

ชื่อโครงการ ผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีและเนื้อเยื่อปูทะเล  
Effects of Salinity on Osmolality and Histology Changes of  
Mud Crab (*Scylla* sp.)

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2554

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 20,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2554

ผู้ดำเนินการวิจัย นายสมชาย หวังวิบูลย์กิจ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

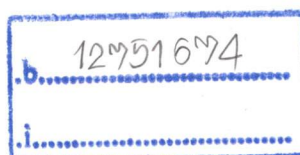
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH

ที่ 2412

2554

สาขา.....  
เลขทะเบียน 141515  
หนังสือ.ปี 16 อ.ก. 2559



## ผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีและเนื้อเยื่อปูทะเล

### บทคัดย่อ

การศึกษารูปแบบของระดับความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีในเลือด และพยาธิสภาพของปูทะเล หลังจากปรับความเค็มน้ำ 30 ppt เป็น 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt แล้วเลี้ยงปูทะเลเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ  $28.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ผลการศึกษาพบว่าปูทะเลมีการปรับออสโมลิตีในเลือดเพิ่มขึ้นเมื่อออสโมลาลิตีในน้ำเพิ่มขึ้น โดยมีค่าออสโมลาลิตีในเลือดแต่ละระดับความเค็มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และมีค่า iso-osmotic point เท่ากับ  $1.031 \pm 0.004$  mOsm/kg ที่ระดับความเค็ม 35 ppt ผลการศึกษารูปแบบพยาธิสภาพของปูทะเล พบว่า ระดับความเค็มน้ำที่น้อยกว่า 15 ppt และมากกว่า 40 ppt เป็นสาเหตุทำให้ epithelium และ pillar cells ของเหงือกผิดปกติ และเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวน R-cell และ B-cell ใน hepatopancreas จากผลการศึกษาออสโมลาลิตีในเลือด พยาธิสภาพของเหงือกและ hepatopancreas ความเค็ม 20-35 ppt เป็นความเค็มที่เหมาะสมในการเลี้ยงปูทะเล

คำสำคัญ: ปูทะเล ความเค็ม ออสโมลาลิตี พยาธิสภาพ

**Effects of salinity on osmolality and histological changes of mud crab  
(*Scylla* sp.)**

**Abstract**

The effect of salinity levels were investigated on haemolymph osmolality and histology of mud crab (*Scylla* sp.), cultured in salinity levels after they were acclimated to 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 ppt from 30 ppt for 7 days at  $28.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . The result showed that haemolymph osmolality of mud crab increased with increased salinity. They were significantly different ( $P < 0.05$ ). The iso-osmotic point was  $1.031 \pm 0.004$  mOsm/kg at 35 ppt. The result of histology of mud crab in salinity, less than 15 ppt and more than 40 ppt caused abnormal epithelium and pillar cells of gill, the number of R-cell and B-cell change in hepatopancreas. The results of haemolymph osmolality and histology of gill and hepatopancreas of mud crab indicated that salinity range of 20-35 ppt were suitable for mud crab culture.

**Keywords:** mud crab, salinity, osmolality, histology

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลองและวิจารณ์	18
สรุป	22
เอกสารอ้างอิง	23

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ออสโมลาลิตีของปูดำ ( <i>Scylla</i> sp.) ที่เลี้ยงในแต่ละระดับ ความเค็ม	18

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงผลการปรับระดับของความเค็มที่ส่งผลต่ออัตราเมทาบอลิซึม	6
2	แสดงผลออกซิโมลาลิตีที่ส่งผลต่อการปรับค่าความเค็ม	7
3	ชนิดปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในพลาสมาปูที่สภาพแวดล้อมมีความเค็มต่างกัน	8
4	แสดงผลออกซิโมลาลิตีที่ส่งผลต่อการปรับค่าโปรตีน	9
5	แสดงผลโซเดียมและคลอไรด์ต่อการปรับค่าความเค็มในเลือดปูทะเล	11
6	แสดงผลแมกนีเซียมและแคลเซียมต่อการปรับค่าความเค็มในเลือดปูทะเล	12
7	การเปลี่ยนแปลงออกซิโมลาลิตีของปูทะเล ( <i>Scylla</i> sp.) ที่เลี้ยงในแต่ละระดับความเค็มต่างๆ	19
8	เนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเลที่เลี้ยงในละระดับความเค็ม 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt	20
9	เนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่เลี้ยงในละระดับความเค็ม 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt	21

## คำนำ

ปูทะเล *Scylla* sp. อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเค็มและน้ำกร่อยของไทยพบมากบริเวณชายฝั่ง ทั้งอ่าวไทยภาคตะวันออกบริเวณจังหวัด จันทบุรี ตราด ระยอง และ ชลบุรี ฝั่งอันดามันพบบริเวณ จังหวัด ระนอง กระบี่ พังงา และสตูล ความอุดมสมบูรณ์ของปูทะเลในแหล่งน้ำธรรมชาติมีปริมาณ ที่ลดลงเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น การทำการประมงมากเกินไป การทำประมงผิดวิธี ปัญหาด้านความเค็มซึ่งพบว่าปัจจุบันความเค็มเปลี่ยนแปลงผิดฤดูกาล และ ปัญหาจากมลภาวะ ต่างๆ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงปูทะเล *Scylla* sp. เพื่อชดเชยจากธรรมชาติ ได้มีการพัฒนาการขึ้นมา ตามลำดับทำให้การเลี้ยงปูทะเลเป็นอาชีพหนึ่งซึ่งทำรายได้ให้แก่ผู้ประกอบการ ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเลี้ยงปูทะเลคือคุณภาพน้ำ เนื่องจากปูทะเลเป็นปูที่อาศัยอยู่บริเวณที่ระดับความเค็ม ของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา การศึกษาการเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีของปูทะเลที่เลี้ยงใน ความเค็มต่างกันจึงอาจเป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงปูทะเล

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีของปูทะเลที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆ
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเนื้อเยื่อปูทะเลที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆ

## การตรวจเอกสาร

### 1. ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

ชื่อวิทยาศาสตร์

อนุกรมวิธาน

Phylum Mollusca

Class Crustacea

Family Portunidae

Genus *Scylla*

ปูทะเลมีส่วนประกอบของโครงสร้างส่วนหัวกับอกรวมกันเรียกว่า cephalo thorax ส่วนนี้จะมีกระดองห่อหุ้มไว้ ลักษณะภายนอกที่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน คือ ลำตัวของปูได้วิวัฒนาการโดยเปลี่ยนแปลงไปเป็นแผ่นบางๆ เรียกว่า "จับปิ้ง" พับอยู่ใต้กระดอง จับปิ้งเป็นอวัยวะที่ใช้เป็นที่คุ้มพุงไข่ของแม่ปู (ในระยะเวลาที่มีไข่ในอกกระดอง) นอกจากนี้ยังเป็นอวัยวะที่ใช้แยกเพศได้อีกด้วย กล่าวคือ ในเพศเมียจับปิ้งจะมีลักษณะกว้างปลายมนกลมกว่าเพศผู้ ซึ่งมีรูปเรียวยาวและแคบ กระดองของปูทะเลมีลักษณะเป็นรูปไข่และมีหนามเรียงจากตาไปทางด้านซ้าย-ขวาของกระดอง ด้านละ 9 อัน ตาของปูทะเลเป็นตาธรรมประกอบด้วยตาเล็กๆ เป็นจำนวนมากมีความรู้สึกไวต่อสิ่งเคลื่อนไหวอยู่รอบตัวและยังมีก้านตาช่วยในการชูลูกตาออกมาภายนอก และหดกลับเข้าไปได้ทำให้มันมองเห็นสิ่งต่างๆ รอบตัวได้อย่างดียิ่งขึ้นปูทะเลมีขา 5 คู่ ขาคู่แรกอยู่หน้าสุดมีขนาดใหญ่มากเป็นพิเศษเรียกว่า "ก้ามปู" ปลายก้ามปูแยกออกเป็น 2 ง่ามมีลักษณะคล้ายคีมใช้จับเหยื่อกินและป้องกันตัว ปลายสุดของขาคู่ที่ 2-4 มีลักษณะแหลมเรียกว่า "ขาเดิน" เพราะทำหน้าที่ในการเดินเคลื่อนที่ ส่วนขาคู่ที่ 5 ซึ่งเป็นคู่สุดท้ายเรียกว่า "ขาว่ายน้ำ" ตอนปลายสุดของขาคู่นี้มีลักษณะแบนคล้ายใบพาย ซึ่งธรรมชาติสร้างมาไว้เพื่อความสะดวกในการว่ายน้ำปูทะเล มีเลือดสีฟ้าใสๆ มีสารประกอบพวกทองแดงปนอยู่ในเลือดเมื่อได้รับบาดเจ็บ เช่นกระดองแตก หรือก้ามหลุด เลือดใสๆ จะไหลออกมา มีลักษณะข้นๆ เมื่อโดนความร้อนจะกลายเป็นสีขาวขุ่นคล้ายครีมสำหรับอวัยวะภายในทั้งหมด ได้แก่ หัวใจ กระเพาะอาหาร ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ ฯลฯ จะรวมกันอยู่ภายในกระดอง (วิสันต์, 2532)

ปูทะเลพบกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำกร่อย ป่าชายเลน และปากแม่น้ำที่มีน้ำทะเลท่วมถึงโดยชุกชุมอยู่ตามใต้รากไม้หรือซอกหินบริเวณชายฝั่งทะเลทั้งฝ่ายอ่าวไทยและอันดามัน โดย

เฉพาะที่ชุกชุมในบริเวณที่เป็นหาดโคลนหรือเลนที่มีป่าแสม และโกงกาง ตั้งแต่อำเภอไทยฝั่งตะวันออก อันได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ชลบุรีบริเวณอ่าวไทยตอนใน ได้แก่ สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงครามและ อ่าวไทยฝั่งตะวันตกมีชุกชุมที่จังหวัดชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง ฝั่งอันดามันพบบริเวณจังหวัดระนอง กระบี่ พังงา และสตูล เป็นต้น (รักษา, 2532)

## 2. การลอกคราบ

การลอกคราบของพวกครัสเตเชียจะเกิดขึ้นตลอดชีวิต (Barnes, 1980) โครงสร้างของเปลือกปูสามารถแบ่งออกเป็นชั้นๆ ประกอบด้วย

ผิวหนังนอก (epidermis) เป็นชั้นที่มีเซลล์ขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ประกอบด้วยรงควัตถุ (chromatophore) ทำให้เซลล์มีสี ผิวหนังนอกตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane)

เคลือบผิวหนังใน (endocuticle) ชั้นนี้ประกอบด้วยชั้นเยื่อ 3 ชั้น โดยมีชั้นเม็ดสี (pigment layer) อยู่บนสุดติดกับชั้นเคลือบผิว และ ชั้นเยื่อ (membranous membrane) อยู่ล่างสุดติดกับเซลล์ epithelium โดยมีชั้นหินปูนอยู่ตรงระหว่างกลาง

ชั้นเคลือบผิว (epicuticle) เป็นเปลือกที่อยู่ชั้นนอกสุด ประกอบด้วยไลโปโปรตีน (lipoprotein)

การลอกคราบของปูทะเลถ้าพิจารณาจากการสร้างผิวหนังนอก ชั้นเคลือบผิว ชั้นเม็ดสี การถอยกลับของชั้นเม็ดสีและการแยกตัวของเปลือกใหม่และเปลือกเก่าสามารถแบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 กระจกนิ่ม: stage A

เป็นระยะที่ปูลอกคราบกระจกนิ่ม ให้น้ำย่น ลื่น ชั้นเคลือบผิว ชั้นเม็ดสี และชั้นเยื่อต่างๆ จะติดเป็นชั้นเดียวกัน ระยะนี้ปูไม่กินอาหารระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 1.5% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ A-1 (newly molt): กระจกนิ่มมาก น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ขายังไม่แข็ง เคลื่อนที่ไม่ได้ ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 0.5% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ A-2 (soft): กระจกเริ่มแข็ง น้ำหนักตัวคงที่ น้ำหยุดซึมเข้าตัว น้ำในตัวมีประมาณ 86% ระยะนี้ใช้เวลา 1.0% ของการลอกคราบ

ระยะที่ 2 กระจกเริ่มแข็ง: stage B (paper shell)

กระจกนิ่มเริ่มแข็ง (De Fur, 1990) เคลือบผิวชั้นในระหว่างเริ่มการพัฒนาจะมีลักษณะหนาและแข็ง ชั้นเม็ดสีเริ่มมีการกลับสู่เดิม ยังไม่กินอาหาร ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 8.0% ของช่วงการลอกคราบสามารถแบ่งออกเป็นสองระยะ

ระยะ B-1: ชั้นหินปูนของเคลือบผิวชั้นในเริ่มพัฒนา ขาแข็งขึ้น น้ำในตัวมีประมาณ 85% ระยะนี้ใช้เวลา 3.0% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ B-2: ชั้นเม็ดสีถอยกลับ ชั้นหินปูนเริ่มพัฒนากว้างขึ้น ขาและเปลือกเริ่มแข็ง น้ำในตัวมีประมาณ 83% ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 5.0% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะที่ 3 เปลือกแข็ง: stage C (intermolt)

กระดองมีความแข็งเต็มที่ ผิวชั้นนอกของเปลือกสมบูรณ์ชั้นเม็ดสีถอยกลับไปอยู่บริเวณฐานปลายสุดของขน (seate) เก่า ผิวชั้นนอกมีการหดกลับ ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 66% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ C-1: เริ่มมีการกินอาหาร ชั้นเม็ดสีกว้าง ขาต่างๆ แข็งเกือบปกติ ในตัวมีน้ำประมาณ 80% ระยะนี้ใช้เวลา 8.0% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ C-2: ชั้นเม็ดสีกว้างขึ้น ขาต่างๆ แข็ง เปราะง่าย น้ำในตัวมีประมาณ 76% ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 13% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ C-3: ชั้นเม็ดสีกว้างขึ้นมากกว่าระยะที่ C-2 น้ำในตัวมีประมาณ 68% ระยะนี้ใช้เวลา 15% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ C-4: เป็นระยะสุดท้าย การพัฒนาของชั้นเม็ดสีสมบูรณ์ มีการถอยร่นกลับเข้าไป ในระยะนี้ปูกินอาหารปกติ การเคลื่อนไหวว่องไวมาก คุ้ยเริ่มมีการสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ต่างๆ ที่จำเป็นในการลอกคราบ น้ำในตัวมีประมาณ 60% ระยะนี้ใช้เวลา 30% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะที่ 4 ก่อนการลอกคราบ (stage D)

กระดองมีความแข็งเต็มที่ เปลือกสมบูรณ์ เป็นระยะที่ปูสะสมอินทรีย์สารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการลอกคราบ เช่น แคลเซียม เพื่อใช้ในการลอกคราบต่อไป กินอาหารน้อย การเคลื่อนไหวช้ามาก ปริมาณน้ำในตัวมีประมาณ 50-60% ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 24% ของช่วงการลอกคราบ สามารถแบ่งเป็น 4 ระยะย่อยคือ

ระยะ D-1: ผิวชั้นนอกของเปลือกใหม่เริ่มมีการพัฒนา เปลือกใหม่แยกจากเปลือกเก่า ทำให้เกิดชั้นของเปลือกใหม่ขนานไปกับเปลือกเก่า เปลือกที่สร้างใหม่ปริมาณน้ำที่เข้าในตัวระยะนี้คงตัวระยะนี้ใช้เวลา 15% ของการลอกคราบ

ระยะ D-2: ช่องว่างระหว่างเปลือกใหม่และเปลือกเก่ากว้าง ขนบนชั้นเคลือบผิวอันใหม่เริ่มพัฒนาให้เห็นเป็นเส้นเล็กๆ ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 5.0% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะ D-3: เปลือกใหม่มีการพัฒนาสมบูรณ์ เปลือกใหม่แยกจากเปลือกเริ่มแตก น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ใช้เวลาประมาณ 1.0% ของช่วงการลอกคราบ

ระยะที่ 5 ลอกคราบ: stage E (molting)

เป็นระยะที่ปูสลัดกระดองทิ้ง น้ำถูกดึงเข้าตัวอย่างรวดเร็ว ไม่เคลื่อนที่ ไม่กินอาหารเป็นช่วงเวลาที่วิกฤติที่สุดของปูทะเล เพราะอ่อนแออาจถูกสัตว์อื่นทำร้ายหรือกินเป็นอาหารได้ง่ายใช้เวลา 0.5% ของช่วงการลอกคราบ

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการลอกคราบ

### 2.1 ปัจจัยภายนอก

แสง: ถ้าปูอยู่ในสภาพที่มีแสงน้อย ระยะการลอกคราบจะสั้นลงกว่าการได้รับแสงมาก

อุณหภูมิ: อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่ออัตราการลอกคราบและชบวนการควบคุมการลอกคราบทั้งทางตรงและทางอ้อม เพราะอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญพลังงาน กระบวนการลอกคราบของปูจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ

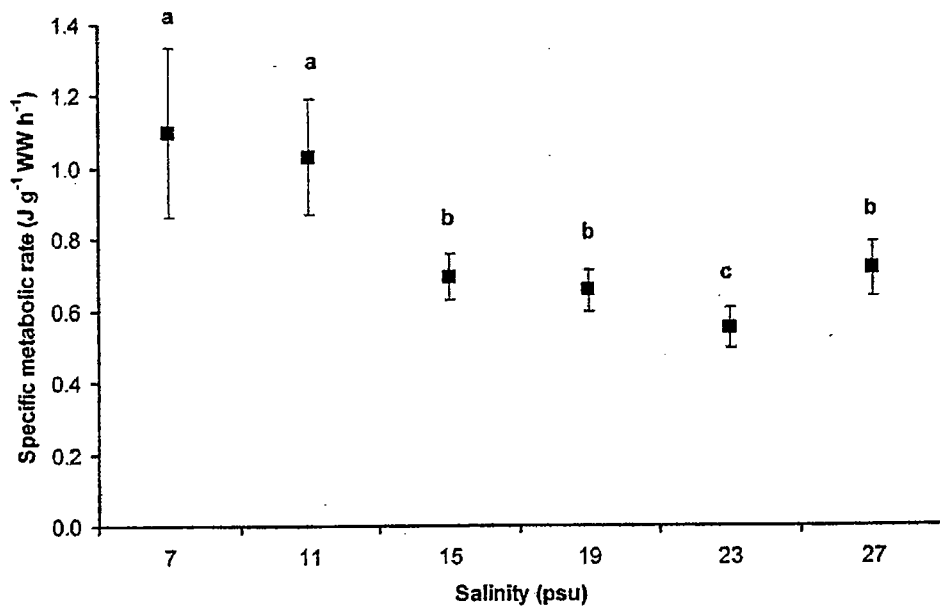
ความเค็ม: ในน้ำที่มีความเค็มสูงจะมีช่วงการลอกคราบที่ยาวกว่าในน้ำความเค็มต่ำ

### 2.2 ปัจจัยภายใน

ปัจจัยภายในที่มีอิทธิพลต่อการลอกคราบของปูคือ ระบบฮอร์โมนในร่างกาย การได้รับการผสมพันธุ์ การมีปรสิตเกาะตามตัวหรือรยางค์ การสูญเสียรยางค์ และการรับอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น (<http://www.crab-trf.com/sea-crab.phb>)

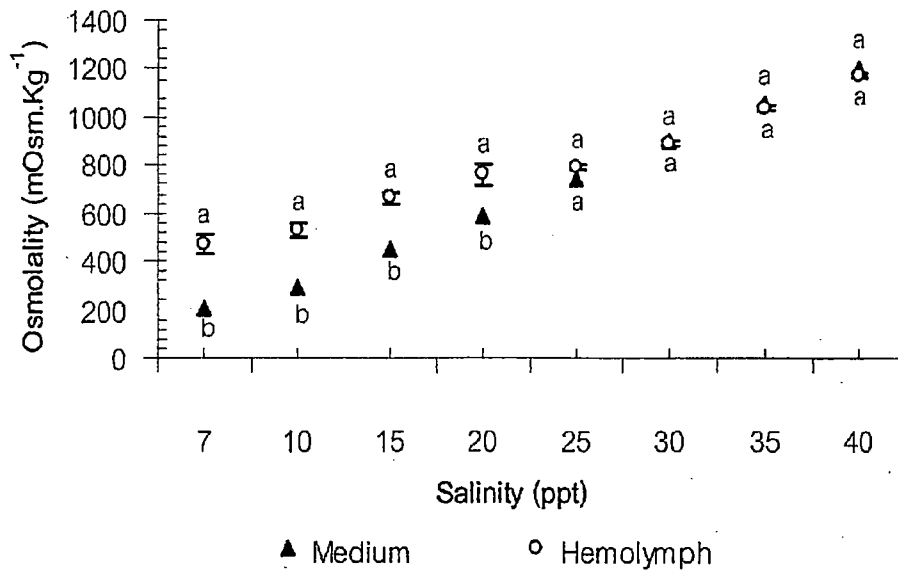
## 3. การปรับระดับของความเค็มที่ส่งผลต่ออัตราเมตาบอลิซึม

สรีรวิทยาของปูทะเลซึ่งมีกลไกในการแลกเปลี่ยนสารที่อยู่ภายในตัวกับสิ่งแวดล้อมภายนอกตัวเพื่อเป็นการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมนั้นได้ จะเกิดขึ้นบริเวณเหงือก จากการศึกษาของ Pratoomchat et al. (2002) เกี่ยวกับความเค็มพบว่าผลต่อกิจกรรม  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  บริเวณเหงือกของปูทะเล ที่ระดับความเค็มต่างๆพบว่า เหงือกเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนไอออนโดยกระบวนการ haemolymph osmolality ในปูทะเลที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมภายนอกตัวมีไซโตเลียมไอออนสูงและภายในเซลล์มีโพแทสเซียมไอออนสูงทำให้ปูทะเลต้องมีการปรับสมดุลร่างกายโดยมีเยื่อหุ้มเซลล์เป็นตัวขนส่งไซโตเลียมไอออนออกภายนอกและดึงโพแทสเซียมไอออนเข้าภายในจากการศึกษา ทดลองกับปูดำที่ระดับความเค็ม 3 ระดับ ที่มีผลต่อค่า haemolymph osmolality โดยปูจะมีการปรับตัวเพื่อให้เหมาะกับการดำรงชีวิต การเปลี่ยนแปลงความเค็มทำให้ปริมาณแอมโมเนียมากขึ้นส่งผลต่อค่า haemolymph osmolality ในเซลล์ เมื่อมีการรบกวนของแอมโมเนียในปริมาณมากจะมาแทนที่โพแทสเซียมซึ่งจะทำให้ชบวนการกลายเป็นการนำไซโตเลียมเข้าภายในและขับแอมโมเนียออกภายนอกและระดับของโพแทสเซียมในกระแสเลือดลดลงทำให้เกิดการสูญเสียการดูดซึมของไอออน



ภาพที่ 1 แสดงผลการปรับระดับของความเค็มที่ส่งผลต่ออัตราเมตาบอลิซึม  
ที่มา: Masui et al. (2003)

นอกจากผลของความเค็มจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมลาลิตีในเลือดยังมีผลต่ออัตราเมตาบอลิซึม (ภาพที่ 2) การเปลี่ยนแปลงปริมาณ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โพลีแซคคาไรด์ แคลเซียม แมกนีเซียม และคลอรันในพลาสมาของปูที่ปรับสภาพภายใต้ความเค็มน้ำ 8 ระดับ (7-40 ppt) พบว่าออสโมลาลิตีและคลอรัน มีค่าแปรผันตามระดับความเค็มโดยมีสภาวะ hyper osmotic, iso osmotic และ hypo osmotic ที่ระดับความเค็มน้ำ 7-29 ppt, 30 ppt และ 31-40 ppt ตามลำดับ ปูดำสามารถควบคุมปริมาณแร่ธาตุได้ดีในช่วงความเค็ม 10-35 ppt และสามารถปรับสภาพ และควบคุมค่าออสโมลาลิตี โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตได้ดีในช่วง 25-40 ppt จากผลการทดลองเสนอแนะได้ว่าช่วงความเค็ม 25-35 ppt น่าจะเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปูดำ (Masui et al.,2003)



ภาพที่ 2 แสดงผลออสโมลาริตีที่ส่งผลต่อการปรับค่าความเค็ม

ที่มา: Mantel and Farmer. (1983)

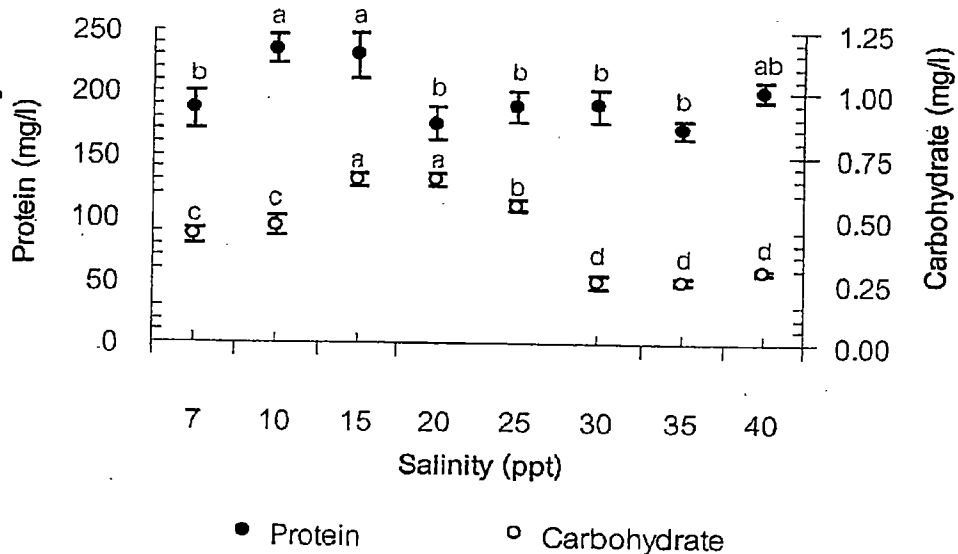
ค่าออสโมลาริตีของเลือดปูดำมีค่าสูงขึ้นแปรผันตามระดับความเค็มน้ำที่เพิ่มขึ้นโดยจะมีค่าออสโมลาริตีในเลือดสูงกว่าค่าออสโมลาริตีของน้ำ (hyper regulation) ที่ระดับความเค็มน้ำ 7 ppt จนถึงระดับความเค็ม 27 ppt จากนั้นค่าออสโมลาริตีในเลือดจะเท่ากับออสโมลาริตีของน้ำ (iso-osmotic point) ที่ช่วง 27-32 ppt หลังจากนั้นเมื่อความเค็มสูงขึ้นปูจะมีการปรับตัวให้มีค่าออสโมลาริตีในเลือดต่ำกว่าค่าออสโมลาริตีของน้ำ (hyposmoregulation) ซึ่งมีพฤติกรรมคล้ายคลึงกับปู *Callinectes sapidus* (Mantel and Farmer, 1983) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าปูดำสามารถรักษาระบบสมดุลเกลือแร่ได้ดีในช่วงระดับความเค็ม 25-35 ppt ในขณะที่ระดับความเค็ม 25 ppt ถึง 10 ppt ปูดำสามารถปรับตัวได้ดีพอสมควร และพยายามรักษาระบบสมดุลเกลือแร่ในร่างกายให้มีความเข้มข้นสูงกว่าภายนอก โดยชี้ให้เห็นว่าค่าออสโมลาริตีในเลือดปูดำสูงกว่าน้ำถึง 2.3 เท่าที่ความเค็ม 7 ppt และมีแนวโน้มไม่อาจจะลดค่าออสโมลาริตีในเลือดไปกว่าระดับนั้นมากนัก คาดว่าไม่น่าจะต่ำไปกว่า 400 mOsm/kg อาจจะสามารถกล่าวได้ว่าความเค็มที่ต่ำกว่านี้จะเป็นจุดวิกฤตในการดำรงชีวิตของปูดำทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างระหว่างค่าออสโมลาริตีในเลือดกับน้ำภายนอกที่มีค่าสูงขึ้น จะส่งผลโดยตรงกับการใช้พลังงานในการรักษาระบบสมดุล และเกิดสภาวะเครียด

