บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง กุ้งกุลาลาย
2. เครื่องมือผ่าตัด
3. แผ่นสไลด์ และ กระจกปิดสไลด์ (slide and cover glass)
4. ภาชนะใส่กุ้งกุลาลาย
5. หลอดหยด
6. เข็มเขี่ย
7. คีมคีบ
8. กระดาษทิชชู
9. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide wormmer)
10. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (OLYMPUS รุ่น BX51 ที่ประกอบด้วยชุดถ่ายภาพดิจิตอล DP50)
11. เครื่องตัดตัวอย่าง (ultra - microtome)
12. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (PHILLIP รุ่น TECNAI 20) และแบบส่องกราด (LEO รุ่น LEO 1450 VP)
13. pH meter
14. thermometer
15. hand refractometer
16. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius CP224S)
17. เครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying)
18. เครื่องเคลือบทอง (ion sputtering) (Polaron Range SC7620)
19. ไม้บรรทัด ดินสอ ยางลบ และปากกา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาลาย

เก็บตัวอย่างของกุ้งกุลาลายจากชาวประมงที่สะพานปลาอ่างศิลา ซึ่งเป็นกุ้งตัวเต็มวัยที่ได้จากการทำประมงบริเวณชายฝั่งทะเลบริเวณอ่างศิลาอำเภอเมือง จนถึงเกาะสีชัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยเริ่มทำการสำรวจและศึกษาตัวอย่างตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2554 เป็นระยะเวลา 13 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกเดือน เดือนละ 20 ตัว

การวัดขนาด และชั่งน้ำหนักกุ้ง

การวัดขนาดกุ้ง มีการวัด 2 แบบ คือ การเริ่มวัดจากบริเวณปลายกรี (rstrum) ของกุ้งจนถึงบริเวณปลายหาง (telson) เรียกว่า total length และ การวัดจาก postorbital จนถึง ปลายหาง เรียกว่า standard length และชั่งน้ำหนักกุ้งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น ทุกเดือน เดือนละ 2 ครั้ง ในวันที่ 1 และ 15 ของแต่ละเดือนโดยเก็บน้ำเวลา 10.00 ถึง 11.00 น. วัดอุณหภูมิโดยใช้ thermometer และเก็บตัวอย่างน้ำทะเลที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตรจากผิวน้ำทะเลและวัดค่า pH โดยใช้ pH meter และวัดความเค็ม โดยใช้ hand refractometer

การศึกษาค่าความชุกและสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp.

1. การตรวจหาโปรโตซัวปรสิตโดยนับจำนวน gamont , syzygy และ gametocyst

โดยใช้กรรไกรตัดส่วนเปลือกกุ้งบริเวณกลางหลังโดยเริ่มตั้งแต่ปลายสุดของหางไปจนถึงปลายสุดของหัวกุ้ง แล้วจึงใช้คีมคีบดึงลำไส้ของกุ้งออกมา จากนั้นนำมาวางบนแผ่นสไลด์หยดน้ำทะเลลงไปแล้วใช้เข็มเขี่ยฉีกลำไส้ออกจากกันปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวน และดูลักษณะรูปร่างของปรสิต *Nematopsis* sp. ระยะ gamont , syzygy และ gametocyst ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานของปรสิต หลังจากนั้นจึงจำแนก นับจำนวนและถ่ายภาพ *Nematopsis* sp. ระยะต่าง ๆ เก็บไว้เพื่อศึกษาต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ศึกษาจุลกายวิภาคของ *Nematopsis* sp. ในลำไส้ของกุ้งกุลาลาย

ทำการศึกษาจุลกายวิภาค ของ *Nematopsis* sp. โดยการใช้ scaning electron microscopy (SEM) และ transmission elcctron microscopy (TEM) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การเตรียมตัวอย่าง สำหรับ scaning electron microscopy (SEM)

นำตัวอย่าง *Nematopsis* sp. ระยะ syzygy จากลำไส้กุ้ง มาทำการรักษาสภาพโดยแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วล้างด้วย 0.1 M PBS , pH 7.8 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นแช่ใน 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffcr saline (PBS) pH 7.8 ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างด้วย 0.1 M PBS , pH 7.8 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกรอง ประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยแช่ใน 70 % 80 % 90 % 95 % 2 ครั้ง และ absolute ethanol 3 ครั้ง ความเข้มข้นละ 20 นาที ตามลำดับ (ตั้งแต่ขั้นตอนการล้างด้วย 0.1 M PBS , pH 7.8 จนกระทั่งถึงแช่ตัวอย่างใน absolute ethanol ครั้งที่ 1ทำที่อุณหภูมิ 4 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 30 – 50 รอบ/นาที และการแช่ใน absolute ethanol ครั้งที่ 2 และ 3 ทำที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 30 – 50 รอบ/นาที) นำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) ติดตัวอย่างลงบน aluminum stub นำไปเคลือบทอง (ion sputtering) ที่ 10 KV หลังจากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

