บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

การทดลองผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มต่อการปรับสมดุลไอออนในกุ้งกุลาดำครั้งนี้ใช้อุปกรณ์ที่สำคัญคือ

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 932 ของบริษัท GBC Scientific Equipment PTY, Ltd. Australia
2. คอมพิวเตอร์ PC พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูป GBC 932 และชุดอุปกรณ์ต่อพ่วง สำหรับควบคุมการทำงานและประมวลผลข้อมูลจากเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
3. ถังก๊าซอะเซทีลีน (C_2H_2)
4. ถังก๊าซไนตรัสอ๊อกไซด์ (N_2O)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น JA - 14 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
6. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Freezer) รุ่น - 30 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO, JAPAN.
7. เครื่องวัดค่าความเค็ม (Hand refractometer) ของบริษัท ATAGO Co, Ltd. JAPAN
8. บ่อทดลองระบบปิด (Closed recirculating seawater system)
9. ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1 ตัน

การเตรียมบ่อทดลอง

บ่อทดลองที่ใช้เป็นบ่อซิเมนต์ ใช้ระบบการหมุนเวียนน้ำเป็นระบบปิด (closed recirculating seawater system) แต่ละบ่อประกอบด้วย 2 ส่วนคือบ่อเลี้ยง (culture tank) มีขนาด 0.75 x 0.75 x 0.75 ม.^{3} และบ่อกรองทางชีวภาพ (biological filtration tank) มีขนาด 0.25 x 0.75 x 0.75 ม.^{3} ทั้งสองบ่ออยู่ติดกันโดยที่ด้านพื้นบ่อมีท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว จำนวน 3 ท่อเชื่อมติดกันสำหรับเป็นทางผ่านของน้ำ โดยมีอวนตาถี่สีฟ้าหุ้มอยู่ที่ปลายด้านบ่อเลี้ยงเพื่อป้องกันกุ้งไม่ให้เข้าไปใต้บ่อกรอง ตรงกลางบ่อมีช่องระบายน้ำอยู่ตรงกลาง (central drain) ซึ่งมีท่อพีวีซีสูง 29 นิ้วปิดช่องกันน้ำออกอยู่ น้ำที่ระบายออกจะไหลลงสู่ท่อระบายน้ำรวมที่อยู่ด้านหน้าของบ่อ

ระบบกรองน้ำแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งประกอบด้วยตัวกรองทางชีวภาพจากด้านบนสู่ด้านล่างได้แก่ เปลือกหอยนางรม กรวด ทราย และอวนตาถี่สีฟ้า ส่วนที่สองประกอบด้วยท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว ยาว 29 นิ้ว ซึ่งเจาะรูขนาด 1/4 นิ้วโดยรอบประมาณ 94 รู โดยปิดด้านหนึ่งด้วยตัวปิดท่อ ส่วนอีกด้านหนึ่งเชื่อมกับท่อพีวีซีขนาด 1 นิ้ว ยาว 24 นิ้ว ด้วยข้องอแล้วปรับให้เป็นรูปตัวแอล จากนั้นเชื่อมกับข้องออีกหนึ่งชิ้นซึ่งด้านบนเจาะรู 1 รูสำหรับใช้เป็นทางผ่านของสายอากาศ (siphon) สายอากาศนี้มีความยาวสามในสี่ของท่อพีวีซีซึ่งด้านหนึ่งต่อเข้ากับท่อลมกลาง เพื่อใช้ดึงมวลน้ำจากด้านล่างของบ่อเลี้ยงเข้าสู่บ่อกรองทางชีวภาพ นำทั้งหมดมาประกอบรวมกันแล้วนำมาวางลงในบ่อเลี้ยง โดยหันข้องอชิ้นสุดท้ายลงในบ่อกรองทางชีวภาพ (รูปที่ 6 ก.) ส่วนที่สองจะเป็นส่วนที่ดึงมวลน้ำจากบ่อเลี้ยงเข้าสู่บ่อกรองทางชีวภาพ มวลน้ำที่ผ่านการกรองทางชีวภาพแล้วจะกลับเข้าสู่บ่อเลี้ยงโดยผ่านท่อพีวีซีด้านล่างซึ่งหุ้มปลายด้วยอวนตาถี่สีฟ้า ซึ่งทำให้มวลน้ำทั้งหมดมีการหมุนเวียนตลอดเวลาและมีคุณภาพดี สามารถใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ตลอดการทดลองโดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ในแต่ละบ่อทดลองมีท่อลมกลางวางตามแนวยาวด้านบนของบ่อสำหรับให้อากาศ โดยใช้สายอากาศที่ด้านปลายมีหัวทรายหรับให้อากาศต่อกับท่อลมกลาง(รูปที่ 6 ข.)

