บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 จุลินทรีย์ (บุญกอบ, 2548)

1.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกคือ *L. plantarum* TISTR 050 จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.1.2 จุลินทรีย์ก่อโรค

ใช้เชื้อ *Vibrio harveyi* AAHRC 01 จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 อาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck)

1.2.2 อาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์1.5 % สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป

1.2.3 อาหาร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) (Merck)

1.3 กุ้งขาว

กุ้งขาวในการทดลองที่ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มของเกษตรกรในจังหวัดสงขลา พัทลุง และสตูล โดยมีอายุระหว่าง 45-80 วัน กุ้งขาวในการทดลองที่ 2 ใช้กุ้งขนาด 3-4 กรัม จากฟาร์มของเกษตรกรในจังหวัดปัตตานี และทำการเลี้ยงในบ่อดินจนมีขนาด 9-11 กรัมที่สถานีวิจัยวาริชศาสตร์ อำเภอละงู จังหวัดสตูล

1.4 โพรบในการทดลองติดตามแบคทีเรีย

ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 โพรบที่ใช้ในการทดลอง

Name	Specificity	Sequence of probe (5'-3')	% formamide	Label fluorescent dry	References
EUB 338 mix*	Domain *Bacteria*				
EUB 338	most Bacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	20-50	Rhod/Fluo	Amann *et al*., 1995
EUB ll	Planctomycetales	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	20-50	Rhod/Fluo	Daims *et al*., 1999
EUB lll	Verrucomicrobiales	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	20-50	Rhod/Fluo	Daims *et al*., 1999
LGC354 mix**	LGC group				
LGC354a	most Lactobacillales	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	35	Cy3	Meier *et al*., 1999
LGC354b	most Bacillales	CGG AAG ATT CCC TAC TGC	35	Cy3	Meier *et al*., 1999
LGC354c	most Streptococcaceae	CCG AAG ATT CCC TAC TGC	35	Cy3	Meier *et al*., 1999
LAB158	Lactic acid bacteria	GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA	25	Cy3	Harmsen *et al*., 1999

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Name	Specificity	Sequence of probe (5'-3')	% formamide	Label fluorescent dry	References
Lplan	*L. plantarum*	CCAATCAATACCAGGAGTTCG	25	Fluo	Hensiek *et al*., 1992
Enc131	*Entrococcus* spp.	CCC CTT CTG ATG GGC AGG	30	Fluo	Behr *et al*., 2000
HGC69A	HGC group	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	35	Cy3	Roller *et al*., 1994
HGC69A Comp	Competitor to HGC69A	TAT AGT TAC GGC CGC CGT	35	--	Roller *et al*., 1994
ALF1B	α-Proteobacteria group	CGT TCG YTC TGA GCC AG	20	Cy3	Manz *et al*., 1992
BET42a	β-Proteobacteria group	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	Fluo	Manz *et al*., 1992
BET42a Comp	Competitor to BET42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	--	Manz *et al*., 1992
GAM42a	γ-Proteobacteria group	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	Cy3	Manz *et al*., 1992
GAM42a Comp.	Competitor to GAM42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	--	Manz *et al*., 1992

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Name	Specificity	Sequence of probe (5'-3')	% formamide	Label fluorescent dry	References
Pseumonas	*Pseudomonas* spp.	GAT CCG GAC TAC GAT CGG TTT	30	Cy3	Schleifer *et al*., 1992
G V	*Vibrio* spp.	AGG CCA CAA CCT CCA AGT AG	30	Cy3	Eilers *et al*., 2000
CFB560	CFB group	WCC CTT TAA ACC CAR T	40	Fluo	Louise *et. al*., 2002

หมายเหตุ การเขียนลำดับกรดนิวคลีอิกใช้ระบบ IUPAC code, * ใช้ EUB 338, EUB II, EUB III รวมกันในสัดส่วนที่เท่ากัน, ** ใช้ LGC354a, LGC354b, LGC354c รวมกันในสัดส่วนที่เท่ากัน, *** Flu = Fluorescein, Rho = Rhodamine, Cy3 = Cy3 (red color)

1.5 อาหารกุ้ง

การทดลองที่ 2 ใช้อาหารกุ้งเกรดการค้าสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวขนาด 5–15 กรัม โดยมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 35% ไขมันไม่น้อยกว่า 5% กากไม่มากกว่า 4% ความชื้นไม่มากกว่า 12%

1.6 สารเคมี

สารเคมีสำหรับเทคนิค FISH มีดังนี้

Reagent	Grade	Company
Ethylenedinitrolo tetraacetic acid-disodium salt dehydrate	Analytical	Merck
Formamide	Analytical	Unilab
Sodium chloride	Analytical	Merck
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Biotechnology	Amresco
Tris-HCl	Biotechnology	Amresco
p-phenylenediamine	Biotechnology	Merck

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ, สายยาง และหัวทราย

2.1.2 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วย สายยาง และเครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่มน้ำได้

2.1.3 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้งทดลอง ได้แก่ ถังพลาสติก และสวิง

2.1.4 อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้งทดลอง ได้แก่ถังขนาด 200 ลิตร บ่อพักน้ำ

