บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 การเตรียมกุ้งทดลอง

1.1.1 กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำสุขภาพแข็งแรง ปลอดโรค อายุ 30 วัน น้ำหนักประมาณ 4-6 กรัม จำนวน 2,000 ตัว จากบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา

1.1.2 กุ้งขาว

กุ้งขาวสุขภาพแข็งแรง ปลอดโรค อายุ 37 วัน น้ำหนักประมาณ 3-5 กรัม จำนวน 2,000 ตัว จากบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว (ภาคผนวก ก)

1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก)

1.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก)

1.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว (ภาคผนวก ก)

1.2.5 สารเคมีสำหรับแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ (ภาคผนวก ก)

1.2.6 สารพิษจากเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ สารพิษทีทูและสารพิษซีราลีโนนได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไบโอมิน จำกัด

1.3 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว

1.3.1 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

1.3.2 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

โดยอาหารทั้ง 2 ชนิด ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่คำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีนระหว่าง 39 - 41 เปอร์เซ็นต์ ไขมันระหว่าง 9 - 11 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 12 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 6 - 8 เปอร์เซ็นต์ ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

2.1.1.1 ตู้กระจกทดลองขนาด 90×45×45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 200 ลิตร จำนวน 42 ตู้

2.1.1.2 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยาง และหัวทราย

2.1.1.3 อุปกรณ์ระบบน้ำแบบไหลผ่าน และระบบกรองน้ำ

2.1.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยาง ฟองน้ำขัดตู้ และสายยางดูดตะกอน

2.1.1.5 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้งทดลอง ได้แก่ ถังพลาสติกและสวิงช้อนกุ้ง

2.1.1.6 ตาข่ายสำหรับหลบซ่อนตัวกุ้ง

2.1.2 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งขาว

2.1.2.1 ถังพลาสติก ขนาด 20×31×22 นิ้ว ความจุน้ำ 200 ลิตร

2.1.2.2 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยาง หัวทราย

2.1.2.3 อุปกรณ์ระบบกรอง โดยใช้ Air lift ประกอบด้วย ท่อพลาสติก ท่อพีวีซี ข้อต่อพีวีซี แผ่นใยแก้ว กระป๋องพลาสติก ถังไฟเบอร์กลาสกลม ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เมตร ภายในบรรจุเปลือกหอย หินเกล็ด ทรายละเอียด และถ่าน

2.1.2.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ และทำความสะอาดถังเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ สายยาง ฟองน้ำขัดถังถังไฟเบอร์กลาสกลมขนาดความจุ 2 ลูกบาศก์ก์เมตร และเครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม (submersible pump)

2.1.2.5 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้ง ได้แก่ สวิงช้อนกุ้งและถังพลาสติก

2.1.2.6 อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ

2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลองของ Hobart Model A 200 T ประกอบด้วยชุดผสมอาหารแบบ มีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Satorius รุ่นBasic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร และมีดตัดอาหาร

2.2.3 ตู้แช่แข็ง เพื่อเก็บอาหารทดลอง

2.3.4 ตู้อบอาหาร

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.3.1 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

2.3.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง บิวเรต ปิเปต ลูกยาง และขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

2.3.3 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.4.1 อุปกรณ์เก็บเลือดกุ้ง ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.4.2 เครื่องสำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti^{TM} 30 centrifuge) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.4.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด คือ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) กล้องจุลทรรศน์

2.4.4 อุปกรณ์สำหรับเจือจางเลือด คือ หลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ไมโคร ปิเปต ทิป เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)

2.4.5 อุปกรณ์สำหรับย้อมสีเม็ดเลือด ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก 1.5 มิลลิลิตร สไลด์ (slide) แผ่นปิดสไลด์ (cover glass) เครื่องเขย่าผสม กล้องจุลทรรศน์

2.4.6 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ALP (alkaline phosphatase) ALT (alanine aminotransferase) และ AST (aspartate aminotransferase) ในน้ำเลือดกุ้งโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Boerhinger Mannheim Automated Analysis/Hitachi 717

2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

2.5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

2.5.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อคือ ไมโครโตม (microtome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposable Microtome Blades) อ่างน้ำอุ่น (warm bath) และสไลด์

