บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ใช้ในการทดลองได้มาจากโรงเพาะฟักบีพีฟาร์มบริเวณอำเภออ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ของแม่กุ้งที่วางไข่ในคราวเดียวกันทั้งหมด ทำการขนส่งมายังห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยวิธีบรรจุกุ้งในถุงพลาสติก 2 ชั้นอัดกาซออกซิเจน วางถุงบรรจุกุ้งในถังโฟมเพื่อป้องกันการกระเทือนและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 20-25 องศาเซลเซียส เมื่อขนส่งถึงห้องปฏิบัติการค่อยๆ ปรับอุณหภูมิของถุงกุ้งให้เข้ากับอุณหภูมิของน้ำในถุงให้เท่ากับบ่ออนุบาลขนาด 200 ลิตร โดยนำถุงแช่ในบ่อประมาณ 30 นาทีจึงปล่อยกุ้งลงในบ่อที่ความเค็ม 30 ppt

การเตรียมน้ำเค็มและขวดสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

น้ำในการเลี้ยงลูกกุ้งวัยอ่อนเป็นน้ำผสมระหว่างน้ำทะเลเข้มข้นและน้ำประปาให้ได้ระดับความเค็ม 30 ppt ทำการฆ่าเชื้อโรคด้วย calcium hypochloride ($Ca(OCl)_2$) ที่ความเข้มข้น 20 ppm หลังจากนั้นให้อากาศและทิ้งไว้ในที่มีแสงแดดเป็นเวลา 3-5 วันก่อนนำไปใช้จะกรองผ่านถุงผ้ากรองขนาด 1 ไมครอนเพื่อดักตะกอนและสิ่งแขวนลอยขนาดเล็กหรือพืชและสัตว์เล็กๆ ซึ่งอาจจะเข้ามาเติบโตในบ่อเลี้ยงลูกกุ้งและอาจเป็นอันตรายต่อลูกกุ้งได้

ขวดสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อนเป็นขวดแกลลอนขนาด 4 ลิตรจำนวน 30 ขวด เตรียมชั้นวางขวดและอุปกรณ์ต่างๆ เช่นสายอากาศ หัวทราย ก่อนทำการทดลองล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคด้วย Chlorox^R และล้างน้ำให้สะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำมาผึ่งแดดให้แห้งเพื่อป้องกันเชื้อรา แล้วจึงประกอบอุปกรณ์ต่างๆ ให้เข้าที่ เติมน้ำเค็ม 30 ppt ที่ผ่านการกรองลงในขวดที่เตรียมไว้ให้ได้ปริมาตรน้ำ 3 ลิตร

อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารกึ่งสังเคราะห์ (semi-purified diet) ที่ใช้carrageenan เป็นสารเชื่อม (binder) และทำด้วยกรรมวิธี Microparticulation โดยใช้วัตถุดิบอาหารดังตารางที่ 2 อาหารทดลองมีทั้งหมด 6 สูตรคืออาหาร 5 สูตรที่เติมวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ที่มีปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 200 ppm และอาหารควบคุม 1 สูตรที่ไม่เติมวิตามินซีซึ่งอาหารแต่ละสูตรมีโปรตีนประมาณ 52%

การทำอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

อาหารทดลองสำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนมีขั้นตอนการทำดังรูปที่ 3 เริ่มจากการบดวัตถุดิบอาหารทุกชนิดให้เป็นผงละเอียดขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนด้วยเครื่อง Ultracentrifugal mill (Retsch, ZM1) ผสมส่วนประกอบที่เป็นผงละเอียดทั้งหมดนี้ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร Moulinex blender เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมน้ำมันปลาทูน่าและเลซิทินจากถั่วเหลืองลงไปผสมต่อเป็นเวลา 10 นาที ขณะผสมค่อยๆ เติมน้ำจนครบ 300 มิลลิลิตร และเติมแร่ธาตุรวมที่ละลายในน้ำปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหารลงในบีกเกอร์และนำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสจนสารเชื่อม (carrageenan) ละลายหมด การผสมวิตามินรวมและ ซีไวตาเมอร์รูปแบบต่างๆ ในสูตรอาหารตามปริมาณที่ระบุไว้ในตารางที่ 3 กระทำภายหลังสารเชื่อมละลายหมดและอาหารมีอุณหภูมิลดลงจนถึง 60 องศาเซลเซียสแล้วโดยผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นเทอาหารลงในถาดอลูมิเนียมตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัวจึงนำมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปทำแห้งใน Freeze dryer (Heto model FD3) ให้เหลือความชื้นในอาหารประมาณ 7-8% โดยปิดอาหารในถาดด้วยแผ่น aluminium foil ที่กรีดเป็นรอยขาดหรือเจาะรูทั่วทั้งแผ่นเพื่อให้น้ำแข็งระเหิดออกได้สะดวก ถาดที่ใช้ในการทำแห้งแบบนี้จะต้องมีผิวเรียบ เพื่อให้การถ่ายเทความร้อนมีประสิทธิภาพ การทำแห้งอาหารด้วย Freeze dryer ตั้งอุณหภูมิต่ำสุดของการแช่เยือกแข็งเป็น -40 องศาเซลเซียสซึ่งจะใช้เวลาในขั้นตอนการอุ่นเครื่องแช่เยือกแข็งอาหารประมาณ 2 ถึง 2.5 ชั่วโมง อาหารจะมีอุณหภูมิเยือกแข็งอยู่ในช่วง -32 ถึง -38 องศาเซลเซียสก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการระเหิด โดยใช้เวลาในการทำแห้งประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงบดและร่อนอาหารด้วยเครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อน (Retsch,

Vibro type) ให้มีอนุภาค 3 ขนาดคือ ≤ 63, 63-125 และ 125-250 ไมครอน (Sutjaritvongsanon, 1984) เก็บในที่มืดอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพอาหารและเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมอาหาร basal diet

วัตถุดิบอาหาร	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่ออาหาร 100 กรัม)
เคซีน	20
ปลาป่น	45
กากถั่วเหลือง	9
แป้งสาลี	8
โคเลสเตอรอล	1
น้ำมันปลาทูน่า	6
เลซิทินจากถั่วเหลือง	3
แร่ธาตุรวม	1
สารเชื่อม (carrageenan)	5
วิตามินรวมซึ่งไม่มีส่วนผสมของวิตามินซี	1
ซีไวตาเมอร์ *	1

วิตามินรวมที่ใช้คือวิตามินรวมสำหรับกุ้ง จากบริษัท โรวิไทย จำกัด มีส่วนประกอบ คือ วิตามิน A, D, E, K, B_2, B_6, B_{12}, niacin, biotin, calcium, folic acid, choline, $FeSO_4$, $CuSO_4$, $MnSO_4$, KI, ZnO, $CoSO_4$, Selenium, $MgCO_3$, SiO_2, สารกันหืน และรำข้าว

แร่ธาตุรวมใน 100 กรัมประกอบด้วย K_2HPO_4 2.000 กรัม, $Ca_3(PO_4)_2$ 2.720 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 3.041 กรัม, $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.79 กรัม ผลิตภัณฑ์ของRovithai Co.Ltd.

เคซีนที่มีโปรตีน 95% ผลิตภัณฑ์ของ Fluka Chemicals Co.Ltd.

ปลาป่นที่ใช้เป็น Denish fishmeal

โคเลสเตอรอล 90% ผลิตภัณฑ์ของ Rovithai Co.Ltd.

กากถั่วเหลือง, แป้งสาลี, น้ำมันปลาทูน่า, เลซิทินจากถั่วเหลือง และสารเชื่อม (carrageenan) เป็น Feed grade

*ปริมาณซีไวตาเมอร์ระบุในตารางที่ 3 ซึ่งมีการใช้เซลลูโลสเติมเพื่อให้สูตรอาหารมีส่วนประกอบครบ 100 %

