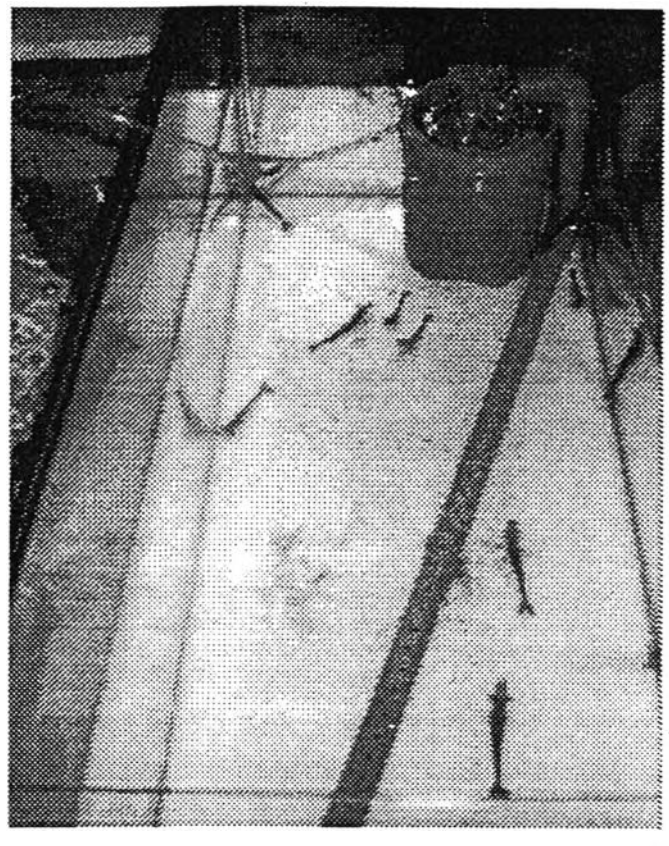
บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

เตรียมกุ้งทดลองและปรับสภาพให้อยู่ที่ระดับความเค็มที่กำหนด

กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการวิจัยได้จากนากุ้งจังหวัดฉะเชิงเทราซึ่งเลี้ยงที่ความเค็ม 3 ส่วนในพันส่วน เป็นกุ้งระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 10 - 13 กรัม (อายุประมาณ 2 - 2.5 เดือนหลังจากลงบ่อดิน) นำมาเลี้ยงเพื่อทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย น้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดการทดลองเป็นน้ำที่เตรียมจากนาเกลือความเค็มอยู่ในช่วง 90-100 ส่วนในพันส่วน ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยโอโซนและให้อากาศตลอดเวลาแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำจืดให้ได้ระดับความเค็มที่ต้องการเป็น 3 ระดับ คือ 10 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน

ระบบเลี้ยงประกอบด้วยหน่วยการทดลองมีระบบกรองน้ำซึ่งเป็นระบบกรองชีวภาพ (biofiltering system) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Spotte (1979) มีหลักการคืออาศัยแรงดันจากอากาศที่ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำภายในท่อเป็นตัวพาเอามวลน้ำขึ้นสู่ด้านบนทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของมวลน้ำ ระบบกรองประกอบด้วยสองส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งเป็นตัวกรองชีวภาพทำจากท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูง 8 นิ้ว ด้านล่างผ่าเป็นรูปปากฉลามทะแยงสี่มุมโดยแต่ละมุมหยักลึกประมาณ 1 นิ้ว ฐานกว้างประมาณ 1.5 นิ้ว เพื่อเป็นทางออกของน้ำที่ผ่านการกรองแล้ว และเป็นที่หลบซ่อนตัวของกุ้งในเวลาเดียวกัน วัดจากด้านล่างของท่อพีวีซีขึ้นมา 1.25 นิ้ว เจาะรูขนาด 1/16 นิ้ว โดยรอบ แต่ละรูห่างกันประมาณ 0.5 นิ้ว เพื่อใช้ร้อยขึงเชือกเอ็นสานเป็นตาข่ายรองรับวัสดุที่ต้องบรรจุภายในท่อ จัดวางวัสดุภายในท่ออันได้แก่ อวนตาถี่สีฟ้า เปลือกหอยนางรม ทราย กรวด และใยกรองสังเคราะห์จากด้านล่างขึ้นสู่ด้านบนตามลำดับ ส่วนที่สองประกอบด้วยท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 นิ้ว ยาว 24 นิ้ว เจาะรูขนาด 1/8 นิ้ว โดยรอบตลอดทั้งท่อ (ประมาณ 60 - 70 รู) จำนวน 1 ชิ้น ท่อพีวีซีขนาดเดียวกันยาว 8 นิ้ว (ไม่ต้องเจาะรู) จำนวน 1 ชิ้น ข้องอ 2 ชิ้น สายยางซึ่งต่ออยู่กับหัวทรายสำหรับไว้ในท่อ 1 ชิ้น และฝาปิดท่อ 1 ชิ้น ประกอบเข้าด้วยกันโดยวางท่อที่เจาะรูในแนวนอนปิดปลายด้านหนึ่งด้วยฝาปิดท่ออีกด้านหนึ่งต่อกับข้องอแล้วต่อกับท่อขนาด 8 นิ้ว ซึ่งวางในแนวดิ่ง นำสายยางที่ต่อกับหัวทรายสอดเข้าไปในข้องออีกอันหนึ่งแล้วจึงต่อข้องออันดังกล่าวเข้ากับท่อแนวดิ่ง (เมื่อประกอบเสร็จจะมีลักษณะคล้ายตัวอักษร L นอน) จากนั้นดันสายยางให้ลึกที่สุดเท่าที่จะทำได้ นำทั้งสองส่วนมาประกอบในตู้

กระจกโดยวางส่วนที่หนึ่งไว้ที่มุมตู้และนำส่วนที่สองวางในแนวทะแยง โดยให้ด้านที่มีท่อแนวดิ่งวางข้างๆ ส่วนที่หนึ่ง ปรับข้องอให้เข้าหาส่วนที่หนึ่งแล้วต่อสายยางเข้ากับเครื่องให้อากาศดังรูปที่ 3 เพื่อดึงมวลน้ำที่อยู่ในระยะไกลเข้าสู่ระบบกรอง ทำให้มวลน้ำในตู้ทดลองมีการหมุนเวียนและมีคุณภาพดีอยู่เสมอโดยหมั่นทำความสะอาดใยกรองทุกๆ 2-3 วันต่อครั้ง และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก



รูปที่ 3 ระบบกรองที่ใช้ในหน่วยการทดลอง

การเตรียมกุ้งเพื่อการทดลอง ดำเนินการดังนี้

1. นำกุ้งมาเลี้ยงในบ่อพักที่มีระบบกรองตามรูปที่ 3 เป็นเวลา 2 วัน
2. ปรับสภาพ (acclimate) ความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงต่าง ๆ กันเป็น 3 ระดับ คือที่ 10, 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน (part per thousand; ส่วนในพันส่วน) โดยค่อย ๆ ปรับความเค็มในอัตราประมาณ 5 ส่วนในพันส่วน ต่อ 2 วัน
3. นำกุ้งกุลาดำที่ปรับสภาพความเค็มแล้วมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 30×60×30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำปริมาตร 30 ลิตร โดยเลี้ยง 10 ตัวต่อตู้ เลี้ยงในระบบกึ่งปิด (semi-closed circulating system) ที่ประกอบด้วยระบบกรองชีวภาพ (รูปที่ 3) ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงทำการดูดเอาอาหารที่เหลือ อุจจาระ รวมทั้งตะกอนต่าง ๆ ทิ้งและถ่ายน้ำออกประมาณ 10 เปอร์เซนต์ ในช่วงเวลาก่อนให้อาหารมื้อสุดท้ายของวัน จากนั้นจึงเติมน้ำความเค็มเดิมลงในบ่อเลี้ยงจนได้ปริมาตรเดิม และทำความสะอาดใยกรองด้วยน้ำสะอาดแล้วใส่คืนท่อกรอง เลี้ยงกุ้งให้อยู่ในระดับความเค็มที่กำหนดเป็นเวลา 1 เดือน ก่อนเริ่มทำการวิจัย เพื่อให้สารตกค้างต่าง ๆ ที่อาจมีอยู่ในตัวกุ้งสลายตัวไปและเพื่อให้กุ้งสามารถปรับตัวให้อยู่ในระดับความเค็มที่กำหนดไว้ได้ดี
4. การให้อาหารให้อาหารสำเร็จธรรมดาวันละ 4 ครั้ง คือที่เวลา 08:00, 12:00, 16:00 และ 20:00 นาฬิกา ทุกวันในอัตรา 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน เลี้ยงในระบบนี้เป็นเวลา 1 เดือน
5. การตรวจวัดคุณภาพน้ำ ตรวจวัดพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 1 ทุกสัปดาห์ และถ้าคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับกุ้งกุลาดำ จะทำการปรับปรุงคุณภาพน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมเหมือน ๆ กันทุกหน่วยการทดลอง