2.3 อุปกรณ์สำหรับเทคนิค FISH

2.3.1 อุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิในการ Hybridize คือ เครื่อง Hybridization Oven (รุ่น Hybridizer HB-1D ยี่ห้อ TECHNE)

2.3.2 อุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิในการล้างโพรบด้วย washing buffer คือ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.3.4 อุปกรณ์สำหรับตรวจผลและบันทึกภาพคือ กล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (epifluorescent microscope) (Olympus, BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD (Olympus, DP50)

2.4 อุปกรณ์อื่นๆ

2.4.1 อุปกรณ์สำหรับชั่งวัดน้ำหนักคือ เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP3100S)

2.4.2 อุปกรณ์สำหรับวัดค่าดูดกลืนแสง คือ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1201)

2.4.3 อุปกรณ์สำหรับจัดเก็บสารละลาย สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ และสายพันธุ์จุลินทรีย์ คือ ขวดแก้วทนกรด-ด่าง ขนาดต่างๆ และตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Science Temp, USA)

2.4.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมวัสดุ, สารเคมี และอุปกรณ์ปลอดเชื้อ คือ หม้อนึ่งความดัน (Tomy Seiko, Co., SS-325), ตู้ปลอดเชื้อ Laminar flow (Dryer Mark II, Clean) และตู้อบฆ่าเชื้อ (Sanyo, Program Oven)

3. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่า ซึ่งประกอบด้วย ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocytes count), การวิเคราะห์ปริมาณ Oxyhemocyanin และการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (Blood glucose) นอกจากนี้ยังทำการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหาร 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน, ลำไส้ส่วนต้น, และลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่าในสภาพการเลี้ยงเชิงการค้าแบบหนาแน่นในบ่อดิน โดยใช้เทคนิค FISH รวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ในขณะที่การทดลองที่ 2 จะเป็นการศึกษาเพื่อยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหาร 2 ส่วนได้

แก่ ตับและตับอ่อน และลำไส้ เมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสทอร่า เชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*V. harveyi* AAHRC 01) และเชื้อไวรัสทอร่าร่วมกับ *V. harveyi* AAHRC 01โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำการออกแบบการทดลองในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความสามารถในการคงอยู่และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* spp. ของเชื้อ โปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 050 ในสภาพการติดเชื้อ *V. harveyi* และเชื้อไวรัสทอร่าร่วมกับ *V. harveyi* ด้วยเทคนิค FISH รวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียรวม, แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. และแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่าในบ่อดิน

3.1.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) โดยศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบเลือด โครงสร้างประชากรแบคทีเรียและสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจในทางเดินอาหาร 3 ส่วนได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลาย ของกุ้งขาวปกติกับกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอร่า โดยทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวสุขภาพดีและติดเชื้อไวรัสทอร่าจากบ่อดินจำนวนอย่างละ 3 บ่อ ซึ่งตัวอย่างของกุ้งขาวสุขภาพดีต้องมาจากบ่อเลี้ยงที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสที่ระบุทั้ง 4 ชนิด ไม่มีประวัติการติดเชื้อแบคทีเรียและการใช้ยาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยง รวมถึงมีการเจริญเติบโตและกินอาหารที่เหมาะสมกับอายุของกุ้ง ในขณะที่ตัวอย่างกุ้งติดไวรัสทอร่าจะต้องมาจากบ่อเลี้ยงที่กุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่าเพียงชนิดเดียวเท่านั้นไม่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ระบุและการใช้ยาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยง โดยจะทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวบ่อละ 18 ตัวจากการสุ่มรอบบ่อเลี้ยง โดยกุ้งปกติจะทำการสุ่มจากยอให้อาหารในขณะที่กุ้งติดเชื้อไวรัสจะทำการสุ่มโดยการตักกุ้งที่แสดงอาการของโรคทอร่าอย่างชัดเจน

3.1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินของเกษตรกรในระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น (intensive system) ซึ่งมีอายุระหว่าง 45-80 วันจากแหล่งเลี้ยงกุ้งขาว 3 แหล่ง ได้แก่ แหล่งเลี้ยงจากฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) ทำการเก็บตัวอย่างในเขตอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา แหล่งเลี้ยงจากทะเล

สาบสงขลา ทำการเก็บตัวอย่างในเขตอำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุงและจากฝั่งตะวันตก (ทะเลอันดามัน) ทำการเก็บตัวอย่างในเขตอำเภอละงู จังหวัดสตูล โดยเก็บตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่าจากแต่ละแหล่งเลี้ยง จำนวนแหล่งเลี้ยงละ 1 บ่อซึ่งจะทำให้ได้ตัวอย่างกุ้งปกติจำนวน 3 บ่อ และกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่าจำนวน 3 บ่อ โดยทำการเก็บตัวอย่างในระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2548 ซึ่งกุ้งขาวสุขภาพปกติที่ทำการเก็บตัวอย่างจะต้องไม่พบการติดเชื้อไวรัสสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ White spot syndrome virus (WSSV), Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), Yellow head baculovirus (YBV), ไวรัสทอร่า โดยทำการตรวจยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR รวมถึงไม่แสดงอาการการติดเชื้อโรคแบคทีเรียหรือมีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยง มีอัตราการเจริญเติบโตและการกินอาหารที่เหมาะสมกับอายุของกุ้ง ในขณะที่ตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอร่าที่ทำการเก็บตัวอย่างจะต้องติดเชื้อไวรัสทอร่าเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ไม่มีการติดเชื้อไวรัสที่สำคัญชนิดอื่นร่วมด้วยไม่ว่าจะเป็น WSSV, IHHNV, YHV โดยทำการตรวจยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR และไม่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งแผนผังการเก็บตัวอย่างแสดงในภาพที่ 9

