บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุและสารเคมี

1. น้ำกากส่าสดจากโรงงานสุราจังหวัดสุราษฎร์ธานี (บริษัทนทีชัย จำกัด)

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำกากส่าสดที่ออกจากหอกลั่นโรงงานสุรา โดยเก็บใส่แกลอนขนาด 100 ลิตร เพื่อใช้ตลอดระยะเวลาการทดลองโดยเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

2. กุ้งขาวอายุ 1 เดือน จากฟาร์มสมชัย จังหวัดสุราษฎร์ธานี

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

-Tryptic Soy Agar (TSA)

- Plate Count Agar (PCA)

- Potato Dextrose Agar (PDA)

- De Man Rogosa and Sharpe (MRS agar)

- Yeast Malt Extract (YM)

- Milk agar

- Starch agar

4. อาหารเม็ด (เอราวัณ 1003 พี บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน))

5. น้ำมันปลา Squalene (บริษัท แอควาเทค 522-526 หมู่ 2 ต. พะวง อ.เมือง จ. สงขลา)

6. น้ำทะเล

เก็บน้ำทะเลจากหาดสมิหลา จังหวัดสงขลา โดยดูดน้ำทะเลที่ระดับความลึก 15 เมตร และห่างจากชายฝั่ง 1 กิโลเมตร

7. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (A.O.A.C, 1990)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (A.O.A.C , 1990)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ซีโอดี (APHA, AWWA and WPCF, 1985)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์บีโอดี (APHA, AWWA and WPCF, 1985)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด (APHA, AWWA and WPCF, 1985)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งแขวนลอย (APHA, AWWA and WPCF, 1985)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งไม่ละลายน้ำ (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งละลายน้ำ (APHA, AWWA and WPCF, 1985)
- สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson, 1954)

2. อุปกรณ์

- เทอร์โมมิเตอร์
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (ultrasonics homogenizer)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (A.O.A.C, 1990)
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (A.O.A.C , 1990)
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ซีโอดี
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์บีโอดี
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งแขวนลอย
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งไม่ละลายน้ำ
- อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ของแข็งละลายน้ำ
- หัวทรายพร้อมท่อ
- หัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร
- ตู้เลี้ยงกุ้งขนาด 45 × 45 × 60 เซนติเมตร จำนวน 15 ตู้
- อวนขนาด 30 ตารางเซนติเมตร

วิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำกากส่า

1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำกากส่า (ภาคผนวก ก)

นำน้ำกากส่าจากหอกลั่นโรงงานผลิตสุราจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีมาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ คือ

1.1 วัดอุณหภูมิ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

1.2 วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง โดยใช้ pH meter

1.3 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (A.O.A.C, 1990)

1.4 วิเคราะห์ปริมาณไขมัน (A.O.A.C , 1990)

1.5 วิเคราะห์ซีโอดี (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

1.6 วิเคราะห์บีโอดี (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

1.7 วิเคราะห์ของแข็งทั้งหมด (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

1.8 วิเคราะห์ของแข็งแขวนลอย (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

1.9 วิเคราะห์ของแข็งไม่ละลายน้ำ (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

1.10 วิเคราะห์ของแข็งละลายน้ำ (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

1.11 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1954)

1.2 วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของน้ำกากส่า

1.2.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

นำน้ำกากส่าสดมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี pour plate ในอาหาร PCAทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

1.2.2 ปริมาณ *Bacillus* sp.

นำน้ำกากส่าสดมาต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ *Bacillus* sp.โดยวิธี pour plate ในอาหาร TSA ที่เติม 1.5 % โซเดียมคลอไรด์ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.3 ปริมาณแบคทีเรียแลกติก

นำน้ำกากส่ามาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียแลคติกโดยวิธี pour plate ในอาหาร MRS agar ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ และ 0.4 % bromocresol purple ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับเฉพาะโคโลนีที่รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง

1.2.4 ปริมาณเชื้อยีสต์และรา

นำน้ำกากส่ามาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เท่า ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อยีสต์และราโดยวิธี pour plate ในอาหาร PDA ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น นำไปบ่มที่ 30 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำกากส่า