2.5.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวร คือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Sunyo, Program Oven) ชุดสำหรับใส่สีย้อม และแผ่นปิดสไลด์

2.5.5 เครื่องเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

2.5.6 เตาร้อน (hot plate)

2.5.7 กล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

2.6.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.6.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่นKjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ และบิวเรต

2.6.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.6.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.7 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของกุ้ง

ประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร กะละมังพลาสติก สวิงช้อนกุ้ง กล่องพลาสติก ผ้าขนหนูซับตัวกุ้ง

3. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 และ 2 ศึกษาผลของสารพิษจากเชื้อราทีทูและซีราลีโนนในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว ตามลำดับ โดยทำการศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน อัตราการรอดตาย องค์ประกอบเลือด และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยการทดลองทั้ง 2 การทดลองใช้สูตรอาหารทดลองเดียวกัน คือสร้างสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่มีสารพิษทีทูและซีราลีโนนระดับต่าง ๆ แตกต่างกัน ระบบการเลี้ยงและการวางแผนการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การทดลองที่ 1 : ผลของสารพิษจากเชื้อราทีทูและซีราลีโนนต่อกุ้งกุลาดำ

3.1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 90×45×45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 200 ลิตร (หน่วยทดลอง) ระบบน้ำที่ใช้เลี้ยงเป็นแบบไหลผ่าน (flow through system) อัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 2.0 ลิตรต่อนาที ใช้น้ำทะเลความเค็ม 30 - 33 พีพีที อุณหภูมิ 28 - 29 องศาเซลเซียส ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ ดูดน้ำทะเลขึ้นไปยังบ่อพักน้ำผ่านระบบกรองแล้วนำน้ำที่กรองแล้วเติมในตู้ทดลองให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร น้ำที่ไหลเวียนในระบบจะล้นออกทางท่อน้ำล้นภายในตู้ทดลองและไหลไปรวมกันในท่อน้ำทิ้งออกสู่ภายนอก ดูดตะกอนและอาหารที่เหลือทุกวันก่อนให้อาหาร

3.1.2 การเตรียมกุ้งทดลอง

ใช้กุ้งกุลาดำสุขภาพแข็งแรง ปลอดโรค อายุ 30 วัน น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 4 - 6 กรัม จำนวน 2,000 ตัว นำมาพักไว้ในบ่อซีเมนต์แล้วคัดขนาดให้มีน้ำหนักในช่วง 4 - 5 กรัม ใส่ตู้ทดลอง จำนวน 15 ตัวต่อตู้ จำนวน 42 ตู้ เลี้ยงในตู้ทดลองและให้อาหารทดลองในชุดควบคุม 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและอาหารทดลอง สังเกตการ

ยอมรับอาหารของกุ้งก่อนเริ่มการทดลองแล้ว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของกุ้งและให้อาหารทดลอง โดยปริมาณอาหารที่ให้จะปรับตามตารางการให้อาหารกุ้งกุลาดำซึ่งเปลี่ยนตามน้ำหนักตัวกุ้ง

3.1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

การทดลองทั้ง 2 การทดลองใช้สูตรอาหารเดียวกัน โดยสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งทดลองมี 7 สูตร แตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของสารพิษทั้ง 2 ชนิด เริ่มโดยคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีนระหว่าง 39 - 41 เปอร์เซ็นต์ ไขมันระหว่าง 9 -11 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 12 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นระหว่าง6 - 8 เปอร์เซ็นต์ แต่มีระดับสารพิษทีทูแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.1, 1.0 และ 2.0 พีพีเอ็ม ซีราลีโนน 0.1, 0.5 และ 1.0 พีพีเอ็ม และรวมชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารพิษทั้ง 2 ชนิด เริ่มโดยการนำสารพิษจากเชื้อราในแต่ละสูตรตามที่คำนวณไว้ผสมรวมกับวัตถุดิบอาหารอื่น ๆ ในเครื่องผสมอาหารจนวัตถุดิบเข้ากันดี จึงนำมาอัดเม็ดอาหาร หลังจากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งดี บรรจุลงถุงพลาสติกเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลองมีดังต่อไปนี้

