# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## 2.1 วัสดุ

2.1.1 วัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารทดลอง ได้แก่ ปลาป่น, ถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน, หัวกุ้งป่น, รำ, น้ำมันปลา, วิตามินรวม, แร่ธาตุรวม, บีเอชที, แป้งมัน, แป้งข้าวเจ้า, แกลบป่น และโครมิกออกไซด์ (แหล่งที่มาของวัตถุดิบอาหารอยู่ในตารางที่ ค-34)

2.1.2 ปลาเป็ด

2.1.3 ปลากะพงขาว ขนาดความยาว 3.5 เซนติเมตร (น้ำหนักเฉลี่ย 0.5 กรัม/ตัว) จำนวน 1,500 ตัว

2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ, องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหาร และองค์ประกอบของมูลและตัวปลา

2.1.5 ยาสลบปลา 2-phenoxyethanol

## 2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง

2.2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร

2.2.1.2 ตู้ทดลองขนาดความจุ ประมาณ 81 ลิตร และชั้นวาง

2.2.1.3 ระบบน้ำไหล และ ระบบน้ำทิ้งโดยใช้ท่อน้ำล้นเป็นตัวควบคุมระดับน้ำ

2.2.1.4 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.2.1.5 อุปกรณ์ถ่ายเปลี่ยนน้ำ ได้แก่ สายยาง

2.2.1.6 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิงสำหรับตักปลา ถังพลาสติก

2.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.2.1 เครื่องผสมอาหาร ของบริษัท Hobart

2.2.2.2 เครื่องอบอาหาร

2.2.2.3 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

2.2.2.4 ตู้แช่แข็ง ใช้เพื่อเก็บอาหารทดลองระหว่างรอการนำไปใช้

2.2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.2.3.1 อุปกรณ์วัดความเค็ม ได้แก่ Salinorefractometer รุ่น ATAGO S 10-E ของบริษัท ATAGO

2.2.3.2 อุปกรณ์วัดความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ เครื่อง pH meter รุ่น Denver Model 58 ของบริษัท Denver

2.2.3.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย, ไนไตรท์, ไนเตรท และฟอสเฟต ได้แก่ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, UV–1200) ของบริษัท Shimadzu ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ไปเปต ลูกยาง

2.2.3.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) ได้แก่ บิวเรต ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ไปเปต ลูกยาง

2.2.3.5 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ความเป็นด่าง ได้แก่ บิวเรต ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ไปเปต ลูกยาง

2.2.3.6 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์

2.2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองและร่างกายปลา

2.2.4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ โถอบแห้ง (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อยโปรตีน (digestion apparatus, Kjeldatherm) ของบริษัท Gerhardt เครื่องกลั่น (distillation apparatus, Vapodest I) ของบริษัท Gerhardt หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่

2.2.4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของบริษัท Gallenkamp

2.2.4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ เครื่องวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ของบริษัท Tecator

2.2.5 อุปกรณ์เก็บมูลปลา ได้แก่ สายยาง ถุงผ้า

2.2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์โครมิกออกไซด์ในอาหารและมูลปลา

2.2.6.1 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน เช่นเดียวกับข้อ 2.2.4.2

2.2.6.2 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, UV–1200) ของบริษัท Shimadzu

## 2.3 วิธีการทดลอง

### 2.3.1 การเตรียมการทดลอง

#### 2.3.1.1 การเตรียมอุปกรณ์การอนุบาลและการเลี้ยง

เตรียมถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร พร้อมด้วยระบบน้ำไหล สำหรับอนุบาลลูกปลากะพงขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.5 กรัม/ตัว จนกระทั่งได้ขนาดทดลอง และตู้ทดลองขนาด 30 x 60 x 45 เซนติเมตร ความจุ 81 ลิตร บรรจุน้ำ 54 ลิตร ใช้พลาสติกสีทึบปิด 3 ด้าน เพื่อป้องกันการรบกวน โดยจัดวางแถวละ 12 ตู้ จำนวน 2 แถว พร้อมทั้งติดตั้งระบบน้ำไหลที่ควบคุมอัตราการไหลของน้ำ 0.5 ลิตร/นาที และระบบให้อากาศในทุกตู้ทดลอง