นำน้ำกากส่าสดมาทำการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยการนำน้ำกากส่าสดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 วัน โดยจะทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์ และ *Bacillus* spp.ในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11และ 13 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ในน้ำกากส่าหมัก แล้วจึงนำมาทำการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำกากส่าต่อไป

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก

นำตัวอย่างน้ำกากส่าหมักในวันที่ให้ปริมาณแบคทีเรียแลกติกมากที่สุดมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยวิธี pour plate ในอาหาร MRS agar ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บโคโลนีที่รอบโคโลนีเป็นสีเหลืองมาทำให้บริสุทธิ์ (steak plate technique) บนอาหาร MRS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง และ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกจะให้ผลลบ (Axelsson, 1993)

2.2 การคัดเลือก *Bacillus* spp.

นำน้ำกากส่าสดมาต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ *Bacillus* spp.โดยวิธี pour plate ในอาหาร TSA ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนี *Bacillus* spp. จากอาหาร TSA มาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (steak plate technique) บนอาหาร TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ดูการย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และดูความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็น *Bacillus* spp. จะให้ผลบวก (Phinphak *et al*., 1997)

การติดสีแกรม

นำโคโลนีของแบคทีเรียแลกติก และ *Bacillus* spp. มาย้อมสีแกรม

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและแห้ง เขี่ยเชื้อทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS และ TSB อายุ 24 ชั่วโมง มา 2 ลูปเขี่ยเชื้อ แตะลงในหยดของ H_2O_2 ถ้าเกิดฟองแก๊สขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

2.3 การคัดเลือกยีสต์

นำตัวอย่างน้ำกากส่ามาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ดูดน้ำกากส่าเจือจางมา 1 มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณยีสต์โดยวิธี pour plate ในอาหาร YM ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนียีสต์จากอาหาร YM agar มาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (steak plate technique) บนอาหาร YM agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำกากส่าโดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำกากส่าหมัก

นำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำกากส่าหมัก มาทำการทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกดังนี้

3.1 การทดสอบการย่อยแป้ง

นำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ ที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง มา steak ลงบนอาหาร Starch agar (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Michael and Pelezar, 1995)

3.2 การทดสอบการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ ที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง มา steak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim Milk agar (ภาคผนวก ข) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญโดยเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนจะเกิดวงใส (clear zone) รอบๆ โคโลนีของเชื้อ (Michael and Pelezar, 1995)

3.3 การทดสอบการย่อยไขมัน

นำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ ที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง มา steak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar, TSA และ YM agar ที่เติมร้อยละ 1 Tributyrin แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญโดยสังเกตบริเวณใส (clear

zone) รอบๆโคโลนี ซึ่งแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมัน (lipolytic enzyme) ย่อย tributyrin ได้ (Michael and Pelezar, 1995)

3.4 การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* spp. และยีสต์มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS, TSB และ YM ทำการแบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 เก็บใน Anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชุดที่ 2 นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.5 การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรด

นำแบคทีเรียแลคติก, *Bacillus* spp. และยีสต์ มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS, TSB และ YM ที่ปรับ pH เป็น 1-5 โดย HCl และ NaOH 3 นอร์มัล นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

3.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

นำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* sp. และยีสต์ที่ผ่านการทดสอบการย่อยแป้ง, โปรตีน, ไขมัน, การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Vibrio haveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งขาวโดยใช้วิธี disc diffusion (ภาคผนวก ก) โดยสังเกตจากวงใสที่เกิดขึ้น

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus* sp .และยีสต์ที่คัดเลือกได้ในน้ำกากส่า

หลังจากทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียและยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำกากส่าหมัก จึงเลือกแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์ และ *Bacillus* sp. ที่ให้ผลการย่อยโปรตีน,ไขมัน, แป้ง, การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน, การเจริญในสภาวะที่กรด และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์ ที่ให้ผลดีที่สุดอย่างละ 1 ไอโซเลต เพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับกุ้งขาวต่อไป

สำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ทำได้โดยนำแบคทีเรียแลกติก, *Bacillus* sp. และยีสต์ที่แยกได้ เลี้ยงใบอาหารเหลว MRS, TRB และ YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 1% NaCl บ่มที่ 35-37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

4.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำกากส่าต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. และยีสต์

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในน้ำกากส่าที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:0, 1:5 และ 1:10 ในฟลาสต์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาการเจริญโดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.2 ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. และยีสต์

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในน้ำกากส่าระดับการเจือจางที่ ได้จากที่ 4.1 ปรับ pH ด้วย 3 นอร์มัล HCl และ NaOH เป็น 4.5, 6.0 และ 7.5 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที 37 องศาเซลเซียส ศึกษาการเจริญโดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. และยีสต์

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงเลี้ยงในน้ำกากส่าระดับการเจือจางที่ได้จากข้อ 4.1 และ pH ที่ได้จากข้อ 4.2 บ่มในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200รอบ/นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ศึกษาการเจริญโดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

5. การประยุกต์ *Bacillus* sp. และยีสต์ ในการเลี้ยงกุ้งขาว

การเตรียมน้ำทะเลสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

เตรียมน้ำทะเลโดยใช้น้ำทะเลที่มีความเข้มข้น 30 ppt มาเจือจางให้ได้ 15 ppt ด้วยน้ำประปาที่พักไว้ในบ่อพักน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่คลอรีนที่มีความเข้มข้นประมาณ 30 ppm เพื่อฆ่าเชื้อ พักน้ำทิ้งไว้ 2 วัน เพื่อกำจัดคลอรีน แล้วนำน้ำทะเลที่เจือจางแล้วใส่ในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่มีขนาด 45 × 45 × 60 เซนติเมตรที่ทำความสะอาดแล้ว ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของตู้ ซึ่งก่อนใช้ตู้ต้องมีการฆ่าเชื้อภายในตู้โดยการแช่คลอรีนที่มีความเข้มข้นประมาณ 30 ppm ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำเมื่อเริ่มการทดลอง ได้แก่ ความเค็ม, ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ใส่หัวทรายในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวตู้ละ 1 หัว เพื่อให้อากาศตลอดเวลา และใส่ตาข่ายไนลอนลงในตู้เพื่อให้กุ้งขาวเกาะในระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาว

การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

เตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยเลี้ยง *Bacillus* sp. และยีสต์ในอาหารเหลว TSB และ YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 1.5% โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว TSB และ YM ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสต์ขนาด 250 มิลลิลิต นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^4 และ 10^7 CFU/ml ทำการคลุกเคล้าเซลล์เปียกกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (เอราวัณ 1003 พี บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน)) โดยการฉีดพ่นเซลล์สดของ *Bacillus* sp. และยีสต์ ที่ปรับความเข้มข้นแล้วให้ทั่วถึงทุกเม็ดของอาหารในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตร/อาหาร 25 กรัม (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539)ซึ่งจะมีเชื้ออยู่จำนวน 2×10^3 และ2×10^6 CFU/g อาหาร หลังจากนั้นเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาให้ทั่วทุกเม็ดของอาหาร (ยี่ห้อ Squalene) เพื่อให้ *Bacillus* sp. และยีสต์เกาะบนอาหารเม็ด ในอัตราส่วน 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้ต่อไป โดยทำการเตรียมอาหารสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

การเตรียมลูกกุ้งขาว

กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองเป็นลูกกุ้งที่มีอายุ 1 เดือน ซึ่งก่อนเริ่มต้นการเลี้ยงต้องทำการคัดเลือกกุ้งขาวที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยสุ่มกุ้งขาวขึ้นมา 10 ตัว ให้มีขนาดใกล้เคียงกัน นำไปแช่น้ำเย็นประมาณ 10 วินาที โดยการใส่น้ำแข็งลงไปลอยในน้ำ (ทำให้กุ้งหยุดการเคลื่อนไหวเพื่อนำไปชั่งน้ำหนัก) หลังจากนั้นซับน้ำที่ตัวกุ้งขาวให้แห้งโดยใช้ผ้าที่สะอาดแล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยตาชั่ง 3 ตำแหน่ง โดยมีน้ำหนักเปียกเฉลี่ยประมาณ 3.5 กรัม/ตัว นำมาใส่ในตู้กระจกขนาด 45 × 45 × 60 เซนติเมตร ตู้ละ 10 ตัว พักกุ้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วจึงให้กุ้งขาวกินอาหารเม็ดธรรมดา (เอราวัณ 1003 พี บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน)) เพื่อให้กุ้งปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในตู้ทดลองก่อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง ก่อนจะเริ่มการทดลองได้ตรวจสอบความแข็งแรงของกุ้ง และกุ้งที่ตายจะถูกตักออกแล้วเติมตัวใหม่ลงไป จนครบจำนวน 10 ตัวทุกตู้ ในระหว่างการทดลองมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาและใส่อวนขนาด 30 ตารางเซนติเมตร เพื่อเป็นที่หลบซ่อนของกุ้งทุกตู้

การวางแผนการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 5 ชุด (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ)

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของ *Bacillus* sp. ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^3 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมเซลล์สดของยีสต์ในระดับความเข้มข้น 2×10^6 CFU/g อาหาร และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดควบคุม ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดธรรมดาที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ให้อาหารตามปกติ (วันละ 4 มื้อ) ในช่วงเวลา 8.00 น., 12.00 น., 16.00 น. และ 20.00 น. ในอัตราประมาณ 6-7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวกุ้งทั้งหมดในตู้ ประมาณ 4 – 5 กรัม/ตู้ มีการตรวจสอบกุ้งที่ตาย และต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ นำตาข่ายไปล้าง ดูดเศษอาหารที่เหลือและขี้กุ้งทิ้งทุกวัน โดยทำการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ในแต่ละสัปดาห์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter (Metter Delta 340) วัดอุณหภูมิของน้ำด้วยเทอร์โมมิเตอร์ชนิด 0-100 ^{0}C และในแต่ละ 2 สัปดาห์ วัดค่าแอมโมเนีย, ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ของน้ำ, ปริมาณไนไตรท์ ไนเตรท และค่าความเค็ม (Salinity) วัดโดย Salinometer (Atago s-28)

5.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

5.1.1 อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (G)

โดยนำลูกกุ้งที่เหลือในแต่ละตู้ไปชั่งน้ำหนัก เมื่อสิ้นสุดระยะการทำการทดลอง โดยหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักเปียก เพื่อคำนวณน้ำหนักลูกกุ้งที่เพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อเริ่มการทดลอง แล้วนำน้ำหนักค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง ดังนี้

$$G = \frac{Wt}{Wo} \times \frac{100}{t}$$

เมื่อ G = อัตราการเจริญเติบโตต่อวันคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

Wt = น้ำหนักสุดท้าย

Wo = น้ำหนักเริ่มต้น

t = ระยะเวลาที่ทดลอง

5.1.2 อัตราการรอดตาย

ตรวจนับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ในตู้ทดลองทุกวัน และบันทึกผลตลอดระยะเวลาการทดลอง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการรอดตายจากสูตร

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่เหลือ}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มทำการทดลอง}} \times 100$$

5.1.3 ระบบภูมิคุ้มกัน

หลังจากที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำครบ 6 สัปดาห์ นำกุ้งทุกชุดการทดลองมาศึกษาระบบภูมิคุ้มกัน คือ

- ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Hemocyte Count, THC) (กิจการ ศุภมายต์ และคณะ, 2543)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง (ใช้กุ้งขาวจำนวน 10 ตัว ชุดการทดลองละ 2 ตัว รวมทั้งชุดควบคุมด้วย) จากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ด้วยเข็มฉีดยาปริมาตร 1 มล. ใช้หัวเข็มเบอร์ 24 นำเลือดที่ได้ 0.1 มล. ใส่ลงใน microtube และใช้ micropipette ดูดเลือดกุ้งมา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด efpendrof ที่บรรจุ Trypan blue ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วหยดเลือดที่ผสม Trypan blue แล้วหยดลงในร่องของ Hemacytometer ที่มี cover glass ปิดอยู่ก่อนแล้ว อย่าให้มีฟองอากาศ และซับของเหลวที่ล้นขอบของ Hemacytometer ทำการนับปริมาณเม็ดเลือดข้างละ 5 ช่องของ Hemacytometer (ตรงกลาง และมุมบนล่างทั้งด้านซ้ายและขาว) นำค่าที่ได้มาทำการคำนวณหาค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมเป็นจำนวนเซลล์/มล. ดังนี้

