บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

1. สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

สถานที่ทำการทดลองคือ โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ระยะเวลาที่ทำการวิจัยเริ่มจาก มีนาคม – ตุลาคม 2553

2. ตัวอย่างทดลอง

ไข่กุ้งขาวในระยะแรกหรือระยะควีเวจ (2 – 3 ชั่วโมงหลังวางไข่), ระยะกลางหรือระยะบลาสตูลา (6 – 7 ชั่วโมงหลังวางไข่) และระยะสุดท้ายหรือระยะแกรสตรูลา (10-11 ชั่วโมงหลังวางไข่) ที่ได้มาจากแม่พันธุ์กุ้งขาวจำนวน 40 ตัว

3. อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า
- เครื่องชั่งสาร
- ไมโครปิเปต
- สไลด์
- แผ่นปิดสไลด์
- หลอดหยด
- บีกเกอร์
- ขวดใส่สาร (Duran)
- แท่งแก้วคนสาร
- กระบอกตวง
- เครื่องนับจำนวน (counter)
- นาฬิกาจับเวลา
- เทอร์โมมิเตอร์
- เครื่องปั๊มออกซิเจน
- สายออกซิเจน

- หัวต่อออกซิเจน
- เครื่องแช่แข็ง
- ถังไนโตรเจนเหลว
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)

3.2 สารเคมี

- Dimethyl sulfoxide (DMSO; MW = 78.13)
- methanol (MW = 32.04)
- propylene glycol (1,2-propanediol; MW = 76.09)
- acetamide (MW = 59.07)
- formamide (MW = 45.04)
- sucrose (MW = 342.30)
- glycerol (MW = 92.10)
- ethanol (MW = 46.07)
- ethylene glycol (MW = 62.07)
- sea water (30 ppt)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การรวบรวมไข่กุ้งขาว

การรวบรวมไข่กุ้งขาวในแต่ละระยะนำมาจากโรงเพาะเลี้ยงของเอกชนในอำเภอแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยเดินทางออกจากมหาวิทยาลัยบูรพาเวลาประมาณ 23.30 น. ไปถึงโรงเพาะเลี้ยงประมาณ 00.30 – 1.00 น. ซึ่งแม่พันธุ์กุ้งขาวจะวางไข่ในช่วงเวลาประมาณ 24.00 น. ไข่กุ้งนี้ได้จากพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาว 120 ตัวที่สมบูรณ์เพศ (ตัวผู้ 80 ตัว และตัวเมีย 40 ตัว) อายุประมาณ 10-11 เดือน ที่เลี้ยงในโรงเพาะฟักที่มีที่มีการระบายอากาศปลอดโปร่ง มีการถ่ายเทของอากาศดี และมีออกซิเจนเพียงพอโดยมีเครื่องให้ออกซิเจนในบ่อ เลี้ยงในน้ำทะลที่มีความเค็ม 30 ppt. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาตัดก้านตา (eye ablation) เพื่อทำลาย X-organ และ sinus gland ซึ่งเป็นที่เก็บและผลิตฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของรังไข่ (gonad inhibiting hormone) (Adiyodi & Adiyodi, 1970; Alfredo & Santiago, 1977) การตัดก้านตาออกโดยใช้กรรไกรตัดเพื่อเร่งให้มีการตกไข่ การตัดตาไม่ว่าจะข้างเดียวหรือ 2 ข้าง โอกาสที่กุ้งจะติดเชื้อจากน้ำได้ง่าย

ดังนั้นจึงตัดตาเพียงข้างเดียว จะเร่งให้กุ้งขาวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ดีกว่าการตัดตาทั้ง 2 ข้าง อัตราการรอดตายของกุ้งตัดตา 2 ข้าง ตัดตาข้างเดียว และไม่ตัดตาเลย อยู่ที่ 0%, 38% และ 49% ตามลำดับ (Alfredo & Santiago, 1977) และพบว่าการไม่ตัดก้านตาจะทำให้มีอัตราการฟักของไข่มากกว่าการตัดก้านตา (Makinouchi & Primavera, 1987) แต่ในการศึกษาในครั้งนี้จำเป็น ต้องทำการตัดก้านตาเพื่อเร่งให้กุ้งขาวเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ เมื่อตัดก้านตาเสร็จจึงทำการหยดโพวิโดนไอโอดีนประมาณ 10 หยดต่อหนึ่งตัวลงบนแผลหลังตัด คอยจนกระทั่งแม่พันธุ์กุ้งขาววางไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ในช่วงเวลาประมาณ 24.00 จากนั้นทำการรวบรวมไข่กุ้งด้วยผ้ากรองขนาด 200 ไมครอน เนื่องจากไข่กุ้งขาวมีขนาดประมาณ 300 ไมครอน แล้วนำมาใส่ในถุงพลาสติก ที่ทำการใส่ออกซิเจนลงไป และมัดปากถุง ใช้เวลาดำเนินการทั้งหมดประมาณ 15 - 20 นาที จากนั้นเดินทางกลับถึงมหาวิทยาลัยบูรพาเวลาประมาณ 02.30 น. ทำการทดลองทันทีเพื่อมาทำการทดลองในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังนี้ คือ ระยะแรกหรือระยะควีเวจ (2 - 3 ชั่วโมงหลังการวางไข่), ระยะกลางหรือระยะบลาสตูลา (6-7 ชั่วโมงหลังการวางไข่) และระยะสุดท้ายหรือระยะแกสตรูลา (10-12 ชั่วโมงหลังการวางไข่) (Primavera, 1981; Vuthiphandchai et al., 2005) เมื่อไข่ฟักเป็นนอเพียส คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ในแต่ละระยะ โดยวิธีการคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การฟัก} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ฟักออกมาเป็นนอเพียส} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการฟักไข่กุ้งขาว

ศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของไข่กุ้งขาวในน้ำทะเลที่อุณหภูมิต่างกัน เริ่มทำโดยเตรียมน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt ที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้ว ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ไข่กุ้งขาวที่มีการการพัฒนาใน ระยะแรกหรือระยะควีเวจ (2 - 3 ชั่วโมงหลังการวางไข่), ระยะกลางหรือระยะบลาสตูลา (6-7 ชั่วโมงหลังการวางไข่) และระยะสุดท้ายหรือระยะแกสตรูลา (10-12 ชั่วโมงหลังการวางไข่) ลงในบีกเกอร์ ประมาณบีกเกอร์ละ 200 ฟองนำไปใส่ในตู้ incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 6, 12, 18, 24 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะทิ้งไข่กุ้งที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วไว้ในตู้ incubator ในแต่ละเวลาที่ 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ที่แต่ละอุณหภูมิเมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ (อุณหภูมิที่ 6 และ 12 องศาเซลเซียสใช้น้ำแข็งในการปรับอุณหภูมิแทนเนื่องจากทางมหาวิทยาลัยไม่มีเครื่อง incubator ที่ใช้สำหรับควบคุมอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ในการวัดค่าอุณหภูมิซึ่งมีการเฝ้าและควบคุมอย่างดีเพื่อไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง

หรือคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิ)จากนั้นนำบีกเกอร์ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (24 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งไข่กุ้งฟักเป็นตัวเพื่อรอการฟัก และทำการนับจำนวนนอเพียส เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟัก (hatching rate) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยที่มีกลุ่มควบคุมเป็นไข่กุ้งอยู่ในน้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ppt ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่ออัตราการฟักไข่กุ้งขาว

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 9 ชนิด ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO) methanol, propylene glycol, acetamide, formamide, sucrose, glycerol, ethanol และ ethylene glycol ที่มีผลต่ออัตราการฟักของไข่กุ้งขาว ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ซึ่งทำการทดลองเหมือนกันทั้ง 3 ระยะการพัฒนา (ระยะแรก, ระยะกลาง และระยะสุดท้าย) ดังนี้โดยเตรียมสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้น 10%, 20%, 30% และ 40% ที่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ที่ใส่น้ำทะเล 20 มิลลิลิตร ที่ใส่ไข่กุ้งขาวที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ประมาณ 200 ฟอง/ บีกเกอร์ (สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิด : น้ำทะเล + ไข่ = 1:1) ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ ปล่อยให้ไข่กุ้งขาวอยู่ในสารเหล่านี้ในระยะเวลา 10 และ 20 นาที โดยในแต่ละสารไครโอโพรเทคแทนท์จะใช้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วจึงนำไข่ไปแช่ด้วยน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้างสารไครโอโพรเทคแทนท์ออกไปจากไข่ให้หมด จากนั้น นำไข่กุ้งขาวไปฟักในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรและให้ออกซิเจนตลอดเวลาในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส คอยจนกระทั่งไข่ฟักเป็นนอเพียส ทำการนับโดยนับทั้งหมดที่มีอยู่ (actual count) (นงนุช, 2550) แยกประเภทตามลักษณะของไข่ที่ไม่ฟักและไข่ที่ฟักออกมาเป็นนอเพียส จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟัก (hatching rate) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยที่มีกลุ่มควบคุมเป็นไข่กุ้งในน้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ppt ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เกณฑ์การเลือกชนิดสารที่มาทำการทดลองนั้นมาจากงานวิจัยของ Vuthiphandchai et al. (2009)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลของอัตราการฟักไข่กุ้งขาวที่ได้จากการทดลองผลของอุณหภูมิและผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์แสดงเป็นค่า mean ± standard deviation โดยที่เปอร์เซ็นต์การฟักของไข่กุ้งขาวที่เก็บรักษาในสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิด หรือฟักที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้วิเคราะห์ทาง

สถิติโดยใช้โปรแกรม statistical analysis software (SPSS) วิเคราะห์แบบ two-way (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Duncan's New Multiple Range Test และพิจารณาที่ระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$