บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ซื้อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60 (สำหรับการทดลองที่ 1 และ 2) และกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30 (สำหรับการทดลองที่ 3) จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของคุณสงกรานต์ ตำบลจุกเฌอ อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา (ภาพที่ 1 ก) และจากฟาร์มเพาะเลี้ยง ไบโอ-เทคฟาร์ม ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ตามลำดับ จากนั้นบรรจุกุ้งขาวแวนนาไมลงในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทีลีน ที่เติมน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และเติมอากาศ ปิดปากถุงให้สนิท และขนส่งมายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำกุ้งขาวแวนนาไมปล่อยลงในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 10 ตัน (สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60) และถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร (สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30) และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 38 %, ไขมัน 5 %, กาก 3 %, และความชื้น 11 %; ซีพี 9001, เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด, สมุทรสาคร, ประเทศไทย) โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อ และเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 10 % ทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 1 ข) เพื่อปรับสภาพกุ้งขาวแวนนาไมก่อนนำไปใช้ในทำการทดลองต่อไป

(ก) (ข)

ภาพที่ 6 (ก) บ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในจังหวัดฉะเชิงเทรา (ข) บ่อปูนซีเมนต์ขนาด 10 ตัน เพื่อใช้ปรับสภาพกุ้ง (ภาพโดยวีรสิทธิ์ ขาวผ่อง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบชีวเคมี

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 Phosphate buffer solution

2.1.2 Plate Count Agar (PCA; Difco, Spark, USA)

2.1.3 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Spark, USA)

2.1.4 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, Spark, USA)

2.1.5 *Vibrio harveyi* Agar (VHA)

2.1.5 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Broth

2.1.6 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Agar ที่เติม Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.1.7 0.1% (w/v) peptone water (Bacto, Spark, USA)

2.1.8.85% และ 2% (w/v) Normal saline (Ajax, Auckland, New Zealand)

2.1.9 20% (w/v) Skim milk solution (Difco, Spark, USA)

2.2 ชุดทดสอบชีวเคมี

2.2.1 Acid from sugar (arabinose, mannitol, xylose, sucrose และ mannose)

2.2.2 Carbohydrate metabolism (O/F glucose medium และ O/F manitol medium)

2.2.3 Citrate (Lab-Scan, Bangkok, Thailand)

2.2.4 Gas from D-glucose

2.2.5 Lysine Indole Motility (LIM) medium (Himedia, Mumbai, India)

2.2.6 Methyl Red - Vogas-Prokauer (Himedia, Mumbai, India)

2.2.7 Motility medium

2.2.8 Nitrate broth

2.2.9 Ornithine decarboxylase medium

2.2.10 TSB ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 %, 3 %, 6 %, 7 %, 8 % และ 10 % (w/v)

2.2.11 Vibriostatic compound (O/129) susceptibility (Oxoid, Basingstoke, England)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol (Sigma, Germany)

3.1.2 Hydrochloric acid (J.T. Baker, USA)

3.1.3 Sodium chloride (Ajax, Auckland, New Zealand)

3.1.4 Sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany)

3.2 สารเคมีสำหรับย้อมแกรม

3.3.1 Crystal violet solution

3.3.2 Gram's iodine solution

3.3.3 Gram's alcohol

3.3.4 Safranin O solution

3.3 สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.3.1 Catalase reagent (Siribuncha, Nonthaburi, Thailand)

3.3.2 0.3 % (w/v) Creatine solution (Himedia, Mumbai, India)

3.3.3 Kovac's reagent

3.3.4 Methyl red reagent

3.3.5 5 % (w/v) α-naphthol solution

3.3.6 Oxidase reagent (Bactidrop, Lenexa, USA)

3.3.7 40% (w/v) Potassium hydroxide (Merk, Darmstadt, Germany)

3.3.8 Nitrate reagent

3.3.9 ผงสังกะสี

3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.4.1 Potassium nitrate (Riedel-de, Germany)

3.4.2 Brucine sulfate (Fluka, USA)

3.4.3 Sulfanilic acid (Fluka, USA)

3.4.4 Hydrochloric acid (J.T. Baker, USA)

3.4.5 Sulfuric acid (J.T. Baker, USA)

3.4.6 Sodium chloride (Carolo Erba Reagents, Italy)

3.4.7 Sodium nitrite (BDH, United Kingdom)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4.8 Sulfanilamide (Fluka, USA)

