บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ

1. น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง

1.1 น้ำทะเลที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลและน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคมจากจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา และสุราษฎร์ธานี เพื่อใช้แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

1.2 น้ำทะเลที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2. จุลินทรีย์

2.1 ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจำนวน 7 สายพันธุ์ที่แยกได้ในการทดลองครั้งนี้ เก็บรักษาแบคทีเรียในอาหารวุ้นสูตร G5 (ภาคผนวก ก) โดยวิธีการ stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บรักษาเชื้อในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อทุก 2 เดือน

2.2 *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ แยกและจำแนกสายพันธุ์โดยศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เก็บรักษาเชื้อในอาหารวุ้นสูตร nutrient agar (Merck) + เกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และถ่ายเชื้อทุก 2 วัน แบคทีเรียมีค่า LD_{50} สำหรับกุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือนเท่ากับ10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. กุ้งกุลาดำ

ใช้กุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือน จากแหล่งเดียวกัน จำนวน 400 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละประมาณ 1 กรัม

4. **สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ**

4.1 อาหารเหลวGM (ภาคผนวก ก) เป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

4.2 อาหารเหลวดัดแปลงจากอาหาร GM มี 5 สูตรดังนี้

สูตร DM1 เติมกลูโคสปริมาณ 2.7 กรัมต่อลิตร แทนกรดมาลิก ส่วนประกอบอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

สูตร DM2 เติมซูโครสปริมาณ 2.7 กรัมต่อลิตร แทนกรดมาลิก ส่วนประกอบอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

สูตร DM3 เติมผงชูรสปริมาณ 3.8 กรัมต่อลิตร แทนกรดแอลกลูตามิก ส่วนประกอบอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

สูตร DM4 เติมยีสต์สกัดปริมาณ 3.8 กรัมต่อลิตร แทนกรดแอลกลูตามิก ส่วนประกอบอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

สูตร DM5 เติมกลูโคสปริมาณ 2.7 กรัมต่อลิตร แทนกรดมาลิกและเติมผงชูรส ปริมาณ 3.8 กรัมต่อลิตร แทนกรดแอลกลูตามิก ส่วนประกอบอื่นไม่เปลี่ยนแปลง

4.3 อาหารเหลวซัลไฟด์ (sulfide) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (ภาคผนวก ก)

4.4 อาหารเหลว DMB สำหรับทดสอบการลดไนเตรทและไนไตรท์ (ภาคผนวก ก)

4.5 น้ำทะเลปลอดเชื้อ ใช้น้ำทะเลในข้อ 1.2 ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ใช้เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และ *V. harveyi*

4.6 อาหาร Thiosulphate citrate bile salt medium (TCBS) (Merck) เป็นอาหารเฉพาะ (Selective media) ของแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอใช้นับเชื้อ *V. harveyi*

4.7 อาหาร Nutrient broth (Merck) ใช้เลี้ยง *V. harveyi*

4.8 อาหารแข็ง Nutrient agar (Merck) ใช้เก็บรักษา *V. harveyi*

4.9 อาหารแข็ง Muller Hinton (Merck) ใช้ทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*

5.อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือน แบ่งเป็น 4 สูตร คือ สูตรอาหารปกติใช้เลี้ยงกุ้งชุดควบคุม และสูตรอาหารที่มีการผสมเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกลงในอาหารปกติ ในอัตรา 0.1, 1.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตารางภาคผนวกที่ ข1

6.สารเคมี

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ใช้ในการแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และวิเคราะห์ผลของภูมิต้านทานของกุ้งกุลาดำ

อุปกรณ์

เครื่องมือวัดพีเอช ยี่ห้อ Scohtt รุ่น CG 825 ของบริษัท SV. Medico จำกัด

เครื่องวัดแสง (Lux meter) รุ่น LX-50 ของบริษัท Digcon จำกัด

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 พร้อมด้วยเครื่องพิมพ์ของบริษัท Hitachi Koki จำกัด

เครื่องเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR20 B ของบริษัท Hitachi Koki จำกัด

เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น G25

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

เก็บตัวอย่างน้ำทะเล ตัวอย่างดินและน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 249 ตัวอย่าง โดยใส่ตัวอย่างน้ำปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างดินประมาณ 1 กรัม ในอาหารเหลว G5 พีเอช 8.0 ที่บรรจุในหลอดทดลอง โดยใส่อาหารให้มีพื้นที่เหลือเมื่อใส่ตัวอย่างน้ำหรือตัวอย่างดินแล้วปริมาตรสารทั้งหมดเต็มหลอดทดลอง บ่มหลอดทดลองในสภาวะไร้อากาศ มีแสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิช่วง 40-45 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เมื่อเกิดสีแดง, น้ำตาล, ส้ม, เหลืองน้ำตาลหรือชมพู ให้นำมาขีดบนอาหารแข็ง G5 แล้วบ่มจานเพาะเชื้อในโถดูดความชื้นที่ทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ โดยการจุดเทียนไขและปล่อยให้เทียนดับ และให้แสง 3000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิช่วง 40-45 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน หลังจากได้โคโลนีเดี่ยวๆบนจานเพาะเชื้อ ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีที่มีสีต่างๆเพื่อทดสอบการติดสีแกรมและตรวจสอบความบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นถ่ายโคโลนีที่ต้องการลงบนอาหารแข็ง G5 ที่บรรจุในหลอดทดลองโดยวิธี stab บ่มเชื้อในสภาวะที่กล่าวมา

2. การเลี้ยงและการวัดการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

2.1 ในการเซลล์เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทำการทดลองโดยใช้ขวดแบนใสที่มีขนาดความจุ 375 มิลลิลิตร โดยใส่อาหาร 315 มิลลิลิตร วางขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ในอ่างพลาสติกใสที่

สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (ภาพที่ 3) ใช้หลอดทังสเตนเป็นแหล่งกำเนิดแสง ความเข้มแสงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ควบคุมให้เท่ากับ 3000 ลักซ์ หากการเลี้ยงเซลล์ในข้อใดต่างจากนี้จะระบุอีกครั้ง

2.2 ศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

3. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆในอาหารเหลวซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ จากอาหารแข็ง GM ประมาณ 1 ลูป ใส่ในอาหารเหลวซัลไฟด์ พีเอช 8.0 ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x125 mm บ่มหลอดทดลองตามวิธีในข้อ 2.1 สังเกตการเจริญได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารจากใสไม่มีสี เป็นสีแดง หรือสีน้ำตาล

4. ศึกษาชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์

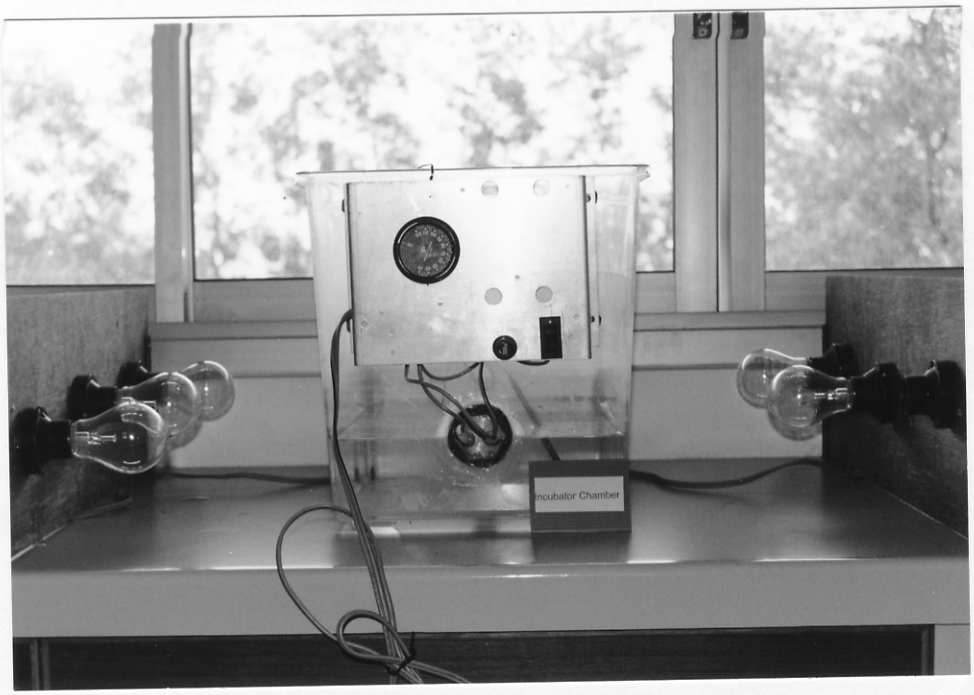
ถ่ายเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ จากอาหารแข็ง GM ประมาณ 1 ลูป ใส่ในอาหารเหลว GM พีเอช 8.0 ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x125 mm บ่มหลอดทดลองตามวิธีในข้อ 2.1 นาน 36 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ชนิดของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Pfennig (1969) (ภาคผนวก ค)

5. ศึกษาสมบัติของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆในอาหารเหลว GM

5.1 อัตราการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ

5.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆจากอาหารแข็ง GM ประมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว GM พีเอช 8.0 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแบนใส เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลว GM และนำเซลล์ที่ได้มาใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น



ภาพที่ 3 อุปกรณ์สำหรับบ่มเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส

5.1.2 การเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ได้จากข้อ 4.1.1 ปริมาตร 35 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว GM พีเอช 8.0 ปริมาณ 315 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงพีเอชตามวิธีในข้อ 2.2 และศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ตามวิธีของ Burgess และคณะ (1991) (ภาคผนวก ค)

5.2 การทดสอบการลดไนเตรทและไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ลดไนเตรทและไนไตรท์

ใช้ลูปขีดเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ต่างๆ จากอาหารแข็ง GM ประมาณ 1 ลูป ลงในอาหารแข็ง DMB (ทดลอง 2 ซ้ำต่อ 1 สายพันธุ์) จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงใส่ในโถดูดความชื้น ถ่ายแก๊สอาร์กอนลงในโถหลังจากที่ไล่แก๊ส ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าอากาศในโถส่วนมากคือแก๊สอาร์กอน จากนั้นปิดวาล์วเพื่อป้องกันอากาศเข้าออกจากโถ และนำโถมาวางที่อุณหภูมิห้อง (35-40 องศาเซลเซียส) ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 7 วัน สังเกตโคโลนีที่ปรากฏในจานเพาะเลี้ยง เมื่อต้องการทดสอบการเจริญภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง ให้ใช้ผ้าสีดำหุ้มจานเพาะเลี้ยง คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารแข็ง DMB มาทดลองในขั้นต่อไป

5.2.2 การทดสอบการลดไนเตรทและไนไตรท์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ถ่ายแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารแข็ง DMB (จากข้อ 5.2.1) ประมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว DMB พีเอช 8.0 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (เท่ากับ 0.5) ใช้เป็นกล้าเชื้อ จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว DMB พีเอช 8.0 ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ศึกษาการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช การลดลงของไนเตรทและไนไตรท์ทุก 1 วัน จนครบ 10 วัน (ภาคผนวก ค)

6. การศึกษาผลของสภาพแวดล้อมและอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

6.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 5.1.1 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว GM พีเอช 8.0 ปริมาตร 315 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 โดยควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

6.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 5.1.1 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว GM ปริมาตร 315 มิลลิลิตร ที่มีพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

6.3 การทดสอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

6.3.1 แหล่งคาร์บอน

เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 5.1.1 โดยใช้อาหาร DM1และ DM2 แทนอาหาร GM จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร DM1และ DM2 พีเอช 8.0 ปริมาตร 315 มิลลิลิตร ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

6.3.2 แหล่งไนโตรเจน

เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 5.1.1 โดยใช้อาหาร DM3 และ DM4 แทนอาหาร GM จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร DM3 และ DM4 พีเอช 8.0 ปริมาตร 315 มิลลิลิตร ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

6.3.3 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

เตรียมกล้าเชื้อเหมือนข้อ 5.1.1 แต่ใช้อาหารสูตร DM5 แทนอาหาร GM จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร DM5 พีเอช 8.0 ปริมาตร 315 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงพีเอชทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

6.4 การเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก และ *Vibrio harveyi* ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ

6.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เตรียมกล้าเชื้อของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก เหมือนข้อ 5.1.1 แต่ไม่ต้องปรับความขุ่นของเซลล์ ให้นำแบคทีเรียมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยสารละลายเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ปรับความขุ่นของเซลล์ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.5 และนำเซลล์ที่ได้มาใช้ในข้อ 6.4.3

6.4.2 เตรียมกล้าเชื้อของ *V. harveyi*

ถ่ายเชื้อ *V. harveyi* จากอาหารแข็ง NA ที่มีเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว NB ที่มีเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ปลอดเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนครบ 8 ชั่วโมง ให้นำแบคทีเรียมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเซลล์และล้างเซลล์ด้วยสารละลายเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ปรับความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 610 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.5 ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อนำเซลล์ที่ได้มาใช้ในข้อ 6.4.4

6.4.3 การเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ได้จากข้อ 6.4.1 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อ พีเอช 8.0 ปริมาณ 315 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิ 35 องศา

เซลเซียส ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อโดยวิธีตรวจนับโคโลนีในอาหารแข็ง GM บ่มในสภาวะไร้อากาศ มีแสง

6.4.4 การเลี้ยงแบคทีเรีย *V. harveyi*

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 6.4.2 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหารน้ำทะเล พีเอช 8.0 ปริมาตร 315 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ โดยวิธีตรวจนับโคโลนีหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ในอาหาร TCBS ที่มีเกลือแกง 3 เปอร์เซ็นต์

7. ทดสอบการแข่งขันการเจริญในน้ำทะเล

7.1 การเตรียมเซลล์เริ่มต้นของ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก และ *V. harveyi*

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก เตรียมเซลล์เริ่มต้นเหมือนข้อ 6.4.1 แต่ปรับความขุ่นของที่เซลล์โดยใช้น้ำทะเลปลอดเชื้อ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.05 ซึ่งจะเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สำหรับ *V. harveyi* การเตรียมเซลล์เริ่มต้นเหมือนวิธีการในข้อ 6.4.2 แต่ปรับความขุ่นของเซลล์โดยใช้น้ำทะเลปลอดเชื้อ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตร เท่ากับ 1.2 ซึ่งจะเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

7.2 การแข่งขันการเจริญ

ถ่ายเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด จากข้อ 7.1 ชนิดละ 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อ พีเอช 8.0 ปริมาตร 130 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยวางฟลาก์สในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยระหว่างการทดลองควบคุมให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส และใช้หลอดทังสเตนเป็นแหล่งกำเนิดแสง ความเข้มแสงเท่ากับ 3000 ลักซ์ ในเวลากลางวันนาน 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสงในเวลากลางคืน ศึกษาอัตราการรอดของเชื้อ *V. harveyi* และ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยวิธีตรวจนับโคโลนีในอาหาร TCBS และ GM ตามลำดับ

8. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

8.1 การเตรียมเซลล์แช่แข็งแห้ง (freeze dried) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหาร GM ที่บรรจุในขวดแบนใส ปริมาตร 375 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้อากาศ มีแสง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนถึงระยะ stationary ให้นำแบคทีเรียมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเกลือแกง 0.9 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง นำเซลล์ไปแช่แข็งแห้ง และเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

8.2 การเตรียมอาหารกุ้ง

นำเซลล์แช่แข็งแห้งมาผสมอาหารที่มีส่วนประกอบดังตารางภาคผนวกที่ ข1 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8.2.1 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

เลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อซีเมนต์ขนาด 5 ตัน จำนวน 4 บ่อ ใส่ท่อพลาสติกที่ยาวประมาณ 5-6 นิ้วเพื่อเป็นที่หลบซ่อนของกุ้ง และให้อากาศตลอดเวลาผ่านทางหินสำหรับให้อากาศ เติมน้ำทะเลผสมกับน้ำจืดให้มีระดับความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน เลือกขนาดของกุ้งทดลองให้มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณตัวละ 1 กรัม จำนวน 100 ตัวต่ออาหารหนึ่งสูตร ให้อาหารวันละ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว จำนวน 4 ครั้งต่อวัน โดยแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 6 ชั่วโมง เลี้ยงกุ้งนาน 45 วัน จากนั้นจะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือด ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, และทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. harveyi* (ภาคผนวก ค)