บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานทดลอง

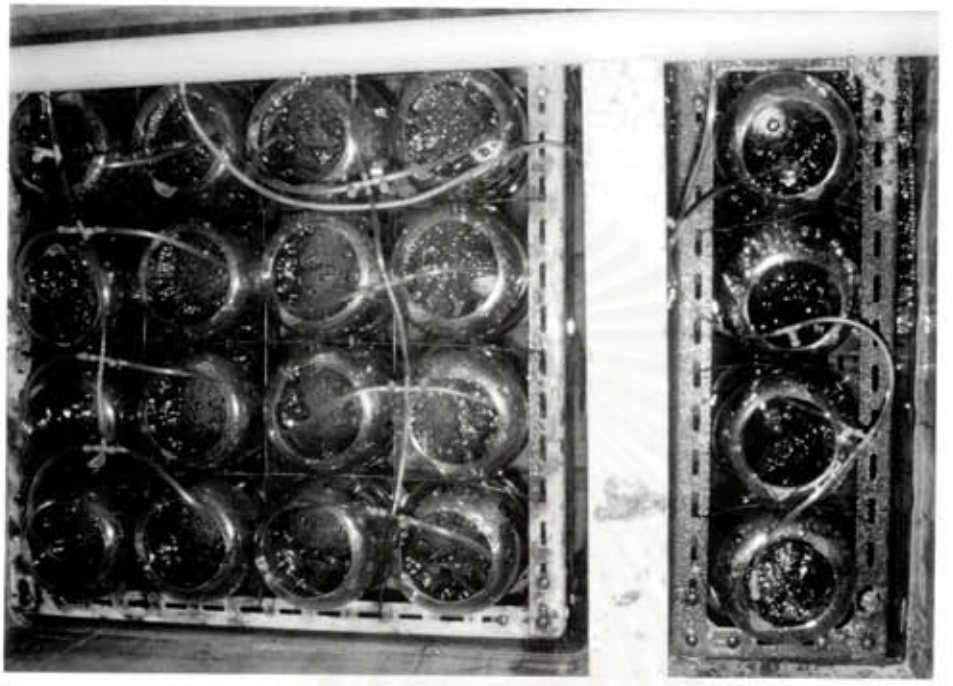
สถานที่ที่ดำเนินการทดลอง ได้แก่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมบ่อเลี้ยงและน้ำทะเล

1. <u>การเตรียมบ่อควบคุมอุณหภูมิและบ่อทดลอง</u> ใช้บ่อทดลองขนาดความจุ 4 ลิตร จำนวน 36 ชุด โดยก่อนการทดลองล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนหรือฟอร์มาลีน แล้วจึงล้างทำความสะอาดอีกครั้ง

นำบ่อทดลองมาบรรจุในบ่อควบคุมอุณหภูมิซึ่งเป็นบ่อคอนกรีต กว้าง 0.80 เมตร ยาว 0.80 เมตร และ สูง 0.75 เมตร ภายในจัดทำโครงเหล็กสำหรับวางบ่อทดลอง สูงจากพื้นบ่อ 0.60 เมตร บรรจุน้ำภายในบ่อคอนกรีตให้มีปริมาตรน้ำในบ่อคอนกรีตสูงเท่ากับน้ำในบ่อทดลอง ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ประมาณ 28 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องให้ความร้อน (heater) และให้อากาศในบ่อคอนกรีตตลอดเวลา เพื่อให้น้ำหมุนเวียน ดังรูปที่ 5

2. <u>น้ำทะเล</u> ใช้น้ำเกลือความเค็มสูงประมาณ 50 - 80 ppt เจือจางด้วยน้ำประปาให้ได้ระดับความเค็ม 30 ppt อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 25 - 28 องศาเซลเซียส ทำการฆ่าเชื้อด้วย calcium hypochloride ($Ca(OCl)_2$) ที่ความเข้มข้น 20 ppm ให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งน้ำทะเลที่เตรียมไว้เป็นเวลา 3 - 5 วัน เพื่อให้สิ่งแขวนลอยต่าง ๆ ในน้ำทะเลตกตะกอนก่อนแล้วจึงนำมาใช้ในการทดลอง



