บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

การศึกษาระดับและแหล่งของไขมันที่เหมาะสมในอาหารหอยเป๋าฮื้อ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการทดลองเบื้องต้น โดยทำการทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis ovina* ด้วยอาหารที่มีระดับของไขมัน และแหล่งของไขมันต่างกัน 6 ชนิด การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ที่มี 7 treatment แต่ละ treatment มี 2 ซ้ำ โดย treatment ที่ 7 ใช้สาหร่าย *Enteromorpha intestinalis* เป็นสูตรควบคุม ทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ 2 ชนิด คือ *H. ovina* และ *H. varia* การทดลองมี 7 treatment เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ treatment ที่ 7 ใช้สาหร่าย *Gracilaria fisheri* แทน *E. intestinalis* ทำการทดลองเป็นเวลา 90 วัน

2. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หอยเป๋าฮื้อ 2 ชนิด คือ *H. ovina* และ *H. varia* หอยทั้ง 2 ชนิด จะเป็นหอยจากธรรมชาติซึ่งมีถิ่นที่อยู่ต่างกัน โดยทำการเก็บตัวอย่าง *H. ovina* จากเกาะค้างคาว เกาะครก และเกาะไผ่ จังหวัดชลบุรี และ *H. varia* เก็บตัวอย่างจากบริเวณเกาะแอล จังหวัดภูเก็ต โดยวิธีการดำน้ำ สำหรับการทดลองที่ 1 ใช้หอยเป๋าฮื้อ *H. ovina* ความยาวเปลือกเฉลี่ย 33.0±0.14 มิลลิเมตรและความกว้างเฉลี่ย 25.5±0.10 มิลลิเมตร สำหรับการทดลองที่ 2 ใช้หอยเป๋าฮื้อ *H. ovina* และ *H. varia* โดย หอยเป๋าฮื้อ *H. ovina* มีความยาวเปลือกระหว่าง 19.6-46.2 มิลลิเมตร และความกว้างเปลือกระหว่าง 16.6-29.3 มิลลิเมตร และ *H. varia* มีความยาวเปลือกระหว่าง 21.8-45.1 มิลลิเมตรและความกว้างเปลือกระหว่าง 13.9-31.1 มิลลิเมตร หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ในการทดลองจะทำการติดเบอร์ที่เปลือกเพื่อใช้ในการเก็บข้อมูลรายตัว และก่อนที่จะใช้ในการทดลองจะทำการเลี้ยงหอยในถังรวมและให้สาหร่าย *G. salicornia* เป็นอาหารในระยะแรก และค่อย ๆ ลดปริมาณสาหร่ายที่ให้ลงและเพิ่มปริมาณอาหารเม็ดสูตรที่ 3 (น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปลาผสมกัน

ปริมาณ 2.5 เปอร์เซนต์) ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการปรับสภาพการกินเพื่อให้หอยสามารถยอมรับอาหารเม็ดได้ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3. ระบบเลี้ยงหอยในการทดลอง

ระบบที่ใช้ประกอบด้วยบ่อขนาด 1x1.2x0.8 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 บ่อเชื่อมถึงกันด้วยท่อพีวีซี ถังกรอง ถังพักน้ำและหน่วยทดลอง ซึ่งเป็นถังสีดำมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางด้านบน 32 เซนติเมตรและด้านล่าง 28 เซนติเมตร ด้านข้างถังจะเจาะรูและต่อท่อพีวีซีให้น้ำไหลออกและมีแผ่นพีวีซีโค้งขนาดกว้าง 4 นิ้ว 2 อันเป็นที่กำบังแสงให้หอยในแต่ละหน่วยทดลอง (รูปที่4)

