

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 สัตว์ทดลอง

ปลากระรังเสื่อ (*Epinephelus fuscoguttatus*) ระยะจูวีไนส์ (ขนาดเล็ก) ความยาวทั้งหมด (total length) ระหว่าง 7-12 เซนติเมตร (เฉลี่ย 10.32 ± 0.51 เซนติเมตร) น้ำหนักระหว่าง 6-8 กรัม (เฉลี่ย 6.65 ± 0.71 กรัม) จำนวน 112 ตัว และปลาตัวเต็มวัย (ขนาดใหญ่) ความยาวทั้งหมดระหว่าง 24-27 เซนติเมตร (เฉลี่ย 25.66 ± 0.44 เซนติเมตร) น้ำหนักระหว่าง 120-180 กรัม (เฉลี่ย 150.50 ± 7.30 กรัม) จำนวน 80 ตัว ได้มาจากฟาร์มเลี้ยงปลาเก่า จังหวัดภูเก็ต ขนส่งปลาจากฟาร์มถึงสถานที่วิจัยโดยรถยนต์ ปลาอยู่ในถุงพลาสติกที่อัดอากาศบรรจุในกล่องโฟมหล่อด้วยน้ำแข็ง ปลาทั้งหมดอยู่ในสภาพดีในระหว่างการขนส่ง ระยะทางจากฟาร์มเลี้ยงปลาถึงสถานที่วิจัย ประมาณ 500 กิโลเมตร

3.2 สถานที่วิจัยและสภาพการเลี้ยง

สถานที่ทำการวิจัยคือ หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ สะกอม อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นหน่วยงานที่สังกัดคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี อยู่ห่างจากทะเลฝั่งอ่าวไทยประมาณ 50 เมตร นำปลากระรังเสื่อขนาดเล็กและขนาดใหญ่มาแยกเลี้ยงในบ่อคอนกรีต ขนาด $186 \times 270 \times 100$ ลูกบาศก์เซนติเมตร ในน้ำทะเลความเค็มระหว่าง 30-32 พีพีที (วัดความเค็มของน้ำโดยใช้เครื่อง Refractometer Model S-10) อุณหภูมิน้ำอยู่ระหว่าง $27 \pm 1^{\circ}$ เซลเซียส แต่ปล่อยให้อากาศโดยเครื่องปั๊มอากาศต่อกับหินทรายด้วยความเร็ว 2-3 ลิตร/นาที่ จำนวน 9 จุด ทำที่หลบซ่อนโดยที่ปลาขนาดเล็ก โดยใช้ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ยาวประมาณท่อนละ 30-40 เซนติเมตร ผูกรวมกันเป็นมัด ๆ ละ 5 ท่อนแขวนไว้ที่บริเวณมุมบ่อหรือขอบบ่อ จำนวน 6 จุด ส่วนปลาขนาดใหญ่ใช้ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร สูบน้ำทะเลมาพักไว้ในบ่อและฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน (แคลเซียมไฮโปคลอไรต์) 20-30 พีพีเอ็ม เป่าอากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา (มากกว่า 5

วัน) เพื่อกำจัดคลอรีน (ทดสอบคลอรีนด้วยโปเทสเซียมไอโอไดด์) จากนั้นสูบน้ำเข้าไปเก็บในบ่อพักผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาด 5 ไมครอน ให้อาหารด้วยพลาสติก (ปลาข้างเหลือง ปลาหลังเขียว และอื่น ๆ) ขนาดขึ้นละประมาณ 1 เซนติเมตรสำหรับปลาขนาดเล็ก และประมาณ 3-4 เซนติเมตรสำหรับปลาขนาดใหญ่ ให้อาหารทุกวันตอนเช้า (เวลา 9.00-10.00 น) วันละ 1 ครั้ง ให้ปลากินอาหารจมน้ำ (ประมาณ 4% ของน้ำหนักตัว) ก่อนให้อาหารแต่ละครั้งใช้สายยางดูดมูลและอาหารที่เหลือทิ้งแล้วเปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ โดยคูดน้ำออกให้เหลือน้ำประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำในบ่อแล้วเติมน้ำใหม่ลงไปจนระดับน้ำเท่าเดิม ปลาอยู่ในบ่อพักอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนที่จะนำไปทดลองในถังไฟเบอร์ ขนาด 47 x 80 x 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร (รูปที่ 3.1) ก่อนทดลองต้องให้ปลาดอกอาหาร 1 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลองตรวจสอบคุณภาพของน้ำทุกวัน เช่น ความเค็ม ออกซิเจนละลายในน้ำโดยวิธี Azide modification of indometric method (APHA et al., 1985) อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย โดยวิธี Salicylate method (Verdouw et al., 1978) และความเป็นด่าง ผลการวัดคุณภาพของน้ำดังแสดงในตารางที่ 3.1)