$$\text{Total Hemocyte Count (THC)} = n \times 2 \times 10^3 \text{ เซลล์/มล.}$$

- **ตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity)** ตามวิธีการของ Soderhall และคณะ (1990) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ ศุภมายต์ และคณะ (2543)

1) การเตรียมตัวอย่างเม็ดเลือด เตรียมเข็มฉีดยา (ปราศจากเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร) โดยดูด 3% แอลซิสทีอีน ใส่หลอดฉีดยา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในแต่ละเข็มฉีดยาแช่เย็นไว้ใช้สำหรับป้องกันเลือดแข็งตัว และเจาะเลือดกุ้งจำนวน 10 ตัว (ชุดการทดลองละ 2 ตัว รวมทั้งชุดควบคุมด้วย) เจาะเลือดบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ใส่ใน microtube แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1-1.5 มิลลิลิตร ด้วยแอลซิสทีอีน ให้เม็ดเลือดตกตะกอนโดยผสมแอลซิสทีอีนกับเลือดกุ้งเบาๆ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6500รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมเค-199 1 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมคาร์โคไดเลตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร (ไม่ต้องผสม) แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวจนแข็ง (กรณีที่ไม่วิเคราะห์ทันที)

2) การวัดปฏิกิริยา นำตัวอย่างเม็ดเลือดที่ได้จากข้อ 1) มาทำให้แตกด้วยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง โดยใช้ความถี่ 35 กิโลเฮิร์ท เป็นเวลา 5 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่ทริปซินในหลอดทดลอง หลอดละ 200 ไมโครลิตร เติมตัวอย่างลงไป 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมแอล-3,4- ไดไฮดรอกซีฟีนิลอลานีน 200 ไมโครลิตร เขย่าทิ้งไว้ 2 นาที เติมคาร์โคไดเลตบัฟเฟอร์ 1800 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ทันทีที่ครบ 2 นาที และทุก 2 นาที บันทึกค่าที่อ่านได้แล้วนำไปคำนวณค่า unit ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสต่อนาที นำตัวอย่างที่เหลือไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543) (ภาคผนวก ก)

ดูดส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเซลล์เม็ดเลือดที่ทำให้แตกแล้ว (จากขั้นตอนการหาความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส) มา 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 900 ไมโครลิตร เติม alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่เติมสารเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณโปรตีน (mg protein) โดยเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 80, 100, 200, 400 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การคำนวณค่า PO activity

$$\text{PO activity} = \frac{\text{unit/min}}{\text{mg protein}} \qquad \text{unit/min/mg protein}$$

5.2 การทดสอบกับเชื้อก่อโรค

หลังจากที่เลี้ยงกุ้งครบ 6 สัปดาห์ นำกุ้งขาวที่เหลือจากการทดลองในขั้นต้นมาทดสอบการทนต่อการเกิดโรคเรืองแสง โดยนำกุ้งขาวที่เหลือ (แบ่งทำเป็น 2 ซ้ำ) มาฉีดเชื้อ *V. harveyi* ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 24 G ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 CFU/ml ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และในชุดควบคุมจะฉีดด้วย 0.85 เปอร์เซนต์โซเดียมคลอไรด์แทน *V. harveyi* โดยฉีดที่ปล้องสุดท้ายของกุ้งกุลาดำระวังอย่าให้โดนเส้นประสาทของกุ้งกุลาดำ ติดตามอัตราการรอดตายหลังจากที่กุ้งได้รับเชื้อ *V. harveyi* เป็นระยะเวลา 10 วัน บันทึกผลเมื่อมีการตายเกิดขึ้น