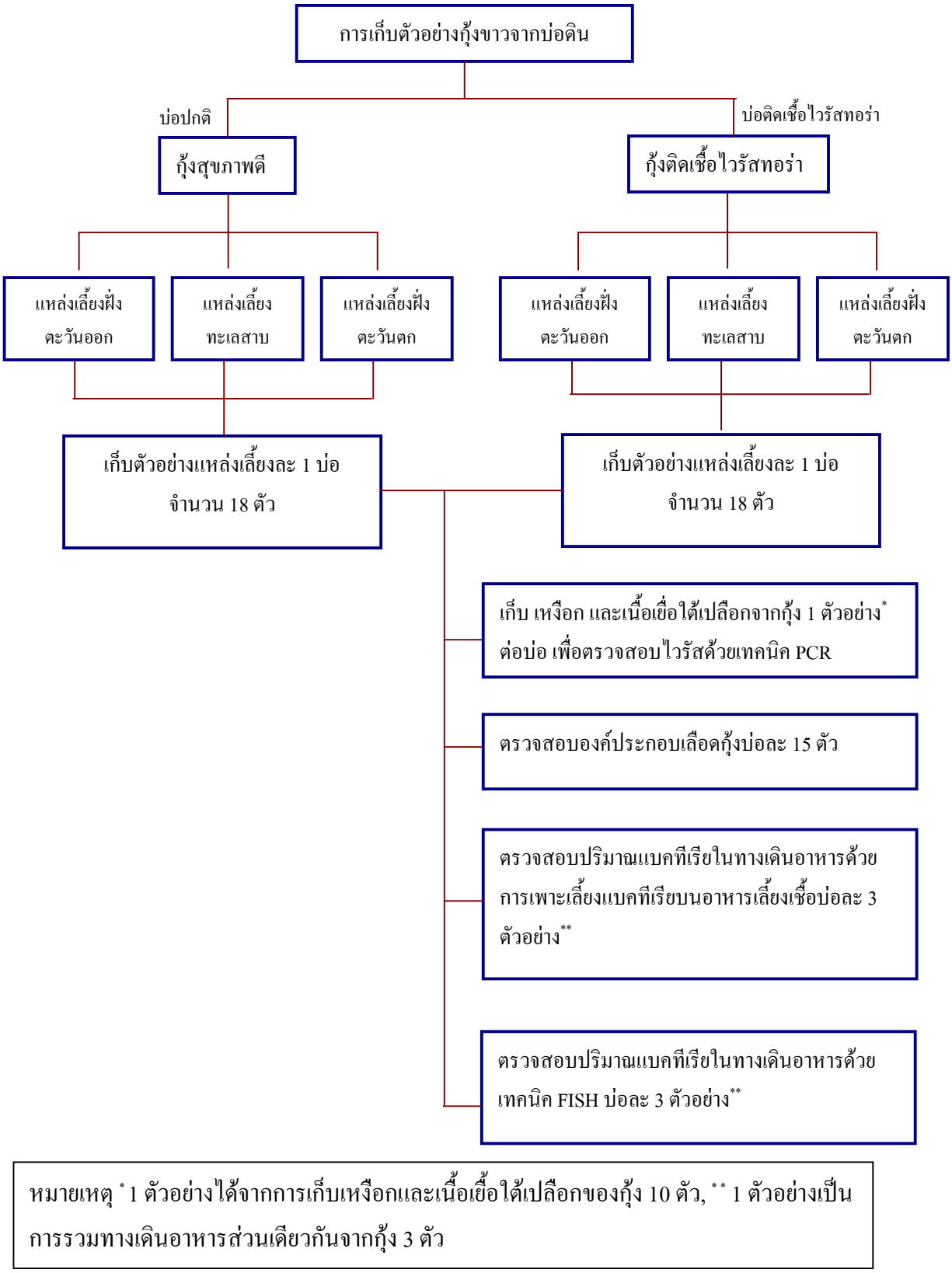
3.1.3 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งขาวตัวอย่างจำนวน 15 ตัวจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ในทุกบ่อที่ทำการศึกษาแล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total haemocytes count) โดยใช้วิธีการของ กิจการและคณะ (2543)

