# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

## อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

- น้ำยาและสารเคมี

*Cold Fixative* โดยเตรียม 1 % ของ Glutaraldehyde ในน้ำทะเลกรองที่มีน้ำตาล 1 %

*Hemocyte Anti-Aggregate Solution (HAAS)* เตรียม Phosphate buffer 0.1 M ที่ pH 7.6 จากสารละลาย A 43.5 ml + สารละลาย B 6.5 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึง 100 ml ( A = $Na_2HPO_4.2H_2O$ 3.56 g +water 100ml, B = $NaH_2PO_4.H_2O$ 2.76 g +water 100ml ) สุดท้ายเติม EDTA 1.5 g ใน Phosphate buffer

*Hemalum solution* เตรียมจาก Potassiumalum 25 g + Hematoxylin 1 g ผสมในน้ำกลั่น 350 ml ให้ความร้อนจนสารละลาย หลังจากทิ้งให้เย็นแล้วผสมกับสารละลาย $NaIO_3$ 0.1 g + water 50 ml สุดท้ายเติม Glecerol สามารถใช้หลังจากทิ้งไว้ 1 เดือน

*Eosin* 0.1 % ผสม Eosin จำนวน 0.1 g ในน้ำกลั่น 100 ml

*Ethanol*

*Xylene*

*Permount*

*Microscope slide and Cover glass*

*Paraffin, Stainless mold and Cassette*

*Syringe*

*อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารใช้ในการทดสอบ Biochemical test : Triptic soy agar, Gram stain(Crystal violet, Iodine, Deionized alcohol, Saffranin),Hydrogen peroxide, MR-VP test, Citrate test, Nitrate test, Oxidase test, 0/129 sensitivity test, NaCl, and TCBS agar.*

- แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เขี่ยเชื้อได้จากน้ำทะเลในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย ในปี 1995

เชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* เตรียมจากการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เจริญบน Triptic soy agar ลงใน Triptic soy broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง ต่อมา

ำนวณปริมาณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วยวิธี Total plate count ซึ่งจะได้ ปริมาณของชื้อในหน่วย CFU/ml (Colony forming unit/milliliter).

- กุ้งกุลาดำและแผนการทดลอง

แบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม

1. กุ้งควบคุม ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ
2. กุ้งถูกฉีดด้วยแบคทีเรียความเข้มข้นสูง โดยฉีดกุ้งแต่ละตัวด้วยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ย 9.06 X $10^4$ CFU/ml/กุ้ง 20 กรัม
3. กุ้งถูกฉีดด้วยแบคทีเรียความเข้มข้นต่ำ โดยฉีดกุ้งแต่ละตัวด้วยปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ย 4.53 X $10^3$ CFU/ml/กุ้ง 20 กรัม
4. กุ้งถูกแช่ด้วยแบคทีเรียปริมาณสูง โดยแช่กุ้งด้วยจำนวนเชื้อเฉลี่ย 4.53 X $10^6$ CFU/ml ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้ง
5. กุ้งถูกแช่ด้วยแบคทีเรียปริมาณต่ำ โดยแช่กุ้งด้วยจำนวนเชื้อเฉลี่ย 2.27 X $10^5$ CFU/ml ของน้ำในถังเลี้ยงกุ้ง

กุ้งกุลาดำจะถูกลำเลียงจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมาที่ ภาควิชาวาริชศาสตร์และถูกเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยงที่มีน้ำความเค็ม 10 ppt และพักฟื้น นาน 7 วัน ก่อนการทดลอง กุ้งจะถูกตรวจสอบระยะการลอกคราบ กุ้งในถังทดลองถูก ปล่อย 48 ตัวต่อถัง

แผนที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดตามระยะการลอกคราบ โดยใช้ค่า Total mocyte counts (THC) จากการสุ่มเลือดกุ้งกุลาดำ และตัดปลายระยางค์ ขาเดินหรือ งกุ้ง เพื่อวิเคราะห์ระยะคราบของกุ้ง

แผนที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบ THC ของกุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและที่ถูกฉีดด้วย แบคทีเรีย *alginolyticus* กุ้งจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดที่ 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง ที่ 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, น, และ 7 วัน และแช่ด้วยแบคทีเรีย *V. alginolyticus* กุ้งจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดที่ 1 3, และ 7 วัน

แผนที่ 3 เพื่อเปรียบเทียบชนิดของเม็ดเลือดของกุ้งที่ถูกฉีดและ แช่ด้วยแบคทีเรีย *V. inolyticus* กุ้งจะถูกสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดที่ 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, และ 7 วัน

- การเก็บตัวอย่างและบันทึกผลทดลอง
  1. วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในน้ำของถังเลี้ยงกุ้งตลอด 3 วัน
  2. เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของเม็ดเลือด
  3. ตัดเก็บตัวอย่างปลายระยางค์ขาเดินหรือขาว่ายน้ำกุ้งเพื่อวิเคราะห์ระยะคราบของกุ้งตามเวลาเดียวกับในข้อ 2 การจำแนกระยะคราบของกุ้งกุลาดำ จะใช้การจำแนกจากกุ้ง *Penaeus esculentus* (Smith and Dall,1985) และจาก *Astacus leptodactylus* (Vranckx and Durliat, 1978)
  4. เก็บตัวอย่างกุ้งในส่วนที่เป็นอวัยวะผลิตเม็ดเลือดเพื่อศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อ
  5. บันทึกพฤติกรรมและการตายของกุ้งตลอดการทดลอง
- การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติใช้การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ One Way Analysis of Variance (Minitab)ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
- การศึกษาด้านเลือดกุ้ง

การดูดเลือดกุ้ง โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและเข็มเบอร์ 26 G ½ ทำการดูดน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (HAAS) ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร แล้วดูดเลือดกุ้งอีกในปริมาณเท่ากันจากกุ้งบริเวณ Ventral abdominal artery ผสมน้ำยาและเลือดให้เข้ากัน หลังจากนั้นหนึ่งหยดของเลือดจะถูกหยดบนสไลด์ ชื่อ Hemacytometer เพื่อนับปริมาณ THC ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Phase contrast ส่วนเลือดที่เหลือ จะถูกศึกษาชนิดของเม็ดเลือดโดยหยดเลือดบนสไลด์ และเกลี่ยให้บางทิ้งให้เม็ดเลือดลงเกาะบนผิวสไลด์ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20-30 นาที แล้วเติม น้ำยา Cold fixative ให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วซับน้ำยาทั้งหมดออกไป เติมน้ำ ยา Cold fixative อีกครั้งที่ อุณหภูมิ 9°C นาน 20-30 นาทีแล้วล้างน้ำยาออกด้วย น้ำกลั่น หลังจากผึ่งให้สไลด์แห้งทำการย้อมสีเม็ดเลือดด้วย Hemalum-Eosin staining ขั้นตอนมีดังนี้ สไลด์จะถูกแช่ใน hemalum solution นาน 5 นาทีแล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งก่อนแช่ใน Eosin solution นาน 3-4 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ในแอลกอฮอล์สองครั้ง และไซลีนก่อนปิด coverslip บนสไลด์ ให้หยดน้ำยา Permount หนึ่งหยด นำสไลด์ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา สุ่มนับเม็ดเลือด 200 เซลล์ต่อสไลด์เพื่อจัดจำแนกชนิดของเม็ดเลือด