รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการเสริมธาตุทองแดงในรูปคีเลตในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย อัตราการแลกเนื้อ และการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมี ของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of Cu chelate Supplementation in feed formulation on Growth, Survival, Feed conversion ratio and Physiochemical change of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ผศ.ดร.บุญรัตน์ ประทุมชาติ [1] และ ผศ.ดร.กระสินธุ์ หังสพฤกษ์ [2]

1 ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
2 คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

รายงานวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี พ.ศ. 2554

บทคัดย่อ

ผลของการเสริมทองแดงรูปคีเลตในอาหารกุ้งโดยมีระดับทองแดง 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และไม่เสริมทองแดงคีเลต (ชุดควบคุม) ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย ความถี่ในการลอกคราบ ความแปรปรวนของขนาด อัตราแลกเนื้อ ความทนทานต่อการขาดออกซิเจน และความเข้มข้นของโปรตีนและทองแดงในพลาสมากุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ขนาดความยาวทั้งหมด 9.24 ± 0.43 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 6.25 ± 0.22 กรัม ที่เลี้ยงในความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 60 วัน

การเสริมทองแดงในอาหาร 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลทำให้กุ้งทดลองมีการเจริญเติบโตในส่วนความยาวที่เพิ่มขึ้นสูงสุดและสูงกว่ากุ้งที่ได้รับทองแดง 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และชุดควบคุม ($p<0.05$) และกุ้งที่ได้รับทองแดง 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีความแปรปรวนของความยาวสูงกว่ากุ้งที่ได้รับทองแดง 50, 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และชุดควบคุม ($p<0.05$) แต่การเสริมทองแดงไม่มีผลต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ความแปรปรวนของขนาดในส่วนน้ำหนัก ความถี่ในการลอกคราบ และอัตราแลกเนื้อ ($p>0.05$) การรอดตายของกุ้งชุดควบคุมสูงกว่ากุ้งที่ได้รับทองแดง 50 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกุ้งที่ได้รับทองแดง 100 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ($p>0.05$) โดยกุ้งชุดควบคุมสลบเร็วสุดที่ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำสูงสุด ($p<0.05$) และระดับความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมามีค่าแปรผันตามปริมาณทองแดงในอาหารที่เพิ่มขึ้น ($p<0.05$) กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดง 150 มก./กก. พบความเข้มข้นทองแดงในพลาสมาสูงที่สุดและสูงกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$)

Abstract

Effects of Copper (Cu) supplementation in diet at 4 levels (50, 100, 150 and 200 mg/kg) using copper chelate and 0 mg/kg (control) on growth, survival, molting frequency, size variation, FCR, oxygen deficiency tolerance and protein and copper concentrations in the plasma of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were studied. Shrimp with average size of 9.24 cm in total length and 6.25 g in total weight and raising at 10 ppt for 60 days was used.

The highest growth rate ($p<0.05$) in length gain was found in shrimp fed on 100 mg Cu/kg Cu supplement in feed, which was significantly ($p<0.05$) higher than those of shrimp fed on 150 mg/kg and control. The size variation in length of shrimp fed with 100 mg Cu/kg supplement in feed was significantly ($p<0.05$) higher than those of shrimp fed on 50, 200 mg Cu /kg and control. It was not significant ($p>0.05$) difference for % weight gain, average daily growth, and size variation of weight, molting frequency and feed conversion ratio among treatments. Survival rate of control was significantly ($p<0.05$) higher than those of shrimp fed on 50 and 200 mg Cu/kg but was not significantly different from shrimp fed on 100 and 150 mg Cu/kg. For stress test, the significant ($p<0.05$) least time and the highest level of dissolved oxygen for unconscious was found in control. Concentration of protein in plasma was significantly ($p<0.05$) correlated to increasing of Cu in feed. Cu concentrations in plasma of shrimp fed on 150 mg Cu/kg supplement in feed was the highest and significantly higher than that of control ($p<0.05$).

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

บทนำ

การเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ของประเทศไทยในปัจจุบันมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย เพราะการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีปัญหามากมาย เช่น การระบาดของโรค การเจริญเติบโตช้า และอัตราการปล่อยที่น้อยทำให้ได้ผลผลิตไม่คุ้มทุน เมื่อเทียบกับการเลี้ยงกุ้งขาวจึงเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญแทนกุ้งกุลาดำและทำรายได้อย่างดีให้กับเกษตรกร ทำให้มีความสนใจและหันมาเลี้ยงกันมากขึ้น แต่ในทางกลับกันพื้นที่ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งมีปริมาณลดน้อยลง เนื่องจากในอดีตการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีจำนวนมาก ทำให้พื้นที่บริเวณชายฝั่งถูกปรับเปลี่ยนมาเป็นบ่อเลี้ยงกุ้งกันมากขึ้น แต่เมื่อมีการระบาดของโรคเกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงกุ้งแล้วปล่อยน้ำเหล่านั้นลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ก็จะทำให้เกิดการระบาดของโรคมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำไม่ประสบความสำเร็จ จึงทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น จึงต้องมีการขยายพื้นที่เข้าไปในบริเวณน้ำจืด ซึ่งในการเลี้ยงแต่ละรุ่นจะปล่อยลูกกุ้งที่ความหนาแน่นสูงเพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ให้สูงมากที่สุด อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งขาวมีความแตกต่างจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมากพอสมควร อีกทั้งเกษตรกรส่วนใหญ่มีการเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง ทำให้ต้องให้ความสำคัญการจัดการระหว่างการเลี้ยงเป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เนื่องจากกุ้งขาวมีพฤติกรรมที่มีการใช้พลังงานสูงกว่ากุ้งกุลาดำและมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ทำให้กุ้งขาวมีการบริโภคออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ในการดำรงชีวิตที่สูงมาก

Cu เป็นแร่ธาตุที่มีปริมาณต่ำมากในน้ำทะเล จึงทำให้กุ้งได้รับไม่เพียงพอต่อความต้องการเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการทางสรีรเคมีภายในร่างกายกุ้ง Cu ทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด (haematopoiesis) โดยกุ้งต้องใช้ Cu เพื่อเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน (haemocyanin) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่เกี่ยวกับการหายใจ (respiratory pigment) ฮีโมไซยานิน ผลิตจาก midgut gland (Mangum, 1989) ทำหน้าที่หลักในการจับออกซิเจน (oxygen affinity) (Mangum, 1989) และลำเลียงออกซิเจน (Dallinger, 1977) ดังรายงานที่กล่าวว่าโปรตีนในเลือดกุ้งซึ่งเป็น macrocrustacean จะมีฮีโมไซยานิน เป็นส่วนประกอบถึง 80-95% (Claybook, 1983) และฮีโมไซยานินเป็นรงควัตถุที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งประกอบด้วย Cu 0.17% carbohydrate น้อยกว่า 4% และมี lipid, polypeptide เพียงเล็กน้อยในโครงสร้างที่มีรูปแบบ hexamer ซึ่งมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงในการจับออกซิเจน นอกจากนี้ Cu ยังมีการใช้ในกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) หลายชนิด เช่น lysyl oxidase, cytochrome c oxidase (CCO), ferroxidase, tyrosinase และ superoxide dismutase (SOD) (O'Dell, 1976) เมื่อกุ้งได้รับ Cu ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Immune enhancement) ในตัวกุ้งได้ เนื่องจากจะไปกระตุ้นการสร้างจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte) ให้สูงขึ้น เพราะเม็ดเลือดของกุ้งส่วนหนึ่งจะช่วยในเรื่องของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย คล้ายคลึงกับการทำหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate leukocytes) และยังส่งผลให้เม็ดเลือดกุ้งมีการผลิต superoxide anion (O_2^-) ภายในเซลล์ให้สูงขึ้นด้วย (Lee and Shiau, 2002) ซึ่งเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ช่วยทำให้กุ้งมีโอกาสรอดตายสูงขึ้นเพราะขาดปัจจัยเสี่ยงของความเครียดที่เกิดขึ้นจากการขาดออกซิเจนแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง

จากเหตุผลที่กุ้งมีประสิทธิภาพการรับออกซิเจนได้ดีขึ้น จึงน่าส่งผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารและการลำเลียงสารอาหาร เพราะว่ากระบวนย่อยด้วย enzyme ต้องใช้ออกซิเจน เมื่อมีประสิทธิภาพในการลำเลียงออกซิเจนได้ดี ก็ย่อมส่งผลต่อกระบวนการนี้ จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (ลด

FCR) และเจริญเติบโตดีขึ้น เพราะสามารถจัดสรรพลังงานมาดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากกุ้งได้รับ Cu ในอาหารต่ำเกินความต้องการแล้วจะไปมีผลต่อการเจริญเติบโต (Lee & Shiau, 2002) เนื่องจาก Cu เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อและเปลือก (soft and hard tissue mineralization) (Davis & Lawrence, 1997) ออกซิเจนที่ต่ำในร่างกายกุ้งยังส่งผลลบต่อการกินอาหาร (Feed ingestion) และการเจริญเติบโตของกุ้งน้ำจืดและทะเลหลายชนิด เช่น กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (Llobera, 1983) กุ้ง *L. vannamei* และ กุ้ง *P. monodon* (Seidman and Lawrence, 1985) แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารรวม ไขมัน และโปรตีน แต่น่าจะมีผลต่อการใช้กรดอะมิโนบางชนิดเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (Pouliot & de la Noue, 1989)

ออกซิเจนที่มากเพียงพอในร่างกายกุ้งนั้นยังส่งผลต่อความสำเร็จในการลอกคราบ (molting success) ของกุ้งอีกด้วยเนื่องจากช่วงระหว่างที่กุ้งก่อนลอกคราบ กำลังลอกคราบ และหลังลอกคราบนั้น กุ้งมีการใช้พลังงานอย่างมากในการควบคุมสมดุลเกลือแร่ และการสร้างแรงดันน้ำภายในร่างกาย (hydrostatic pressure) ช่วยก่อนลอกคราบ และต้องมีพลังงานมากในการปรับสมดุลเกลือแร่ภายหลังลอกคราบ ซึ่ง Mangum (1989) พบว่า Haemocyanin มีประสิทธิภาพต่ำสุดในการจับออกซิเจนหลังลอกคราบใหม่ ๆ จึงเป็นวิกฤติมากสำหรับการดำรงชีวิตของกุ้ง ซึ่งกุ้งต้องเผชิญอย่างต่อเนื่อง ซึ่งกิจกรรมทั้งหมดนี้ต้องใช้พลังงาน และใช้ออกซิเจนสูง ดังนั้นเมื่อกุ้งมีออกซิเจนในร่างกายมากพอ ส่งผลให้กุ้งมีโอกาสรอดตายมากขึ้นในขบวนการลอกคราบ รวมถึงการเจริญเติบโตด้วย อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการจับออกซิเจน (oxygen affinity) ของ Haemocyanin จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อ 1) อุณหภูมิน้ำลดลง 2) มีปริมาณ Ca^{++}, Mg^{++} จาก CaCl, MgCl รวมถึงปริมาณ NaCl, KCl ในน้ำที่เพียงพอและเหมาะสม (Mangum, 1989) ขณะที่ pH และหรือ ความเค็มลดลงจะส่งผลลบต่อการจับออกซิเจนในเลือดด้วย (Truchot, 1973a, Mangum, 1989)

