

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สัตว์ทดลองคือ กุ้งแคระ *N. heteropoda*

3.1.2 อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้งแคระ ได้แก่ โหลพลาสติกขนาด 7 นิ้ว, ป้อนอกซิเจน, สายออกซิเจน, หัวทราย และ อาหารกุ้งชนิดเม็ดจมน้ำ

3.1.3 อุปกรณ์ในการศึกษาการพัฒนาไข่หลังผสมและตัวอ่อนของกุ้งแคระ ได้แก่ ขวดฟักไข่, ป้อนอกซิเจน, สายออกซิเจน, ปากคีบ, ผ้าขาวบาง, สไลด์หลุม, plate และ dropper

3.1.4 อุปกรณ์และสารเคมีในการเตรียมฮอร์โมน ได้แก่ บีกเกอร์, แท่งแก้วคนสาร, ปิเปต, ลูกยาง, ขวดปรับปริมาตร, กระจกตวงสาร และ เครื่องชั่งสาร สารเคมี ได้แก่ ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดโอดอล และ แอลกอฮอล์

3.1.5 อุปกรณ์และสารเคมีในการดองกุ้งแคระ ได้แก่ บีกเกอร์, ขวดสีชา, ขวดไวโอล, แท่งแก้วคนสาร, กระจกตวงสาร, ปากคีบ, ปิเปต และ ลูกยาง สารเคมีได้แก่ แอลกอฮอล์, ฟอร์มาลิน, กรดแอซิดิก และ น้ำกลั่น

3.1.6 อุปกรณ์และสารเคมีในการเตรียมเนื้อเยื่อ ได้แก่ บีกเกอร์, สไลด์, กระจกปิดสไลด์, กล้องใส่ชิ้นเนื้อ, ภาดใส่ชิ้นเนื้อ, ตะเกียงแอลกอฮอล์, หม้อต้มพาราฟิน, ตะกร้าลูมิเนียม, เข็มเขี่ย, ปากคีบ, เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ, เครื่องตัดชิ้นเนื้อ, เครื่องอุ่นสไลด์, แท่นทำความเย็น และ อ่างทำความร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิ สารเคมีได้แก่ แอลกอฮอล์, แอมโมเนีย, chloroform, paraffin, xylene, hematoxylin, eosin staining และ permount

3.1.7 อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูล ได้แก่ กล้องสเตอริโอ, กล้องจุลทรรศน์ และ กล้องบันทึกภาพ

#### 3.2 วิธีการ

3.2.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาพัฒนาของไข่และตัวอ่อนของกุ้งแคระ *N. heteropoda*

3.2.1.1 ใช้กุ้งแคระเพศเมียที่ได้รับการผสมกับกุ้งเพศผู้ จนกุ้งเพศเมียได้สร้างไข่มาติดบริเวณ ขาวว่ายน้ำ

3.2.1.2 นำกุ้งเพศเมียที่มีไข่ที่ขาวว่ายน้ำ มาวางบนผ้าขาวบางเปียกน้ำ ใน plate กลม

3.2.1.3 นำไข่จากขาวว่ายน้ำของกุ้งเพศเมีย โดยใช้ ปากคีบ นำไข่ออกมาที่ละใบ จนครบ 5 ฟอง นำไข่ทั้งหมด โดยใช้ dropper มาใส่ในขวดฟักไข่ ให้ออกซิเจน และ เปลี่ยนน้ำทุกวัน

3.2.1.4 ใช้กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4X ถ่ายภาพการพัฒนาของไข่ที่ผสมแล้วตั้งแต่ไข่ได้รับการผสม จนไข่ฟักออกเป็นตัว

3.2.1.5 เมื่อไข่ฟักเป็นตัว แยกตัวอ่อนกุ้งแคระออกจากขวดฟักไข่ มาเลี้ยงในโหลพลาสติกขนาด 7 นิ้ว ใช้กล้องถ่ายภาพจากกล้องสเตอริโอถ่ายภาพการพัฒนาของตัวอ่อนกุ้งแคระเป็นเวลา 10 วัน

3.2.2 การทดลองที่ 2 การใช้ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดโอดอลในกุ้งแคระ *N. heteropoda*

3.2.2.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ปัจจัยที่ศึกษา คือ ระดับฮอร์โมนที่แตกต่างกันได้แก่ 0, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อลิตร ( $\mu\text{g/L}$ ) แบ่งชุดการทดลอง ออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ใช้กุ้งแคระ 4 ตัวต่อซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมไม่มีการเติมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดโอดอล

ชุดการทดลองที่ 2 ชุดการทดลองที่เติมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล 4 µg/L  
ชุดการทดลองที่ 3 ชุดการทดลองที่เติมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล 8 µg/L

### 3.2.2.2 วิธีการ

- (1) ใช้กึ่งแคระ *N. heteropoda* เพศเมีย จำนวน 60 ตัว
- (2) เตรียม ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล (ภาคผนวกที่ 1)
- (3) เตรียมโหลทดลองพลาสติกขนาด 7 นิ้ว และเติมน้ำในโหลทดลอง 3 ลิตร
- (4) เติมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ตามความเข้มข้นแต่ละชุดการทดลอง
- (5) นำกึ่งแคระเพศเมียมาเลี้ยงในโหลทดลองหลังจากเติมฮอร์โมน ให้ออกซิเจน และอาหารวันละ 1 ครั้ง
- (6) เลี้ยงกึ่งแคระเป็นเวลา 96 ชั่วโมง
- (7) สุ่มกึ่งแคระ 2 ตัวในแต่ละซ้ำของชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไปศึกษาเนื้อเยื่อ รังไข่ (ภาคผนวกที่ 2)

3.2.3 การทดลองที่ 3 การเพาะพันธุ์กึ่งแคระในอัตราส่วนเพศต่างกันที่มีความหนาแน่นเท่ากัน

#### 3.2.3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ปัจจัยที่ศึกษา คือ อัตราส่วนเพศที่ต่างกัน ได้แก่ 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เพศผู้:เพศเมีย เท่ากับ 1:1

ชุดการทดลองที่ 2 เพศผู้:เพศเมีย เท่ากับ 1:2

ชุดการทดลองที่ 3 เพศผู้:เพศเมีย เท่ากับ 1:3

#### 3.2.4.2 วิธีการ

(1) เตรียมโหลพลาสติกทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 เซนติเมตร สูง 22.5 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 3 ลิตร จำนวน 12 ถัง ปูพื้นโหลด้วยกระดาษสีขาว

(2) คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กึ่งแคระโดยกึ่งแคระเพศเมียที่นำมาใช้ในการทดลองคือกึ่งแคระที่มีไข่ติดท้อง ให้แยกแม่กึ่งแคระออกมาฟักไข่พ่อแม่กึ่งแคระฟักไข่หมดแล้วให้นำมาฟักไว้ 2 วัน จากนั้นคัดขนาดของรังไข่ให้มีความใกล้เคียงกัน ส่วนกึ่งแคระผู้ที่นำมาใช้ในการทดลองคัดขนาดตัวให้ใกล้เคียงกัน

(3) ปลอ่ยกึ่งแคระเพศผู้และเพศเมียให้ผสมพันธุ์ในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย โดยชุดการทดลองที่ 1 อัตราส่วน 1:1 โดยเลี้ยงกึ่งแคระตัวผู้ 12 ตัว และกึ่งตัวเมีย 12 ตัว, โดยชุดการทดลองที่ 2 อัตราส่วน 1:2 โดยเลี้ยงกึ่งแคระตัวผู้ 8 ตัว และกึ่งตัวเมีย 16 ตัว และโดยชุดการทดลองที่ 3 อัตราส่วน 1:3 โดยเลี้ยงกึ่งแคระตัวผู้ 6 ตัว และกึ่งตัวเมีย 18 ตัว

(4) ให้อาหารสำเร็จรูป 1 ครั้งต่อวัน ใส่ในจานแก้วขนาดเล็ก

(5) เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนประมาณ ¼ ของถัง ทุก ๆ วันพร้อมเติมน้ำให้ได้

ระดับเดิม

### 3.2.5 การบันทึกข้อมูล

3.2.5.1 บันทึกภาพการพัฒนาตัวอ่อนกึ่งแคระ *N. heteropoda*

3.2.5.2 บันทึกระยะเวลาไข่ที่ผสมแล้วของกึ่งแคระ *N. heteropoda* ฟักเป็นตัว

3.2.5.3 บันทึกภาพเนื้อเยื่อรังไข่ของกึ่งแคระ *N. heteropoda*

3.2.5.4 บันทึกภาพจำนวนคราบในแต่ละวันเปรียบเทียบในแต่ละชุดการทดลอง

3.2.5.5 การวางไข่ของแม่กุ้งและทำการนับลูกกุ้งทุกๆสัปดาห์

3.2.5.6 คำนวณหาอัตราการรอด และอัตราการเจริญเติบโต ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{อัตราการรอด (Loss Percentage)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่เหลือ}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต} = \frac{\text{น้ำหนักตัวครั้งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักตัวเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน)}}$$