

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ท่อ PVC ขนาด 4 นิ้ว ยาว 0.88 เมตร จำนวน 24 ท่อน
2. ท่อ PVC ขนาด 4 นิ้ว ยาว 1.08 เมตร จำนวน 12 ท่อน
3. ท่อ PVC ขนาด 4 นิ้ว ยาว 0.38 เมตร จำนวน 12 ท่อน
4. ท่อ PVC ข้อต่อ 90 องศา ขนาด 4 นิ้ว จำนวน 16 ชิ้น
5. ท่อ PVC สามทาง ขนาด 4 นิ้ว จำนวน 8 ชิ้น
6. ท่อ PVC ขนาด 4 นิ้ว ยาว 3 เมตร 2 ท่อน
7. แผ่นผ้าพลาสติก PE ขนาด ยาว 2.16 เมตร กว้าง 1.95 เมตร จำนวน 6 ผืน
8. ตัวหนีบแผ่น PE 50 ตัว
9. ชุดตะกร้าใส่ปุ๋ยจำนวน 25 ตะกร้า
10. ชุดเชื่อมต่อสายออกซิเจน 24 ชุด สายออกซิเจนยาว .30 เมตร จำนวน 48 ท่อน
หัวทราย จำนวน 48 หัว
11. ชุดกรอง ขวดน้ำดื่มพลาสติกขนาด 750 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 12 ขวด + ผ้ากรองขนาด
25 เซนติเมตร ยาว 35 เซนติเมตร จำนวน 12 ชิ้น
12. ชุดเข็มเจาะเลือดขนาด 1 ml จำนวน 30 ชุด
13. สาร โซเดียมซัลเฟต 15 % + ขวด durance 150 ml.
14. ชุดปฏิบัติงานเครื่องวัดออกซิโมลาร์ตี+ สารคาลิเบต
15. ไมโครปิเปตขนาด 30-100 ไมโครลิตร
16. กล้องไฟน์โฟกัสแข็งเก็บตัวอย่างเลือด
17. ฟอर्मาลิน 10 %
18. เครื่อง salinometer
19. อุปกรณ์ผ่าตัด
20. เครื่อง microtome
21. อ่างลอยชิ้นเนื้อเยื่อ
22. slide warmer
23. classed box
25. เครื่อง automatic processor

วิธีการ

แผนการทดลอง

ทำการทดลองเลี้ยงปูที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน 7 ชุดการทดลอง (treatment) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ (replication) คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ความเค็มของน้ำที่ 10 ppt

ชุดการทดลองที่ 2 ความเค็มของน้ำที่ 15 ppt

ชุดการทดลองที่ 3 ความเค็มของน้ำที่ 20 ppt

ชุดการทดลองที่ 4 ความเค็มของน้ำที่ 25 ppt

ชุดการทดลองที่ 5 ความเค็มของน้ำที่ 30 ppt

ชุดการทดลองที่ 6 ความเค็มของน้ำที่ 35 ppt

ชุดการทดลองที่ 7 ความเค็มของน้ำที่ 40 ppt

น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองได้ผ่านขบวนการ stock น้ำมาผ่านการกรองแล้วนำมาเจือจางให้ได้ระดับความเค็มต่างๆ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมจัดระบบการทดลองนำท่อ PVC ต่อเป็นทรงลูกบาศก์ขนาดกว้าง .108 เมตร ยาว 0.88 เมตร ลึก 0.38 เมตร ให้ติดกันจำนวน 3 บ่อ เป็นจำนวน สองชุด นำแผ่นผ้า PE มาพับเป็นรูปทรงปริมาตรสี่เหลี่ยมผืนผ้าในแต่ละช่องทั้งหมด 6 บ่อ

2. จัดเตรียมชุดตัวกรองพร้อมจัดระบบออกซิเจนให้ครบทุกบ่อโดยชุดตัวกรองใส่จำนวน 2 ชุด ต่อ 1 บ่อ นำตะกร้าเลี้ยงปูใส่บ่อบ่อละ 2 ชุด รวม 12 ตะกร้า หัวยทรายใส่ทุกช่องของตะกร้าเลี้ยงปูพร้อมต่อสายออกซิเจน เตรียมจัดตะกร้า 13 ตะกร้าใส่ในบ่อ stock น้ำที่ความเค็ม 30 ppt

3. เตรียมบ่อ stock น้ำที่ความเค็ม 30 ppt

4. ตรวจคุณภาพน้ำ ค่าความเป็นด่าง, ค่าความเค็ม, อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง

5. เตรียมบ่อพักน้ำที่ความเค็ม 30 ppt นำมาใส่ในบ่อที่ทำเตรียมไว้ทั้ง 6 บ่อ นำปูทะเลมาพักไว้ใน บ่อทั้ง 6 บ่อ ช่องละ 1 ตัว เป็นจำนวน 36 ตัว ปูอีกจำนวน หนึ่งนำใส่ในตะกร้า ที่บ่อ stock ความเค็ม 30 ppt

6. หลังนำปูทะเลมาทำการเลี้ยง 7 วัน ทำการเพิ่มความเค็ม

6.1 บ่อที่ 1 บ่อที่ 2 ทำการปรับค่าความเค็มที่ทำการเลี้ยงเพิ่มเป็น 35 ppt และ 40 ppt ตามลำดับ ทำการเจาะเลือดปู 6 ตัวพร้อมเก็บตัวอย่างปฏมาตอง 3 ตัวของแต่ละค่าความเค็มเพื่อเก็บเนื้อเยื่อที่ 35 ppt และ 40 ppt มาทำสไลด์ถาวร

6.2 บ่อที่ 3 บ่อที่ 4 บ่อที่ 5 และบ่อที่ 6 เพิ่มความเค็มเป็น 25, 20, 15 และ 10 ppt ตามลำดับ ทำการเจาะเลือดปู 6 ตัว พร้อมเก็บตัวอย่างปฏมาตอง 3 ตัว ของแต่ละค่าความเค็มเพื่อเก็บเนื้อเยื่อที่ 25, 20, 15 และ 10 ppt มาทำสไลด์ถาวร

7. ทุกวันของการทดลองควรทำการซักผ้ากรองและเก็บเศษอาหารพร้อมด้วยการกรองเอาตะกอนออกตรวจสอบค่าความเค็มให้ตรงตามการปฏิบัติงานและทุกๆ 3 วันทำการตรวจสอบค่าความเป็นด่าง การให้อาหารด้วยปลาไหลควรให้ช่วงเวลา 16.00 น.-18.00 น.

8. เตรียมเครื่อง osmolarity พร้อมทั้งคาร์เบตเครื่องทุกครั้งก่อนการปฏิบัติงาน

8.1 ทำการดูดสารโซเดียมคลอไรด์ 0.1 ml และค่อยๆ ทำการดูดเลือดปูที่บริเวณแอ่งเลือดปูให้ได้ 0.1 ml และใส่หลอด osmotube ในช่วงการดูดเลือดปูควรแช่ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง ทุกครั้งที่ทำการวัดค่าออสโมลาลิตี

8.2 ทำการเก็บตัวอย่างปู 3 ตัวของแต่ละความเค็ม แช่สารละลาย formaline 10% เพื่อทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

9. การทำสไลด์เนื้อเยื่อ

9.1 ตัดเนื้อเยื่อเหงือกคู่ที่ 1,3 และ 7

9.2 ตัดเนื้อเยื่อตับ

9.3 ทำการละลายแคลเซียมจากเนื้อเยื่อ 2 ชั่วโมง

9.4 กระบวนการ tissue processor

9.5 หล่อพาราฟินใส่คัตเซ็ทบล็อก

9.6 ตัดเนื้อเยื่อด้วย microtome

9.7 สไลด์วางบน slide warmer

9.8 ทำการย้อมเนื้อเยื่อเหงือกด้วย hematoxylin และ eosin

9.9 ทำสไลด์ถาวรโดยการ mount



การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลวัดค่า heamolymph ของปูทุกสัปดาห์ในแต่ละระดับความเค็ม
2. ถ่ายภาพเนื้อเยื่อเหงือกด้วยกล้องจุลทรรศน์ในแต่ละระดับความเค็ม

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์การปรับออสโมลาลิตีของปูที่ความเค็มต่างๆ และลักษณะทางเนื้อเยื่อเหงือก ดังนี้

1. เก็บตัวอย่างเลือดปูมาวิเคราะห์วัดค่าออสโมลาลิตีนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติหาค่าความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS
2. นำภาพถ่ายเนื้อเยื่อเหงือกมาเปรียบเทียบกันตามลักษณะในแต่ละระดับความเค็ม

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลและคุณภาพน้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

31 ธันวาคม 2553 ถึง 20 มีนาคม 2554