3.4.9 N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine dihydrochroride (Merck, Germany)

3.4.10 Ammonium chloride (Fisher Scientific, United Kingdom)

3.4.11 Sodium hypochlorite (Carolo Erba Reagents, Italy)

3.4.12 Sodium citrate (Merck, Germany)

3.4.13 Sodium hydroxide (Merck, Germany)

3.4.14 Sodium nitroprusside (Merck, Germany)

3.4.15 Phenol (Fisher Scientific, United Kingdom)

3.4.16 95% ethanol (Bangkok, Thailand)

3.4.17 Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)

3.4.18 Ammonium paramolybdate (BDH, United Kingdom)

3.4.19 Antimony potassium tartate (Riedel-de, Germany)

3.4.20 L – Ascorbic acid (Merck, Germany)

4. อุปกรณ์

4.1 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

4.2 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

4.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

4.4 คิวเวต (Cuvette)

4.5 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

4.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.7 แท่งแก้วกระจายเชื้อ (Spreader)

4.8 แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Bar)

4.9 บีกเกอร์ (Beaker)

4.10 บ่อเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 0.8 × 1.2 × 0.6 เมตร

4.11 บ่อเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร

4.12 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)

4.13 สายยางและหัวทราย

4.14 หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.15 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

4.16 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 13 × 100 และ 16 × 150 มิลลิเมตร

5. เครื่องมือ

5.1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope; Olympus รุ่น CH30RF200, Japan)

5.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker; Innova, 4340, USA)

5.3 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (A&D รุ่น HR-200, Greifensee, Japan)

5.4 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AT200, Switzerland)

5.5 เครื่องแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer; Heto รุ่น lyoLab 3000, Allerod, Denmark)

5.6 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer; Vortex-2 Genie, Bohemia, NY, USA)

5.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge; Eppendoff รุ่น Cectrifuge 5804R, Germany)

5.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge; Sigma รุ่น 3K18, Osterode am Harz, Germany)

5.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Cintra 400 Double beam, Melbourne, Australia)

5.10 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate; Heidolph รุ่น 3001, Germany)

5.11 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator; Memmert รุ่น BE 400, Schwabach, Germany)

5.12 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; WTB Binder, Germany)

5.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow; Super clean VC 150, Bangkok, Thailand)

5.14 ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump; Gast รุ่น 0211-V45F-G230CX, Michigan, USA)

5.15 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; Wisd Laboratory Instrument, Seoul, Korea)

5.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Memmert, รุ่น GmbH + Co KG 8540, Schwabach, Germany)

5.17 ออโตปิเปต (Autopipette; Gilson รุ่น PIPETMAN, Villiers-le-Bel, France)

6. จุลินทรีย์

6.1 แบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005

6.2 ยีสต์โพรไบโอติกสายพันธุ์ BUU 01 และ BUU 02 จาก รศ.ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

6.3 *V. harveyi* สายพันธุ์ 001, 002, 003 และ 004

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังต่อไปนี้ โดยการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60 ในบ่อดินจำลอง และให้อาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมที่อยู่ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน (*Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ *Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ และยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงโดยให้อาหารที่ไม่เติมโพรไบโอติก จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารส่วน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และคุณภาพน้ำทางเคมี (แอมโมเนีย ไนไทรต์ ไนเทรต และฟอสเฟต) ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวน-นาไมจำลองเป็นระยะเวลา 120 วัน การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60 ในบ่อขนาด 100 ลิตรด้วยอาหารที่เติมโพรไบโอติกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถในความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นเวลา 28 วัน ด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรค จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารส่วน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 และคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลอง การทดลองที่ 3 ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30 ในบ่อขนาด 100 ลิตรด้วยอาหารที่เติมโพรไบโอติก

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นทดสอบความสามารถในความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นระยะเวลา 10 วัน ด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยการเติม*V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารส่วน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยมีรายละเอียดในแต่ละการทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่เติมลงในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ใน Hepatopnacreas ลำไส้ ของกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลอง

1.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011) และ Nimrat et al. (2011)

1.1.1 นำแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 นำสารเซลล์แขวนลอยจากแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใส่ทิ้ง

