บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ทำการทดลอง

1. ด้านการเลี้ยง

1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1.1.1 ไข่ขาว

1.1.2 เครื่องให้อากาศ (Yamano AP-120)

1.1.3 ตู้ปลาขนาด 12x24x15 นิ้ว

1.1.4 ปั๊มน้ำ (Sonic AP-1200)

1.1.5 พันธุ์ปลาทอง

1.1.6 ใยกรอง

1.1.8 สายอากาศ

1.1.9 สาหร่ายไกผง

1.1.10 สาหร่ายสไปรูลินาผง

1.1.12 หัวทราย

1.1.13 อาหารลูกกบสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ

1.1.14 ฮิตเตอร์ (Regent 100 w)

2 ด้านการวัดการเจริญเติบโต

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

2.1.1 กะละมัง

2.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 1 ตำแหน่ง (And HL-1000 WP)

2.1.3 ไม้บรรทัด

2.1.4 สวิง

2.2 สารเคมี

2.2.1 ยาสลบ (2-Phenoxy-ethanol)

3 ด้านการวัดดัชนีความสมบูรณ์เพศ

3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.1.1 กรรไกร

3.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 210 S)

3.1.3 จานแก้ว

3.1.4 ปากคีบ

3.1.5 มีดผ่าตัด

3.1.6 สำลี

4. ด้านการประเมินระบบภูมิคุ้มกัน

4.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

4.1.1 กรรไกร

4.1.2 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CX21)

4.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kobota 5100)

4.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich chiveral 32 R)

4.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Heraeus instruments biofuge haemo)

4.1.6 ดินน้ำมัน

4.1.7 ตะแกรงลวด

4.1.8 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Samsung)

4.1.9 ตู้เย็น-20 องศาเซลเซียส (Sunyo)

4.1.10 ถาดใส่ Microtubes

4.1.11 ปากคีบ

4.1.12 มีดผ่าตัด

4.1.13 ไมโครปิเปต

4.1.14 สไลด์ และแผ่นปิดสไลด์สำลี

4.1.15 หลอดฉีดยา และเข็ม

4.1.16 Autoclave (Becthai hirayama)

4.1.17 Capillary

4.1.18 Conical tube

4.1.19 Coplin jar

4.1.20 Haemacytometer

4.1.21 Microtubes

4.1.22 Pipet tips

4.1.23 Plate

4.1.24 Shaker (Kika Cabotechnik KS 501 digital)

4.1.25 96-well plate (U sheped)

4.2 สารเคมี

4.2.1 น้ำกลั่น

4.2.2 สารละลาย A

4.2.3 สารละลาย B

4.2.4 สารละลาย Fixtive

4.2.5 สารละลาย RPMI 1640 (Sigma)

4.2.6 สารละลาย Phosphate buffer saline

4.2.7 *Aeromonas hydrophila*

4.2.8 Ficoll paque

4.2.9 Pen/Strep Solution 100X (Invitromex)

4.2.10 *Saccaromyces cerevisae* (V1116)

5. ด้านการประเมินสีบนตัวปลา

5.1 เครื่องวัดสี (Koniki minolta color reader CR-10)

6. ด้านการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

6.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

6.1.1 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

6.1.2 กระบอกตวง

6.1.3 กรวยกรอง

6.1.4 ขวดเก็บน้ำตัวอย่าง

6.1.5 ขวดบีโอดี

6.1.6 ขวดรูปชมพู่

6.1.7 คอลัมน์พร้อมขาตั้ง

6.1.8 บิวเรตพร้อมขาตั้ง

6.1.9 บิ๊กเกอร์

6.1.10 ปิเปต

6.1.11 หลอดหยด

6.1.12 Thermometer

6.1.13 pH-meter (HI 9821)