1.ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 100 ไมโครลิตรเจือจางด้วยสารละลาย 0.15% Trypan blue 900 ไมโครลิตรในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.ทำการนับปริมาณเม็ดเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) โดยการนับจำนวนเม็ดเลือดผ่านกล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณเป็นปริมารเม็ดเลือดต่อลิตร



ภาพที่ 9 แผนผังการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวสุขภาพดีและติดเชื้อไวรัสทอร่าจากบ่อดิน

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง x ยาว x สูง

= 1 x 1 x 0.1 mm

= 0.1 mm^3

จำนวนเม็ดเลือด/มล.^{3} = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเม็ดเลือด/มล. = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4

การวิเคราะห์ปริมาณ Oxyhemocyanin โดยดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก Chen และ Cheng (1993)

1.ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 10 ไมโครลิตรเจือจางด้วยน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร

2.นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงมี่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร

การคำนวณค่าปริมาณ Oxyhemocyanin โดย εLC=Abs., ε=17.26

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (Blood glucose) โดยดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก Hyvarinen และ Nikkila (1962)

1.ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตรที่ไม่บรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัว

2.เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร ถ่ายในหลอดพลาสติกและทำการวิเคราะห์ทันที โดยเติมเลือด 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกที่มีสารละลาย TCA 3 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที

3.นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,590xg อุณหภูมิ 4^0C นาน 2 นาที

4.แยกส่วนใส 0.5 มิลลิลิตรเติมในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี color reagent 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5.นำไปแช่ในน้ำเดือด 8 นาที ตั้งไว้ให้เย็น

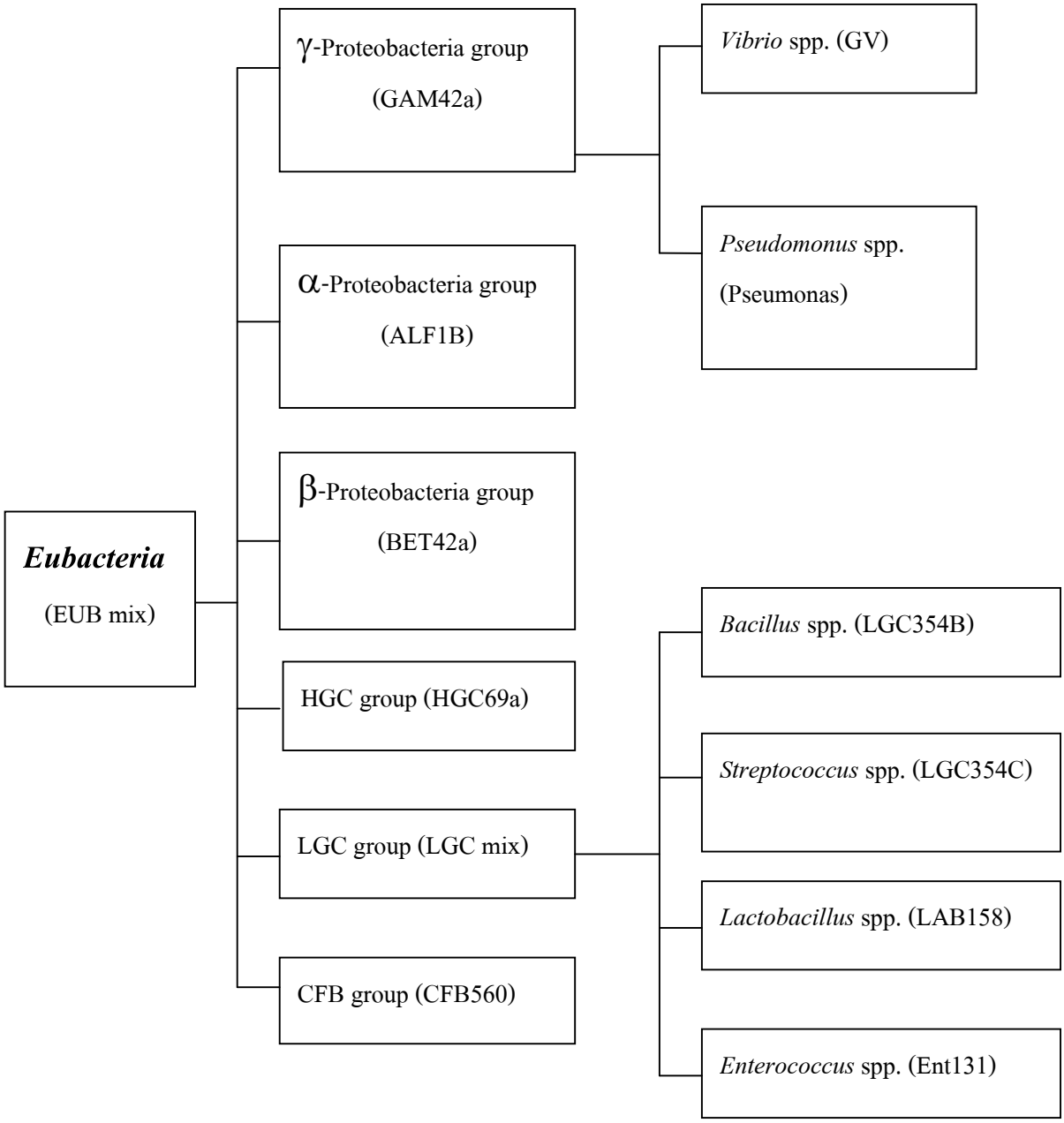
6.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตรเทียบกับสารละลาย Trichloro acetic acid (TCA) 3% 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.1.4 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

สลบกุ้งโดยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1-2 นาทีและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเปลือกโดยการใช้ เอทานอล 70% ตัดแยกทางเดินอาหารของกุ้งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลายด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นบดแต่ละส่วนของทางเดินอาหารจากตัวอย่างกุ้ง 3 ตัวรวมกันในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และปรับความเข้มข้นเนื้อเยื่อตัวอย่างเป็น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงแบคทีเรียรวมในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA: Merck,Darmstadt, Germany) ซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในอาหาร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS: Merck, Darmstadt, Germany)

3.1.5 การติดตามแบคทีเรียที่สนใจโดยเทคนิค FISH

การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค FISH เข้ามาใช้ในการติดตามกลุ่มของแบคทีเรียที่สนใจในทางเดินอาหารของกุ้งขาวทั้ง 3 ส่วน เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่า โดยใช้ Oligonucleotide probe ติดสารเรืองแสงในการติดตามกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจจำนวน 6 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ α-Proteobacteria, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacteroides* (CFB) , *Low G+C Gram Positive Bacteria* (LGC) และ *High G+C Gram Positive Bacteria* (HGC) นอกจากนี้ยังทำการจัดกลุ่มย่อยของ LGC group ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. และ *Enterococcus* spp. รวมถึงจัดกลุ่มย่อยของ γ-Proteobacteria group ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ *Vibrio* spp. และ *Pseudomonas* spp. ดังภาพที่ 10 ในการทดลองครั้งนี้ การใช้โพรบ LAB158 ในการตรวจสอบแบคทีเรียที่เรืองแสงจะทำการตรวจสอบเฉพาะแบคทีเรียรูปแท่งเท่านั้น เนื่องจากต้องการตรวจสอบเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. แต่โพรบ LAB158 จะจำเพาะกับแบคทีเรียทั้งกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ที่มีรูปร่างเป็นแท่งและกลุ่ม *Enterococcus* spp. ซึ่งมีรูปร่างกลม นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่สามารถตรวจสอบได้จากการย้อมสีด้วยสารเรืองแสง DAPI กับประมาณเซลล์แบคทีเรียที่สามารถเรืองแสงได้จากการตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ซึ่งสารย้อมเรืองแสง DAPI มีคุณสมบัติในการติดตาม DNA และ RNA ของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด โดย DAPI ที่มีความจำเพาะต่อ DNA หรือ RNA สายคู่ โดยจะเชื่อมต่อกับสาย DNA หรือ RNA ที่ตำแหน่งของเบส A-T และ A-U ซึ่งเกิดการเรืองแสงสีน้ำเงิน ในขณะที่โพรบ EUB338 mixed จะจำเพาะต่อ *Eubacteria* เท่านั้น



ภาพที่ 10 แผนผังการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียที่ทำการศึกษา (ชื่อในวงเล็บ คือ โพรบที่ใช้ในการศึกษา)

การเตรียมตัวอย่างทางเดินอาหารกุ้งบด (ดัดแปลงจาก บุญกอบ และคณะ, 2548)

สลบกุ้งทันทีเมื่อนำขึ้นจากบ่อโดยแช่ในน้ำเข็งเป็นเวลา 1-2 นาที ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเปลือกโดยการใช้เอทานอล 70% จากนั้นล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อและรักษาสภาพของกุ้งโดย

การฉีดสารละลายฟอร์มาลิน 10% ให้ทั่วตัวกุ้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณตับและตับอ่อนซึ่งเสียสภาพได้ง่าย แล้วทำการดองในสารละลายฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C แล้วย้ายเก็บในเอทานอล 70% ที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำมาตัดแยกทางเดินอาหารออกเป็น 3 ส่วน โดยแต่ละตัวอย่างจะบดรวมทางเดินอาหารของกุ้งจำนวน 3 ตัวรวมกันในเอทานอล 70% โดยทุกตัวอย่างจะทำการปรับปริมาณของเนื้อเยื่อตัวอย่างเป็น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแต่ละบ่อจะทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยใช้กุ้งขาวทั้งหมด 9 ตัวจากแต่ละบ่อ จากนั้นนำไปทำให้เซลล์กระจายตัวด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) (Kubota, insonator201M, Japan) ที่ 80 W เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้งภายใต้อุณหภูมิต่ำและยืนยันการคงอยู่ของเซลล์แบคทีเรีย โดยนำเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ในกลุ่มของ *Bacillus* sp., *Vibrio* sp. และ *Escherichia coli* ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนมาทำให้เซลล์กระจายด้วยเครื่องตัวกำเนิดเสียงความถี่สูงที่ระดับเดียวกันและตรวจสอบการคงอยู่ของเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมสีเรืองแสง DAPI (5 μg/ml) โดยการเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียก่อนทำให้เซลล์กระจายด้วยเครื่องตัวกำเนิดเสียงความถี่สูง จากนั้นทำเก็บรักษาตัวอย่างทางเดินอาหารกุ้งที่พร้อมนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป

การตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (ดัดแปลงจาก Amann, 1995)

นำตัวอย่างทางเดินอาหารบดของกุ้งขาวที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม 1 μL เกลี่ยลงบนเทฟลอนสไลด์ (Teflon slide) ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ด้วยเอทานอล 70% 80% และ 100% ความเข้มข้นละ 1 ครั้งๆละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วทิ้งให้แห้ง ทำการบ่มตัวอย่างกับ โพรบแต่ละชนิด (ตารางที่ 3) โดยแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อในทุกสไลด์จะบ่มโพรบพร้อมกัน 2 ชนิด คือ โพรบ EUB338 mix ที่ใช้ในการตรวจสอบกลุ่ม *Eubacteria* (Thimm and Tebbe, 2003) และ โพรบที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ โดยให้สีการติดฉลากของโพรบ EUB 338 mix ด้วยสีเรืองแสงที่ต่างจากโพรบที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ ทำการ hybridization ในสารละลาย hybridization buffer (NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM, SDS 0.01% และความเข้มข้น formamide ตามชนิดโพรบ) โดยมีโพรบความเข้มข้น 25 ng/μl แล้วนำตัวอย่างกับโพรบบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (TECHNE, hybridizer HB-1D) ที่อุณหภูมิ 46°C ในสภาพที่เต็มไปด้วยไอของ hybridization buffer และปราศจากแสงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วล้างสไลด์ด้วย washing buffer (Tris-HCl 20 mM, SDS 0.01% และ NaCl ความเข้มข้นตามชนิดของโพรบ) 1 ครั้งที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แห้ง หลังจากนั้นนำสไลด์ไปย้อมสีเซลล์ทั้งหมดด้วยสีเรืองแสง DAPI (5 μg/ml) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หยด anti-fading

solution ลงบนสไลด์เพื่อชะลอการจางหายของสารเรืองแสงแล้วจึงปิดสไลด์ด้วยกระจกปิด (cover glass) ก่อนนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ epifluorescent (Olympus, BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง cooled CCD (Olympus, DP50) ซึ่งวิธีการนับเซลล์แบคทีเรียแสดงในภาคผนวก ก

3.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range Test (Duncan, 1955)

3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินของกุ้งขาวจากผลของ ไวรัสทอร่า โปรไปโอติก และแบคทีเรียก่อโรค

3.2.1 การเตรียมอุปกรณ์และอาหารทดลอง

ทำการติดตั้งถังทดลองพลาสติกขนาด 20x31x22 นิ้ว ความจุ 200 ลิตรจำนวน 18 ถังพร้อมระบบให้อากาศ บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารคลอรีน 50 ppm. แล้วทิ้งไว้ให้คลอรีนสลายตัวจนหมด ปริมาณ 100 ลิตร PH ของน้ำทะเลก่อนเริ่มการทดลองระหว่าง 6.5-7.0 โดยปราศจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลองและไม่ใช้ระบบกรองตะกอน ปิดปากถังด้วยตาข่ายพลาสติกเพื่อป้องกันกุ้งดีดตัวข้ามถังทดลอง

3.2.2 การเตรียมกุ้งทดลอง

กุ้งขาวสุขภาพดี ไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสสำคัญ ได้แก่ White spot syndrome virus (WSSV), Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), Yellow head baculovirus (YBV), ทอร่าและทำการตรวจยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR รวมถึงไม่แสดงอาการการติดเชื้อโรคแบคทีเรียหรือมีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะก่อนการทดลอง โดยกุ้งที่ใช้มีอายุ 85 วัน น้ำหนักประมาณ 9-11 กรัม ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์กุ้งขนาด 3-4 กรัมจากฟาร์มของเกษตรกรในจังหวัดปัตตานีและทำการเลี้ยงในกระชังขนาด 1 ตารางเมตร ในบ่อดินขนาด 4 ไร่ โดยมีความหนาแน่น 100 – 150 ตัวต่อกระชัง ดูแลคุณภาพน้ำและการให้อาหารตามปกติ จนมีขนาด 9-11 กรัมที่สถานีวิจัยวาริชศาสตร์ อำเภอละงู จังหวัดสตูล ก่อนการ

ทดลอง 7 วันจะนำกุ้งมาพักในบ่อซีเมนต์ขนาด 8,000 ลิตร ของศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมและการทดลอง

3.2.3 อาหารทดลอง

การทดลองที่ 2 ใช้อาหารกุ้งเกรดการค้าสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวขนาด 5–15 กรัม โดยมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 35% ไขมันไม่น้อยกว่า 5% กากไม่มากกว่า 4% ความชื้นไม่มากกว่า 12%

3.2.4 การเตรียมเชื้อไวรัสทอร่า เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* AAHRC 01 และเชื้อโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 050