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ตรวจวัดคุณภาพน้ำ

พารามิเตอร์	เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)	เครื่อง YSI model 57
อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง	เครื่องวัดความเป็น กรด-ด่าง (Handheld/pH/mV/Ion meter; รุ่น Accumet1003 series, Fisher Scientific, USA)
ความเค็ม	เครื่องวัดความเค็ม (Hand refractometer; S/Mill ATAGO Co., Ltd, Japan)
แอมโมเนีย	วิเคราะห์โดยวิธีของ Strickland and Parsons (1972) ตามภาคผนวก ก
ไนไตรท์	Nitrite-Test Kit ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
อัลคาไลนิตี้	Alkalinity-Test kit ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

การเตรียมอาหารสำเร็จรูปผสมออกซีเททราซัยคลินปริมาณต่าง ๆ

อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดการทดลองเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดจมน้ำเบอร์ 4s ยี่ห้อ NASA ซึ่งผลิตโดยบริษัทธุรกิจอาหารสัตว์น้ำจำกัด มีคุณค่าทางอาหารตามที่ระบุไว้ดังนี้ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 36 เปอร์เซนต์ ไขมันไม่ต่ำกว่า 3 เปอร์เซนต์ ความชื้นไม่มากกว่า 12 เปอร์เซนต์ และกากไม่มากกว่า 3 เปอร์เซนต์

ออกซีเททราซัยคลินที่ใช้ผสมอาหารอยู่ในรูปของออกซีเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ (oxytetracycline hydrochloride) มีความบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซนต์ (BP grade) มีชื่อทางการค้าว่า ออกซีเอ (Oxy-A) ซึ่งนำเข้าและแบ่งบรรจุโดยบริษัทแลปอินเตอร์ จำกัด เป็นยาปฏิชีวนะที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองละลายน้ำได้ดี

ส่วนออกซีเททราซัยคลินที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานอยู่ในรูปของออกซีเททราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ จากบริษัทซิกมาเคมิคอล จำกัด

เตรียมอาหารผสมออกซีเททราซัยคลินปริมาณต่าง ๆ กัน 4 ระดับคือที่ 0 (ชุดควบคุม) 1, 5 และ 10 กรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม โดยชั่งออกซีเททราซัยคลินให้ได้น้ำหนัก 1, 5 และ 10 กรัม ส่วนอาหารชุดควบคุมไม่ผสมออกซีเททราซัยคลินแต่มีขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับอาหารชุดที่ผสมออกซีเททราซัยคลินทุกประการ นำออกซีเททราซัยคลินที่ชั่งแล้วมาผสมน้ำกลั่น (ultrapure water) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จนออกซีเททราซัยคลินละลายหมด นำไปคลุกกับอาหาร 1 กิโลกรัม ให้กระจายสม่ำเสมอและเข้ากันดี จากนั้นจึงใช้ไข่ขาวดิบของไข่ไก่ปริมาตร 60 มิลลิลิตร (6เปอร์เซนต์ของอาหาร) คลุกกับอาหารอีกครั้งเพื่อเคลือบอาหารที่ผสมออกซีเททราซัยคลินไม่ให้ออกซีเททราซัยคลินละลายน้ำออกไปโดยง่ายเมื่อให้กุ้งกิน สำหรับชุดควบคุมใช้เพียงน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร คลุกกับอาหารและเคลือบด้วยไข่ขาวปริมาตรเท่า ๆ กับชุดอื่น ๆ จากนั้นนำอาหารนี้ไปทำให้แห้งใน Freeze dryer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำออกมาเก็บไว้ในภาชนะสีทึบและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาใช้

ศึกษาผลของออกซีเททราซัยคลินและความเค็มต่อการขับถ่ายแอมโมเนีย

เลี้ยงกุ้งที่แต่ละระดับความเค็ม (10, 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน) ด้วยอาหารสำเร็จรูปที่นำมาผสมออกซีเททราซัยคลินในอัตราต่าง ๆ กัน 4 ระดับ คือ 0, 1, 5 และ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งเคลือบด้วยไข่ขาวของไข่ไก่ โดยให้อาหารตามเวลาและอัตรา 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน และให้อาหารที่ผสมออกซีเททราซัยคลินเพียง 14 วัน ต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดาซึ่งไม่ได้ผสมออกซีเททราซัยคลิน แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ และมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำสัปดาห์ละครั้งตามปกติ

การวัดแอมโมเนียที่กุ้งขับถ่าย

วัดแอมโมเนียที่กุ้งขับถ่ายออกมาตลอดช่วงระยะเวลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมออกซีเททราซัยคลิน โดยเก็บตัวอย่างกุ้งทุก 72 ชั่วโมง (เริ่มต้นนับหลังจากเริ่มให้อาหารผสมออกซีเททราซัยคลิน) สุ่มตัวอย่างกุ้งหน่วยการทดลองละ 1 ตัว หลังจากที่ให้อาหารแล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำ 200 มิลลิลิตร และเตรียมน้ำที่แต่ละความเค็มใส่ลงในขวดเป็นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ความเค็มละ 3 ขวด โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่างกุ้งลงไปเพื่อทำเป็นแบลงค์ ปิดด้วยฟอยล์เพื่อลดการปนเปื้อนของแอมโมเนียจากบรรยากาศ แล้วปล่อยให้กุ้งอยู่อย่าง

ปกติเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นวิเคราะห์แอมโมเนียที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Strickland and Parsons (1972) โดยปิเปตน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (vial) เจือจางด้วยน้ำกลั่น de-ionized ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย phenol 0.4 มิลลิลิตร (การเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ก) โดยใช้ไมโครปิเปต (micropipette) เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม sodium nitroprusside 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม oxidizing solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอด ห่อหุ้มไว้ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดได้ดีในที่มืด วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 - 27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้เซลล์ (cell) ขนาด 10 เซนติเมตร ค่าที่บันทึกได้ต้องลบออกด้วยค่าแบลงค์ (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่น de-ionized แทนน้ำตัวอย่างแล้วทำตามขั้นตอนข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นี้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียกับค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำตัวอย่าง

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของการขับถ่ายแอมโมเนียของกุ้งกุลาดำที่ได้รับออกซีเททราซัยคลินปริมาณต่าง ๆ ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ กัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS(1985)

การศึกษาผลของออกซีเททราซัยคลินและความเค็มต่อการตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำความเค็ม

เก็บตัวอย่างกุ้งทั้งในระหว่างที่ให้อาหารผสมออกซีเททราซัยคลินและหลังจากหยุดให้ออกซี-เททราซัยคลินแล้วให้อาหารธรรมดาเพื่อศึกษาระยะเวลาที่ออกซีเททราซัยคลินจะตกค้างอยู่ในเนื้อกุ้ง สุ่มตัวอย่างกุ้งหน่วยการทดลองละ 1 ตัวต่อครั้ง โดยเก็บตัวอย่างตามเวลาดังนี้

ครั้งที่ 1 หลังจากให้อาหารผสมออกซีเททราซัยคลินเป็นเวลา 1 วัน

ครั้งที่ 2 หลังจากให้อาหารผสมออกซีเททราซัยคลินเป็นเวลา 7 วัน

ครั้งที่ 3 หลังจากให้อาหารผสมออกซีเททราซัยคลินเป็นเวลา 14 วัน

ครั้งที่ 4 หลังจากหยุดให้อาหารผสมออกซีเททราซัยคลินแล้วให้อาหารธรรมดาซึ่งไม่ได้ผสมออกซีเททราซัยคลินเป็นเวลา 2 วัน (ระยะเวลาการเลี้ยง 16 วัน)

