บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาผลของความเค็มและระดับของโปรตีนต่อการจัดสรรพลังงานของกุ้งกุลาดำในระยะวัยรุ่นในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็นสี่ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนการเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด ที่ควบคุมระดับโปรตีนตามที่ต้องการ โดยมีส่วนประกอบที่เป็นวัตถุดิบคือ

1. ปลาป่นเป็นแหล่งของโปรตีน
2. แป้งสาลีเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตและเป็นตัวช่วยให้อาหารยึดเกาะกันได้ดีขึ้น
3. น้ำมันปลาเป็นแหล่งของไขมัน
4. Wheat gluten เป็นสารเหนียว (binder) ซึ่งช่วยให้ส่วนประกอบของอาหารยึดเกาะและเป็นแหล่งของโปรตีน
5. วิตามินและแร่ธาตุรวม

กำหนดให้มีอาหาร 3 สูตร ที่มีระดับโปรตีนที่แตกต่างกันคือที่ 25 35 และ 45 % โดยดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

1. นำวัตถุดิบแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และความชื้น ด้วยวิธี proximate analysis (AOAC, 1990) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำตามขั้นตอนดังนี้ ชั่งตัวอย่างอาหารแห้งมา 2 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยและเติม catalyst 2เม็ด เติมสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 25 ml (อุปกรณ์และการเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ข) ใส่ลงในหลอดย่อย นำหลอดย่อยไปใส่ลงในเครื่อง Kjeldatherm พร้อมทั้งประกอบท่อดูดควันระบบสูญญากาศ ทิ้งให้เกิดการย่อยจนได้สารประกอบสีดำ โดยครั้งแรกใช้ความร้อนประมาณ 250 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น โดยปรับอุณหภูมิ 20 ^{0}C ทุก ๆ 15 นาที จนถึงอุณหภูมิ 380 ^{0}C ปล่อยให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ จนได้สารละลายในหลอดเป็นสีเหลืองอ่อนใส เมื่อย่อยจนได้สารสีเหลืองใสแล้ว (หลังจากถึงอุณหภูมิ 380 ^{0}C แล้ว ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) นำหลอดออกทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กลั่นตัวอย่างที่ย่อยแล้วด้วยเครื่อง vapodest 1 โดยใส่สารละลายกรด boric 4 % เติม indicator 4-5 หยด ปล่อยให้กลั่นจนสารละลาย จนสารละลายในขวดได้ปริมาตร

ประมาณ 300 ml (ใช้เวลาประมาณ 30 นาที) ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.5 N

$$\% \text{ โปรตีน} = \frac{a * b * 6.25 * 1.4}{c}$$

เมื่อ a = normality ของ H_2SO_4 ที่ไตเตรต

b = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรต (ml)

c = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทำตามขั้นตอนดังนี้ อบขวดสกัดไขมันในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 120 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (dessicator) ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัม (อย่างละเอียด) ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ตัวอย่างที่ห่อแล้วลงใน thimble แล้วใส่ thimble ลงในขวดสกัดไขมัน เติม petrolium ether ประมาณ 75 ml (ระวังอย่าให้ thimble แช่อยู่ใน petrolium ether) นำขวดสกัดไขมันที่ผ่านขั้นตอนข้างต้นแล้วไปประกอบกับเครื่อง (soxthem automatic) โดยเปิดเครื่องสกัดไขมัน เปิดสวิทช์ของ oil bate ตั้งอุณหภูมิที่ 150 ^{0}C เปิดสวิทช์ของ pressure control pump เปิด cooler ให้น้ำไหลเวียนเข้า condenser ของเครื่อง soxtherm automatic เลื่อนคันโยกที่เครื่อง soxthrem automatic มายังตำแหน่งที่จะให้เกิดการ reflex กลับของ petroleum ether ปล่อยให้เกิดการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหย petrolium ether ออกจากไขมันที่สกัดได้ แล้วอบขวดสกัดไขมันใน oven ที่ 120 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น เมื่อขวดสกัดไขมันเย็นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักละเอียดเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมันรวมในอาหาร

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(a - b) * 100}{c}$$

เมื่อ a = น้ำหนักขวดสกัดไขมันก่อนการสกัดไขมัน (g)

b = น้ำหนักขวดสกัดไขมันและไขมันหลังการสกัดไขมัน (g)

c = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (g)

การวิคราะห์ปริมาณเถ้าทำตามขั้นตอนดังนี้ อบ crucible และฝาที่อุณหภูมิ 120 ^{0}C ในตู้อบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน dessicator และชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม อย่างละเอียดใส่ลงใน crucible นำ crucible ไปเผาบนเตาเผาโดยทำในตู้ควัน เผาจนหมดควัน จากนั้นนำ ไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 ^{0}C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จนได้เถ้าเป็นสีขาวหรือเทาอ่อน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักละเอียด

$$\%\text{เถ้า} = \frac{(a - b) * 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของ crucible (g)

b = น้ำหนักของ crucible กับน้ำหนักเถ้า (g)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นทำตามขั้นตอนดังนี้ อบ crucible และฝาที่อุณหภูมิ 120 ^{0}C ในตู้อบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม อย่างละเอียดใส่ลงใน crucible นำ crucible จากข้อ 3 ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 ^{0}C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำ crusible ออกจากตู้อบทิ้งไว้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด นำ crucible กลับเข้าอบในตู้อบ จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่แสดงว่าความชื้นได้ระเหยออกจากตัวอย่างไปหมดแล้ว

$$\%\text{ความชื้น} = \frac{(a - b) * 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของ crucible และตัวอย่างก่อนอบ (g)

b = น้ำหนักของ crucible กับตัวอย่างหลังอบ (g)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยทำตามขั้นตอนดังนี้ นำตัวอย่างที่สกัดไขมันออกแล้ว (ทราบน้ำหนักอย่างละเอียด) มาใส่ลงใน beaker เติมสารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.255 N ลงไป 200 ml ต่อ condenser เข้ากับ beaker เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของกรดให้คงที่เปิด heater ให้ความร้อนกับกรดจนเดือด ปล่อยให้เดือดประมาณ 30 นาที อบกระดาษกรองเบอร์ 41 และถ้วยกระเบื้องทิ้ง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ให้เย็นในโถดูดความชื้น จนได้น้ำหนักคงที่ กรองสารละลายที่ได้จากข้อ 1 ด้วยสารละลายเบอร์ 41 (รู้น้ำหนักอย่างละเอียด) จนหมด (ใช้น้ำกลั่นล้างตะกอนที่เหลือค้างใน beaker) แล้วล้างตะกอนที่ตกค้างอยู่บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นกรด (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) นำส่วนที่เหลือบนกระดาษกรองใส่ลงใน beaker แล้วเติมสาร NaOH เข้มข้น 0.313 N ลงไป 200 มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้ล้างตัวอย่างบนกระดาษกรองให้หมด ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที กรองเอาตะกอนจากข้อ 4 ด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิมแล้วล้างตัวอย่างจนปราศจากความเป็นกรดเป็นด่างแล้วล้างตะกอนด้วย 95 % ethyl alcohol นำตัวอย่างที่เหลือบนกระดาษกรองพร้อมกระดาษกรองไปอบให้แห้งในตู้อบที่ 120 ^{o}C ประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน dessicator แล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด นำตะกอนพร้อมกระดาษกรองไปเผาใน muffle furnace ที่ 600 ^{o}C นาน 3 ชั่วโมง เพื่อหาเถ้าโดยใส่ไว้ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักละเอียดแล้ว ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด

$$\% \text{ เยื่อใย} = \frac{(a+b) - (b-c) * 100}{d}$$

เมื่อ a = น้ำหนักตะกอน (g)

b = น้ำหนักกระดาษกรอง (g)

c = น้ำหนักเถ้า (g)

d = น้ำหนักตัวอย่างอาหารที่ใช้วิเคราะห์ (g)

ปริมาณขององค์ประกอบวัตถุดิบและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในแต่ละสูตรอาหารแสดงไว้ในตารางที่ 1 และจะเห็นได้ว่าในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร ปริมาณของปลาป่น แป้งสาลี และน้ำมันปลามีปริมาณที่ใช้ไม่เท่ากัน เนื่องจากวัตถุดิบมีองค์ประกอบของ โปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น และเยื่อใยไม่เท่ากัน ดังนั้นเมื่อคำนวณระดับของโปรตีนรวมในอาหารตามที่ได้กำหนดไว้จึงทำให้ปริมาณที่ใช้แตกต่างกัน

2. คำนวณสูตรอาหารตามที่ได้กำหนดไว้ คือที่ระดับโปรตีน 25 35 และ 45 % โดยวิธีเขียนรูปสี่เหลี่ยมจตุรัส ของ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2536)

ตารางที่ 1. องค์ประกอบของวัตถุดิบ (%) และปริมาณที่ใช้ในสูตรอาหาร

วัตถุดิบ	องค์ประกอบ					สูตรอาหารที่ระดับโปรตีน		
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น	เยื่อใย	25%	35%	45%
ปลาป่น	64.55	8.08	15.60	7.52	1.72	15.34	33.51	51.68
แป้งสาลี	13.92	1.60	1.40	12.50	1.38	76.66	58.49	40.32
Wheat Gluten	68.30	2.67	1.22	8.50	1.70	5.00	5.00	5.00
น้ำมันปลา	-	100.00	-	-	-	7.44	6.22	5.03
วิตามินและแร่ธาตุรวม	-	-	-	-	-	3.00	3.00	3.00

3. นำวัตถุดิบในแต่ละสูตรตามปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 1. มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (blender; National รุ่น MX-T2GN) เติมน้ำอุ่น (70-80 ^{0}C) แล้วคลุกเพื่อให้แป้งสาลีสุกและอาหารที่ผสมกันแล้วจับตัวกันดีขึ้น จากนั้นนำอาหารใส่ลงในเครื่องบดเนื้อสัตว์แบบใช้มือหมุน (meat mincer porkert) โดยใช้หน้าแว่นรูขนาด 1/16 นิ้ว หมุนอย่างต่อเนื่องแล้วใช้มีดปลายตัด ขูดตัดเพื่อให้ได้อาหารออกมาเป็นท่อน ๆ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 mm และยาวประมาณ 0.2 mm

5. นำอาหารเม็ดที่ได้ไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 70 ^{0}C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6. นำอาหารออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเก็บอาหารไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกว่าจะนำออกมาใช้เลี้ยงกุ้ง

7. วิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารในแต่ละสูตรด้วยวิธีของ AOAC (1990) อีกครั้งหนึ่งเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของอาหารที่ได้กำหนดไว้

8. วิเคราะห์ค่าพลังงานรวมในอาหารด้วยเครื่อง microbomb calorimeter แบบ Solution calorimeter รุ่น 1455 ยี่ห้อ Parr ด้วยวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำตัวอย่างอาหารไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดตัวอย่าง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม นำตัวอย่างที่ชั่งแล้วมาอัดเม็ด หลังจากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่เป็นเม็ดไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนอีกครั้งหนึ่งตัดฟิวส์ (ni Alloy) ยาว 10 cm แล้วผูกเข้ากับ electrode hook แล้วทำเป็น coil ประมาณ 4-5 รอบ (อุปกรณ์และสารเคมีแสดงดังในภาคผนวก ก) นำตัวอย่างจากข้อ ใส่ลงใน Fuel capsule, Inconel ที่ประกอบกับ Capsule support loop แล้วเลื่อนตัวอย่างแตะกับฟิวส์ตรงบริเวณที่เป็น coil ให้อยู่กึ่งกลางตัวอย่างประกอบ Bomb head assembly, Bomb body, Bomb cup และ Screw cup

เข้าด้วยกัน หลังจากนั้นนำ Oxygen fill connection ต่อเข้ากับ Gas tube แล้วเปิดวาล์วเอาออกซิเจนเข้าประมาณ 35 บรรยากาศ แล้วปิด นำสายจุดระเบิดทั้งสองเส้นประกอบเข้ากับ Terminal nut และ อีกเส้นหนึ่งประกอบเข้ากับ Semimicro oxygen bomb ประกอบเข้าด้วยกัน จากนั้นนำน้ำใส่ลงใน Glass Dewar ปริมาตร 450 ml โดยอุณหภูมิของน้ำจะต้องเย็นกว่าอุณหภูมิของห้องประมาณ 1-2 ^{0}C แล้วนำ Semimicro oxygen bomb ที่ประกอบเข้ากับสายจุดระเบิดแล้วใส่ลงใน Glass Dewar จากนั้นนำ Cover มาปิดพร้อมทั้งคล้องสายพานเข้ากับร่องเฟืองและมอเตอร์ เปิดเครื่องแล้วอุ่นเครื่องไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง จากนั้นกดปุ่ม "f $_{1}$" บนหน้าปัดเครื่องจะแสดงลำดับที่ของตัวอย่างขณะนั้นแล้วกดปุ่ม "Enter" แล้วเครื่องจะถามน้ำหนักตัวอย่างบนหน้าปัด ป้อนค่าน้ำหนักตัวอย่างแล้วกด "Enter" จากนั้นรอสัญญาณจากเครื่องให้ Fire โดยกดปุ่มจุดระเบิดที่ตัวจุดระเบิด (Ignition unit) แล้วกดปุ่ม "Enter" รอจนกระทั่งเครื่องให้สัญญาณแสดงผลที่หน้าปัดออกมาเป็น Gross heat (แคลลอรี่ต่อกรัม) ของตัวอย่างนั้น ๆ หลังจากเผาไหม้ตัวอย่างแล้ววัดความยาวของฟิวส์ที่เหลือ หาค่าของความยาวของฟิวส์ที่ถูกเผาไหม้ไปนำไปลบออกจากค่าพลังงานที่ได้จากตัวอย่าง โดยค่าพลังงานในฟิวส์เท่ากับ 2.3 cal/cm คำนวณหาค่าพลังงานในตัวอย่าง โดย

$$\text{ค่าพลังงานรวม} = \frac{\text{Gross heat} * \text{ค่าแก้}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \quad \text{cal/g}$$

ค่าแก้ ได้จากการนำตัวอย่าง benzoic acid มาตรฐานไปเผาด้วยเครื่อง Microbomb calorimeter 2 - 3 ตัวอย่าง แล้วนำค่า Gross heat ที่ได้ในแต่ละครั้งไปหารด้วยค่าพลังงานของ benzoic acid มาตรฐาน (6318 cal/g)

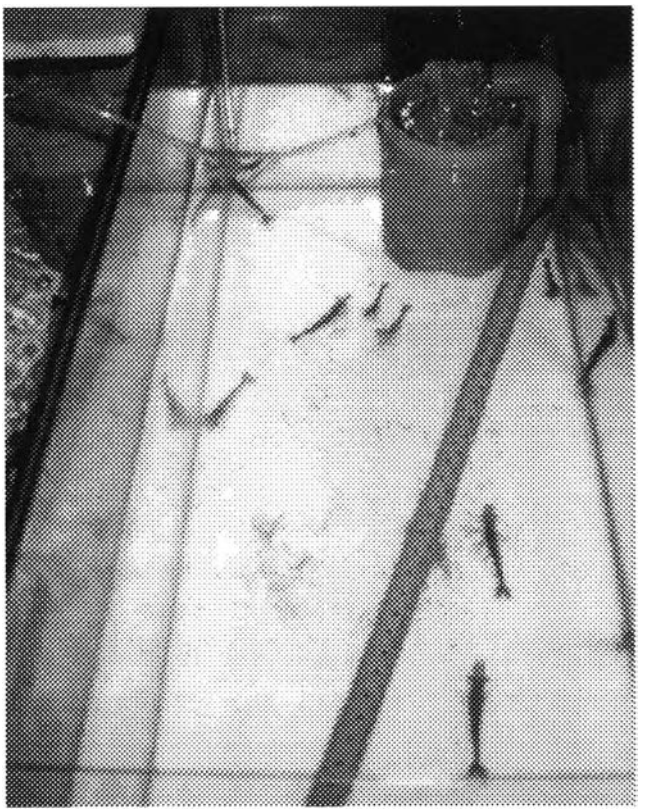
ขั้นตอนการเตรียมและเลี้ยงสัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ระยะวัยรุ่น (juvenile) น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 0.6-0.7 g และความยาวประมาณ 4.0-5.5 cm กุ้งที่ใช้ทดลองมีอายุประมาณ 1 เดือนหลังจากลงบ่อดิน โดยเป็นกุ้งจากนากุ้งที่จังหวัดฉะเชิงเทราซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มประมาณ 20 ppt ทำการทดลองเลี้ยงกุ้ง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

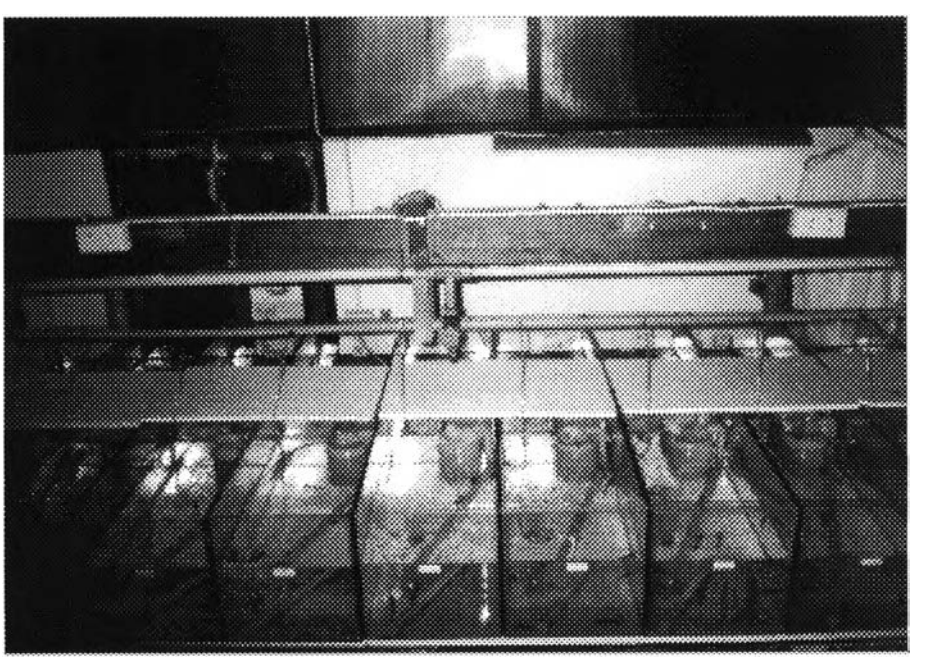
น้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งเป็นน้ำจากนาเกลือที่มีความเค็มสูงประมาณ 90-100 ppt ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ (calcium hypochloride; $Ca(OCl)_2$) ที่ความเข้มข้น 20 ppm และให้อากาศตลอดเวลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเจือจางด้วยน้ำประปาเพื่อให้ได้ความเค็มที่ต้องการ 3 ระดับ คือที่ความเค็ม 10 20 และ 30 ppt ใส่ลงในถังพักน้ำแต่ละความเค็มแล้วจึงนำไปใส่ในตู้กระจกขนาด 30*60*30 cm เป็นปริมาตร 30 ลิตร โดยกรองด้วยถุงกรองตาถี่ขนาด 5 ไมครอน เพื่อขจัดเศษวัสดุและตะกอนที่ปะปนมากับน้ำออกไป

นำกุ้งกุลาดำมาเลี้ยงไว้ในบ่อพักที่ความเค็มเดิม คือที่ 20 ppt เป็นเวลา 2 วัน โดยเปลี่ยนน้ำ 50 % ทุกวัน หลังจากนั้นแบ่งกุ้งออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน เริ่มปรับความเค็มให้ได้ระดับตามที่ต้องการ คือที่ 10 20 และ 30 ppt โดยปรับความเค็มในอัตรา 5 ppt ต่อ 2 วัน เมื่อได้ระดับความเค็มตามที่ต้องการแล้วนำกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในความเค็มแต่ละระดับมาใส่ตู้กระจกที่เตรียมไว้ในแต่ละชุดการทดลอง การวางแผนการทดลองเป็นแบบ factorial design (ความเค็ม 3 ระดับ โปรตีน 3 ระดับ แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ) เลี้ยงกุ้งที่ความหนาแน่น 20 ตัวต่อตู้ (ประมาณ 110 ตัวต่อตารางเมตร) โดยชั่งน้ำหนักและวัดความยาวกุ้งแต่ละตัวก่อนปล่อยลงตู้ ในแต่ละหน่วยการทดลองจะเลี้ยงด้วยระบบกึ่งปิด (semi-closed circulating system) ที่มีระบบกรองชีวภาพ (biofilter system) ในระหว่างการเลี้ยงจะเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 10 % โดยดูดตะกอนและเศษอาหารที่เหลือออกโดยวิธีกาลักน้ำ แล้วเติมน้ำใหม่ให้ได้ปริมาตรเท่าเดิมทุก ๆ 2 วัน

ระบบกรองน้ำที่ใช้ในแต่ละหน่วยการทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Spotte (1979) โดยใช้แรงดันจากอากาศที่ลอยขึ้นสู่ผิวน้ำภายในท่อ อากาศเป็นตัวพาเอามวลน้ำขึ้นสู่ด้านบน ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของมวลน้ำ (Air lift) ระบบกรองแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งคือตัวกรองชีวภาพซึ่งประกอบด้วยท่อ พีวีซี เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 นิ้ว สูง 8 นิ้ว ทางด้านล่างผ่าเป็นรูปปากฉลามทะแยงสี่มุม ในแต่ละมุมลึกประมาณ 1 นิ้ว และกว้างประมาณ 1.5 นิ้ว เพื่อเป็นทางออกของน้ำ จากด้านล่างสูงขึ้นมา 1.25 นิ้ว เจาะรูโดยรอบระยะห่างประมาณ 0.5 นิ้ว ขนาดของรู 0.0625 (1/16) นิ้ว เพื่อใช้ขึ้นเชือกเอ็นเป็นตาข่ายภายในท่อเพื่อไม่ให้วัสดุลอดออกมา ภายในท่อประกอบด้วยใยกรองสังเคราะห์ เปลือกหอยนางรม กรวด ทรายและอวนตาถี่สีฟ้า จากด้านบนลงสู่ด้านล่างตามลำดับ ส่วนที่สองประกอบด้วยท่อ พีวีซี ขนาด 0.5 นิ้ว ยาว 60 cm ซึ่งเจาะรูขนาด .0125 (1/8) นิ้ว โดยรอบทั้งชิ้นประมาณ 60-70 รู จำนวน 1 ชิ้นและ ยาว 20 cm 1 ชิ้น ข้องอ 1 ชิ้น และ ตัวปิดท่อ 1 ชิ้น นำส่วนประกอบทั้งหมดมาประกอบเข้าด้วยกันเป็นลักษณะคล้ายรูปตัวแอล



รูปที่ 4. ระบบกรองน้ำที่ใช้ในแต่ละหน่วยการทดลอง



รูปที่ 5. ชุดการทดลองที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

นอน นำส่วนที่หนึ่งและส่วนที่สองมาประกอบลงในตู้ทดลอง โดยวางส่วนที่หนึ่งไว้ที่มุมของตู้ทดลองและนำส่วนที่สองวางตามแนวทะแยงจากมุมหนึ่งไปยังอีกมุมหนึ่งของตู้ (รูปที่ 4) เพื่อดึงมวลน้ำที่อยู่ในระยะไกลเข้าสู่ระบบกรอง ทำให้มวลน้ำในตู้ทดลองมีการหมุนเวียนและมีคุณภาพดีขึ้น และจะล้างใยกรองสังเคราะห์ให้สะอาดทุก 3 วัน แล้วนำใยกรองกลับมาใช้ใหม่อีก และตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยตรวจสอบค่าคุณภาพน้ำต่าง ๆ ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. พารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ตรวจสอบคุณภาพน้ำ

พารามิเตอร์	เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ
แอมโมเนีย	ammonium-test kit ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
ไนเตรต	Nitrate-test kit ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
ความเค็ม	เครื่องวัดความเค็ม(Hand refractometer; S/Mill ATAGO Co., Ltd. Japan)
ความเป็นกรด-ด่าง	เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter; pH Scan 3 Eutech Cybernetics Co., Ltd. Singapore)
วัดอุณหภูมิด้วย	เครื่อง YSI model 57
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ	เครื่อง YSI model 57

การเก็บข้อมูลค่าตัวแปรในสมการการจัดสรรพลังงาน

หลังจากปรับสภาพกุ้งเป็นเวลา 1 เดือนแล้วเก็บข้อมูลค่าตัวแปรต่าง ๆ ในสมการการจัดสรรพลังงาน

$$C = P + R + U + F + M$$ (ดัดแปลงจาก Winberg 1960)

ตามรายละเอียดวิธีการดังนี้

ค่าพลังงานจากการบริโภค (C) และค่าพลังงานจากการขับถ่ายในรูปของอุจจาระ (F)

ประมาณค่าน้ำหนักอาหารที่กุ้งบริโภคและอุจจาระที่กุ้งถ่ายออกมาใน 1 วัน โดยชั่งน้ำหนักอาหารก่อนแบ่งออกเป็น 3 ส่วน เท่า ๆ กันเพื่อเลี้ยงกุ้งในแต่ละมื้อ ซึ่งจะใช้จำนวนกุ้งทั้งหมดที่มีเหลืออยู่ในตู้ของแต่ละหน่วยการทดลอง ทำความสะอาดตู้ก่อนให้อาหารมื้อแรกและนำระบบกรองน้ำออกเพื่อไม่ให้อุจจาระและอาหารที่เหลือเข้าไปในระบบกรองน้ำหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง เก็บอาหารที่เหลือโดยวิธีกาลักน้ำและใช้กระชอนตาถี่ (ตาขนาด 20 ไมครอน) กรองเศษอาหารที่เหลือ และเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอรวบรวมให้ครบทั้ง 3 มื้อ หลังจากนั้นอีก 2 ชั่วโมง จึงดูดอุจจาระกุ้งที่กุ้งถ่ายออกมาด้วยวิธีเช่นเดียวกัน แล้วนำเศษอาหารที่เหลือ และอุจจาระกุ้งที่รวบรวมได้ (แยกกัน) ในแต่ละวันไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 90 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หักน้ำหนักของอาหารที่เหลือออกจากน้ำหนักของอาหารเริ่มต้นจะได้น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินไปส่วนตัวอย่างอุจจาระกุ้งที่ได้เก็บไว้วิเคราะห์ค่าพลังงานต่อไป

ค่าพลังงานจากการบริโภคสามารถหาได้ดังนี้

ค่าพลังงานจากการบริโภค (cal/g/day)

$$= \frac{\text{ค่าพลังงานรวมในอาหาร (cal/g)} * \text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินในหนึ่งวัน (g)}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งในแต่ละหน่วยการทดลอง (g)}}$$

นำตัวอย่างอุจจาระกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไปวิเคราะห์ค่าพลังงานรวมด้วยเครื่อง Microbomb calorimeter มีวิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าพลังงานรวมในอาหาร เมื่อได้ค่าพลังงานรวมของอุจจาระกุ้งในแต่ละชุดการทดลองแล้ว สามารถประมาณค่าพลังงานจากการขับถ่ายในรูปของอุจจาระได้ดังนี้

ค่าพลังงานจากการขับถ่ายในรูปของอุจจาระ (cal/g/day)

$$= \frac{\text{ค่าพลังงานในอุจจาระกุ้ง (cal/g)} * \text{น้ำหนักของอุจจาระกุ้งในหนึ่งวัน (g)}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งในแต่ละหน่วยการทดลอง (g)}}$$

ค่าพลังงานที่ใช้ในการเติบโต (P)

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 1 เดือนแล้ว ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้ง หาค่าอัตราการเติบโต (growth rate) โดยน้ำหนักและหาค่าอัตรารอดของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง โดยคำนาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะโดยน้ำหนักจากสูตร

$$\text{อัตราการเติบโต (g/day)} = \frac{(W_2 - W_1)}{\text{จำนวนวันที่ใช้เลี้ยง}}$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักกุ้งก่อนการทดลอง (g)

W_2 = น้ำหนักกุ้งหลังการทดลอง (g)

และค่าอัตรารอดสามารถหาได้จาก

$$\text{อัตรารอด (\%)} = \frac{N_2 * 100}{N_1}$$

เมื่อ N_1 = จำนวนกุ้งก่อนการทดลอง

N_2 = จำนวนกุ้งหลังการทดลอง

หลังจากเก็บค่าตัวแปรอื่น ๆ เรียบร้อยแล้ว สุ่มตัวอย่างกุ้ง 3 ตัว จากแต่ละหน่วยการทดลองนำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบ ที่อุณหภูมิ 85 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

หลังจากนั้นนำตัวอย่างกุ้งที่อบแห้งแล้วไปหาค่าพลังงานรวมด้วยเครื่อง Microbomb calorimeter การวิเคราะห์หาค่าพลังงานรวมในตัวอย่างกุ้งมีวิธีการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าพลังงานรวมในอาหาร เมื่อได้ค่าพลังงานในตัวอย่างกุ้งแล้วสามารถหาค่าพลังงงานที่ใช้ในการเติบโตได้ดังนี้

ค่าพลังงานที่ใช้ในการเติบโต (cal/g/day)

$$= \frac{\text{ค่าพลังงานในตัวอย่างกุ้ง (cal/g) * (น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น / จำนวนวันที่ใช้เลี้ยง (g/day))}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งในแต่ละหน่วยการทดลอง (g)}}$$

ค่าพลังงานที่สูญเสียไปในรูปของแอมโมเนีย (U)

วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยสุ่มตัวอย่างกุ้งในแต่ละหน่วยการทดลองหลังจากให้อาหารแล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 3 ตัวต่อหน่วยการทดลอง นำมาใส่ลงใน flask ขนาด 250 ml ที่มีปริมาตรน้ำ 100 ml ทั้งนี้มีขวดควบคุมโดยนำ flask ขนาด 250 ml ใส่น้ำในแต่ละความเค็มในปริมาตร 100 ml แต่ไม่ใส่ตัวอย่างกุ้งเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผล ทิ้งไว้โดยไม่รบกวนกุ้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำทั้งขวดที่มีตัวอย่างกุ้งและขวดควบคุมนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Strickland and Parsons (1972) วิธีการวิเคราะห์แอมโมเนียสามารถทำได้ดังนี้ นำน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง โดยใช้ pipette แล้วเติม phenol solution 0.4 ml (การเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ค) โดยใช้ micropipette เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม sodium nitroprusside 0.04 ml เขย่าให้เข้ากันและเติม oxidizing solution 0.4 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 - 27 ^{0}C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยห่อฟอล์ยไว้เพื่อป้องกันมิให้แอมโมเนียจากบรรยากาศเข้ามาปนเปื้อน หลังจากนั้นนำน้ำตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 6400 นาโนเมตร โดยใช้ cell ขนาด 10 cm บันทึกค่าที่ได้แล้วลบออกด้วย blank โดยใช้น้ำกลั่น de-ionized แทนน้ำตัวอย่างแล้วทำตามขั้นตอนข้างต้น นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับ standard curve ของสารละลายมาตราฐานแอมโมเนีย เพื่อหาความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำตัวอย่าง ค่าพลังงานที่สูญเสียไปในรูปของแอมโมเนียสามารถหาได้ โดยนำค่าแอมโมเนียที่วิเคราะห์ได้เปลี่ยนเป็นพลังงานตามวิธีของ Elliot and Davidson (1975; อ้างถึงใน Widdows, 1984) โดย 1 mg NH_4-N เท่ากับ

24.87 J และ 1 J = 0.239 cal (1 mg NH_4-N = 5.94 cal) ดังนั้นสามารถคำนวณค่าพลังงานที่สูญเสียไปในรูปของแอมโมเนียได้จากสมการ

พลังงานที่สูญเสียไปในรูปของแอมโมเนีย (cal/g/day)

$$= \frac{\text{แอมโมเนียที่กุ้งปล่อยออกมาใน 1 วัน (cal)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างกุ้ง (g)}}$$

ค่าพลังงานที่ใช้ในการหายใจ (R)

วิเคราะห์อัตราการบริโภคออกซิเจน โดยใช้เครื่อง Gilson differential respirometer รุ่น IGR20 Respirometer ของบริษัท Gilson medical electronics มีวิธีการดังนี้ (หลักการทำงานของเครื่อง อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้แสดงไว้ในภาคผนวก ง) เปิดเครื่องแล้วตั้งอุณหภูมิของ incubator ไว้ที่ระดับที่ต้องการ (28 ^{o}C) ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง นำสัตว์ทดลองใส่ลงใน Gilson chamber ที่มีน้ำอยู่ 45 ml โดยใส่ chamber ละ 1 ตัว นำ NaOH 10% ใส่ลงใน side arm ของ Gilson chamber ประมาณ 4-5 หยด ปิดฝาและประกอบเข้ากับตัวเครื่อง นำ Gilson chamber ที่มีสัตว์ทดลองอยู่ลงใน incubator แล้วปล่อยให้สัตว์ทดลองอยู่อย่างปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเปิดวาล์ว (valve) ที่ micrometer ไว้ เมื่อครบ 1 ชั่วโมง จึงปิดวาล์ว หลังจากนั้นทุกๆ 15 นาที ปรับความดันที่ micrometer และอ่านค่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดย 15 นาทีแรกไม่นำค่าที่อ่านได้มาใช้ ค่าของ micrometer ที่อ่านได้มีหน่วยเป็น microliter นำค่าที่ได้ไปคูณกับค่าคงที่ C โดยหาค่า C ได้จาก

$$C = \frac{(273) * (Pb)}{(t + 273) * (760)}$$

เมื่อ

t = อุณหภูมิในขณะทำการทดลอง

Pb = ค่าความกดอากาศที่กดอากาศที่อ่านได้จากเครื่อง barometer เป็นมิลลิเมตรของปรอท

เมื่อได้ค่าคงที่แล้วสามารถหาค่าอัตราการบริโภคออกซิเจนได้จาก

$$k = C * h$$

เมื่อ h = ค่าที่อ่านได้จาก micrometer

ค่าอัตราการบริโภคออกซิเจนที่ได้มีหน่วยเป็น microliter/hour

เมื่อทราบอัตราการบริโภคออกซิเจนแล้วนำมาเปลี่ยนเป็นค่าพลังงานตามวิธีของ Gnaiger (1983, อ้างถึงใน Kurmaly et al., 1989) โดย 1 mg O_2 ที่ใช้ไปเท่ากับ 14.06 J และสามารถหาค่าพลังงานที่ใช้ในการหายใจได้ดังนี้

$$\text{ค่าพลังงานที่ใช้ในการหายใจ (cal/g/day)} = \frac{\text{พลังงานที่กุ้งใช้ในการหายใจ 1 วัน (cal)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างกุ้ง (g)}}$$

ค่าพลังงานที่สูญเสียไปในรูปของคราบ (M)

เก็บคราบกุ้งโดยตรวจดูภายในตู้ทุก 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เริ่มเลี้ยง รวบรวมคราบกุ้งในแต่ละ 1 วันโดยแยกเป็นแต่ละตู้ แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 85 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนคราบกุ้งที่ได้ในแต่ละตู้และชั่งน้ำหนัก นำตัวอย่างที่รวบรวมได้ในหนึ่งเดือนมาวิเคราะห์หาค่าพลังงานด้วยเครื่อง Microbomb calorimeter รายระเอียดวิธีในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าพลังงานรวมในอาหาร เมื่อได้ค่าพลังงานของคราบกุ้งแล้วสามารถประมาณค่าพลังงานที่สูญเสียไปในรูปของคราบได้ดังนี้

ค่าพลังงานที่สูญเสียไปในรูปของคราบ (cal/g/day)

$$= \frac{\text{ค่าพลังงานในคราบกุ้ง (cal/g)} * \text{น้ำหนักคราบกุ้งในหนึ่งวัน (g)}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งในแต่ละหน่วยการทดลอง (g)}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลค่าพลังงานของแต่ละค่าในสมการการจัดสรรพลังงานมาทดสอบผลของความเค็มและระดับของโปรตีนพร้อมทั้งปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสองด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยมีการวางแผนการทดลองเป็นแบบ factorial design (ความเค็ม 3 ระดับ โปรตีน 3 ระดับ) และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม Statistic Analytical System (SAS, 1985) แล้วนำค่าที่ได้กลับไปแทนค่าในสมการการจัดสรรพลังงาน