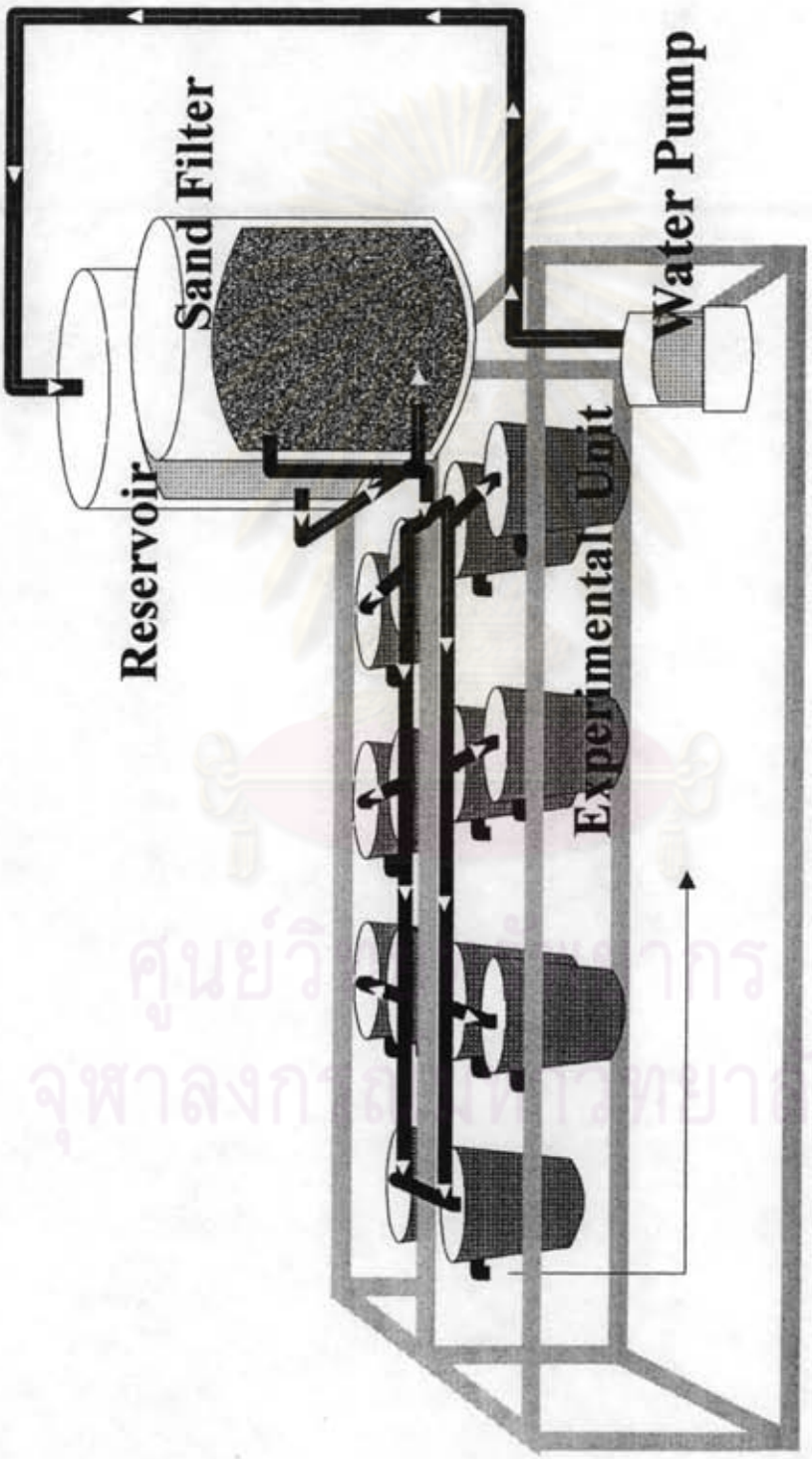
ระบบน้ำเป็นแบบปิด (รูปที่ 5) โดยมีการไหลเวียนของน้ำเริ่มจากน้ำจากถังพักน้ำจะไหลเข้าสู่ถังกรอง และต่อเข้ากับหน่วยทดลองด้วยท่อพีวีซี แล้วน้ำจะล้นออกทางด้านข้างลงสู่พื้นบ่อด้านล่างและเครื่องสูบน้ำจะทำการสูบน้ำไปยังถังพักน้ำ และเข้าสู่ถังกรองเพื่อไปยังหน่วยทดลองต่อไป

4. อาหารและการเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้ในทุกการทดลอง จะประกอบด้วยอาหารสำเร็จรูป 6 สูตร และสาหร่าย 1 ชนิด อาหารสำเร็จรูปที่ใช้ 6 สูตรประกอบด้วยแหล่งของไขมันต่างกัน 3 แหล่ง คือ น้ำมันปลา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปลาในอัตราส่วน 3: 2 โดยใช้ dextrin เป็นตัวปรับสูตรอาหาร รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 5 การเตรียมอาหารใช้ในการทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Ogino และ Ohata (1963); Ogino และ Kato (1964) และ Uki และ Watanabe (1985) โดย นำส่วนผสมยกเว้นน้ำมัน ผสมเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำประมาณ 2 ใน 3 ของปริมาณอาหาร นวดให้เข้ากันและเติมน้ำมันลงไปตามสูตร นวดให้เข้ากันแล้วบดให้เป็นแผ่นบนแผ่นพลาสติกให้หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วตัดเป็นแผ่นเล็กๆขนาดประมาณ 2 ตารางเซนติเมตร นำอาหารเม็ดที่ได้ไปจุ่มในสารละลาย 5 เปอร์เซนต์ (w/v) แคลเซี่ยมคลอไรด์ประมาณ 1 นาทีแล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงโปร่งก่อนนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วใส่ในถุงพลาสติกปิดแน่น และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้ต่อไป (รูปที่ 6)

