อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. ออโตเมติคไมโครปิเปต ขนาด 20 , 200 และ 1000 ไมโครลิตร
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Milton Roy รุ่น 401
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath GFL รุ่น 1083)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge ยี่ห้อ Hettich รุ่น mikro 200 R)
5. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
7. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
8. เครื่องเขย่าตะกอน (Vortex mixer)
9. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
10. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow ยี่ห้อ Larconco)
11. สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)
12. Stirrer hotplate
13. Salino-refractometer
14. กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 26G x 1.5 นิ้ว
15. Microcentrifuge tube
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์
17. จานเลี้ยงเชื้อ (pertri dish) และหลอดทดลอง (test tube)
18. แท่งแก้วสามเหลี่ยม (triangle) และเข็มเขี่ยเชื้อ
19. Homogenizer

สารเคมี

1. สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 (Sodium cacodylate trihydrate , $C_2H_6AsNaO_2.3H_2O$)
2. KCl (Potassium chloride)

3. $MgCl_2.6H_2O$ (Magnesium chloride hydrated)

4. $MgSO_4.7H_2O$ (Magnesium sulphate hydrated)

6. HCl (Hydrogen chloride)

7. NaOH (Sodium hydroxide)

8. L- glutamin (L-glutamic acid-5-amide , $C_5H_{10}N_2O_3$)

9. $CaCl_2.2H_2O$ (Calcium chloride dihydrate)

10. NaCl (Sodium chloride)

11. $NaHCO_3$ (Sodium hydrogen carbonate)

12. Hepes (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulonic acid, $C_8H_{18}N_2O_4S$)

13. L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine, $C_9H_{11}NO_4$)

14. 0.1 M NaOH (Sodium hydroxide)

15. 1% Potassium tartrate (di- potassium tartrate hemihydrate , $C_4H_4K_2O_6.O.5H_2O$)

16. 1% trypsin (trypsin from hog pancreas)

17. Bovine serum albumin

18. Folin (Ciocalteu's phenol reagent)

19. 0.5% $CuSO_4$ (Cupper sulphate)

20. อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium - 199

21. น้ำเกลือ 1.5% และ 2.6% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

22. เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (AQVH 001) จากห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

23. ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

24. Tri-sodium citrate

25. Glucose

26. กระดาษกรอง 0.22 μm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้วที่ 121°ซ นาน 15 นาที) ยกเว้นอาหารแข็ง Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)

การเตรียมสัตว์ทดลองสำหรับการทดลองที่ 1

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) อายุ 2 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10 กรัมต่อตัว มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการของโรค นำกุ้งใส่ในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร จำนวน 12 ตู้ โดยใส่กุ้งทดลองตู้ละ 10 ตัว เลี้ยงในน้ำเค็ม 20 ppt เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนวันเว้นวัน ประมาณ 50 % ใช้พลาสติกคลุมตู้เพื่อลดปริมาณแสงและให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้ทดลองเป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิตามินซีที่ใช้ผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

1.1 อาหารและการให้อาหาร

ให้อาหารอัตรา 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน ให้อาหารวันละ 4 มื้อ คือ เวลา 08.00 น., 13.00 น. , 18.00 น. และ 23.00 น. โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปและกลุ่มทดลองจะให้อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซี (Na,Ca-ascorbyl-2-monophosphate) เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก (น้ำมันปลาหมึกอัตรา 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม) นำอาหารที่เตรียมได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 : อาหารสำเร็จรูปที่ไม่ได้ผสมวิตามินซี (control)

ชุดการทดลองที่ 2 : อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซีในสัดส่วน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 : อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซีในสัดส่วน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 : อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซีในสัดส่วน 5 กรัมต่ออาหาร 1

กิโลกรัม

หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารเป็นเวลา 14 วัน จึงเก็บเลือดกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง โดยเก็บซ้ำละ 3 ตัว เพื่อใช้ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโดยการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Haemocytes Count), กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity) กิจกรรมของเม็ดเลือดในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) และกิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด (Bactericidal Activity)

1.2 รายงานผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ทรีทเมนต์ โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยตาราง ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