การวิเคราะห์ปริมาณออกซีเททราซัยคลินในเนื้อกุ้ง

การวิเคราะห์ปริมาณออกซีเททราซัยคลินในเนื้อกุ้งโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ทำโดยสกัดสารออกซีเททราซัยคลินออกจากเนื้อเยื่อด้วยสารละลาย 0.1 M EDTA McIlvaine, pH 4.0 แล้วนำสารละลายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น (sample clean-up) ด้วย Sep-Pak C18 cartridge จากนั้นฉีดสู่ระบบ HPLC ที่มี Nova Pak C18 column และ 17% acetronitrile + 83% (0.01 M oxalic acid + 0.1% (v/v)triethylamine, pH 4.5) เป็น mobile phase และติดตามปริมาณโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร

การเตรียมตัวอย่างกุ้งเพื่อนำมาวิเคราะห์ ทำตามขั้นตอนดังนี้

1. นำกุ้งมาแกะเปลือกและเด็ดหัวออก แล้วนำไปปั่นให้ละเอียด
2. ชั่งเนื้อกุ้งที่ปั่นแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วโฮโมจีไนส์ (homogenize) ด้วยสารละลาย 0.1 M Na_2EDTA-McIlvaine, pH 4.0 (การเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
3. นำของเหลวที่ได้มาเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
4. ถ่ายสารละลายส่วนใส (supernatant) ลงในหลอดฉีดยา (syringe) ที่ต่ออยู่กับ Sep-Pak C18 ที่ผ่านการกระตุ้น (activated) แล้ว (การกระตุ้น Sep-Pak C18 ทำโดยผ่าน methanol 20 มิลลิลิตร ลงใน Sep-Pak C18 แล้วตามด้วยน้ำกลั่น (ultrapure water) อีก 20 มิลลิลิตร) กดให้สารละลายไหลผ่าน Sep-Pak C18 ด้วยความเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที
5. ล้าง Sep-Pak C18 ด้วย น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยการอัดน้ำใน syringe ให้ไหลผ่าน Sep-Pak C18
6. ใช้หลอดฉีดยาดูดอากาศปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วอัดผ่าน Sep-Pek C18
7. ชะออกซีเททราซัยคลินออกจาก Sep-Pak C18 ด้วยสารละลาย methanol : (0.01 M oxalic acid + 0.1 % TEA, pH 4.5); (7:3) 5 มิลลิลิตร แล้วอัดอากาศผ่าน Sep-Pak C18 เก็บสารละลายที่ออกมาให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
8. ฉีดสู่ระบบ HPLC 100 ไมโครลิตร

   โดยเตรียมระบบ HPLC ดังนี้

Column	:	Nova-Pak C18, 3.9 × 300 มิลลิเมตร
Mobile phase	:	17% acetronitrile, 83% 0.01M oxalic acid + 0.1%TEA,pH 4.5
Flow rate	:	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
Detection	:	355 นาโนเมตร
Injection volume	:	100 ไมโครลิตร

เครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเททราซัยคลินครั้งนี้เป็นเครื่องShimadzu รุ่น LC-3A มี Integrator ของ Shimadzu รุ่น C-R1A ส่วน UV Detecter เป็นของ LCD รุ่น 4100

ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเททราซัยคลินในเนื้อกุ้งโดยใช้เทคนิค HPLC จะฉีดสารละลายมาตรฐานออกซีเททราซัยคลินก่อนเพื่อนำมาทำกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (area) ของโครมาโตแกรม (chromatogram) ซึ่งได้จาก Integrator กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานออกซีเททราซัยคลิน จากนั้นเมื่อฉีดตัวอย่างนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณออกซีเททราซัยคลินในตัวอย่างกุ้ง

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณออกซีเททราซัยคลินตกค้างในเนื้อกุ้งที่ได้รับออกซีเททราซัยคลินปริมาณต่างๆ ที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS(1985)