2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี ที่ใช้ในการทดลองและบริษัทผู้ผลิตได้แสดงในตารางที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน และสารเคมีเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี	**บริษัทผู้ผลิต**
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ	
Brain heart infusion agar (BHI agar)	Merck
Casien hydrolysis agar	Merck
Gelatin hydrolysis	Difco
Man rogosa and sharpe agar (MRS agar)	Merck
MRS broth	Merck
Nutrient agar (NA)	Difco
O-F basal medium	Difco
Phenol red broth base	Difco
Starch agar	Merck
Triple sugar iron agar (TSI)	Difco
Tryptic soy agar (TSA)	Merck
Thiosulfate citrate bile salt (TCBS)	Merck

2. สารเคมี

Ammonium citrate	Merck
Amygdalin	Fluka
Arabinose	Fluka
Calciumcarbonate	Merck
D – Melebiose	Fluka
D – Sorbitol	Fluka
D – Mannose	Fluka
D – Melezitose	Fluka
D – Trehalose	Fluka
D – Cellobiose	Fluka
D – Fructose	Fluka
Dextrin	Fluka
Galactose	Fluka
Lactose	Fluka
L – Arginine	Fluka
L – Raffinose	Fluka
L – Rhamnose	Fluka
Maltose	Fluka
Mannitol	Fluka
Ribose	Fluka
Sodium chloride	Merck
Sucrose	Fluka

อุปกรณ์

เครื่องมือทั่วไป

Centrifuge : Harrier 18 / 80.

Deep-freeze : Freeze Dryer IKEDA Scientific Co, Ltd., Tokyo, Japan.

Electronic balance : Satorius BF 210s SV Medico Co, Ltd., Germany.

Hot air oven : WTB Binder, BD/ED/FD with R3- Controller.

Incubator : Gallenkamp, U.K.

Larminar air flow cabinet : Science Tech Co., Ltd., Bangkok.

Micropipette : pipetman T5 A1038, France.

Microscope : Olympus Optical Co, Ltd., Tokyo, Japan.

pH meter : Denver instrument Model 215, USA.

Shaker incubator : Gallenkamp, U.K.

Spectrophotometer : Jenway.

Stirring hot plate : Fisher Scientific, R10T3496, USA.

Ultrasonic cleaner : Branson, 5200 Germany,

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ชื่อแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
แบคทีเรียแกรมบวก	
Bacillus cereus	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.[1]
Staphylococcus aureus ATCC25923	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
แบคทีเรียแกรมลบ	
Enterobacter aerogenes	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.

Enterobacter cloacae	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Edwardsiellar tarda	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Escherichia coli ATCC 25922	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Escherichia coli O157 : H7	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล[2]
Klebsiella pneumoniae	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Morganella morgarnii	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Proteus mirabilis	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Proteus rettgeri	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Salmonella typhimurium	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Serratia marcescens	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Shigella flexneri	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Shigella sonnei	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มอ.
Vibrio parahaemolyticus	รศ. ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล
Vibrio harveyi	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มอ.[3]
Vibrio alginolyticus	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มอ.
Vibrio salmonicida	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มอ.
Vibrio marinus	ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มอ.

[1] มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[3] ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

***ที่อยู่บริษัทผู้ผลิตต่าง ๆ ที่อ้างถึง**

Difco : Difco Laboratories, Detriot, Michigan, U.S.A.

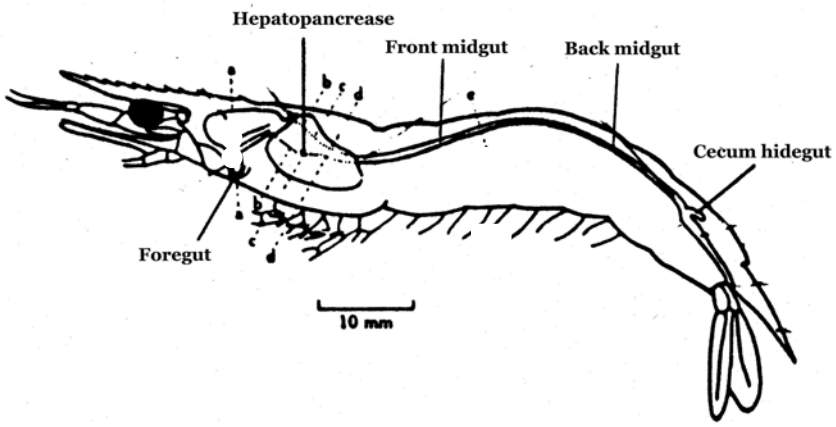
Fluka : Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland.

Merck : E. Merck, Darmstadt, Postfach, Germany.

