

วิธีการดำเนินการวิจัย

การวางแผนการทดลอง

ทำการแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด โดยแบ่งตามสัดส่วนของแมกนีเซียมและแคลเซียมได้แก่ 1:1, 2:1, 4:1 และ 5:1 อัตราส่วน 3:1 เป็นชุดควบคุม ทำการทดลองที่ระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt ทำ 3 ซ้ำต่อการทดลอง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมและแคลเซียมตามสัดส่วนต่างๆ ที่ความเค็ม 3 ระดับ

| ความเค็ม (ppt) | Ratio of Mg:Ca | | | | | | | | | |
|----------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 1:1 | | 2:1 | | 3:1 Control | | 4:1 | | 5:1 | |
| | Mg (mg/l) | Ca (mg/l) | Mg (mg/l) | Ca (mg/l) | Mg (mg/l) | Ca (mg/l) | Mg (mg/l) | Ca (mg/l) | Mg (mg/l) | Ca (mg/l) |
| 10 | 500 | 500 | 500 | 250 | 500 | 160 | 660 | 160 | 820 | 160 |
| 20 | 900 | 900 | 900 | 450 | 900 | 280 | 1180 | 280 | 1460 | 280 |
| 30 | 1300 | 1300 | 1300 | 650 | 1300 | 400 | 1700 | 400 | 2100 | 400 |

การเตรียมกุ้งขาวและวิธีการทดลอง

รวบรวมกุ้งขาวจากบ่อเลี้ยงระบบพัฒนาอายุประมาณ 2 เดือน ความยาวลำตัวเฉลี่ย (total length) 10.4 ± 0.09 cm และน้ำหนักเฉลี่ย 8.29 ± 0.08 g ที่มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง 70 ตัว/ตารางเมตร และทำการติดเครื่องหมายแต่ละตัวทุกตัวเพื่อตรวจสอบการลอกคราบ

การเตรียมน้ำและการปรับสภาพกุ้งขาว

เตรียมน้ำทะเลลงบ่อพักน้ำที่เตรียมไว้ วัดความเค็มแล้วปรับความเค็มด้วยน้ำจืดให้ได้ระดับความเค็มน้ำ 20 ppt เติมน้ำในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 200L ปริมาตร 100L นำกุ้งที่ติดเครื่องหมายมาทำการปรับความเค็มน้ำที่ระดับ 10, 20, และ 30 ppt วิธีการปรับความเค็มน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวจะค่อยๆ ปรับความเค็มน้ำจากความเค็ม 20 ppt ขึ้นและลงให้ได้ความเค็มที่ต้องการภายใน 1 วัน และเมื่อได้ความเค็มที่ต้องการแล้วเลี้ยงกุ้งต่อไปอีก 5 วันก่อนเริ่มทดลอง

การเติมแร่ธาตุ

ทำการเติม CaCl_2 และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในปริมาณต่าง ๆ กัน ในน้ำความเค็ม 3 ระดับ ปริมาตร 20 ลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณ Ca และ Mg โดยเติมแร่ธาตุ 2 ครั้ง เติมน้ำวันเว้นวัน (ตารางที่ 2) และพบความเข้มข้นของ Cl เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ CaCl₂ และ MgCl₂·6H₂O ที่เติมลงในน้ำเลี้ยงกุ้งขาว

| ความเค็ม (ppt) | Mg:Ca | | | | | | | |
|----------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|---|-------------------|---|-------------------|
| | 1:1 (g/L) | | 2:1 (g/L) | | 4:1 (g/L) | | 5:1 (g/L) | |
| | MgCl ₂ ·6H ₂ O | CaCl ₂ (Ca) | MgCl ₂ ·6H ₂ O | CaCl ₂ (Ca) | MgCl ₂ ·6H ₂ O (Mg) | CaCl ₂ | MgCl ₂ ·6H ₂ O (Mg) | CaCl ₂ |
| 10 | - | 0.94 (340) | - | 0.25 (90) | 1.36 (160) | - | 2.72 (320) | - |
| 20 | - | 1.72 (620) | - | 0.47 (170) | 2.37 (280) | - | 4.74 (1460) | - |
| 30 | - | 2.5 (900) | - | 0.69 (250) | 3.93 (400) | - | 7.86 (2100) | - |

หมายเหตุ ที่สัดส่วน 3:1 ไม่มีการเติม

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ Cl ที่ได้จากการเติม CaCl₂ และ MgCl₂·6H₂O

| ความเค็ม (ppt) | Mg:Ca | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 1:1 | 2:1 | 4:1 | 5:1 |
| | Cl (mg/L) | Cl (mg/L) | Cl (mg/L) | Cl (mg/L) |
| 10 | 595 | 158 | 466.44 | 932.88 |
| 20 | 1085 | 298 | 816.27 | 1632.54 |
| 30 | 1575 | 438 | 1166.10 | 2332.20 |

