



วิธีการวิจัย

การรวบรวมและการเตรียมกุ้งขาวที่ใช้ในการทดลอง

รวบรวมกุ้งจากบ่อเลี้ยงระบบพัฒนาที่มีลักษณะแข็งแรง สมบูรณ์เต็มที่ อายุ 2 เดือน ขนาดความยาวเฉลี่ย 8.9 ± 0.19 cm และน้ำหนักเฉลี่ย 9.7 ± 0.18 g มาทำการปรับสภาพภายในบ่อพัก โดยจะปรับความเค็มให้ได้ 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppt วิธีปรับความเค็มน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งจากความเค็ม 30 ppt ลงให้ได้ความเค็มที่ต้องการ โดยจะปรับความเค็มลงวันละ 5 ppt เมื่อได้ความเค็มตามที่ต้องการแล้วเลี้ยงกุ้งในบ่อพักอีก 7 วัน จึงนำกุ้งไปใช้ในการทดลอง

การเตรียมถังและน้ำที่ใช้ในการเลี้ยง

ล้างและแช่ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 250 L ด้วยคลอรีน (Ca(OCl)_2) ระดับความเข้มข้น 50-100 ppm ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งหนึ่ง และเตรียมน้ำทะเลให้ได้ความเค็มที่ต้องการ (10, 20 และ 30 ppt) แล้วให้อากาศตลอดเวลา

การวางแผนการทดลอง

การออกแบบแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design - CRD) และแบ่งออกเป็น 9 ชุดการทดลอง ที่ความเค็มน้ำ 10, 20 และ 30 ppt ที่มีการเสริมแร่ธาตุและไม่มีการเสริมแร่ธาตุทุกความเค็ม (negative control) และการเสริม NaCl เพียงอย่างเดียวเพื่อให้ได้ระดับความเค็มใกล้เคียงกับชุดที่เสริมแร่ธาตุ (positive control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยพิจารณาพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุแต่ละชนิดในทางสรีระเคมีของปลาสด ดับ และเปลือก เมื่อทราบระดับความเค็มที่เหมาะสมของแต่ละอวัยวะแล้วจึงนำความเข้มข้นของ Mg, Ca, Na, K และ Cl ตามระดับความเค็มที่เหมาะสมในแต่ละอวัยวะและน้ำ มาคำนวณระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุ โดยเฉลี่ยที่ควรมีอยู่ในน้ำซึ่งได้พิจารณาจากปลาสด เปลือก และตับ โดยคูณด้วยแฟกเตอร์ 2:1:1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และมีการตรวจสอบอัตราส่วนของ Mg:Ca, Na:Mg, Ca:P, Na:K, Cl:K และ Cl:Na (ตารางที่ 5)

การพิจารณาในปลาสดและเปลือกจะพิจารณา Mg, Ca, Na, K และ Cl ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นที่สูงสุดที่กุ้งขาวสามารถควบคุมระดับความเข้มข้นไว้ได้ ก่อนที่จะลดระดับความเข้มข้นลง ยกเว้น Ca ในปลาสดจะพิจารณาจากค่าเฉลี่ยตรงกลางในช่วงความเค็ม 2.8-50 ppt เนื่องจากตลอดช่วงความเค็มนี้ Ca ในปลาสดจะมีค่าคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงต่ำ ซึ่ง

ตารางที่ 4 ระดับความเค็มที่เหมาะสมจากการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีของกุ้งและปริมาณการเสริมแร่ธาตุในระบบเลี้ยงกุ้งขาว (*L. vannamei*) ความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

แร่ธาตุ	ความเข้มข้นที่ 1 (mg/L)	ความเข้มข้นที่ 2 (mg/L)			ความเข้มข้นที่ 3 (mg/L)		
		ความเค็ม (ppt)			ความเค็ม (ppt)		
		10	20	30	10	20	30
Na	6,822	3,072	4,808	6,451	3,750	2,014	371
Mg	1,084	519	814	1,270	565	270	-
Cl	10,229	3,298	7,513	11,214	6,930	2,716	-
Ca	210	76	157	263	134	53	-
K	310	222	309	365	88	1*	-

หมายเหตุ ความเข้มข้นที่ 1 เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณจากระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมทางสรีระเคมีของกุ้ง
ความเข้มข้นที่ 2 เป็นค่าความเข้มข้นของแร่ธาตุแต่ละชนิดที่มีในน้ำทะเลปกติที่ความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt
ความเข้มข้นที่ 3 เป็นค่าความเข้มข้นของแร่ธาตุที่ต้องเสริมลงในน้ำที่ใช้ในการทดลอง

ถือว่าเป็นช่วงความเค็มที่มีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมกับความต้องการ และ Cl ในปลาสมจะพิจารณาจากจุด iso-ionic point (ความเค็ม 25 ppt)

