2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารลี้ยงเชื้อและสารเคมีซึ่งใช้ในการทดลองได้แสดงไว้ดังข้างล่างนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
Agar Technical	Difco
Frazier Gelatin Medium (FGM)	เตรียมส่วนผสมตามภาคผนวก ก
Plate Count Agar (PCA)	Merck
Mueller Hinton Agar (MHA)	Difco
Mueller Hinton Broth (MHB)	Difco
Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)	Difco
Tryptic Soy Agar (TSA)	Difco
Tryptic Soy Broth (TSB)	Difco
Standard Plate Count Agar (SPCA)	Merck
Beef Extract	Difco and Oxoid

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
95% alcohol	LD Science

$CuSO_4.5H_2O$	BDH
EDTA	Merck
Folin-Ciocalteau reagent	Fluka
HCl	Merck
$HgCl_2$	BDH
K_2HPO_4	Ajax Finechem
KH_2PO_4	Merck
L-Tyrosine	Fluka
NaCl	Lab-Scan
Na_2CO_3	BDH
NaOH	BDH
Sodium citrate	BDH
Trichloroacetic acid	CARLO ERBA
Tris base	Fisher Scientific
$MnSO_4.4H_2O$	Merck
KOH	BDH
$NaNO_3$	BDH
H_2SO_4 conc.	BDH
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	BDH
$K_2Cr_2O_7$	CARLO ERBA
$HgSO_4$	BDH
$FeSO_4.7H_2O$	BDH

อุปกรณ์

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น
ตู้อบ (Hot air oven)	บริษัท MMM Medcenter รุ่น Venticell

หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)	บริษัท Tommy รุ่น SS-325
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	บริษัท Thai polymedic รุ่น Gallenkamp
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	บริษัท Olympus รุ่น Co11
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Balance with 3 digitals)	บริษัท Mettler Toledo รุ่น PL-83-S
เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	บริษัท Jenway รุ่น 6400 Spactrophotometer สำหรับวัดการเจริญ และบริษัท Perkin Elmer instrument รุ่น Lambda 25 UV/VIS Spectophotometer สำหรับวัดกิจกรรมเอนไซม์
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	บริษัท Metrohm รุ่น 713 pH Meter
เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Ultracentrifuge)	บริษัท SANYO รุ่น Harrier 18/80
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)	บริษัท Astec Microflow รุ่น Microflow Advanced Biosafety cabinet
Auto-pipette	บริษัท eppendrop
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	บริษัท Julabo รุ่น Eco Temp TW20
เครื่องเขย่า (Shaker)	บริษัท Thai Polymedic รุ่น Gallenkamp

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้ 34 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำและเลนของบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา ซึ่งได้มาจากงานวิจัยเรื่องบทบาทของแบคทีเรียในวัฏจักรไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาเพื่อการเพาะเลี้ยงแบบยั่งยืนของ รศ.ดร. ดวงพร คันธโชติ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ดวงพร, 2546)

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคกุ้ง ได้รับความอนุเคราะห์จากรศ.ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ลูกกุ้งที่ใช้ในการศึกษา

ลูกกุ้งขาวอายุ 30 วัน (P-30) ที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 200 ตัว ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณ สุรชัย นิลรัตน์ อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกเบื้องต้นสำหรับแบคทีเรียย่อยโปรตีน

แบคทีเรียที่นำมาศึกษามี 34 ไอโซเลท แยกจากน้ำและเลนของบ่อเลี้ยงกุ้งในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสงขลา (ดวงพร, 2546) โดยใช้อาหาร Frazier gelatin medium (FGM) และใช้อาหารดังกล่าวเก็บรักษาเชื้อ

นำเชื้อที่มีการเจริญดีที่อายุ 24 ชั่วโมง มา 1 ลูป (loop) แตะลงที่จุดศูนย์กลางอาหาร Frazier gelatin medium (FGM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำจานเพาะเลี้ยง (plate) ที่มีแบคทีเรียย่อยโปรตีนมาราดด้วย $HgCl_2$ 12.5% ราดลงบนโคโลนี ประมาณ 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จะปรากฏวงใส (clear zone) ทำการวัดเพื่อหาค่า Degree of hydrolysis โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier caliper) เป็นเกณฑ์พิจารณาในการคัดเลือก และพิจารณาการเจริญร่วมด้วย ทำจำนวน 3 ซ้ำต่อเชื้อ