การเตรียมสัตว์ทดลอง

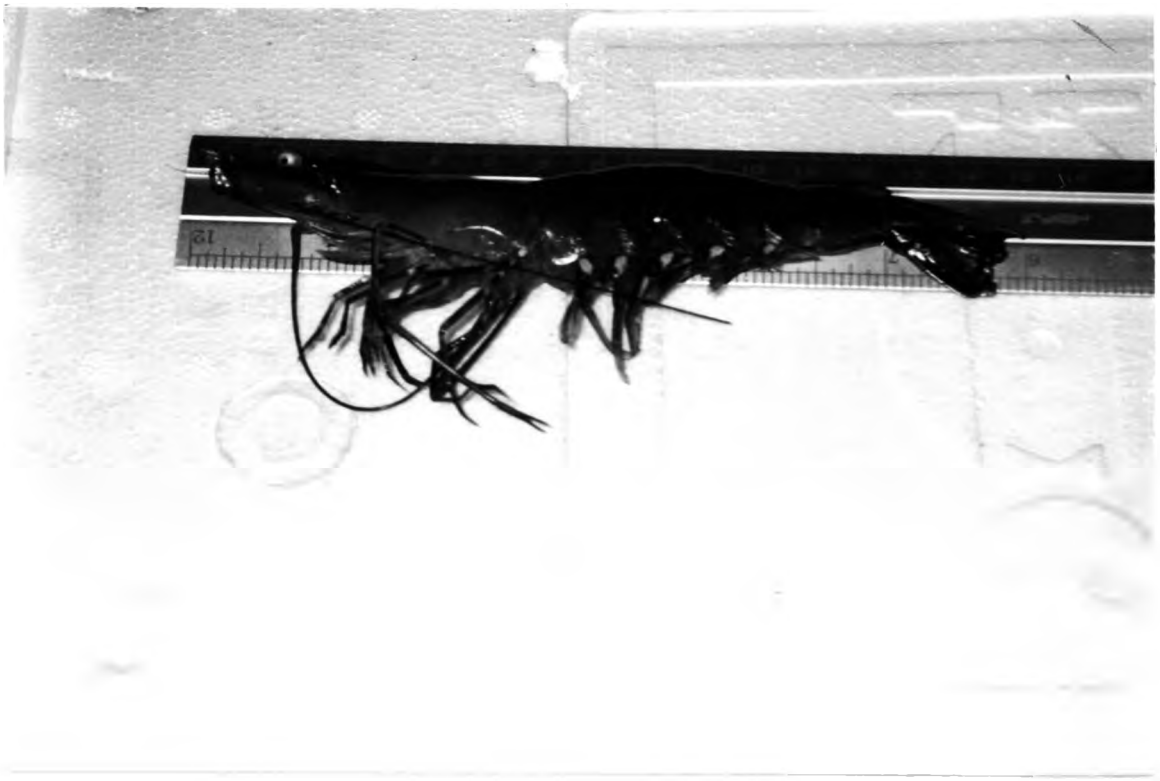
การทดลองครั้งนี้ใช้กุ้งกุลาดำตัวเต็มวัยระยะต้น(subadult) คัดเลือกตัวที่แข็งแรงจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาที่จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 5 - 8 ppt อายุประมาณ 3 เดือนหลังลงบ่อดิน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 12.39 ± 0.75 กรัม ความยาวเฉลี่ย 11.45 ± 0.49 ซม. (รูปที่ 7) ทำการทดลอง ณ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีลักษณะเป็นโรงเรือนที่มีหลังคาสูงและมีผนังทึบทั้งสี่ด้าน แสงอาทิตย์ไม่สามารถส่องผ่านลงไปได้ จึงสามารถควบคุมอุณหภูมิและปริมาณแสงภายในได้

น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งเป็นน้ำที่มีความเค็มสูงจากนาเกลือจังหวัดสมุทรสงคราม มีความเค็มประมาณ 95 - 100 ppt นำมาผ่านถุงกรองขนาด 5 ไมครอนเพื่อกำจัดตะกอนและเศษวัสดุ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ (Calcium hypochloride ; $Ca(OCl)_2$) ความเข้มข้น 30 ppm และให้อากาศตลอดเวลาเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้คลอรีนที่ตกค้างสลายตัวไป จากนั้นกรองด้วยถุงกรองขนาด 5 ไมครอนอีกครั้งก่อนนำไปเจือจางในบ่อทดลองกับน้ำประปา เพื่อให้ได้ความเค็มตามที่ต้องการในระดับความสูงของน้ำ 0.55 เมตร แล้วให้อากาศตลอดเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำผสมกันได้ทั่วถึงก่อนนำกุ้งทดลองมาเลี้ยง

ก.

ข.

รูปที่ 6 ระบบเลี้ยงและระบบกรองกรองน้ำซึ่งใช้ระบบการหมุนเวียนน้ำระบบปิด (closed recirculating seawater system) ที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงกุ้งทดลอง



รูปที่ 7 กุ้งกุลาดำ ตัวเต็มวัยระยะต้น (subadult)

รูปที่ 8 การดูดเลือดจากกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงกุ้งมาพักไว้ที่ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1 ตันที่ความเค็มเดิมจากบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อปรับสภาพ เปลี่ยนน้ำ 50 % ทุกวัน กำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อโรคโดยจุ่มลงในฟอร์มาลีนเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำกลับไปไว้ที่ถังพักเหมือนเดิม ปรับสภาพกุ้งในถังพักเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วคัดเลือกตัวที่แข็งแรงนำไปทดลองต่อไป

ในทุกการทดลองนำกุ้งที่จะนำมาทดลองมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวก่อนนำลงบ่อทดลองทุกครั้ง เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 3 ครั้งคือ 7:00 น. 13:00 น. และ 19:00 น. ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน ในระหว่างการเลี้ยงได้ทำการดูดตะกอนและเศษอาหารออกก่อนให้อาหารมื้อแรกทุกวัน ตรวจสอบจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละบ่อทุกวัน ตรวจสอบค่าคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง ก่อนเริ่มเก็บเลือดกุ้งทุกครั้งและทุกการทดลองจะทำการอดอาหารก่อนเก็บเลือด 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันผลกระทบจากอาหาร

การทดลองผลของความเค็มต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำ

คัดเลือกกุ้งที่แข็งแรงจากถังพักกุ้งลงในบ่อทดลอง อัตราความหนาแน่น 25 ตัวต่อบ่อ (ประมาณ 44 ตัวต่อตารางเมตร) จำนวน 8 บ่อ ดังนี้

บ่อที่ 1 ชุดการทดลอง 5 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)
บ่อที่ 2 ชุดการทดลอง 5 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)
บ่อที่ 3 ชุดการทดลอง 17 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)
บ่อที่ 4 ชุดการทดลอง 17 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)
บ่อที่ 5 ชุดการทดลอง 30 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)
บ่อที่ 6 ชุดการทดลอง 30 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)
บ่อที่ 7 ชุดการทดลอง 42 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)
บ่อที่ 8 ชุดการทดลอง 42 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

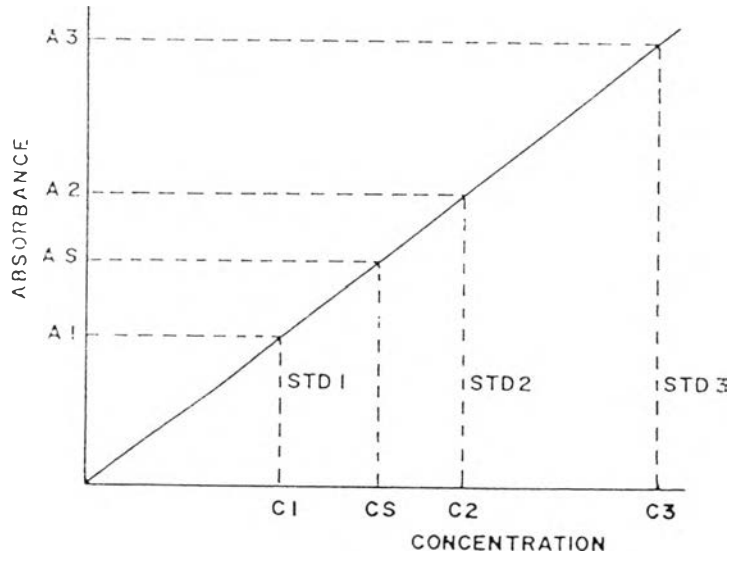
เริ่มปรับความเค็มให้ได้ตามการทดลอง โดยปรับจากความเค็มเดิมในอัตรา 3 ppt ต่อวัน จนได้ความเค็มที่ต้องการคือ 5 17 30 และ 42 ppt แล้วเลี้ยงกุ้งที่ระดับความเค็มต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน โดยเมื่อครบ 2 สัปดาห์ทำการติดเบอร์ (tag) ที่กรีกุ้ง เพื่อตรวจสอบการลอกคราบ เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือน ทำการเก็บเลือดกุ้งชุดการทดลอง โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 22G x 1 1/2 นิ้ว ซึ่งใช้ร่วมกับ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณฐานขาเดินคู่รองสุดท้ายปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (รูปที่