การพิจารณาในดับจะพิจารณา Mg, Ca, Na, K และ Cl ที่ช่วงความเค็มที่มีค่าความเข้มข้นของแร่ธาตุแต่ละชนิดคงที่ตลอดหรือมีการเปลี่ยนแปลงต่ำ ซึ่งถือได้ว่าเป็นช่วงความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมกับความต้องการของกุ้งขาว (*L. vannamei*) และนำมาหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของแร่ธาตุนั้น ๆ แต่ละชนิดต่อไป

การเติมแร่ธาตุ

การเติมแร่ธาตุดำเนินการโดยละลายสารประกอบ ได้แก่ NaCl, MgCl₂, CaCl₂ และ KCl ในปริมาณต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 6) ในน้ำทะเลแต่ละความเค็ม และแบ่งการเติมแร่ธาตุออกเป็น 10 ครั้ง โดยจะเติมวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 2 วัน และจะเว้น 1 วัน ซึ่งจะใช้เวลาในการเติมแร่ธาตุประมาณ 14 วัน เพื่อที่จะให้กุ้งได้ปรับสภาพต่อปริมาณแร่ธาตุที่เติมลงไป ในน้ำ และน้ำที่ใช้ละลายสารประกอบจะใช้น้ำจากถังการทดลองเพื่อรักษาปริมาณน้ำให้มีระดับคงที่ตลอด

ตารางที่ 5 อัตราส่วนของ Na:K, Mg:Ca, Na:Mg, Ca:P, Cl:Na และ Cl:K ที่พบในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ที่ความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

ความเค็ม (ppt)	การทดลอง	Na:K	Mg:Ca	Na:Mg	Ca:P	Cl:Na	Cl:K
10	ชุดควบคุมเชิงลบ	15.4:1 (3,781:219)	3.5:1 (531:177)	7.1:1 (3,781:531)	2.2:1 (177:79)	17.4:1 (3,404:219)	0.9:1 (3,404:3,781)
	ชุดควบคุมเชิงบวก	58.2:1 (12,581:216)	2.7:1 (517:194)	24.3:1 (12,581:517)	3.2:1 (494:63)	40.6:1 (8,804:216)	0.7:1 (8,804:12,581)
	ชุดเสริมแร่ธาตุ	15.6:1 (4,810:319)	3.0:1 (702:231)	6.9:1 (4,810:702)	3.0:1 (231:51)	24.5:1 (7,456:319)	1.6:1 (7,456:4,810)
20	ชุดควบคุมเชิงลบ	17.1:1 (4,992:269)	3.3:1 (717:220)	7.1:1 (4,992:717)	2.4:1 (220:93)	24.3:1 (7,053:269)	1.4:1 (7,053:4,992)
	ชุดควบคุมเชิงบวก	17.1:1 (5,093:289)	3.0:1 (687:253)	7.7:1 (5,093:687)	2.8:1 (253:94)	24.8:1 (7,086:289)	1.4:1 (7,086:5,093)
	ชุดเสริมแร่ธาตุ	16.2:1 (5,659:369)	3.5:1 (927:270)	6.2:1 (5,659:927)	3.0:1 (270:93)	25.9:1 (9,236:369)	1.6:1 (9,236:5,659)
30 *	ชุดควบคุม ,	18.3:1 (7,269:397)	3.4:1 (1,031:80)	7.5:1 (7,269:1,031)	3.9:1 (307:80)	29.9:1 (11,606:397)	1.6:1 (11,606:7,269)
	ชุดเสริมแร่ธาตุ	20.0:1 (7,543:381)	3.5:1 (1,157:71)	6.5:1 (7,543:1,157)	4.7:1 (332:71)	32.3:1 (11,983:381)	1.6:1 (11,983:7,543)

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงลบ คือ ชุดการทดลองที่ไม่มีการเสริมแร่ธาตุ (negative control)

ชุดควบคุมเชิงบวก คือ ชุดการทดลองที่มีการเสริมแร่ธาตุเพื่อปรับระดับความเค็มใกล้เคียงกับชุดที่เสริมแร่ธาตุ (positive control)

ชุดเสริมแร่ธาตุ คือ ชุดการทดลองที่มีการเสริมแร่ธาตุ

ตัวเลขในวงเล็บ คือ ความเข้มข้นของแร่ธาตุ (mg/L)

* ความเค็ม 30 ppt เนื่องจากชุดควบคุมเชิงบวก และชุดเสริมแร่ธาตุ ใช้ปริมาณแร่ธาตุในการทดลองเท่ากันจึงรวมเข้าด้วยกันเป็นชุดเสริมแร่ธาตุ

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารประกอบที่ใช้ในการปรับอัตราส่วนของแร่ธาตุในน้ำที่ทดลองเลี้ยง กุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่ความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