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่โตเต็มวัยจากบ่อเดียวกัน โดยเก็บตัวอย่างกุ้งปกติ 20 ตัว และเก็บตัวอย่างกุ้งเป็นโรค 5 ตัว จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นำกุ้งกุลาดำที่ได้มาชั่งน้ำหนักและฆ่าเชื้อที่ผิวนอกโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วล้างด้วยน้ำเกลือ 1.5% โซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อหลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อผ่ากลางลำตัวกุ้งกุลาดำแล้วเลาะเอาส่วนตับและทางเดินอาหารออกมาโดยแบ่งเป็น 5 ส่วน คือส่วนที่ 1 ปากถึงกระเพาะ (Foregut) ส่วนที่ 2 ตับ (hepatopancrease) ส่วนที่ 3 ลำไส้ส่วนต้น (Front midgut) ส่วนที่ 4 ลำไส้ส่วนปลาย (Back midgut) และส่วนที่ 5 ซีกัม (Cecum hidegut) ดังแสดงในรูปที่ 2 นำตัวอย่างแต่ละส่วนมาชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยาที่ปราศจากเชื้อ



รูปที่ 2 แสดงระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

2. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก

เจือจางตัวอย่างในข้อที่ 1 ในอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำเกลือ 1.5% ที่ปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} และ10^{-2} หลังจากนั้นนำตัวอย่าง

มา 500 µl pour plate ด้วย MRS agar ที่เติม 1% แคลเซียมคาร์บอเนต และ 1.5% โซเดียมคลอไรด์ ทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 7 วัน นับโคโลนีทั้งหมดที่มีลักษณะของแบคทีเรียแลกติก สุ่มเลือก โคโลนีของแบคทีเรียแลกติกจากอาหาร MRS มาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อใน 20% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -70°C

3. การจัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสรีรวิทยาและชีวเคมี

การติดสีแกรม

นำโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกมาย้อมสีแบบแกรม (Gram straining)

การทดสอบการสร้างเอนไซน์คะตาเลส

หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและแห้ง เขี่ยเชื้อทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS อายุ 24 ชั่วโมง มา 2 loopful แตะลงในหยดของ H_2O_2 ถ้าเกิดฟองแก๊สขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase แสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

หยด 1% tetramethyl paraphenylene diamine hydrochloride ลงบนกระดาษกรองให้ซึมพอหมาด ๆ ใช้แท่งแก้วแตะเชื้อทีเลี้ยงบนอาหาร MRS อายุ 24 ชั่วโมง ลากบนกระดาษกรองดังกล่าวถ้ามีสีม่วงเข้มเกิดขึ้นตามรอยลากแสดงผลการทดสอบเป็นบวกคือเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ oxidase

การทดสอบไนเตรทรีดักชั่น

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เลี้ยงในอาหาร MRS อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงหยด sulfanilic acid

และ α - napthylamine ลงใน nitrate broth ที่มีเชื้อเจริญ ถ้าเกิดตะกอนสีแดงแสดงผลการทดสอบเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงเติมผงสังกะสีลงไปถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบถ้าไม่เกิดสีแดงแสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก

การทดสอบการย่อยเจลาติน

โดยเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS ลงในอาหาร nutrient gelatin บ่มเชื้อที่ 20-22°C เป็นเวลา 30 วัน ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อย gelatin ได้ จะทำให้อาหารไม่แข็งที่อุณหภูมิ 20°C

การทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskauer (MR – VP)

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบจากอาหาร MRS อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว MR – VP medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ทดสอบ methyl red โดยการหยด methyl red solution ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าผลการทดลอง methyl red เป็นบวก ส่วนหลอดที่ทดสอบ Voges-Proskauer ทดสอบโดยการหยด 10% α - napthol ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติม KOH 20% ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลการทดลอง Voges-Proskauer เป็นบวก

การทดสอบออกซิเดทีฟ – เฟอร์เมนท์เททีฟ

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS stab ลงในอาหาร Hugh and Leifson's O-F medium 2 หลอด หลอดที่หนึ่งทำให้อยู่ในสภาวะที่ขาดอากาศโดยเททับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเติมพาราฟินเหลว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูว่าเกิดกรดในหลอดอาหารในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศหรือทั้งสองสภาพ ทั้งที่มีพาราฟินและไม่มีพาราฟินถ้าเกิดทั้งสองหลอดแสดงว่าเป็น fermentation แต่ถ้าเกิดเฉพาะในหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น oxidation การเกิดกรดแสดงให้ทราบโดยอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

การทดสอบไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS นำมา stab ลงในอาหารแข็ง TSI บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วัน โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเกิดสีดำตามรอย stab แสดงผลการทดลองเป็นบวก

การทดสอบการย่อยอาร์จีนิน

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS นำมา Stab ลงในอาหาร Arginine hydrolysis เททับด้วยพาราฟินที่ปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลทุกวันถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยอาร์จีนีนได้จะทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีบานเย็น

การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทียบกับหลอดควบคุม ถ้าเชื้อเจริญให้ผลเป็นบวกถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบการเจริญใน NaCl 0, 10, 15, 20 และ 25 %

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว MRS ที่เติม NaCl 0, 10, 15, 20 และ 25% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทียบกับหลอดควบคุม ถ้าเชื้อเจริญให้ผลเป็นบวกถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล (phenol red broth base) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบได้แก่ Amygdalin, Arabinose, DL-Arabinose, Arbutin, (D)+Cellobiose, Dextrose, D-Galactose, D(+)Galactose, Inosital, Inulin, Lactose, D-Maltose, Maltose, D-Mannitol, Mannitol, D-Mannose, Melibiose, D(+)Melibiose monohydrate, Melezitose, D(+)Melezitose Monohydrate, Raffinose, D(+)Raffinose pentahydrate, L(+) Raffinose monohydrate, Rhamnose, Salicin, Sorbitol, D-Sorbitol, Sucrose, D(+)Trehalose dihydrate, L-Tyrosine, D-Xylose และ D(+)Xylose บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรดโดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวกถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

4. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก

การทนต่อ pH ต่ำ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH เป็น 1 – 5 บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลเป็นบวกถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

ความสามารถในการย่อยโปรตีน

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS ลงบน Skim milk agar บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญโดยเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนได้จะเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ

ความสามารถในการย่อยแป้ง

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS ลงบน Starch agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญโดยหยด Lugol's iodine

ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่เชื้อเจริญแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้

ความสามารถในการย่อยไขมัน

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 1% tributyrine สำหรับทดสอบการย่อย tributyrine บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อย tributyrine ได้

ความสามารถในการเจริญในที่ไม่มีออกซิเจน

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง จากอาหาร MRS ลงในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มใน Anaerobic jar เป็นเวลาบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญในอาหาร MRS ถ้าเชื้อเจริญได้แสดงว่าสามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน

5. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot (Spelhaug and Harlander, 1989)

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็งโดยวิธี agar spot เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5% โดยบ่มไว้ที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% โดยบ่มไว้ที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับให้ได้ 10^8 CFU/ml หยดลงบนอาหารแข็ง MRS เชื้อละ 5 ไมโครลิตร แต่ละเชื้อห่างกัน 3 เซนติเมตร จานละ 4 เชื้อ นำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นราดทับด้วย BHI soft agar (0.7% วุ้น) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อยู่ 10^6 CFU/ml ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยถ่าย

เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลงในอาหารเหลว TSA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ 10^6 CFU/ml โดยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Edwardsiellar tarda, Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATCC25922, *E. coli* O157 : H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus rettgeri*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis, Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *Serratia marcescen*, *Shigella sonei*, *S. flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V.logei*, *V. salmonicida*, *V. marinus* และ *V. mediterranei* บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงวัด clear zone รอบโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยวัดตั้งแต่ขอบของโคโลนีไปจนถึงขอบของวงใสถ้ามี clear zone มากกว่า 5 มิลลิเมตร ถือว่าให้ผลบวก (Spelhaug and Harlander, 1989) การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจะเปรียบเทียบความกว้างของ clear zone และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิด

6. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion (Spelhaug and Harlander, 1989)

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยวิธี well diffusion (Spelhaug and Harlander, 1989) โดยใช้ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ สำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นเหมือนกับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4°C 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาส่วนใส 100 µl ไปหยดลงในหลุมบนอาหารแข็ง NA (1% agar) ที่เจาะด้วยทิปที่ปราศจากเชื้อ จานละ 4 หลุมแต่ละหลุมห่างกัน 3 เซนติเมตร โดยแต่ละหลุมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร ที่เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 10^6 CFU/ml ด้วย cotton swab ไว้ก่อนแล้วโดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์หมือนกับการเตรียมในการทดสอบความ

สามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot นำจานอาหารไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงวัด clear zone ของเชื้อด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์โดยวัดตั้งแต่ขอบของหลุมไปจนถึงขอบของวงใส

6. การเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติก

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot นำเชื้อเริ่มต้นมาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ทำให้เจือจางจนได้ค่า optical density (O.D.) 0.5 (Meynell and Meynell, 1970) เพื่อใช้เป็น inoculum แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% นำไปบ่มใน shaker incubator 150 rpm ที่อุณหภูมิ 35°C ที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง นำมาวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer (บริษัท Jenway) ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร พร้อมกับทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion โดยใช้ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำค่าที่ได้ไป plot graph การเจริญเพื่อหา generation time และดูความสัมพันธ์ของการยับยั้งแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์

7. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

7.1 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ในอาหารเหลว MRS ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 1.5 % ที่ปรับ pH เป็น 5.0 5.5 และ 6.0 นำไปใส่ใน shaker incubator 150 rpm ที่อุณหภูมิ 35°C ศึกษาการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง เนื่องจากผลของการศึกษาการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกพบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมงเป็นเวลาที่แบคทีเรียแลกติกให้ผลการเจริญและการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูง จึงเก็บตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง มาวัดการเจริญโดยวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์เพื่อนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion โดยใช้ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำค่าที่ได้ไป plot graph เพื่อเปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

7.2 ผลของอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ที่ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.1 นำไปใส่ใน shaker incubator ที่ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C เก็บตัวอย่างที่เวลา 36 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์เพื่อนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion โดยใช้ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำค่าที่ได้ไป plot graph เพื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง

8. การศึกษาสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก

8.1 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก ในสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลกลูโคสและอากาศ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 2% และเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากศึกษาผลของ pH เริ่มต้นและผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในขั้นต้น หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4°C 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทำ well diffusion ยับยั้ง *V. harveyi*

8.2 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกในสภาวะที่จำกัดน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่จำกัดอากาศ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคส 2% และเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 35° C ในตู้บ่ม เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4°C 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทำ well diffusion ยับยั้ง *V. harveyi*

8.3 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกในสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลแต่จำกัดอากาศ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคส 2 % และเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ใน anaerobic jar เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4°C 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทำ well diffusion ยับยั้ง *V. harveyi*

8.4 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกในสภาวะที่จำกัดน้ำตาลกลูโคสและจำกัดอากาศ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคส 2% และเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 35° C ใน anaerobic jar เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 4°C 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทำ well diffusion ยับยั้ง *V. harveyi*

9. การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลกติกเพื่อเป็นโปรไบโอติก

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C pH 6.0 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากศึกษาผลของ pH เริ่มต้นและผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในขั้นต้น แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 100มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปใส่ใน shaker incubater ที่ 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปรับให้ได้ 10^8 CFU/ml นำไปผสมรวมกับอาหารเม็ด (ซีพี 9003 พี บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน))ที่ใช้ในการทดลองให้ทั่วถึงในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร / อาหาร 25 กรัม (ศิริรัตน์, 2540) หลังจากนั้นเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา (ยี่ห้อ Squalene) เพื่อให้แบคทีเรียแลกติกเกาะบนอาหารเม็ดในอัตราส่วน 10 กรัม / อาหาร 1 กิโลกรัม เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C

การเตรียมน้ำทะเลสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

เตรียมน้ำทะเลโดยใช้น้ำทะเลที่มีความเข้มข้น 30 ppt มาเจือจางให้ได้ 15 ppt ด้วยน้ำประปาที่พักไว้ในบ่อพักน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใส่น้ำทะเลที่เจือจางแล้วในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีขนาด 45 x 45 x 60 เซนติเมตร ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของตู้ ซึ่งก่อนใช้ตู้ต้องมีการฆ่าเชื้อภายในตู้โดยการแช่คลอรีนที่มีความเข้มข้นประมาณ 30

ppm ตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำระหว่างการทดลองการทดลอง ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด–ด่าง และอุณหภูมิ ใส่หัวทรายเพื่อให้อากาศในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกตู้ตู้ละ 1 หัว เพื่อเพิ่มอากาศตลอดเวลา และใส่ตาข่ายไนลอนลงในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อให้กุ้งกุลาดำเกาะในระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การเตรียมกุ้งกุลาดำ