8) เก็บเลือดลงในหลอดโพลีเอทธีลีน (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตรซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็งแห้ง เสร็จแล้วนำกุ้งลงไปเลี้ยงที่บ่อทดลองเดิม นำเลือดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11

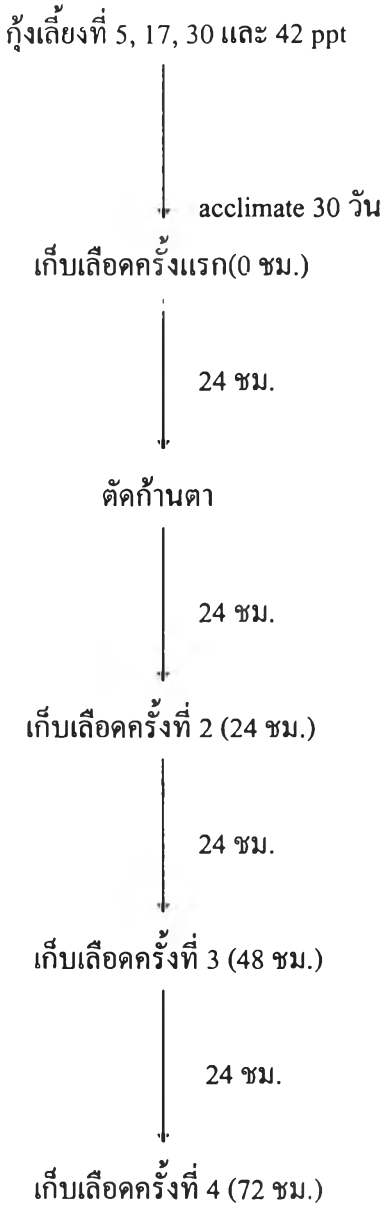
เตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อนำไปหาความเข้มข้นในเลือดกุ้ง ได้แก่ โซเดียม, โปแตสเซียม, แมกนีเซียม และ แคลเซียมไอออน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Funge - Smith, 1995) โดยนำเลือดกุ้งที่อยู่ในหลอดโพลีเอทธีลีนไปปั่นที่เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ในอัตราความเร็ว 10000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงซ้ำด้วยอัตราเดิมจนเลือดตกตะกอน แล้วดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบน(serum)ปริมาณ 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดโพลีเอทธีลีนอีกอันหนึ่ง เติมกรดไนตริกเข้มข้นลงไป 100 ไมโครลิตรเพื่อใช้เป็นตัวทำละลายไอออนให้จับตัวอยู่ในรูปโลหะไนเตรต นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยอัตรา 8000x g เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดส่วนใสออกมา 100 ไมโครลิตรแล้วนำมาเจือจางกับน้ำกลั่น 3 ครั้ง ในอัตราการเจือจางต่าง ๆ เพื่อวัดค่าการดูดซับแสงได้ในช่วงที่เหมาะสมกับประสิทธิภาพของเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ อัตราการเจือจางของไอออนต่าง ๆ มีดังนี้ โซเดียมไอออนเจือจาง 40,000 เท่า โปแตสเซียมไอออนเจือจาง 1,000 เท่า แมกนีเซียมไอออนเจือจาง 400 เท่า และแคลเซียมไอออนเจือจาง 100 เท่า แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 932 มิเตอร์ รุ่น 932 ของบริษัท GBC Scientific Equipment PTY, Ltd. Australia ณ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รูปที่ 9) โดยใช้วิธี calibration method ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Athanasopoulos (1993) ขั้นตอนการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก แสดงในภาคผนวก ก. (รูปที่ 10)

