บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 กุ้งทดลองในการทดลองที่ 1

1.1.1 กุ้งขาววานาไม

เตรียมกุ้งทดลองที่ปราศจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โดยนำมาจากฟาร์มที่ไม่มีประวัติของการเกิดโรค และนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสและแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยใช้กุ้งขาววานาไมอายุ 35-45 วัน (น้ำหนักประมาณ 2.24 ± 0.02 กรัม) จำนวน 3,000 ตัว

1.2 กุ้งทดลองในการทดลองที่ 2

1.1.2 กุ้งขาววานาไม

เตรียมกุ้งทดลองที่ปราศจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โดยนำมาจากฟาร์มที่ไม่มีประวัติของการเกิดโรค และนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสและแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล ใช้กุ้งขาววานาไมน้ำหนักตัวเริ่มต้นประมาณ 10.00 ± 0.01 กรัม

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก)

1.3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก)

1.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว (ภาคผนวก ก)

1.4 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

ในการทดลองนี้จะใช้สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งทดลองทั้งหมด 5 สูตร แตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของบีเทน โดยคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีนประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ พลังงานประมาณ 370 กิโลแคลอรี่ต่อ 100 กรัม ให้อาหารวันละ 4 ครั้งต่อวัน

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งขาวในบ่อ

2.1.1.1. กระชังขนาด 1×1×1.5 เมตร

2.1.1.2. อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยาง หัวทราย

2.1.1.3. อุปกรณ์ขนย้ายกุ้ง ได้แก่ สวิงช้อนกุ้งและถังพลาสติก

2.1.1.4. ตาข่ายสำหรับหลบซ่อนตัวกุ้ง

2.1.2 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งขาวในตู้

2.1.2.1. ตู้กระจกขนาด 20×48×20 นิ้ว ความจุน้ำ 200 ลิตร

2.1.2.2. อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยาง หัวทราย

2.1.2.3. อุปกรณ์ขนย้ายกุ้ง ได้แก่ สวิงช้อนกุ้งและถังพลาสติก

2.1.2.4. อุปกรณ์การเปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยางดูดน้ำ และเครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม (submersible pump)

2.2 อุปกรณ์การเตรียมอาหารทดลอง

2.2.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลองของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วยชุดผสมอาหารแบบ มีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Satorius รุ่นBasic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร และมีดตัดอาหาร

2.2.3 ตู้แช่แข็ง เพื่อเก็บอาหารทดลอง

2.3.4 ตู้อบอาหาร

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.3.1 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

2.3.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง บิวเรต ปิเปต ลูกยาง และขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

2.3.3 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

2.4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่นKjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ และบิวเรต

2.4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.5 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของกุ้ง

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร กะละมังพลาสติก สวิงช้อนกุ้ง กล่องพลาสติก ผ้าขนหนูซับตัวกุ้ง

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.6.1 อุปกรณ์เก็บเลือดกุ้ง ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.6.2 เครื่องสำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti^{TM} 30 centrifuge) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.6.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด คือ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) กล้องจุลทรรศน์

2.6.4 อุปกรณ์สำหรับเจือจางเลือด คือ หลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ไมโครปิเปต ทิป เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)

2.6.5 อุปกรณ์สำหรับย้อมสีเม็ดเลือด ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก 1.5 มิลลิลิตร สไลด์ (slide) แผ่นปิดสไลด์ (cover glass) เครื่องเขย่าผสม กล้องจุลทรรศน์

3. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของบีเทนต่อการเจริญเติบโต และความต้านทานโรคในกุ้งขาว ส่วนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของบีเทนต่อระบบสมดุลของของเหลวในร่างกายของกุ้งขาว โดยทำการศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน อัตราการรอดตาย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มเฉลี่ยต่อตัว ความต้านทานโรคแบคทีเรีย ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด องค์ประกอบเลือด และไอออนต่าง ๆ ในน้ำเลือด โดยการทดลองทั้ง 2 การทดลองใช้สูตรอาหารทดลองเหมือนกัน คือสร้างสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่มีบีเทนที่ระดับต่าง ๆ แตกต่างกัน ระบบการเลี้ยงและการวางแผนการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การทดลองที่ 1: ผลของบีเทนต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคในกุ้งขาว

3.1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้กระชังขนาด 1×1×1.5 เมตร โดยแขวนกระชังในบ่อดินที่มีความลึกประมาณ 1.7 เมตร เลี้ยงที่ความเค็ม 10 พีพีที แบ่งชุดการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ (replication) โดยแต่ละซ้ำ ใช้กุ้งจำนวน 50 ตัว โดยเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้งต่อกระชังให้มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวใกล้เคียงกันทุกกระชัง และมีการให้อากาศโดยใช้ใบพัดตีน้ำในบ่อตลอดระยะเวลาการเลี้ยงพร้อมกับให้อาหารวันละ 4 ครั้ง เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

3.1.2 การเตรียมกุ้งทดลอง

เตรียมกุ้งทดลองที่ปราศจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โดยใช้กุ้งขาววานาไมอายุ 35 ถึง 45 วัน (น้ำหนักประมาณ 2.24±0.02 กรัม) จำนวน 3,000 ตัว นำมาพักในกระชังก่อนที่จะนำมาคัดขนาดและทำการชั่งน้ำหนักกุ้งเริ่มต้นให้มีน้ำหนักกุ้งเริ่มต้น 2.24±0.02 กรัม จำนวน 50 ตัวต่อกระชัง จำนวน 20 กระชัง เลี้ยงในกระชังทดลองและให้อาหารในชุดควบคุมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม คุณภาพน้ำในบ่อที่ใช้มีค่าความเป็นด่าง (alkalinity) เท่ากับ 80-120 พีพีเอ็ม และพีเอชอยู่ในช่วง 7.5-8.5

3.1.3 การเตรียมสารบีเทน

คำนวณปริมาณสารบีเทนที่ใช้เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยเริ่มจากนำสารบีเทนนำมาเจือจางกับแป้งสาลีเพื่อให้อาหารแต่ละสูตรมีระดับความเข้มข้นตามที่คำนวณไว้ จากนั้นจึงผสมแร่ธาตุรวม วิตามินรวม และแป้งข้าวเจ้า ตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตร รายละเอียดของการเตรียมสารบีเทนในอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเตรียมบีเทนในอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

อาหารสูตรที่	ความเข้มข้นบีเทน (เปอร์เซ็นต์)	บีเทน (กรัม/อาหาร 4 กก.)	ปริมาณแป้งสาลีที่ใช้เจือจาง (กรัม/อาหาร 4 กก.)
1	0 เปอร์เซ็นต์	0	1,540
2	1 เปอร์เซ็นต์	40	1,500
3	2 เปอร์เซ็นต์	80	1,460
4	3 เปอร์เซ็นต์	120	1,420
5	4 เปอร์เซ็นต์	160	1,380

3.1.4 การเตรียมอาหารทดลอง

ในการทดลองนี้จะใช้สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งทดลองทั้งหมด 5 สูตร ดังตารางที่ 9 แตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของบีเทน โดยคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีนประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 12 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นระหว่าง 6-8 เปอร์เซ็นต์ พลังงานประมาณ 370 กิโลแคลอรี่ต่ออาหาร 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างของบีเทน 4 ระดับคือ 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ และรวมชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมบีเทน เริ่มต้นการทำอาหารทดลองโดยการนำบีเทนในแต่ละสูตรตามที่คำนวณไว้ผสมกับวัตถุดิบอาหารอื่น ๆ ในเครื่องผสมอาหารจนวัตถุดิบเข้ากันดี จึงนำมาอัดเม็ด และนำมานึ่งเป็นระยะเวลา 5 นาที และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งดี บรรจุลงถุงพลาสติกเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบและปริมาณวัตถุดิบในอาหารแต่ละสูตรของการทดลอง