ดังนั้นจึงควรคำนึงถึงออกซิเจนในร่างกายกุ้ง ไม่ใช่สนใจประเด็นเพียงออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำเพียงอย่างเดียว เพราะการที่กุ้งจะมีออกซิเจนเพียงพอในระบบร่างกายนั้นไม่ใช่เพียงการเพิ่มออกซิเจนในน้ำ เพราะว่าเพิ่มออกซิเจนลงไปในน้ำมากเท่าใด แต่กุ้งยังมีข้อจำกัดในการรับก็ไม่เป็นผลดีต่อกุ้ง และที่สำคัญทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นอีก แต่ต้องกลับมาให้ความสำคัญว่าทำอย่างไรจะทำให้กุ้งสามารถสร้างกลไกการสร้างตัวรับออกซิเจนเข้าในร่างกายกุ้งคือ ฮีโมไซยานิน (Haemocyanin) ซึ่งทำให้กุ้งมีประสิทธิภาพในการรับและลำเลียงออกซิเจนไปใช้ในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิผล จากการค้นคว้าเอกสารเบื้องต้นทั้งฐานข้อมูลสิทธิบัตรและงานวิจัยทั่วโลกพบว่าไม่มีงานวิจัยที่ใช้ธาตุทองแดงในรูปคีเลตในอาหารกุ้งทะเลหรือสัตว์น้ำชนิดอื่นแต่อย่างใด ซึ่งงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาระดับที่เหมาะสมในการเสริมทองแดงในรูปคีเลตที่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย ความถี่การลอกคราบ อัตราการแลกเนื้อ และความแตกต่างของขนาด กุ้งมีความทนทานต่อการขาดออกซิเจนมากขึ้น โดยไม่ส่งผลกระทบต่อระบบสรีระเคมีภายในร่างกายกุ้ง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อจะได้เกิดประโยชน์สูงสุดและคุ้มค่าในการใช้อาหารและพลังงาน ซึ่งนับเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตให้กับผู้เลี้ยงกุ้ง เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันให้กับอุตสาหกรรมกุ้งไทยต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญของแร่ธาตุในอาหาร

แร่ธาตุเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างเปลือก และเนื้อเยื่อที่อ่อนนุ่ม (soft tissues) เช่น sulfer ในโปรตีน Zn ใน carboxypeptidase (metalloprotien) รวมทั้งเป็นองค์ประกอบ cofactor และ activator ในเอนไซม์หลายชนิด เช่น alkaline phosphatase, แร่ธาตุที่ละลายได้ดี (Ca, P, Na, K และ Cl) จะทำหน้าที่ในระบบ Osmoregulation สมดุลเกลือแร่ระหว่างร่างกายสัตว์กับสิ่งแวดล้อม รวมทั้งบำรุงรักษาความสมดุลความเป็นกรดด่าง (acid-base balance) และความต่างศักย์ของเนื้อเยื่อ (membrane potential) นับว่ายังคงมีงานวิจัยน้อยมากที่เกี่ยวกับความต้องการแร่ธาตุ (dietary mineral requirments) ของครัสเตเชียนที่อาศัยในทะเล (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546, 2551)

1. แร่ธาตุหลัก (Macro Mineral)

1.1 แคลเซียม (Calcium)

ปลาและกุ้ง สามารถดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดจากน้ำ เช่น แคลเซียม อาจจะพบการดูดซึมทั้งหมดหรือบางส่วนจากน้ำ (Desshimaru *et al.*, 1978 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997) จึงไม่จำเป็นต้องเสริมแคลเซียมในอาหารกุ้ง *L. vannamei* (Davis *et al.*, 1993 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997) แต่บางครั้งพบว่าสัตว์น้ำอาจมีการขาดแคลเซียมเมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีแคลเซียมต่ำ (Robinson *et al*, 1984, 1986, 1987 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณแคลเซียมในอาหารจะมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับความปฏิสัมพันธ์ (interact) ระหว่างสารอื่นๆ มากกว่าความต้องการแคลเซียมในอาหาร

1.2 ฟอสฟอรัส (Phosphorus)

เนื่องจากในแหล่งน้ำธรรมชาติมีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ การดูดซึมฟอสฟอรัสของสัตว์น้ำจากน้ำจืดหรือน้ำเค็มโดยทั่วไปยังมีไม่เพียงพอ (Cuzon *et al.*, 2004) ดังนั้นฟอสฟอรัสในอาหารสัตว์น้ำจึงมีความสำคัญ เบื้องต้นพบว่าครัสเตเชียนมีความต้องการฟอสฟอรัสในอาหาร 1-2% (Kitabayashi *et al.*, 1971; Deshimaru and Yone, 1978; Kanazawa *et al.*, 1984 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997) ในกุ้ง *P. japonicus* ซึ่งต้องการฟอสฟอรัสประมาณ 0.3-0.8% (National Research Council, 1993 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997) ที่ต้องการสูงในกุ้งมีผลมาจากเนื่องจากกุ้งมีความจำเป็นต้องใช้ฟอสฟอรัสในการสร้างเปลือกตลอดวงจรการลอกคราบ Cazon (1982) รายงานว่ากุ้งที่ให้หอยแมลงภู่ซึ่งมีฟอสฟอรัสต่ำ 0.7% เป็นอาหารจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง สอดคล้องกับการใช้อาหารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีระดับฟอสฟอรัส 0.41% และ 0.56% เลี้ยงกุ้ง *L. vannamei* และ *P. japonicus* จะทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง นอกจากนี้ความต้องการของฟอสฟอรัสในกุ้งยังขึ้นอยู่กับปริมาณแคลเซียมในอาหารอีกด้วย ดังการทดลองได้ใช้สัดส่วนระหว่างแคลเซียมและฟอสฟอรัส อัตราส่วน 0.56 ต่อ 1.10 จะทำให้กุ้งวัยรุ่น (*Hormarus americanus*) มีการเจริญเติบโตดีหากสัดส่วนเพิ่มเป็น 1.55 หรือมากกว่าจะมีผลทำให้การสร้างเปลือกชั้น endocuticle ผิดปรกติ โดยทั่วไปอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ได้ถูกแนะนำให้ใช้ในอาหารกุ้ง *P.*

japonicus การเสริมแคลเซียม 0.34% ของฟอสฟอรัสจะยับยั้งการนำไปใช้ประโยชน์ของฟอสฟอรัสในกุ้ง ดังนั้นระดับแคลเซียมที่ผสมในอาหารไม่ควรเกิน 2.3% การกำหนดการดูดซึมของฟอสฟอรัสจากแหล่งวัตถุดิบหลายชนิดในกุ้งและการสูญเสียหรือเจือจางจากอาหารควรที่จะทำให้การประเมินแหล่งอาหารในเทอมของสารอาหาร เศรษฐศาสตร์ และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม Davis และ Amold ใช้ chromic oxide เป็น marker ในการพิจารณา APA ของ inorganic phosphorus และผลของการเติมแคลเซียมต่อ APA ในกุ้ง *L. vannamei* ปรากฏดังนี้

Calcium phosphate monobasic	46.3%
Calcium phosphate dibasic	19.1%
Calcium phosphate tribasic	9.9%
Potassium phosphate monobasic	68.1%
Sodium phosphate monobasic	68.2%

พบว่าค่า APA ของอาหารที่ใช้ Sodium phosphate monobasic เป็นแหล่งฟอสฟอรัสจะถูกลด activity โดย calcium lactate (50% APA) แต่ไม่มีปัญหาที่ใช้ calcium carbonate (65.5% APA) หรือ calcium chrolide (68.2% APA) การปรากฏของ phytase จะไปยับยั้งการใช้แคลเซียมและฟอสฟอรัส เนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำในระบบย่อยอาหารในกุ้ง *P. japonicus* และ *L. vannamei* การใช้ประโยชน์ phytase อย่างไรก็ดีกุ้ง *P. japonicus* สามารถใช้ประโยชน์ phytase Phosphorus ได้ถึง 47.3% และ 8.4% ในกุ้ง *L. vannamei* (Civera *et al.*, 1990 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997) การเติม phytase 1.5% ในอารหารจะทำให้ลดการใช้ฟอสฟอรัสและสังกะสีในกุ้ง *L. vannamei*

1.3 โซเดียม (Sodium)

โซเดียมที่อยู่ในเลือดมีน้อยมาก ส่วนใหญ่อยู่ในกล้ามเนื้อประมาณ 90% ปริมาณของโซเดียมจะแตกต่างกันตามที่อยู่อาศัย มีหน้าที่ต่อไปนี้

ก.3.1 รักษาสมดุลของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ควบคู่ไปกับโปแตสเซียม (K+)

ก.3.2 รักษาสภาพความเป็นกรด – ด่างในร่างกายให้สมดุล

ก.3.3 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาท

1.4 คลอรีน (Chlorine)

คลอรีนพบในของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ สัตว์สามารถสะสมได้มากกว่าโซเดียมและโปแตสเซียม มีหน้าที่ดังต่อไปนี้

1.4.1 ถ้าอยู่ในเลือดจะรักษาความเป็นกรด – ด่างของน้ำย่อยและเป็นส่วนประกอบในน้ำย่อยด้วย

1.4.2 รักษาความดันออสโมติก ควบคุมการเข้าออกของสารและน้ำภายในเซลล์คลอรีนเกี่ยวข้องกับการเกิดสมดุลของแคทไอออน (cation) และแอนไอออน (anion) โดยอยู่รวมกับโซเดียม ถ้าอยู่ในสภาพสมดุลการแลกเปลี่ยนของแมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate) จะเกิดได้ดี ปริมาณคลอรีนจะแปรผกผันกับซัลเฟต เช่น ถ้าปริมาณซัลเฟตลดลง ปริมาณคลอรีนจะเพิ่มขึ้น

1.4.3 กระตุ้นน้ำย่อย amylase ปริมาณของคลอรีนในเลือดของครัสเตเชียนในทะเลจะเท่ากับในน้ำทะเลหรือใกล้เคียงกัน จึงไม่มีปัญหาการปรับสมดุลเหมือนสัตว์อื่นๆ และช่วยกระตุ้นน้ำย่อยให้ทำงานดีขึ้น

1.5 โปแตสเซียม (Potassium)

โปแตสเซียมพบอยู่ในเซลล์ของร่างกายและเลือด ส่วนในของเหลวภายนอกเซลล์พบโปแตสเซียมปริมาณน้อยมาก ในระยะที่มีการเจริญเติบโตหรือเริ่มสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ความต้องการโปแตสเซียมในเซลล์จะสูงมาก ซึ่งถ้ามีโปแตสเซียมในเลือดจะเป็นของเสียที่ต้องขับออกทางแอนเทนนอลแกลนด์ (antennal gland) พร้อมๆ กับแมกนีเซียมและซัลเฟต แต่ปริมาณน้อยกว่า

1.6 แมกนีเซียม (Magnesium)