1.1.3 เติมสารละลาย 0.1% Peptone water ให้ปริมาตรเท่าเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ทำจนครบ 3 รอบ เพื่อเป็นการล้างเซลล์

1.1.4 ทำการแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 A.U. ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกเท่ากับ 10^{10} CFU/ml

1.1.5 เติมสารละลาย Skim milk ความเข้มข้น 20 % (w/v) ลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ในปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเซลล์แขวนลอย เพื่อให้มีความเข้มสุดท้ายเท่ากับ 10 % (w/v) จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในเครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

1.1.6 นำผงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

1.2 การเตรียมเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกผสมในแบบรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

1.2.1 นำยีสต์โพรไบโอติกจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ BUU 01 และ BUU 02 เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast peptone dextrose broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.2 นำสารแขวนลอยจากยีสต์โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง

1.2.3 เติมสารละลาย 0.1 % Peptone water ให้ปริมาตรเท่าเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ทำจนครบ 3 รอบ เพื่อเป็นการล้างเซลล์

1.2.4 ทำการแขวนลอยเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟ-มิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 A.U. ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกเท่ากับ 10^{10} CFU/g

1.2.5 เติมสารละลาย Skim milk ความเข้มข้น 20 % (w/v) ลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ ในปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเซลล์แขวนลอย เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% (w/v) จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในเครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

1.2.6 นำผงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกที่ได้ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

1.3. การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

1.3.1 นำอาหารเลี้ยงกุ้งทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* จำนวน 5 สายพันธุ์ (T1)

ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกจำนวน 2 สายพันธุ์ (T2)

ส่วนที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ (T3)

ส่วนที่ 4 ชุดควบคุมไม่เติมโพรไบโอติก (C)

1.3.2 นำอาหารเลี้ยงกุ้งที่เตรียมได้จากข้อ 1.3.1 มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์โพรไบโอติกทำการตรวจนับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.4 การเตรียมบ่อดินจำลองสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสม และยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ในกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011)

1.4.1 เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 0.8 × 1.2 × 0.6 เมตร ที่มีระบบเติมอากาศและระบบหมุนเวียนน้ำ (Re-circulating system) จำนวน 12 บ่อ แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองซึ่งแต่ละชุดการทดลองมี 3 บ่อและแต่ละชุดการทดลองมีระบบหมุนเวียนน้ำซึ่งกันและกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยให้อาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ชุดการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยให้อาหารที่เติมแบคทีเรียผสมกับยีสต์โพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ชุดการทดลองที่ 3 เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยให้อาหารที่เติมยีสต์โพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ชุดการทดลองที่ 4 เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยให้อาหารที่ไม่เติมโพรไบโอติก (ควบคุม)

1.4.2 เติมดินจากบ่อเพาะเลี้ยงลงในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองสูงจากพื้นบ่อ 7 เซนติเมตร

1.4.3 เติมน้ำทะเลที่มีค่าความเค็มเท่ากับ 5 ส่วนในพันส่วนที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองและทำการทดสอบระบบหมุนเวียนน้ำของแต่ละชุดการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.4.4 ปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60 ลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาแวนนาไมจำลองทั้ง 12 บ่อ ๆ ละ 30 ตัว และกำหนดการให้อาหารเป็น 3 เวลา คือ เวลา 7.00 15.00 และ 23.00 น. ตามลำดับ โดยการทำการให้อาหารหนึ่งยอต่อหนึ่งบ่อเท่านั้น

1.4.5 ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 120 วัน โดยตลอดระยะเวลา 120 วัน จะทำการตรวจการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และคุณภาพน้ำทางเคมี

1.5 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมแบบต่าง ๆ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) *Bacillus* และยีสต์ ใน Hepatopancreas และลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

1.5.1 สุ่มจับกุ้งขาวแวนนาไมจากแต่ละบ่อการทดลอง ๆ ละ 3 ตัว และเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้เลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในแต่ละบ่อทดลองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในช่วงเวลาก่อนการทดลองและทุก ๆ 30 วัน ของการทดลองเป็นระยะเวลา 120 วัน