ส่วนประกอบ	สูตรอาหาร				
(กรัม/100 กรัม)	1	2	3	4	5
ปลาป่น	15	15	15	15	15
หมึกป่น	5	5	5	5	5
วีทกลูแตน	3	3	3	3	3
กากถั่วเหลือง	26	26	26	26	26
แป้งสาลี	38.5	37.5	36.5	35.5	34.5
น้ำมันปลา	2	2	2	2	2
น้ำมันถั่วเหลือง	2	2	2	2	2
เลซิติน	1	1	1	1	1
วิตามินและแร่ธาตุผสม[1]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
แป้งข้าวเจ้า	5	5	5	5	5
บีเทน	0	1	2	3	4
รวม	100	100	100	100	100
ความเข้มข้นของบีเทน	0 เปอร์เซ็นต์	1 เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์	4 เปอร์เซ็นต์

[1]Vitamin and mineral mixture supplemented per kilogram feed: Thiamine (B_1) 10 mg; Riboflavin (B_2) 20 mg; Pyridoxine (B_6) 10 mg; Cyanocobalamin (B_{12}) 2 mg; Retinal (A) 4,000 IU, Cholecalciferol (D_3) 2,000 IU; Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 mg; Folic acid 5 mg; Calcium pantothenate 40 mg; Inositol 400 mg; Niacin 150 mg; DL-alpha-tocopherol (E) 50 IU; Choline chloride 6,000 mg; Ascorbic acid (C) 500 mg; Biotin 1 mg; NaCl 0.25 g; $MgCO_3$ 3.75 g; $FeSO_4$ 0.72 g; $(CH_3COO)_2$ $Ca.5H_2O$ 0.88 g; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.088 g; $MnSO_4.4H_2O$ 0.040 g; $CuSO_4.5H_2O$ 0.008 g; $CoCl_2.6H_2O$ 0.00025 g; $KIO_3.6H_2O$ 0.00075 g

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารมีดังต่อไปนี้

3.1.4.1 ชั่งแป้งสาลี และบีเทน ตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหาร ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง ผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึงในถุงพลาสติกใส

3.1.4.2 ชั่งแร่ธาตุรวม วิตามินรวมและแป้งข้าวเจ้าตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหาร ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง ผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึงในถุงพลาสติกใส

3.1.4.3 ชั่งปลาป่น หมึกป่น วีทกลูแตน และกากถั่วเหลืองป่น ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง ผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึงในถุงพลาสติกใส

3.1.4.4 ชั่งเลซิตินและน้ำมันพืช ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีความละเอียด 2 ตำแหน่ง ผสมกันให้ทั่วถึงในบีกเกอร์

3.1.4.5 นำวัตถุดิบอาหารตามข้อ 3.1.3.1, 3.1.3.2, 3.1.3.3 เข้าเครื่องผสมอาหารผสมจนเข้ากันดีแล้ว จึงนำวัตถุดิบในข้อ 3.1.3.4 ผสมลงไปและเติมน้ำ 35 % ของน้ำหนักอาหารผสมจนวัตถุดิบอาหารเข้ากันดี

3.1.4.6 หลังจากวัตถุดิบผสมเข้ากันดี ทำการอัดเม็ดอาหารขนาดที่เหมาะสมกับขนาดที่กุ้งกินตลอดการทดลอง

3.1.4.7 นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วนำมานึ่งในที่นึ่งอาหารระยะเวลา 5 นาที หลังจากนึ่งอาหารเรียบร้อยแล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งพอดี บรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร และคณะ, 2540) นำอาหารทดลองไปตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของสูตรอาหาร (โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า) ด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่เตรียมตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) ก่อนนำไปเลี้ยงทดลอง ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารในชุดการทดลองที่ 1 แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองในการทดลองที่ 1 ที่มีบีเทนระดับต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์[1]

