

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วัสดุ

##### 1. กุ้งกุลาดำ

- 1.1 ลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาร์วา (post larva) ที่อนุบาลในโรงเพาะฟัก
- 1.2 กุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

##### 2. สารเคมี

- 2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก)
- 2.2 สารเคมีและสีย้อมสำหรับเทคนิคอิมเพรสชันเสมีียร์ (ภาคผนวก ก)
- 2.2 สารเคมีและสีย้อมสำหรับเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (ภาคผนวก ก)
- 2.3 สารเคมีสำหรับศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ภาคผนวก ก)
- 2.4 สารเคมีสำหรับเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน(ภาคผนวก ก)

##### 3. อาหารสำหรับกุ้งกุลาดำ

อาหารผงและอาหารเม็ดสำเร็จรูปเบอร์ 1-4 สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, อารี่ที่เมียบโตเต็มวัยแบบแช่แข็ง อาหารสดสำหรับเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ เนื้อหอยแครงบดละเอียด

#### อุปกรณ์

##### 1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งทดลอง

- 1.1 ถังทดลอง ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 100 ลิตร ถังทดลองดังกล่าวจัดวางตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD)
- 1.2 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย
- 1.3 อุปกรณ์ระบบกรองและเปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วยท่อน้ำ แผ่นกรองตะกอน ถังรองรับตะกอน สายยางดูดตะกอน สายยางเปลี่ยนถ่ายน้ำ

## 2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างกึ่งกลาดำในบ่อดิน

- 2.1 อุปกรณ์ขนย้ายกึ่ง ได้แก่ ถังความจุน้ำ 20 ลิตร
- 2.2 แห ขนาดตาถี่ 1.0 เซนติเมตร
- 2.3 เครื่องให้อากาศแบบใช้กับแบตเตอรี่ 12 โวลต์

## 3. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- 1.1 ขวดเก็บน้ำสำหรับวิเคราะห์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolve oxygen, DO) ได้แก่ เครื่อง DO meter ของ YSI modek 57
- 1.3 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ เครื่อง pH meter รุ่น Denver Instrument. Basic
- 1.4 อุปกรณ์วัดความเค็ม ได้แก่ hand refractometer รุ่น ATAGO S-28E
- 1.5 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์
- 1.6 อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ขวดรูปชมพู่ บิวเรตและปิเกตอร์

## 4. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของกิ้ง

- 4.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius Basic. BA310S)
- 4.2 เวอร์เนียคาลิเปอร์
- 4.3 ถังพลาสติกขนาด 3 ลิตร และสวิงสำหรับช้อนกิ้ง

## 5. อุปกรณ์ศึกษาการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยวิธี Impression smear

- 4.1 สไลด์ ขนาด 25.4×76.2 มิลลิเมตร และแผ่นปิดสไลด์ขนาด 24×50 มิลลิเมตร
- 4.2 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ กรรไกร มีดผ่าตัด ปากคีบ และตะเกียง
- 4.3 ชุดอุปกรณ์สีย้อมตามวิธีของ Vickers และคณะ (1993) (ภาคผนวก ก)
- 6.2 กล้องถ่ายภาพ ของ Olympus รุ่น AX70 และกล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus รุ่น C-35 AD

## 6. อุปกรณ์ศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

- 6.1 ขวดสำหรับดองตัวอย่างเนื้อเยื่อ กุ้ง ขนาด 30 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
- 6.2 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ กรรไกร มีดผ่าตัด ปากคีบ และตะเกียง
- 6.3 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Mod. 2A Autotechnicon Mono
- 6.4 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (microtome) ของ Jung AG Heidelberg
- 6.5 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- 6.6 อ่างน้ำอุ่น (warm bath)
- 6.7 เตาร้อน (hot plate)
- 6.8 สไลด์ ขนาด 25.4×76.2 มิลลิเมตร และแผ่นปิดสไลด์ขนาด 24×50 มิลลิเมตร
- 6.9 กล้องถ่ายภาพ ของ Olympus รุ่น AX70 และกล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus รุ่น C-35 AD

## 7. อุปกรณ์เตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางชีวโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR)

- 7.1 เครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycle, MJ Research, PTC 100)
- 7.2 อุปกรณ์สำหรับแยกดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสพร้อมชุดควบคุมกระแสไฟ (Scie-Plas, PSU 400/600)
- 7.3 เครื่อง UV light transilluminator สำหรับตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (VL Viber Lourmat, TFX-20M)
- 7.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti™ 30 centrifuge ) และเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (IWAKI Inc. Ltd, IWAKI Centrifuge Micro 6 HG)

