

วิธีดำเนินการวิจัย

1 สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากบ่อดินอายุ 2 เดือน ความยาวเฉลี่ย 8 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 6-7 กรัม

2. สถานที่ทำการเพาะเลี้ยง

โรงเพาะเลี้ยง ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

3. ระยะเวลาทำการทดลอง

ทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2554

4 การเตรียมน้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt เตรียมใส่ไว้ในบ่อขนาด 5,000 ลิตร โดยจะปรับความเค็มของน้ำให้ได้ 20 ppt ด้วยน้ำประปา

5. การปรับสภาพกุ้งก่อนทำการทดลอง

นำกุ้งที่ได้จากฟาร์มมาทำการปรับสภาพ โดยการนำมาเลี้ยงในบ่อขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำที่ปรับความเค็มที่จะใช้ในการทดลองคือ 10 ppt อัตราการปล่อยกุ้ง 100 ตัว/ตารางเมตร

6. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) เป็นไปตามระดับของปริมาณทองแดงที่ใส่ในอาหารที่ต่างกัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดทดลองๆละ 3 ซ้ำ ตาม ระดับของปริมาณทองแดงในอาหารที่ใช้เลี้ยง ได้แก่ 50 mg/kg 100 mg/kg 150 mg/kg และ 200 mg/kg และไม่เสริม (control)

7. การเตรียมอาหาร

7.1 นำอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 35 % ไขมัน 9 % คาร์โบไฮเดรต 34 % วิตามิน 1 % เยื่อใย 5 % มาเข้าเครื่องบดเพื่อให้อาหารมีลักษณะเป็นผงละเอียด

7.2 นำอาหารที่บดละเอียดแล้วมาผสมกับ Cu Chelate โดยใน Cu Chelate ที่ผสมในอาหารประกอบด้วย Cu ประมาณ 10 % ความเข้มข้นที่ต้องการเสริมในอาหารเท่ากับ 0 mg/kg (control) 50 mg/kg 100 mg/kg และต้องใช้ Cu Chelate เท่ากับ 0 mg/kg (control) 500 mg/kg 1,000 mg/kg 1,500 mg/kg และ 2,000 mg/kg จากนั้นนำอาหารเข้าเครื่องผสมอาหารเป็นเวลา 10 นาที

7.3 นำอาหารที่ผสมกับ Cu Chelate แล้ว มาใส่น้ำ 70% ของน้ำหนักอาหาร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องอัดเม็ด

7.4 นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วฝังลม 2 วัน จากนั้นคลุกด้วยน้ำมันปลา 1% ของน้ำหนักอาหาร แล้วฝังลมอีก 1 วัน

7.5 เก็บอาหารในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

8. การทดสอบการเลี้ยงกุ้ง

จะดำเนินการเลี้ยงกุ้งตามวิธีการทดลองข้างต้น 2 ชุด แต่ละการทดลองของการเลี้ยงแต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ

ชุดที่ 1 เพื่อการทำการตรวจสอบการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ การรอดตาย ความถี่การลอกคราบ ความแตกต่างของขนาด หลังจากการทดลองเลี้ยง 2 เดือน จึงนำกุ้งทุกชุดการทดลองการทดสอบระดับความทนทานของการขาดออกซิเจน

ชุดที่ 2 เพื่อใช้เจาะเลือดกุ้งนำพลาสมาไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน และแร่ธาตุเช่น Na, Ca, Mg, K, Cl, P, Cu

8.1 คัดเลือกกุ้งที่มีความแข็งแรงใสในบ่อเลี้ยงขนาด 500 ลิตร (100 ตัว/ตารางเมตร) ใส่หัวทราย 1 จุด ใส่อาหารขนาดเล็กเพื่อใช้เป็นที่พักของกุ้งขาวในและใส่อาหารบ่อละถาดเพื่อใช้ในการตรวจปริมาณอาหาร

8.2 อาหารและการให้อาหาร ทำการให้อาหารทดลองโดยจะให้อาหารวันละ 4 ครั้ง คือ 09.00 น. 13.00 น. 18.00 น. และ 23.00 น. โดยเก็บอาหารที่เหลือจากการให้ในแต่ละบ่อมาทำการอบแห้งทุกวัน เพื่อมาหาอัตราการแลกเนื้อ

8.3 การจัดการ ดูแลรักษาความสะอาดของบ่อโดยการขับบ่อ ดูดตะกอน ล้างกระจาด ล้างอวน ชัดหัวทราย และเปลี่ยนถ่ายน้ำออก 50 เปอร์เซ็นต์ของบ่อ ทุกๆ 7 วัน

8.4 ทำการตรวจวัดค่า D.O., pH, อุณหภูมิ และเก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ไนโตรท์ และอัลคาไลน์ดีทุก ๆ 15 วัน

9. การบันทึกและตรวจสอบการเจริญเติบโตและอื่น ๆ

9.1 ทำการสุ่มชั่งน้ำหนัก 100 % และวัดความยาวกุ้ง 40% ทุก 15 วัน พร้อมกับนับจำนวนตัวที่รอดตาย

9.2 ทุกวันจะทำการตรวจสอบกุ้งที่ตาย

9.3 นำข้อมูลจากข้อ 9.1 มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อตามตารางที่

1

10. การทนทานต่อการขาดออกซิเจน

โดยการนำกุ้งในหน่วยการทดลองต่างๆมาใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ โดยจะใส่ถึงละ 6 ตัว แล้วงดให้ออกซิเจน ทำการปิดฝาภาชนะด้วยพลาสติกใสเพื่อป้องกันมิให้ออกซิเจนจากภายนอกเข้ามาทำการตรวจค่า D.O. โดยใช้เครื่อง D.O. meter โดยทำการตรวจค่าทั้งตอนเริ่มทำการทดลองและตอนสิ้นสุดการทดลอง โดยจะยุติการทดลองเมื่อในการทดลองใดๆกุ้งมีการสลบมากกว่าหรือเท่ากับ 50 % แล้วสังเกตพฤติกรรมของกุ้งขาวโดยจะมีเกณฑ์ในการสังเกต จดบันทึกพฤติกรรม และลักษณะทางกายภาพของกุ้งขาว ได้แก่

การเคลื่อนที่

กุ้งมีการเคลื่อนที่จากจุดหนึ่งไปยังจุดหนึ่ง

ตารางที่ 1 สูตรการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และ ความแปรปรวนของขนาด

พารามิเตอร์	สูตรการคำนวณ
1. อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily weight gain ; ADG _w ; กรัม / วัน)	$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$
2. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain (%) ; WG)	$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$
3. ความยาวที่เพิ่มขึ้น (Length gain (%) ; LG)	$\frac{\text{ความยาวเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{ความยาวเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{ความยาวเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100$
4. เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของขนาดในส่วนน้ำหนัก (Size variation, weight (%))	$\frac{\text{ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S.D.) ของน้ำหนัก} \times 100}{\text{น้ำหนักเฉลี่ย}}$
5. เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของขนาดในส่วนความยาว (Size variation, length (%))	$\frac{\text{ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S.D.) ของความยาว} \times 100}{\text{ความยาวเฉลี่ย}}$
6. อัตราการแลกเนื้อของกุ้ง (Feed conversion ratio; FCR)	$\frac{\text{น้ำหนักแห้งของอาหารที่กักกิน}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$

อาการขาวขุ่นของกล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อบริเวณลำตัวที่มีลักษณะขาวขุ่นระดับน้อย(ขาวขุ่นประมาณ ¼ ของลำตัว) ปานกลาง (ขาวขุ่นประมาณ 1/3-½ ของลำตัว) หรือมาก (ขาวขุ่น > ½ ของลำตัว)

การเกร็งอของลำตัว

สังเกตที่บริเวณลำตัวซึ่งจะมีการอของลำตัวตลอดเวลาในขณะหยุดนิ่งและว่ายน้ำ

การเลี้ยงการทรงตัว

กึ่งมีการตะแคงตัวเมื่อหยุดนิ่งหรือว่ายน้ำแบบควงส่ว้น

11. การเก็บตัวอย่างเลือดกึ่ง

11.1 กึ่งแต่ละการทดลองจะถูกตรวจสอบระยะลอกคราบ โดยนำกึ่งระยะลอกคราบ D₀ มาทำการเก็บเลือดกึ่งโดยใช้เข็มฉีดยา ทำการดูดเลือดกึ่งขาวโดยใช้เข็มเบอร์ 24 Tuberculin ขนาด 1.0 มิลลิตร ทางบริเวณใต้ขาเดินคู่ที่ 5 (5th pereopods)

11.2 นำเลือดเก็บไว้ใน Eppendroff โดยผสม 30% tri-sodium citrate เพื่อกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) โดยผสมลงในอัตราส่วน 1:1 (ใช้เลือด 0.7 ml:30% tri-sodium citrate 0.7 ml) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อมาทดสอบปริมาณโปรตีนและทองแดง

12. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแร่ธาตุ

12.2.1 นำเลือดกึ่งที่ผสม 30% tri-Sodium citrate ไปปั่นเพื่อให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge เพื่อให้ตกตะกอนรวมตัวกันที่ก้นหลอด ด้วยแรงเหวี่ยง 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20-25 นาที

12.2.2 ดูดของเหลวส่วนบน (Supernatant) ซึ่งก็คือพลาสมาปริมาตร 1 มิลลิตร เก็บไว้ใน Eppendrof ใหม่ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณของแร่ธาตุตาม โดยนำตัวอย่างมาใส่ cup โดยด้านล่างหุ้มด้วย prolene film แล้วนำไปวัดปริมาณของ Cu ด้วยเครื่อง X-ray fluorescent spectrophotometer Oxford ED 2000 ตามวิธีการของ Pratoomchat et al. (2002)