3.1.3.1 ชั่งวิตามินผสม แร่ธาตุผสม แป้งสาลี และสารพิษทีทูหรือซีราลีโนน ตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหาร ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง ผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึงในถุงพลาสติกใส

3.1.3.2 ชั่งวัตถุดิบอาหารอื่น ๆ ที่เหลือตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหารแสดงในตารางที่ 3 (ภาคผนวก)

3.1.3.3 นำวิตามิน แร่ธาตุ แป้งสาลี สารพิษทีทูหรือซีราลีโนน ในข้อ 3.1.3.1 ลงถุงพลาสติกใสขนาดใหญ่แล้วผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง

3.1.3.4 นำวัตถุดิบอาหารตามข้อ 3.1.3.2 เข้าเครื่องผสมอาหาร ผสมจนเข้ากันดีแล้วนำวัตถุดิบข้อ 3 ใส่ลงไปผสม เติมน้ำ 35 % ของน้ำหนักอาหาร ผสมจนวัตถุดิบอาหารเข้ากันดี

3.1.3.5 หลังจากวัตถุดิบผสมเข้ากันอย่างดีทำการอัดเม็ดอาหารขนาดที่เหมาะสมกับขนาดที่กุ้งกินตลอดการทดลอง

3.1.3.6 นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งพอดี บรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร และคณะ, 2540) นำอาหารทดลองไปตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของสูตรอาหาร (โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า) ด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่เตรียมตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

ก่อนนำไปเลี้ยงทดลอง ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารในชุดการทดลองสารพิษ . ทีทู แสดงในตารางที่ 4 (ภาคผนวก ข) และสารพิษซีราลีโนน แสดงในตารางที่ 5 (ภาคผนวก ข)

3.1.4 การเตรียมสารพิษทีทูและซีราลีโนน

คำนวณปริมาณสารพิษทีทูที่ใช้เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ 0.1, 1.0 และ 2.0 พีพีเอ็ม และซีราลีโนน 0.1, 0.5 และ1.0 พีพีเอ็ม โดยเริ่มจากสารพิษทีทูบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 35 มิลลิกรัม ซึ่งได้จากเชื้อรากลุ่มฟูซาเรียม และซีราลีโนนบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ได้จากเชื้อรา *Fusarium graminearum* ใช้แป้งสาลีเป็นตัวเจือจาง เพื่อให้อาหารแต่ละสูตรมีระดับความเข้มข้นตามที่คำนวณไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 (ภาคผนวก ข) จากนั้นผสม แร่ธาตุผสม วิตามินผสม แป้งสาลี และสารพิษทีทูหรือซีราลีโนนตามที่คำนวณไว้แต่ละสูตรอาหารในถุงพลาสติกใส ผสมให้เข้ากันแล้วจึงผสมรวมเข้ากับวัตถุดิบอาหารอื่น ๆ ในเครื่องผสมอาหารแล้วดำเนินการตามขั้นตอนการเตรียมอาหารต่อไป

3.1.5 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง (treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (replication) ๆ ละ 15 ตัว โดยแต่ละชุดการทดลองแบ่งมา 5 ซ้ำ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและองค์ประกอบเลือด อีก 1 ซ้ำ นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารพิษเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับสัปดาห์ที่ 8 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งหมดของแต่ละชุดการทดลอง ๆ ละ 25 ตัว เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด และอีก 15 ตัว สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ กุ้งที่เหลือเลี้ยงต่อจนครบ 10 สัปดาห์ แล้วทำการเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งหมดเพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือดและเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 4) ชุดการทดลองแต่ละชุดแบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารพิษทีทู 3 ระดับ (0.1, 1.0 และ 2.0 พีพีเอ็ม) และซีราลีโนน 3 ระดับ (0.1, 0.5 และ 1.0 พีพีเอ็ม) รวมชุดควบคุม (0 พีพีเอ็ม) เริ่มต้นการทดลองโดยชั่งน้ำหนักกุ้งกุลาดำ สุ่มกุ้งให้มีน้ำหนักในช่วง 4 - 5 กรัมต่อตัว ปล่อยในตู้ทดลองตู้ละ 15 ตัวต่อตู้ ให้อาหารวันละ 4 มื้อ เวลา 8.00, 13.00, 18.00 และ 22.00 น. สังเกตปริมาณอาหารที่กุ้งกิน เพื่อนำไปปรับปริมาณอาหารมื้อต่อไป ชั่งและบันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกวัน ชั่งน้ำหนักกุ้งทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลตลอดการทดลอง

ตารางที่ 4 แผนการทดลองศึกษาองค์ประกอบเลือดและเนื้อเยื่อวิทยาของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารพิษทีทูและซีราลีโนนระดับต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	ตัวอย่างกุ้ง (ตัว) สัปดาห์ที่ 4		ตัวอย่างกุ้ง (ตัว) สัปดาห์ที่ 8		ตัวอย่างกุ้ง (ตัว) สัปดาห์ที่ 10		จำนวนกุ้งทั้งหมด (ตัว)
	องค์ประกอบเลือด	เนื้อเยื่อ	องค์ประกอบเลือด	เนื้อเยื่อ	องค์ประกอบเลือด	เนื้อเยื่อ	
0 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90
T-2 0.1 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90
T-2 1.0 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90
T-2 2.0 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90
ZEN 0.1 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90
ZEN 0.5 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90
ZEN 1.0 พีพีเอ็ม	-	15	25	15	25	10	90

3.1.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอกของกุ้งกุลาดำ

ตลอดระยะเวลาทดลองสังเกตพฤติกรรมที่ผิดปกติและลักษณะภายนอกที่แสดงออก ได้แก่ พฤติกรรมการกินอาหาร สีของลำตัว ลักษณะลำตัว การลอกคราบ และระยางค์ต่าง ๆ ผิดปกติหรือไม่ รวมทั้งอวัยวะภายนอกอื่น ๆ ของกุ้งทุกชุดการทดลอง

3.1.6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำ

ชั่งน้ำหนักกุ้งกุลาดำทุก 2 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตลักษณะอาการกุ้งตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกข้อมูลไว้จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ

- น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (average weight) (ภาคผนวก ก)
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) ตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก)
- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% specific growth rate, SGR) ตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966)

- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการรอดตาย (survival rate) ตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000) (ภาคผนวก ก)

3.1.6.3 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เก็บตัวอย่างกุ้ง ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 โดยสุ่มกุ้งจากทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 25 ตัว สำหรับกุ้งที่เหลือเลี้ยงครบ 10 สัปดาห์ แล้วทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดเพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด ได้แก่

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total hemocytes count) โดยใช้วิธีการของ กิจการ (2538)

- การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยวิธีดัดแปลงจาก Smith และ Soderhall (1983)

- การแยกชนิดของเม็ดเลือดกุ้ง (differential cell counts) โดยใช้เทคนิคการย้อมสี Bengal Rose ตามวิธีการของ Sritunyalucksana และคณะ (2005)

- ปริมาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ALP (alkaline phosphatase) ALT (alanine aminotransferase) และ AST (aspartate aminotransferase) ในน้ำเลือดกุ้ง นำส่งวิเคราะห์ที่หน่วยเคมีคลีนิค คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Boehringer Mannheim Automated Analysis/Hitachi 717

3.1.6.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำในสัปดาห์ที่ 4 จำนวน 15 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองที่แยกไว้ 1 ซ้ำข้างต้น สำหรับสัปดาห์ที่ 8 และ10 สุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละชุดการทดลอง ๆ ละ 15 และ 10 ตัว ตามลำดับ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีของ Bell และ Lightner (1988) โดยฉีดน้ำยาเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับ ส่วนหัว และกล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่ว แล้วตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีก นำกล้ามเนื้อลำตัวดองในขวดที่บรรจุน้ำยาเดวิดสัน ให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid cell) เหงือก (gill) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) และกล้ามเนื้อ (muscle) หลังจาก 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) โดยใช้เครื่อง Automatic Tissue Processor ซึ่งเป็นการผ่าน

แอลกอฮอล์ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จาก 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์แล้วผ่านไซโซโพรพิลและไซลีน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านขึ้นตอนการฝังชิ้นเนื้อลงในพาราพลาส (embedding) แล้วตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม ให้มีความหนาประมาณ 3 - 5 ไมครอน ย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน Hematoxylin & Eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Olympus AX 70) และบันทึกภาพโดยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล Olympus DP-10