รูปที่ 5. บ่อควบคุมอุณหภูมิและบ่อทดลองสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified diet) มีลักษณะเป็น particulate ดัดแปลงจากสูตรของ Kanazawa และ คณะ (1985) ใช้ carrageenan เป็นสารเหนียว (binder) อาหารทดลองมีทั้งหมด 12 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีระดับโปรตีนอยู่ในช่วง 50 - 55 เปอร์เซนต์ การทดลองออกแบบเป็น factorial design (4x3) เปลี่ยนแปลงระดับเลซิทิน 4 ระดับที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์ของอาหาร และระดับคอเลสเทอรอล 3 ระดับที่ 0, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซนต์ของอาหาร ส่วนประกอบอาหารแสดงดังตารางที่ 2 สัดส่วนของเลซิทินและคอเลสเทอรอล แสดงดังตารางที่ 3. ทำการสกัดเลซิทิน (ฟอสโฟลิปิด) ออกจากน้ำมันปลาก่อนผสมน้ำมันปลาลงในส่วนประกอบอื่นโดยวิธี degumming (Bimbo, 1990) ทำให้อาหารแห้งโดยใช้ขบวนการ freeze dryer (Heto model FD3) อาหารที่ได้นำมาคัดออกเป็น 3 ขนาด ดังนี้ 1) อาหารสำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ zoea มีขนาดของ

เม็ดอาหารเล็กกว่าหรือเท่ากับ 60 μm 2) อาหารสำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ mysis มีขนาดของเม็ดอาหาร 60 - 125 μm และ 3) อาหารสำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ postlarva มีขนาดของเม็ดอาหารใหญ่กว่า 125 μm (Kanazawa และ คณะ, 1985) เก็บอาหารไว้ในภาชนะปิดสนิทภายใต้กาซไนโตรเจนและแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ขั้นตอนการทำอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

เตรียมอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน โดยผสมส่วนประกอบอาหารตามสัดส่วนในตารางที่ 1. ใส่ส่วนประกอบที่ใช้มีขนาดอนุภาค < 20 μm ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำมันปลาที่สกัดฟอสโฟลิปิดออกลงในส่วนประกอบอาหารผสมให้เข้ากันประมาณ 15 นาที เติมน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นบน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนผสมทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 40 องศาเซลเซียส เติมแร่ธาตุรวม (mineral mixture) และไวตามินรวม (vitamin mixture) ที่ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรลงไปในอาหาร นำส่วนประกอบทั้งหมดที่ได้มาผสมในเครื่องผสมอาหาร (mixer) ประมาณ 5 นาที นำส่วนประกอบอาหารทั้งหมดเทลงสู่ถาดตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องจนเย็นตัดอาหารในถาดให้เป็นชิ้นเล็กประมาณ 2 X 2 เซนติเมตร ทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer (Heto, model FD3) ประมาณ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -48 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารแห้งสนิทแล้วนำอาหารมาแยกขนาดออกเป็น 3 ขนาด ตามวิธีของ Kanazawa และ คณะ (1985) อาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้มีลักษณะเป็น particulated diet เก็บไว้ในถุงปิดสนิทภายใต้บรรยากาศกาซไนโตรเจน เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำออกมาใช้และวิเคราะห์คุณภาพอาหาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2. ส่วนประกอบของอาหารทดลอง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม / 100 กรัม ของอาหาร)
เคซีน	55.0
เดกซ์ทริน	15.5
น้ำมันปลา	8.0
แร่ธาตุรวม[1]	8.0
ไวตามินรวม[2]	4.0
เลซิทิน[3]	0-1.5
คอเลสเทอรอล[4]	0-1.0
ไวตามินซี[5]	0.08
แอสตาแซนทีน[6]	0.025
คาร์ราจีแนน	5.0
อัลฟา-เซลลูโลส	เติมให้ครบ 100 กรัม
รวม	100

[1] ในแร่ธาตุรวม 100 กรัม ประกอบด้วย : K_2HPO_4, 2.0 กรัม; $Ca_3(PO_4)_2$, 2.720 กรัม; $MgSO_4.7H_2O$, 3.041 กรัม; $NaH_2PO_4.2H_2O$, 0.790 กรัม

[2] ในไวตามิน 100 กรัม ประกอบด้วย : p-Aminobenzoic acid, 10.0 มก.; Biotin, 0.40 มก.; Inositol, 400.0 มก.; Nicotinic acid, 40.0 มก.; Ca-Pantothenate, 60.0 มก.; Pyridoxine-HCl, 12.0 มก.; Riboflavin, 8.0 มก.; Thiamine-HCl, 4.0 มก.; Menadione, 4.0 มก.; α-Tocopherol, 20.0 มก.; Cyanocobalamine, 0.08 มก.; Calciferol, 1.20 มก.; Folic acid, 0.80 มก.; Choline chloride, 120.0 มก.