การเตรียมน้ำที่ระดับความเค็มต่างๆ ใช้น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้เป่าอากาศตลอดเวลาให้คลอรีนระเหยออกไป นำไปผสมกับน้ำทะเลที่กรองแล้วจนได้ความเค็มที่ต้องการ ในขณะที่นำสัตว์จากบ่อพักไปทดลอง น้ำที่ใสในบ่อปรับความเค็มครั้งแรกมีความเค็มเท่ากับน้ำในบ่อพัก จากนั้นค่อย ๆ ลดหรือเพิ่ม วันละ 2-4 พีพีที จนได้ความเค็มที่ต้องการ ได้แก่ 10 20 และ 30 พีพีที (ชุดควบคุม เป็นความเค็มของน้ำตามธรรมชาติ ประมาณ 30±2 พีพีที)

ตารางที่ 3.1. คุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลากะรังเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*)

ตัววัด	ความเค็ม 10 พีพีที	ความเค็ม 20 พีพีที	ความเค็ม 30 พีพีที
ออกซิเจน (มิลลิกรัม/ลิตร)	7.24±0.1	7.08±0.07	6.71±0.05
อุณหภูมิ (°เซลเซียส)	27±1	27±1	28±1
ความเป็นกรดด่าง	8.05±0.01	8.04±0.01	8.03±0.02
บีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)	1.8±0.03	2.1±0.05	1.67±0.08
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม/ลิตร)	77.7±5.01	80.5±6.88	82.20±3.54
แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ลิตร)	0.2±0.00	0.4±0.00	0.5±0.00
ความกระด้าง (มิลลิกรัม/ลิตร)	2638.3±11.45	3587.7±9.8	5247.4±12.13

3.3. การออกแบบการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทดลองในปลาขนาดเล็กและกลุ่มที่ 2 ทดลองปลาขนาดใหญ่ ทั้งสองกลุ่มทดลองตามแบบแผนเดียวกัน ดังนี้

3.3.1 นำปลาจากบ่ออนุบาลมาแยกเลี้ยงในบ่อปรับความเค็มซึ่งเป็นบ่อไฟเบอร์ ขนาด 100 x 200 x 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 3 บ่อ ความเค็มเริ่มต้นเป็นแบบเดียวกับบ่ออนุบาล แต่ละบ่อมีปลา 38 ตัว ให้ปลากินอาหารและให้อากาศอย่างดี

3.3.2 ปรับความเค็มของน้ำในบ่อปรับความเค็ม ที่ 1 และ 2 ให้ลดลงวันละ 2-4 พีพีที โดยเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน เพื่อได้ความเค็มสุดท้ายเป็น 10 และ 20 พีพีที ส่วนบ่อที่ 3 ไม่มีการปรับ (เป็นความเค็มของน้ำทะเลตามธรรมชาติ) ช่วงระหว่างการปรับความเค็มให้อาหารและอากาศตามปกติ

3.3.3 แยกปลาจากบ่อปรับความเค็มมาเลี้ยงในถังทดลองซึ่งเป็นถังไฟเบอร์ขนาด 47x80x50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แต่ละถังเติมน้ำความเค็มเท่ากับความเค็มสุดท้ายในบ่อปรับความเค็ม (10, 20 และ 30 พีพีที) จำนวน 3 บ่อ แต่ละบ่อมีปลา 8 ตัว ให้อากาศอย่างดี

3.3.4 เลี้ยงปลาในถังทดลอง 1 สัปดาห์แล้วให้ปลาอดอาหาร 1 วันก่อนนำไปทดลอง ดังนี้

บ่อทดลองที่ 1 ของแต่ละความเค็ม ศึกษาอัตราการหายใจ และขับแอมโมเนีย

บ่อทดลองที่ 2 ของแต่ละความเค็ม ศึกษาออสโมเรกูเลชัน ความเข้มข้นของกลูโคสและแลคเตตในเลือด ค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน

บ่อทดลองที่ 3 ของแต่ละความเค็ม ศึกษาการเจริญเติบโตและปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต

3.3.5 ทำการทดลองเช่นเดียวกับ ข้อ 3.4 ทุกสัปดาห์จนถึง 11 สัปดาห์

3.4. การทดลอง

3.4.1 ออสโมเรกูเลชัน

วิธีเก็บตัวอย่างเลือดปลาเพื่อวิเคราะห์ออสโมเรกูเลชันและองค์ประกอบเลือดคัดแปลงมาจาก Coffigny et al. (2004) และ Hemre and Sandnes (2008) เก็บตัวอย่างเลือดปลาแต่ละตัวที่ปลายหาง (caudal vein) โดยใช้หลอดฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร ที่เคลือบด้วยเฮปารินพร้อมเข็มฉีดขนาด 25 G ก่อนเจาะเลือดสลับปลาด้วย 50 มิลลิกรัม/ลิตร MS-222 (tricaine metrane sulfonate) ในขณะที่เก็บตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างน้ำ 3 หลอด ๆ ละ 20 มิลลิลิตร เพื่อหาค่าออสโมลาริตีและไอออนในน้ำควบคู่ไปกับตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างเลือดตัวละ 1 มิลลิลิตร ข้อมูลที่ต้องวิเคราะห์ทันที ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นหรือค่าฮีมาโตคริต (Hct) ฮีโมโกลบิน (Hb) และจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ออสโมลาริตี (osmolality) ในน้ำและเลือด ตัวอย่างน้ำที่เหลือนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (-20°เซลเซียส) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไอออนควบคู่กับการวิเคราะห์ในเลือดในวันต่อไป ตัวอย่างเลือดที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็วรอบ 14,000g ที่ 4 °เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปเก็บไว้ในหลอดที่มีฝาปิดไว้ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งแล้วนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20°เซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ในวันต่อไป ได้แก่ วิเคราะห์ไอออน แลคเตต และกลูโคส

3.4.1.1 ออสโมลาริตีและไอออนในเลือดและน้ำ

ใช้ตัวอย่างเลือดและตัวอย่างน้ำ 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ออสโมลาริตีโดยใช้ เครื่องออสโมมิเตอร์ (Advanced Instrument Inc., Model 3320) วิเคราะห์ Na^+ K^+ และ Ca^{++} ในเลือดโดยเครื่องมือ AAS (Atomic absorption spectrophotometer) วัด Cl⁻ ตามวิธี Thiocyanate method (Franson, 1985)

3.4.1.2 กิจกรรมของเอ็นไซม์ Na^+/K^+ -ATPase (NKA) ในเหงือก

หลังเก็บตัวอย่างเลือด ตัดเหงือกด้านขวาของปลาบริเวณแผ่นเหงือก (gill arch) ที่ 2 ซึ่งเหงือกที่ 3-5 (gill filament) เพื่อวิเคราะห์ความว่องไวของเอ็นไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ของเหงือกปลา วิธีการวิเคราะห์คัดแปลงมาจาก McCormick (1993) และ Mancera et al. (2002) โดยสรุปคือ ตัดเหงือกปลาประมาณ 20 มิลลิกรัมจุ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ SEI (pH 7.4) (100 มิลลิโมล NaCl, 8 มิลลิโมล MgCl_2 , 30 มิลลิโมล imidazole, 0.1 มิลลิโมล EDTA, 3mM ATP, pH 7.6) เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80° เซลเซียส