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองที่ 1 เป็นสาหร่ายสีเขียว *E. intestinalis* (รูปที่ 7) ซึ่งมีทัลลัสเป็นหลอดกลวง หงิกงอ และย่นเหมือนไส้ไก่ (Lewmanomont และ Ogawa, 1995) สูงประมาณ 12 เซนติเมตร ได้จากการเพาะเลี้ยงในบ่อทดลองโดยการปล่อยให้น้ำทะเลไหลผ่านในบ่อเป็นเวลาประมาณ 2 อาทิตย์ ทุก 1 อาทิตย์ทำการปิดน้ำ 1-2 ชั่วโมงแล้วเติมยูเรียลงไป สำหรับการทดลองที่ 2 ใช้สาหร่ายสีแดง *G. fisheri* ซึ่งมีทัลลัสเป็นพุ่มใหญ่ แตกแขนงมากและยาว สูงประมาณ 30 เซนติเมตร โดยนำมาจากจังหวัดสงขลา (รูปที่ 8)

รูปที่ 4 ถังที่ใช้ในการเลี้ยงหอยทดลอง



รูปที่ 5 ระบบที่ใช้เลี้ยงหอยทดลองและแผนผังการไหลเวียนของน้ำในระบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17046282

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของอาหาร 6 สูตรที่ใช้ในการทดลอง

ส่วนประกอบ (%)	สูตรอาหารที่					
	1	2	3	4	5	6
กากถั่วเหลือง*1	42.57	42.57	42.57	42.57	42.57	42.57
ปลาหมึกป่น*2	16.43	16.43	16.43	16.43	16.43	16.43
เดกซ์ทริน	7.5	7.5	7.5	5.0	5.0	5.0
เซลลูโลส	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
แร่ธาตุ*3	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
วิตามิน*4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
โคลีน คลอไรด์	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
โซเดียม อัลจิเนต	20	20	20	20	20	20
น้ำมันถั่วเหลือง	2.5	-	-	5.0	-	-
น้ำมันปลา	-	2.5	-	-	5.0	-
น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปลา	-	-	2.5	-	-	5.0

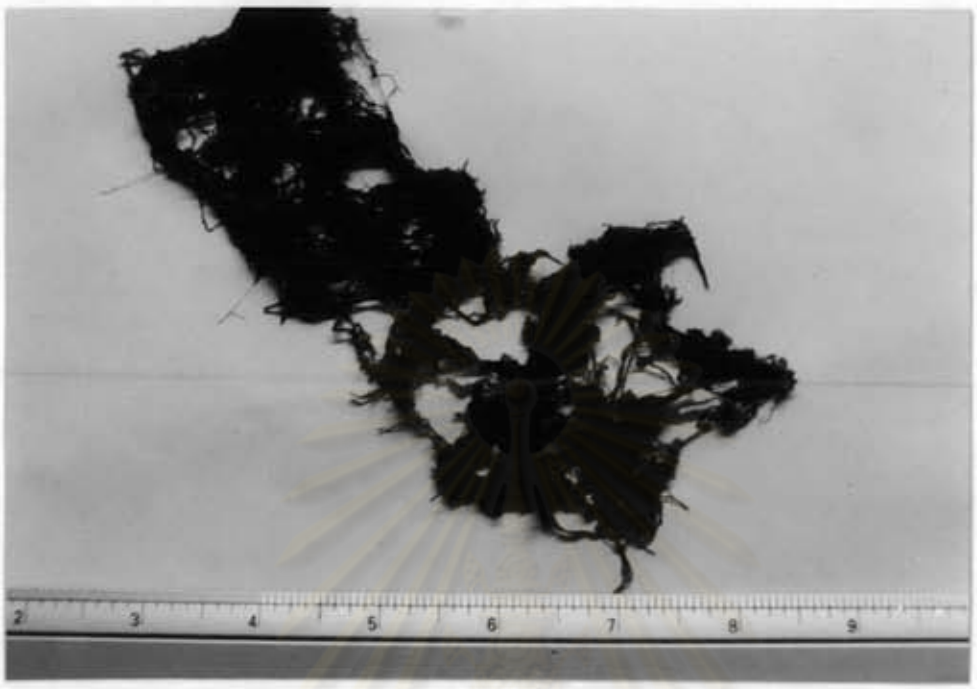
หมายเหตุ น้ำมันจะผสม วิตามิน อี 1 เปอร์เซนต์