#### 2.3.1.2 การเตรียมปลาสำหรับทำการทดลอง

นำปลากะพงขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.5 กรัม/ตัว (ความยาวประมาณ 3.5 เซนติเมตร) จำนวน 1,500 ตัว จากบ่อเลี้ยงของศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสทรงกลม ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เลี้ยงในระบบน้ำไหล ความเค็มประมาณ 33.29$\pm$0.23 ส่วนในพัน และให้ออกซิเจนตลอดเวลา โดยให้อาหารเม็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (ตารางที่ ค-33) อนุบาลลูกปลาวันละ 2 มื้อ เพื่อฝึกให้ปลาเคยชินกับอาหาร จนกระทั่งลูกปลายอมรับอาหารเม็ดและมีน้ำหนักประมาณ 0.9 กรัม/ตัว จากนั้นจึงคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันใส่ตู้ทดลองขนาด 30 x 60 x 45 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 54 ลิตร ที่ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศและระบบน้ำไหลผ่านตลอดไว้เรียบร้อยแล้ว จำนวนตู้ละ 30 ตัว เพื่อปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับตู้ทดลองและอาหารทดลอง จากนั้นจึงคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันในแต่ละตู้ทดลองเหลือ 15 ตัว และชั่งน้ำหนักโดยการแทนที่น้ำ

#### 2.3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

โดยสร้างสูตรอาหารทดลอง 6 สูตร ให้มีระดับโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ ทุกชุดการทดลอง (ดัดแปลงจากมะลิ และคณะ, 2539) แต่ให้มีโปรตีนจากถั่วเหลืองแทนที่โปรตีนจากปลาป่นที่ระดับ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนจากปลาป่นในอาหารสูตรที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

เตรียมอาหารโดยชั่งวัสดุอาหารแต่ละชนิดได้แก่ ปลาป่น, ถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน, หัวกุ้งป่น, รำ, วิตามินรวม, แร่ธาตุรวม, บีเอชที, แป้งข้าวเจ้า และแกลบป่น ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นผสมส่วนประกอบวัสดุอาหารให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมอาหาร แล้วจึงเติมน้ำมันปลาที่ผสมวิตามินที่ละลายในไขมัน เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วจึงเติมน้ำ ส่วนการเตรียมวิตามิน

และแร่ธาตุ โดยชั่งวิตามินและแร่ธาตุแต่ละชนิดด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง จากนั้นจึงนำวิตามินและแร่ธาตุมาบดให้ละเอียด ผสมให้ทุกส่วนเข้ากันดี สำหรับวิตามินซี และโคลีนคลอไรด์ (choline chloride) นำมาละลายน้ำ สารละลายที่ได้นำไปผสมกับวัสดุอาหารแห้งอื่นๆ ที่ผสมเข้ากันดีแล้วในเครื่องผสมอาหาร แล้วจึงเติมแป้งมันที่ทำให้สุกแล้วผสมในอาหารจนวัสดุอาหารเข้ากันดีอีกครั้ง จากนั้นจึงนำอาหารเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร (Hobart) ผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอาหารแห้ง นำไปบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารได้แก่ โปรตีน, ไขมัน, ความชื้น และเถ้าตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1980) สำหรับคาร์โบไฮเดรทได้จากการคำนวณตามสูตร 100 – (โปรตีน + ไขมัน + เถ้า + ความชื้น) และฟอสฟอรัสโดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC (1990) ก่อนนำไปใช้ในการทดลองเลี้ยง

**ตารางที่** 3 ส่วนประกอบของอาหารทดลองที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาว (กรัม/100 กรัม)

| ส่วนประกอบ (กรัม) | สูตรอาหาร | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| ปลาป่น (63%โปรตีน) | 56 | 50 | 45 | 39 | 33 | 28 |
| ถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน | 0 | 7.6 | 15 | 23 | 31 | 38 |
| หัวกุ้งป่น | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| รำ | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| น้ำมันปลา | 3.7 | 3.9 | 4.1 | 4.3 | 4.4 | 4.7 |
| วิตามินรวม[1] | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| แร่ธาตุรวม[2] | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| บีเอชที | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| แป้งมัน | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| แป้งข้าวเจ้า | 8.1 | 6.9 | 4.85 | 3.3 | 1.75 | 0.08 |
| แกลบป่น | 2.98 | 2.38 | 1.83 | 1.18 | 0.63 | 0 |
| โครมิกออกไซด์[3] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| พลังงานรวม[4] | 3968 | 3967 | 3974 | 3971 | 3973 | 3973 |

[1]วิตามินรวม (มก./กก. อาหาร) : Thiamin HCl 60, Riboflavin 100, Pyridoxine HCl 40, Choline chloride 5,000, Niacin 400, Ca - Pantothenate 100, Ascorbic acid 500, Inositol 2,000, Biotin 6, Folic acid 15, Vitamin $B_{12}$ 0.1, Menadione 50, Tocopherol acetate 100, Vitamin $AD_3$ (500 IU of A+100 IU of $D_3$/mg) 8.