กุ้งที่ใช้ในการทดลองเป็นลูกกุ้งกุลาดำอายุประมาณ 30 วันซึ่งก่อนเริ่มต้นการเลี้ยงต้องคัดกุ้งกุลาดำที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันโดยสุ่มกุ้งกุลาดำขึ้นมา 10 ตัว โดยคัดเลือกกุ้งกุลาดำที่มีขนาดใกล้เคียงกัน นำไปแช่ในน้ำเย็นประมาณ 10 วินาที หลังจากนั้นซับน้ำที่ตัวกุ้งกุลาดำให้แห้งโดยใช้ผ้าที่สะอาด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ซึ่งจะมีน้ำหนักเปียกเฉลี่ยประมาณ 3.5 กรัม/ตัว นำไปใส่ในตู้เลี้ยงกุ้งที่เตรียมไว้เมื่อใส่กุ้งในตู้ทดลองที่เตรียมไว้ตู้ละ 10 ตัว จนครบทุกตู้ พักกุ้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วจึงให้กุ้งกินอาหารกุ้งกินอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมแบคทีเรียแลกติกเพื่อให้กุ้งปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในตู้ทดลองก่อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดลอง ในระหว่างการทดลองให้กุ้งกินอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลกติกวันละ 4 มื้อ ในช่วงเวลา 8.00 น. 12.00 น. 16.00 น. และ 20.00 น. ในอัตราประมาณ 6 – 7% ของน้ำหนักตัวกุ้งทั้งหมดในตู้ ประมาณ 2 - 2.5 กรัม/ตู้ เป็นระยะเวลา 30 วัน และต้องมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ นำตาข่ายไปล้าง ดูดเศษอาหารที่เหลือและขี้กุ้งทิ้งทุกวัน

การวางแผนการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุด (ทุกชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง)

ชุดที่ 1 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมแบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดที่ 2 กลุ่มควบคุมได้รับอาหารเม็ดธรรมดาที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดและจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

การติดตามแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำเมื่อครบระยะเวลา 30 วันโดยการนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดและจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกและที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก โดยการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองมาผ่าตัดเอาส่วนทางเดินอาหารมาชั่งน้ำหนักและนำไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยาที่ปราศจากเชื้อแล้วจึงเจือจางตัวอย่างในอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำเกลือ 1.5% ที่ปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้มา pour plate ในอาหารแข็ง MRS ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ และ 1.5% แคลเซียมคาร์บอเนต สำหรับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด และการตรวจนับจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดทำได้โดยการนำตัวอย่างที่ได้มา spread plate บนอาหาร TCBS ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์

การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลการตายของลูกกุ้งเมื่อพบซากในตู้แต่ละตู้นับจำนวนลูกกุ้งที่เหลือในแต่ละตู้เพื่อคำนวณอัตราการรอดแล้วชั่งน้ำหนักลูกกุ้งที่เหลือนำไปหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเปียก เพื่อคำนวณหาน้ำหนักลูกกุ้งที่เพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อเริ่มการทดลองนำค่าน้ำหนักที่ได้ไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง โดยดัดแปลงจากสูตรของ Lobban (1985) (อ้างโดย สินธิ และ ลิลา, 2541) และคำนวณอัตราการรอดตาย

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

เมื่อ G = อัตราการเจริญเติบโตต่อวันคิดเป็นเปอร์เซนต์

Wt = น้ำหนักสุดท้าย

Wo = น้ำหนักเริ่มต้น

t = ระยะเวลาที่ทดลอง (วัน)

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = 100 \times \frac{\text{จำนวนกุ้งที่ตายในระหว่างการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้น}}$$

การทดสอบกับเชื้อก่อโรค (Pathogen challenge test)

หลังจากที่เลี้ยงกุ้งครบ 30 วัน นำกุ้งทุกชุดการทดลองที่เหลือจากการทดสอบในขั้นต้นมาทดสอบการทนต่อการเกิดโรคเรืองแสงโดย *V. harveyi* โดยนำกุ้งกุลาดำที่เหลือมาฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร โดยฉีดที่ปล้องสุดท้ายของกุ้งกุลาดำระวังอย่าให้โดนเส้นประสาทของกุ้งกุลาดำเพื่อศึกษาติดตามการรอดตายหลังจากที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* โดยติดตามผลการตายเป็นระยะเวลา 7 วัน บันทึกผลเป็นร้อยละหากมีการตายเกิดขึ้น

ทำการเปรียบเทียบผลของแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์ต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่ให้ผลการเป็นโปรไบโอติกที่เหมาะต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมากที่สุดและดีที่สุด

สถิติที่ใช้วิเคราะห์

ในการทดลองครั้งนี้ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติคือ โปรแกรม SPSS ซึ่งพัฒนาโดย บริษัท SPSS INC. ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับผลทางสถิติ (กลุ่มงานบริการศูนย์คอมพิวเตอร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2544) จากการศึกษาในครั้งนี้วิธี one way ANOVA และ two way ANOVA ขึ้นอยู่กับชุดข้อมูลแต่ละชุด