การคำนวณหาค่า Degree of hydrolysis

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (mm)}}$$

2. การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้สูง

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นจากอาหารวุ้นเอียงที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Frazier gelatin medium (FGM) 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับให้มีค่า OD_{660} เป็น 0.5 และใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญ

pH และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร ของ 1% สารละลายเจลาติน ที่มี 2% NaCl ใน 0.1 โมลาร์ Tris-HCl pH 8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 นำส่วนใสมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank เพื่อหากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (ดัดแปลงจาก Norberg and Hofsen, 1969 อ้างโดย ดารณี, 2543) โดยเกณฑ์การคัดเลือกพิจารณาจากเชื้อที่มีกิจกรรมย่อยโปรตีนได้และมีการเจริญดี ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

ทำกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความเข้มข้น 3.125 6.25 12.5 25 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Unit/ml) (http://www.degp.go.th/data_env/south/animals/water/kunkuladoum.html., 8/07/2005)

$$\text{Unit/ml} = \frac{\text{tyrosine (µg/ml) X dilution}}{\text{sample volume (ml) X incubation time (min)}}$$

โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน คือ กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนอิสระไทโรซีนปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อนาที

3. การยับยั้ง *Vibrio harveyi* โดยใช้วิธี Agar diffusion

นำเชื้อ *V. harveyi* ที่อายุ 18 ชั่วโมง จากอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มี 1.5% NaCl บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard มา swab ลงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ที่มี NaCl 1.5% จากนั้นเจาะอาหารให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร โดยใช้ pasture pipette เจาะ 2 หลุมต่อจานเพาะเชื้อ แล้วหยดเชื้อที่คัดเลือกได้ที่อายุ 18 ชั่วโมง จากอาหาร FGM ที่มีเกลือ NaCl 2% ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ว

ปรับความขุ่นของเชื้อที่คัดเลือกได้โดย spectrophotometer ให้ได้ค่า OD_{660} เท่ากับ 0.5 ลงในหลุม หลุมละ 70 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการวางแผ่นยาปฏิชีวนะเตรียมเช่นเดียวกันแต่ใช้การวางแผ่นยาลงในจานเพาะเชื้อ ซึ่งยาที่นำไปวางได้แก่ oxonilic acid (2µg) norfloxacin (10µg) tetracycline (30µg) และ sulphamethoxazole (25µg) วางจานละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำ 3 ซ้ำ (3 จาน) จำนวนซ้ำคือ 6 ซ้ำต่อเชื้อหรือยา โดยพิจารณาการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* จากวงใสที่เกิดขึ้นแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้

4.1 ความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก อายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) 100 มิลลิลิตร บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับเชื้อให้มีค่า OD_{660} เป็น 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มีเกลือ NaCl 0% 1% 1.5% 2% 2.5% และ 3% เพื่อดูความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นเลี้ยง และทุกๆ 12 ชั่วโมง จนได้การเจริญของเชื้อสูงสุด วัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นที่ OD_{660} ทำ 3 ซ้ำในแต่ละการทดสอบ

4.2 pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก จากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป (loop) ที่อายุ 24 ชั่วโมง โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อที่มีการปรับค่า OD_{660} เป็น 0.5 ใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2% NaCl ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 และ 9 นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญโดยวัดความขุ่นที่ OD_{660} เมื่อเริ่มต้นการเลี้ยงและทุกๆ 12 ชั่วโมงจนเชื้อมีการเจริญสูงสุด ทำ 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดสอบ

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกอายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl และ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อที่มีการปรับค่า OD_{660} เป็น 0.5 ใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ10% ลงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl และ pH เริ่มต้นเป็น 7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 28 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญ โดยวัดการเจริญของเชื้อจากความขุ่นที่ OD_{660} เมื่อเริ่มต้นเลี้ยงและทุกๆ 12 ชั่วโมงจนเชื้อมีการเจริญสูงสุด ทำ 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง

4.4 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก อายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl และ pH เริ่มต้นเป็น 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อที่มีการปรับค่า OD_{660} เป็น 0.5 ใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl และ pH เริ่มต้นเป็น 7 นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 0 100 150 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยการวัดการเจริญจากค่า OD_{660} เมื่อเริ่มเลี้ยงและทุก 12 ชั่วโมงจนเชื้อมีการเจริญสูงสุด ทำ 3 ซ้ำในแต่ละการทดสอบ

5. การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

5.1 การเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งเลี้ยงได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง

FGM มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีการปรับค่า OD_{660} เป็น 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว NB และเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกับที่เตรียมหัวเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 2 4 7 10 12 15 20 25 30 36 และ 42 ชั่วโมงโดยหาเวลาที่ใช้เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (td: Doubling time) และค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ: Specific growth rate) จากสูตร

$$\mu = \frac{0.693}{t_d}$$

5.2 การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

การวิเคราะห์เอนไซม์ที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีการปรับค่า OD_{660} เป็น 0.5 เพื่อใช้หัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว FGM และเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกับที่เตรียมหัวเชื้อ จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2 โดยเจลาตินที่ใช้เป็นซับสเตรทในการทดสอบละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 7 และทำ 3 ซ้ำในการทดลองนี้ และสำหรับวิธีการวิเคราะห์โปรตีนใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ในการวิเคราะห์โปรตีนโดยมี Bovine serum albumin เป็นมาตรฐาน โดยเตรียมความเข้มข้นที่ 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข)

6. ลักษณะของเอนไซม์จากเชื้อที่คัดเลือกได้

6.1 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

สำหรับการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกอายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป (loop) โดย

วิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl pH เริ่มต้นของอาหาร 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับเชื้อให้มีค่า OD_{660} เป็น 0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% เลี้ยงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเดียวกับการเตรียมหัวเชื้อ เลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เติม 1% สารละลายเจลาติน ใน 0.1 โมลาร์ Tris-HCl pH 8 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloloacitic acid (TCA) 5% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง watman No.1 นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทำเช่นเดียวกันสำหรับอุณหภูมิที่เหลือเพียงแต่เปลี่ยนการบ่มเป็นที่ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส และสำหรับการหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยนำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเจลาติน 1 มิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟสบัพเฟอร์ (phosphate buffer) pH 7 และสำหรับ pH 8 และ 9 ใช้ Tris-HCl ที่มีการปรับ pH เป็น 8 และ 9 (Purwani *et al*., 2004) แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

6.2 อุณหภูมิและ pH ที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกอายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารวุ้นเอียง FGM มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ที่มี 2% NaCl pH เริ่มต้นของอาหาร 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับเชื้อให้มีค่า OD_{660} เป็น 0.5 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อ 10% เลี้ยงลงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเดียวกับที่เตรียมหัวเชื้อ เลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำมาทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ ทดสอบที่อุณหภูมิ 28 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยนำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตรต่อการทดสอบแต่ละอุณหภูมิ บ่มเป็นเวลา 60 120 180 และ 240 นาที (Thangam *et al*.,2002) จากนั้นวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีทำในข้อ 2 แต่ละชุดทดลองทำ 3 ซ้ำ

ส่วนการวัดความคงตัวของเอนไซม์ต่อ pH นำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตรต่อการทดสอบแต่ละค่าของ pH จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 7 8 และ 9 ลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 120 180 และ 240 นาที (Thangam *et al*.,2002) จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2 แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

6.3 หาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก จากอาหารวุ้นเอียง FGM อายุ 24 ชั่วโมง มา 1 ลูป (loop) โดยวิธีการปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ที่มีเกลือ NaCl 2% pH เริ่มต้นของอาหาร 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เชื้อที่มีการปรับค่า OD_{660} เป็น 0.5 ใช้เป็นกล้าเชื้อโดยใช้หัวเชื้อ 10% เลี้ยงลงในอาหารเหลว FGM 100 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะเดียวกับการเตรียมหัวเชื้อ เลี้ยงเชื้อจนมีอายุ 36 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เติมตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และไอออนของโลหะ 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.01 M ได้แก่ EDTA Zn^{2+} Cu^{2+} Mg^{2+} Fe^{2+}และ Ca^{2+} (Thangam *et al*.,2002) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2