1.5.2 แช่กุ้งขาวแวนนาไมในสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

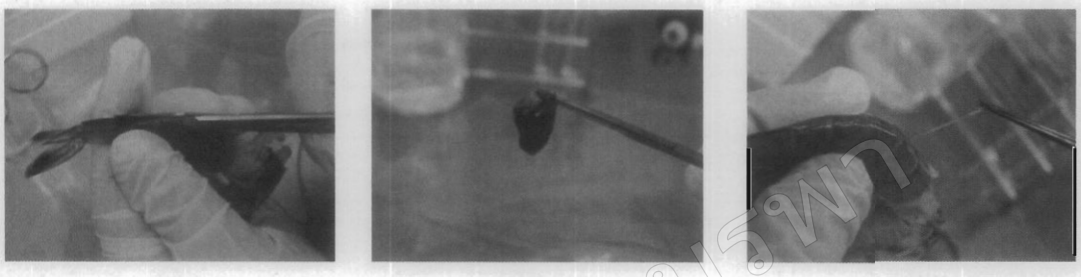
1.5.3 ผ่าทางเดินอาหารส่วน Hepatopancreas และลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (ภาพที่ 7) จากนั้นนำแต่ละส่วนของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเดียวกันปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันในสารละลาย 0.85% Normal saline

1.5.4 เจือจางทางเดินทางอาหารส่วน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในสารละลาย 0.85% Normal saline ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

1.5.5 ปิเปตสารละลายตัวอย่างทางเดินอาหารของกุ้งและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (เพื่อนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและ *Bacillus* และลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar (เพื่อนับปริมาณยีสต์) จากนั้นเกลี่ยเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ

1.5.6 นับปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในหน่วย CFU (Colony forming unit) ดังสมการ

จำนวนแบคทีเรีย (CFU/g or ml) = จำนวนโคโลนี × ส่วนกลับของระดับความเจือจาง × 10



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 7 (ก) วิธีการผ่ากุ้งขาวแวนนาไม (ข) Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไม (ค) ลำไส้กุ้งของกุ้งขาวแวนนาไม (ภาพโดยวีรสิทธิ์ ขาผ่อง)

1.6 การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในแบบรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011)

สุ่มตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองเพื่อทำการวัดการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นรายวัน โดยทำการวัดการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมก่อนและหลังการทดลอง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลอง} = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{จำนวนเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ยสิ้นสุดการทดลอง} = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$$

น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain; %) =

$$\frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; % ต่อวัน) =

$$\frac{\ln \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{ระยะเวลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{ระยะเวลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นรายวัน (ADG; กรัมต่อวัน) =

$$\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{จำนวนวัน}}$$

อัตราแลกเนื้อ (FCR) = $\frac{\text{จำนวนน้ำหนักอาหารที่กุ้งกิน}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$

1.8 การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสม ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของน้ำใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2012)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนเทรต ไนไทรต์ และฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการสุ่มตัวอย่างน้ำในบ่อที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ ณ เวลา 05.00 น. และ 14.00 น. ทุก ๆ 15 วันของการทดลองตลอดระยะเวลาการทดลอง

1.8.1 การวัดปริมาณแอมโมเนีย ตามวิธีการของ American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980)

1.8.2 การวัดปริมาณไนเทรต ตามวิธีการของ Association of Official American Chemists [AOAC] (2002)

1.8.3 การวัดปริมาณไนไทรต์ ตามวิธีการจากคู่มือวิเคราะห์น้ำของ Stickland and Parson (1972)

1.8.4 การวัดปริมาณฟอสเฟต ตามวิธีการของ American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยทำการวิเคราะห์ ณ เวลา 05.00 น. และ 14:00 น. ทุก ๆ 15 วันของการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่เติมลงในอาหารต่อการต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมขนาดโพสต์-ลาวา 60 ที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

2.1 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำใช้ในการเหนี่ยวนำให้กุ้งขาวแวนนาไมเกิดโรคเรืองแสง (Challenge test)

นำ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% มาศึกษาสัณฐานวิทยาและนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994; Krieg & Holt, 1984;)

2.2 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคของ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดัดแปลงจากวิธีการของ Robertson et al. (1998)

2.2.1 เตรียมตู้กระจกขนาด 0.2 × 0.4 × 0.25 เมตร จำนวน 30 ตู้ แบ่งออกเป็น 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ได้แก่