แมกนีเซียมมีความสำคัญต่อกุ้งทะเลในแง่เป็นตัวที่ช่วยปรับสมดุลเกลือแร่ภายในร่างกาย ความต่างศักย์ของเนื้อเยื่อ การสร้างเปลือก และการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เป็นแร่ธาตุที่พบปริมาณสูงในน้ำทะเล โดยทั่วไปแล้วกุ้งและปูที่ดำรงชีวิตอยู่ในทะเลจะพยายามขับแมกนีเซียมออกจากร่างกายเพื่อให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าภายนอก ดังนั้นจึงเป็นข้อเท็จจริงที่ว่ากุ้งทะเลที่เลี้ยงในน้ำความเค็มสูงอยู่แล้วจะไม่ขาดแร่ธาตุชนิดนี้ อย่างไรก็ดี พบว่ากุ้งขาวจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดหากมีการเสริมแมกนีเซียม 1.2 g/Kg ในอาหาร แต่จะมีการเจริญเติบโตลดน้อยลงหากมีในอาหารมากเกิน 0.4 g/Kg สรุปได้ว่าในอาหารควรมีแมกนีเซียมอยู่ในระดับ 0.25-4 g/Kg จะส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของกุ้งทะเล (Davis and Lawrence, 1997)

2. แร่ธาตุรอง (Micro Mineral)

2.1 ทองแดง (Copper)

ทองแดงเป็นโลหะที่จำเป็นต่อสัตว์ มันทำหน้าที่ในตับและในการสร้างเอนไซม์ lysyl oxidase, cytochrome *c* oxidase (CCO), ferroxidase, tyrosinase และ superoxide dismutase (SOD) (Dell *et al.*, 1976 อ้างโดย Lee *et al.*, 2002) ทองแดงมีมากในครัสเตเชียนซึ่งบรรจุอยู่ในฮีโมไซยานินใช้เป็นรงควัตถุหลักในการขนส่งออกซิเจนในเลือด (Lee and Shiau, 2002) เนื่องจากทองแดงมีปริมาณต่ำมากในน้ำทะเล จึงทำให้กุ้งได้รับไม่เพียงพอต่อความต้องการเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการทางสรีระเคมี เพื่อก่อให้เกิดการเจริญเติบโตสูงสุด การสร้างเนื้อเยื่อจากการสะสมแร่ธาตุ (tissue mineralization) และ กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) อีกทั้งกุ้งต้องใช้ทองแดงเพื่อเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุเกี่ยวกับการหายใจ (respiratory pigments) เกี่ยวข้องกับการสร้างเลือด (hematopoiesis) รวมถึงการสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen) และอีแลสติน (elastin) (Cuzon *et al.*, 2004) หากกุ้งขาดทองแดงจะพบปริมาณทองแดงต่ำในเปลือกส่วนหัวกุ้ง เลือด ตับ และหัวใจ พบว่าการเจริญเติบโตของกุ้งขาว *L. vannamei* จะลดลงหากมีปริมาณทองแดงต่ำกว่า 34 mg/Kg ในอาหารกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified diets) (Davis and Lawrence, 1997) และในอาหารสำหรับกุ้ง *P. orientalis* ควรมีการเสริมทองแดงในปริมาณ 53 mg/kg (Liu *et al.*, 1990 อ้างโดย Davis and Lawrence, 1997)

จากการศึกษาของ Kanazawa *et al.* (1984) อ้างโดย Lee *et al.* (2002) พบว่าในกุ้ง *P. japonicus* ที่ให้อาหารที่เสริมทองแดง 30 mg/kg เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกับกุ้งที่ให้อาหารที่ไม่ได้เสริมทองแดง Lin *et al.* (2008) ได้ศึกษาการเสริมทองแดงในอาหารปลา *Epinephelus malabaricus* พบว่าระดับ

ทองแดงที่ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตดีที่สุดมีค่าสูงจะอยู่ในช่วง 4-6 mg/kg ถ้าหากเสริมทองแดงในปริมาณที่มากกว่านี้จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง แต่การเสริมทองแดงในอาหารปลาไม่มีผลต่ออัตราการรอดตาย

อย่างไรก็ตามการเสริมทองแดงตามความต้องการและความเป็นพิษของทองแดงมีการศึกษาในสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ แต่ยังไม่มีการศึกษาในสัตว์ทะเล โดยที่สัตว์ทะเลมีการรับทองแดงไปใช้ในปริมาณที่น้อย สำหรับพวกครัสเตเชียนจะมีข้อมูลที่เกียวข้องกับความต้องการแร่ธาตุที่หาง่ายแต่มีผลการทดลองที่ค่อนข้างแปรปรวน รายงานว่าทองแดงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของ *P. japonicus* โดยการทดลองมีผลทำให้รู้ว่าการขาดแคลนและการมีมากเกินไปของทองแดงจะมีผลต่อการยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกันและมีความเข้มงวดมากขึ้นที่จะป้องกันการติดเชื้อระหว่างปลากับสัตว์อื่นๆ (Lee and Shiau, 2002)

2.2 เหล็ก (Iron)

ธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญไขมัน (Lipid Oxidation) อาการขาดในกุ้งไม่ค่อยพบมากในกุ้ง หากมีปริมาณมากเกินไปจะมีผลเสียทำให้การเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเคยพบในกุ้ง *P.japonicus* เนื่องจากไปเพิ่มการเผาผลาญไขมัน (Lipid Oxidation) และไปลดความเสถียรของกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid) โดยทั่วไปแล้วไม่จำเป็นต้องเสริม (Davis and Lawrence, 1997)

2.3 ไอโอดีน (Iodine)

โดยทั่วไปแล้วไม่ค่อยได้ทำการประเมินถึงความจำเป็นของไอโอดีนต่อสรีระวิทยากุ้ง การเสริมปริมาณไอโอดีน 1 mg/Kg ในอาหาร จึงน่าที่จะเพียงพอที่ไม่ทำให้กุ้งมีการขาด (Davis and Lawrence, 1997)

2.4 แมงกานีส (Manganese)

การเสริมแมงกานีสในอาหารสำหรับกุ้งมีความจำเป็น เนื่องจากปริมาณแมงกานีสในน้ำทะเลมีค่าต่ำมาก (0.01 mg/l) อีกทั้งขบวนการนำแมงกานีสไปใช้ประโยชน์ในร่างกายถูกยับยั้งด้วยกรดไฟติก (Phytic Acid) การเสริมในอาหารจึงเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณา อาการขาดแมงกานีสจะทำให้โตช้า การพัฒนาของเปลือกผิดปรกติ ลูกวัยอ่อนตายสูง และอัตราการฟักต่ำ (Davis and Lawrence, 1997)

2.5 ซิลีเนียม (Selenium)

ซิลีเนียมเป็นธาตุที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ glutathion peroxidase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เปลี่ยน hydrogen peroxide ไปเป็นน้ำ และ lipid hydroperoxides ไปเป็น lipid alcohols และช่วยป้องกันเซลล์จากการทำลายของ peroxidase ร่วมกับไวตามินอีทำหน้าที่ antioxidant เพื่อป้องกัน polyunsaturated phospholipids ใน cellular membranes จากการทำลายของ peroxidative อาการขาดซิลีเนียมคือทำให้การพัฒนาของเปลือกผิดปรกติ ทำให้กุ้ง juvenile *P.vannamei* จะโตดีที่สุดหากมีการเสริมซิลีเนียมลงไป 0.2-0.4 mg/Kg อย่างไรก็ดีในอาหารสำเร็จรูปจะพบว่ามีปริมาณเพียงพอหากใช้ปลาป่นเป็นส่วนประกอบมากกว่า 15% และควรหลีกเลี่ยงการเสริมซิลีเนียมเกิน 0.3 mg/Kg เนื่องจากมีแนวโน้มอาจเกิดความเป็นพิษได้ (Davis and Lawrence, 1997)

2.6 สังกะสี (Zinc)

เพื่อทำให้ขบวนการสร้างเนื้อเยื่อเป็นไปได้อย่างปกติในกุ้ง *L. vannamei* จึงควรมีสังกะสี 33mg/Kg ในอาหาร การนำธาตุนี้จากอาหารมาใช้ประโยชน์ได้ต่ำ การเสริมจึงมีความจำเป็น อีกทั้งการนำสังกะสีไปใช้ประโยชน์ในร่างกายยังมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับปริมาณของ tricalcium phosphate และ phytase ก็ยังไปลดการนำไปใช้ของสังกะสีอีกทางหนึ่งด้วย (Davis and Lawrence, 1997)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน

3.1 ความแตกต่างของชนิดสัตว์ และอายุ (Species and age) โดยทั่วไปแล้วครัสเตเชียนน้ำจืดจะมีประสิทธิภาพการย่อยอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเช่น รำสาลี หรือรำข้าวได้สูงกว่าครัสเตเชียนน้ำเค็ม แต่ครัสเตเชียนทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจากกุ้งป่น และเคซีนได้ดีใกล้เคียงกัน ในขณะที่เครย์ฟิชจะมีประสิทธิภาพการย่อยอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีไฟเบอร์สูงได้ดี และจะมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตต่ำกว่าเป็นต้น สำหรับความสัมพันธ์ของอายุ และประสิทธิภาพการย่อยอาหารนั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์ของระบบย่อยอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่าต่ำ และมีความต้องปริมาณสารอาหารที่แตกต่าง (Lee and Lawrence, 1997)

3.2 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Environmental factors) นับว่ามีความสัมพันธ์ทางอ้อมเนื่องจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของครัสเตเชียนซึ่งอาจส่งผลต่อกิจกรรมต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปเช่น การยอมรับอาหาร อัตราการกินอาหาร หรือความต้องการอาหารเป็นต้น ซึ่งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ได้มีการศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็มน้ำ pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เป็นต้น (Lee and Lawrence, 1997)

3.3 องค์ประกอบทางโภชนาการ (Nutrient associations) เป็นหลักฐานที่แน่ชัดว่าองค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารในธรรมชาติ หรืออาหารสำเร็จรูปมีอิทธิพลโดยตรงต่อระสิทธิภาพการย่อยอาหารของครัสเตเชียน เนื่องจากวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิดมีโครงสร้าง หรือองค์ประกอบแตกต่างกัน เช่นวัตถุดิบโปรตีนจากพืชบางชนิดแม้จะมีโปรตีนสูงแต่ก็มีไฟเบอร์สูงนอกเหนือจากนั้นคือสารยับยั้งการย่อยของเอนไซม์ย่อยอาหารที่มีปริมาณสูงหากผ่านกระบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพโดยวัตถุดิบแต่ละชนิดก็จะมีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ และช่วงอายุของครัสเตเชียนซึ่งได้กล่าวไว้ในข้างต้น (Lee and Lawrence, 1997)

3.4 การยอมรับอาหาร (Feed Palatability) ในที่นี้รวมถึงความพึงพอใจหรือการยอมรับในสี รส รูปร่าง และขนาดของอาหาร ซึ่งจากการศึกษาในอดีตมีการยอมรับว่าการยอมรับอาหาร เป็นปัจจัยสำคัญอันดับต้น ๆ ที่มีผลต่ออัตราการกินอาหาร รวมถึงกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และระบบย่อยอาหารให้ทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Lee and Lawrence, 1997)

วิธีดำเนินการวิจัย

1 สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากบ่อดินอายุ 2 เดือน ความยาวเฉลี่ย 8 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 6-7 กรัม

2. สถานที่ทำการเพาะเลี้ยง

โรงเพาะเลี้ยง ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

3. ระยะเวลาทำการทดลอง

ทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2554

4 การเตรียมน้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt เตรียมใส่ไว้ในบ่อขนาด 5,000 ลิตร โดยจะปรับความเค็มของน้ำให้ได้ 20 ppt ด้วยน้ำประปา

5. การปรับสภาพกุ้งก่อนทำการทดลอง

นำกุ้งที่ได้จากฟาร์มมาทำการปรับสภาพ โดยการนำมาเลี้ยงในบ่อขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำที่ปรับความเค็มที่จะใช้ในการทดลองคือ 10 ppt อัตราการปล่อยกุ้ง 100 ตัว/ตารางเมตร

6. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) เป็นไปตามระดับของปริมาณทองแดงคีเลตในอาหารที่ต่างกัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดทดลองๆละ 3 ซ้ำ ตาม ระดับของปริมาณทองแดงในอาหารที่ใช้เลี้ยง ได้แก่ 50 mg/kg 100 mg/kg 150 mg/kg และ 200 mg/kg และไม่เสริม (control)

7. การเตรียมอาหาร

7.1 นำอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 35 % ไขมัน 9 % คาร์โบไฮเดรต 34 % วิตามิน 1 % เยื่อใย 5 % มาเข้าเครื่องบดเพื่อให้อาหารมีลักษณะเป็นผงละเอียด

7.2 นำอาหารที่บดละเอียดแล้วมาผสมกับ Cu Chelate โดยใน Cu Chelate ที่ผสมในอาหารประกอบด้วย Cu ประมาณ 10 % ความเข้มข้นที่ต้องการเสริมในอาหารเท่ากับ 0 mg/kg (control) 50 mg/kg 100 mg/kg และต้องใช้ Cu Chelate เท่ากับ 0 mg/kg (control) 500 mg/kg 1,000 mg/kg 1,500 mg/kg และ 2,000 mg/kg จากนั้นนำอาหารเข้าเครื่องผสมอาหารเป็นเวลา 10 นาที

7.3 นำอาหารที่ผสมกับ Cu Chelate แล้ว มาใส่น้ำ 70% ของน้ำหนักอาหาร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องอัดเม็ด

7.4 นำอาหารที่อัดเม็ดแล้วผึ่งลม 2 วัน จากนั้นคลุกด้วยน้ำมันปลา 1% ของน้ำหนักอาหาร แล้วผึ่งลมอีก 1 วัน

7.5 เก็บอาหารในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

8. การทดสอบการเลี้ยงกุ้ง

จะดำเนินการเลี้ยงกุ้งตามวิธีการทดลองข้างต้น 2 ชุด แต่ละการทดลองของการเลี้ยงแต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ

ชุดที่ 1 เพื่อการทำการตรวจสอบการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ การรอดตาย ความถี่การลอกคราบ ความแตกต่างของขนาด หลังจากการทดลองเลี้ยง 2 เดือน จึงนำกุ้งทุกชุดการทดลองการทดสอบระดับความทนทานของการขาดออกซิเจน

ชุดที่ 2 เพื่อใช้เจาะเลือดกุ้งนำพลาสมาไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน และแร่ธาตุเช่น Na, Ca, Mg, K, Cl, P, Cu

8.1 คัดเลือกกุ้งที่มีความแข็งแรงใส่ในบ่อเลี้ยงขนาด 500 ลิตร (100 ตัว/ตารางเมตร) ใส่หัวทราย 1 จุด ใส่อวนขนาดเล็กเพื่อใช้เป็นที่หลบซ่อนของกุ้งขาวในและใส่ถาดอาหารบ่อละถาดเพื่อใช้ในการตรวจปริมาณอาหาร

8.2 อาหารและการให้อาหาร ทำการให้อาหารทดลองโดยจะให้อาหารวันละ 4 ครั้ง คือ 09.00 น. 13.00 น. 18.00 น. และ 23.00 น. โดยเก็บอาหารที่เหลือจากการให้ในแต่ละบ่อมาทำการอบแห้งทุกวัน เพื่อมาหาอัตราการแลกเนื้อ

8.3 การจัดการ ดูแลรักษาความสะอาดของบ่อโดยการขัดบ่อ ดูดตะกอน ล้างกระจาด ล้างอวน ขัดหัวทราย และเปลี่ยนถ่ายน้ำออก 50 เปอร์เซ็นต์ของบ่อ ทุกๆ 7 วัน

8.4 ทำการตรวจวัดค่า D.O., pH, อุณหภูมิ และเก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย ไนไตรท์ และอัลคาไลนิตี้ทุก ๆ 15 วัน

9. การบันทึกและตรวจสอบการเจริญเติบโตและอื่น ๆ

9.1 ทำการสุ่มชั่งน้ำหนัก 100 % และวัดความยาวกุ้ง 40% ทุก 15 วัน พร้อมกับนับจำนวนตัวที่รอดตาย

9.2 ทุกวันจะทำการตรวจสอบกุ้งที่ตาย

9.3 นำข้อมูลจากข้อ 9.1 มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อตามตารางที่ 1

10. การทนทานต่อการขาดออกซิเจน

โดยการนำกุ้งในหน่วยการทดลองต่างๆมาใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ โดยจะใส่ถังละ 6 ตัว แล้วงดให้ออกซิเจน ทำการปิดฝาภาชนะด้วยพลาสติกใสเพื่อป้องกันมิให้ออกซิเจนจากภายนอกเข้ามา ทำการตรวจค่า D.O. โดยใช้เครื่อง D.O. meter โดยทำการตรวจค่าทั้งตอนเริ่มทำการทดลองและตอนสิ้นสุดการทดลอง โดยจะยุติการทดลองเมื่อในการทดลองใดๆกุ้งมีการสลบมากกว่าหรือเท่ากับ 50 % แล้วสังเกตพฤติกรรมของกุ้งขาวโดยจะมีเกณฑ์ในการสังเกต จดบันทึกพฤติกรรม และลักษณะทางกายภาพของกุ้งขาว ได้แก่

การเคลื่อนที่

กุ้งมีการเคลื่อนที่จากจุดหนึ่งไปยังจุดหนึ่ง

ตารางที่ 1 สูตรการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์การเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และ ความแปรปรวนของขนาด

พารามิเตอร์	สูตรการคำนวณ
1. อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily weight gain ; ADG_W; กรัม / วัน)	$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$
2. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain (%) ; WG)	$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง– น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง)}\times 100}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}$
3. ความยาวที่เพิ่มขึ้น (Length gain (%) ; LG)	$\frac{\text{ความยาวเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง– ความยาวเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง)}\times 100}{\text{ความยาวเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง}}$
4. เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของขนาดในส่วนน้ำหนัก (Size variation, weight (%))	$\frac{\text{ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S.D.) ของน้ำหนัก}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ย}}\times 100$
5. เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของขนาดในส่วนความยาว (Size variation, length (%))	$\frac{\text{ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (S.D.) ของความยาว}}{\text{ความยาวเฉลี่ย}}\times 100$
6. อัตราการแลกเนื้อของกุ้ง (Feed conversion ratio; FCR)	$\frac{\text{น้ำหนักแห้งของอาหารที่กุ้งกิน}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$

อาการขาวขุ่นของกล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อบริเวณลำตัวที่มีลักษณะขาวขุ่นระดับน้อย(ขาวขุ่นประมาณ ¼ ของลำตัว) ปานกลาง (ขาวขุ่นประมาณ1/3-½ ของลำตัว) หรือมาก (ขาวขุ่น> ½ ของลำตัว)

การเกร็งงอของลำตัว

สังเกตที่บริเวณลำตัวซึ่งจะมีการงอของลำตัวตลอดเวลาในขณะหยุดนิ่งและว่ายน้ำ

การเสียการทรงตัว

กุ้งมีการตะแคงตัวเมื่อหยุดนิ่งหรือว่ายน้ำแบบควงสว่าน

11. การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง

11.1 กุ้งแต่ละการทดลองจะถูกตรวจสอบระยะลอกคราบ โดยนำกุ้งระยะลอกคราบ D_0 มาทำการเก็บเลือดกุ้งโดยใช้เข็มฉีดยา ทำการดูดเลือดกุ้งขาวโดยใช้เข็มเบอร์ 24 Tuberculin ขนาด 1.0 มิลลิลิตร แทงบริเวณใต้ขาเดินคู่ที่ 5 (5th pereiopods)

11.2 นำเลือดเก็บไว้ใน Eppendroff โดยผสม 30% tri-sodium citrate เพื่อกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) โดยผสมลงไปในอัตราส่วน 1:1 (ใช้เลือด 0.7 ml:30% tri-sodium citrate 0.7 ml) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อมาทดสอบปริมาณโปรตีนและทองแดง

12. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแร่ธาตุ

12.2.1 นำเลือดกุ้งที่ผสม 30% tri-Sodium citrate ไปปั่นเพื่อให้ตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge เพื่อให้ตกตะกอนรวมตัวกันที่ก้นหลอด ด้วยแรงเหวี่ยง 14,000 g ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20-25 นาที

12.2.2 ดูดของเหลวส่วนบน (Supernatant) ซึ่งก็คือพลาสมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ใน Eppendrof ใหม่ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณของแร่ธาตุตาม โดยนำตัวอย่างมาใส่ cup โดยด้านล่างหุ้มด้วย prolene film แล้วนำไปวัดปริมาณของ Cu ด้วยเครื่อง X- ray fluorescent spectrophotometer Oxford ED ^{2000} ตามวิธีการของ Pratoomchat et al. (2002)

ผลการวิจัย

จากการศึกษาระดับทองแดงในอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ความถี่ในการลอกคราบอัตราการรอดตาย ความแตกต่างของขนาด FCR และความเข้มข้นของโปรตีนและทองแดงในพลาสมากุ้งขาว โดยให้อาหารที่มีการเสริมทองแดงที่แตกต่างกัน 5 ระดับ 0 mg/kg (control) 50 mg/kg 100 mg/kg 150 mg/kg และ 200 mg/kg โดยเลี้ยงกุ้งขาวตั้งแต่ขนาดเริ่มต้น 9.24 เซนติเมตร และน้ำหนัก 6.24 กรัม จนสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลานาน 60 วัน พบว่ากุ้งมีความเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 1 และรูปที่ 2)

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโต ความแปรปรวนของขนาด อัตราการรอด ความถี่ในการลอกคราบ และ FCR

1. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain)

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 3)

2. เปอร์เซ็นต์ความยาวที่เพิ่มขึ้น (Length gain)

เปอร์เซ็นต์ความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้นของชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 100 mg/kg มีค่าสูงสุด สูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เสริมทองแดง150 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) โดยที่ชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg 200 mg/kg และชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 4)

3. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในส่วนน้ำหนัก (Specific growth rate of weight)

ในแต่ละชุดการทดลองในเรื่องของเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของขนาดในส่วนน้ำหนักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 5)

4. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในส่วนความยาว (Specific growth rate of length)

เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของขนาดในส่วนความยาวของชุดการทดลองอาหารที่เสริมทองแดง 100 mg/kg สูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (*P<0.05*) แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg และชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 200 mg/kg (*P>0.05*) (รูปที่ 6)

5. อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily weight gain)

ในแต่ละชุดการทดลองในเรื่องของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 7)

6. เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของขนาดในส่วนน้ำหนัก (Size variation, weight)

ในแต่ละชุดการทดลองในเรื่องของเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของขนาดในส่วนน้ำหนักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 8)

7. เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของขนาดในส่วนความยาว (Size variation, length)

เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของขนาดในส่วนความยาวของชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 100 mg/kg สูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg 200 mg/kg และชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) (รูปที่ 9)

8. อัตราการรอด (Survival)

อัตรารอดของชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg และ 200 mg/kg ต่ำกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) โดยที่ชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 100 mg/kg และ 150 mg/kg ไม่มีความแตกต่างกันและไม่แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 10 และ 11)

9. อัตราการแลกเนื้อของกุ้ง (Feed conversion ratio; FCR)

อัตราการแลกเนื้อของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 12)

10. ความถี่ในการลอกคราบของกุ้ง (Molting frequency)

ความถี่ในการลอกคราบของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 13 และ 14)

11. ระดับความเข้มข้นโปรตีนในพลาสมา

ระดับความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาของกุ้งขาว จากการนำสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 15) มาคำนวณปริมาณโปรตีน โดยจะเห็นชัดเจนว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 200 mg/kg จะพบว่าระดับความเข้มข้นโปรตีนมีค่าสูงสุด สูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดงในอาหาร 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg และชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) โดยที่ชุดควบคุมมีระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุด ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg และ 100 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) (รูปที่ 16)

12. ระดับความเข้มข้นทองแดงในพลาสมา

ระดับความเข้มข้นของทองแดงในพลาสมาของชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg สูงสุดและสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg 100 mg/kg และ 200 mg/kg (รูปที่ 17)

13. ผลการทดสอบการทนทานต่อการขาดออกซิเจน

13.1 ระยะเวลานานที่สุดที่ทำให้กุ้งสลบ

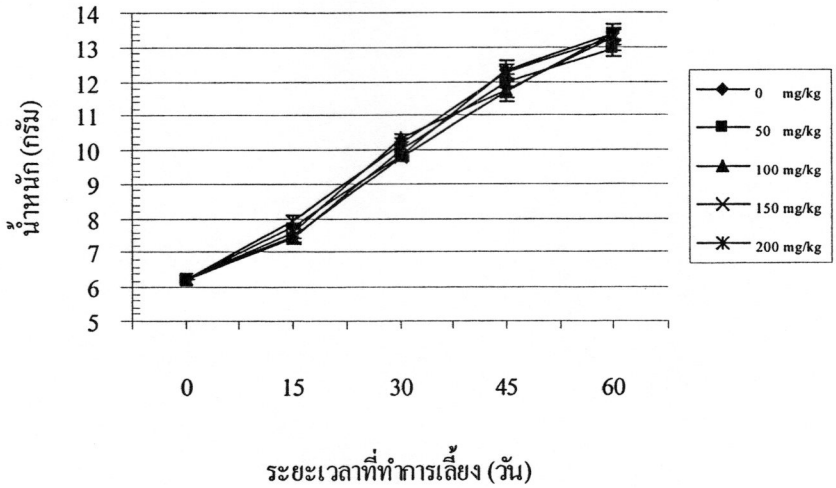
ระยะเวลาที่ทำให้กุ้งสลบ 50% ของชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg มีค่าสูงสุด สูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg 100 mg/kg และชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) โดยที่ชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg และ 200 mg/kg ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) และระยะเวลาที่ทำให้กุ้งสลบของชุดควบคุมมีค่าต่ำสุด ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg และ 100 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) (รูปที่ 18)

13.2 ระดับออกซิเจนต่ำสุดที่ละลายในน้ำที่ทำให้กุ้งสลบ

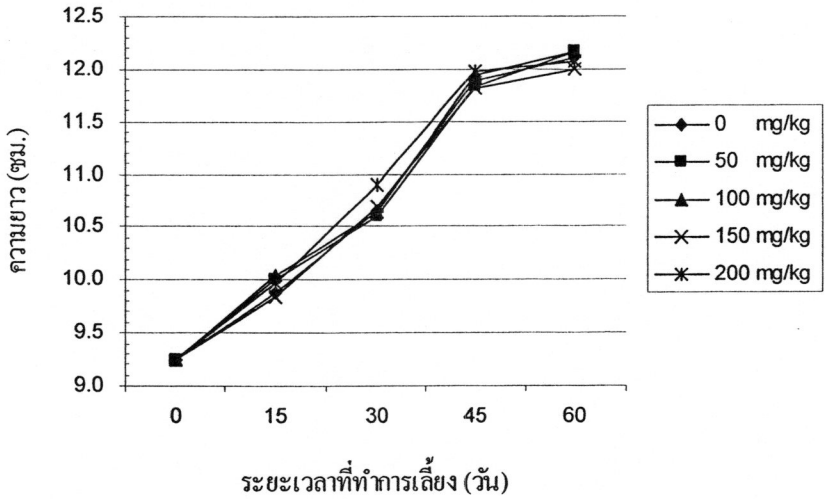
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ทำให้กุ้งสลบของชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 0 mg/kg (ชุดควบคุม) 50 mg/kg และ 100 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 200 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) และชุดควบคุมจะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำสูงสุดที่ทำให้กุ้งสลบ และสูงกว่ากว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 50 mg/kg และ 100 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) (รูปที่ 19)

14. คุณภาพน้ำในบ่อทดลอง

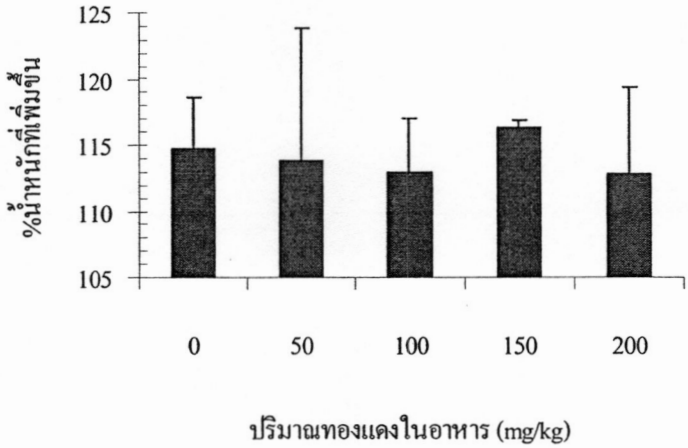
จากการตรวจสอบตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง พบว่า ระดับความเค็มอยู่ที่ 10 ppt อุณหภูมิ 26 – 29 ^{o}C พีเอช 7.8-8.3 ส่วนไนไตรท์ 0.002 mg/l และแอมโมเนียต่ำกว่า 0.02 mg/l ซึ่งคุณภาพน้ำยังอยู่ระดับไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50% ทุกๆ 7 วัน และมีการนำอาหารที่เหลือออกไปหลังจากให้กุ้งกินเป็นเวลา 2-3 ชม.



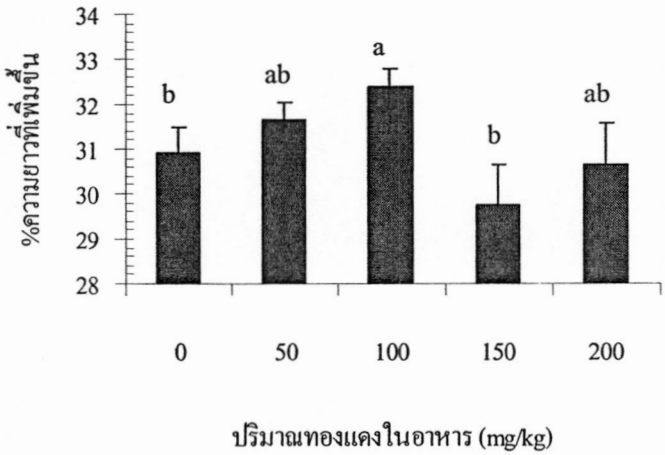
รูปที่ 1 น้ำหนักตัวของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดง ระยะเวลาเลี้ยง 60 วัน ค่าเฉลี่ย ± S.E.



รูปที่ 2 ความยาวลำตัวของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดง ระยะเวลาเลี้ยง 60 วัน ค่าเฉลี่ย ± S.E.



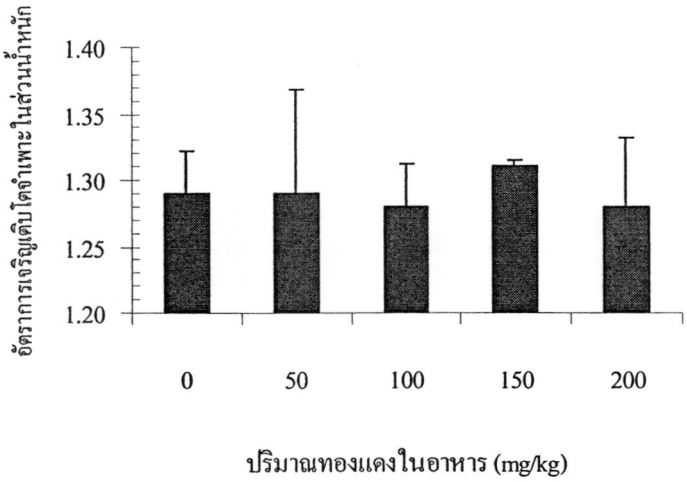
รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงครบ 60 วัน ค่าเฉลี่ย ± S.E.



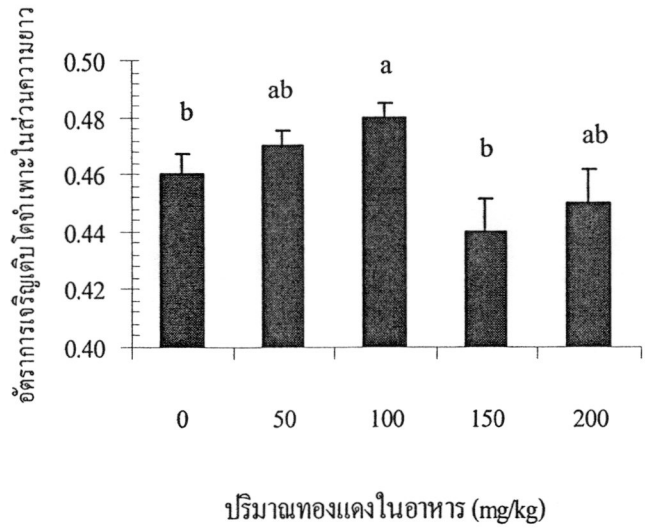
รูปที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงครบ 60 วัน

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



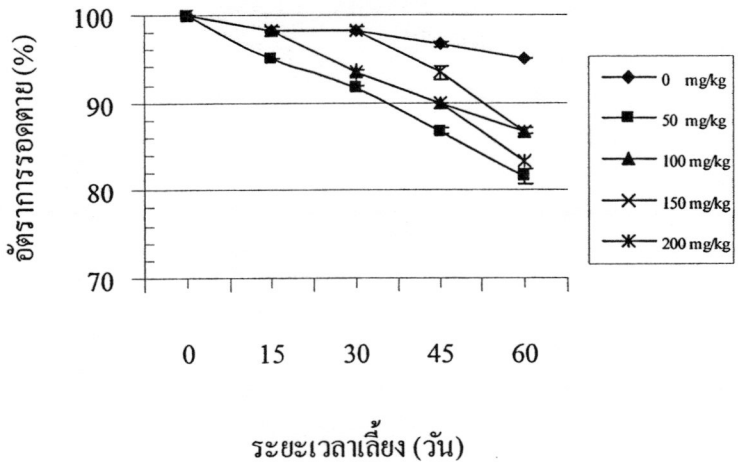
รูปที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในส่วนของน้ำหนักของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงครบ 60 วัน ค่าเฉลี่ย ± S.E.



