บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวางแผนการทดลองสร้างอาหารทดลองโดยให้มีคุณค่าเทียบเท่ากับอาหารที่กุ้งได้รับจากธรรมชาติ โดยเริ่มจาก การเตรียมตัวอย่างอาหารธรรมชาติ วัสดุอาหารและ พ่อพันธุ์จากทะเลและจากกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน เพื่อนำมาวิเคราะห์หากรดไขมัน หลังจากนั้นเริ่มการวิเคราะห์กรดไขมันและวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของอาหารธรรมชาติและวัสดุอาหาร และจากข้อมูลต่างๆ ตามที่ต้องการจึงนำมาสร้างสูตรอาหารทดลอง และทำอาหารทดลอง และทดสอบอาหารกับพ่อพันธุ์กุ้ง ตามแผนการทดลองที่วางไว้ เมื่อถึงระยะเวลาที่กำหนด นำกุ้งขึ้นมาวิเคราะห์ผล

1. การสร้างสูตรอาหารทดลอง

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารธรรมชาติและพ่อพันธุ์กุ้ง เพื่อนำไปศึกษากรดไขมัน

รวบรวมตัวอย่างอาหารธรรมชาติ ที่มีการใช้ในการเลี้ยงพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำได้แก่ เพรียงเลือด เพรียงทราย หอยนางรม หมึกกล้วยจากตลาดสด และพ่อพันธุ์กุ้งธรรมชาติจากสะพานปลาอ่างศิลา จ. ชลบุรี เมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2545 และพ่อพันธุ์กุ้งจากบ่อดิน นำมาจากกรุงเทพฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำกัด จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อวันที่ 18 ตุลาคม 2545 เลือกพ่อพันธุ์กุ้งที่สมบูรณ์เพศโดยสังเกตจากโคนขาเดินคู่ที่ 5 จะมีตุ่มสีขาวขุ่นของถุงเก็บน้ำเชื้อ ชั่งน้ำหนักกุ้งแต่ละตัวพร้อมจดบันทึก หลังจากนั้นผ่ากุ้งบนน้ำแข็ง โดยใช้กรรไกรตัดบริเวณกึ่งกลางเปลือกคลุมหัว (Carapace) เลาะเปลือกคลุมหัวออกและตัวเนื้อเยื่อส่วนหัวออก จากนั้นตัดหัวใจของกุ้งออก ในกุ้งเพศผู้จะพบอวัยวะคล้ายกับนิ้วมือวางแผ่อยู่บนตับอ่อน (Hepatopancrease) เรียก เทสติคูลาร์โหลบ และมีท่อสีขาวขุ่นรูปทรงกระบอก คือ ท่อนำสเปิร์ม จากนั้นใช้กรรไกรตัดกล้ามเนื้อไล่ตามท่อนำสเปิร์มลงมาบริเวณข้างลำตัวจนถึงท้องบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 จะพบถุงน้ำเชื้อสีขาวขุ่น ใช้ปากคีบดึงออกมา ชั่งน้ำหนักถุงน้ำเชื้อ และตับอ่อน จดบันทึกหลังจากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ช่องเยือกแข็งที่อุณหภูมิประมาณ –80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไประเหิดแห้ง (Freeze dried) สำหรับการวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

การวิเคราะห์กรดไขมันจากอาหารธรรมชาติ ตัวอย่างพ่อพันธุ์กุ้งและวัสดุอาหาร (Bligh and Dryer, 1959)

การสกัดตัวอย่าง

ทดลองที่ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยชั่งน้ำหนักวัสดุอาหารหรืออาหารธรรมชาติประมาณ 3 กรัม ลงในโถปั่นหรือหลอดปั่นขนาด 100 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร เมทานอล 20 มิลลิลิตร และน้ำให้อัตราส่วน 1 : 2 : 0.8 เมื่อคิดรวมกับน้ำในเนื้อปลา ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง (homogenizer) ที่ 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตรปั่น 30 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรและปั่น 30 นาที กรองผ่านถ้วยกระเบื้องกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วยคลอโรฟอร์ม นำส่วนที่กรองได้ เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel) ตัดกระดาษกรองที่กรองแล้วให้เป็นชิ้นเล็กก่อนใส่ลงไปพร้อมกับเนื้อปลาลงในโถปั่น เติมคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร ปั่น 1 นาที นำส่วนที่กรองได้เทรวมลงในกรวยแยกอันแรก แล้วเติม 0.88 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ลงไป 1ใน 4 ของปริมาตรทั้งหมด เขย่าให้เข้าดีทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นไขแยกส่วนคลอโรฟอร์ม ชั้นล่างออก ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีจุกแก้วเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous) ลงไปเล็กน้อยไล่อากาศออกไปด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดจุกแก้ว เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่าง 20-30 นาที สังเกตลักษณะสารละลายที่ได้ต้องใส ถ้าไม่ใสต้องเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปอีกเล็กน้อย จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เทส่วนที่กรองได้ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจนแล้วปิดให้สนิท ดูดส่วนที่กรองได้ไล่ลงในขวดแก้วก้นกลมหรือขวดแก้วรูปแพร์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหยคลอโรฟอร์มออกใน เครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator) ชั่งน้ำหนักและหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้คำนวณเป็นร้อยละของตัวอย่างสดและแห้ง

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันของตัวอย่างที่ได้จากการสกัด โดย GLC (A.O.C.S., 1989)

การเตรียม Methyl ester ของกรดไขมันจากน้ำมันตัวอย่างที่ได้จากการสกัด เพื่อหาค่าของตัวอย่างในรูปของร้อยละของพื้นที่ (Area Percentages)

ชั่งเตรียมน้ำมันตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เติม 0.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจนปิดฝา เขย่า 10

วินาที เขย่าในน้ำเดือด 30 นาที หรือจนได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมโบโรไตรฟูออไรด์ (Borotrifluoride) ในเมทานอล 2 มิลลิลิตรไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจนปิดฝา เขย่า 10 วินาที เขย่าในน้ำเดือด 20 วินาที หลังจากทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ปิดฝาผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เติมโซเดียมคลอไรด์ที่อิ่มตัว (Saturated sodium chloride) 3 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดผิวบนใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 4-5 มิลลิลิตร ที่มีฝาชั้นในเป็นซิลิโคนปิดสนิท ฉีดตัวอย่าง 1-2 ไมโครลิตร ลงใน Gas chromatography

การวิเคราะห์ Methyl esterด้วย Gas Chromatography (ปรับปรุงจาก A.O.C.S., 1989)
(Gas Chromatograph SHIMADZU Condition GC ชนิด CBP20 (SHIMADZU) ยาว 25m ID 0.22 mm.)

column	:	Capillary Column DB Wax 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 microns		
Injection temperature	:	250°C		
Detector temperature	:	300°C		
Column temperature	:	Temperature program		
		Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Time (min)
Initial temperature			170	2
Final temperature		5	240	9
Split ratio	:	1:20		

สูตรคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์พื้นที่กรดไขมัน (Area เปอร์เซ็นต์ fatty acids)} = \frac{100\ A_x}{(A_T)-(A_I)}$$

โดยที่

A_x = พื้นที่ของ Fatty acid "X"
A_T = พื้นที่ของโครมาโตรแกรมทั้งหมด
A_I = พื้นที่ของ Hexane

วิธีการสกัดตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยเพื่อนำไปหากรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Lapage and Roy, 1984)

นำตัวอย่างที่ทำให้แห้งด้วยการระเหยในระบบเยือกแข็ง (Freeze dried) นำมาชั่ง 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดตัวอย่าง เติม 1.0 มิลลิลิตร กรดไตรโคซาโนอิค (Tricosanoic acid; C23:0) ใน

ตัวอย่างและเติมสารละลาย เมทานอล-ไฮโดรคลอริค (methanol-hydrochloric; 95:5) 2 มิลลิลิตร นำขวดตัวอย่างไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาให้สนิทและพันด้วยพาราฟินอีกครั้ง หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และสกัดด้วยเฮกเซนที่มีบูทิลเลตไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) 0.01 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันดีและรอให้ตัวอย่างแยกชั้น เมื่อเกิดการแยกชั้นแล้วดูดตัวอย่างชั้นบนมาทำการกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4) นำตัวอย่างที่ได้ไล่อากาศออกด้วยไนโตรเจนปิดฝาให้สนิท หลังจากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography และนำผลของกรดไขมันที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน (68B) ดังแสดงในตารางที่1.

ตารางที่1. องค์ประกอบของกรดไขมันมาตรฐาน

GLC REFERRENCE STANDARDS

CHAIN	ITEM	เปอร์เซ็นต์ BY WT.
C14:0	METHYL MYRISTATE	3.0
C14:1	METHYL MYRIDSTTOLEATE	1.0
C16:0	METHYL PALMITATE	10.0
C16:1	METHYL PLAMITOLEATE	2.0
C18:0	METHYL STEARATE	15.0
C18:1	METHYL OLEATE	25.0
C18:2	METHYL LINOLEATE	10.0
C18:3	METHYL LINOLENATE	4.0
C20:0	METHYL ARACHIDATE	2.0
C20:1	METHYL 11 - EICOSENOATE	2.0
C20:2	METHYL 11,14 EICOSADIENOATE	2.0
C20:3	METHYL HOMOGRAMMALINOLENATE	4.0
C20:4	METHYL ARACHIDONATE	4.0
C22:0	METHYL BEHENATE	4.0
C22:1	METHYL ERUCATE	2.0
C22:6	METHYL DOCOSAHEXAENOATE	4.0
C24:0	METHYL LIGNOCERATE	2.0
C24:1	METHYL NERVONATE	4.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของอาหารธรรมชาติ วัสดุอาหาร และพ่อพันธุ์กุ้ง ดำเนินการโดยวิธี AOAC (1995) โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบดังนี้ (ภาคผนวก ข)

- ปริมาณความชื้นและปริมาณวัตถุแห้ง ด้วยวิธี oven-drying
- ปริมาณเถ้า ด้วยวิธี muffle furnace combustion
- ปริมาณไขมันด้วยวิธี ether extraction
- ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method
- ปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่อง Gas chromatography
- และปริมาณเส้นใย ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ กรมปศุสัตว์

2. การสร้างอาหารทดลอง

สร้างสูตรอาหาร โดยกำหนดจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารที่มีชีวิต โดยวัสดุอาหารที่ใช้ผลิตอาหารทั่วไปได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลืองป่น หมึกป่น แป้งสาลี สารเหนียว วิตามินรวม แร่ธาตุ ไขมัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. องค์ประกอบของอาหารพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ

วัสดุอาหาร	กรัมต่อ100 กรัมอาหาร	แหล่งที่มาของอาหาร
ปลาป่น	41	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด
หมึกป่น	12	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด
กากถั่วเหลืองป่น	8	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด
หัวกุ้งป่น	8	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด
แป้งสาลี	8	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด
Sodium Alginate/ Calcium	4/2	บริษัท รวมเคมี จำกัด
Cholesterol / lecithin	0.5/0.5	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด
Vitamin mix/ Mineral mix*	2/2	บริษัท โคเดล จำกัด
AA oil	7	Vedovar, Netherland
EPA oil	3	Rovithai Co., Ltd
Fish Soluble	1	บริษัท โคเดล จำกัด
Vitamin C	0.5	บริษัท โคเดล จำกัด
Astaxantin	0.5	Rovithai Co., Ltd.

*วิตามินรวมและแร่ธาตุรวม ใช้สัดส่วนตาม สกนธ์ (2534)

3. การเตรียมอาหาร

อาหารทดลองดำเนินการเตรียมตามวัตถุดิบในตารางที่ 2 โดยนำวัตถุดิบอาหารได้แก่ หมึกหัวกุ้ง และกากถั่วเหลืองนำมาป่นให้มีขนาดประมาณ 200 ไมครอนหลังจากนั้นนำส่วนผสมของอาหารมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ยกเว้นส่วนประกอบที่เป็นแป้งนำไปเคี่ยวให้สุก ก่อนนำมาผสมให้เข้ากับวัสดุอื่น และนำมาเข้าเครื่องบดเนื้อทำอาหารให้เป็นเม็ด ให้ได้ขนาดของเม็ดอาหารเท่ากับ 4 มิลลิเมตรที่อุณหภูมิห้อง นำไปอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารที่ได้ใส่ถุงพลาสติกและเก็บรักษาไว้ในภาชนะมืดที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4. การดำเนินการทดลอง

สถานที่ดำเนินการทดลอง

สถานที่ดำเนินการทดลองที่ ฉลองเบย์ฟาร์ม ตำบล อ่าวฉลอง อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทดลองในช่วงเดือน มกราคม – กุมภาพันธ์ พ.ศ.2546 ใช้ระยะเวลาในการทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

การเตรียมบ่อทดลอง

บ่อทดลองเป็นบ่อซีเมนต์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 2x8x1 เมตร^3 จำนวน 4 บ่อ บ่อละ 1 การทดลอง เตรียมน้ำเพื่อใช้ทดลองเลี้ยงโดยนำน้ำทะเลมาจากอ่าวฉลองขึ้นมากรอง ผ่านถุงกรองขนาด 150 ไมครอน ลงในบ่อพักน้ำที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเข้มข้น นำน้ำที่บำบัดแล้วมาใส่บ่อทดลอง ก่อนนำน้ำลงบ่อทำการกรองอีก 1 ครั้ง ใส่น้ำในบ่อทดลองให้ได้ระดับประมาณ 50 เซนติเมตร ให้อากาศและใช้ผ้าเต้นท์คลุมบ่อทดลองเพื่อให้มีแสงที่เหมาะสมต่อกุ้งทดลอง

การเตรียมพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ

นำพ่อพันธุ์กุ้งบ่อดินจากจังหวัดกระบี่ โดยคัดเลือกพ่อพันธุ์กุ้งที่มีน้ำหนักประมาณ 80-120 กรัม ที่เลี้ยงรวมกับปลาเก๋า ในบ่อดินขนาด 1 ไร่เศษ โดยกุ้งก่อนนำมาทดลองได้รับอาหารเป็นปลาสดสลับกับอาหารเม็ดสำหรับกุ้งใหญ่ ขนส่งพ่อพันธุ์กุ้งจากจังหวัดกระบี่มายังฉลองเบย์ฟาร์ม จังหวัดภูเก็ต โดยการลำเลียงทางรถขนส่ง นำพ่อพันธุ์กุ้งบ่อดินมาปรับสภาพในบ่อก่อนการทดลอง 7 วัน ให้อาหารสดทั้งหมด แล้วค่อยปรับให้อาหารตามการทดลองที่กำหนด หลังจากนั้นติดเครื่องหมายที่ก้านตา บันทึกน้ำหนัก ความยาวของตัวกุ้ง (Carapace length) และลักษณะภายนอกต่างๆ เช่น กรีหัก หางขาด หรือลอกคราบ นำกุ้งไปปล่อยลงในบ่อที่เตรียมไว้ โดยปล่อยกุ้งเพศผู้บ่อละ 15 ตัว

การทดลองผลของอาหารต่อการเจริญพันธุ์ของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ

ดำเนินการทดลองแบบ Completely randomized design โดยมีองค์ประกอบปัจจัยดังนี้

การทดลองที่ 1 อาหารธรรมชาติ ประกอบด้วย หอย ปลาหมึก แม่เพรียง (Control, C)

การทดลองที่ 2 อาหารเม็ดทดลอง (Experiment, E)

การทดลองที่ 3 อาหารเม็ดทดลองและอาหารธรรมชาติ ชนิดละ 50 เปอร์เซ็นต์ (C+E)

การทดลองที่ 4 อาหารเม็ดพ่อแม่พันธุ์ ต่างประเทศ (Broodstock Commercial Feed) (MBF)

การให้อาหารและการจัดการ

ให้อาหารธรรมชาติเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำนักตัวกุ้งต่อวัน และอาหารเม็ดทดลองเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน โดย

การทดลองที่ 1 อาหารธรรมชาติ ประกอบด้วย หอย ปลาหมึก แม่เพรียง ให้สลับกันทุกวัน โดยแต่ละวันจะให้อาหารชนิดเดียวกันทั้ง 6 มื้อ

การทดลองที่ 2 อาหารเม็ดทดลอง ให้ทั้ง 6 มื้อต่อวัน

การทดลองที่ 3 อาหารเม็ดทดลองและอาหารธรรมชาติ ชนิดละ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละวันจะให้อาหารเม็ดทดลองในช่วงเวลา 20.00, 24.00 และ 04.00 นาฬิกา ส่วนอาหารธรรมชาติจะให้เวลา 08.00, 12.00 และ16.00 นาฬิกา และ

การทดลองที่ 4 อาหารเม็ดพ่อแม่พันธุ์ ต่างประเทศ (Broodstock Commercial Feed) ให้ทั้ง 6 มื้อต่อวัน

อาหารที่ให้ใน 1 วัน แบ่งเป็น 6 มื้อในเวลา 04.00 08.00 12.00 16.00 20.00 และ 24.00 นาฬิกา ปรับปริมาณการให้อาหารทุกมื้อเมื่ออาหารขาดหรือเหลือค่อนข้างมาก ตรวจดูเศษอาหารตกค้างทุกวันและตรวจสอบการลอกคราบ และการตาย เปลี่ยนถ่ายน้ำวันเว้นวัน โดยถ่ายน้ำออกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำความสะอาดบ่อด้วยการใช้ฟองน้ำถูรอยคราบอาหารที่ขอบบ่อให้สะอาด

การตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำในบ่อพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ

ปัจจัยทางกายภาพที่ควบคุมคุณภาพของน้ำในบ่อ ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ อากาศ ความเค็ม ค่าพีเอช ดีโอ อัลคาไลน์ ไนไตรท์ โดยที่ความเค็มของน้ำมีค่าประมาณ 30 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชประมาณ 8 และ ค่าอัลคาไลน์ควรอยู่ประมาณ 130-150 แอมโมเนียควรน้อยกว่า 1 โดยทำการตรวจวัดในช่วงหลังจากเปลี่ยนถ่ายน้ำ

การเก็บข้อมูลงานวิจัย

1. การวัดความยาวตัว (Carapace length) และน้ำหนักของพ่อพันธุ์กุ้งจากทะเลและบ่อดินก่อนและหลังการทดลอง 1 เดือน
2. การตรวจสอบคุณภาพของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ น้ำหนักของถุงสเปิร์ม จำนวนสเปิร์มสุทธิ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่ผิดปกติ และ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

การตรวจสอบคุณภาพของสเปิร์ม ดำเนินการตามวิธีของ Leung-Trujillo and Lawrence (1985) โดยดำเนินการดังต่อไปนี้

1. คัดเลือกพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจนับคุณภาพของสเปิร์ม โดยเลือกตัวที่ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่น ทำการชั่งวัดน้ำหนัก และความยาวของตัวกุ้ง
2. ใช้อุปกรณ์ในการช็อตเสปิร์มทำการช็อตเอาถุงน้ำเชื้อออกมาใส่ลงในจานแก้ว (petri-dish) ที่มีน้ำทะเลสะอาดความเค็มเดียวกับที่ใช้เลี้ยงพ่อพันธุ์
3. นำคีมครีบ (forceps) ดึงเอาถุงน้ำเชื้อออกมา แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักของถุงสเปิร์มให้มีขนาดใกล้เคียง 0.0001 กรัม
4. นำถุงสเปิร์มมาบดในหลอดใส่ตัวอย่างที่มีน้ำทะเลเจือจาง 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเอาเศษถุงออกให้เหลือแต่น้ำที่มีสเปิร์มเจือจางลอยอยู่
5. นำสเปิร์มไปตรวจวัดโดยตรวจนับจากสไลด์นับเม็ดเลือด (Heamacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคำนวณเป็นจำนวนสเปิร์มทั้งหมดในถุงสเปิร์ม (Total number of sperm)

เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่ผิดปกติ (เปอร์เซ็นต์ Abnormal sperm) โดยสังเกตจากส่วนหัวของสเปิร์มที่ผิดปกติ หรือหัวเบี้ยว spike ขาด

6. หลังจากนั้นตรวจหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์ Live sperm) โดยการย้อมสีทริปแพนบลู (Trypan blue stain) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันและคำณวนเป็นเปอร์เซ็นต์ สเปิร์มที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์ Live sperm)

เปอร์เซ็นต์ สเปิร์มที่มีชีวิต = 100 x (สเปิร์มที่มีชีวิต(ไม่ติดสี) /สเปิร์มทั้งหมด)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบผลของอาหารต่อคุณภาพของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ และค่ากรดไขมันในอวัยวะต่างๆที่วิเคราะห์ได้ด้วย ANOVA และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย