ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสนใจในการใช้โปรไบโอติกในทางการค้าในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมุ่งเน้นเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียในการบำบัด หรือปรับปรุงคุณภาพของน้ำ ส่วนการศึกษาวิจัยที่มุ่งเน้นการใช้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยีสต์เป็นโปรไบโอติกยังมีไม่มากนัก ทั้งๆที่ยีสต์มีองค์ประกอบที่มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำอยู่หลายชนิด เช่น เบต้ากลูแคน ไดติน เม็ดสีคาโรทินอยด์ mannoproteins และ polyamines จากการใช้ผลิตภัณฑ์ยีสต์ชนิดต่างๆ ต่อความต้านทานของลูกกุ้ง *Penaeus vannamei* ต่อโรคกุ้งที่เกิดจาก *Vibrio harveyi* โดย Scholz *et al.* (1999) พบว่า อาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมยีสต์และไม่ผสมยีสต์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักในกุ้ง แต่กุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* และ *Phaffia rhodozyma* มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีเบต้ากลูแคน ซึ่งมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อจุ่มกุ้งทดลองลงในสารแขวนลอยของ *V. harveyi* strain BP05 พบว่า กุ้งที่ได้รับยีสต์ทั้ง 2 ชนิด สามารถกำจัดแบคทีเรียออกจาก hemolymph ได้ โดยกุ้งที่ได้รับ *P. rhodozyma* สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ดีกว่า กุ้งที่ได้รับ *S. cerevisiae* ในขณะที่กุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนยังมีแบคทีเรียเหลืออยู่ค่อนข้างสูง การทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสิ่งใดหรือปัจจัยใดจากยีสต์ที่ส่งผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่สรุปได้ว่าการใช้ยีสต์ส่งผลให้กุ้งที่มีอัตราการรอดตายที่ดีขึ้น

Tovar และคณะ (2002) รายงานว่าการผสมยีสต์ *Debaryomyces hansenii* ที่ยังมีชีวิตซึ่งแยกได้จากไส้ปลาในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ส่งผลให้อัตราการรอดตายของปลาสูงกว่าตัวอ่อนที่ได้รับอาหารผสม *S. cerevisiae* และชุดควบคุม ซึ่งผู้วิจัยมุ่งเน้นความสนใจไปยังองค์ประกอบ polyamines (spermine และ spermidine) ที่ยีสต์ชนิดนี้ผลิตได้สูงกว่า *S. cerevisiae* มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการหลั่งของเอ็นไซม์ amylase และ trypsin ในทางเดินอาหารของปลา ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีรายงานวิจัยว่าสารประกอบกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการ differentiation และ maturation ของทางเดินอาหารของปลา

ยีสต์มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ที่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีผลต่ออัตราการรอดที่สูงขึ้น อย่างเช่น เบต้ากลูแคน และ polyamines โดยที่ Sitthipun และคณะ (2000) ได้ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *S. cererisiae* TISTR 5088 แล้วนำไปผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์มีความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* โดยมีอัตราการรอดตายถึง 90% และมีปริมาณแบคทีเรียเหลืออยู่ในน้ำเลือดต่ำสุดเมื่อเทียบกับกุ้งที่ได้รับอาหารผสมผนังเซลล์ยีสต์ และอาหารผสมเบต้ากลูแคนก่อนการทำบริสุทธิ์ ซึ่งนอกจากเบต้ากลูแคน และ polyamines แล้วผนังเซลล์ยีสต์ยังประกอบไปด้วยไคติน ซึ่ง Sakai

และคณะ (1992) อ้างโดย Masahiro (1999) พบว่าการฉีด chitin ในปลา Rainbow Trout (*Salrelinus fontinalis*) ส่งผลไปกระตุ้น macrophage และเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะแต่การทดลองในหนูไม่พบผลดังกล่าว และการใช้ไคโตแซนยังมีผลไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา Rainbow trout ได้อีกด้วย นอกจากนี้ Scecondary metabolite ที่ยีสต์บางชนิดสร้างขึ้น เช่น astaxanthin ซึ่งมีรายงานว่าการใช้ astaxanthin เสริมในอาหารเลี้ยงปลา Rainbow trout ส่งผลให้สัตว์มีอัตราการรอดและการเจริญที่สูงขึ้น ตลอดจนมีภูมิต้านทานต่อโรคดี Boonyaratpalin *et al.* (2000) พบว่าการเสริม astaxanthin ในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำส่งผลให้เม็ดเลือดกุ้งมีปริมาณมากขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกุ้งมีความต้านทานต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังมีประสิทธิภาพที่จำกัด นอกจากนี้ยังมีผลต่อปริมาณเม็ดสีเพิ่มขึ้นมีผลต่อคุณภาพด้านสีของเนื้อกุ้งได้ดี

ขอบเขตของการวิจัย

1. แยกเชื้อยีสต์จากกุ้งกุลาดำธรรมชาติ กุ้งเลี้ยง สัตว์ทะเล ซากพืชและสัตว์ ตะกอนดิน และตัวอย่างน้ำทะเลตามจุดต่างๆที่เก็บตัวอย่างดังกล่าว
2. คัดเลือกยีสต์ที่แยกได้ตามความสามารถของยีสต์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ในหลอดทดลอง ความสามารถในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง ไขมัน โปรตีน รวมถึงความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีไนเตรท ไนไตรท์
3. ศึกษาศักยภาพการเป็นโปรไบโอติก ในหลอดทดลองโดยตรวจสอบความสามารถในการแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรค การผลิตสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งงาน วิจัยส่วนนี้จะทำ ณ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่
4. การนำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงให้ได้ปริมาณที่เพียงพอ สำหรับนำไปใช้ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งเพื่อศึกษาผลของยีสต์ต่อ การเจริญ อัตราการรอด และผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งตลอดจนความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียออกจากระบบไหลเวียน ซึ่งงานส่วนนี้บางส่วนจะทำ ณ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร และบางส่วนจะทำ ณ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

1. จุลินทรีย์
   1.1 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055
   1.2 *Vibrio harveyi* (แยกจากกุ้งที่เป็นโรค)
   1.3 FS9
2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ
   2.1 Thiosulphate citrate bile salt agar(TCBS)
   2.2 Yeast extract (Himedia)
   2.3 Malt extract (Himedia)
   2.4 Tryptone (Himedia)
   2.5 Soytonte (Himedia)
   2.6 Glucose (Fluka)
   2.7 Agar (BP)
   2.8 Peptone (Himedia)
   2.9 Mueller Hinton Agar (Himedia)
   2.10 Soluble Starch
   2.11 Nutrient Broth (Labscan)
   2.12 Potassium Nitrate (Merck)
   2.13 α-naphthylamine reagent solution
   2.14 Sulfanilic acid
   2.15 ผงสังกะสี
   2.16 Skim milk
   2.17 Trypan Blue (Fluka)
   2.18 NaCl (MercK)
   2.19 Liquid Paraffin
   2.20 Gum Arabic
   2.21 Trybutyrin (Fluka)
   2.22 10% Chloramphenical
   2.23 2% Streptomycin
   2.24 Ethyl alcohol (CH_3CH_2OH)
   2.25 Acetic Acid

2.26 1 M NaOH

2.27 น้ำมันปลาทูน่าความเข้มข้น 60°บริกซ์ (บ. โชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด)

2.28 อาหารเม็ด รหัส ซีพี 9003 พี (บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด (มหาชน))

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Mettler Toledo PB1502-S

3.2 เครื่องเขย่า Labnet VX-100

3.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ(Autoclave) รุ่น SS-325

3.4 เครื่องเขย่า GFL 3017

3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centifuge) รุ่น Universal 32R

3.6 ไมโครปิเปตขนาด 1000 และ 100 ไมโครลิตร(Gilson, France)

3.7 ทิพขนาด 1000 และ 100 ไมโครลิตร(Axygen)

3.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ Memmert รุ่น WB14

3.9 ตู้ปลอดเชื้อ Microflow class-2

3.10 ตู้บ่มเชื้อ Memmert รุ่น BF 500

3.11 กล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น YS 100

3.12 Heamacytometer

3.13 จานเพาะเชื้อขนาด 15x100 มิลลิเมตร (Petriq)

3.14 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อและเข็มเขี่ยเชื้อ

3.15 หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20x150 มิลลิเมตร (Pyrex, USA)

3.16 หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13x100 มิลลิเมตร (Pyrex, USA)

3.17 Syringe 10 ml

3.18 Syringe Filter cellulose acetate 0.2 µm

3.19 กระบอกอบเพลทสำหรับจานเพาะเชื้อขนาด 15x100 มิลลิเมตร

3.20 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(Waterbath)

3.21 Hot plate and stirrer (LMS-HTS1003)

3.22 Hand held tolley Counter (Diamond)

3.23 Microscope slides ขนาด 1 x 3 นิ้ว

3.24 Microscope cover glasses ขนาด 22 x 22 mm

3.25 Heater ปรับอุณหภูมิในตู้เลี้ยงกุ้ง

3.26 ตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งขนาด 45 x 45 x 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.27 ระบบให้อากาศ

3.28 ตาข่ายไนลอน

วิธีการวิจัย

1. การแยกเชื้อยีสต์จากแหล่งธรรมชาติทางทะเล น้ำ ตะกอนดิน กุ้งเลี้ยง และกุ้งธรรมชาติ

ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งเลี้ยง กุ้งธรรมชาติ ตะกอนดิน พืชทะเล สัตว์ทะเล และน้ำทะเล รวมถึงน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จากทะเลฝั่งอันดามันโดยเน้นบริเวณภาคใต้ตอนกลาง ครอบคลุมตอนเหนือของจังหวัดตรัง กระบี่ และทางฝั่งอ่าวไทย ตามวิธีของ Hagler and Ahearn (1987) แล้วนำมาเจือจางและปั่นผสมกับน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อและมีความเค็มสมดุลกับความเค็มของตัวอย่าง ทำการเจือจางแบบลำดับส่วน แล้วเกลี่ยตัวอย่างบนอาหาร 2 ชนิด คือ Yeast Malt Agar ทีมี 0.01% chloramphenical และ 0.002% Streptomycin ที่เตรียมโดยใช้น้ำทะเล เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย กับ อาหาร YM ที่มีการปรับพีเอช เป็น 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังรายละเอียดในภาคผนวก ค (Fell, 2001)

ทำการแยกเชื้อยีสต์ตามลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของโคโลนี ที่เจริญบนอาหารวุ้น โดยวิธีเกลี่ยบนอาหารแข็งให้ได้โคโลนีเดี่ยวอย่างน้อย 3 ครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ทำการเก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่แยกได้ในอาหาร YM เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ และอีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°ซ โดยใส่ใน microtube ซึ่งมี 70 % Glycerol ผสมอยู่

2. การคัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น โดยนำยีสต์ที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติดังต่อไปนี้

2.1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง แบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ของเชื้อยีส์ที่แยกได้จากข้อ 1 โดยวิธี Agar spot assay (ภาคผนวก ค) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่แสดงผลการยับยั้งสูงที่สุด โดยวัดความกว้างของวงใสเพื่อบ่งบอกระดับของการยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อยีสต์ที่แยกได้

2.2. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ของส่วนใสที่แยกจากการเลี้ยงยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 1 โดยวิธี Agar diffusion assay (ภาคผนวก ค) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่แสดงผลการยับยั้งดีที่สุด โดยวัดความกว้างของวงใสที่บ่งบอกระดับของการยับยั้งแบคทีเรีย

2.3. ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง โปรตีนและไขมัน โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มี แป้ง, เคซีน และ Tributyrin ตามลำดับ ทำการทดสอบตามวิธีในภาคผนวก ค โดยวัดความกว้างของวงใสที่บ่งบอกความสามารถของยีสต์ที่แยกได้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ดังกล่าว คัดเลือกยีสต์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ได้ดีที่สุด

2.4. ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท/ไนไตรท์ ของยีสต์ที่แยกได้ โดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหาร nitrate broth ทำการทดสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ MacFaddin

(2000) ตามภาคผนวก ค แล้วคัดเลือกยีสต์ที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท/ไนไตรท์ได้ดีที่สุด

3. จัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสของ 26s rRNA (Altschul *et al.*, 1997) แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GeneBank โดยใช้ BLASTn

4. ศึกษาศักยภาพการเป็นโปรไบโอติก ของยีสต์ที่คัดเลือกจากข้อ 2

นำสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง *V. harveyi* ตามวิธี co-culture technique (Fooks and Gibson, 2002)โดยการเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้ร่วมกับ *V. harveyi* ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมของ Yeast Malt Broth และ Tryptone Soy Broth ที่เตรียมจากน้ำทะเล ในสภาวะที่มีอากาศและสภาวะไร้อากาศ (ปิดทับอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย sterile liquid paraffin) ดึงตัวอย่างเพื่อตรวจนับจำนวนยีสต์ โดยวิธี plate count โดยใช้อาหาร YM และจำนวนแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* โดยใช้อาหาร TCBS agar ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง คำนวนจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดและรายงานเป็น CFU/ml อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยดำเนินการทดลองดังนี้

4.1 การเตรียมและนับจำนวนยีสต์เริ่มต้น

4.1.1 ถ่ายเชื้อยีสต์ 1 ลูป จากอาหารวุ้นเอียงลงในอาหาร YMB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาดเล็ก บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.2 ปิเปตยีสต์จากข้อ 4.1.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วนร้อยละ 3.3) ลงในอาหาร YMB 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาดเล็ก บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.3 นับจำนวนยีสต์เริ่มต้นในอาหารจากข้อ 4.1.2 โดยเจือจางสารแขวนลอยยีสต์ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ แบบลำดับส่วนครั้งละ 10 เท่า (ten-fold dilution) จนได้ความเจือจาง 10^{-6} นำสารแขวนลอยที่ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ความเจือจางละ 100 ไมโครลิตรเกลี่ยลงในอาหาร YMA โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.1.4 นับจำนวนโคโลนีและทำการคำนวนให้เป็นหน่วย CFU/ml (การเตรียมเชื้อเริ่มต้นวิธีนี้จะได้จำนวนยีสต์ KT 1.12 และ FS 9 1.60×10^9 และ 2.34×10^9 CFU/ml ตามลำดับ)

4.2 การเตรียมและนับจำนวนแบคทีเรีย *V. harveyi* เริ่มต้น

4.2.1 นำ *V. harveyi* จาก stock ในอาหารวุ้นเอียง แล้วนำมา streak ลงบนอาหารแข็ง TSA, TCBS และในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการเรืองแสง, การให้โคโลนีสีเขียว ในอาหาร

TSA, TCBS และ 16 ชั่วโมงเพื่อเตรียมถ่ายเชื้อ

4.2.2 ปิเปต *V. harveyi* ที่เลี้ยงใน TSB จากข้อ 4.2.1 มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร TSB น้ำทะเล 3 มิลลิลิตร (อัตราส่วนร้อยละ 3.3) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.2.3 นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมจากข้อ 4.2.2 โดยเจือจางด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อแบบลำดับส่วนครั้งละ 10 เท่า (ten-fold dilution) มานับจำนวนทั้งหมดแบบลำดับส่วน 10 เท่า (ten-fold dilution) จนได้ความเจือจางเป็น 10^{-9} นำสารแขวนลอยที่ความเจือจาง 10^{-6} ถึง10^{-9} ความเจือจางละ 100 ไมโครลิตรเกลี่ยลงในอาหาร TSA โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.4 นับจำนวนโคโลนีและทำการคำนวนให้เป็นหน่วย CFU/ml (การเตรียมเชื้อเริ่มต้นวิธีนี้จะได้จำนวน *V. harveyi* 2.15×10^{9} CFU/ml)

4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ที่คัดเลือกได้

4.3.1 นำยีสต์ที่เตรียมตามข้อ 4.1.2 และ *V. harveyi* ที่เตรียมตามข้อ 4.2.2 มาทำการเจือจางด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อให้ได้จำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^{7} CFU/ml

4.3.2 เตรียมชุดการทดลอง 2 ชุด ซึ่งศึกษาการเลี้ยงร่วมกันของยีสต์และ *V. harveyi* ในสภาวะที่มีอากาศ และสภาวะไร้อากาศโดยแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมของ TSB และ YMB ที่มียีสต์ หรือ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวและหลอดที่มีการเติมจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน โดยปิเปตสารแขวนลอยเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมในข้อ 4.3.1 ชนิดละ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมของ TSB และ YMB ที่บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 x 150 mm ปริมาตร 9.8 มิลลิลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อทั้งสองชนิดเป็น 10^{-5} CFU/ml ในขณะเดียวกันเตรียมชุดควบคุมของยีสต์ และ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวในทำนองเดียวกันโดยใส่สารแขวนลอยยีสต์หรือ *V. harveyi* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในอาหารผสมของ TSB และ YMB ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร

4.3.3 สำหรับชุดการทดลองที่บ่มในสภาวะไร้อากาศ เติมพาราฟินเหลวปลอดเชื้อให้สูง 1.0-1.5 เซนติเมตร เหนือระดับอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.4 บ่มชุดการทดลองทั้งสองที่อุณหภูมิ 30°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนยีสต์ และ *V. harvey i* โดยการเกลี่ยบนอาหาร YMA และ TCBS ตามลำดับ

5 ศึกษาผลของการใช้ยีสต์ที่คัดเลือกจากข้อ 2 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055

(Baker's yeast) ต่อการเจริญ อัตราการรอด และภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

5.1 การเตรียมยีสต์เพื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง ทำโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหาร YM broth น้ำทะเล 100 มล. บนเครื่องเขย่า ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อด้วย Heamacytometer และวิธี plate count

5.2 นำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงตามวิธีการข้อ 5.1 แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ปั่นแยกส่วนใสทิ้งอีกครั้ง แขวนลอยยีสต์ในน้ำทะเลปลอดเชื้อ 1 มล. แล้วผสมรวมกับอาหารเม็ดซีพี 9003 พี 100 ก. คลุกเคล้าให้ทั่วถึง จะได้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ 10^8 CFU/กรัมอาหาร เคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันปลาทูน่าเพื่อให้ยีสต์เกาะบนอาหารเม็ดในอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งผสมยีสต์ทุก 3 วัน

5.3 เตรียมน้ำทะเลโดยใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt เจือจางให้ได้ความเค็ม 18 ppt ด้วยน้ำประปาที่พักไว้ในบ่อพักน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใส่น้ำทะเลที่เจือจางแล้วในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 45 x 45 x 60 เซนติเมตร ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนในตู้ทดลองที่มีระบบลม, ฮีทเตอร์ปรับอุณหภูมิ 30°ซ และตาข่ายไนลอนเพื่อให้กุ้งกุลาดำเกาะลอกคราบในระหว่างการเลี้ยง

5.4 การเตรียมกุ้งเพื่อทดลองโดยใช้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพสมบูรณ์คัดขนาดให้ใกล้เคียงกัน 0.7-0.8 กรัม มาจากฟาร์ม นำมาพักในบ่อซิเมนต์ที่มีน้ำทะเลเจือจางดังข้อ 5.3 เพื่อให้กุ้งปรับตัวเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

5.5 สุ่มกุ้งกุลาดำจากข้อ 5.4 ขึ้นมา 20 ตัว นำไปแช่น้ำเย็นประมาณ 10 วินาที หลังจากนั้นซับน้ำที่ตัวกุ้งกุลาดำให้แห้งโดยใช้ผ้าที่แห้งและสะอาด นำไปชั่งน้ำหนัก ซึ่งจะมีน้ำหนักเปียกเฉลี่ยประมาณ 10.5 กรัม/ตัว นำไปใส่ในตู้เลี้ยงกุ้งที่เตรียมไว้ตู้ละ 20 ตัว จนครบ 24 ตู้ พักกุ้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง แล้วจึงให้กุ้งกินอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมยีสต์เพื่อให้กุ้งปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในตู้การทดลองก่อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดลอง ในระหว่างการทดลองให้กุ้งกินอาหารวันละ 4 มื้อ ในอัตราประมาณ 4% ของน้ำหนักตัว โดยให้อาหารในช่วงเวลา 8.00น. 12.00น. 16.00น. และ 20.00น.