อาหาร	บีเทน	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)				
สูตรที่	(เปอร์เซ็นต์)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย
1	0	7.56 ± 0.02	34.23 ± 0.21	8.43 ± 0.21	6.43 ± 0.03	0.063 ± 0.002
2	1	7.75 ± 0.01	34.44 ± 0.33	8.34 ± 0.11	6.33 ± 0.01	0.062 ± 0.005
3	2	7.52 ± 0.04	34.33 ± 0.13	8.76 ± 0.17	6.76 ± 0.05	0.061 ± 0.004
4	3	7.85 ± 0.07	34.42 ± 0.54	8.12 ± 0.65	6.23 ± 0.02	0.061 ± 0.003
5	4	8.02 ±0.02	34.74 ± 0.66	8.67 ± 0.43	6.78 ± 0.07	0.060 ± 0.006

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ)

3.1.5 แผนการทดลอง

ในการศึกษาการเจริญเติบโตจะวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 ตัว โดยแต่ละชุดการทดลองแบ่งมา 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและองค์ประกอบเลือด และอีก 1 ซ้ำนำไปทดสอบความต้านทานโรคและความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด โดยชุดการทดลองแต่ละชุดมีระดับความเข้มข้นของบีเทนแตกต่างกัน 4 ระดับ (1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์) และรวมถึงชุดควบคุม (0 เปอร์เซ็นต์) เริ่มต้นการทดลองโดยทำการคัดเลือกกุ้งที่มีขนาด 2.1-2.2 กรัม และทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนปล่อยลงเลี้ยงในกระชัง กระชังละ 50 ตัว ให้อาหารวันละ 4 มื้อ เวลา 7.00 น., 12.00 น., 17.00 น. และ 22.00 น. สังเกตปริมาณอาหารที่กุ้งกินเพื่อนำไปปรับอาหารในมื้อต่อไป ชั่งและบันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ในทุกวัน ชั่งน้ำหนักกุ้งทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลตลอดการทดลอง

สำหรับการศึกษาความต้านทานความเครียดโดยการเปลี่ยนแปลงความเค็ม จะวางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบ 4×4 ซึ่งประกอบด้วย 16 หน่วยทดลอง โดยศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ชุดการทดลอง และเวลา รวมทั้งทำการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยด้วยวิธีของ Pearson correlation

3.1.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1.6.1 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว

ชั่งน้ำหนักกุ้งขาวทุก 2 สัปดาห์โดยชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกข้อมูลไว้จนสิ้นสุดการทดลอง 6 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าต่าง ๆ ดังนี้

- น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (average weight) (ภาคผนวก ก)
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) ตามวิธีการของ Tapia-Salazar และคณะ (2004) (ภาคผนวก ก)
- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR) ตามวิธีการของ Ziaei-Nejad และคณะ (2006) (ภาคผนวก ก)
- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการของ Felix และ Sudharsan (2004)
- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption) (ภาคผนวก ก)
- อัตราการรอดตาย (survival rate) ตามวิธีการของ Felix และ Sudharsan (2004) (ภาคผนวก ก)

3.1.7 การศึกษาความต้านทานโรคแบคทีเรียเรืองแสง (Vibriosis)

ใช้ตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 จำนวน 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว มาทำการศึกษาความต้านทานโรคแบคทีเรียเรืองแสงตามวิธีการของมะลิ และคณะ (2543) โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* บริสุทธิ์ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งสารละลายมีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ $\times 10^7$ โคโลนี/มิลลิลิตร เข้าตัวกุ้งทดลองตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นบันทึกการตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองภายหลังจากฉีดเชื้อเป็นระยะเวลา 10 วัน

3.1.8 การศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Clearance ability of bacteria)

ใช้ตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 จำนวน 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว มาทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย โดยเตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกบริสุทธิ์นำมาเลี้ยงบนอาหารบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญเป็นกลุ่มเดี่ยวมาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และวัดความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืน

แสงประมาณ 0.07-0.09 และนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการ drop plating เพื่อนับจำนวนเซลล์เริ่มต้น แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ฉีดเข้ากุ้งทดลองที่บริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการดูดเลือดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 จากกุ้งทดลองตัวละประมาณ 0.2 มิลลิลิตร และทำการเจือจางเลือดกุ้งแต่ละตัวในสารละลายเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1/2 1/4 และ 1/8 เท่าแล้วนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี drop plating เพื่อนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในน้ำเลือด จากนั้นนำจานอาหารดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนับปริมาณเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับชุดควบคุมและปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่นับได้ ตามวิธีการของกิจการและคณะ (2543 ก)

3.1.9 ศึกษาการตอบสนองความเครียดในกุ้งขาวต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม

เก็บตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 โดยสุ่มกุ้งจากทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 40 ตัว มาเปรียบเทียบในแต่ละระดับความเค็ม ในช่วงเวลาที่ 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาเก็บองค์ประกอบเลือดได้แก่

- การวิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ และปริมาณอิเลคโทรไลท์ต่าง ๆ ในเลือด ตามวิธีการของกิจการ และคณะ (2543 ข.)

3.1.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค และประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อแบคทีเรียใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range Test (Duncan, 1955) ส่วนการทดสอบความต้านทานความเครียดโดยการเปลี่ยนแปลงความเค็ม จะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการวิเคราะห์หาปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย คือ ชุดการทดลอง และเวลา นอกจากนั้นวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยด้วยวิธีของ Pearson correlation

3.2 การทดลองที่ 2: ผลของบีเทนต่อระบบสมดุลของเหลวในร่างกายของกุ้งขาว

3.2.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ศึกษาผลของบีเทนต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงความเค็มต่อระบบสมดุลของเหลวในร่างกายของกุ้งขาว โดยใช้ตู้กระจกขนาด 20×48×20 นิ้ว ปริมาณน้ำเท่ากับ 250 ลิตร

3.2.2 การเตรียมกุ้งทดลอง คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง และการให้อาหาร

เตรียมกุ้งทดลองที่ปราศจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรียโดยใช้กุ้งขาววานาไมจำนวน 1,000 ตัว โดยนำมาพักในบ่อซีเมนต์ก่อนที่จะนำมาคัดขนาดและทำการชั่งน้ำหนักกุ้งเริ่มต้นให้มีน้ำหนักกุ้งเริ่มต้น 10 กรัม จำนวน 15 ตัวต่อตู้ จำนวน 30 ตู้ เลี้ยงในตู้ทดลองและให้อาหารในชุดควบคุมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและอาหารทดลอง สังเกตการยอมรับอาหารของกุ้งก่อนเริ่มการทดลอง คุณภาพน้ำในตู้ที่ใช้เลี้ยงมีค่าความเป็นด่าง (alkalinity) เท่ากับ 80-120 พีพีเอ็ม และพีเอชอยู่ในช่วง 7.5-8.5 ให้อาหารวันละ 4 มื้อ เวลา 7.00 น., 11.00 น., 17.00 น. และ 22.00 น.

3.2.3 การเตรียมสารบีเทน

ความเข้มข้นของสารบีเทนที่ใช้ในการทดลองนี้ จะเป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้ผลการเจริญเติบโตของกุ้งขาวดีที่สุดในชุดการทดลองที่ 1 และมีวิธีการเตรียมสารบีเทนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (3.1.4) แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การเตรียมบีเทนในอาหารทดลองสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นบีเทน (เปอร์เซ็นต์)	บีเทน (กรัม/อาหาร 4 กก.)	ปริมาณแป้งสาลีที่ใช้เจือจาง (กรัม/อาหาร 4 กก.)
1	0 เปอร์เซ็นต์	0	385
2	4 เปอร์เซ็นต์	160	345
3	8 เปอร์เซ็นต์	320	305

3.2.4 การเตรียมอาหารทดลอง

ส่วนประกอบและปริมาณวัตถุดิบในอาหารแต่ละสูตรของการทดลอง มีสูตรที่เหมือนกันกับการทดลองที่ 1 และผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารในชุดการทดลองที่ 1 แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลองในการทดลองที่ 2 ที่มีบีเทนระดับต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์[1]