โดยทั่วไปแล้วเมื่อปูทะเลเผชิญกับสภาวะความเค็มน้ำต่ำ น้ำภายนอกร่างกายจะเข้าสู่ร่างกายปู ทำให้ความเข้มข้นของแร่ธาตุภายในร่างกายลดลง ปูจึงมีกระบวนการควบคุมการเข้าออกของน้ำเพื่อรักษาระดับสมดุลเกลือแร่และน้ำ (osmotic balance) นอกจากนี้ปูจะมี

กระบวนการดูดกลับแร่ธาตุเข้าสู่ภายในให้เข้าสู่สมดุล โดยมีการลดขนาดของเยื่อเลือกผ่านให้มีขนาดเล็กลง และเพิ่มการเก็บสะสมปัสสาวะเพื่อปรับระดับแรงดันน้ำในร่างกาย (hydrostatic pressure) ให้อยู่ในสภาวะปกติ (Mantel and Farmer, 1983) การใช้พลังงานเพื่อปรับความเข้มข้นของเกลือแร่ในร่างกายให้อยู่ในสภาวะสมดุล ดังกล่าวของปูมีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase โดยกิจกรรมของเอนไซม์  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อสัตว์ถูกย้ายไปสู่ น้ำที่มีความเค็มต่ำ (Mantel and Farmer, 1983) เพื่อควบคุมระดับแร่ธาตุโดยเฉพาะอย่างยิ่ง  $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$

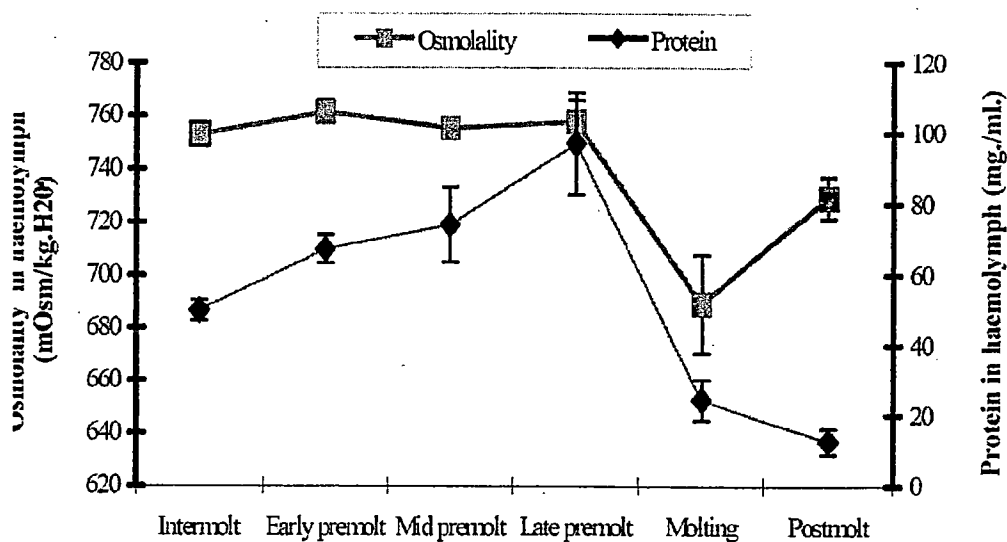
#### 4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในเลือดของปูในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มต่างกัน

ความเข้มข้นของโปรตีนจะมีค่าคงที่ช่วงความเค็ม 20-40 ppt ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีค่าคงที่ช่วงความเค็ม 30-40 ppt (ภาพที่ 4) คาดว่าน่าจะเป็นช่วงความเค็มปกติที่พบในปูม้า ซึ่งปูจะสามารถนำโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต และการสร้างเปลือกใหม่ (sclerotinization) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) เป็นตัวสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกของ Ca (calcification) และจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่เป็นน้ำภายนอกมีความเป็นด่างเล็กน้อย (Pratoomchat et al., 2002)



ภาพที่ 3 ชนิดปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในพลาสมาปูที่สภาพแวดล้อมมีความเค็มต่างกัน  
ที่มา: Mangum and Johansen. (1976)

ความเข้มข้นของโปรตีนจะมีค่าเพิ่มขึ้นที่ความเค็ม 10-15 ppt ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตมีค่าสูงขึ้นเมื่อเผชิญกับความเค็ม 15-25 ppt เนื่องจากปูอยู่ในสภาพน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าร่างกาย (hypomedium) ส่งผลให้ปูมีอัตราเมตาโบลิซึมสูงขึ้นจนเกิด respiratory acidosis ทำให้ของเหลวในร่างกายมีสถานะเป็นกรดเกิดการละลาย (dissolution) โครงสร้างเปลือกซึ่งเป็น chitin-protein ได้กรดอะมิโน และกลูโคสเพื่อนำมาชดเชยการสูญเสียเกลือแร่ และใช้เป็นพลังงานในการปรับสมดุลเกลือแร่ (osmoregulation) ด้วยกระบวนการ active transport เช่นเดียวกับการลดลงของกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อของปู *C. sapidus* ที่ถูกปรับสภาพให้อยู่ในน้ำที่มีความเค็มลดลงจากเดิม 50% (850 mOsm./kg) ซึ่งโดยปกติแล้วมีความคล้ายคลึงกับปูทะเล (*Scylla serrata*) และปูเขี้ยว (*Carcinus maenas*) (Taylor *et al.*, 1977) แต่เมื่อความเค็มลดลงถึง 7 ppt ปูจะมีปัญหาเกี่ยวกับระบบสมดุลเกลือแร่ในร่างกายเนื่องจากมีการลดลงของโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตอย่างมาก ซึ่งน่าจะเกิดจากการเจือจาง (dilution) จากน้ำภายนอก และเกิดการสูญเสียไปกับกระบวนการใช้พลังงานในการรักษาสมดุลเกลือแร่ นอกจากนี้ (Mangum *et al.* 1976) พบว่าปูจะมีการใช้พลังงานเพื่อปรับสภาพความสมดุลเกลือแร่อย่างมากเมื่อความเค็มน้ำภายนอกมีระดับต่ำหรือสูงเกินไป (osmotic stress) ส่งผลให้ระดับ  $\text{NH}_3$  ในเลือดของปู *C. sapidus* (Mangum and Johansen, (1976) เช่นเดียวกับในก้ามเนื้อของปู *Eriocheir sinensis* ที่มีค่าสูงขึ้นอีกด้วย



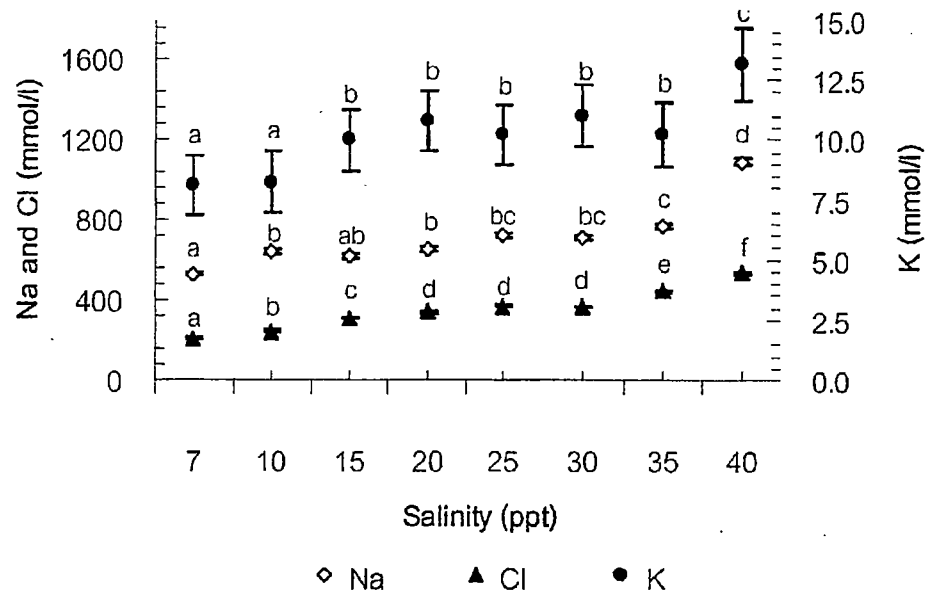
ภาพที่ 4 แสดงผลออสโมลาริตีที่ส่งผลต่อการปรับค่าโปรตีน  
ที่มา: Mangum and Johansen. (1976)