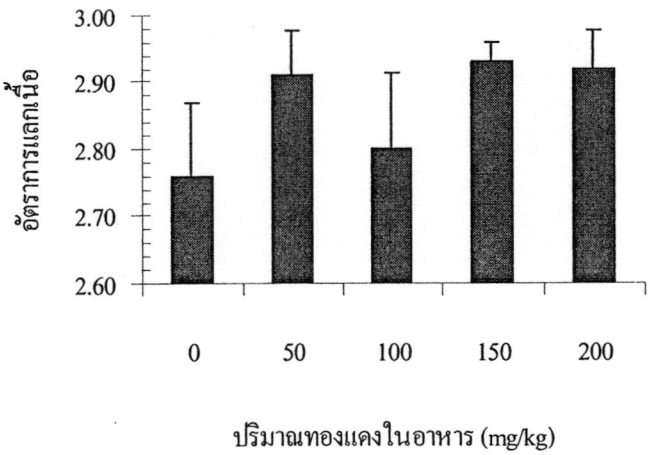
รูปที่ 6 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในส่วนความยาวของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงเมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



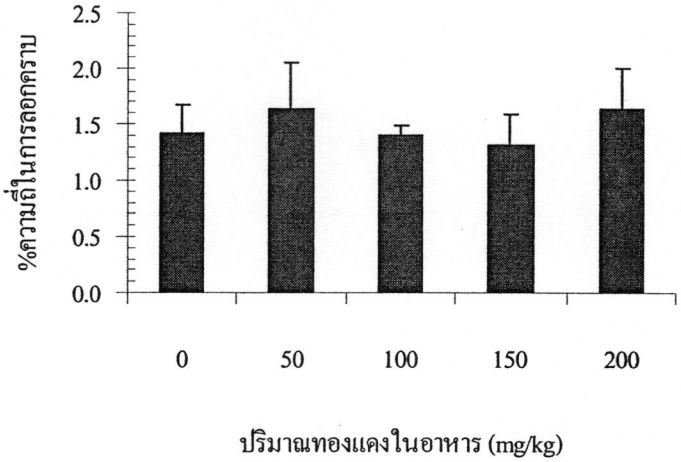
รูปที่ 11 อัตราการรอดของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงตลอดระยะเวลาเลี้ยง 60 วัน



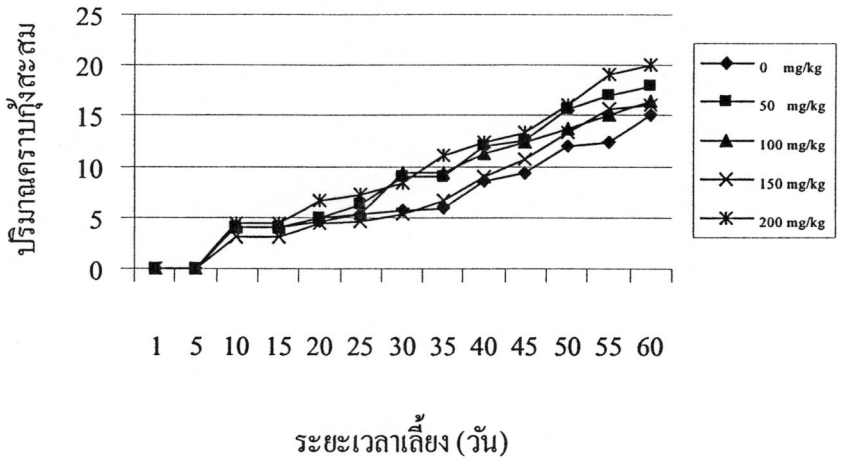
รูปที่ 12 อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงครบ 60 วัน

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

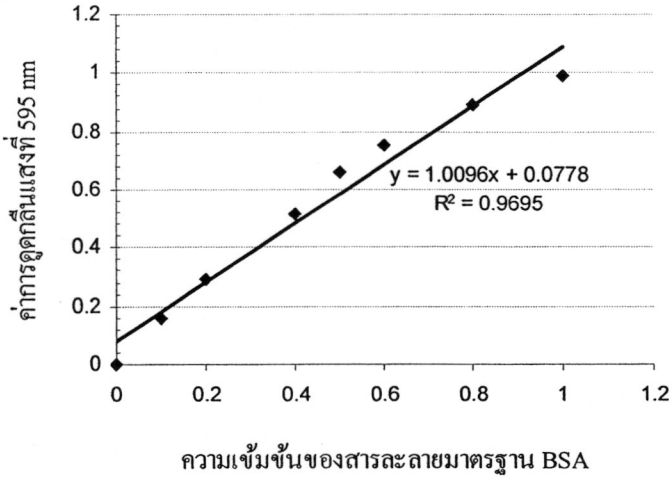
2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



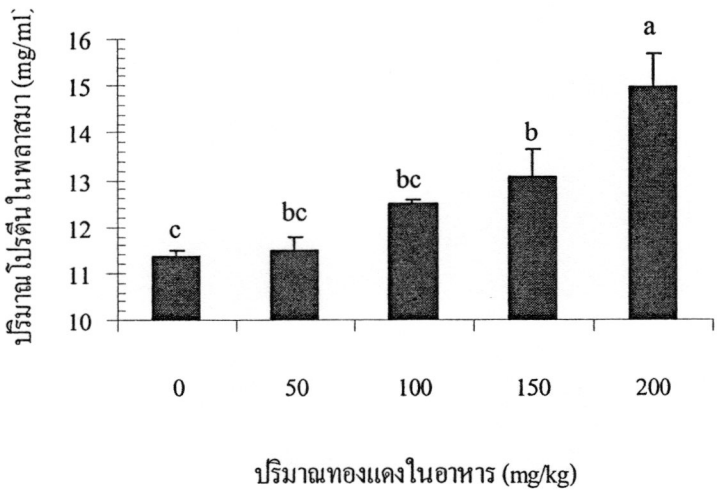
รูปที่ 13 ความถี่ในการลอกคราบในของกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดงครบ 60 วัน ค่าเฉลี่ย ± S.E.



รูปที่ 14 ความถี่สะสมในการลอกคราบในของกุ้งขาว (*L.vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดง ตลอดระยะเวลาเลี้ยง 60 วัน



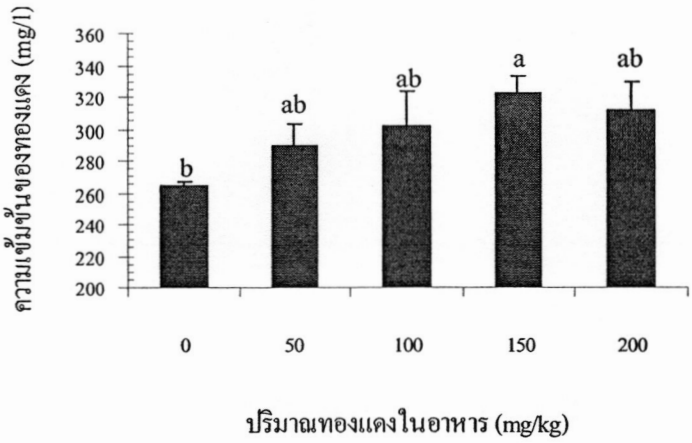
รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นโปรตีน (Standard Curve)



รูปที่ 16 ความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมากุ้งขาว (*L.vannamei*) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

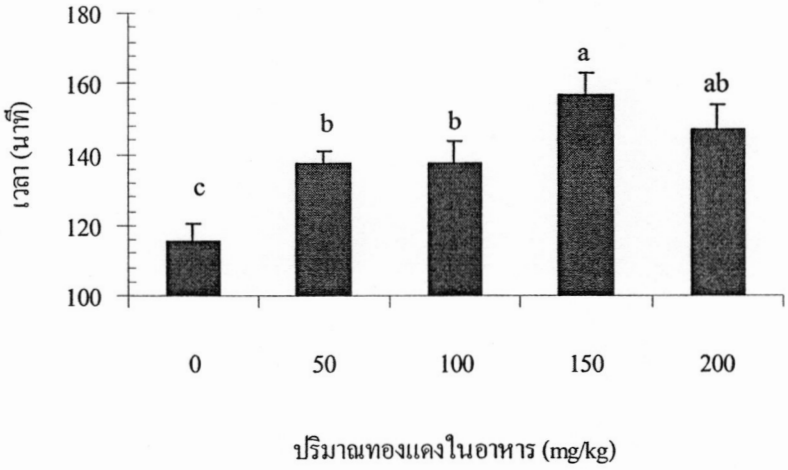
2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 17 ความเข้มข้นของทองแดงในพลาสมากุ้งขาว (*L.vannamei*) เมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

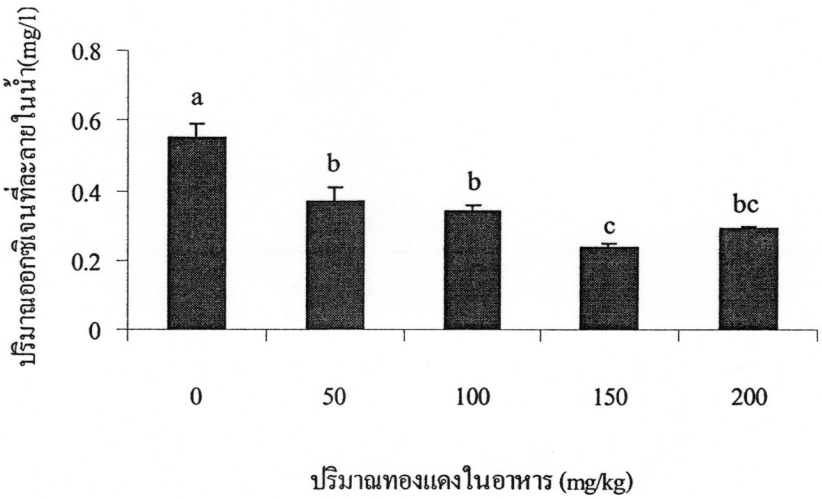
2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 18 เวลาที่กุ้งสลบเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 19 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ทำให้กุ้งสลบเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย ± S.E.

2. อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

1. การเจริญเติบโต

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า การเสริมทองแดงในอาหารไม่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตในส่วนของน้ำหนัก และอัตราแลกเนื้อของกุ้งทั้ง 5 ชุดการทดลอง โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lee *et al.* (2002) ที่ได้ทำการศึกษาการเสริมทองแดงตามความต้องการของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (*P. monodon*) และผลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจง โดยทำการเสริมทองแดงในอาหารที่ 7 ระดับ คือ 0 (ชุดควบคุม), 10, 20, 30, 40, 80 และ 160 mg/kg ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจะสูงที่ระดับทองแดง 10, 20 และ 30 mg/kg และจะลดต่ำลงเมื่อระดับทองแดงในอาหารมากขึ้น และจากการศึกษาของ Kanazawa *et al.* (1984) อ้างโดย Lee *et al.* (2002) พบว่าในกุ้ง *P. japonicus* ที่ให้อาหารที่เสริมทองแดง 30 mg/kg เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกับกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่ได้เสริมทองแดง และจากการศึกษาของ Chen *et al.* (2001) ที่ได้ทำการศึกษาพิษของคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีผลต่ออัตรารอดตาย การเจริญเติบโต การลอกคราบ และการให้อาหาร ของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) โดยทำการเสริมคอปเปอร์ซัลเฟตในน้ำที่ 5 ระดับ คือ 0 (ชุดควบคุม), 0.45, 0.90, 1.80 และ 4.50 mg/l และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 75 วัน ซึ่งพบว่าน้ำหนักและความยาวของชุดควบคุมมีค่าสูงที่สุดและสูงกว่าชุดการทดลองที่เสริมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.90, 1.80 และ 4.50 mg/l อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดง 100 mg/kg มีความยาวเพิ่มขึ้นสูงสุดโดยสูงกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารเสริมทองแดง 150 mg/kg และชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทองแดงจะมีผลต่อความยาวของกุ้ง ถ้ากุ้งได้รับทองแดงมากหรือน้อยจนเกินไปจะทำให้มีการเจริญเติบโตในส่วนความยาวลดลง

2. อัตราการรอดตาย

การเสริมทองแดงมีผลต่ออัตราการรอดตาย โดยที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมทองแดงมีอัตรารอดตายสูงสุดและสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมทองแดง 50 mg/kg และ200 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lee *et al.* (2002) พบว่าระดับทองแดงในอาหารที่ 10 mg/kg และ 20 mg/kg จะทำให้กุ้ง *P. monodon* มีอัตรารอดตายสูง ซึ่งถ้าเสริมทองแดงมากกว่านี้จะทำให้อัตราการรอดตายลดลง และจากการศึกษาของ Chen *et al.* (2001) พบว่า ในการเสริมคอปเปอร์ซัลเฟตในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอัตรารอดตายของชุดควบคุมและกุ้งที่ได้รับการเสริมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.45 mg/l จะมีค่าสูงที่สุด ส่วนกุ้งที่ได้รับการเสริมคอปเปอร์ซัลเฟต 4.50 mg/l จะตายหมดที่ 30 วัน

การที่กุ้งได้รับทองแดงมากเกินไปแล้วตาย มีสาเหตุจากการที่กุ้งได้รับทองแดงมากเกินไป จะสร้างเมือกขึ้นมาปกคลุมบริเวณเหงือกทำให้เกิดการระคายเคือง อีกทั้งยังเป็นการขัดขวางการทำงานของเหงือก และทองแดงยังเก็บสะสมอยู่ในรูปของกรดแล็คติกอีกด้วย เนื่องจากทองแดงเป็นตัวจำกัดในการแลกเปลี่ยนก๊าซที่ใช้ในกระบวนการหายใจที่ทำงานร่วมกับกล้ามเนื้อภายในเซลล์ที่ขาดออกซิเจน จึงมีกลไกในการทำให้กุ้งตาย (Frias *et al.*, 2003)

3. การลอกคราบ

การเสริมทองแดงในอาหารไม่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้ง เนื่องจากกุ้งนำแร่ธาตุโซเดียม คลอรีน โปแตสเซียม และแคลเซียมในพลาสมาไปใช้ในการสร้างเปลือก ซึ่งแร่ธาตุแคลเซียมเป็นแร่ธาตุหลักที่สำคัญในการสร้างเปลือกของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เมื่อปริมาณแคลเซียมในเลือดมีสูงกระบวนการสร้างเปลือกก็สามารถดำเนินไปได้ด้วยดี รวดเร็ว การมีขนาด ความแข็งของเปลือก และความสมบูรณ์จึงมีมากกว่า (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546) และจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากุ้งใช้ระยะเวลาในการลอกคราบสั้น เนื่องมาจากการเลี้ยงกุ้งที่น้ำความเค็มต่ำ ดังมีรายงานที่กล่าวว่า ปู *C. altimanus* ที่เลี้ยงในความเค็มน้ำ 3 ppt ระยะลอกคราบ (Intermolt) จะสั้นกว่าปูที่เลี้ยงระดับความเค็ม 20 และ 30 ppt (Spivak, 1999 อ้างโดย บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546)

4. โปรตีนและทองแดงในพลาสมา

การเสริมทองแดงในอาหารมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากว่าในฮีโมไซยานินมีองค์ประกอบของโปรตีน และทองแดงเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งถ้าเสริมทองแดงเข้าไปก็จะเป็นการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างฮีโมไซยานินมากขึ้น ดังนั้นถ้ามีปริมาณฮีโมไซยานินมากก็จะทำให้มีปริมาณโปรตีนมากขึ้นด้วย โดยจะเห็นชัดว่าชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 200 mg/kg จะพบระดับโปรตีนสูงสุด ($p<0.05$) ซึ่งในแต่ละชุดการทดลอง การเสริมทองแดงในอาหารส่งผลช่วยทำให้ระดับโปรตีนในพลาสมาสูงขึ้น และปริมาณทองแดงในพลาสมาชุดการทดลองที่เสริมทองแดง 150 mg/kg จะพบระดับทองแดงในพลาสมาสูงสุด ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$) ปริมาณทองแดงในพลาสมามีความสัมพันธ์กับการทดสอบความเครียด โดยถ้ามีปริมาณทองแดงในพลาสมาสูงกุ้งจะสามารถทนต่อสภาพที่มีออกซิเจนต่ำได้ดีกว่ากุ้งที่มีปริมาณทองแดงในพลาสมาต่ำ เนื่องจากทองแดงเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน ซึ่งเป็นรงค์วัตถุเกี่ยวกับการหายใจ (Cuzon *et al.*, 2004) การที่กุ้งได้รับอาหารเสริมทองแดง 200 mg/kg มีปริมาณทองแดงในพลาสมาต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดง 150 mg/kg ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการสะสมทองแดงที่กุ้งได้รับในอาหารมากเกินไป โดยกุ้งจะขับทองแดงส่วนเกินจากการสร้างฮีโมไซยานินออก เพื่อรักษาสมดุลภายในร่างกาย จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณทองแดงในพลาสมามีปริมาณต่ำกว่าปริมาณสูงสุดที่กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้พบในอาหาร โดยคำนึงถึงความปลอดภัยและต้องไม่เกินค่าสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (Thai RDI) สามารถบริโภคอาหารที่มีทองแดงได้วันละ 2 มิลลิกรัม แต่ไม่เกิน 3 มิลลิกรัมต่อวัน โดยการทดลองของ Mendez *et al.* (2001) พบว่า ปริมาณทองแดงในกล้ามเนื้อของกุ้งจะมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณทองแดงที่พบในตับ โดยที่ปริมาณทองแดงในตับและในเลือดจะปริมาณใกล้เคียงกัน การที่ปริมาณทองแดงในกล้ามเนื้อมีปริมาณน้อยกว่าในเลือดนั้น แสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดงจากการทดลองนี้ จะมีปริมาณทองแดงในพลาสมากุ้งขาวอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค

จากการทดลองเลี้ยงกุ้งที่ระดับน้ำที่มีความเค็ม 10 ppt ถือว่าเป็นการเลี้ยงกุ้งที่ระดับความเค็มต่ำ การที่จะเลี้ยงกุ้งอยู่ในสภาวะความเค็มไม่เหมาะสมนั้นจะส่งผลกระทบต่อแรงดันออสโมติกของกุ้ง ก่อให้เกิดความเครียดและลดความต้านทานโรคลง ในการเลี้ยงกุ้งความเค็มน้ำต่ำนั้น โปรตีนถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากกุ้งต้องการที่จะใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงาน เพื่อใช้ในการปรับความสมดุลของแร่ธาตุภายในร่างกาย และในกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งในการเลี้ยงกุ้งที่ระดับความเค็มน้ำต่ำนั้นยังส่งผลให้ความเข้มข้นของทองแดงในเลือดมีค่ามากกว่าที่ระดับน้ำความเค็มสูง เนื่องจากกุ้งใช้พลังงานมากขึ้นในการควบคุมสมดุลเกลือแร่ จึงจำเป็นที่ต้องนำ

ทองแดงเข้าสู่ระบบเลือดเพื่อไปใช้ในขบวนการหายใจซึ่งสัมพันธ์กับการจับออกซิเจน และเกี่ยวข้องกับการนำออกซิเจนมาใช้ในกิจกรรมภายในเซลล์ด้วย (Lee and Shiau, 2002) จากการที่กุ้งใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ ในสภาพดังกล่าวนี้สัตว์อาจจะมีกลไกการขับกรดอะมิโน (amino acid) ออกนอกเซลล์หรือการสูญเสียจากเซลล์เข้ามาเก็บในเลือดอยู่ในรูปโปรตีนหรือมีการสลาย (dissolution) ของสารอินทรีย์และอนินทรีย์จากเปลือกเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อช่วยเพิ่มระดับออสโมลานิตีภายในเลือด (Mangum and Johansen, 1975)

5. การทนทานต่อการขาดออกซิเจน

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า การเสริมทองแดงในอาหารช่วยให้กุ้งสามารถทนต่อสภาวะขาดออกซิเจนได้เป็นระยะเวลาที่นานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่จะเห็นได้ว่า กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดงสามารถทนต่อสภาวะที่ขาดออกซิเจนได้ดีกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมทองแดง การที่กุ้งได้รับอาหารเสริมทองแดง 200 mg/kg ลงไปในอาหารนั้นอาจทำให้กุ้งได้รับทองแดงมากเกินพอเพื่อเก็บในร่างกายกุ้ง การที่กุ้งมีธาตุทองแดงสะสมอยู่อย่างมากพอ ทำให้กุ้งสามารถนำออกซิเจนสำรองที่อยู่ภายในรงค์วัตถุที่ใช้ในการหายใจ (respiratory pigment) (Vernberg, 1971) มาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกุ้งจะตอบสนองต่อการลดลงของปริมาณออกซิเจนมากกว่าที่จะตอบสนองต่อความต้องการปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น (Mc.Mahon and Wilkens, 1983) การปรับตัวตอบสนองภาวะการขาดแคลนออกซิเจนนั้นเป็นการปรับตัวของระบบหมุนเวียนโลหิต และระบบระบายน้ำผ่านเหงือก ตลอดจนระบบลำเลียงออกซิเจน การปรับตัวอย่างฉับพลันเกิดขึ้นด้วยการเพิ่มปริมาณน้ำให้ไหลผ่านเหงือกมากขึ้นเพื่อให้สอดคล้องกับการที่ออกซิเจนลดปริมาณลงในแต่ละหน่วยปริมาตรของน้ำ การเคลื่อนที่หรือว่ายน้ำของกุ้งเป็นการตอบสนองในรูปแบบหนึ่งที่สามารถทำให้ปริมาณน้ำไหลผ่านเหงือกมากขึ้น ระดับการตอบสนองนี้อาจจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสภาวะการขาดแคลนออกซิเจนรวมทั้งพลังงานที่สูญเสียไปในการเคลื่อนที่นั้น ซึ่งพลังงานที่สูญเสียไปมีปริมาณมากและเป็นข้อจำกัดของการปรับตัวในลักษณะนี้เนื่องจากผลลัพธ์ของการสูญเสียพลังงานไปมากจะย้อนกลับมาเป็นความต้องการบริโภคออกซิเจนเพิ่มขึ้นในขบวนการเมตาบอลิซึมที่สูงขึ้นนั่นเอง