## 8. อุปกรณ์เตรียมตัวอย่างทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 8.1 เครื่องตัดแต่งแท่งพลาสติก (EM Trim) ของ Leica รุ่น 702601
- 8.2 เครื่องทำมีดแก้ว (EM KMR) ของ Leica
- 8.3 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบบางเป็นพิเศษ (ultramicrotome) ของ Leica รุ่น 706201

8.4 แท่งแก้ว (glass strip) ขนาดยาว 400 มิลลิเมตร กว้าง 25 มิลลิเมตรหนา 8

มิลลิเมตร

8.5 อุปกรณ์ตัดมีดแก้ว (knife boat) สำหรับลอบตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อ

8.6 กริดสำหรับวางตัวอย่าง

8.7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ของ Jeol รุ่น JEM – 100 CX-II

## วิธีการศึกษา

### 1. การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกึ่งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาในโรงเพาะฟัก

#### -การเก็บตัวอย่าง

สำรวจลูกกึ่งและเก็บตัวอย่างลูกกึ่งตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะโพสต์ลาวา 10 (PL10) จากโรงเพาะฟักในเขตอำเภอละงู จังหวัดสตูล เพื่อตรวจสอบอัตราการพบเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกึ่งในช่วงอายุต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างลูกกึ่งแต่ละระยะที่กำหนดคือ ระยะนอเพเลียส ชูเบีย ไมซิส โพสต์ลาวา1 โพสต์ลาวา5 และโพสต์ลาวา10 จำนวนบ่อละ 100 ตัวเพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวรสำหรับตรวจสอบอัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี นำตัวอย่างลูกกึ่งจำนวน 50 ตัวมาทำสไลด์ถาวรเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ โดยนำไปดองในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's Fixative) แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีการของ Bancroft (1967) โดยผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากตัวอย่าง เพื่อฝังลงในพาราฟิน (paraffin) แล้วตัดให้มีความหนา 2-7 ไมโครเมตร เพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวร โดยย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน และตรวจหาเปอร์เซ็นต์ของลูกกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์ (compound microscope)

ในกรณีที่น่าลูกกึ่งมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา แล้วไม่พบการติดเชื้อจะทำการยืนยันผลอีกครั้ง โดยการนำกึ่งอีก 50 ตัว ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Belcher และ Yong (1998) ศึกษาอัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกึ่งในแต่ละบ่อจากโรงเพาะฟักต่างๆ

## 2. การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกึ่งกลาดำระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

### - การสำรวจ และคัดเลือกตัวอย่าง

สำรวจลูกกุ้งจากบ่ออนุบาลที่อยู่ในระยะโพสต์ลารวา (post larva) 10-15 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีระหว่าง 70 – 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อติดตามลูกกุ้งที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในระดับที่กำหนดไว้ก่อนที่เกษตรกรจะนำไปลงเลี้ยงในบ่อดิน โดยเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวาจาก โรงเพาะฟักในเขตอำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา จำนวนบ่อละ 200 ตัวเพื่อเตรียมเป็น สไลด์ถาวรสำหรับตรวจสอบอัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี โดยนำตัวอย่างลูกกุ้งจำนวน 100 ตัวมาตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีอิมเพรสชันสเมียร์ (impression smear) ตามวิธีการของ Vickers และคณะ (1993) และตัวอย่างลูกกุ้งอีก 100 ตัว นำไปตรวจวินิจฉัยด้วยทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีการของ Bancroft (1967) ตรวจหาเปอร์เซ็นต์ของลูกกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์ (compound microscope)

### - การเก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ผล

เมื่อเกษตรกรซื้อลูกกุ้งจากบ่ออนุบาลที่คัดเลือกแล้วดั่งข้างต้นไปเลี้ยงในบ่อดินแล้วจึงทำการสุ่มลูกกุ้งจากแต่ละบ่อจำนวน 200 ตัว ทุกๆ 1 เดือนจนกระทั่งจับขาย เพื่อตรวจสอบน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว ความยาว และตรวจวัดปริมาณของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยวิธี impression smear (Vickers *et al.*, 1993) จำนวน 100 ตัว และวิธีการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Bancroft, 1967) จำนวน 100 ตัว

ตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างกุ้งในแต่ละบ่อ ได้แก่ ความเค็มโดยใช้เครื่องวัดการหักเหแสง (refractometer) ค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยพีเอชมิเตอร์ และวัดค่าอัลคาไลน์ตี้ (alkalinity) และค่าแอมโมเนีย (ammonia) ตามวิธีการของ Boyd (1990) เปรียบเทียบค่า สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ของความยาวและน้ำหนักกุ้งในแต่ละบ่อที่ระยะต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่ตรวจพบในระหว่างช่วงการเลี้ยงโดยการคำนวณค่าความถดถอยเชิงเส้น (linear regression) และค่าสหสัมพันธ์ (correlation) (มัลลิกา, 2542)