สำหรับไอออนประจุบวกหนึ่งได้แก่ โซเดียมและโปแตสเซียมไอออน จะถูกไอออนประจุลบที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบบางตัว เช่น ฟอสเฟต ซัลเฟต เป็นต้น ทำให้ผลการหาปริมาณได้น้อยกว่าปกติเมื่อใช้ air - acetylene เป็นเชื้อเพลิง ซึ่งจะทำให้เกิดสารประกอบที่อยู่ตัวบางชนิดเรียกว่า “refractory compound” มีผลให้การแตกตัวของเป็นอะตอมของธาตุที่วิเคราะห์น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นจึงเติมสารละลายซึ่งเรียกว่า “releasing agent” ลงไป releasing agent จะทำให้สามารถเกิดสารประกอบที่อยู่ตัวได้ดีกว่าไอออนประจุลบเหล่านั้น ในการทดลองครั้งนี้จึงเติม CsCl ลงไป 2,000 ไมโครกรัมต่อน้ำกลั่น1 มิลลิลิตร

รูปที่ 9 เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น 932 บริษัท GBC Scientific Equipment PTY, Ltd. Australia



รูปที่ 10 การวิเคราะห์วิธี calibration method ตาม Athanasopoulos (1993)



รูปที่ 11 ขั้นตอนการทดลองผลของความเค็มต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำ และผลของการตัดก้านตาต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำ

การทดลองผลของการตัดก้านตาต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำ

ใช้กุ้งกุลาดำจากการทดลองผลของความเค็มต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำนำมาตัดก้านตา ส่วนชุดควบคุมไม่ตัดก้านตาและเก็บเลือดเหมือนบ่อตัดก้านตาทุกประการ เก็บเลือดกุ้งหลังจากตัดก้านตาแล้วเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยดูดเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณฐานขาเดินคู่รองสุดท้ายประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 11 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง ตลอดจนการเตรียมตัวอย่างเหมือนการทดลองผลของความเค็มต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำทุกประการ นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโซเดียม, โปแตสเซียม, แมกนีเซียมและแคลเซียมไอออน ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้วิธี Calibration Method ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Athanasopoulos (1993)

การทดลองผลของการตัดก้านตาต่อความสามารถในการปรับตัวเมื่อเปลี่ยนแปลงความเค็ม

คัดเลือกกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ตัวเต็มวัยระยะต้นที่แข็งแรงจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาที่จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 5 - 8 ppt อายุประมาณ 3 เดือนหลังลงบ่อดิน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 20.74 ± 2.09 กรัม ความยาวเฉลี่ย 14.20 ± 0.53 ซม. นำมาพักในถังขนาด 1 ตันเพื่อปรับสภาพและกำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ตามวิธีการเตรียมสัตว์ทดลองดังที่ได้กล่าวมาแล้ว หลังจากปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ คัดเลือกตัวที่แข็งแรงมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว นำมาเลี้ยงในบ่อทดลองในอัตราความหนาแน่น 25 ตัวต่อบ่อ (44 ตัวต่อตารางเมตร) จำนวน 4 บ่อ โดยแยกเป็นการทดลองดังนี้

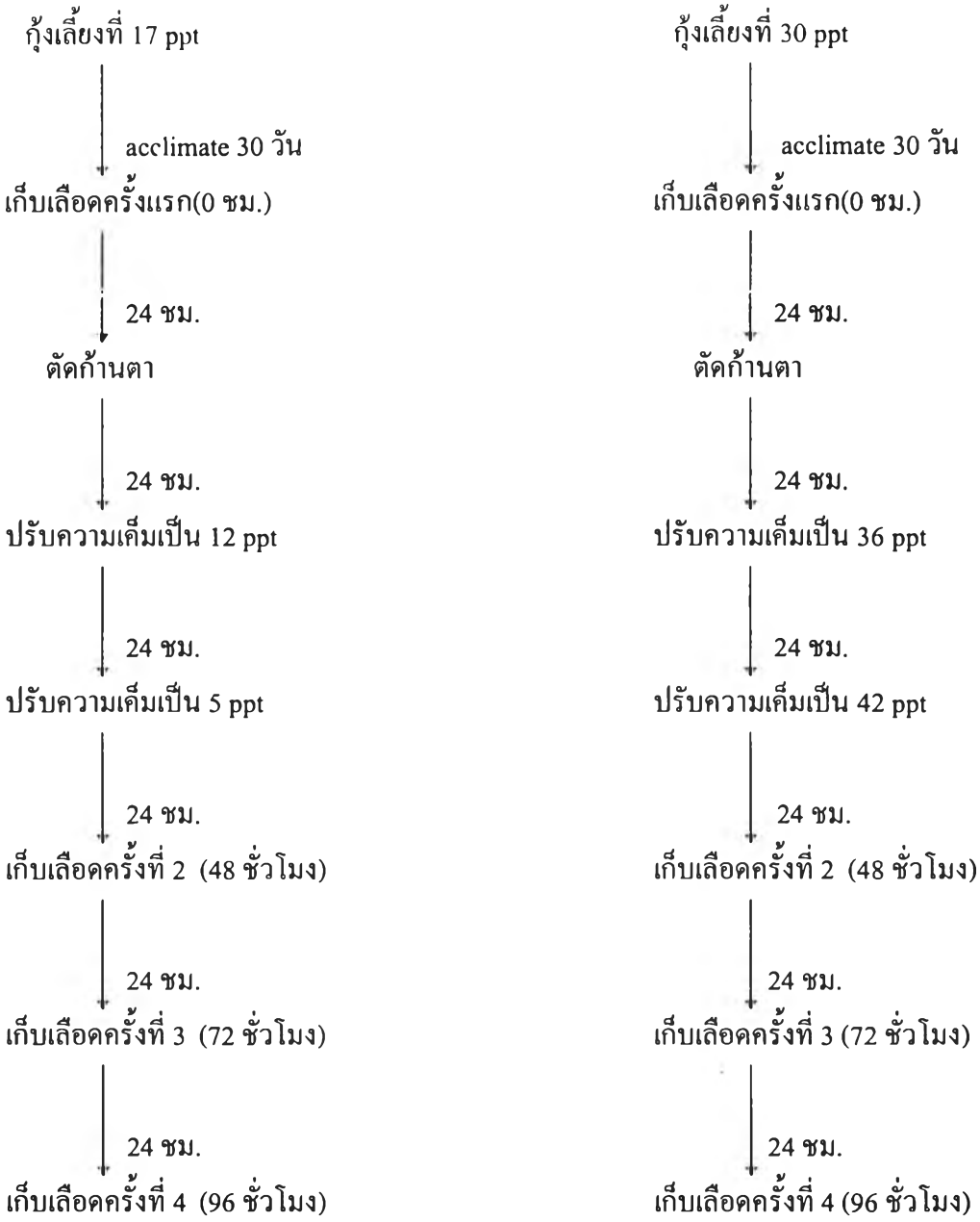
บ่อที่ 1 ชุดความเค็ม 17 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)

บ่อที่ 2 ชุดความเค็ม 17 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

บ่อที่ 3 ชุดความเค็ม 30 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)

บ่อที่ 4 ชุดความเค็ม 30 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

เริ่มปรับความเค็มให้ได้ตามการทดลอง โดยปรับความเค็มของน้ำจากความเค็มเดิมในอัตรา 3 ppt ต่อวันจนได้ความเค็มที่ต้องการ แล้วเลี้ยงกุ้งต่อไปอีก 1 เดือน โดยเมื่อครบ 2 สัปดาห์ทำการติดเบอร์(tag) ที่กรีกุ้ง เพื่อตรวจสอบการลอกคราบ เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือนนำกุ้งมาตัดก้านตา 1 ข้างด้วยมีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนชุดควบคุมไม่ตัดก้านตาและเก็บเลือดเหมือนบ่อตัดก้านตาทุกประการ เก็บเลือดกุ้งหลังจากตัดก้านตาแล้วเลี้ยงไว้ที่ความเค็มเดิม 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเค็มกุ้งชุด 17 ppt เป็น 12 ppt และ 5 ppt ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ปรับความเค็มกุ้งชุด



รูปที่ 12 ขั้นตอนการทดลองผลของการตัดก้านตาต่อการปรับตัวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเค็ม

30 ppt เป็น 36 ppt และ 42 ppt ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ เก็บเลือดกุ้งทั้งสองชุดที่เวลา 48 72 และ 96 ชั่วโมงหลังตัดก้านตาตามลำดับ ขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 13 ขั้นตอนการเก็บรักษาตัวอย่าง ตลอดจนการเตรียมตัวอย่างเหมือนการทดลองผลของความเค็มต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำทุกประการ นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ โซเดียม, โปแตสเซียม, แมกนีเซียมและแคลเซียมไอออน ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้วิธี Calibration Method ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Athanasopoulos (1993)

การทดลองผลของการตัดก้านตาและอาหารเสริมคาร์นิทีนตาต่อความสามารถในการปรับตัวเมื่อเปลี่ยนแปลงความเค็ม

คัดเลือกกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ตัวเต็มวัยระยะต้นที่แข็งแรงจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา ที่จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็ม 5 - 8 ppt อายุประมาณ 3 เดือนหลังลงบ่อดิน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 20.85 ± 1.03 กรัม ความยาวเฉลี่ย 13.42 ± 0.16 ซม. นำมาพักในถังขนาด 1 ตันเพื่อปรับสภาพและกำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ตามวิธีการเตรียมสัตว์ทดลองดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

เตรียมอาหารเสริมคาร์นิทีน (L-carnitine supplement feed) ในอัตรา 500 มก.ต่ออาหารเม็ดสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม (Jayaprakas and Sambhu, 1995) คลุกรวมกันโดยใช้น้ำมันปลาเป็นสารเหนียวช่วยให้ยึดติดกัน ในอัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักอาหารทั้งหมด คลุกให้เข้ากันแล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทและป้องกันความชื้น อาหารที่คลุกแล้วจะใช้หมดภายใน 3 วันแล้วจึงคลุกอาหารชุดใหม่

หลังจากปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ คัดเลือกตัวที่แข็งแรงมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว นำมาเลี้ยงในบ่อทดลองในอัตราความหนาแน่น 25 ตัวต่อบ่อ (44 ตัวต่อตารางเมตร) จำนวน 4 บ่อ โดยแยกเป็นการทดลองดังนี้

1. ชุดอาหารเม็ดปกติ

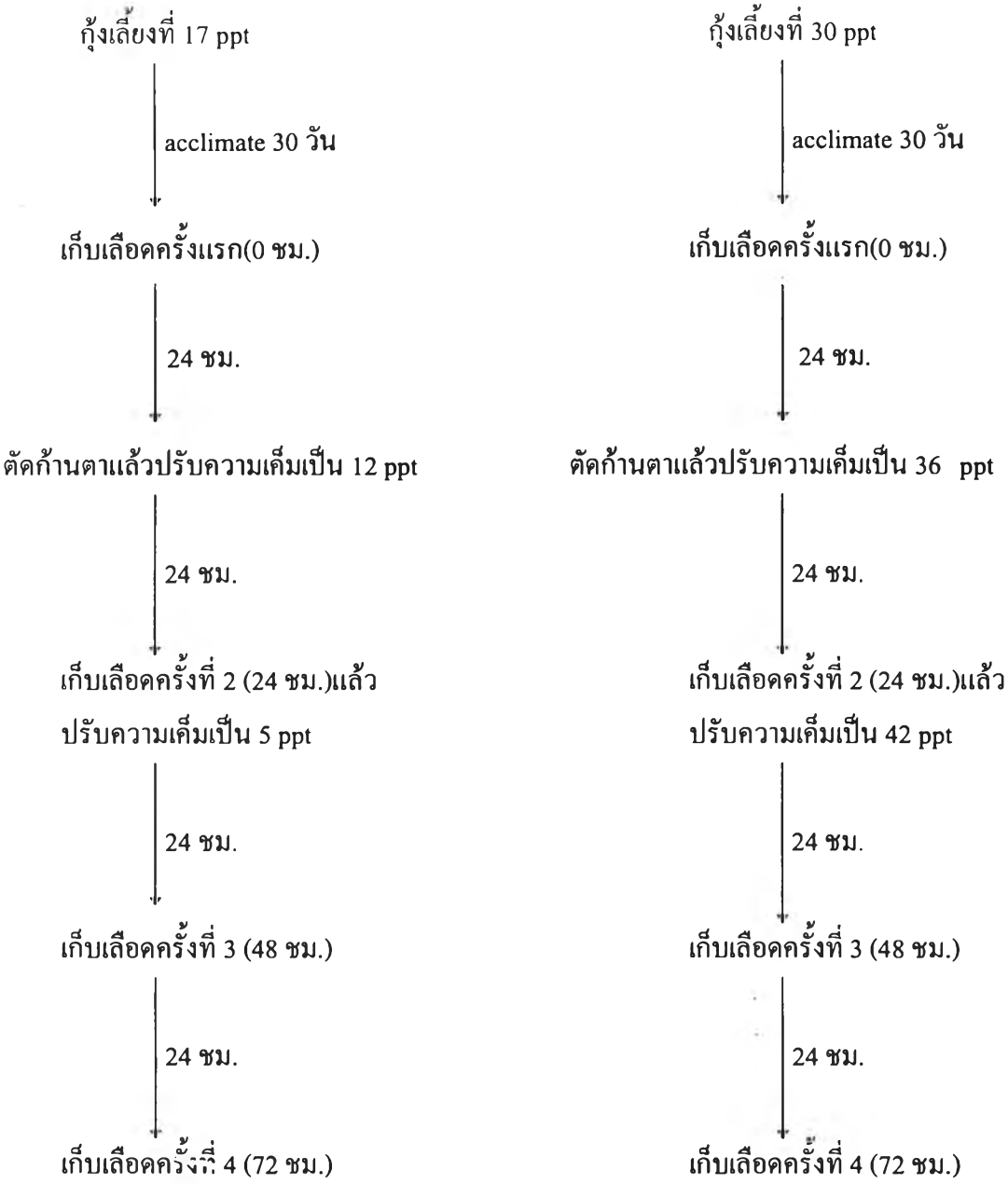
บ่อที่ 1 ชุดความเค็ม 17 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)

บ่อที่ 2 ชุดความเค็ม 17 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

บ่อที่ 3 ชุดความเค็ม 30 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)

บ่อที่ 4 ชุดความเค็ม 30 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

I 19236700



รูปที่ 13 ขั้นตอนการทดลองผลของการตัดก้านตาและอาหารเสริมคาร์นิทีนต่อการปรับตัวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเค็ม

2. ชุดอาหารเม็ด + อาหารเสริมคาร์นิทีน

บ่อที่ 5 ชุดความเค็ม 17 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)

บ่อที่ 6 ชุดความเค็ม 17 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

บ่อที่ 7 ชุดความเค็ม 30 ppt (เพื่อใช้ในการตัดก้านตา)

บ่อที่ 8 ชุดความเค็ม 30 ppt (เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ตัดก้านตา)

เริ่มปรับความเค็มให้ได้ตามการทดลอง โดยปรับความเค็มของน้ำจากความเค็มเดิมในอัตรา 3 ppt ต่อวันจนได้ความเค็มที่ต้องการ แล้วเลี้ยงกุ้งต่อไปอีก 1 เดือน โดยเมื่อครบ 2 สัปดาห์ทำการติดเบอร์(Tag) ทีกรีกุ้ง เพื่อตรวจสอบการลอกคราบ เมื่อเลี้ยงครบ 1 เดือนตรวจสอบอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโต แล้วนำกุ้งมาตัดก้านตา 1 ข้างด้วยมีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนชุดควบคุมไม่ตัดก้านตาและเก็บเลือดเหมือนบ่อตัดก้านตาทุกประการ เก็บเลือดกุ้งหลังจากตัดก้านตาแล้วเลี้ยงไว้ที่ความเค็มเดิม 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเค็มกุ้งชุด 17 ppt เป็น 12 ppt และ 5 ppt ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ปรับความเค็มกุ้งชุด 30 ppt เป็น 36 ppt และ 42 ppt ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ เก็บเลือดกุ้งทั้งสองชุดที่เวลา 24 48 และ72 ชั่วโมงหลังตัดก้านตาตามลำดับ ขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 14 ขั้นตอนการเก็บรักษาตัวอย่าง ตลอดจนการเตรียมตัวอย่างเหมือนการทดลองผลของความเค็มต่อการปรับสมดุลเกลือและน้ำในกุ้งกุลาดำทุกประการ นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ โซเดียม, โปรตีนแตสเซียม, แมกนีเซียมและแคลเซียมไอออน ด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้วิธี Calibration Method ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Athanasopoulos (1993)

การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลทั้งหมดแล้วทดสอบข้อมูลทางสถิติ ดังนี้

1. ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+} และ Ca^{2+} ไอออน ที่ระดับความเค็ม 5, 17, 30 และ 42 ppt ด้วยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (Multiple comparison) ด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences) (กัลยา, 2541)

2. ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นไอออนชุดควบคุมและชุดตัดก้านตาด้วยการวิเคราะห์ Analysis of covariance และหาความสัมพันธ์เชิงเส้นของการผันแปรตามระยะ

เวลาด้วยการวิเคราะห์ Linear regression analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SAS (Statistic Analytical System) (SAS, 1985)