ชุดที่ 1 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 001
ชุดที่ 2 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002
ชุดที่ 3 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 003
ชุดที่ 4 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 004
ชุดที่ 5 (ชุดควบคุม) เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 พีพีที และไม่เติม *V. harveyi*
ชุดที่ 6 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 001
ชุดที่ 7 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002
ชุดที่ 8 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 003
ชุดที่ 9 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 พีพีที และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 004
ชุดที่ 10 (ชุดควบคุม) เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 พีพีที และไม่เติม *V. harveyi*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.2 ปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะ โพสต์ลาวา 15 ลงในบ่อ ๆ ละ 50 ตัว

2.2.3 เตรียมหัวเชื้อ *V. harveyi* ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.4 นำเซลล์ของ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 2 % (w/v) Saline water 3 ครั้ง

2.2.5 นำสารแขวนลอยเซลล์ของ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 AU (10^{10} CFU/ml) จากนั้นเติมลงในบ่อทดลองและปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^{7} CFU/ml จากนั้นนำหัวเชื้อ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์และตัวอย่างน้ำในแต่ละบ่อหลังเติม *V. haveyi* แต่ละสายพันธุ์มาตรวจหาปริมาณ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ *Vibrio harveyi* agar (Harris, Owens, & Smith, 1996)

2.2.6 บันทึกอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละวันและนำ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการก่อโรคเรืองแสงในกุ้งขาวแวนนาไมไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมต่อไป

2.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) สำหรับใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011) และ Nimrat et al. (2011)

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกจำนวน 5 สายพันธุ์ได้แก่ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 และยีสต์โพรไบโอติก BUU 01 และ BUU 02 ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งดังอธิบายมาแล้วในการทดลองที่ 1 จากนั้นนำผงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและผงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกที่ได้มาตรวจนับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน เพื่อใช้ในการศึกษาความต้านทานการก่อโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011); Nimrat et al. (2011)

2.4.1 นำอาหารเลี้ยงกุ้งทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* จำนวน 5 สายพันธุ์ (T1)

ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกจำนวน 2 สายพันธุ์ (T2)

ส่วนที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ (T3)

ส่วนที่ 4 ชุดควบคุมไม่เติมโพรไบโอติก (C)

2.4.2 นำอาหารเลี้ยงกุ้งที่เตรียมได้จากข้อ 2.4.1 ทั้งหมดมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์โพรไบโอติกทำการตรวจนับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5 การเตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ต่อการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม ดัดแปลงจากวิธีการของ Nimrat, Tanutpongpalin, Sritunyalucksana, Boonthai, and Vuthiphandchai (2013)

2.5.1 เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร ที่มีระบบเติมอากาศ จำนวน 12 บ่อ แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังกล่าวมาแล้วในการทดลองที่

ชุดการทดลองที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ จำนวน 3 บ่อ

ชุดการทดลองที่ 2 เติมแบคทีเรียผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสม 2 สายพันธุ์ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวน 3 บ่อ

ชุดการทดลองที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวน 3 บ่อ

ชุดการทดลองที่ 4 ไม่เติมโพรไบโอติก (ควบคุม)

2.5.2 เติมน้ำทะเลที่มีค่าความเค็มเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วนที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อ

2.5.3 ปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60 ลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลองทั้ง 12 บ่อ ๆ ละ 50 ตัว และกำหนดการให้อาหารเป็น 3 เวลา คือเวลา 7.00 15.00 และ 23.00 น. ตามลำดับ โดยการทำการให้อาหารหนึ่งยอต่อหนึ่งบ่อเท่านั้น โดยทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

2.5.4 จากนั้นทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำและปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 CFU/ml ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นนี้ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็น 10^7 CFU/ml โดยเติมในวันที่ 14 หลังจาก Challenge ครั้งแรก

2.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารส่วน Hepatopancreas และลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) *Bacillus* และยีสต์ ใน Hepatopancreas และลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ทำการทดลองดังอธิบายมาแล้วในการทดลองที่ 1.5 โดยปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดศึกษาใช้อาหาร PCA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 % ปริมาณยีสต์ศึกษาโดยใช้อาหาร YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิลิตร

2.7 การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในแบบรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011)

ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ก่อนทำการทดสอบความต้านโรคของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 และทดสอบความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 28 วัน ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมอีกครั้งโดยคำนวณตามสมการดังอธิบายมาแล้วในข้อที่ 1.6

2.8 การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสม ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของน้ำใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2012)

การศึกษาคุณภาพน้ำทางเคมีทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.8 โดยทำการตรวจทุก ๆ 7 วัน

การทดลองที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่เติมลงในอาหารต่อการต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30 ในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% (Greenberg et al., 1992)

3.1.1 เตรียมตู้กระจกขนาด 0.2 × 0.4 × 0.25 เมตร จำนวน 12 บ่อ ที่บรรจุน้ำความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ใส่กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30 ลงในบ่อ ๆ ละ 50 ตัว

3.1.2 เตรียมหัวเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการในข้อ 2.2 จากนั้น เติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงและปรับให้มีความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml และ 10^7 CFU/ml ความเข้มข้นละ 3 บ่อ ส่วนอีก 3 บ่อใช้เป็นชุดควบคุมไม่เติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

3.1.3 เก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละบ่อมาตรวจนับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในน้ำหลังจากเติมด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ VHA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อยืนยันปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่เติมแต่ละชุดการทดลอง

3.1.4 บันทึกจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้การวิเคราะห์แบบโปรบิท (Probit analysis)

3.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ดัดแปลงจากวิธีการของ Nimrat et al. (2013)

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 และยีสต์โพรไบโอติก BUU 01 และ BUU 02 ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งตามวิธีการของ Boonthai et al., (2011) และ Nimrat et al., (2011) ดังอธิบายมาแล้วในการทดลองที่ 1 จากนั้นนำผงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและผงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกที่ได้มานับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมต่อไป

3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ เพื่อใช้ศึกษาความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

3.3.1 นำอาหารเลี้ยงกุ้งทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* จำนวน 5 สายพันธุ์ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T1)

ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกจำนวน 2 สายพันธุ์ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T2)

ส่วนที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T3)

ส่วนที่ 4 ไม่เติมโพรไบโอติก (C)

3.3.2 นำอาหารเลี้ยงกุ้งที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 ทั้งหมดมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์โพรไบโอติกทำการตรวจนับโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบันทึกผล

3.4 การเตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ต่อความต้านทานการโรคที่จาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30 ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

3.4.1 เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร ที่มีระบบเติมอากาศ จำนวน 12 บ่อ แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ และยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสม 2 สายพันธุ์ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 4 ไม่เติมโพรไบโอติก (ควบคุม) จำนวน 3 บ่อ

3.4.2 เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลอง (ค่าความเค็มของน้ำเลี้ยงกุ้งเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน) จากนั้นปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 30 ลงในบ่อทดลองทั้ง 12 บ่อ ๆ ละ 50 ตัว และให้อาหารในช่วงเวลา 7.00 15.00 และ 23.00 น. ตามลำดับ โดยทำการให้อาหารในยอที่มี 1 ยอต่อบ่อ ทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นจะทำการทดสอบความ

ต้านทานการเกิดโรคของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำและปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml เป็นระยะเวลา 10 วัน

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมแบบต่าง ๆ ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) *Bacillus* และยีสต์ ใน Hepatopancreas และลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011)

ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ใน Hepatopancreas-intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในการทดลองที่ 1.5 โดยศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 % และศึกษาปริมาณยีสต์โดยใช้อาหารเลี้ยง YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในช่วงก่อนการทดลองความต้านโรคของกุ้งขาวที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ใน Hepatopancreas-intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในวันเริ่มต้นการทดลอง และวันที่ 30 ของการทดลอง เมื่อทดสอบความต้านทานการเกิดโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ใน Hepatopancreas-intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในวันที่ 1 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ถึงวันที่ 5 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค และศึกษาอีกครั้งในวันที่ 7 และ 10 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

3.6 การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011)

ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ก่อนทำการทดสอบความต้านโรคของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 และทดสอบความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 10 วัน ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมอีกครั้งโดยคำนวณตามสมการดังอธิบายมาแล้วในข้อที่ 1.6

3.7 การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสม ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของน้ำใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Nimrat et al. (2012)

การศึกษาคุณภาพน้ำทางเคมีทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.8 โดยในช่วงก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ทำการศึกษาคุณคุณภาพน้ำทางเคมีทุก ๆ 7 วัน และหลังจากเหนี่ยวนำให้ เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ทำการศึกษาคุณภาพน้ำทางเคมีทุกวันที่ 1 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ถึงวันที่ 5 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค และศึกษาอีกครั้งในวันที่ 7 และ 10 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

นำข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University