การเตรียมตัวอย่าง สำหรับ transmission electron microscopy (TEM)

นำตัวอย่าง *Nematopsis* sp. ระยะ syzygy จากลำไส้กุ้ง มาทำการรักษาสภาพ โดยการแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วล้างด้วย 0.1 M PBS , pH 7.8 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แช่ใน 1% osmium tetroxide ใน0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย 0.1 M PBS , pH 7.8 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยแช่ใน 70 % 80 % 90 % 95 % ethanol 2 ครั้ง absolute ethanol 3 ครั้ง และ Propreline oxide (PO) 2 ครั้ง ความเข้มข้นละ 20 นาที ตามลำดับ (ตั้งแต่ขั้นตอนการล้างด้วย 0.1 M PBS , pH 7.8 จนกระทั่งถึงแช่ตัวอย่างใน absolute ethanol ครั้งที่ 1ทำที่อุณหภูมิ 4 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 30 – 50 รอบ/นาที และหลังจากแช่ใน absolute ethanol ครั้งที่ 1 ถึงการแช่ใน Proprelinc oxide ทำที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 30 – 50 รอบ/นาที) ทำการกำซาบ (infiltration) ตัวอย่างโดยนำมาแช่ในสารผสมระหว่าง Propylene oxide และ Rasin ในอัตราส่วน 2:1 ประมาณ 1 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และ 1:2 ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝาให้ PO ระเหย นานประมาณ 6 – 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปฝังใน pure araldite 502 resin นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 °C ประมาณ 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 65 °C ประมาณ 48 ชั่วโมง นำไปตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่าง (ultra - microtome) ให้มีความหนาประมาณ 1 ไมโครเมตร และย้อมด้วย 1% methylene blue ในน้ำ (สำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง) และตัดตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ 60 – 90 นาโนเมตร ย้อมสีด้วย 5% uranyl acetate ใน 70% methanol และ 0.1% lead citrate ในน้ำอย่างละ 20 นาที ตามลำดับ นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

การศึกษาพยาธิสภาพลำไส้ของกุ้งกุลาลายที่มีการระบาดของ *Nematopsis* sp.

การเตรียมตัวอย่าง

ตัดลำไส้กุ้งกุลาลายเป็น ที่พบว่ามีการติดเชื้อ *Nematopsis* sp. ตามธรรมชาติ มาทำการรักษาสภาพโดยการแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.8 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยแช่ใน 70 % 80 % 90 % ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง 95 % 2 ครั้ง และ absolute ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ ที่ อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 30 – 50 รอบ/นาที จากนั้นทำการกำซาบ (infiltration) ตัวอย่างโดยนำมาแช่ใน xylene 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง และสารผสมระหว่าง xylene : melted paraplast ในอัตราส่วน 2:1 และ 1:1 ตามลำดับ ขั้นตอนละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 °C หลังจากนั้นแช่ใน pure paraplast 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 °C แล้วฝังเนื้อเยื่อลงใน paraplast (embedding) และลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ paraplast แข็ง หลังจากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่อง rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 5 – 10 ไมครอน นำแผ่นตัวอย่างที่ตัดได้วางบนแผ่นสไลด์โดยยึดตัวอย่างให้ติดแผ่นสไลด์ด้วย gelatin แล้วนำไปย้อมสี Hematoxylin & Eosin ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การย้อมสี

นำสไลด์ตัวอย่างมาละลาย paraffin ออกโดยแช่ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วแช่ใน absolute ethanol 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที 95 % 90 % 70 % ethanol และน้ำกลั่น ครั้งละ 3 นาที ตามลำดับ ย้อมสี Harris's Hematoxylin 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านตลอด จนกระทั่งนิวเคลียสเป็นสีน้ำเงิน ถ้าตัวอย่างติดสีเข้มเกินไปให้จุ่มในสารละลาย 1% acid alcohol แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาไหลผ่าน แต่ถ้าสีจางเกินไปให้ย้อมสีใหม่อีกครั้ง และล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านตลอด ย้อมสี Eosin 30 – 45 วินาที ล้างสีส่วนเกินด้วย 95 % ethanol จากนั้น แช่ใน absolute ethanol 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที นำไปตูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าติดสีเข้มให้ล้างสีออกด้วย 95 % ethanol แต่ถ้าสีจางเกินไปให้ย้อมสีใหม่อีกครั้ง เมื่อได้สีตามต้องการแล้ว แช่ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที หลังจากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ permount เป็นตัวยึดติดแล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS รุ่น BX51) โดยศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งกุลาลาย และลักษณะของ *Nematopsis* sp. ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University