5.6 แบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุดๆละ 6 ตู้ โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองประกอบด้วยชุดที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมยีสต์ เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการเติมยีสต์ที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ และยีสต์ขนมปัง *S. cerevisiae* ในปริมาณ 10^8 CFU/g อาหาร ทำการทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยในระหว่างเลี้ยงต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ล้างทำความสะอาดตาข่าย และตู้เลี้ยง พร้อมทั้งดูดเศษอาหารที่เหลือและขี้กุ้งทิ้งทุกวัน

5.7 เก็บตัวอย่างกุ้งที่เวลาเริ่มต้น และหลังจากนั้นทุก 2 สัปดาห์เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์

ดังต่อไปนี้

5.7.1 ศึกษาการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของกุ้ง (Scholz *et al.*, 1999) โดยทำการนับและชั่งน้ำหนักรวมของกุ้ง เมื่อเริ่มต้นเลี้ยง และทุกๆ สัปดาห์ รวมถึงปริมาณอาหารที่กุ้งแต่ละตู้กินในทุกๆ 2 สัปดาห์ แล้วคำนวนน้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักเพิ่ม อัตราการรอด และอัตราแลกเนื้อของกุ้ง

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ย} = \frac{\text{น้ำหนักรวมทั้งหมดของกุ้งกุลาดำ}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมด}}$$

$$\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น} = \frac{(\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}) \times 100}{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้น}}$$

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด}}{(\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง})}$$

5.7.2 ตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งทุก 2 สัปดาห์ โดยนำตัวอย่างกุ้งกุลาดำมาฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ใช้มีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อผ่ากลางลำตัวกุ้ง เลาะเอาส่วนตับและทางเดินอาหารนำมาชั่งน้ำหนัก บดให้ละเอียด เจือจางตัวอย่างในอัตราส่วน 1 : 10 ด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อจนได้ความเจือจาง 10^{-1} – 10^{-9} นำแต่ละความเจือจางมา 100 ไมโครลิตรเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA, YM Agar ที่มี 0.01% chloramphenical และ 0.002% Streptomycin และ TCBS agar เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, ยีสต์ และ *Vibrio* spp. ตามลำดับ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่มีลักษณะของแบคทีเรีย , *Vibrio* spp. และยีสต์

5.7.3 วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมในเลือดของกุ้งทุกสองสัปดาห์ (Supamattaya *et al.*, 2000) โดยนำเลือดที่เจาะได้จากโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของกุ้งแต่ละตัวมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ด้วยสารละลาย 1%ไตรแพนบลู ที่เตรียมในสารละลายเกลือแกง 1.5 % แล้วนับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ คำนวณ

ปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นจำนวนเซลล์ / ลบ.มม.

5.8 หลังจากการให้อาหารกุ้งครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ นำกุ้งที่เหลือในทุกชุดการทดลองมาทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* (challenge test) โดยทำการแบ่งกุ้งในแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มซึ่งกลุ่มหนึ่งกุ้งจะถูกฉีดสารแขวนลอยของ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ 10^8 CFU/ml (เจือจางด้วย 1.5 % น้ำเกลือ) เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้ายโดยฉีดตัวละ 0.1 มล. ส่วนอีกกลุ่มเป็นกลุ่มควบคุมซึ่งถูกฉีดด้วย 1.5 % น้ำเกลือปลอดเชื้อ ปล่อยกุ้งกลับไปในถัง ถังละ 10 ตัว สังเกตอาการและบันทึกจำนวนกุ้งที่ตายทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 10 วัน คำนวนอัตราการรอดของกุ้ง

5.9 ศึกษาผลของการใช้ยีสต์ต่อความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกจากระบบไหลเวียน (Clearance test) โดยนำตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงครบกำหนด 6 สัปดาห์ ซึ่งเหลือจากการทดลองข้อ 5.7 ของชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดมาฉีดด้วยสารแขวนลอยของแบคทีเรีย *V. harveyi* จำนวน???? โดยมีกุ้งที่เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งถูกฉีดด้วยน้ำเกลือแทนสารแขวนลอยแบคทีเรียหลังจากการฉีด 3 ชม. ทำการดูดเลือดจากกุ้งตัวละประมาณ 0.2 มล. มาเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ แล้วนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio spp.* บนอาหาร PCA และ TCBS ตามลำดับ คำนวนจำนวนจุลินทรีย์โดยมีหน่วย CFU/ml ของเลือด