ปูทะเลขนาดความกว้างกระดองเฉลี่ย 71 มิลลิเมตร ระยะคราบแข็ง (stage C) ปรากฏจากก้าม ที่ระดับความเค็มน้ำ 5, 10, 15, 20, และ 25 ppt (และเพิ่ม 30, 35 และ 40 ppt สำหรับ

การศึกษาของออสโมลาลิตี) ระยะเวลา 75 วัน เพื่อทำการตรวจสอบขบวนการลอกคราบอัตราการรอด และการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีของปูทะเล ความเค็มมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไกลโคสอะมิโนไกลแคน ออสโมลาลิตี โซเดียม คลอรีน โปแทสเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส ทองแดง ซีลเฟอร์ และแคลเซียม ในพลาสมาปูทะเล โดยพบว่าเมื่อระดับ ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นตามความเค็มที่เพิ่มขึ้นยกเว้นฟอสฟอรัส โดยแมกนีเซียม ซีลเฟอร์ แมงกานีส ทองแดง และแคลเซียม จะมีค่าลดลงที่ความเค็ม 25 ppt ซึ่งการเพิ่มขึ้นของธาตุ ส่วนมากในเลือดตามความเค็มนั้นส่งผลให้ปริมาณธาตุที่พบในเปลือกเพิ่ม ยกเว้นทองแดง ปูที่ เลี้ยงในน้ำความเค็ม (20-25 ppt) จึงเป็นความเค็มที่เหมาะสมต่อกลไกการสร้างเปลือกและ เนื้อเยื่อของปูทะเล (Masui et al., 2003) ซึ่งพบมีจำนวนปูลอกคราบสูงสุด (100%) ที่ความเค็มน้ำ 20 ppt ขณะที่ปูที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 5 ppt ใช้ระยะเวลาในการลอกคราบ ( $36 \pm 4$  วัน) สั้นกว่าปู ที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 25 ppt ( $47 \pm 4$  วัน) ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าที่ความเค็มที่ต่ำมีส่วนช่วย สนับสนุนการละลายเปลือกเก่าในปูชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม ขนาดปูหลังลอกคราบ และการตายของปู ทะเลของการเลี้ยงทุกระดับความเค็มไม่พบความแตกต่างกัน

##### 5. การเปลี่ยนแปลงปริมาณ โซเดียม โปแทสเซียม และ คลอรีน ในพลาสมา

Na มีค่าความเข้มข้นสูงสุดทุกระดับความเค็มโดยแร่ธาตุที่มีค่ารองลงมา ได้แก่ Cl และ K ซึ่งความเข้มข้นแปรผันตามระดับความเค็มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่าสูงสุดที่ ระดับความเค็ม 40 ppt มีค่าเท่ากับ 1,093 mmol/l, 536 mmol/l และ 13.19 mmol/l ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดอยู่ที่ความเค็ม 7 ppt ซึ่งค่า 531 mmol/l, 208 mmol และ 8.12 mmol/l ตามลำดับรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแร่ธาตุดังกล่าวมีความคล้ายคลึง กับปู *S. serrata* (Pratoomchat et al., 2002) ปู *C. sapidus* (Henry and Cameron, 1982) ปู *Ocyroide quadrata* และปู *C. maenas* (Lovett et al., 2001)

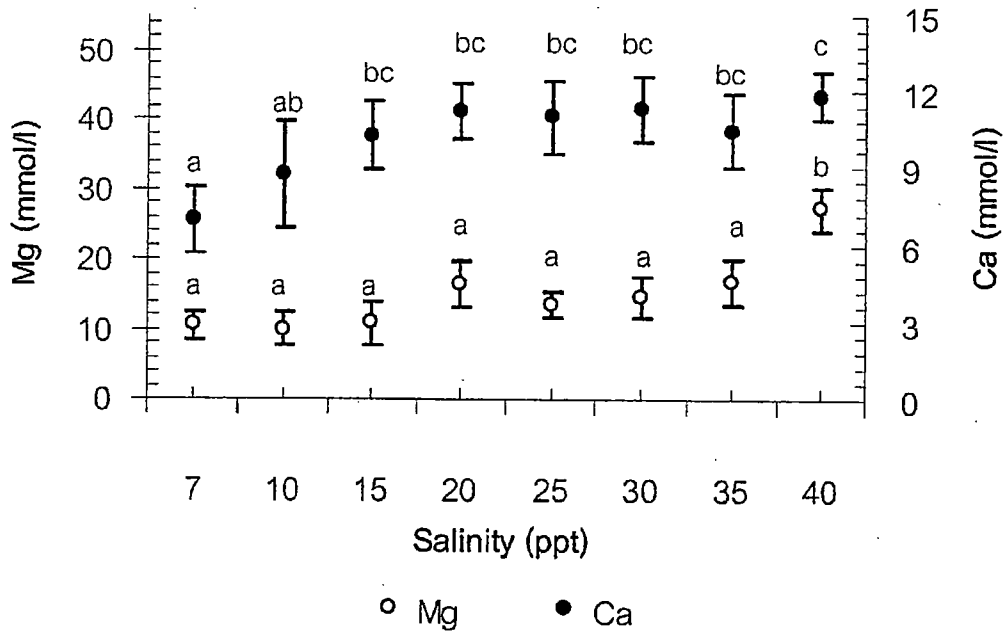


ภาพที่ 5 ผลโซเดียมและคลอไรด์ต่อการปรับค่าความเค็มในเลือดปูทะเล  
ที่มา: Mantel and Farmer (1983)

การเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มนี้จะส่งผลกระทบต่อระบบสรีระ และการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุภายในตัวของครัสเตเชียน รวมถึงการตอบสนองที่เกิดขึ้นจะมีความเหมือนหรือแตกต่างกันนั้นก็ขึ้นกับชนิดของครัสเตเชียนนั้นๆ เป็นที่ทราบกันดีว่า Na และ Cl เป็นองค์ประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดในเลือดของครัสเตเชียน โดยมีปริมาณมากกว่า 90% ของแร่ธาตุทั้งหมด ดังนั้น Na และ Cl จึงจัดเป็น แร่ธาตุที่ช่วยรักษาสมดุลไอออนของเลือด กล่าวคือถ้ามีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของ Na และ Cl ในน้ำก็จะส่งผลให้สมดุลไอออนของเลือดเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Mantel and Farmer, 1983) จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าปูดำมีความสามารถในการควบคุมการรักษาสมดุลของ Cl ได้ดีเนื่องจากมีการปรับค่าความเข้มข้นของ Cl ให้แปรผันตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Cl ในน้ำ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ Na และ K พบว่าปูดำจะพยายามปรับให้คงที่ได้ในระดับหนึ่งในช่วงความเค็ม 25-30 ppt เนื่องจากธาตุทั้งสองชนิดมีความสำคัญต่อกระบวนการปรับสมดุลเกลือแร่ และการนำกระแสประสาท โดยพฤติกรรมดังกล่าวคล้ายคลึงกับปู *Crangon crangon* (Hargerman and Uglow, 1982) และปู *Goniopsis cruentata* (Zanders, 1978) แต่เมื่อความเค็มลดลง หรือเพิ่มขึ้นจากนี้ปูจะปรับสภาพร่างกายให้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำภายนอกตามไปด้วย

### 6. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแมกนีเซียม และแคลเซียมในพลาสมาของปู

ปริมาณของ Mg และ Ca ในพลาสมาปูดำมีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่ระดับความเค็ม 40 ppt คือ 27.16 mmol/l และ 11.85 mmol/l ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณของ Mg และ Ca ที่เพิ่มขึ้นจากระดับความเค็มน้ำ 7-35 ppt และ 10-35 ppt



ภาพที่ 6. ผลแมกนีเซียมและแคลเซียมต่อการปรับค่าความเค็มในเลือดปูทะเล  
ที่มา: Pratoomchat *et al.*, (2002)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าความเค็มน้ำจะมีค่าลดลง หรือเพิ่มขึ้นอย่างไรก็ตามปูจะพยายามรักษาปริมาณความเข้มข้นของ Mg และ Ca ให้คงที่โดยปูดำจะควบคุมระดับ Mg ไม่ให้สูงเกินไปนักเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น และน่าจะรักษาระดับไว้ไม่ให้ต่ำกว่า 10 mmol/l แม้ว่าความเค็มจะลดลงเท่าใดก็ตามที่ปูดำสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า Mg น่าจะเป็นแร่ธาตุที่เป็นปัจจัยจำกัดสำหรับปูดำในการดำรงชีวิต และสรีระเคมีในร่างกาย ในขณะที่ความเค็ม 15-7 ppt ปริมาณ Ca ในพลาสมาจะถูกเจือจาง ทำให้มีค่าความเข้มข้นต่ำลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แม้ว่าปูจะพยายามควบคุมระดับ Ca แต่ปูจะยอมสูญเสีย Ca ได้บ้างเมื่อความเค็มลดลงระหว่าง 15-10 ppt และดูเหมือนว่าจะเริ่มสูญเสียการควบคุมเมื่อความเค็มต่ำลงมาถึง 7 ppt โดยความเค็ม 10-35 ppt ปริมาณของ Ca ไม่น่าจะเป็นปัจจัยจำกัดของปูดำ กล่าวคือ Ca และ Mg เป็นแร่ธาตุหลักในกระบวนการสร้างเปลือก จึงพบว่าเมื่ออยู่ในระบบเลือดน้อย (Pratoomchat *et al.*, 2002) ซึ่งหากมีมากเกินไปจะพยายามขับออกนอกร่างกาย อาจมีการเก็บไว้