ดังนั้นถ้าปริมาณออกซิเจนในน้ำยังลดลงต่ำลงกว่าเดิมต่อไปอีก กลวิธีการปรับตัวของกุ้งจะต้องเปลี่ยนไปเป็นการสงวนพลังงานโดยหยุดการเคลื่อนไหว ซึ่งในระยะเวลาต่อมาอาจจะเริ่มใช้ออกซิเจนสำรองจากแหล่งกักตุนภายในร่างกาย เช่น จากฟองอากาศของรงค์วัตถุที่ใช้ในการหายใจ (Vernberg, 1971) หรือเริ่มดึงพลังงานจากเนื้อเยื่อออกมาโดยกระบวนการ anaerobic respiration เพื่อรักษาชีวิตไว้ก่อน ขบวนการปรับตัวทั้งหมดน่าจะเป็นไปตามนี้ เมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างระดับการบริโภคออกซิเจนกับปริมาณออกซิเจนของกุ้ง เช่น กุ้งกุลาดำ (จารุวัฒน์ นภีตะภัฏ และสมนึก กบิลรมย์, 2529)

การที่กุ้งได้รับอาหารที่เสริมทองแดงสามารถช่วยกระตุ้นให้กุ้งมีระดับออกซิเจนภายในระบบเลือดสูงมากขึ้น จึงน่าส่งผลทำให้ความเข้มข้นของออกซีฮีโมไซยานินสูงขึ้นกว่าชุดควบคุมและเมื่อเลี้ยงนานขึ้นก็ส่งผลให้มีออกซีฮีโมไซยานินเพิ่มขึ้นตามลำดับ แสดงว่ากุ้งมีการเพิ่มประสิทธิภาพการลำเลียงออกซิเจน (oxygen-carrying capacity) ในเลือดดีขึ้น (Taylor and Anstiss, 1999; Cheng et al., 2003) รวมถึงเป็นการกระตุ้นการใช้ออกซิเจน (oxygen uptake) (Li et al., 2008) ชี้ให้เห็นว่ากุ้งชุดทดลองมีข้อได้เปรียบทางสรีระร่างกายหลายประการด้วยเหตุผลข้างต้น นอกจากจะทำให้กุ้งทนทานต่อการสลบในสภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) มากกว่าชุดควบคุม และทนต่อระดับออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำสุดมากกว่า จึงเป็นข้อได้เปรียบของการเลี้ยงกุ้งซึ่งมีโอกาสสูงใน

การเผชิญกับสภาวะการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน (acute hypoxia) และการขาดออกซิเจนเรื้อรัง (chronic hypoxia) กล่าวคือกุ้งที่ได้รับการเสริมทองแดงมีความทนทานมากกว่าและลดความเสี่ยงจากการเสียหาย เพราะว่าการเลี้ยงกุ้งช่วงเดือนที่ 3 และ 4 นั้นสภาพพื้นบ่อเริ่มมีการหมักหมมมาก โอกาสที่กุ้งมีสภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลันสูงโดยเฉพาะช่วงเช้ามืด หรือโอกาสการขาดอย่างเรื้อรังมีค่อนข้างมาก ข้อเท็จจริงของการดำเนินการให้มี DOสูงกว่า 5 mg/l ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น (Cheng et al., 2003) เนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตและทางสรีระเคมีของกุ้งนั้น เป็นเรื่องที่ไม่ง่ายนักในสภาพการเลี้ยงจริงของเกษตรกรของประเทศไทย เนื่องจากการจัดการ DOยังอยู่ในความสนใจเพียงเกษตรกรบางกลุ่ม เกษตรกรจำนวนมากยังขาดความเข้าใจเรื่องความสำคัญและปัจจัยจำกัดของออกซิเจนต่อการเจริญเติบโต ดังเช่นพบว่าหาก DO ต่ำกว่า 2 mg/l จะมีผลทำให้กุ้งขาว (*L. vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ลดลง (Seidman and Lawrence, 1985) รวมทั้งการบริโภคออกซิเจน (oxygen consumption) ของกุ้ง Chinese (*Fenneropenaeus chinensis*) มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อระดับ DO แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความหนาแน่นของการเลี้ยงกุ้ง (Li et al., 2006) หากเกิดสภาวะการขาดออกซิเจน (hypoxia) ยังส่งผลการหายใจ (Rosas et al., 2002; Wu et al., 2002) ความดันออสโมติค (Charmantier et al., 1994; Cheng et al., 2003) ความถี่ของการลอกคราบ (Clark, 1986) มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการรอดในที่สุดในกุ้ง penaeid (Seidman and Lawrence, 1985; Aquacop et al., 1988; Allan and Maguire, 1991)

สรุปผลการทดลอง

1. การเสริมทองแดงในอาหารไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว
2. อัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดงต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารไม่เสริมทองแดง
3. อาหารเสริมทองแดงไม่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งขาว
4. ความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาผันตามระดับทองแดงในอาหาร
5. กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมทองแดง 150 mg/kg สามารถทนในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำที่สุดและเป็นระยะเวลานานที่สุด

เอกสารอ้างอิง

บุญรัตน์ ประทุมชาติ, บัลลังก์ เนื่องแสง, ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, 2546. ผลของการเสริมเกลือแร่ในอาหารและการเปลี่ยนแปลงสรีรเคมีของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงระบบพัฒนา. ชลบุรี: รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา 90 หน้า

บุญรัตน์ ประทุมชาติ อรสา สุริยาพันธุ์ กิตติยา อุปถัมภ์ สว่างพงศ์ สมมาตร 2551. กระบวนการสะสมแร่ธาตุของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และประยุกต์การเสริมแร่ธาตุในระบบอนุบาลและการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา 78 หน้า

Allan, G.L. and Magurire, G.B., 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. Aquacul 94, 27–37.

Aquacop, Bedier, E. and Soyez, C., 1988. Effects of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. J. World Aquac. Soc. 19, 14A.

Charmantier, G., Soyez, C., and Aquacop, 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178, 233–246.

Cheng, W., Liu, C.H., and Kuo, C.M., 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture 220, 843–856.

Claybook, D.L.1983. Nitrogen metabolism: In The biology of Crustacea Vol 5 Internal Anatomy and Physiological Regulation Mantel L.H. (Ed.) Academic Press, New York, p. 163-213.

Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., and Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* rared in tanks or in ponds. Aquacul, 235, 513-551.

Dallinger, R. 1977. The flow of copper through a terrestrial food chain. III. Selection of an optimum copper diet by isopods. Oecologia 30, 273-277.

Davis, D.A. and Lawrence A.L. 1997. Minerals : In Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture Vol 6. D'Abramo L.R. et al. (Eds) P. 150-163.

Frias-Espericueta, M.G., Voltolina, D. and Osuna-Lopez, J.I. 2003. Acute Toxicity of Coper, Zinc, Iron, and Manganese and of the Mixtures Copper-Zinc and Iron-Manganese to Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae. Env Contamination and Toxicol., 71, 68-74.

Lee, P. G., and Lawrence, A. L. 1997. Digestibility. In Crustacean nutrition advances in world aquaculture. Vol. 6. D' Abramo, L. R., Conklin, D. E., & Akiyama, D.M. (Eds.) (p. 194-260). The World Aquaculture Society, the United States of America.

Lee, M. H. and Shiau, S. Y., 2002. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon* , and effects on non-specific immune responses. Fish Shellfish Immunology., 13, 259-270.

Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X. and Qin, J.G. 2008. Comparaison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhaemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquacul. 274, 80–86.

Lin. Y.H., Shie. Y.Y. and Shiau. S.Y., 2008. Dietary copper requirement of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquacul., 274, 161-165

Mangum, C. P. 1989. Oxygen transport in the blood. In The biology of Crustacea Vol 5 Internal Anatomy and Physiological Regulation Mantel L.H. (Ed.) Academic Press, New York, p. 373-430.

Mangum, C. P., and Johansen, K. (1975). The colloid osmotic pressures of invertebrate body fluids. *Journal of Experimental Biology*. 63, 661-671.

Mangum, C.P. and Johansen, K. 1975. The colloid osmotic pressures of invertebrate body fluids. J. of Exp. Biol. 63, 661-671

Mc Mahon, B. R. and Wilkens, J. L., 1983. Respiratory and circulatory response to hypoxia in lobster *Homarus americanus*. J of Exp Biol., 62, 637-655.

Mendez, L., Racotta, I.S., Acosta, B. and Rodriguez-Jaramillo, C. 2001. Mineral concentration in tissues during ovarian development of the white shrimp *Penaeus vannamei* (Decapod : Penaeidae). Mar Biol.., 138, 687-692

O'Dell, B.L. 1976. Biochemistry of copper. Symposium on trace elements. Medical Clinicals of North America 60, 697-703.

Pouliot, T., and de la Noue, J. 1989. Feed intake, digestibility and brain neurotransmitters of rainbow trout under hypoxia Aquacul 79, 317-327.

Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Pakkong, P., and Machado, J. (2002b). Organic and inorganic variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). *Comp Biochem and Physiol. Part A.* 131, 243-255.

Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., and Soto, L.A., 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 234 (1), 41–57.

Seidman, E.R. and Lawrence, A.L., 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. J. World Maric. Soc. 16, 333–346.

Taylor, H.H. and Anstiss, J.M., 1999. Copper and haemocycanin dynamics in aquatic invertebrates. Mar. Freshw. Res. 50, 907-931.

Truchot, J. P. 1973. Fixation et transport de l' oxyge'ne par le sang se *Carcinus maenas*: variation en rapport avec diverses conditions de tempe'rature et de salinite' Netherland Journal of Sea Research. 7, 482-495.

Vernberg, F.J., 1971. Dissolved Gas-Animals. In :O, Kinne (Ed.), Marine Ecology Vol. I Part 3 Environmental Factors. London : Wiley-Interscience, 1491-1526.

Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., and Wan, K.L., 2002. Tolerance to, and avoidance of hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*). Environ. Pollut. 118, 351–355.