*1 และ *2 ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณอุชุกร พฤกษ์พงศ์รัตน์ ระดับโปรตีนของกากถั่วเหลืองและปลาหมึกป่น เท่ากับ 43.07 และ 66.535 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

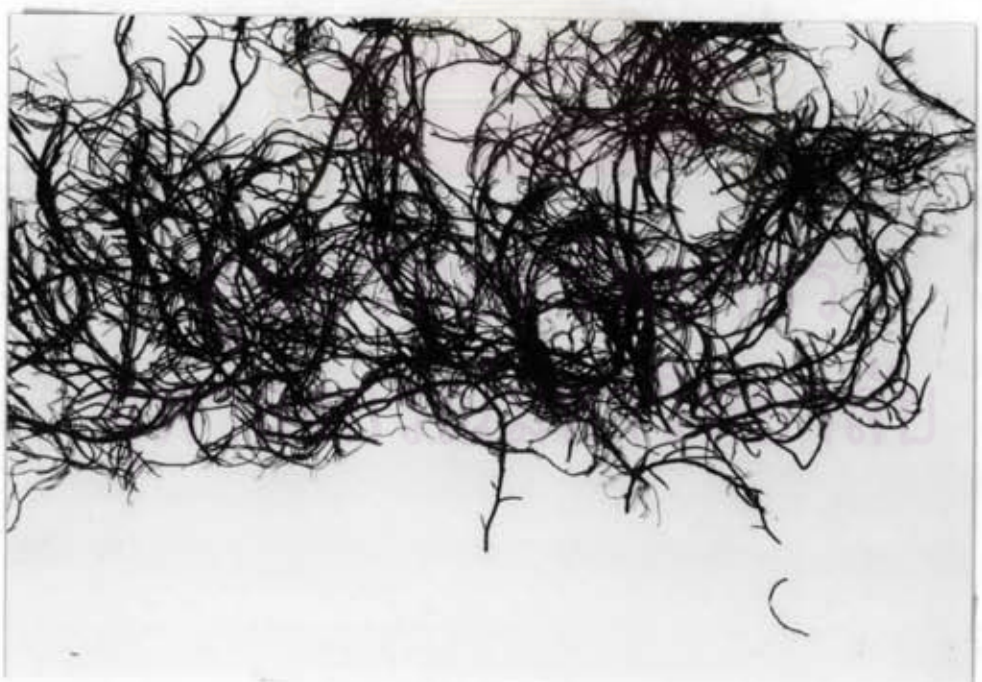
*3 และ *4 ส่วนประกอบเหมือนกับ Hahn (1989)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แผนผังการเตรียมอาหารที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 7 สาหร่าย *Enteromorpha intestinalis* ที่ใช้ในการทดลองที่ 1 (ที่มา: คุณมณฑล แก่นมณี)



รูปที่ 8 สาหร่าย *Gracilaria fisheri* ที่ใช้ในการทดลองที่ 2

5. การดำเนินการทดลอง

อาหารที่ใช้ทั้ง 2 การทดลองเป็นสูตรอาหารเดียวกัน การให้อาหารจะให้ในตอนเย็นเพียงครั้งเดียว โดยให้ในปริมาณ 10 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักตัว ส่วนสาหร่ายจะให้มากเกินพอ ในตอนเช้าจะทำการเก็บอาหารที่เหลือจากการกินและของเสีย ทุก 1 สัปดาห์จะเติมน้ำในระบบเพื่อให้ปริมาณคงที่ การเปลี่ยนน้ำทั้งหมดจะทำเดือนละ 1 ครั้งเพื่อทำความสะอาดก้นบ่อซึ่งจะมีโคพีพอดบางชนิด และขัดคราบสาหร่ายที่ขึ้นในถังเลี้ยงหอยออก และควบคุมความเค็มให้มากกว่า 28 ppt. โดยการใส่เกลือ ตรวจสอบคุณภาพน้ำทุก 1 สัปดาห์ เก็บข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ อุณหภูมิ ความเค็ม แอมโมเนีย ไนเตรท และไนไตรท์ เมื่อการทดลองสิ้นสุดในแต่ละเดือนนำหอยเป๋าฮื้อ มาทำการชั่งวัดการเติบโตโดยวัดความยาวเปลือก ความกว้างเปลือก ด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ และชั่งน้ำหนักของหอยเป๋าฮื้อที่ผ่านการซับน้ำออกด้วยกระดาษชำระ 2 ครั้งด้วยเครื่องชั่งที่มีจุดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (รุ่น IBOR EB - D) และทำการบันทึกจำนวนตัวที่เหลือ