ในอวัยวะจำเพาะ โดยมีค่าใกล้เคียงกับครัสเตเชียนชนิดอื่นๆ เช่น *C. sapidus*, *C. magister* และ *C. maenas* (Mantel and Farmer, 1983) กล่าวโดยรวมแล้วการเปลี่ยนแปลงความเค็มส่งผลต่อระบบสมดุลเกลือแร่ในร่างกายปูดำโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเค็มต่ำ เลือดปูดำจะถูกเจือจาง จึงทำให้ระดับของ Na, K, Ca และ Cl ต่ำลง ส่งผลให้ปูดำต้องนำสารอินทรีย์จำพวกกรดอะมิโน และกลูโคสมาใช้เป็นพลังงานอย่างมากจากเปลือกและเนื้อเยื่อ เพื่อควบคุมระบบสมดุลเกลือแร่ในร่างกายให้อยู่ในระดับคงที่ และเหมาะสมกับการดำรงชีวิต อีกทั้งกรดอะมิโน และกลูโคสดังกล่าวยังเป็นการเพิ่มระดับออสโมลาลิตีภายในเลือด (colloidal osmotic pressure) ให้สูงขึ้นอีกด้วย (Mangum and Johansen, 1976) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเคมีของปูดำพบว่าสามารถควบคุมปริมาณแร่ธาตุหลัก 4 ชนิด (Na, K, Mg และ Ca) ได้ดี ในขณะที่ Cl ปูสามารถควบคุมได้ดีที่สุด อาจกล่าวได้ว่าความเค็มที่มีความเป็นไปได้ในการเลี้ยงปูดำน่าจะอยู่ในช่วง 25-35 ppt อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่าออสโมลาลิตี โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตร่วมด้วยแล้ว ระดับความเค็มที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 25-35 ppt เนื่องจากมีค่าความเข้มข้นค่อนข้างคงที่ กล่าวคือปูมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีระเคมีภายในร่างกายค่อนข้างต่ำ สามารถปรับออสโมลาลิตีได้ดีโดยไม่เกิดการสูญเสียพลังงานในการควบคุมสมดุลแร่ธาตุ จึงส่งผลให้สามารถนำพลังงานไปใช้ในการดำรงชีวิต และการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ท่อ PVC ขนาด 4 หุน ยาว 0.88 เมตร จำนวน 24 ท่อน
2. ท่อ PVC ขนาด 4 หุน ยาว 1.08 เมตร จำนวน 12 ท่อน
3. ท่อ PVC ขนาด 4 หุน ยาว 0.38 เมตร จำนวน 12 ท่อน
4. ท่อ PVC ข้อต่อ 90 องศา ขนาด 4 หุน จำนวน 16 ชิ้น
5. ท่อ PVC สามทาง ขนาด 4 หุน จำนวน 8 ชิ้น
6. ท่อ PVC ขนาด 4 หุน ยาว 3 เมตร 2 ท่อน
7. แผ่นผ้าพลาสติก PE ขนาด ยาว 2.16 เมตร กว้าง 1.95 เมตร จำนวน 6 ผืน
8. ดัชนีบนแผ่น PE 50 ตัว
9. ชุดตะกร้าใส่ปุ๋ยจำนวน 25 ตะกร้า
10. ชุดเชื่อมต่อสายออกซิเจน 24 ชุด สายออกซิเจนยาว .30 เมตร จำนวน 48 ท่อน  
หัวทราย จำนวน 48 หัว
11. ชุดกรอง ขวดน้ำดื่มพลาสติกขนาด 750 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 12 ขวด + ฝากรองขนาด  
25 เซนติเมตร ยาว 35 เซนติเมตร จำนวน 12 ชิ้น
12. ชุดเข็มเจาะเลือดขนาด 1 ml จำนวน 30 ชุด
13. สาร โซเดียมซัลเฟต 15 % + ขวด durance 150 ml.
14. ชุดปฏิบัติงานเครื่องวัดออกซิโมลาริตี้+ สารคาลิเบต
15. ไมโครปิเปตขนาด 30-100 ไมโครลิตร
16. กล้องไฟมโสน้ำแข็งเก็บตัวอย่างเลือด
17. ฟอรัมาลิน 10 %
18. เครื่อง salinometer
19. อุปกรณ์ผ่าตัด
20. เครื่อง microtome
21. อ่างลอยชิ้นเนื้อเยื่อ
22. slide warmer
23. classed box
25. เครื่อง automatic processor

## วิธีการ

### แผนการทดลอง

ทำการทดลองเลี้ยงปูที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน 7 ชุดการทดลอง (treatment) แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ (replication) คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ความเค็มของน้ำที่ 10 ppt

ชุดการทดลองที่ 2 ความเค็มของน้ำที่ 15 ppt

ชุดการทดลองที่ 3 ความเค็มของน้ำที่ 20 ppt

ชุดการทดลองที่ 4 ความเค็มของน้ำที่ 25 ppt

ชุดการทดลองที่ 5 ความเค็มของน้ำที่ 30 ppt

ชุดการทดลองที่ 6 ความเค็มของน้ำที่ 35 ppt

ชุดการทดลองที่ 7 ความเค็มของน้ำที่ 40 ppt

น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองได้ผ่านขบวนการ stock นำมาผ่านการกรองแล้วนำมาเจือจางให้ได้ระดับความเค็มต่างๆ

### วิธีการทดลอง

1. เตรียมจัดระบบการทดลองนำท่อ PVC ต่อเป็นทรงลูกบาศก์ขนาดกว้าง .108 เมตร ยาว 0.88 เมตร ลึก 0.38 เมตร ให้ติดกันจำนวน 3 บ่อ เป็นจำนวน สองชุด นำแผ่นผ้า PE มาพับเป็นรูปทรงปริมาตรสี่เหลี่ยมผืนผ้าในแต่ละช่องทั้งหมด 6 บ่อ

2. จัดเตรียมชุดตัวกรองพร้อมจัดระบบออกซิเจนให้ครบทุกบ่อโดยชุดตัวกรองใส่จำนวน 2 ชุด ต่อ 1 บ่อ นำตะกร้าเลี้ยงปูใส่บ่อบ่อละ 2 ชุด รวม 12 ตะกร้า หัวทรายใส่ทุกช่องของตะกร้าเลี้ยงปูพร้อมต่อสายออกซิเจน เตรียมจัดตะกร้า 13 ตะกร้าใส่ในบ่อ stock น้ำที่ความเค็ม 30 ppt

3. เตรียมบ่อ stock น้ำที่ความเค็ม 30 ppt

4. ตรวจสอบคุณภาพน้ำ ค่าความเป็นด่าง, ค่าความเค็ม, อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง

5. เตรียมบ่อพักน้ำที่ความเค็ม 30 ppt นำมาใส่ในบ่อที่ทำเตรียมไว้ทั้ง 6 บ่อ นำปูทะเลมาพักไว้ใน บ่อทั้ง 6 บ่อ ช่องละ 1 ตัว เป็นจำนวน 36 ตัว ปูอีกจำนวน หนึ่งนำใส่ในตะกร้า ที่บ่อ stock ความเค็ม 30 ppt

6. หลังนำปูทะเลมาทำการเลี้ยง 7 วัน ทำการเพิ่มความเค็ม

6.1 บ่อที่ 1 บ่อที่ 2 ทำการปรับค่าความเค็มที่ทำการเลี้ยงเพิ่มเป็น 35 ppt และ 40 ppt ตามลำดับ ทำการเจาะเลือดปู 6 ตัวพร้อมเก็บตัวอย่างปฏมาตอง 3 ตัวของแต่ละค่าความเค็มเพื่อเก็บเนื้อเยื่อที่ 35 ppt และ 40 ppt มาทำสไลด์ถาวร

6.2 บ่อที่ 3 บ่อที่ 4 บ่อที่ 5 และบ่อที่ 6 เพิ่มความเค็มเป็น 25, 20, 15 และ 10 ppt ตามลำดับ ทำการเจาะเลือดปู 6 ตัว พร้อมเก็บตัวอย่างปฏมาตอง 3 ตัว ของแต่ละค่าความเค็มเพื่อเก็บเนื้อเยื่อที่ 25, 20, 15 และ 10 ppt มาทำสไลด์ถาวร

7. ทุกวันของการทดลองควรทำการซักผ้ากรองและเก็บเศษอาหารพร้อมด้วยการกรองเอาตะกอนออกตรวจสอบค่าความเค็มให้ตรงตามการปฏิบัติงานและทุก ๆ 3 วันทำการตรวจสอบค่าความเป็นด่าง การให้อาหารด้วยปลาไหลควรให้ช่วงเวลา 16.00 น.-18.00 น.