[2]แร่ธาตุรวม (ก./กก. อาหาร) : $CaHPO_4$ 8, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 15, $KH_2PO_4$ 10, KCl 5.

[3]โครมิกออกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมแป้งข้าวเจ้าที่อัตราส่วน 1 : 1

[4]พลังงานรวม (กิโลแคลลอรี่/กิโลกรัมอาหาร) คำนวณจากค่าพลังงานของโปรตีน = 5.64, ไขมัน = 9.44 และคาร์โบไฮเดรท = 4.11 (NRC, 1993)

**2.3.2 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร**

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยมีชุดการทดลอง (treatment) 7 ชุด ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 มีโปรตีนจากปลาป่น 35.11 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 0 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 มีโปรตีนจากปลาป่น 31.35 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 3.52 เปอร์เซ็นต์ (แทนที่ 10 เปอร์เซ็นต์โปรตีนจากปลาป่น)

ชุดการทดลองที่ 3 มีโปรตีนจากปลาป่น 28.21 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 6.9 เปอร์เซ็นต์ (แทนที่ 20 เปอร์เซ็นต์โปรตีนจากปลาป่น)

ชุดการทดลองที่ 4 มีโปรตีนจากปลาป่น 24.45 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 10.65 เปอร์เซ็นต์ (แทนที่ 30 เปอร์เซ็นต์โปรตีนจากปลาป่น)

ชุดการทดลองที่ 5 มีโปรตีนจากปลาป่น 20.69 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 14.35 เปอร์เซ็นต์ (แทนที่ 40 เปอร์เซ็นต์โปรตีนจากปลาป่น)

ชุดการทดลองที่ 6 มีโปรตีนจากปลาป่น 17.55 เปอร์เซ็นต์ . มีโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน 17.59 เปอร์เซ็นต์ (แทนที่ 50 เปอร์เซ็นต์โปรตีนจากปลาป่น)

ชุดการทดลองที่ 7 ใช้ปลาเป็ด (ปลาหลังเขียวสดแล่เนื้อ และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ)

จัดชุดการทดลอง และหน่วยทดลองโดยการสุ่มด้วยการจับฉลาก ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (replicate) ซึ่งใช้ปลาทดลองจำนวน 15 ตัวต่อซ้ำ โดยมีการเก็บตัวอย่างปลาจำนวน 100 กรัมเพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของซากปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ขณะศึกษาเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ให้ปลากินอาหารทดลองจนอิ่ม โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้าเวลา 09.00 น. และช่วงเย็นเวลา 15.00 น. โดยก่อนให้อาหารทำความสะอาดตู้ทดลองและดูดตะกอน บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้เพื่อทราบปริมาณอาหารที่ปลากินในแต่ละวัน และลักษณะผิดปกติภายนอก ได้แก่ สีของลำตัว การตกเลือด และการเกิดบาดแผล รวมทั้งสังเกตพฤติกรรมที่ผิดปกติในปลาแต่ละกลุ่ม และมีการใช้ยาและสารเคมีเพื่อป้องกันโรคตามสภาพของปลา

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักปลาหลังจากปลากินอาหาร 18 ชั่วโมง โดยสลบปลาด้วยยาสลบ 2-phenoxyethanol ความเข้มข้น 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างปลาในแต่ละตู้ จำนวน 5 ตัวต่อตู้ นำไปเก็บในตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

จากนั้นนำปลาทั้งตัวไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวปลาแห้ง แล้วจึงนำไปใส่โถดูดความชื้นรอจนกว่าตัวปลาเย็น จึงชั่งน้ำหนักหาความชื้นของตัวปลา ทำซ้ำจนกระทั่งได้ค่าความชื้นคงที่ แล้วจึงบดปลาทั้งตัวให้ละเอียดและนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง ก่อนนำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน, ไขมัน เถ้า และความชื้นของซากปลาที่ได้รับอาหารแต่ละสูตร ตามวิธีการของ AOAC (1980) และฟอสฟอรัสโดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก AOAC (1990)

นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าต่างๆ ได้แก่ อัตรารอด (survival rate) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม (weight gain, %) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency ratio, FER) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER) โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (productive protein value, %) (Paspatis *et al*., 2000; Nankervis *et al*., 2000)

อัตรารอด (survival rate, %)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้น}}$$

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่ม (weight gain, %)

$$= \frac{(\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}) \times 100}{\text{น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้น (กรัม)}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, %/วัน)

$$= \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{T_2 - T_1} \times 100$$

$W_1$ = น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

$W_2$ = น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

$T_1$ = วันที่เมื่อเริ่มต้นการทดลอง

$T_2$ = วันที่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR)

$$= \frac{\text{น.น.อาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น.น.ปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม) - น.น.ปลาเมื่อเริ่มต้น (กรัม)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed efficiency ratio, FER)

$$= \frac{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น.น.อาหารที่ปลากิน (กรัม)}}$$

ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio, PER)

$$= \frac{\text{น.น.ปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากิน (กรัม)}}$$

โปรตีนที่นำไปใช้ประโยชน์ (productive protein value, %)

$$= \frac{\text{โปรตีนของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น.น.โปรตีนที่ปลากินตลอดการทดลอง (กรัม)}} \times 100$$

**2.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน**

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนโดยวิธีทางอ้อมที่มีโครมิกออกไซด์ ($Cr_2O_3$) เป็นฉลาก (marker) ในอาหาร ให้ปลาทดลองกินอาหารที่มีส่วนผสมของโครมิกออกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มเก็บมูลปลาหลังจากปลายอมรับอาหารที่มีส่วนผสมของโครมิกออกไซด์แล้วเป็นเวลาประมาณ 15 วัน โดยวิธีกาลักน้ำมูลปลาลงสู่ถุงเก็บมูลหลังจากการให้อาหาร 2 ชั่วโมง และนำไปแช่แข็ง เก็บรวบรวมมูลปลาเป็นเวลา 30 วัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นนำมูลปลาที่เก็บได้ไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมูลปลาแห้ง แล้วจึงบดมูลปลาที่แห้งแล้วและเก็บไว้ในตู้แช่แข็งจนกว่าจะวิเคราะห์ หลังจากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ AOAC (1980) หาปริมาณโครมิกออกไซด์ ตามวิธีการของ Furukawa และ Tsukahara (1966) ในอาหารและมูลปลา คำนวณค่าโครมิกออกไซด์ในอาหารและมูลปลา ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเมื่อใช้โครมิกออกไซด์เป็นอินดิเคเตอร์ (De Silva and Anderson, 1995) โดยใช้สมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน} = 100 - \left( \frac{\%\ Cr_2O_3\text{ในอาหาร} \times \%\ \text{โปรตีนในมูล} \times 100}{\%\ Cr_2O_3\text{ในมูล} \times \%\text{โปรตีนในอาหาร}} \right)$$

**2.3.4 การศึกษาปริมาณการขับถ่ายไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของปลากะพงขาว**

2.3.4.1 การศึกษาปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตโดยวิธีทางเคมี

1) ศึกษาปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตหลังจากปลาได้รับอาหารที่เวลาต่างๆ กัน เพื่อหาช่วงเวลาที่ปลาขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตสูงที่สุด ขณะศึกษาให้อาหารตามปกติคือ 2 ครั้งต่อวัน ที่อัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โดยเก็บตัวอย่างน้ำก่อนเริ่มให้อาหารมื้อแรก และอีก 6 ครั้งทุก 2 ชั่วโมงหลังจากให้อาหารมื้อแรก เก็บตัวอย่างน้ำ 2 วันในช่วงสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดพลาสติก ตัวอย่างละประมาณ 1 ลิตร นำตัวอย่างน้ำใส่กระติกที่บรรจุน้ำแข็งแล้วจึงนำไปแช่แข็งเพื่อรอการนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียรวม, ไนไตรท์, ไนเตรท และฟอสเฟต ตามวิธีของ Strickland และ Parsons (1972) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ห้องปฏิบัติการเคมีของศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล และเก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวด BOD ทุกๆ ครั้งเพื่อมาวิเคราะห์ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำที่ห้องปฏิบัติการเคมีของศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล ขณะเก็บตัวอย่างน้ำทำการวัดอุณหภูมิน้ำ, ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความเค็ม ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาคำนวณตามสูตร

ปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนีย (มก.แอมโมเนีย-ไนโตรเจน/กก.ปลา/ชม.)
= (ปริมาณแอมโมเนียหลังจากให้อาหารมื้อแรกของแต่ละหน่วยทดลองและแต่ละช่วงเวลา
- ปริมาณแอมโมเนียก่อนเริ่มให้อาหารมื้อแรกของแต่ละหน่วยทดลอง) x
(1000/น้ำหนักปลาเฉลี่ยของแต่ละหน่วยทดลองช่วงเก็บตัวอย่างน้ำ)

สำหรับค่าปริมาณไนไตรท์, ไนเตรท และปริมาณการขับถ่ายฟอสเฟต หาโดยการแทนค่าตามสูตรข้างต้น จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง (n=3) และแต่ละช่วงเวลา แล้วจึงนำค่าเฉลี่ยดังกล่าวของวันที่ 1 และ 2 มาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง (n=2) และแต่ละช่วงเวลา

2) ศึกษาปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตช่วงสูงสุดที่ 10 และ 12 ชั่วโมงหลังปลาได้รับอาหาร (จากการศึกษาปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตหลังจากปลาได้รับอาหารที่เวลาต่างๆ กัน) ขณะศึกษาให้อาหารเช่นเดียวกับการศึกษาปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตหลังจากปลาได้รับอาหารที่เวลาต่างๆ กัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำก่อนเริ่มให้อาหารมื้อแรก และที่เวลา 10 และ 12 ชั่วโมงหลังจากให้อาหาร เก็บตัวอย่างน้ำ 1 วันในช่วงสัปดาห์ที่ 12 ของการทดลอง สำหรับการเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างน้ำสำหรับการวิเคราะห์มีการปฏิบัติเช่นเดียวกับการศึกษาปริมาณการขับถ่ายแอมโมเนียและฟอสเฟตหลังจากปลาได้รับอาหารที่เวลาต่างๆ กัน ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาคำนวณตามสูตรของการศึกษา 1.1 จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง (n=3) และแต่ละช่วงเวลา

2.3.4.2 การศึกษาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่สูญเสียโดยวิธีการทางชีววิทยา

ศึกษาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่สูญเสีย โดยการนำข้อมูลสารอาหารที่ปลาได้รับ และสารอาหารที่เพิ่มขึ้นในตัวปลามาใช้ในการคำนวนหาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่สูญเสีย ตามวิธีของ Paspatis และคณะ (2000)

สารอาหารที่ปลาได้รับ (กรัม/ กิโลกรัมของน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น)

$$= \frac{1000 \text{ X } (\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัม/ตัว)} \text{ x } \%\text{สารอาหารในอาหาร})}{\text{น้ำหนักของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)}}$$

สารอาหารที่เพิ่มขึ้นในปลา (กรัม/ตัว)

= (น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม/ตัว) x ปริมาณสารอาหารในตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (%)) – (น้ำหนักเมื่อเริ่มการทดลอง (กรัม/ตัว) x ปริมาณสารอาหารในตัวปลาเมื่อเริ่มการทดลอง (%))

สารอาหารที่สูญเสีย (กรัม/ กิโลกรัมของน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น)

$$= \frac{1000 \text{ X } (\text{สารอาหารที่ปลาได้รับ (กรัม/ตัว)} - \text{สารอาหารที่เพิ่มขึ้นในปลา (กรัม/ตัว)})}{\text{น้ำหนักของตัวปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)}}$$

เปอร์เซ็นต์สารอาหารที่สูญเสีย

$$= \frac{\text{สารอาหารที่สูญเสีย (กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น)}}{\text{สารอาหารที่ได้รับ (กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น)}} \times 100$$

**2.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล**

2.3.5.1 ข้อมูลการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน และคุณภาพน้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) แบบ CRD และเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

2.3.5.2 วิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของปริมาณสิ่งขับถ่ายไนโตรเจนรวม และฟอสฟอรัสรวมกับระดับโปรตีนจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน

การวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS (MS WINDOWS)