แร่ธาตุ	ปริมาณ (g/L)		
	ความเค็ม 10 ppt	ความเค็ม 20 ppt	ความเค็ม 30 ppt
MgCl ₂	4.79	2.29	-
CaCl ₂	0.37	0.15	-
NaCl	9.52	5.11	0.94
KCl	0.17	-	-

การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำในถังเลี้ยงก่อนเริ่มการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ระยะเวลา 2 เดือน โดยวิเคราะห์ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ และอุณหภูมิ ด้วยเครื่อง YSI model 85/10 วิเคราะห์ค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH Meter รุ่น D-21 และวิเคราะห์ค่าไนไตรท์ แอมโมเนีย ความเป็นด่าง ด้วยเครื่อง Multiparameter specific ion meter รุ่น C203

การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 6 ครั้ง จากบริเวณกลางบ่อเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุ โดยจะเริ่มเก็บช่วงก่อนการทดลอง (ครั้งที่ 1) เมื่อมีการเติมแร่ธาตุครบ (ครั้งที่ 2) และหลังจากนั้นจะเก็บ ทุก ๆ 15 วัน จนครบจำนวน 2 เดือน

การเก็บตัวอย่างเลือด การเตรียมพลาสมา เพลือก และดัก การวัดปริมาณของแร่ธาตุ ในพลาสมา เพลือก และดัก

การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากเลี้ยงกุ้งจนครบ 3 เดือน สุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละชุดการทดลองมาเก็บตัวอย่าง เลือด โดยมีวิธีดังนี้

ก. หลังจากงดอาหารเป็นเวลา 1 วัน จึงคัดเลือกกุ้งที่มีระยะลอกคราบ Do มาจำนวน เท่า ๆ กัน (5 ตัวอย่าง / ซ้ำ) ในแต่ละการทดลอง

ข. คัดเลือกกุ้งโดยใช้เข็ม เบอร์ 26 Tuberculin ขนาด 1.0 ml บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5

ก. นำเลือดเก็บไว้ในหลอดการทดลองขนาด 1.5 ml โดยผสม 30 % tri-sodium citrate เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว (anticoagulant) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 (ใช้เลือด 0.7 ml: 30 % tri- sodium citrate 0.7 ml) เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียมพลาสมา

ก. นำเลือดกึ่งที่ผสม 30% tri-sodium citrate ไปปั่นเพื่อให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง micro centrifuge เพื่อให้ตกตะกอนรวมตัวกันที่ก้นหลอดด้วยแรงเหวี่ยง 14,000 g ที่ อุณหภูมิ 4°C นาน 20-25 นาที

ข. ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ซึ่งก็คือพลาสมาปริมาตร 1 ml เก็บไว้ใน eppendroff ใหม่เพื่อใช้เป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเปลือก และตับ

นำตัวอย่างกึ่งที่เก็บเลือดแล้ว มาแกะเปลือกกุ้งแต่ละตัวของแต่ละการทดลอง การทดลองละ 6 ตัว นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำบริสุทธิ์ยิ่งยวด (deionized water) 2 รอบ นำเปลือกที่ล้างแล้วไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเปลือกที่อบแล้วชั่งน้ำหนักรอบแรก แล้วนำไปอบต่ออีก 2 ชั่วโมง นำกลับมาชั่งน้ำหนักอีก จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ จึงนำเปลือกกุ้งแต่ละตัวที่อบแห้ง แล้วมาบดในโกร่งบด (ceramic mortar) ให้ละเอียด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงตาถึงขนาด 150 μm ให้ได้ปริมาณ 1g เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อไป โดยเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (deccicator) ส่วนตับจะแยกมาจากกุ้งแต่ละตัวของแต่ละการทดลอง การทดลองละ 6 ตัว ไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 3-5 วัน นำมาชั่งด้วยกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 6 N แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่อไป

การวัดปริมาณของแร่ธาตุในพลาสมา ตับ และเปลือก

นำตัวอย่างทั้ง 3 ประเภทมาใส่ cup โดยด้านล่างหุ้มด้วย prolene film แล้วนำไปวัดปริมาณของ Na, Ca, K, Mg, P และ Cl ด้วยเครื่อง X- ray fluorescent spectrophotometer Oxford ED²⁰⁰⁰ ตามวิธีการของ Pratoomchat et al. (2002b) จะได้ปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นมีหน่วยเป็น mg/L ส่วนตับและเปลือกจะมีหน่วยเป็น mg/g

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลของแต่ละการทดลอง ได้แก่ การเจริญเติบโต การรอดตาย ความถี่ของการลอกคราบ อัตราการแลกเนื้อ ปริมาณของแร่ธาตุในน้ำ พลาสมา ตับ และเปลือกของกุ้ง มาหาความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์หาความแปรปรวน (analysis of variance) และนำมาหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี Duncan's New multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS for windows version 11.5 (License code 30025 36098 54100 85475 59009 9625)