เชื้อไวรัสทอร่าที่ใช้ในการทดลอง ทำการแยกมาจากเหงือก หัวใจและเนื้อเยื่อใต้เปลือกของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอร่าระยะรุนแรงจากบ่อของเกษตรในเขตอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา โดยทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้ออายุ 32 วัน เมื่อวันที่ 14 ตุลาคม 2548 และทำการแยกไวรัสด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก จรีพร และคณะ (2548) โดยไวรัสที่แยกได้สามารถก่อโรคและทำให้กุ้งขาวปกติขนาด 9 กรัม ตายปริมาณ 20% ภายในเวลา 7 วัน โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องสุดท้ายของกุ้ง ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจาง 1:1,000 เท่าด้วยสารละลาย K-199 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีคุณภาพน้ำปกติ

เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* AAHRC 01 จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งสามารถก่อโรคและทำให้กุ้งปกติขนาด 7-10 กรัม ตายปริมาณ 60% ภายในเวลา 14 วัน (บุญกอบ, 2549) โดยวิธีการเติมเชื้อลงในน้ำเลี้ยงกุ้งให้มีปริมาณ $1x10^6$ CFU/ml การเตรียมเชื้อเริ่มต้น *V. harveyi* AAHRC 01 โดยการนำเชื้อที่เก็บไว้มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 5 ลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C โดยมีการเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนใช้งาน

เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 050 จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยนำเชื้อที่เก็บไว้มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS borth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในตู้

ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อากาศปกติ นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ให้มีปริมาณ $1x10^{12}$ CFU/ml ก่อนนำไปพ่นลงบนเม็ดอาหาร

3.2.5 แผนการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบ CRD โดยทำการสุ่มกุ้งขาวขนาด 9-11 กรัม อายุ 90 วัน จำนวน 45 ตัวต่อถัง ลงในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตรที่ใส่น้ำทะเลความเค็ม 20 ppt. ปริมาตร 100 ลิตร อุณหภูมิน้ำ 27-29^{0}C จำนวน 6 ชุด ๆ 3 ถัง โดยแบ่งเป็นชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุม กุ้งขาวปกติและได้รับอาหารปกติ (control)

ชุดทดลองที่ 2 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01โดยวิธีการแช่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงที่ความเข้มข้น $1x10^4$ CFU/ml ร่วมกับอาหารปกติ (VH)

ชุดทดลองที่ 3 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อไวรัสทอร่า โดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่อัตราการเจือจาง 1:1000 เท่าร่วมกับอาหารปกติ (TSV)

ชุดทดลองที่ 4 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01โดยวิธีการแช่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงที่ความเข้มข้น $1x10^4$ CFU/ml ร่วมกับอาหารผสม *L. plantarum* TISTR 050 10^9 CFU/g (VH+LP)

ชุดทดลองที่ 5 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อไวรัสทอร่า โดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่อัตราการเจือจาง 1:1,000 เท่าและเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 โดยวิธีการแช่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงที่ความเข้มข้น $1x10^4$ CFU/ml ร่วมกับอาหารปกติ (TSV+VH)

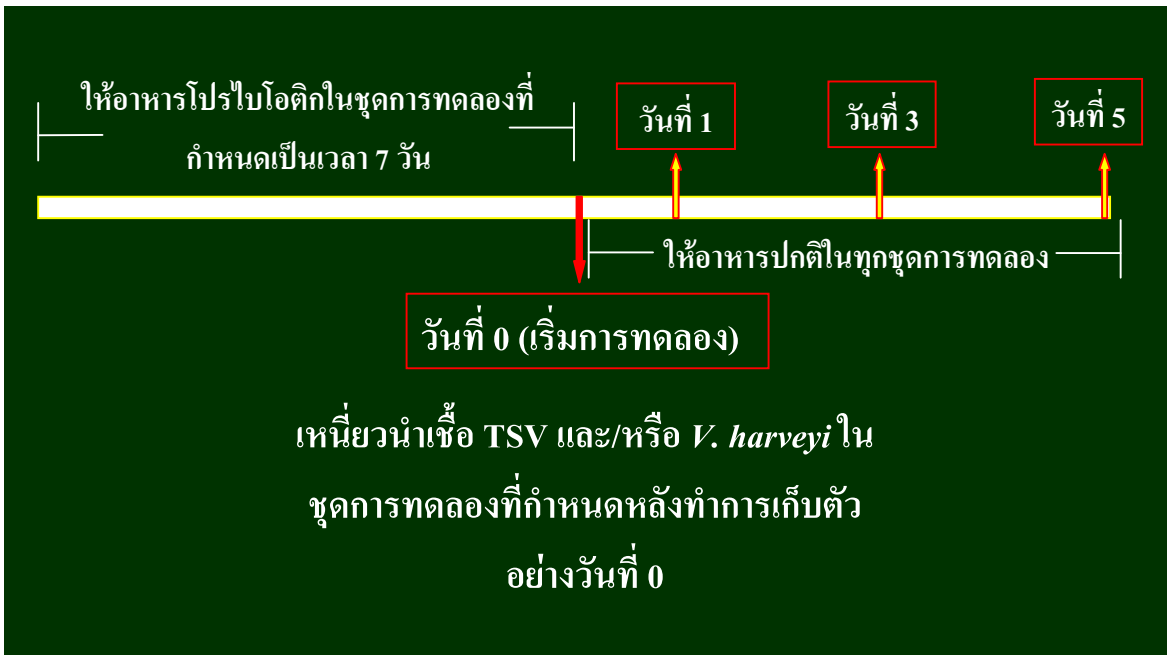
ชุดทดลองที่ 6 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อไวรัสทอร่า โดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่อัตราการเจือจาง 1:1000 เท่าและเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 โดยวิธีการแช่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงที่ความเข้มข้น $1x10^4$ CFU/ml ร่วมกับอาหารผสม *L. plantarum* TISTR 050 10^9 CFU/g (TSV+VH+LP)

โดยชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจะทำการให้อาหารผสมโปรไบโอติกก่อนเหนี่ยวนำโรคเป็นเวลา 7 วันและชุดการทดลองที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสจะทำการฉีดสารละลาย K-199 ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ในการเจือจางไวรัส ในปริมาณเท่ากับกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัส การให้อาหารจะทำการให้อาหารจำนวน 4 มื้อ โดยให้อาหารเวลา 7.00 น., 11.00 น., 16.00 น., 20.30 น. ตามลำดับ ตลอดการทดลองจะไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำรวมถึงการใช้ระบบกรองน้ำ ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง ปริมาณ *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปริมาณ

ประมาณการของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในบ่อกุ้งที่มีกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่าที่ได้จากการตรวจสอบในงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งแผนผังการให้อาหาร การเหนี่ยวนำโรคและการเก็บตัวอย่างแสดงในภาพที่ 11

การเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บตัวอย่างกุ้งจำนวน 7 ตัวต่อถัง ในช่วงเวลาดังต่อไปนี้

1. ก่อนการเหนี่ยวนำโรค (หลังการให้โปรไบโอติกเป็นเวลา 7 วัน)
2. หลังเหนี่ยวนำโรคเป็นเวลา 1 วัน
3. หลังเหนี่ยวนำโรคเป็นเวลา 3 วัน
4. หลังเหนี่ยวนำโรคเป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 11 แผนผังการให้อาหาร การเหนี่ยวนำโรคและการเก็บตัวอย่างในการทดลองที่ 2

3.2.6 การศึกษาองค์ประกอบเลือดจากผลของไวรัสทอร่า แบคทีเรียก่อโรค และโปรไบโอติก

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งขาวตัวอย่างจำนวน 7 ตัวจากบริเวณโคนขาเดินที่ 3 ในทุกถังแล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ปริมาณ Oxyhemocyanin โดยดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก Chen and Cheng (1993)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือด โดยดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก Lowry และคณะ (1951)

การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocytes count) โดยใช้วิธีการของ กิจการและคณะ (2543)

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (blood glucose) โดยดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก Hyvarinen and Nikkila (1962)

3.2.7 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

สลบกุ้งโดยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1-2 นาทีและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเปลือกโดยการใช้ เอทานอล 70% ตัดแยกทางเดินอาหารของกุ้งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อนและลำไส้ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นบดแต่ละส่วนของทางเดินอาหารจากตัวอย่างกุ้ง 3 ตัวรวมกันในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และปรับความเข้มข้นเป็น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร เพาะแบคทีเรียในอาหาร TSA, MRS ซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และTCBS โดยทำการสุ่มตรวจจำนวน 3 ตัวอย่างในทุกชุดการทดลอง ซึ่งการนับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จะทำการนับเฉพาะแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลมนูน ขอบเรียบและระยะเวลาในการเจริญที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 ซึ่งเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เท่านั้น

3.2.8 การติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวจากผลของไวรัสทอร่า แบคทีเรียก่อโรค และโปรไบโอติก โดยเทคนิค FISH

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาว โดยใช้ Oligonucleotide probe ติดสารเรืองแสงในการติดตามกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจจำนวน 6 กลุ่มรวมถึงกลุ่มย่อยของ LGC group และ γ-Proteobacteria group เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นอกจากนี้ยังทำการติดตามแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* ด้วยโพรบ Lplan ซึ่งเป็นโพรบที่จำเพาะต่อ *L. plantarum* เท่านั้น โดยทำการเก็บตัวอย่างทางเดินอาหารกุ้ง 2 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน และลำไส้ (ทั้งลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลาย) จำนวนอย่างละ 3 ตัวอย่างในทุกชุดการทดลอง ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะทำการบดรวมตัวอย่างชนิดเดียวกันจากกุ้ง 3 ตัวรวมกัน

3.2.9 การเตรียมตัวอย่างลำไส้กุ้งบด (ดัดแปลงจาก บุญกอบ และคณะ, 2548)
ดำเนินการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.10 การตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (ดัดแปลงจาก Amann, 1995)
ดำเนินการศึกษาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range Test (Duncan, 1955)