การให้อาหาร

ให้อาหารสำเร็จรูปมีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 35% ไขมันไม่ต่ำกว่า 5% ความชื้นไม่มากกว่า 11% กากไม่มากกว่า 3% ให้อาหารประมาณ 5% ของน้ำหนักตัวกุ้ง วันละ 3 ครั้ง ใช้ระบบน้ำแบบปิด (closed system)

การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ระหว่างทำการทดลองทำการตรวจวัด ปริมาณออกซิเจนละลาย อุณหภูมิ ความเค็มน้ำ ด้วยเครื่อง YSI Incorporated model # 85/10 ตรวจสอบทุก ๆ 7 วัน และทำการตรวจสอบความเข้มข้นแอมโมเนีย ไนโตรท์ และ อัลคาไลน์ตี ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ส่วนการวัดความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมในน้ำใช้เครื่อง X-ray fluorescent spectrophotometer Oxford ED²⁰⁰⁰ ตามวิธีการของ Pratoomchat et al. (2002)

การบันทึกผลการ ทดลองด้านการเจริญเติบโต

ระหว่างการทำทดลองทุก ๆ วัน ทำการบันทึกจำนวนกุ้งที่ลอกคราบ จำนวนที่ตาย และลักษณะการตายของกุ้ง และทุก 15 วันจะทำการชั่งน้ำหนัก และวัดขนาดความยาว ตลอดระยะเวลา 2

เดือน เพื่อนำมาตรวจสอบพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต เช่น การเจริญเติบโตในแต่ละวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนัก (% WG) และอัตราการแลกเนื้อ (FCR)

การเก็บตัวอย่างเลือด การเตรียมพลาสมา เปลือก และตับ การวัดปริมาณของแร่ธาตุในพลาสมา เปลือก และตับ

การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากเลี้ยงกุ้งจนครบ 2 เดือน จึงทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละการทดลองมาเก็บตัวอย่างเลือดโดยวิธีดังนี้

ก. หลังจากงดอาหารเป็นเวลา 1 วัน จึงคัดเลือกกุ้งที่มีระยะลอกคราบ D0 มาจำนวนเท่า ๆ กัน (5 ตัวอย่าง / ซ้ำ) ในแต่ละการทดลอง

ข. ทำการดูดเลือดกุ้งโดยใช้เข็ม เบอร์ 27 Tuberculin ขนาด 1.0 มิลลิลิตร แทงลงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5

ค. นำเลือดเก็บไว้ใน Eppendroff โดยผสม 30 % tri-sodium citrate เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว (anticoagulant) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 (ใช้เลือด 0.7 มิลลิลิตร: 30 % tri- sodium citrate 0.7 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียมพลาสมา

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

ข. ชุดของเหลวส่วนบน (supernatant) ซึ่งก็คือพลาสมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บไว้ใน eppendroff ใหม่เพื่อใช้เป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเปลือก และตับ

เมื่อตัวอย่างกุ้งที่ทำการเก็บเลือดแล้ว จึงทำการแกะเปลือกกุ้งแต่ละตัวของแต่ละการทดลอง การทดลองละ 6 ตัว นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำบริสุทธิ์ยิ่งยวด (deionized water) 2 รอบ นำเปลือกที่ล้างแล้วไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเปลือกที่อบแล้วชั่งน้ำหนักรอบแรก แล้วนำไปอบต่ออีก 2 ชั่วโมง นำกลับมาชั่งน้ำหนักอีก จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ จึงนำเปลือกกุ้งแต่ละตัวที่อบแห้ง (คราบ) แล้วมาบดในโกร่งบด (ceramic mortar) ให้ละเอียด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงตาถี่ ขนาด 150 μm . ให้ได้ปริมาณ 1 กรัม เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ต่อไป โดยเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccators) ส่วนตับจะทำการแยกมาจากกุ้งแต่ละตัวของแต่ละการทดลอง การทดลองละ 6 ตัว ไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วนำมาย่อยด้วยกรดไนตริกที่ความเข้มข้น 6 N แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุ ต่อไป

การวัดปริมาณของแร่ธาตุในพลาสมา ตับ และเปลือก

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

การจดบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลระยะเวลาที่กุ้งใช้ในการลอกคราบ 3 ครั้ง หลังจากที่กุ้งมีการลอกคราบไปแล้วครั้งแรก ขนาดความยาวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ของกุ้งแต่ละตัวทุกชุดการทดลอง จำนวนกุ้งตายและลักษณะอาการของกุ้งทดลองที่ตาย เพื่อนำมาตรวจสอบ %น้ำหนักและความยาวมีเพิ่มขึ้น ความถี่ของการลอกคราบ การรอดตาย รวมถึงความเข้มข้นของ Ca และ Mg ที่ใช้ไปมาหาความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS for windows version 11.5 License code 30025 36098 54100 85475 59009 9625