7. ลักษณะของเชื้อที่คัดเลือกได้

7.1. การเทียบเคียงเชื้อที่คัดเลือกได้

ผลการย้อมแกรมพบว่าเชื้อติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นจึงเทียบเคียงในระดับจีนัส (Genus) ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.1 (Krieg and Holt, 1984) นอกจากนี้ยังได้ใช้ชุดทดสอบ ทางชีวเคมี (Test Kit: API 20 E) ของบริษัท BIOMERIEUX โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีที่บริษัทแนบมากับชุดทดสอบและ ดูรูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) โดยส่งเชื้อไปที่ศูนย์เครื่องมือกลาง

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเทียบเคียงเชื้อในระดับสปีชี่ (species) โดยใช้วิธีการเรียงลำดับเบส (16S rDNA) โดยส่งไปเทียบเคียงเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ UK-VECTOR ศูนย์พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีรัฐร่วมเอกชน (ศรอ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ซึ่งใช้โปรแกรม DNASIS V3.7 ในการจัดเรียงลำดับเบส DNA และสร้าง phylogenetic tree

7.2 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ/*Pseudomonas* ต่อเชื้อที่คัดเลือกได้และดูลักษณะการแตกของเม็ดเลือดแดง

นำเชื้อที่คัดเลือกได้อายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร Muller Hillton Broth (MHB) ซึ่งปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 Mcfarland standard มา swab บนอาหาร Muller Hillton Agar (MHA) จากนั้นวางแผ่นยาที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบลงในจานอาหาร chloramphenicol (30µg) gentamicin (10µg) amikacin (30µg) cephalothin (30µg) tetracycline (30µg) netilmicin (30µg) ceftazidime (30µg) โดยที่ norfloxacin (10µg) และ trimethoprim-sulfamethoxazole (25µg) เป็นยาที่ใช้ยับยั้ง *Pseudomonas* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัด Inhibition zone โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier caliper) ทำ 3 ซ้ำสำหรับยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด

ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ (hemolytic) ซึ่งดูลักษณะการแตกของเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood Agar ทำโดยการนำเชื้อ streak ลงบนอาหาร Blood Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ

8. การทดสอบใช้เชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำและควบคุม *V. harveyi* ในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

8.1 การเตรียมแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหาร FGM ที่มีเกลือ NaCl 2% pH เริ่มต้น 7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย และเลี้ยงจนการเจริญของแบคทีเรียอยู่ในระยะ late log phase ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในภาคสนามเพราะมีการเจริญดีและทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดี (Talaro and Talaro, 1996 ; Vanderhove *et al*., 1991) ปรับ

จำนวนแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^8 CFU/ml ก่อนปล่อยแบคทีเรียลงในตู้เลี้ยงกุ้ง (ภาคผนวก ข)

8.2 การเตรียมน้ำทะเล

นำน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 กรัมต่อลิตร ทำการฆ่าเชื้อโดยการเติมคลอรีนที่มีความเข้มข้นประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าอัลคาไลน์ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีในภาคผนวก ข (Boyd and Tucker, 1992) พักน้ำทิ้งไว้โดยมีการให้อากาศตลอดเวลาประมาณ 2 วันเพื่อกำจัดคลอรีน นำน้ำไปใส่ตู้แก้วใสขนาด 45 x 45 x 60 cm ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของตู้ ใส่หัวทรายลงในตู้ทดลองทุกตู้ตู้ละ 1 หัว และใส่ตาข่ายไนลอนลงในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวเพื่อเป็นที่เกาะให้แก่กุ้งในระหว่างการเลี้ยง

8.3 การเตรียมลูกกุ้งขาวและชุดการทดลอง

ใช้ลูกกุ้งขาวที่มีน้ำหนักระหว่าง 2.30-2.60 g ที่มีอายุ 1 เดือน พักกุ้งทิ้งไว้โดยให้กินอาหารเม็ดธรรมดา วันละ 4 ครั้ง ให้ครั้งละ 0.4 g (7.00 น. 12.00 น. 17.00 น. และ 22.00 น.) ให้กุ้งปรับตัว 48 ชั่วโมง แล้วนำลูกกุ้งมาใส่ในตู้ทดลองที่เตรียมไว้ตู้ละ 10 ตัว โดยมีแผนการทดลองเพื่อใช้แบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้ในการเลี้ยงกุ้งซึ่งมี 2 วัตถุประสงค์คือ การปรับปรุงคุณภาพน้ำและการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด การทดลองแต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ คือ

ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดการควบคุม ซึ่งไม่ใส่แบคทีเรีย

ชุดการทดลองที่ 2 คือชุดการทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้เพียงเชื้อเดียว

โดยชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบกันเพื่อดูวัตถุประสงค์การบำบัดน้ำเสียของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้

ชุดการทดลองที่ 3 เป็นชุดควบคุม เติมเฉพาะเชื้อ *V. harveyi* เท่านั้น

ชุดการทดลองที่ 4 เป็นชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อที่คัดเลือกได้และเชื้อ *V. harveyi*

ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 เปรียบเทียบกันเพื่อดูผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 3 และ 4 เพื่อดูผลของเชื้อที่เติมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง

สำหรับปริมาณของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และ *V. harveyi* แต่ละชนิดปรับให้ได้ประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วใส่เชื้อลงในตู้ที่มีกุ้งขาวสำหรับพร้อมทดลอง โดยที่ชุดการทดสอบที่ 1 และ 2 ใช้เพื่อพิจารณาผลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในการรักษาคุณภาพน้ำดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งพารามิเตอร์ที่ติดตาม คือ อุณหภูมิ pH ความเค็ม BOD แอมโมเนีย ไนเตรท แบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยโปรตีน และการเจริญของกุ้ง แต่ละพารามิเตอร์ติดตามทุกๆ 4 วัน ยกเว้น BOD แอมโมเนีย และไนเตรท ซึ่งจะติดตามทุกๆ 7 วัน ส่วนการเจริญของกุ้งวัดการเจริญเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงและเมื่อเลี้ยงไปได้ 30 วัน

ขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 3 และ 4 ใช้เพื่อพิจารณาผลของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* โดยพารามิเตอร์ที่ติดตามได้แก่ อุณหภูมิ pH ความเค็ม *V. harveyi* และการเจริญเติบโตของกุ้งโดยแต่ละพารามิเตอร์ติดตามทุกๆ 4 วัน ยกเว้นการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยวัดการเจริญของกุ้งเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงและเลี้ยงไปได้ 30 วัน และเนื่องจากในการศึกษานี้เมื่อเลี้ยงกุ้งไปได้ 48 วัน เกิดไฟฟ้าดับเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำให้กุ้งส่วนหนึ่งตายไปจึงนำเสนอผลการทดลองเพียง 32 วันของการเลี้ยงกุ้ง

8.4 ตรวจสอบคุณภาพน้ำ

วัดอุณหภูมิน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ความเค็มของน้ำโดยใช้ Salinometer pH โดยใช้ pH meter ค่า DO ใช้เครื่อง YSI Environmental EcoSense® DO200 และ BOD ที่ 20 องศาเซลเซียส 5 วัน โดยวิเคราะห์ค่า DO ที่เริ่มต้นและที่ 5 วันโดยใช้ Azide Modification ตามวิธีของ APHA (1998) ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข และหาปริมาณแอมโมเนีย และปริมาณไนไตรท์โดยวิธี Colorization Method ซึ่งใช้ Test kit ของบริษัท Merck และวัดโดยเครื่อง Spectroqucent NOVA 60 ของบริษัท Merck German

8.5 ตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

ใช้วิธีการ Standard Plate Count นับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Heterotrophic Plate Count: HPC) โดยใช้อาหาร Plate Count Agar (PCA) และนับ Proteolytic bacteria (PTB) โดยใช้อาหาร Frazier Gelatin Medium (FGM) ซึ่งในอาหารแต่ละชนิดเติมเกลือ NaCl 2% บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *V. harveyi* นับโดยใช้อาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.6 วัดการเจริญของกุ้งขาว

ชั่งน้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงและเมื่อเลี้ยงได้ 30 วัน โดยหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักเปียกเพื่อคำนวณหาน้ำหนักลูกกุ้งที่เพิ่มขึ้นจากเดิม แล้วนำค่าน้ำหนักไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง โดยใช้วิธีการตาม Lobban (1985) ดังสูตรข้างล่าง

$$G = (Wt/W0) \text{ X } (100/t)$$

เมื่อ

G = อัตราการเจริญเติบโตต่อวันคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

Wt = น้ำหนักสุดท้าย

W0 = น้ำหนักเริ่มต้น

t = ระยะเวลาที่ทดลอง