[3] Feed grade

[4] 95% Cholesterol, Laboratory grade ผลิตภัณฑ์ของ บริษัท Sigma จำกัด

[5] STAY C-25® 25% active vitamin c ผลิตภัณฑ์ของ บริษัท Roche จำกัด

[6] CHLOROPHYLL PINK® 8% active astaxanthin ผลิตภัณฑ์ของ บริษัท Roche จำกัด

ตารางที่ 3. รายละเอียดการเปลี่ยนแปลงระดับเลซิทินและคอเลสเทอรอลในอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ (เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก)	
	คอเลสเทอรอล	เลซิทิน
1	0	0
2	0	0.5
3	0	1.0
4	0	1.5
5	0.5	0
6	0.5	0.5
7	0.5	1.0
8	0.5	1.5
9	1.0	0
10	1.0	0.5
11	1.0	1.0
12	1.0	1.5

สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

การทดลองวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ที่มี 4 x 3 Factorials ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จัดชุดการทดลองและซ้ำโดยการสุ่ม เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

สัตว์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่กุ้งกุลาดำวัยอ่อนจากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี ทำการทดลอง 3 ระยะ ตามระยะพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน คือ ระยะ zoea, mysis และ postlarva ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. <u>ระยะ zoea</u> ใช้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ zoea 1 เลี้ยงจนถึงระยะ mysis 1 ก่อนการทดลองนำกุ้งมาในระยะ nauplius 5 - 6 มาอนุบาลและปรับสภาพความพร้อมก่อนนำมา ทดลอง โดยเมื่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนพัฒนาการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะต่าง ๆ พร้อมแล้วจึงให้อาหารธรรมชาติควบคู่กับอาหารทดลอง จำนวน 1 ครั้ง โดยอาหารธรรมชาติที่ให้กุ้งในระยะนี้คือ สาหร่าย *Cheatoceros* sp. ทำการสุ่มกุ้งลงในบ่อทดลองโดยใช้ความหนาแน่น 300 ตัวต่อบ่อ

2. <u>ระยะ mysis</u> ใช้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ mysis 1 เลี้ยงจนถึงระยะ postlarva 1 ก่อนการทดลองนำกุ้งระยะ zoea 3 มาอนุบาลและปรับสภาพความพร้อมก่อนนำมาทดลอง เมื่อกุ้งพัฒนาการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะต่าง ๆ แล้วจึงให้อาหารธรรมชาติคือ artemia ที่ผ่านการแช่น้ำร้อน ควบคู่กับอาหารทดลอง จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นทำการสุ่มกุ้งลงในบ่อทดลอง โดยใช้ความหนาแน่น 90 ตัวต่อบ่อ

3. <u>ระยะ postlarva</u> ใช้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ postlarva 1 เลี้ยงจนถึงระยะ postlarva 15 โดยนำกุ้งระยะ mysis 3 มาอนุบาลและปรับสภาพความพร้อมก่อนนำมาทดลอง เมื่อกุ้งพัฒนาการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะต่าง ๆ พร้อมแล้วจึงให้อาหารธรรมชาติคือ artemia ควบคู่กับอาหารทดลอง จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นทำการสุ่มกุ้งลงในบ่อทดลองใช้ความหนาแน่น 30 ตัวต่อบ่อ

ให้อาหารกุ้ง 4 ครั้งต่อวัน (เวลา 08.00, 12.00, 16.00 และ 19.00 น.) โดยมีปริมาณตามความต้องการของกุ้ง ทำความสะอาดบ่อทดลองและเปลี่ยนน้ำในถังทดลองประมาณ 50 เปอร์เซนต์ วันเว้นวัน

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. <u>การทดลองระยะ zoea</u> ตรวจสอบอัตรารอดในการอนุบาลกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ภายหลังจากที่มีการพัฒนาความสมบูรณ์ในการเจริญเติบโตในแต่ละระยะ บันทึกอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน โดยดูจากความสมบูรณ์ของการพัฒนาในแต่ละระยะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus model CHS) และกล้องสเตริโอ (Mitutoyo, Profile projector model PJ250)

2. <u>การทดลองระยะ mysis</u> ตรวจสอบอัตราการรอดและบันทึกอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน โดยวิธีเช่นเดียวกับการทดลองระยะ zoea

3. <u>การทดลองระยะ postlarva</u> ตรวจสอบอัตราการรอดโดยวิธีเดียวกับการทดลองระยะ zoea และบันทึกความยาวของกุ้งโดยสุ่มจากบ่อทดลองบ่อละ 10 ตัว เมื่อเริ่มการทดลอง และบันทึกความยาวของกุ้งทุกตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยใช้กล้องสเตริโอ

นำกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ post larva 15 ในการทดลองที่ 3 มาทดสอบสภาวะเครียด โดยเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มของน้ำจากความเค็ม 30 ppt เป็นความเค็ม 2 ppt ทันทีสังเกตและบันทึกอัตราการตายทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4. ตรวจสอบคุณภาพของน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

- ความเค็ม ตรวจสอบโดย reflectometer (ppt)
- อุณหภูมิ ตรวจสอบโดย เทอร์โมมิเตอร์ (°C)
- ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ตรวจสอบโดย YSI model 57 (ppm, mg/l)
- pH ตรวจสอบโดย pH meter
- แอมโมเนีย (ammonia, NH_3-N) และไนเตรท (nitrate, NO_3-N) ตรวจสอบโดยวิธีของ Strickland และ Parsons (1977)

ทำการทดสอบคุณภาพน้ำในการทดลองระยะ zoea และ mysis ระยะละ 1 ครั้ง ในวันที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำช่วงปลายการทดลอง สำหรับการทดลองระยะ postlarva ทำการทดสอบคุณภาพน้ำ 2 ครั้ง ในวันที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำช่วงกลางและปลายการทดลอง

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. ในการทดลองระยะ zoea และ mysis วิเคราะห์ผลของปริมาณเลซิทินและคอเลสเทอรอลในอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของกุ้งโดยวิธีวัดดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) (Kanazawa และ คณะ, 1985) และทำการวิเคราะห์อัตรารอด ส่วนการทดลองระยะ postlarva วิเคราะห์ผลของปริมาณเลซิทินและคอเลสเทอรอลในอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของกุ้งโดยวิธีวัดความยาวของกุ้งที่เพิ่มขึ้นและวิเคราะห์อัตรารอด การประเมินผลทางสถิติใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ Statistic Analysis System (SAS, 1985) โดยวิธีวิเคราะห์ Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ดัชนีการเจริญเติบโต (Kanazawa และ คณะ, 1985) เป็นผลรวมของการพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งวัยอ่อนทุกระยะ โดยกำหนดค่าให้กับระยะการพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งดังนี้ zoea1 = 1, zoea2 = 2, zoea3 = 3, mysis1 = 4, mysis2 = 5, mysis3 = 6 และ postlarva1 = 7

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโต} = \sum\left(\frac{SnNn}{T}\right)$$

Sn = การพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งระยะ n

Nn = จำนวนกุ้งในการพัฒนาการเจริญเติบโตระยะ n

T = จำนวนกุ้งทั้งหมด

2. วิเคราะห์อาหารกุ้งสูตรต่าง ๆ โดยวิธี proximate analysis (AOAC, 1980) วิเคราะห์ปริมาณเลซิทินโดยวิธี phosphorus assay (Barlett, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณของคอเลสเทอรอล โดยวิธี gas chromatography (Artemia Reference Center) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก

วิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอลโดยใช้วิธี gas chromatography ใช้สภาพเครื่องดังนี้

- เครื่อง gas chromatography : Fison instruments HRGC MEGA 2 Series
- คอลัมน์ : DBWAX1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร
- อุณหภูมิคอลัมน์ : เริ่มที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 205 องศาเซลเซียส นาน 11 นาที
- Carrier gas : ไนโตรเจน (Nitrogen) อัตราการไหลผ่านที่ 1.6 มล./นาที
- Make up gas : ไนโตรเจน อัตราการไหลผ่านที่ 24 มล./นาที
- ไฮโดรเจน (Hydrogen) อัตราการไหลผ่านที่ 32 มล./นาที
- อากาศ (Air) อัตราการไหลผ่านที่ 230 มล./นาที
- Detector : FID (Flame ionic detector) อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ Injector : 250 องศาเซลเซียส

3. วิเคราะห์ผลของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่มีผลต่อสภาวะทนเครียดของกุ้งในระยะ postlarva โดยเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงจาก 30 ppt เป็น 2 ppt บันทึกอัตรารอดในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (ระยะ postlarva 15) เปรียบเทียบระยะเวลาการตายสะสม 50 เปอร์เซนต์ โดยวิธี probit analysis โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS-PC และเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารสูตรต่าง ๆ โดยวิธีวิเคราะห์ Analysis of Variance โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistic Analysis System (SAS, 1985) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์