

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ

1. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเพรียงทราย

- 1.1 หัวทราย
- 1.2 ถังพลาสติก
- 1.3 ถังไฟเบอร์กลาส (Fiberglass) ขนาด 250 ลิตร
- 1.4 กระบะพลาสติก ขนาด 35 ซม.×50 ซม.×20 ซม.
- 1.5 สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
- 1.6 ทรายเทียม (Vermiculite)
- 1.7 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.8 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask)

2. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำในการเลี้ยงเพรียงทราย

- 2.1 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 2.2 เครื่องให้อากาศ (Air Pump)
- 2.3 เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer) PORTABLE
- 2.4 เครื่องมือวัดความเป็นกรด – เบส (pH meter) METROHM 713
- 2.5 เครื่องมือวัดออกซิเจน (Dissolved Oxygen Meter)

3. อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

- 3.1 บิวเรต (Burette)
- 3.2 ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
- 3.3 หลอดย่อย (Digestion Tube)
- 3.4 แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Bar)
- 3.5 ซ้อนตักสาร กระดาษกรอง กรวยแยก ปากคืบ ถาดอะลูมิเนียม
- 3.6 จานเพาะเชื้อ บีกเกอร์ ปีเปต เข็มเขี่ยเชื้อ ขวดรูปชมพู่ ขวดน้ำกลั่น
- 3.7 เตาเผา (Muffle Furnance)
- 3.8 อ่างปรับอุณหภูมิ (Water Bath)
- 3.9 กล้องจุลทรรศน์

- 3.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง METTELER TOLEDO AG-285
- 3.11 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker) IN NOVA
- 3.12 เครื่องย่อย (Digester)
- 3.13 โถดูดความชื้น (Desiccater)
- 3.14 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate)
- 3.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) SANYO HARRIER 18/80
- 3.16 เครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer) LAB CONCO
- 3.17 หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) TOMY SS-325
- 3.18 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow)
- 3.19 ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer) ULTRALOW,

SANYO

- 3.20 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) HEWLETT PACKARD/

HP 6890 SERIES

4. สารเคมี

- 4.1 กลูโคส (Glucose) RIEBEL-DE HAEN
- 4.2 ยีสต์สกัด (Yeast Extract) HI-MEDIA
- 4.3 วุ้น (Agar)
- 4.4 น้ำทะเล
- 4.5 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)
 - 4.5.1 เพนนิซิลลิน จี (Penicillin G)
 - 4.5.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)
- 4.6 สารละลาย ฟิซีเอส (PBS)
 - 4.6.1 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) UNIVAR
 - 4.6.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium dihydrogen phosphate)
 - 4.6.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)
- 4.7 เมทานอล (Methanol) UNIVAR
- 4.8 เฮกเซน (Hexanes) UNIVAR
- 4.9 กรดซัลฟิวริก (Sulphuric Acid) MERCK
- 4.10 โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate) UNIVAR

4.11 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulphate)

4.12 40% w/v Boric acid (40 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร)

4.13 Indicator (0.625 g methylene red, 0.480 g methylene blue ผสมลงใน 500 มิลลิลิตร ของ 95% ethyl alcohol)

วิธีการทดลองในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมทอรอสโทโคตริดส์ (*Aurantiochytrium limacinum*)

โดยนำทอรอสโทโคตริดส์ไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ / นาที แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์ ทุก 4 วัน โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ค้างเซลล์ด้วยสารละลายฟิเบส ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ / นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ปั่นเหวี่ยงแล้วไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer) แล้วทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer)

การผลิตอาหารสำเร็จรูป

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสำหรับเลี้ยงเพรียงทราย ประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง สารเหนียว วิตามินรวม แป้งสาลี น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปลาทูน่า น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์ม และทอรอสโทโคตริดส์ (*Aurantiochytrium limacinum*) ผสมเข้าด้วยกันแล้วไปอัดเม็ด แบ่งการทดลองออกเป็นสูตรอาหาร 6 สูตร และสูตรที่ 7 คือ อาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาคำตามท้องตลาด (สูตรเปรียบเทียบ) แต่ละสูตรมีปริมาณวัตถุดิบดังแสดงตารางที่ 3 – 1 โดยได้สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเพรียงทราย 7 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารที่ไม่เติมน้ำมัน (อาหารชุดควบคุม)

สูตรที่ 2 อาหารที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองตามท้องตลาด

สูตรที่ 3 อาหารที่เติมน้ำมันรำข้าวตามท้องตลาด

สูตรที่ 4 อาหารที่เติมน้ำมันปาล์มตามท้องตลาด

สูตรที่ 5 อาหารที่เติมน้ำมันปลาทูน่าตามท้องตลาด

สูตรที่ 6 อาหารที่เติมทอรอสโทโคตริดส์ (*Aurantiochytrium limacinum*)

สูตรที่ 7 อาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาคำตามท้องตลาด (สูตรเปรียบเทียบ)

ตารางที่ 3-1 ปริมาณวัตถุดิบอาหารในอาหารสำเร็จรูปที่เลี้ยงเพรียงทรายโดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

วัตถุดิบอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
ปลาป่น	25	25	25	25	25	25	อาหาร กุ้ง
กากถั่วเหลือง	25	25	25	25	25	25	
ยีสต์	10	10	10	10	10	10	
สารเหนียว (CMC)	3	3	3	3	3	3	
วิตามินรวม*	2	2	2	2	2	2	
แป้งสาลี	35	30	30	30	30	30	
น้ำมันถั่วเหลือง	-	5	-	-	-	-	
น้ำมันรำข้าว	-	-	5	-	-	-	
น้ำมันปลาล้ม	-	-	-	5	-	-	
น้ำมันปลาทูน่า	-	-	-	-	5	-	
ทรอสโทไลดรีดส์ (<i>Aurantiochytrium limacinum</i>)	-	-	-	-	-	5	
รวม	100	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ *วิตามินรวม ประกอบด้วย วิตามินเอ ดี อี เค ซี ไบโอดีน บี1, 2, 6, 12

สูตรที่ 1 ส่วนผสมประกอบด้วย ปลาป่น 25 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง 25 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ 10

เปอร์เซ็นต์ สารเหนียว 3 เปอร์เซ็นต์ วิตามินรวม 2 เปอร์เซ็นต์ แป้งสาลี 35 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 ส่วนผสมเหมือนสูตรที่ 1 โดยลดเปอร์เซ็นต์แป้งสาลีเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมน้ำมันถั่วเหลือง 5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 ส่วนผสมเหมือนสูตรที่ 2 โดยเปลี่ยนจากน้ำมันถั่วเหลืองเป็นน้ำมันรำข้าว 5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 ส่วนผสมเหมือนสูตรที่ 2 โดยเปลี่ยนจากน้ำมันถั่วเหลืองเป็นน้ำมันปลาล้ม 5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 ส่วนผสมเหมือนสูตรที่ 2 โดยเปลี่ยนจากน้ำมันถั่วเหลืองเป็นน้ำมันปลาทูน่า 5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 6 ส่วนผสมเหมือนสูตรที่ 2 โดยเปลี่ยนจากน้ำมันถั่วเหลืองเป็นทรอสโทไลดรีดส์

(*Aurantiochytrium limacinum*) 5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 7 อาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาคำตามท้องตลาด (สูตรเปรียบเทียบ)

ตารางที่ 3-2 ราคาวัตถุดิบอาหารในการผลิตอาหารสำเร็จรูปแต่ละสูตร ที่ใช้เลี้ยงเพรียงทราย
(บาท/1 กิโลกรัม)

วัตถุดิบอาหาร	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
	ราคา (บาท)	ราคา (บาท)	ราคา (บาท)	ราคา (บาท)	ราคา (บาท)	ราคา (บาท)	ราคา (บาท)
ปลาป่น	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5	อาหาร กุ้ง
กากถั่วเหลือง	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	
ยีสต์	4	4	4	4	4	4	
สารเหนียว (CMC)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
วิตามินรวม	9	9	9	9	9	9	
แป้งสาลี	13.25	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	
น้ำมันถั่วเหลือง	-	2.75	-	-	-	-	
น้ำมันรำข้าว	-	-	3.05	-	-	-	
น้ำมันปาล์ม	-	-	-	2.25	-	-	
น้ำมันปลาทูน่า	-	-	-	-	4.75	-	
ทรอสโทโคตริคส์ (<i>Aurantiochytrium limacinum</i>)	-	-	-	-	-	500	
รวม	49.75	50.75	51.05	50.25	52.75	548	800