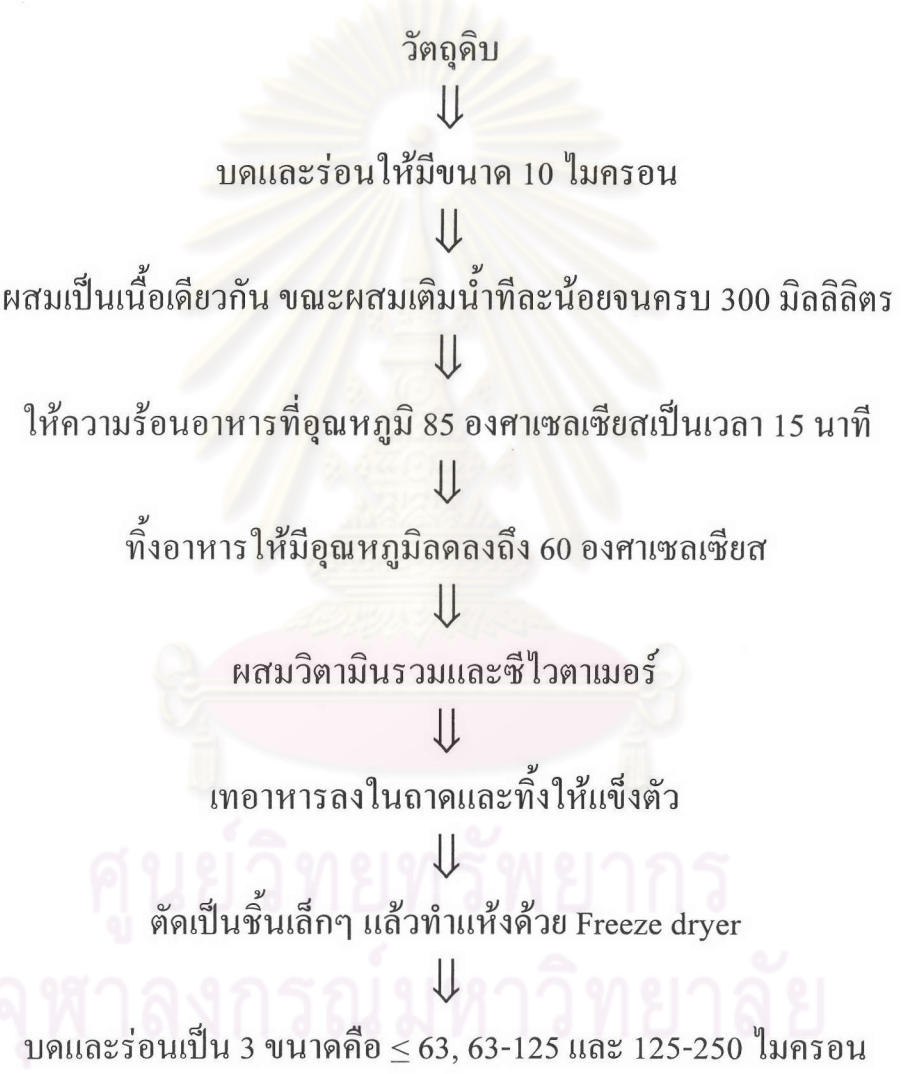
ตารางที่ 3 ปริมาณซีไวตาเมอร์และเซลลูโลส (กรัม) ที่เติมลงใน basal diet ได้อาหารทดลอง 6 สูตรที่มีปริมาณวิตามินซีในอาหารเท่ากับ 200 ppm (200 ppm of ascorbic acid equivalent)

สูตรอาหาร	ปริมาณซีไวตาเมอร์ : เซลลูโลส
อาหารที่เติม Ascorbate-2-monophosphate (M)	0.435 : 0.565
อาหารที่เติม Ascorbate-2-polyphosphate (P)	0.800 : 0.200
อาหารควบคุมที่ไม่เติมวิตามินซี (N)	0.000 : 1.000
อาหารที่เติม Ascorbate-2-sulfate (S)	0.417 : 0.583
อาหารที่เติม L-ascorbic acid (A)	0.400 : 0.600
อาหารที่เติม Coated L-ascorbic acid (C)	0.222 : 0.778

หมายเหตุ

- Ascorbate-2-monophosphate ผลิตภัณฑ์ของ Showa Denko K.K. มี 46% of ascorbic acid equivalent
- Ascorbate-2-polyphosphate ผลิตภัณฑ์ของ Rovithai Co.Ltd. มี 25% of ascorbic acid equivalent
- Ascorbate-2-sulfate ผลิตภัณฑ์ของ Pfizer Co.Ltd. มี 48% of ascorbic acid equivalent
- Coated L-ascorbic acid ผลิตภัณฑ์ของ Takeda Chemical Industries CoLtd. มี 90% of ascorbic acid equivalent

- L-ascorbic acid ผลิตภัณฑ์ของ Merck Co.Ltd. มี 100% of ascorbic acid equivalent แต่ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยออกซิเจนในอากาศและความร้อนระหว่างการผลิตอาหารจึงเติมลงไป 2 เท่า



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แผนผังแสดงการทำอาหารสำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนด้วยวิธี Microparticulation

<u>การออกแบบการทดลองและการเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน</u>

การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อนครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ระยะตามขั้นตอนการเจริญของลูกกุ้งและใช้อาหารที่มีวิตามินซีรูปแบบต่างกัน 6 สูตร ออกแบบการทดลองเป็นแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 6 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำมีรายละเอียดดังนี้คือ

1. ระยะ Zoea เมื่อลูกกุ้งเจริญเข้าสู่ระยะ Zoea I ให้กิน *Chaetoceros calcitrans* ที่มีความหนาแน่น 30,000-50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็นอาหารมื้อแรก สุ่มลูกกุ้งลงขวดทดลองขวดละ 200 ตัว (ความหนาแน่น 66 ตัวต่อลิตร) และเริ่มให้อาหารที่มีอนุภาคขนาด $\leq$ 63 ไมครอนแทนที่ *Chaetoceros calcitrans*

2. ระยะ Mysis เมื่อลูกกุ้งเจริญเข้าสู่ระยะ Mysis I สุ่มกุ้งลงขวดทดลองขวดละ 100 ตัว (ความหนาแน่น 33 ตัวต่อลิตร) เปลี่ยนขนาดอนุภาคอาหารจาก $\leq$ 63 เป็น 63-125 ไมครอน โดยที่ในวันแรกของการเปลี่ยนขนาดให้ค่อยๆ แทนที่ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าด้วยขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่าจนทำได้ทั้งหมดภายในมื้อที่ 4 ของวันนั้นเพื่อที่วันต่อไปของการเลี้ยงจะได้ให้อาหารที่มีขนาดเหมาะสมกับระยะของกุ้งวัยอ่อน

3. ระยะ Postlarva เมื่อลูกกุ้งเจริญเข้าสู่ระยะ Postlarva 1 สุ่มกุ้งลงขวดทดลองขวดละ 50 ตัว (ความหนาแน่น 16 ตัวต่อลิตร) เปลี่ยนขนาดอนุภาคอาหารจาก63-125 เป็น 125-250 ไมครอน ทำการทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

ให้อาหารลูกกุ้งวันละ 4 มื้อตลอดระยะเวลาการทดลองคือ 8.00, 12.00, 16.00 และ 19.00 น. โดยให้ตามปริมาณที่กุ้งแต่ละวัยต้องการ การให้อาหารจะให้เท่ากันทุกซ้ำการทดลองโดยละลายในน้ำก่อนที่จะตวงให้ เพื่อที่ทุกขวดในแต่ละ treatment ได้รับอาหารในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ระหว่างการทดลองทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และกำจัดตะกอนที่ติดข้างขวดออกทุกวัน ในช่วง Zoea I - Mysis III เปลี่ยนน้ำเพียง 1 ใน 3 ส่วน ต่อมาในช่วง Postlatva 1-20 จึงเปลี่ยนน้ำ 50% ควบคุมความเค็มที่ระดับ 30 ppt และให้อากาศเบาๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง ใช้ระยะเวลาการทดลองเลี้ยงทั้งสิ้นประมาณ 1 เดือน

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ตรวจสอบอัตรารอดของทุกระยะเพียง 1 ครั้งเมื่อลูกกุ้งเจริญเข้าสู่ระยะใหม่โดยนับจำนวนกุ้งเปรียบเทียบกับจำนวนเริ่มต้นคำนวณเป็นอัตรารอด (%)

2. ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองดังนี้

- บันทึกอุณหภูมิ ตรวจสอบด้วยเทอร์โมมิเตอร์ (^{0}C)
- ความเค็ม ตรวจสอบด้วย refractometer (ppt)
- ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ตรวจสอบด้วย S-C-T meter YSI model 33 (mg/l)
- ความเป็นกรดด่าง (pH) ตรวจสอบด้วยสารเคมีชุดวิเคราะห์คุณภาพน้ำ Aquamerck test kit
- แอมโมเนีย (NH_3-N) และไนเตรท (NO_3-N) ตรวจสอบด้วยสารเคมีชุดวิเคราะห์คุณภาพน้ำ Aquamerck test kit (mg/l) ตรวจสอบระยะละ1 ครั้งในช่วง Zoea II และ Mysis II ส่วนระยะ Postlarva วัด 2 ครั้งคือ ช่วงP_5 และ P_{15}

3. ตรวจสอบการเจริญเติบโตเมื่อกุ้งเจริญเข้าสู่ P_{20} โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งขวดละ 10 ตัวมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเหยียด (วัดจากปลายกรีของกุ้งถึง telson)

4. ตรวจสอบความทนทานต่อสภาวะเครียดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างฉับพลันของกุ้ง P_{20} โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งขวดละ 10 ตัวมาทดสอบด้วยน้ำจืด 0 ppt นับอัตราการตายทุกๆ 10 นาทีจนตัวสุดท้ายที่ตาย

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับการศึกษาด้านการเจริญเติบโต อัตราการรอดใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistic Analysis System (SAS, 1985) และใช้ SPSS-PC program for probit analysis เพื่อหาช่วงเวลาที่เกิดการตาย 50% (LT_{50}) ของกุ้งเนื่องจากการทดสอบความทนทานต่อสภาวะเครียดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างฉับพลันของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 6 สูตร เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเส้นใยตามวิธีของ AOAC (1980) วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยเอาผลรวมของเปอร์เซนต์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้าและเส้นใยไปลบออกจาก 100 เปอร์เซนต์

3. วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารแต่ละขนาดอนุภาคๆ ละ 1 ซ้ำรวมเป็น 3 ซ้ำต่ออาหาร 1 สูตรและในเนื้อกุ้ง (ทำทุกซ้ำการทดลองคือชุดการทดลองละ 5 ซ้ำต่ออาหาร 1 สูตร) ด้วยวิธี Colorimetry ดังแสดงในรูปที่ 4

<u>การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารและเนื้อกุ้งด้วยวิธี Colorimetry</u>

ทำการวิเคราะห์วิตามินซีในอาหารและเนื้อกุ้งด้วยวิธี Colorimetry ซึ่งเป็นการวัดปริมาณ Ascorbic acid (AA) โดยอาศัยหลักการจางลงของสี 2, 6-dichlorophenol indophenol (DCIP) เนื่องจากวิตามินซีถูกออกซิไดส์ด้วย DCIP ซึ่งสีของ DCIP จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสี (Kittakoop et al., 1996a)

Ascorbic acid + DCIP (สีน้ำเงิน)$\longrightarrow$ Dehydroascorbic acid + reduced DCIP (ไม่มีสี)

การเตรียมสี DCIP ที่ใช้ให้มีค่า absorbance ประมาณ 0.5-0.6 ทำได้โดยค่อยๆ ละลายเกล็ดสีในน้ำกลั่น นำไปกรองเพื่อแยกสีส่วนที่ละลายไม่หมดออกก่อนวัดค่า absorbance ด้วย Spectrophotometer (Spectronic, GENESYS 5) เมื่อสีมีค่า absorbance อยู่ในช่วงที่กำหนดจึงจะสามารถนำไปใช้ได้

หาผลต่างระหว่างค่า absorbance ของ blank (น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร+สีDCIP 3 มิลลิลิตร) ได้เป็นค่า Δ A standard curve ของ AA มีค่า Slope เท่ากับ -1.80 (Kittakoop et al., 1996a)

$$\Delta A/-1.80 = \mu mol\ of\ AA$$

กุ้ง P_{20} หรือตัวอย่างอาหารที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

⇓

homogenise กับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (1,000 ไมโครลิตร)

⇓

centrifuge ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

⇓

นำส่วนที่สกัดได้มา 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในสี DCIP 3 มิลลิลิตร

⇓

วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร

รูปที่ 4 แผนผังแสดงการวิเคราะห์วิตามินซีในอาหารและเนื้อกุ้งด้วยวิธี Colorimetry

การคำนวณปริมาณ Ascorbic acid (AA) ในอาหารและเนื้อกุ้ง

$$\text{ปริมาณ AA ในอาหาร (ppm)} = \frac{\Delta A/-1.80 \times 10^3/500 \times 176.13 \text{ (มวลโมเลกุลของ AA)}}{\text{น้ำหนักของอาหาร}}$$

$$\text{ปริมาณ AA ในเนื้อกุ้ง (ppm)} = \frac{\Delta A/-1.80 \times 10^3/500 \times 176.13 \text{ (มวลโมเลกุลของ AA)}}{\text{น้ำหนักของกุ้ง}}$$