อาหาร	บีเทน	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)				
สูตรที่	(เปอร์เซ็นต์)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย
1	0	8.65 ± 0.01	34.27 ± 0.49	8.25 ± 1.05	6.35 ± 0.03	0.063 ± 0.002
2	4	7.47 ± 0.03	34.14 ±0.61	8.54 ± 0.29	6.44 ± 0.11	0.060 ± 0.006
3	8	6.65 ± 0.09	34.62 ± 1.32	8.21 ± 0.27	6.53 ± 0.11	0.057 ± 0.003

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำ)

3.2.5 แผนการทดลอง

การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระดับของบีเทน 3 ระดับ ระหว่างความเค็มที่ 2 พีพีที และ 25 พีพีที โดยศึกษาการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ปริมาณออสโมลาริตี้ และไอออนในน้ำเลือด โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial design) มีปัจจัย 2×3 ปัจจัย คือความเค็มของน้ำที่ 2 พีพีที และ 25 พีพีที และระดับของบีเทน 0, 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ มีชุดการทดลองทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) โดยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งต่อตัวเท่ากับ 10 กรัม แต่ละตู้บรรจุน้ำ 200 ลิตร ให้อาหารวันละ 4 มื้อ คือ 7.00, 11.00, 17.00 และ 22.00 น. สังเกตปริมาณอาหารที่กุ้งกินเพื่อนำไปปรับอาหารในมื้อต่อไป รายละเอียดอื่น ๆ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

สำหรับการศึกษาความต้านทานความเครียดโดยการเปลี่ยนแปลงความเค็ม จะวางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบ 3×4 ปัจจัย โดยศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย คือ ระดับบีเทน 3 ระดับ และเวลาที่ใช้ในการทดลอง มีชุดการทดลองทั้งหมด 12 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ รวมทั้งทำการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยด้วยวิธีของ Pearson correlation

3.2.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.2.6.1 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว

ชั่งน้ำหนักกุ้งขาวทุก 2 สัปดาห์โดยชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกข้อมูลไว้จนสิ้นสุดการทดลอง 6 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ

- น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (Average weight) (ภาคผนวก ก)

- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) ตามวิธีการของ Tapia-Salazar และคณะ (2004) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) ตามวิธีการของ Ziaei-Nejad และคณะ (2006) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion rate, FCR) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการของ Felix และ Sudharsan (2004)

- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการรอดตาย (Survival rate) ตามวิธีการของ Felix และ Sudharsan (2004) (ภาคผนวก ก)

3.2.6.2 ศึกษาองค์ประกอบเลือด

เก็บตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 โดยทำการสุ่มกุ้งจากทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 80 ตัว เพื่อทำการเก็บตัวอย่างองค์ประกอบเลือดก่อนทำการเปลี่ยนแปลงความเค็ม ได้แก่

- การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและซีรัม (ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total hemocytes count) ตามวิธีการของกิจการ และสิทธิ (2538)

- การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (Blood glucose) ตามวิธีของ Hyvarinen และ Nikkila, (1962)

- การวิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ และปริมาณอิเลคโทรไลท์ต่าง ๆ ในเลือด (กิจการ และคณะ, 2543 ข)

3.2.6.3 ศึกษาการตอบสนองในกุ้งขาวต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มแบบฉับพลัน

- การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและซีรัม ตามวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total hemocytes count) ตามวิธีการของกิจการและสิทธิ (2538)

- การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (Blood glucose) ตามวิธีดัดแปลงจาก Hyvarinen และ Nikkila (1962)

- การวิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ และปริมาณอิเลคโทรไลท์ต่าง ๆ ในเลือด ตามวิธีการของกิจการ และคณะ (2543 ข)

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test โดยโปรแกรม SPSS version 11. และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้วยวิธีของ Pearson correlation