การเตรียมกระบะทดลอง

กระบะที่ใช้ทดลองเป็นพลาสติกทึบแสงขนาด 35 เซนติเมตร × 50 เซนติเมตร × 20 เซนติเมตร จำนวน 21 กระบะ โดยใส่ทรายเทียม (Vermiculite) ที่ผ่านการร่อนและล้างทรายให้สะอาดแล้วนำไปตากแดดเพื่อฆ่าสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่มีอยู่ในทราย 5-7 วัน นำทรายที่เตรียมไว้ใส่ในกระบะให้สูง ประมาณ 10 เซนติเมตร ใส่น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิของน้ำ ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เติมน้ำทะเลสูงเหนือระดับพื้นทรายประมาณ 2 เซนติเมตร ให้อากาศบริเวณกลางกระบะในแต่ละสูตรอาหารทำ 3 ซ้ำ

การเตรียมเพรียงทรายที่ใช้ในการทดลอง

โดยเตรียมสัตว์ทดลอง อายุ 3 - 4 เดือน ความยาวเฉลี่ย 5.6 ± 0.01 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.71 ± 0.01 กรัมต่อตัว จากฟาร์มสาธิตการเพาะเลี้ยงเพรียงทราย บริษัทต้นอควาติก จำกัด จังหวัดสมุทรสงคราม นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพให้คุ้นกับสภาพแวดล้อม 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงด้วยอาหารกุ้ง

การทดลองเลี้ยงเพรียงทราย

ทำการปล่อยเพรียงทรายลงเลี้ยงจำนวน 200 ตัวต่อกระบะ คิดเป็นความหนาแน่น 1,142 ตัวต่อตารางเมตร ในการทดลองให้อาหาร 7 สูตร แต่ละสูตรทำ 3 ซ้ำ เริ่มให้อาหาร วันละ 2 มื้อ ในเวลา 6:00 น. และ 18:00 น. คิดเป็นปริมาณอาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวัน ก่อนให้อาหารต้องปิดอากาศ จากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทุกๆ 4 วัน ให้ระดับน้ำเหลือถึงระดับพื้นผิวทราย และทำการวัดค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (D.O.) ค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำ (pH) อุณหภูมิ น้ำ อุณหภูมิอากาศทุกวัน วันละ 1 ครั้ง และทำการวัดค่าแอมโมเนีย ในเตรท และไนไตรท์ (1-2 ครั้งต่ออาทิตย์) จัดบันทึกข้อมูลที่ได้ ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง 45 วัน และทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 วัน คือ 15, 30, และ 45 วัน โดยทำการเก็บข้อมูลน้ำหนักและวัดความยาวของเพรียงทรายโดยสุ่มเก็บตัวอย่างกระบะละ 60 ตัว แล้วนำตัวอย่างเก็บไว้ในตู้ทำความเย็น อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Deep Freezer) แล้วไปทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งระบบทำความเย็น (Freeze Dryer) จากนั้นนำอาหารและตัวอย่างเพรียงทรายมาบดก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เยื่อใย เถ้า และกรดไขมัน (ภาคผนวก)

สูตรการคำนวณอัตราการรอด อัตราการเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ มีดังนี้

$$\text{อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนเพรียงทรายที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง}}{\text{จำนวนเพรียงทรายเมื่อเริ่มต้นเลี้ยง}} \times 100$$

$$\text{อัตราการเติบโต (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเลี้ยง}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเลี้ยง}} \times 100$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักเพรียงทรายเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น}}$$

การวัดคุณภาพน้ำในการทดลอง ได้แก่

- ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (D.O) ใช้ Dissolved Oxygen Meter
- ความเป็นกรด-เบสของน้ำ (pH) ใช้ pH meter
- อุณหภูมิของทรายและอุณหภูมิอากาศ ใช้ Thermometer
- ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ ใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรอาหารที่เวลาเลี้ยงต่างกันด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two - Way Analysis of Variance; ANOVA) และเมื่อพบว่ามีความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร เวลา หรือปัจจัยร่วม ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตรอาหารด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