### 3. ศึกษาผลของอาหารชนิดต่างๆต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกึ่งกุลาดำ

#### - การเตรียมและคัดเลือกสัตว์ทดลอง

คัดเลือกลูกกึ่งจากบ่ออนุบาลที่อยู่ในระยะโพสต์ลาร์วา (post larva) 10-15 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีระหว่าง 70 – 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา(Bancroft,1967) จำนวน 100 ตัวและ เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิคอิมเพรสชันสเมียร์ (impression smear) (Vickers *et al.*, 1993) จำนวน 100 ตัว เพื่อนำมาศึกษาปัจจัยด้านอาหารที่มีต่อการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี

#### - ชุดการทดลอง และการเก็บตัวอย่าง

นำลูกกึ่งจากโรงเพาะฟักที่คัดเลือกแล้วลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 100 ลิตร ในระบบน้ำไหลหมุนเวียนที่มีการให้อากาศตลอดเวลา แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ที่ความหนาแน่น 500 ตัวต่อน้ำ 80 ลิตร ในชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงกึ่งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเบอร์ 1 และ 2 ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงกึ่งด้วยอาร์ทีเมียโตเต็มวัย และชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสด เลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ทุกชุดการทดลองให้อาหารจนกึ่งกินหมดพอดีวันละ 4 ครั้ง ดูดตะกอน และอาหารเหลือออกทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 สัปดาห์ และทุก 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างจำนวน 100 ตัวในแต่ละชุดการทดลอง แล้วนำมาตรวจสอบอัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีโดยนำกึ่งจำนวน 50 ตัวมาตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีอิมเพรสชันสเมียร์ (Vickers *et al.*, 1993) และอีก 50 ตัวนำมาดองด้วยน้ำยาเดวิสสันเพื่อเตรียมเป็นสไลด์เนื้อเยื่อถาวร ศึกษาอัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกึ่งในแต่ละชุดการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

### 4. ศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกึ่งกุลาดำ

#### - การเตรียมและคัดเลือกสัตว์ทดลอง

คัดเลือกลูกกึ่งจากบ่ออนุบาลที่อยู่ในระยะโพสต์ลาร์วา 10-15 ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีระหว่าง 30 – 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บตัวอย่างลูกกึ่งระยะโพสต์ลาร์วาจากโรงเพาะฟักในเขต

อำเภอสังขละบุรี จังหวัดสงขลา จำนวนบ่อละ 100 ตัว เพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวรสำหรับตรวจสอบ อัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีการของ Bancroft (1967) และ ตรวจหาเปอร์เซ็นต์ของลูกกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์ (compound microscope)

#### - ชุดการทดลอง และการเก็บตัวอย่าง

นำลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักที่คัดเลือกแล้วมาทำการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อใน กุ้งแต่ละชุดการทดลองที่ได้ทดสอบความเครียดที่สภาวะแตกต่างกัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 2 ถึง ถึงละ 300 ตัว ชุดการทดลองที่ 1 เป็น ชุดควบคุม เลี้ยงที่ความเค็ม 12 ppt อุณหภูมิ 29 °C ซึ่งเป็นสภาวะปกติในโรงเพาะฟัก ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงที่ความเค็ม 12 ppt ในระดับอุณหภูมิ 25 °C ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงที่ความเค็ม 12 ppt ในระดับอุณหภูมิ 34 °C ชุดการทดลองที่ 4 ย้ายลงเลี้ยงในน้ำความเค็ม 6 ppt ที่อุณหภูมิ 29 °C และชุดการทดลองที่ 5 ย้ายลงเลี้ยงในน้ำความเค็ม 18 ppt ที่อุณหภูมิ 29 °C และชุดการทดลองที่ 6 อยู่ในสภาวะการจำลองการขนส่ง โดยใช้ถุงขนส่งกุ้งใส่น้ำความเค็ม 12 ppt จำนวน 2 ลิตร และกุ้งจำนวน 2,000 ตัว ได้รับการเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 50 รอบต่อนาที และทำการวัด ออกซิเจนละลายน้ำภายในถุงขนส่งกุ้ง หลังจากให้สภาวะความเครียดครบ 12 และ 24 ชั่วโมง ทำ การเก็บตัวอย่างกุ้งแต่ละชุดการทดลองเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี จำนวน 50 ตัวที่ระยะ 0 , 1 , 3 และ 7 วัน ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยศึกษาอัตราการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกุ้งใน แต่ละชุดการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การ ติดเชื้อด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

### 5. การศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน

คัดเลือกลูกกุ้งจากบ่ออนุบาลที่อยู่ในระยะโพสต์ลาร์วา ที่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีระหว่าง 30 – 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อนำมาศึกษาศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ภายในเซลล์ด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (สากล, 2544 ; Robinson *et al.*, 1987)