เพื่อวิเคราะห์ในวันต่อไปแต่ไม่เกิน 3 เดือน ในวันที่วิเคราะห์นำเหงือกมาบดละเอียด (homogenize) เป็นเวลา 10-15 วินาที นำเหงือกมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000g อุณหภูมิ 4 ° เซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowery et al. (1951) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ NKA โดยวัดปริมาณฟอสเฟสที่ปล่อยออกไปจากตัวอย่างที่อยู่ในบัฟเฟอร์ นำส่วนใส 15 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ที่มี 50 ไมโครลิตรของสารละลายเกลือ (50 มิลลิโมล imidazole, 400 มิลลิโมล NaCl, 16 มิลลิโมล $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ และ 80 มิลลิโมล KCl) 4 หลอด (2 หลอดแรก มี 80 มิลลิโมล KCl แต่ 2 หลอดหลังไม่มี แต่มี 2.5 มิลลิโมล Ouabain มาแทนที่ 80 มิลลิโมล KCl) เติมสารละลายที่จะวิเคราะห์ 15 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 0.015 g ATP และ 10 ml imidazole buffer) ทิ้งไว้ 30 นาที เติม 10% TCA ที่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000g เวลา 10 นาที ส่วนใสนำไปวิเคราะห์ ionic phosphate ตามวิธี Sigma Diagnostics Procedure No. 670 ค่าได้อยู่ในหน่วย ไมโครโมลฟอสเฟต/ชั่วโมง/มิลลิกรัม โปรตีน

3.4.2 เมแทบอลิซึม

3.4.2.1 อัตราการบริโภคออกซิเจนหรืออัตราการหายใจ (oxygen consumption rate)

หลังจากที่ให้ปลาอาหาร 1 วัน วัดอัตราการบริโภคออกซิเจนของปลา โดยสุ่มตัวอย่างปลาจากบ่อที่ 1 มาอยู่ในท่อวัดอัตราการหายใจ ซึ่งเป็นท่อ PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร สำหรับปลาขนาดใหญ่ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตรสำหรับปลาขนาดเล็ก ท่อวัดอัตราการหายใจมีฝาปิดทั้งสองด้าน แต่ละด้านต่อด้วยสายยางที่มีการป้องกันไม่ให้น้ำซึมออก สายยางด้านหนึ่งต่อเข้ากับเครื่องปั้มน้ำ (รูปที่ 3.2) ก่อนทดลองให้ปลาอยู่ในท่อวัดอัตราการบริโภคออกซิเจน ปิดฝาทั้งสองด้านและเปิดเครื่องปั้มน้ำ ตรวจสอบไม่ให้น้ำไหลออกบริเวณรอบ ๆ สายยางและฝาปิดทั้งสองด้าน ปลาอยู่ในท่อวัดอัตราการหายใจอย่างน้อย 1 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการชินสภาพและลดความเครียด หลังจากนั้นปิดเครื่องปั้มน้ำและสายยางทั้งสองด้านระวังอย่าให้มีฟองอากาศในท่อวัด ปลาอยู่ในระบบปิด 1 ชั่วโมง อัตราการบริโภคออกซิเจนวัดจากออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ที่หายไปก่อนปิดและ

หลังปิดฝาในเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้แน่ใจว่าออกซิเจนที่หายไปมาจากสัตว์อย่างเดียว ทำการทดลองอีก 1 ชุด (control) โดยปราศจากปลาในท่อดัดอัตราการหายใจ แล้วนำออกซิเจนที่ละลายในน้ำมาหักออก ค่า DO ของน้ำวิเคราะห์โดยวิธี Azide modification of indometric method หรือ Winker (APHA et al., 1985) แล้วนำมาวิเคราะห์อัตราการบริโภคออกซิเจน

วิเคราะห์อัตราการบริโภคออกซิเจนดัดแปลงจากสูตร ดังนี้ (Chen et al., 2009)

$$\text{OCR} = \frac{(DO_0 - DO_t) \times V}{t} \text{ mg/h}$$

โดย OCR หมายถึง อัตราการบริโภคออกซิเจน

DO_0 และ DO_t หมายถึง ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) ก่อนปิดและหลังปิดท่อดัดอัตราการหายใจในเวลา 1 ชั่วโมง

V หมายถึง ปริมาตรของท่อดัดอัตราการหายใจ (ลิตร)

t หมายถึง ระยะเวลาที่ปลาอยู่ในท่อดัดอัตราการหายใจระบบปิด (1 ชั่วโมง)

(การวิเคราะห์อัตราการบริโภคออกซิเจนในครั้งนี้อาจไม่ได้คิดต่อหน่วยน้ำหนักปลา ดังนั้นค่าที่ออกมาอยู่ในหน่วย มิลลิกรัมของออกซิเจน/ชั่วโมง/ตัว)

