บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

ใช้กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากฟาร์มในจังหวัดตรัง สงขลา และปัตตานี ขนาดอายุ 60 วัน (น้ำหนักเฉลี่ย 5.74 กรัม) และขนาดอายุ 120 วัน (น้ำหนักเฉลี่ย 17.24 กรัม) โดยแบ่งกุ้งออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 สำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งที่อยู่ในสภาพของการเลี้ยงในบ่อดิน นำกุ้งตัวอย่างมาเก็บเลือดเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันโดยดำเนินการทันทีภายในฟาร์ม

ชุดที่ 2 สำหรับการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และการติดเชื้อ ต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน โดยลำเลียงตัวอย่างกุ้งทั้งสองกลุ่มอายุจากฟาร์ม มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ของโรงเพาะฟัก ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พักกุ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพการทดลอง (acclimatization) ให้อาหารปกติวันละ 3 มื้อ ก่อนดำเนินการชักนำให้มีการติดเชื้อ และเก็บเลือดเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการต่อไป

2. การตรวจสอบภาวะการติดเชื้อของกุ้งในบ่อเลี้ยง

ตัวอย่างกุ้งจากบ่อเลี้ยงที่นำมาใช้ในการศึกษาทดลองจะต้องเป็นกุ้งสุขภาพดี ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นกุ้งปลอดเชื้อก่อโรคจะต้องมีการตรวจสอบการติดเชื้อ โดยนำกุ้งตัวอย่างมาตรวจสอบการติดเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio*, ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) ณ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* จะเก็บตัวอย่างตับ (hepatopancreas) ของกุ้งกุลาดำมาชั่งน้ำหนัก และเขี่ยเชื้อบนอาหาร Thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหาร คำนวณปริมาณเชื้อต่อกรัมของน้ำหนักตับ โดยกุ้งสุขภาพดีจะต้องมีปริมาณเชื้อไม่เกิน 10^4 โคโลนีต่อกรัมของตับ

การตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV และ YHV จะใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ตามลำดับ

ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Takahashi และคณะ (1996) และ Tang และ Lightner (1999) โดยกุ้งที่นำมาทดลองจะต้องปลอดเชื้อ WSSV และ YHV จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

3. การชักนำการติดเชื้อในกุ้งสำหรับชุดทดลองในห้องปฏิบัติการ

กุ้งกุลาดำชุดทดลองในห้องปฏิบัติการจะถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ แบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*), White spot syndrome virus (WSSV) หรือ Yellow head virus (YHV) เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน ชักนำให้มีการติดเชื้อมีวิธีการดังนี้

แบคทีเรีย นำเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ผสมเกลือแกง 1.5% ที่อุณหภูมิ 35°C ประมาณ 20-24 ชั่วโมง มาละลายในน้ำเกลือ 1.5% และปรับให้สารละลายเชื้อ (bacterial suspension) มีความเข้มข้นของเชื้อ ประมาณ 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (cells/ml) นำมาฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อกุ้งปล้องที่ 6 ปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (ml) จำนวน 50 ตัว ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ 1.5% ในปริมาตรเท่ากัน

ไวรัส เชื้อไวรัสที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ White spot syndrome virus (WSSV) และ Yellow head virus (YHV) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำสารละลายเชื้อไวรัสที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 โดยเจือจางเชื้อไวรัส WSSV และ YHV ให้มีความเข้มข้นที่ระดับ $1:10^6$ และ $1:10^9$ ตามลำดับ แล้วนำเชื้อไวรัสที่เจือจางแล้วมาฉีดเข้ากุ้งทดลองจำนวน 0 ตัว ตัวละ 0.1 ml ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วย PBS ในปริมาตรเท่ากัน

หลังจากการฉีดเชื้อเป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน ทำการตรวจสอบระดับของการติดเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ ในกุ้งทดลองตามวิธีการข้างต้น เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งมีการติดเชื้อ จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันต่อไป

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน

- ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte count, THC)

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งตามวิธีการของกิจการและสิทธิ (2538) โดยดูดเลือดกุ้งจากบริเวณโคนขาเดิน โดยใช้เข็มขนาด 25G นำเลือดที่ได้จากกุ้งแต่ละตัวมาเจือจางด้วยสารละลายของสีย้อม trypan blue เข้มข้น 1% ในสารละลายเกลือแกง 1.5% ในอัตราส่วน 1:100 นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ haemacytometer คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้ในหน่วยเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (cells/mm^3)

- ปฏิกิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase

วิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase ในเลือดกุ้งกุลาดำ โดยทำการดูดเลือดกุ้งผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 ที่มี 4% L-cysteine เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ผสมอยู่ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือด นำเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดมาเติม cacodylate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 1 ml นำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) แล้วนำเม็ดเลือดที่แข็งแล้วมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกเฉพาะสารละลายส่วนใส (haemocyte lysate, HLS) ที่อาจมีเอนไซม์ phenoloxidase ละลายอยู่

นำ HLS มาวิเคราะห์ตามวิธีการของ Smith และ Soderhall (1983) โดยใช้ L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยดูด HLS ปริมาตร 200 µl ผสมกับสารละลาย trypsin ปริมาตร 200 µl แล้วตามด้วย L-DOPA ปริมาตร 200 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม cacodylate buffer 1,800 µl จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที นำค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงตามเวลามาคำนวณค่า activity ของเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งมีหน่วยเป็น unit/min โดยที่ 1 unit คือความสามารถของเอนไซม์ phenoloxidase ที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น dopamine ซึ่งวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย

PO activity = unit/min/mg-protein

- ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (serum protein)

วิเคราะห์โปรตีนในน้ำเลือดตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งวิธีการนี้จะใช้ working solution สองชนิด คือ alkaline copper solution และ folin reagent โดยอาศัยหลักการที่ ammonia (NH_3) ในโปรตีนตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ copper ions (Cu^{2+}) ใน alkaline copper solution เกิดเป็น biuret complex ($Cu(NH_3)_4^{2+}$) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะทำปฏิกิริยากับ phosphomolybdotungstate ใน folin reagent ไปเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงินเข้ม และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

วิธีการวิเคราะห์โปรตีนเริ่มต้นจากการเจือจางซีรัมด้วยน้ำกลั่น 200 เท่า โดยใช้ซีรัมตัวอย่างปริมาตร 5 µl เติมลงในหลอดที่บรรจุน้ำกลั่น 995 µl จากนั้นเติม alkaline copper working solution ซึ่งประกอบด้วย 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ 1 ส่วน, 1% NaKtatrate 1 ส่วน และ 1% Na_2CO_3 ใน 0.5 M NaOH 50 ส่วน ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที เติม folin reagent (เจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่เติมสารเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (standard albumin) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นของโปรตีนจะรายงานในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)

- ปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเลือดตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) โดยใช้ ortho-toluidine เป็นตัวรีดิวซ์น้ำตาล โดยเติมซีรัมตัวอย่างปริมาตร 100 µl ลงในหลอดที่บรรจุ 1 ml ของ 3% Trichoroacetic acid ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 2 - 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอน (centrifuge) ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที 2 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) มา 500 µl ผสมกับ 4.5 ml ของ color reagent ซึ่งประกอบด้วย Thiourea 1.5 g, Glacial acetic acid 940 ml และ O-toluidine 60 ml จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 7 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย trichloroacetic acid 500 µl ผสมกับ color reagent 4.5 ml เป็น blank คำนวณความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดจะรายงานในหน่วยมิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (mg%)

- ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือด (blood pH)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งแต่ละตัวโดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (micro pH meter)

- การแข็งตัวของเลือด (clotting time)

การหาค่า clotting time ของเลือดกุ้งกุลาดำ จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งปริมาตรประมาณ 300 µl โดยไม่ผสม anticoagulant บรรจุเลือดลงในหลอด microcentrifuge tube และจับเวลาทันที ตรวจสอบการแข็งตัวของเลือดโดยสังเกตการเปลี่ยนสภาพไปเป็นวุ้น (gelation) ของเลือดในหลอดทุก ๆ 20 วินาที จนครบ 2 นาที บันทึกเวลาที่เลือดแข็งตัว

5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

แต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งในบ่อดินและชุดทดลองในห้องปฏิบัติการ จะเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณออกซิเจนละลาย ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) และแอมโมเนีย ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) เพื่อใช้เป็นดัชนีกำหนดการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของกุ้งที่นำมาเลี้ยงภายใต้สภาพการทดลอง

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลองจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA)