

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเรื่องผลการใช้น้ำพืชสมุนไพรเสริมอาหารต่อการรอดตายและเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมมีวิธีดำเนินการวิจัยดังนี้

1. รูปแบบการวิจัย

1.1 วางแผนการทดลองการวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มี 6 ทริตเมนต์ๆ ละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้งทดลอง 18 ตัว ทริตเมนต์ที่ใช้ทดลองประกอบด้วย

ทริตเมนต์ที่ 1 อาหารกุ้งเสริมน้ำไม่ใช้สมุนไพร (กลุ่มควบคุม)

ทริตเมนต์ที่ 2 อาหารกุ้งเสริมน้ำต้นครอบจักรวาล

ทริตเมนต์ที่ 3 อาหารกุ้งเสริมน้ำสาหร่ายคลอเรลล่า

ทริตเมนต์ที่ 4 อาหารกุ้งเสริมน้ำหญ้าแห้วหมู

ทริตเมนต์ที่ 5 อาหารกุ้งเสริมน้ำต้นน้ำนมราชสีห์

ทริตเมนต์ที่ 6 อาหารกุ้งเสริมน้ำต้นลูกใต้ใบ

1.2 กุ้งทดลองทั้งหมดเป็นลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 12 (P12) น้ำหนักตัวเฉลี่ย 0.004 กรัม จำนวน 432 ตัวลูกกุ้งมาจากพ่อแม่เดียวกันของสายลมฟาร์ม

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการวิจัย

2.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งทดลองเป็นอาหารสำเร็จรูปทางการค้า 4 ชนิด ประกอบด้วย

2.1.1 อาหารลูกกุ้งวัยอ่อนระยะ P6 - P15 มีลักษณะเป็นผงละเอียดขนาดเล็ก มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 45% ไขมันไม่น้อยกว่า 8% คากหรือเยื่อใยไม่เกิน 3% ความชื้นไม่เกิน 8%

2.1.2 อาหารกุ้งขาวเบอร์ 901 มีลักษณะเป็นเกล็ดจมน มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 38% ไขมันไม่น้อยกว่า 5% คากหรือเยื่อใยไม่มากกว่า 3% ความชื้นไม่มากกว่า 11%

2.1.3 อาหารกึ่งเบอร์ 902 มีลักษณะเป็นเกล็ดจมน มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 38% ไขมันไม่น้อยกว่า 5% กากหรือเชื้อไขไม่มากกว่า 3% ความชื้นไม่มากกว่า 11%

2.1.4 อาหารกึ่งเบอร์ 903 มีลักษณะเป็นเกล็ดจมน มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 38% ไขมันไม่น้อยกว่า 4% กากหรือเชื้อไขไม่น้อยกว่า 4% ความชื้นไม่น้อยกว่า 12 %

อาหารทั้ง 4 ชนิด ใช้สำหรับเลี้ยงกุ้งทดลองในช่วงระยะการเจริญเติบโต ดังนี้

- 1) กุ้งระยะ P12 เมื่อเริ่มต้นการทดลองให้อาหารเสริมระหว่างอาหารลูกกุ้งวัยอ่อนระยะ P6 - P15 จำนวน 1 ส่วน ผสมอาหารกึ่งเบอร์ 901 จำนวน 4 ส่วน
- 2) กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 1 ขนาดกุ้ง 1.2–2.5 ซม. ให้อาหารกึ่งเบอร์ 901
- 3) กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 2 ขนาดกุ้ง 2.5–3.5 ซม. ให้อาหารกึ่งเบอร์ 902
- 4) กุ้งวัยอ่อนระยะที่ 3 ขนาดกุ้ง 1–3 กรัม ให้อาหารกึ่งเบอร์ 903

2.2 พืชสมุนไพร ที่ใช้ทดลอง ประกอบด้วย

2.2.1 ต้นครอบครัววาล (Abutilon indicus) ใช้เฉพาะส่วนของใบ โดยเก็บวันใบยอด 4 ใบ

2.2.2 สาหร่ายคิโดเมอร์ฟา (Chaetomorpha sp.) ใช้ทุกส่วนของพืช

2.2.3 หญ้าแห้วหมู (Cyperus rotundus) ใช้ทุกส่วนของพืช ได้แก่ ใบ เหง้าและราก

2.2.4 ต้นน้ำนมราชสีห์ (Euphorbia hirta) ใช้เฉพาะส่วนของใบ โดยวันใบยอด 4 ใบ เก็บลงมาถึงโคนต้นวันใบล่าง 1 คู่

2.2.5 ต้นลูกใต้ใบ (Phyllanthus amarus) ใช้เฉพาะส่วนของใบ โดยวันใบล่าง 2 คู่

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อวริโอ TCBS พร้อมอุปกรณ์งานเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร แท่งแก้วเชื้อเชื้อเลี้ยงเชื้อ หม้อนึ่งความดันชนิดใช้แก๊ส

2.4 เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหารทดลอง ประกอบด้วย ครกหิน เครื่องปั่นไฟฟ้าเอนกประสงค์ บีกเกอร์และกระบอกฉีดยา

2.5 เครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดคุณภาพน้ำ ประกอบด้วย เครื่องวัดออกซิเจนและวัดอุณหภูมิ น้ำยาวัดแอมโมเนีย น้ำยาวัดค่าความเป็นด่างอัลคาไลน์ pH test kit พร้อมน้ำยาวัดค่า pH และเครื่องวัดความเค็ม (Salinometer)

2.6 เครื่องมือชั่งและตวง เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง) กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 10 และ 1 มิลลิลิตร บีกเกอร์ขนาด 1,000 และ 200 มิลลิลิตร ช้อนตวงลูกกุ้ง จำนวน 1 ชุด หลอดไมโครเซนติฟิว ขนาดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.7 อื่นๆเช่น เครื่องมือที่ใช้บันทึกและรวบรวมข้อมูลปากกา ถุงเก็บอาหารกะละมัง พลาสติก ถังพลาสติกปากทรงกลมกว้างก้นทรงกลมแคบ (ทรงเทเปอร์) ปริมาตร 200 ลิตรถุงมือยาง ขวดพลาสติกใสขนาด 200 มิลลิลิตร ป้ายพลาสติกประจำตัวกุ้งสีขาว

3. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.1 ขั้นตอนเตรียมการ

3.1.1 การเตรียมน้ำพืชสมุนไพร

เตรียมน้ำกรองสำหรับใช้สกัดพืชสมุนไพร ใช้น้ำประปาผ่านเครื่องกรองแบบไม่ใช้สารเคมีนำขึ้นส่วนของพืชสมุนไพรที่จัดเตรียมไว้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบต้นครอบครัววาล สำหรับคีโตเมอร์ฟา หญ้าเหี่ยวเหี่ยวใบต้นน้ำนมราชสีห์และใบต้นลูกใต้ใบ มาล้างให้สะอาด จากนั้นหั่นด้วยมีดเพื่อให้มีขนาดเล็กลง แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าเอนกประสงค์โดยใช้ชุดโถปั่นแห้งปั่นจนละเอียดนำสมุนไพรที่ปั่นละเอียดมาโขลกด้วยครกหินให้ละเอียดอีกครั้งเพื่อให้เซลล์พืชสมุนไพรเข้าหรือแตกผสมสมุนไพรกับน้ำกรอง ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้พืชสมุนไพรสดละเอียด 200 กรัม ต่อน้ำประปาผ่านการกรองแบบไม่ใช้สารเคมี 200 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยถุงผ้ากรองน้ำขนาด 120T เก็บน้ำพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่กรองแล้วใส่ขวดพลาสติกปิดฝาแล้วแช่เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Parekh et al., 2006) นำมาใช้เมื่อต้องการ

3.1.2 การเตรียมอาหารทดลอง

- 1) ทำการเตรียมน้ำพืชสมุนไพรกับอาหารกุ้งสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยชั่งอาหารกุ้ง 500 กรัมใส่กะละมังพลาสติกเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร
- 2) จากนั้นเตรียมน้ำพืชสมุนไพรแต่ละชนิด (ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) จำนวน 25 มิลลิลิตร โดยสเปรย์น้ำพืชสมุนไพรลงในอาหารกุ้ง (อัตราการเตรียมน้ำพืชสมุนไพร 50 มิลลิลิตรต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม)
- 3) นำอาหารแต่ละทริตเมนต์ไปผึ่งให้แห้ง แล้วชั่งเตรียมไว้ บรรจุถุงซิปลพลาสติกใส และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ซึ่งเป็นไปตามตารางการให้อาหาร โดยให้อาหารตามค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว เช่น มือแรก ให้อาหารมีอัตรา 0.09 กรัม

3.1.3 การเตรียมบ่อทดลอง

- 1) จัดเตรียมพื้นที่ ขนาด 1.50×24 เมตร สำหรับวางถังพลาสติกทรงเทเปอร์ ขนาดความจุ 200 ลิตรโดยจัดวางโดยเรียงถึงเรียบชายคา เพื่อให้ได้รับแสงเท่ากันมีหลังคากันน้ำฝน ติดยึดต่อวาล์วปรับลมพลาสติก สำหรับให้อากาศ