3.4.2.2 อัตราการขับแอมโมเนีย

การวิเคราะห์อัตราการขับแอมโมเนียรวม (NH_3 และ NH_4^+) ทดลองควบคู่ไปกับการวัดอัตราการหายใจ โดยใช้วิธีซาลิไซเลต-ไฮโปคลอไรต์ (salicylate hypochlorite method) (Verdouw et al., 1978) กล่าวโดยสรุปคือ กรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร วิเคราะห์แอมโมเนียทันที หรือเก็บไว้ที่ -20°C เซลเซียส ภายในเวลา 1 วันหลังจากเก็บตัวอย่างน้ำ เตรียมสารละลายมาตรฐาน 50 มิลลิโมล/ลิตร (NH_4)₂SO₄ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมล/ลิตร, 50 ไมโครโมล/ลิตร, 75 ไมโครโมล/ลิตร, 100 ไมโครโมล/ลิตร, 125 ไมโครโมล/ลิตร และ 150 ไมโครโมล/ลิตร ใส่น้ำตัวอย่างน้ำที่กรองแล้วในหลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 7 มิลลิลิตร. ปรับ pH ให้มากกว่า 10.4 ด้วย NaOH ที่เข้มข้น นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 3.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 3.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายดังต่อไปนี้ 1) 40% Sodium salicylate 1 มิลลิลิตร 2) 2% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 มิลลิลิตร ที่ผสมกับ 10% Sodium citrate ใน 0.1 N NaOH และ 3) 0.4

มิลลิลิตร NaOCl ลงไปในหลอดที่มีน้ำตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน และหลอดที่มีน้ำกลั่นอย่างเดียวก่อน 7 มิลลิลิตร. เขย่าหลอดให้สารรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่าแอมโมเนียรวมเทียบกับสารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน นำค่าแอมโมเนียในน้ำก่อนปิดและหลังปิดเครื่องวัดอัตราการหายใจมาวิเคราะห์อัตราการขับแอมโมเนียจากสูตร ดังนี้ (Chen et al., 2009)