3.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range Test (Duncan, 1955)

3.2 การทดลองที่ 2 : ผลของสารพิษจากเชื้อราทีทูและซีราลีโนนต่อกุ้งขาว

3.2.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ศึกษาผลของสารพิษทีทูและซีราลีโนนต่อ การเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของกุ้งขาว โดยใช้ถังพลาสติกขนาด 20×31×22 นิ้ว ความจุน้ำ 200 ลิตร ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์การให้อากาศ ระบบกรอง อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ ระบบเลี้ยงเป็นระบบปิด ประกอบด้วย ถังกรองน้ำเป็นถังไฟเบอร์กลาสกลม บรรจุถ่าน เปลือกหอย หินเกล็ด และทรายละเอียด มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา โดยน้ำในถังเลี้ยงจะถูกดูดขึ้นมาผ่านระบบกรองแล้วไหลไปยังถังทดลองใหม่ และแต่ละถังให้มีปริมาตรน้ำเท่ากันทุกถัง ปิดปากถังด้วยแผ่นตาข่ายพลาสติกเพื่อป้องกันกุ้งดีดตัวข้ามถังเลี้ยง

3.2.2 การเตรียมกุ้งทดลอง

ใช้กุ้งขาวสุขภาพแข็งแรง ปลอดโรค อายุ 37 วัน น้ำหนักประมาณ 3 - 5 กรัม จากฟาร์มเอกชน อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา นำกุ้งพักไว้ในบ่อซีเมนต์แล้วคัดขนาดให้มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นในช่วง 3-4 กรัมต่อตัว ใส่ถังทดลอง 15 ตัวต่อถัง เลี้ยงในถัง 1 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมและอาหารทดลอง สังเกตการยอมรับอาหารของกุ้งก่อนเริ่มการทดลองแล้ว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของกุ้ง และให้อาหารทดลอง

3.2.3 การเตรียมอาหารทดลอง

สูตรอาหารทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ตารางภาคผนวกที่ ข. 3)

3.2.4 การเตรียมสารพิษจากเชื้อรา

การเตรียมสารพิษทีทูแลซีราลีโนนระดับต่าง ๆ เหมือนกับการทดลองที่ 1 (3.1.4) (ตารางภาคผนวกที่ ข.1 และ ข.2)

3.2.5 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 8 สัปดาห์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง (treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (replication) โดยแต่ละซ้ำจะใช้กุ้งจำนวน 15 ตัว

การทดลองที่ 2 เป็นการทดลองผลของสารพิษทีทูและซีราลีโนนต่อกุ้งขาว โดยมีระดับสารพิษทีทูและซีราลีโนนแตกต่างกันไปเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 7 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ โดยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งต่อตัวเท่ากับ 3 - 4 กรัม แต่ละถังทดลองบรรจุน้ำ 20 ลิตร ให้อาหารวันละ 4 มื้อ คือ 8.00, 13.00, 18.00 และ 22.00 น. สังเกตปริมาณอาหารที่กุ้งกินเพื่อนำไปปรับปริมาณอาหารมื้อต่อไป รายละเอียดอื่น ๆ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (ในข้อ 3.1.5)

3.2.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.2.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอกของกุ้งขาว

3.2.6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว

ชั่งน้ำหนักกุ้งขาวทุก 2 สัปดาห์ จนสิ้นสุดการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการกุ้งตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกข้อมูลไว้จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหา

- น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (average weight) (ภาคผนวก ก)
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) ตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก)
- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% specific growth rate, SGR) ตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) (ภาคผนวก ก) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966)

- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption) (ภาคผนวก ก)

- อัตราการรอดตาย (survival rate) ตามวิธีการของ Nankervis (2000) (ภาคผนวก ก)

3.2.6.3 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เก็บตัวอย่างกุ้งการทดลองที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 8 โดยสุ่มกุ้งจากทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 25 ตัว เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด ได้แก่

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocytes count) โดยใช้วิธีการของ กิจการ (2538)

3.2.6.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

ดำเนินการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (3.1.6.4)

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range Test (Duncan, 1955)