<u>การเตรียมสัตว์ทดลองสำหรับการทดลองที่ 2</u>

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) อายุ 2 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10 กรัมต่อตัว มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีอาการของโรค นำกุ้งใส่ในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร จำนวน 16 ตู้ โดยใส่กุ้งทดลองตู้ละ 15 ตัว เลี้ยงในน้ำเค็ม 20 ppt เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนวันเว้นวัน ประมาณ 50 % ใช้พลาสติกคลุมตู้เพื่อลดปริมาณแสงและให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้ทดลองเป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำการทดลอง

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้วิตามินซีต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

2.1 อาหารและการให้อาหาร

เมื่อทราบความเข้มข้นของวิตามินซี (Na,Ca-ascorbyl-2-monophosphate) ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 แล้ว จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการประเมินช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้วิตามินซีภายใน 1 เดือน โดยให้อาหารที่ผสมวิตามินซีในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 : อาหารสำเร็จรูปที่ไม่ได้ผสมวิตามินซี (control)

ชุดการทดลองที่ 2 : อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซี ให้เป็นเวลา 10 วันภายใน 1 เดือน

ชุดการทดลองที่ 3 : อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซี ให้เป็นเวลา 20 วันภายใน 1 เดือน

ชุดการทดลองที่ 4 : อาหารสำเร็จรูปผสมวิตามินซี ให้เป็นเวลา 30 วันภายใน 1 เดือน

ให้อาหารเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยเริ่มให้อาหารที่ผสมวิตามินซีของชุดการทดลองที่ 4 ก่อน ส่วนชุดการทดลองที่ 2 และ 3 จะให้อาหารที่ไม่ได้ผสมวิตามินซีเช่นเดียวกับกลุ่ม control จนกระทั่งเมื่อครบ 10 วันจึงเริ่มให้อาหารที่ผสมวิตามินซี (ชุดการทดลองที่ 3), และอีก 10 วันต่อมาจึงเริ่มให้อาหารที่ผสมวิตามินซี (ชุดการทดลองที่ 2) เมื่อครบระยะเวลา 1 เดือน จึงเก็บเลือดกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ซ้ำละ 3 ตัว เพื่อใช้ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโดยการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Haemocytes Count), กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity), กิจกรรมของเม็ดเลือดในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) และกิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด (Bactericidal Activity) หลังจากนี้แต่ละทรีทเมนต์จะให้อาหารเหมือนกลุ่มควบคุมและทำการตรวจระบบภูมิคุ้มกันทุก ๆ 10 วัน จนกว่าภูมิคุ้มกันของแต่ละชุดการทดลองจะลดลงอย่างชัดเจน

2.2 รายงานผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ทรีทเมนต์ โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 4 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยตาราง ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

<u>การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ</u>

การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียมสารละลายเซลล์เม็ดเลือด (Haemocytes Lysate Supernatant : HLS) โดยเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ที่มีส่วนผสมระหว่าง 5% L-cysteine ใน K-199 (modified M - 199 pH 7.4) กับ 10 % โซเดียมซิเตรท ที่บรรจุในหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร และใช้เข็มเบอร์ 24 G นำไปเจาะเลือดกุ้งที่ตำแหน่งโคน

ขาเดินคู่ที่ 3 โดยใช้อัตราส่วนเลือด : anticoagulant เท่ากับ 1 : 2 (เลือด 0.5 มิลลิลิตร : anticoagulant 1.0 มิลลิลิตร)

1. การตรวจนับเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ (Total Haemocytes Count)

หลังจากดูดเลือดจนได้ปริมาตรที่ต้องการใส่ใน microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หยดน้ำเลือด 10 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือด hemocytometer

1.1 นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

1.2 คำนวณปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดใน 1 มิลลิลิตรของเลือด เป็นจำนวนเซลล์/ลบ.มม.