8. เตรียมเครื่อง osmolarity พร้อมทั้งคาร์เบตเครื่องทุกครั้งก่อนการปฏิบัติงาน

8.1 ทำการดูดสารโซเดียมซีเตรต 0.1 ml และค่อยๆ ทำการดูดเลือดปูที่บริเวณแอง เลือดปูให้ได้ 0.1 ml และใส่หลอด osmotube ในช่วงการดูดเลือดปูควรแช่ในกล่องโฟมบรรจุ น้ำแข็ง ทุกครั้งที่ทำการวัดค่าออสโมลาลิตี

8.2 ทำการเก็บตัวอย่างปู 3 ตัวของแต่ละความเค็ม แช่สารละลาย formaline 10% เพื่อทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

9. การทำสไลด์เนื้อเยื่อ

9.1 ตัดเนื้อเยื่อเหงือกคู่ที่ 1,3 และ 7

9.2 ตัดเนื้อเยื่อตับ

9.3 ทำการละลายแคลเซียมจากเนื้อเยื่อ 2 ชั่วโมง

9.4 กระบวนการ tissue processor

9.5 หล่อพาราฟินใส่คัตเซตบล็อก

9.6 ตัดเนื้อเยื่อด้วย microtome

9.7 สไลด์วางบน slide warmer

9.8 ทำการย้อมเนื้อเยื่อเหงือกด้วย hematoxylin และ eosin

9.9 ทำสไลด์ถาวรโดยการ mount

**การบันทึกข้อมูล**

1. บันทึกข้อมูลวัดค่า heamolymph ของปฏุกส์ปดาหีนในแต่ละระดับความเค็ม
2. ถ่ายภาพเนื้อเยื่อเหงือกด้วยกล้องจุลทรรศน์ในแต่ละระดับความเค็ม

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์การปรับออสโมลาลิตีของปูที่ความเค็มต่างๆ และลักษณะทางเนื้อเยื่อเหงือก  
ดังนี้

1. เก็บตัวอย่างเลือดปูมาวิเคราะห์วัดค่าออสโมลาลิตีนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติหาค่าความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS
2. นำภาพถ่ายเนื้อเยื่อเหงือกมาเปรียบเทียบกันตามลักษณะในแต่ละระดับความเค็ม

**สถานที่ทำการทดลอง**

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลและคุณภาพน้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง  
สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ระยะเวลาในการทดลอง**

31 ธันวาคม 2553 ถึง 20 มีนาคม 2554

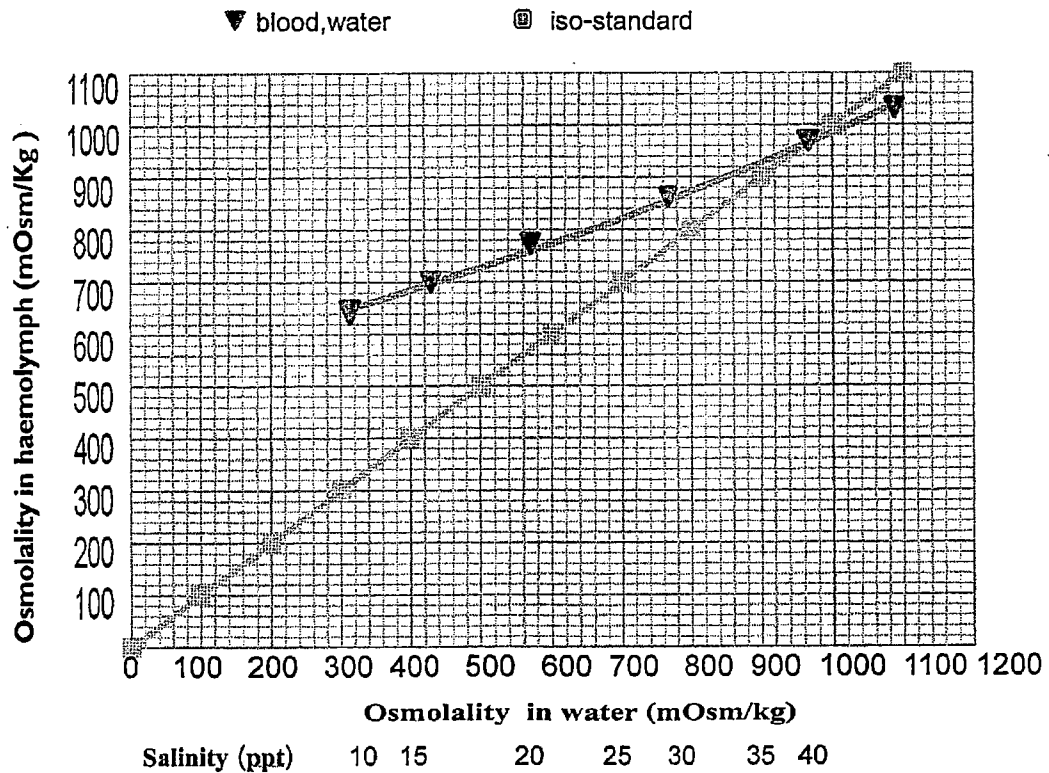
### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การเปลี่ยนแปลงออสโมลาลิตีที่ระดับความเค็มต่างกัน

ค่าออสโมลาลิตีของเลือดปูดำมีค่าสูงขึ้นแปรผันตามระดับความเค็มน้ำที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยจะมีค่าออสโมลาลิตีในเลือด 0.638, 0.720, 0.758, 0.806, 0.8625, 1.0125, และ 1.063 mOsm/kg ตามลำดับ โดยชุดการทดลองที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 40 ppt เป็นกลุ่มการทดลองที่มีค่าออสโมลาลิตีสูงสุดซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มที่เลี้ยงกับระดับความเค็ม 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt เส้นกราฟ 2 เส้นตัดกันระหว่างช่วงความเค็มที่ 37 ppt

ตารางที่ 1 ออสโมลาลิตีของปูดำ (*Scylla* sp.) ที่เลี้ยงในแต่ละระดับความเค็ม

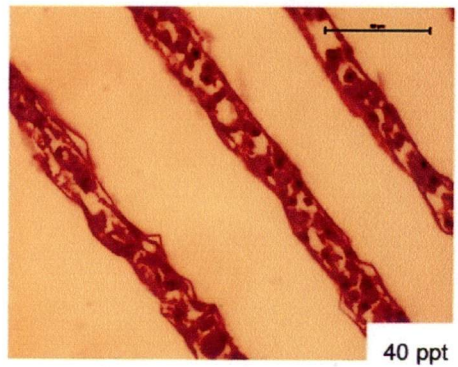
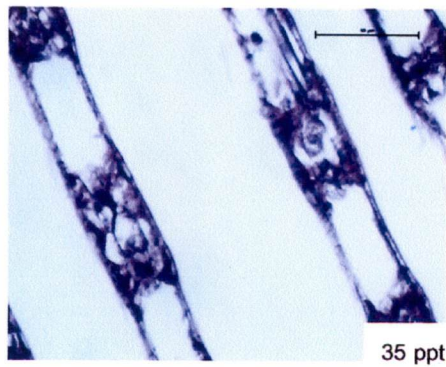
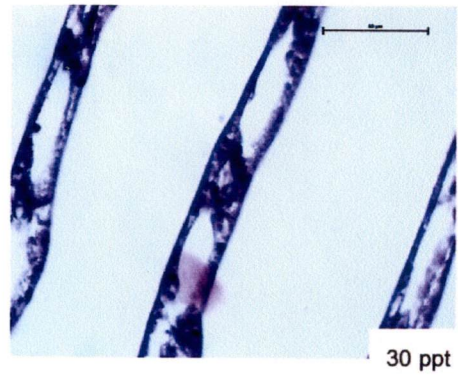
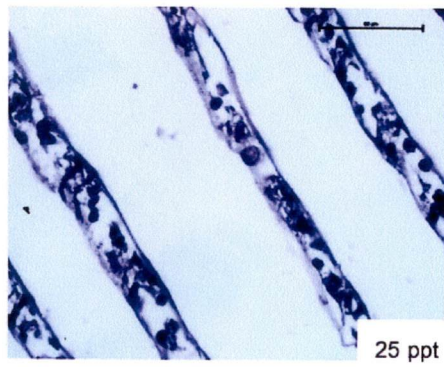
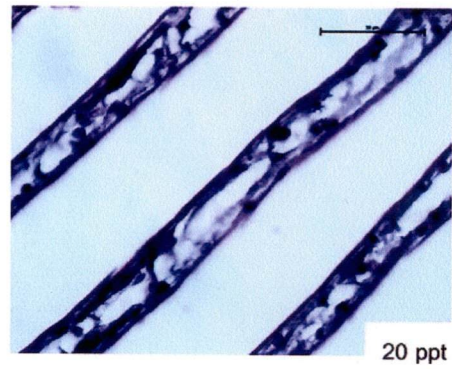
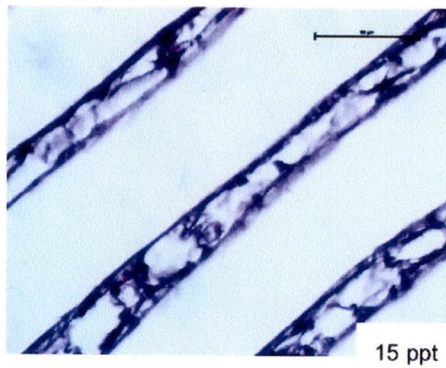
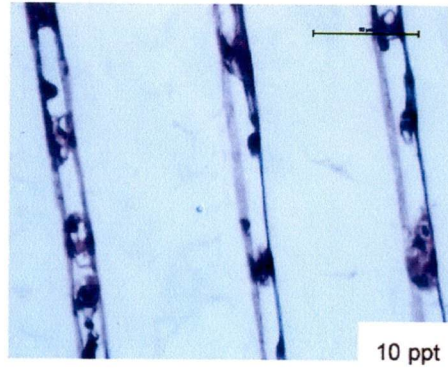
Salinity (ppt)	Blood (mOsm/kg)	Water (mOsm/kg)
10	0.638 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.320 ± 0.004 <sup>a</sup>
15	0.720 ± 0.013 <sup>b</sup>	0.376 ± 0.001 <sup>b</sup>
20	0.758 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.582 ± 0.001 <sup>c</sup>
25	0.806 ± 0.004 <sup>d</sup>	0.756 ± 0.001 <sup>d</sup>
30	0.8625 ± 0.008 <sup>e</sup>	0.853 ± 0.017 <sup>e</sup>
35	1.013 ± 0.009 <sup>f</sup>	0.976 ± 0.023 <sup>f</sup>
40	1.063 ± 0.011 <sup>g</sup>	1.087 ± 0.002 <sup>g</sup>



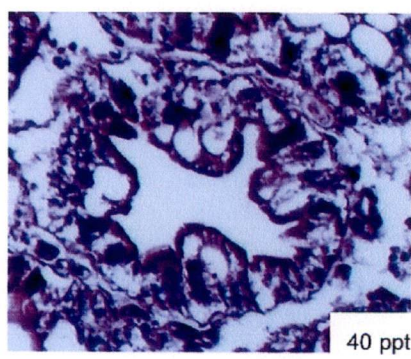
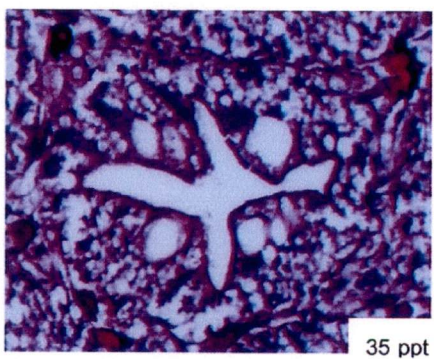
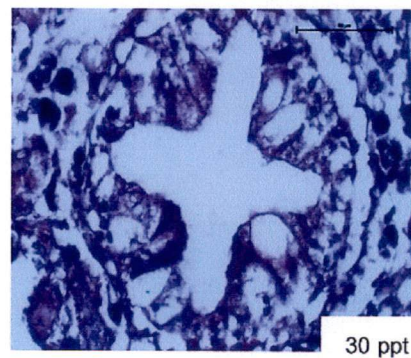
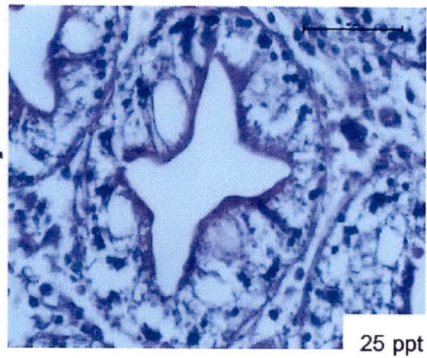
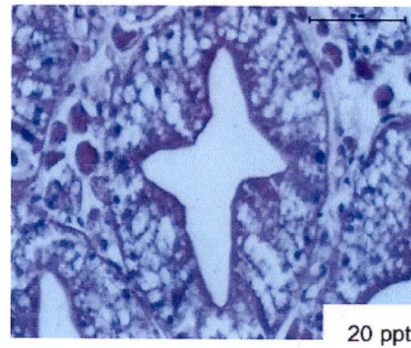
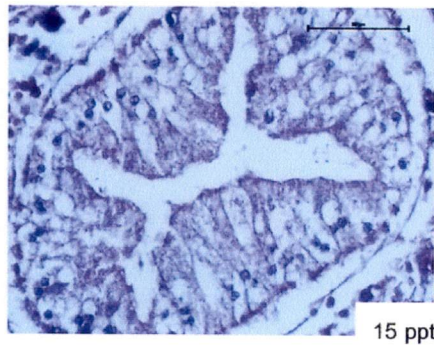
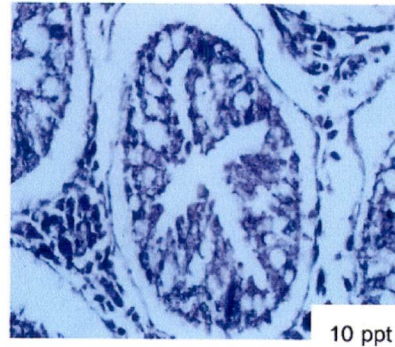
ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงออสโมลาริตีของปูทะเล mud crab (*Scylla* sp.) ที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆ

## 2. เนื้อเยื่อเหงือกและตับของปูทะเล

เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเล พบว่าลักษณะเนื้อเยื่อในระดับความเค็มที่ 10 ppt และ 40 ppt มีความผิดปกติโดย ซีเหงือกมีลักษณะบวมและเชื่อมติดกัน epithelium cell มีความหนาเพิ่มขึ้นส่งผลให้ haemolymph lacuna มีขนาดเล็กลง และมีการพบช่องว่าง septum ระหว่าง epithelium ทำให้พื้นที่ผิวเหงือกลดลงซึ่งมีผลทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจนและการรักษาสมดุลไฮออนในร่างกายผิดปกติซึ่งจะไม่พบในระดับความเค็มที่ 15, 20, 25, 30 และ 35 ppt ลักษณะเนื้อเยื่อ heppatopancreas ที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่ำและระดับความเค็มสูงภายในท่อ heppatopancreas มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีจำนวน R-cell ลดลง แต่จำนวน B-cell เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปูทะเลที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 20-30 ppt (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเลที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt



ภาพที่ 9 เนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt

## สรุป

ออสโมลาลิตีในเลือดปฐะเลมีการเปลี่ยนแปลง เมื่อความเค็มภายนอกเปลี่ยนแปลง โดยมีค่า Iso-osmotic point อยู่ที่ความเค็ม 37 ppt ออสโมลาลิตีที่เปลี่ยนแปลงจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเหงือกและ hepatopancrease ของปฐะเลที่เลี้ยงในระดับความเค็มน้อยกว่า 20 ppt และมากกว่า 30 ppt ดังนั้น ระดับความเค็ม 20-30 ppt เป็นระดับที่เหมาะสมในการเลี้ยงปฐะเลมากที่สุดเนื่องจากจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปฐะเล

## เอกสารอ้างอิง

- รักษา แดงวัฒนกุล. 2532. การเลี้ยงปูทะเล วารสารการประมง, กรุงเทพฯ 201 น.
- วิสันต์ มีสวัสดิ์. 2532. การเลี้ยงปูไข่. เอกสารแนะนำกรมประมง, จังหวัดจันทบุรี. 113-126 น.
- Barnes, R.D 1980. Invertebrate Zoology. Holt –Sauders. Tokyo Japan.
- De Fur, P.L. 1990. Respiration during Ecdysis at low salinity in Blue crab, *Callinectes sapidu* . Aquaculture 46: 48-54.
- Pratoomchat, B., P. Sawangwong, P. Pakkong and J. Machado 2002. Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda) Comp. Aquaculture 131: 243-255.
- Masui, D.C., R. P. M. Furriela, F. L. M. Mantelatto, J. C. McNamara , F.A. Leone. 2003. Gill ( $\text{Na}^+\text{K}^+$ ) ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: modulation of  $\text{K}^+$  phosphatase activity by potassium and ammonium ions. Aquaculture 134: 631-640.
- Mantel, L.H. and L.L. Farmer. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: The Biology of crustacea. Aquaculture 5: 54-143.
- Mangum, C.P. and K. Johansen. 1976. The colloid osmotic pressures of invertebrate body fluids. Aquaculture 63: 661-671.
- Taylor, E.W., P.J. Butler, and A. Wassia. 1977. The effect of a decrease in salinity on respiration, osmoregulation and activity in the shoe crab, *Carcinus maenas*. at different acclimation temperatures. Aquaculture 119: 155-170.
- Lovette. D. L., M. P. Verzi, P. D. Clifford and D. W. Borst. 2001. Hemolymph levels of Methyl Farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab *Carcinus maenas*. Aquaculture 128: 229-306.
- Hagerman, L. and R.F. Uglow. 1982. Effect of hypoxia on osmotic and ionic regulation in the brownshrimp *Crangon crangon* (L.) from brackish water. Aquaculture 63: 93-104.
- Zanders, I.P. 1978. Ionic regulation in the mangrove crab *Goniopsis cruentata*. Aquaculture 60: 293-302.
- [http:// www.crab-trf.com/sea\\_crab.phb](http://www.crab-trf.com/sea_crab.phb). (March)