6. การวิเคราะห์อาหาร

6.1 Proximate analysis อาหารทั้ง 7 ชนิดจะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาเปอร์เซนต์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก)

6.2 องค์ประกอบของกรดไขมันในอาหาร นำตัวอย่างอาหารไปทำการสกัดไขมันและนำไขมันที่ได้ไปทำ Esterification แล้ววิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาหาร โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography ด้วยวิธี FAME ดัดแปลงจากวิธีของ Artemia Reference Center (Sorgeloos, 1993)

6.2.1 การสกัดไขมัน นำตัวอย่างอาหารแห้งน้ำหนักประมาณ 10 กรัม (สำหรับสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด นำไประเหยแห้งโดยผ่านเครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 1 คืน) มาบดละเอียด แล้วเติม ส่วนผสมของ Chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 คืน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 42 นำสารละลายไปทำการระเหยด้วยเครื่อง evaporator จนแห้ง ชั่งตัวอย่างไขมันที่ได้ แล้วนำไปทำ Esterification ต่อไป

6.2.2 การทำ Esterification นำไขมันน้ำหนักประมาณ 30-40 มิลลิกรัม ใส่ในขวด reaction vial เติม 5 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร ของ Acetyl choride ใน methanol (เตรียมโดยการนำ methanol ใส่ในบีกเกอร์ที่แช่ในน้ำแข็ง แล้วจึงค่อยๆเติม Acetyl choride ลงไป) และ Internal standard (C19:0 ความเข้มข้น 2000 ส่วนในล้านส่วน) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วปิดฝาขวด vial ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (O_2 Free) และนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม 6 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของ Sodium carbonate 3 มิลลิลิตร และ Hexane 3 มิลลิลิตร นำไป centrifuge ที่ 4000 รอบนาน 5 นาที แยกชั้น Hexane (อยู่ด้านบน มีสีเหลืองใส) ไปกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง) ด้วยกระดาษกรอง MN 615 นำไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน จนเหลือ 1 มิลลิลิตร เก็บเข้าตู้เย็นเพื่อรอการฉีดเข้าเครื่อง GC

6.2.3 สภาวะเครื่อง GC

เครื่องมือ: GC HRGC MEGA 2 SERIES (Fison instrument, Italy) ประกอบด้วยคอลัมน์ DB-WAX ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 25 ไมครอน (J & W Scientific, USA)

อุณหภูมิคอลัมน์: 180 °C 4 min --> 200 °C 40 min --> 205 °C 21 min

Detector: Flame Ionized Detector (อุณหภูมิ 300 °C 5 °C / min)

ปริมาตรที่ฉีด: 1 µl (อุณหภูมิ 180 °C)

การวิเคราะห์ Peak Intregration โดย Chrom card software version 2.1 (Fison instrument, Italy) (ภาคผนวก ข การคำนวณหาปริมาณกรดไขมัน)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 ข้อมูลการเติบโต ข้อมูลของน้ำหนักตัวของหอยเป้าฮื้อทั้งเปลือกที่วัดเป็นรายตัวจะนำมาประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR) โดยใช้สูตร

$$SGR\ (/day) = \frac{\ln(Wt_2)-\ln(Wt_1)}{t_2-t_1}$$

ln (Wt_1) เท่ากับ natural log ของน้ำหนักหอยเป้าฮื้อที่เวลา 1 (t_1) เป็นวัน และ ln (Wt_2) เท่ากับ natural log ของน้ำหนักหอยเป้าฮื้อที่เวลา 2 (t_2) เป็นวัน

7.2 จำนวนตัว ข้อมูลจำนวนตัวที่เหลือของหอยเป๋าฮื้อที่ทำการทดลองในแต่ละเดือน จะนำมาประมาณเปอร์เซนต์อัตรารอดโดยใช้สูตร

$$\text{อัตรารอด (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวของหอยเป๋าฮื้อที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนตัวเมื่อเริ่มการทดลอง}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of covariance) โดยใช้ค่าน้ำหนักของหอยเป๋าฮื้อแรกเริ่มเป็นตัวแปรร่วมและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Sigma Stat Program และ Systat (version 5.1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย