

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาทดลองในครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นส่วนของการสร้างสูตรอาหาร ทำการเก็บตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากธรรมชาติ อาหารธรรมชาติ ได้แก่ เปรียง หมึก และหอย รวมทั้งวัสดุอาหารที่ใช้ในการผสมอาหาร อันได้แก่ ปลาป่น หมึกป่น กากถั่วเหลือง หัวกุ้งป่นและแป้งสาลี เพื่อนำมาวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการทางอาหาร ตามวิธีของ AOAC (1990) ดังนี้

- การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นและปริมาณวัตถุแห้ง ด้วยวิธี oven-drying
  - การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า ด้วยวิธี muffle furnace combustion
  - การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันด้วยวิธี ether extraction
  - การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method
  - การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย
  - การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่อง gas-liquid chromatography
- หลังจากนั้นจะนำข้อมูลเหล่านี้มาสร้างสูตรอาหารทดลอง ส่วนที่สองเป็นการทดลองเลี้ยงแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยอาหารชนิดต่างๆ

#### การคำนวณสูตรอาหาร

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการของวัสดุอาหาร มาสร้างสูตรอาหารให้มีสัดส่วนของกรดไขมันใกล้เคียงกับเปรียง โดยคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสำเร็จรูปสำหรับแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำอ้างอิงจาก Millamena et al. (1986)

#### การเตรียมอาหาร

นำวัตถุดิบอาหารทั้งหมดมาบดให้ละเอียด และนำแป้งสาลีมาต้มให้สุกก่อนผสมอาหาร จากนั้นนำมาผสมแบบหมาด อัดผ่านเครื่องบดเนื้อโดยใช้อุณหภูมิปกติ ให้ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอาหารทดลองเท่ากับ 4 มิลลิเมตร จากนั้นอบที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้ได้อาหารหมาด อาหารทดลองที่ได้จะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อรักษาคุณค่าของอาหาร

### การทดสอบอาหาร

นำอาหารที่สร้างมาทำการทดสอบอาหารโดยดูความคงทนในน้ำโดยนำอาหารทดลองมาแช่ไว้ในน้ำ ตรวจสอบความคงทนที่เวลาต่างกัน อาหารที่เหมาะสมคือ อาหารสามารถคงตัวได้ในน้ำนานประมาณ 30 นาที และความขวนกินของอาหาร โดยนำอาหารทดลองที่สร้างมาทดลองให้กึ่งกิน โดยปรับสูตรจนกระทั่งกึ่งยอมรับอาหาร

### การทดลองเลี้ยง

จัดชุดการทดลองที่คลองเบย์ฟาร์ม จ.ภูเก็ต ประกอบด้วยบ่อซีเมนต์ขนาด 10 ตันจำนวน 4 บ่อ บ่อละ 12 ตัว โดยอัตราปล่อยประมาณ 1 ตัวต่อตารางเมตร บรรจุน้ำให้มีความสูง 50 เซนติเมตร ความเค็ม 30 ppt อัตราการเปลี่ยนถ่ายน้ำเพื่อรักษาคุณภาพน้ำอยู่ที่ 50 % ค่าคุณภาพน้ำที่ตรวจเช็คประจำ คือ อุณหภูมิ ความเค็ม pH แอมโมเนีย ไนโตรเจน ไนเตรต ภายในบ่อซีเมนต์ประกอบด้วย หัวทรายเพื่อเพิ่มอากาศในบ่อ

### สัตว์ทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ใช้แม่กุ้งกุลาดำที่มีการพัฒนาของรังไข่ระยะที่ 0 จากทะเลน้ำตื้น จังหวัดภูเก็ต ความเค็ม 30 ppt แม่กุ้งทุกตัวจะถูกทำเครื่องหมายที่ก้านตาโดยใช้เชือกสีต่างๆ รวมทั้งขี้หน้ำหนักและวัดขนาดแม่กุ้งเมื่อเริ่มและหลังการทดลอง แม่กุ้งจะถูกนำมาปรับความเคยชินต่ออาหาร ทำโดยค่อยๆผสมอาหารทดลองที่ละน้อยกับอาหารธรรมชาติ จนแม่กุ้งสามารถรับอาหารทดลองได้ ใช้เวลา 7 วัน ก่อนสุ่มแม่กุ้งลงในบ่อทดลองอาหารแต่ละชนิด

### การให้อาหาร

ศึกษาการเจริญของรังไข่และไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหาร 4 สูตรได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารพ่อแม่พันธุ์ตามท้องตลาด

สูตรที่ 2 อาหารธรรมชาติ ประกอบด้วย หอย หมึก และเพรียง

สูตรที่ 3 อาหารทดลอง

สูตรที่ 4 อาหารทดลองสลับอาหารธรรมชาติ ชนิดละ 50 เปอร์เซ็นต์

โดยให้อาหารแม่กุ้ง 6 มื้อต่อวัน เวลา 04.00น. 08.00น. 12.00น. 16.00น. 20.00น. และ 24.00น. ทำการเก็บอาหารที่เหลือทุกมื้อ และปรับปริมาณอาหารที่ให้ให้สอดคล้องกับปริมาณการกินอาหารของกุ้งในแต่ละวัน ตรวจสอบการลอกคราบและการตาย

หลังให้อาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน แม่กุ้งจะถูกตัดตาเพื่อเร่งการเจริญของไข่ จากนั้นให้อาหารทดลองต่อไป พร้อมเก็บข้อมูลจนแม่กุ้งสมบูรณ์เพศเต็มที่ หรือภายหลังตัดตา 15 วัน

ในระหว่างการทดลอง ตรวจวัดการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของแม่กุ้งด้วยตาเปล่า ด้วยการฉายแสงผ่านด้านหลังกุ้ง เพื่อจำแนกระยะของรังไข่ หากพบแม่กุ้งตัวใดสมบูรณ์เพศเต็มที่ คือมีการพัฒนาของรังไข่ระยะที่ 4 หรือสิ้นสุดการทดลอง จะทำการเก็บตัวอย่าง โดยจะทำการผ่าอวัยวะภายในบนน้ำแข็งได้แก่ ตับ และรังไข่ ซึ่งน้ำหนักเพื่อคำนวณค่า Hepatosomatic index (HI) และค่า Gonadosomatic index (GSI) และเก็บตัวอย่างทั้งสองรวมทั้งกล้ามเนื้อเพื่อตรวจวิเคราะห์กรดไขมันบางชนิด ด้วยเครื่อง gas chromatography และแบ่งรังไข่บางส่วนเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยรักษาสภาพของเนื้อเยื่อใน Bouin fixative และย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของไข่

#### การศึกษาอิทธิพลของอาหาร

วัดการตอบสนองของแม่กุ้งกุลาดำต่ออาหารแต่ละชนิด โดยพิจารณา

1. ความสมบูรณ์พันธุ์ คือ ค่า GSI และ HI
2. ระดับกรดไขมันใน กล้ามเนื้อ ตับ และรังไข่
3. เนื้อเยื่อของรังไข่

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของกรดไขมันในอวัยวะต่างๆ ข้อมูลความยาวเฉลี่ย น้ำหนักตัว ค่า GSI HI และเปอร์เซ็นต์ไข่ระยะต่างๆ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ Duncan's new multiple range test (DMRT)

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย