอัตรารอดและสัดส่วนของกุ้งที่ไม่ค่ำ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลขั้นตอนการเจริญและเปอร์เซนต์การรอดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ หลังจากวิเคราะห์ด้วยสถิติธรรมดาแล้วจะถูกทดสอบด้วย Analysis of Variance

และ Analysis of Covariance เพื่อหานัยสำคัญของข้อมูล และวิธี Pair-wise Test เพื่อหาความแตกต่างและนัยสำคัญของข้อมูลแต่ละคู่ โดยวิธีการของ Snedecor และ Cochran (1967) และ Yamane (1973)

ส่วนการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 สิ่ง และการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนของการเจริญเติบโต ใช้วิธี Correlation and Regression รายละเอียดจะอธิบายในภาคผนวก