2. การเตรียม Haemocyte Lysate Supernatant (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543 ก)

2.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งกุลาดำแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ anticoagulant จนได้ปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตร

2.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์ความว่องไวในการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ ตามวิธีข้อ 5 ตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 และละลาย (resuspend) ในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

2.3 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลานาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 จากนั้นแยกส่วนใสซึ่งเป็น Haemocyte Lysate Supernatant (HLS) นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและปริมาณโปรตีนทันที

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity) โดยดัดแปลงวิธีการมาจาก Soderhall and Hall (1984)

3.1 นำ Haemocyte Lysate Supernatant (HLS) มา 500 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายทริปซิน (0.1% trypsin ใน cacodylate buffer เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 30 นาที

3.2 เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) 500 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3.3 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (Blank)

Blank = trypsin + L-DOPA + cacodylate buffer (แทน HLS)

3.4 นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (Unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกำหนดค่าดังนี้

1 หน่วยของ phenoloxidase Δ = OD_{490} ที่เพิ่มขึ้น 0.001/1 นาที/มก.โปรตีน

4. การวิเคราะห์โปรตีนใน Haemocyte Lysate Supernatant (HLS) ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

4.1 นำ Haemocyte Lysate Supernatant (HLS) 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมา 0.5 มิลลิลิตร

4.2 เติม reagent c 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที

4.3 เติม reagent d 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที

4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทียบกับกราฟความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข

Blank = สารละลาย cacodylate buffer 0.3 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร เติม reagent c และ d อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร

การเตรียมสารวิเคราะห์โปรตีน

Reagent a เตรียมจาก 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/ปริมาตร Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 M NaOH

Reagent b เตรียมจาก 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4$ ละลายใน 1 เปอร์เซ็นต์ potassium tatrate

Reagent c เตรียมจาก 0.5 มิลลิลิตรของ Reagent a รวมกับ 1 มิลลิลิตรของ Reagent b

Reagent d เตรียมจาก folin 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 2 ส่วน

5. การศึกษากิจกรรมในการทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal Activity) ของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543 ก)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

5.1 เจาะเลือดจากกุ้งแต่ละตัว และนำมาแยกซีรั่ม จากนั้นนำมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในระดับ 1:2 , 1:4 , 1:8 , 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

5.2 นำเชื้อ *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาละลายในน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.1 - 0.15 ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^6 cfu/ml นำเชื้อไปเติมในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรั่มปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.3 นำส่วนผสมในแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spread plate

5.4 บันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

6. การศึกษากิจกรรมฟาโกไซโตซีสของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ (Phagocytosis Activity) ดัดแปลงจากวิธีของ Itami *et al.* (1994)

6.1 เก็บเลือดกุ้งกุลาดำแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ anticoagulant 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

6.3 ทิ้ง supernatant ด้านบนโดยใช้ dropper ค่อย ๆ ดูดออก อย่าให้ตะกอนของเม็ดเลือดฟุ้งออกมา

6.4 เติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette และค่อย ๆ ใช้ pipette ดูดขึ้นลง เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.5 นำสารละลายยีสต์ 10 µl ส่องดูใน hemacytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1×10^8 cells/ml.

6.6 นำสารละลายเซลล์จำนวน 200 µl เลี้ยงบน cover slip โดย spread ให้ทั่วทิ้งไว้ 20 นาที

6.7 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6.8 หยดสารละลาย Heat-killed yeast 2 ml ลงไป ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.9 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

6.10 หยดน้ำยา fixative (95% alcohol) 1 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

6.11 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง 20-60 นาที

6.12 หยด Giemsa's stain ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นและตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

6.13 นำสไสด์ไปส่องดูปริมาณเซลล์เม็ดเลือดกุ้งในการจับกินสิ่งแปลกปลอม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

6.14 นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซีส (% phagocytosis) และฟาโกไซติก อินเด็กซ์ (phagocytic index ; PI) ดังนี้

$$\%\ \text{phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{phagocytic index ; PI} = \frac{\text{จำนวนยีสต์ที่ถูกกิน}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน 2548 และสิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2548

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ทราบถึงปริมาณที่เหมาะสมในการใช้วิตามินซีเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาการให้วิตามินซีเพื่อเป็นมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

แหล่งสนับสนุนเงินทุน

1. ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
2. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์