6.1.14 Spectrophotometer (Spectro SC)

6.2 สารเคมี

6.2.1 ผงแคดเมียม

6.2.2 น้ำแป้ง

6.2.3 สารละลายมาตรฐานไนเตรท

6.2.4 สารละลาย Alkali iodide azide reagent

6.2.5 สารละลายมาตรฐาน Ammonium chloride

6.2.6 สารละลาย Coupling reagent

6.2.7 สารละลาย $CuSO_4$ 2 เปอร์เซ็นต์

6.2.8 สารละลาย Diazotizting reagent

6.2.9 สารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น

6.2.10 สารละลาย Manganous sulfate

6.2.11 สารละลาย Molybdate reagent

6.2.12 สารละลาย NH_4Cl เข้มข้น

6.2.13 สารละลาย NH_4Cl เจือจาง

6.2.14 สารละลาย Oxidizing

6.2.15 สารละลาย Phennate

6.2.16 สารละลาย Rochelle salt

6.2.17 สารละลาย Sodium thiosulfate 0.025 โมลาร์

6.2.18 สารละลาย Stannous chloride reagent

7. ด้านการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ แคโรทีนอยด์ และไฟโคไซยานินในอาหาร

7.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

7.1.1 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

7.1.2 กระบอกฉีดน้ำ

7.1.3 กระบอกตวง

7.1.4 ขวดก้นแบน

7.1.5 ขวดรูปชมพู่

7.1.6 คีม

7.1.7 เครื่องทำความร้อน (Gerhardt)

7.1.8 เครื่องกลั่น (Gerhardt)

7.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kobota 5100)

7.1.10 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 210 S)

7.1.11 จานอลูมิเนียม

7.1.12 ตู้ควัน (Super flow fume cupboard)

7.1.13 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

7.1.14 เตาเผา (Carbolite CWF 1200)

7.1.15 เตาอบแห้ง (WTB Binder)

7.1.16 ถ้วยกระเบื้อง

7.1.17 ถ้วยกรองแก้ว

7.1.18 โถอบแห้ง

7.1.19 แท่งแก้วคนสาร

7.1.20 บิวเรตพร้อมขาตั้ง

7.1.21 บีกเกอร์

7.1.22 ปิเปต

7.1.23 ลูกแก้ว

7.1.24 สำลี

7.1.29 หลอดทดลอง

7.1.30 Hot plate (Velp scientifica)

7.1.31 Crucible

7.1.32 Sonicator (Wheation oberhend stirrer)

7.1.33 Soxhlet apparatus

7.1.34 Kjeldahl flask

7.1.35 Water bath

7.1.36 Spectrophotometer (Spectro SC)

7.1.37 Thimble

7.2 สารเคมี

7.2.1 น้ำกลั่น

7.2.2 สารเร่งปฏิกิริยา

7.2.3 สารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น

7.2.4 สารละลาย H_2SO_4 1.25 เปอร์เซ็นต์

7.2.5 สารละลาย H_2SO_4 1 นอร์มอล

7.2.6 สารละลาย KOH 60 เปอร์เซ็นต์

7.2.7 สารละลาย NaCl 9 เปอร์เซ็นต์

7.2.8 สารละสาย NaOH 45 เปอร์เซ็นต์

7.2.9 สารละลาย NaOH 1.25 เปอร์เซ็นต์

7.2.10 สารละลาย NaOH 1 นอร์มอล

7.2.11 สารละลาย Na_2HPO_4 10 มิลลิโมลาร์

7.2.12 แอลกอฮอล์

7.2.13 Anifoam

7 2.14 Diethyl ether

7.2.15 Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

7.2 16 Hexane

7.2.17 Sodium azide

7.2.18 Screened methyl red indicator

วิธีการวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลาทอง เพื่อศึกษาการเติบโต ดัชนีความสมบูรณ์เพศ ระบบภูมิคุ้มกัน และการเปลี่ยนแปลงสี ด้วยอาหารผสมสาหร่าย 2 ชนิดในระดับที่แตกต่างกันโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) แบ่งออกเป็น 4 หน่วยการทดลอง (Treatment) แต่ละหน่วยการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ (Replication) ดั้งนี้

การทดลองที่ 1 ใช้อาหารลูกกบสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ (ชุดควบคุม)

การทดลองที่ 2 ใช้อาหารลูกกบสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำผสมสาหร่ายสไปรูลินา ผง 6 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 ใช้อาหารลูกกบสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำผสมสาหร่ายสไปรูลินา ผง 12 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 4 ใช้อาหารลูกกบสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำผสมสาหร่ายไกผง 6 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณของสาหร่ายสไปรูลินา และสาหร่ายไกที่นำมาผสมอาหารในการทดลองครั้งนี้ได้จากการต่อยอดในงานวิจัยของ จงกล และคณะ (2552)

2. การเตรียมตู้ และปลาที่ใช้ในการทดลอง

2.1 การเตรียมตู้ทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ตู้ขนาด 12x24x15 นิ้ว 12 ตู้ เตรียมระบบการให้อากาศ และระบบกรอง เติมน้ำ 23 เซนติเมตร (40 ลิตร)

2.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำปลาทองมาจากร้านขายปลาสวยงามในอำเภอเมืองเชียงใหม่มาพัก เพื่อให้ปลาปรับสภาพให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมของการวิจัยเป็นเวลา 1 เดือน โดยให้อาหารในชุดควบคุม วันละ 2 ครั้งคือ 09.00 น. และ 17.00 น. จากนั้นปล่อยปลาลงเลี้ยงทำการทดลอง 5 ลิตร ต่อ 1 ตัว (วันเพ็ญ และกาญจนา, 2547) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อเริ่มต้นเท่ากับ 13.9±0.73 กรัม

2.3 การเตรียมอาหาร

ใช้อาหารลูกกบสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำนำมาคลุกกับสาหร่ายผงตามปริมาณที่กำหนดไว้คือสาหร่ายสไปรูลินาผง 6 และ12 เปอร์เซ็นต์ และผสมสาหร่ายไกผง 6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไข่ขาวเป็นตัวประสานปริมาณ 60 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้อาหาร 3-5 เปอร์เซ็นต์

ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้งคือ 09.00 น. และ 17.00 น. ปรับปริมาณอาหารทุกๆ 30 วัน ตลอดทุกการทดลอง และวิเคราะห์คุณคาทางโภชนาการของอาหารที่ใช้ทดลองทุกการทดลองตามตาราง 5

ตาราง 5 ปัจจัยและวิธีการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหาร

ปัจจัยที่วิเคราะห์	วิธีการ นิวุฒิ (2547)
โปรตีน (Protein)	โดยวิธี micro-Kjeldahl
ไขมัน (Lipid)	โดยวิธี dichloromethane extraction ตาม Soxlhet method
ใยอาหาร (Fiber)	โดยวิธี fritted glass crucible
เถ้า (Ash)	โดยการเผาใน muffle furnace 550 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง
ความชื้น (Moisture)	โดยการอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
แคโรทีนอยด์รวม (Total Carotenoids)	Sommer *et al.* (1992)
ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin)	Silveira *et al.* (2007)

ตาราง 6 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารในแต่หน่วยการทดลอง

คุณค่าทางโภชนาการ	ระดับสาหร่ายที่ผสมในอาหาร (เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดควบคุม	สไปรูลินา 6	สไปรูลินา 12	ไก 6
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	9.3 ± 0.23^{b}	11.2 ± 0.07^{a}	8.2 ± 0.11^{c}	6.9 ± 0.14^{d}
เถ้า (เปอร์เซ็นต์)	12.1 ± 0.40^{c}	12.5 ± 0.18^{c}	13.5 ± 0.61^{b}	15.2 ± 0.37^{a}
ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	13.7 ± 0.65^{ab}	13.1 ± 0.44^{b}	14.6 ± 1.02^{a}	11.5 ± 0.02^{c}
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	30.1 ± 1.41^{ns}	31.7 ± 4.04^{ns}	33.3 ± 1.15^{ns}	30.3 ± 2.39^{ns}
ใยอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	2.3 ± 0.13^{a}	1.0 ± 0.06^{c}	0.9 ± 0.03^{c}	1.6 ± 0.14^{b}
ไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	0.01 ± 0.01^{c}	0.04 ± 0.01^{b}	0.05 ± 0.01^{a}	0.02 ± 0.01^{bc}
แคโรทีนอยด์รวม (มิลลิกรัมต่อกรัม)	0.01 ± 0.00^{d}	0.07 ± 0.00^{b}	0.15 ± 0.00^{a}	0.03 ± 0.00^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD ที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) และ ns แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.4 การเก็บข้อมูล

ชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์การเติบโตตามข้อ 3 ทุกๆ 30 วัน วัดดัชนีความสมบูรณ์เพศ เก็บตัวอย่างของเลือดแล้วนำวิเคราะห์ค่าต่างๆ ตามข้อ 5 ทุกๆ 60 วัน วัดสีบนตัวปลาด้วยเครื่องวัดสี Koniki minolta color reader CR-10 ทุกๆ 14 วันและวิเคราะห์คุณภาพน้ำวิเคราะห์ตามปัจจัยตามตาราง 7 ทุกๆ 30 วันจนสิ้นสุดการทดลองระยะเวลา 180 วัน

ก่อนการเก็บข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับปลาจะนำมาปลาทองมาทำการสลบโดยใช้ยาสลบ 2-Phenoxy-ethanol เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตาราง 7 ปัจจัยและวิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ปัจจัยที่วิเคราะห์	วิธีการ
อุณหภูมิของน้ำ,อากาศ	Thermometer
ความเป็นกรด-เป็นด่าง (pH)	pH-meter (HI 9821)
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)	Azide modification method
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N)	Phenol method
ไนไตรท์-ไนโตรเจน (NO_2-N)	Diazotization method
ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N)	Cadmium reduction method
ออร์โธฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (PO_4-P)	Stannous chloride method

3. การวิเคราะห์การเจริญเติบโต

3.1 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)

= น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

3.2 อัตราการเจริญเติบโต; กรัมต่อวัน (Average Daily Growth; ADG)

= (น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง)/ จำนวนวันที่ทำการทดลอง

3.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ; เปอร์เซ็นต์ต่อวัน (Specific Growth Rate; SGR)

= [(ln น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - ln น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) / จำนวนวันที่ทำการทดลอง] x 100

3.4 ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน; หน่วย (Protein Efficiency Ratio; PER)

= น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น / ปริมาณโปรตีนของอาหาร

3.5 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ; หน่วย (Feed Conversion Rate; FCR)

= น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่ให้ / น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

3.6 อัตราการรอดตาย; เปอร์เซ็นต์ (Survival rate)

= (จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง / จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) x 100

4. การประเมินดัชนีความสมบูรณ์เพศ เกรียงศักดิ์ (2547)

ดัชนีความสมบูรณ์เพศ; เปอร์เซ็นต์ (Gonadosomatic index; GSI)

= (น้ำหนักของรังไข่หรืออัณฑะ / น้ำหนักตัวปลา) x 100

5. การประเมินระบบภูมิคุ้มกัน

สุ่มตัวอย่างปลามา 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการสลบโดยใช้ยาสลบ 2-Phenoxy-ethanol เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เจาะเลือดปลาจากเส้นเลือด caudal vein ซึ่งอยู่บริเวณโคนหางของปลา โดยใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร เข็มเบอร์ 26G เก็บเลือดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และการตรวจวัดระดับแอนติบอดี

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed red blood cell volume) นพดล (2549)

การวัดปริมาณของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed red blood cell volume) หรือฮีมาโตคริต (Haematocrit) ในปลาโดยทั่วไปจะใช้วิธี microhaematocrit method ซึ่งจะเป็นการบรรจุเลือดปลาเข้าไปในหลอด capillary ขนาดเล็กที่มีการเคลือบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparinised) ไว้ที่ผิวด้านในปริมาณ 2/3 ของความยาวหลอดแล้วปิดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง นำหลอดไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที คำนวณเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นโดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด

Percent Packed red blood cell volume = (ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น / ปริมาตรเลือดทั้งหมด) x 100

5.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไต (ดัดแปลงจากวิธีของ ชฎาธาร, 2550; กัญช์ 2553 และ เยาวนิตย์ และคณะ, 2543)

ตัดไตเกลี่ยผ่านตะแกรงลวดลงในจานแก้วที่มีอาหาร (RPMI1640) อยู่ 3 มิลลิลิตร ดูดส่วนใสจากจานแก้วผ่านผ้ากรองขนาดตา 100 ไมครอน ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารแยกเม็ดเลือดขาว Ficoll Paqua 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร อีกหลอดแล้วดูดส่วนที่ได้จากการกรอง 3 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีสารแยกเม็ดเลือดขาว จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณที่ 2,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกเม็ดเลือดขาวที่มีลักษณะสีขาวขุ่นๆ อยู่ตรงกลางออกมาใส่ในหลอดทดลองอีกหลอดเติม RPMI1640 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนที่ใสด้านบนทิ้งทำซ้ำ 2 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.3 การเตรียมยีสต์ (วิธีการดัดแปลงมาจาก กัญช์, 2553)

ละลายผงยีสต์ (*Saccaromyces cerevisae*) ที่ได้มาจากห้างหุ้นส่วนจำกัดเวชวิทย์ อำเภอเมืองเชียงใหม่ ลงในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เพื่อใช้แทนสิ่งแปลกปลอมให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกิน และปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.4 การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) (ดัดแปลงจากวิธีของ ชฎาธาร, 2550; กัญช์ 2553 และ เยาวนิตย์ และคณะ, 2543)

นำเม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับยีสต์ความเข้มข้นเข้มข้น 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 50 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดกระบวนการการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ดูดส่วนผสมดังกล่าว 200 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที เทของเหลวที่อยู่ด้านบนสไลด์ออก แล้วล้างด้วย RPMI1640 2 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ติดสไลด์ออกย้อมเซลล์ด้วยวิธี diff quick ด้วยชุดน้ำยา Wright instant stain set โดยนำสไลด์จุ่มลงใน Fixative Solution และจุ่มลงใน Wright stain A แล้วจุ่มลงใน Wright stain B ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นรอให้แห้งจากนั้นนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งที่จับกินจับกินยีสต์ และไม่กินยีสต์จำนวนเซลล์ 200 เซลล์ต่อสไลด์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

Phagocytic activity = (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่กินเซลล์ยีสต์ / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่นับ) x 100

5.5 การแยกซีรัม ขวัญตา (2552)

ทำได้โดยนำของตัวอย่างเลือดปลามาเก็บไว้ให้แข็งตัวที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างเลือดไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดซีรัมส่วนใส่ด้านบนเก็บที่ อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

5.6 การเตรียมแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

เลี้ยงเชื้อ แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ด้วยอาหาร Lactose-Bouillon (LB) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น และปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง แล้วเติมฟอร์มาลิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปั่นล้างเซลล์อีกครั้ง และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่า Optical Density (OD) เท่ากับ 0.7 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

5.7 การตรวจวัดระดับแอนติบอดี (Bacterial agglutination activity) (ดัดแปลงจากวิธีของ Takano *et al.*, 2010 และ Swain *et al.*, 2010)

โดยนำซีรัมผสมกับ PBS (pH 7.2) อัตราส่วน 1:1 ในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม PBS 25 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate (U sheped) เติมส่วนผสมระหว่างซีรัมกับ PBS จำนวน 25ไมโครลิตร ทำการเจือจางซีรัมจากหลุมแรกของ 96-well plate ไปหลุมถัดไป จำนวน 25 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (OD เท่ากับ 0.75 ที่ 540 นาโนเมตร) 25 ไมโครลิตร ปิด plate ด้วย พลาสติกบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมง แปรผลปฏิกิริยา agglutination ที่เกิดขึ้นโดยผลบวกของปฏิกิริยา (positive reaction) จะสังเกตจากซีรัมที่ระดับการเจือจางสูงสุดแสดงการกระจายเป็นวงที่ก้นหลุม และถ้าเป็นจุดกลมๆ ที่ก้นหลุมแสดงถึงผลลบของปฏิกิริยา (negative reaction) และเปรียบเทียบระดับแอนติบอดี (antibody titer) ของปลา โดยระดับแอนติบอดีจะเป็นส่วนกลับของการเจือจางของหลุมสุดท้ายที่เกิดผลบวกของปฏิกิริยา agglutination มาเข้า log 10

6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ONE WAY ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างหน่วยการทดลอง จากนั้นใช้ Duncan Multiple Range Test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละหน่วยการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0