$$AER = \frac{(N_t - N_0) \times V}{t \times W} \mu\text{M}/\text{mg}/\text{h}$$

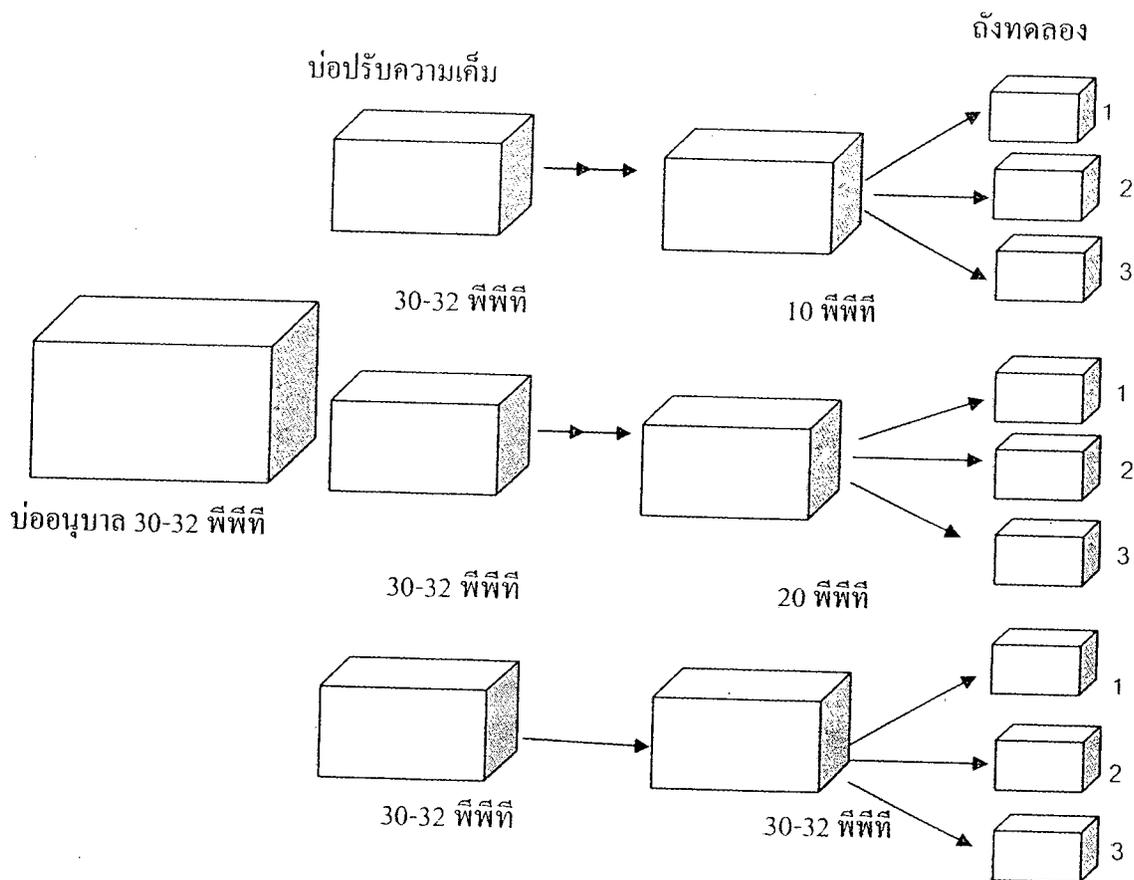
โดย AER หมายถึงอัตราการขับแอมโมเนีย

N_t และ N_0 หมายถึงความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำ (ไมโครโมล/ลิตร) ก่อนปิดและหลังปิดท่อวัดอัตราการหายใจในเวลา 1 ชั่วโมง

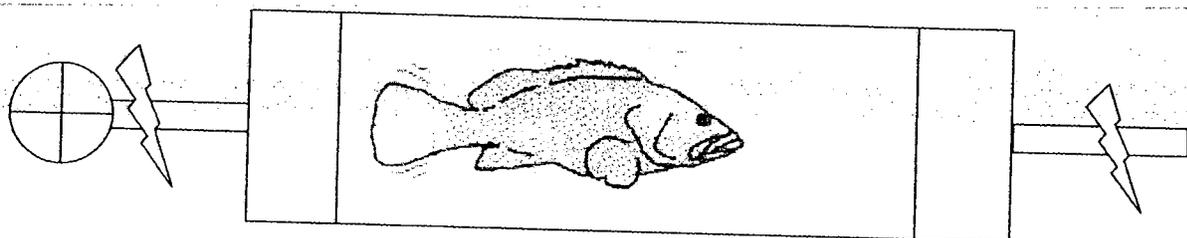
V หมายถึง ปริมาตรของท่อวัดอัตราการหายใจ (ลิตร)

t หมายถึง ระยะเวลาที่ปลาอยู่ในท่อวัดอัตราการหายใจระบบปิด (1 ชั่วโมง)

W หมายถึง น้ำหนักของปลา (มิลลิกรัม)



รูปที่ 3.1 แบบการทดลองการศึกษาออสโมเรกูเลชันและแทบอลิซึม



รูปที่ 3.2 ท่อวัดอัตราการบริโภคออกซิเจน

3.4.2.3 องค์ประกอบเลือด

3.4.2.3.1 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น หรือฮีมาโตคริต (haematocrit) ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดง

วัดฮีมาโตคริตทำได้โดยบรรจุเลือด (ประมาณ 10 ไมโครลิตร) ในหลอดฮีมาโตคริต (vitrex medical A/S) ความยาว 75 มิลลิเมตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,200 เวลา 10 นาที วัดความยาวของหลอดที่มีเม็ดเลือดอัดแน่นเทียบกับความยาวทั้งหมดในหน่วยเปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (540 นาโนเมตร) โดยวิธี Cyanmethahaemoglobin (Blaxhall and Daisley, 1973) นับจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) โดยใช้ เครื่องนับเม็ดเลือด (haematocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเจือจางเลือด 1:500 เท่า หยดบนสไลด์นับเม็ดเลือด นับจำนวนเม็ดเลือดแดง แล้วคำนวณปริมาณเม็ดเลือดต่อมิลลิลิตร ในหน่วย ล้านเซลล์/มิลลิลิตร

3.4.2.3.2 ปริมาณกลูโคสในเลือด

โดยวิธี Glucose oxidase method (Sigma kit 510-A)

3.4.2.3.3 ปริมาณแลคเตตในเลือด

การวิเคราะห์แลคเตตในเลือด ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Sigma Kit no 826 นำตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดพลาสติกเติม 200 ไมโครลิตร Perchloric acid (PCA) ที่เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000g. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาทดลองโดยเติมสารละลาย 1.4 มิลลิลิตร incubation medium (10 มิลลิกรัม NAD, 2 มิลลิลิตร Glycine buffer with 12 มิลลิโมล EDTA, 4 มิลลิลิตร dH₂O และ 0.1 lactate dehydrogenase) เตรียมหลอดควบคุม โดยใช้ 100 ไมโครลิตร 8% PCA ที่เติม 1.4 มิลลิลิตร incubation medium นำหลอดทดสอบทั้งหมด (ชุดทดลอง ชุดควบคุม และชุดมาตรฐาน) มาแช่ในน้ำอุ่น 37°เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบกับ ชุดมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายแลคเตตมาตรฐานตั้งต้น เตรียมได้จาก เจือจางกรดแลคตริก 5 มิลลิโมล/ลิตร ด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า แล้วนำไปเจือจางอีกให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละหลอดเป็น 0 ไมโครโมล/ลิตร, 1.33 ไมโครโมล/ลิตร, 2.66 ไมโครโมล/ลิตร, 4 ไมโครโมล/ลิตร, 5.33 ไมโครโมล/ลิตร, และ 6.66 ไมโครโมล/ลิตร ตามลำดับ ก่อนที่จะปรับ

อุณหภูมิ ร่วมกับชุดทดลอง เต็ม 1 มิลลิลิตร incubation medium ลงในหลอดแต่ละหลอด สารละลาย incubation medium เตรียมได้จากการผสมสาร 30 มิลลิกรัม NAD, 60 มิลลิลิตร Glycine buffer ด้วย 12 มิลลิโมล EDTA, 0.7 มิลลิลิตร d H₂O และ 0.2 มิลลิลิตร lactate dehydrogenase)

3.4.3 ศักยภาพการเพาะเลี้ยง

ศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, SGR) น้ำหนักเพิ่มขึ้นต่อวัน (BWG) การเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (relative growth weight, RGW) อัตราแลกเปลี่ยน (feed conversion ratio, FCR), อัตราการกินอาหาร (FI) ความยาวทั้งหมด (TL, total length) อัตราส่วนน้ำหนักและความยาว (Kc, coefficient of condition) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV, coefficient of variation) ตามวิธีการของ Azaza et al. (2008), Salari et al. (2012) Elahee and Bhagwant (2007) จากสูตรดังนี้

$$\text{SGR (\%)} = 100 \text{ dt}^{-1} \text{ Ln} \frac{\text{FBW}}{\text{IBW}}$$

$$\text{BWG (g/day)} = \frac{\text{FBW} - \text{IBW}}{\text{dt}}$$

$$\text{RGW (\%)} = 100 \frac{\text{FBW} - \text{IBW}}{\text{IBW}}$$

$$\text{FCR (g/g)} = \frac{F}{(\text{Bf} - \text{Bi})}$$

$$\text{FI (g/day)} = \frac{\text{g dry matter}}{\text{day}}$$

$$\text{Kc} = 10^5 \frac{\text{mean weight}}{\text{length}^3}$$

$$\text{CV} = \frac{\text{standard deviation of weight}}{\text{mean body weight}}$$

โดย dt หมายถึง ระยะเวลาการทดลอง (วัน) FBW และ IBW หมายถึง น้ำหนักสุดท้ายและเริ่มต้นเฉลี่ยของปลา (กรัม) ความยาว (length) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร F หมายถึง น้ำหนักอาหารที่กิน (กรัม) ต่อช่วงระยะเวลา, Bf และ Bi หมายถึง น้ำหนักของปลา (กรัม) สุดท้ายและเริ่มต้นในช่วงระยะเวลา

3.5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลแสดงถึงค่าเฉลี่ย ($X \pm S.D$) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยสาเหตุเนื่องมาจากความเค็ม ใช้ one-way ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยรายคู่ใช้ Student's t-test ความสัมพันธ์ระหว่างตัววัดและน้ำหนัก ใช้ Linear regression ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$