2) เติมน้ำทะเลผ่านการตักตะกอนแบบไม่มีการฆ่าเชื้อ ลงในถังๆละ 100 ลิตร ตามระดับข้างถึง

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

3.2.1 กุ้งทดลองลงถึงทดลองถึงละ 18 ตัวจำนวน 24 ถัง

3.2.2 ให้อาหารทดลอง ตามแผนการทดลอง ปริมาณการให้อาหารเป็นไปตามข้อเสนอแนะของบริษัทผู้ผลิตอาหาร โดยแบ่งให้วันละ 3 ครั้ง หากสังเกตพบว่ามีอาหารเหลือที่พื้นถึงทดลองจะลดอาหารลงเหลือ 2 ครั้ง

3.2.3 จัดการดูแลสภาพทั่วไป การปฏิบัติเลี้ยงดูกุ้งทดลองทุกทรีตเมนต์เป็นไปในลักษณะเดียวกัน

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

4.1 บันทึกน้ำหนักกุ้งชั่งน้ำหนักกุ้งทดลองในวันแรกและเมื่อสิ้นสุดการทดลองของแต่ละถึง คำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย (Average Daily Gain, ADG) ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย (กรัม/ตัว/วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{จำนวนวันทำการทดลอง}}$$

4.2 บันทึกปริมาณอาหารที่กุ้งกิน บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้กุ้งกินตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนสิ้นสุดการทดลองของแต่ละถึง แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการแลกเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR)

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ให้กุ้งกินในแต่ละถึง}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นในแต่ละถึง}}$$

4.3 บันทึกการตายของกุ้งทดลองบันทึกจำนวนตัวกุ้งเมื่อเริ่มต้นทดลองและจำนวนกุ้งตายเพื่อคำนวณหาอัตราการรอดตายของกุ้งทดลอง

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{(\text{จำนวนกุ้งทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการทดลอง} - \text{จำนวนกุ้งตาย}) \times 100}{\text{จำนวนตัวกุ้งทั้งหมดในแต่ละถึง}}$$

4.4 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองทุกวันที่ 7 ของสัปดาห์ ก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ นำน้ำตัวอย่างไปตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่

4.4.1 **อุณหภูมิของน้ำ** ใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ Dissolved Oxygen Meter (LT lutron รุ่น DO-5519)

4.4.2 **ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ** ใช้เครื่องวัดออกซิเจน Dissolved Oxygen Meter (LT lutron รุ่น DO-5519)

4.4.3 **ค่าความเป็นด่าง** ใช้ชุดน้ำยาทดสอบ Alkalinity test kit (PARA TEST)

4.4.4 **ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)** ใช้ชุดน้ำยาทดสอบ pH test kit (SONA TEST)

4.4.5 **ปริมาณแอมโมเนียที่ละลายน้ำ** ใช้ชุดน้ำยาทดสอบน้ำยาวัดแอมโมเนีย Ammonia test Kit (AQUA AM)

4.4.6 **ค่าความเค็มของน้ำ** ใช้เครื่องวัดความเค็ม Salinometer (ATAGO รุ่น S/MILL)

4.5 วิเคราะห์ปริมาณเชื้อไวรัส หลังชั่งน้ำหนักกุ้งทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำตัวกุ้งทดลองมาทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และตรวจนับจำนวนโคโลนี (colony) ของเชื้อไวรัสโอสเทียและสปีชีส์ ตามวิธีการของชัยวุฒิ สุกทองคง (2557) และณัฐพงษ์ ธนันทชัยขมพู และคณะ (2550)

$$\text{จำนวนเชื้อไวรัสโอสเทีย (cfu/g)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีโอสเทียบนอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างสารละลายตัวกุ้งทดลองที่ใส่จานเลี้ยงเชื้อ}}$$

$$\text{จำนวนเชื้อไวรัสโอสเทีย (cfu/g)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีสปีชีส์บนอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างสารละลายตัวกุ้งทดลองที่ใส่จานเลี้ยงเชื้อ}}$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่เก็บรวบรวมมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6. สถานที่ทำการทดลอง

สายลม ฟาร์ม 13/3 หมู่ที่ 3 ตำบล กุยเหนือ อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ ทะเบียนฟาร์ม 77-02-000447 เลขที่ GAP 1501-01-55-01315

7. ระยะเวลาทดลอง

ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 70 วัน ตั้งแต่วันที่ 25 ตุลาคม 2556 ถึง 4 มกราคม 2557

