บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 ทำการศึกษาโดยใช้ลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 45 วัน โดยซื้อจากฟาร์มคุณสงกรานต์ ตำบลจุกเฌอ อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา และนำกุ้งมาปรับสภาพในบ่อปูนซีเมนต์ ขนาด 10 ตัน ที่โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ภาพที่ 12) โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 38%, ไขมัน 5%, กาก 3% และความชื้น 11%; โปรฟีด 3 เอ็ม, เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด, สมุทรสาคร, ประเทศไทย) วันละ 3 มื้อ ได้แก่เวลา 7:00, 15:00 และ 23:00 น. พร้อมทั้งเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10% ทุก ๆ วัน ตลอดระยะเวลาการปรับสภาพลูกกุ้งเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ส่วนในการทดลองที่ 3 ทำการซื้อลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 15 จากไบโอเทคฟาร์ม ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยนำลูกกุ้งลงปรับสภาพในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 38%, ไขมัน 5%, กาก 3% และความชื้น 11%; ซีพี 9001, เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด, สมุทรสาคร, ประเทศไทย) โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อและเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 10% ทุก ๆ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

(ก) (ข)

ภาพที่ 12 (ก) ฟาร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในจังหวัดฉะเชิงเทรา (ข) บ่อปรับสภาพกุ้งขาวแวนนาไม ขนาด 10 ตัน (ภาพโดยจำลอง แสงส่ง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบชีวเคมี

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 Marine Agar (MA; Lab-Scan, Bangkok, Thailand) (ภาพที่ 13ก)

2.1.2 Muller Hinton Agar (MHA; Difco, Spark, USA)

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

2.1.4 Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar (Difco, Spark, USA)

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

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

2.1.7 *Vibrio harveyi* Agar (VHA) (ภาพที่ 13ข)

2.1.8 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Agar

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

2.1.9 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) Broth

2.1.10 0.1% (w/v) peptone water (Bacto, Spark, USA)

2.1.11 0.85% และ 2% (w/v) Normal saline (Ajax, Auckland, New Zealand)

2.1.12 20% (w/v) Skim milk solution (Difco, Spark, USA)

2.2 ชุดทดสอบชีวเคมี

2.2.1 Acetamide

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

2.2.3 Ammonium salt glucose medium

2.2.4 Arginine decarboxylase medium

2.2.5 Bile Esculin (Himedia, Mumbai, India)

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

2.2.7 Citrate (Lab-Scan, Bangkok, Thailand)

2.2.8 Coagulase

2.2.9 Gas from D-glucose

2.2.10 Gelatin hydrolysis medium

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

2.2.12 Malonate-Ducitol medium

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.14 Motility medium

2.2.15 Nitrate broth

2.2.16 Ornithine decarboxylase medium

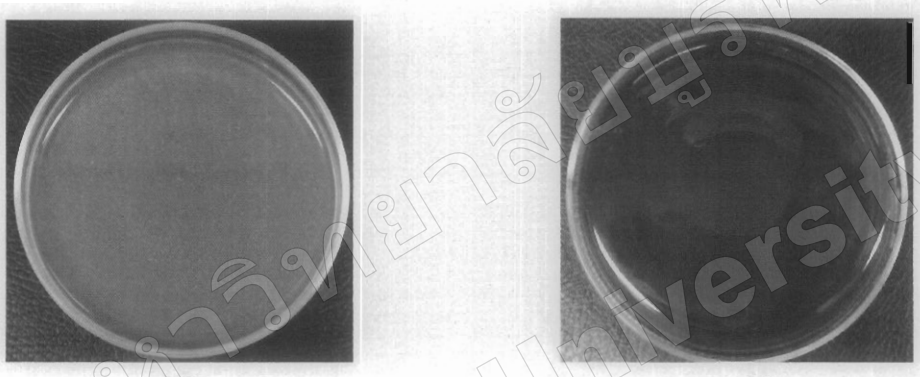
2.2.17 Phenol red broth for carbohydrate/sugar utilization

2.2.18 Triple sugar iron (TSI) agar (Difco, Spark, USA)

2.2.19 TSB with 0%, 3%, 6%, 7%, 8% และ 10% (w/v) NaCl

2.2.20 Urease agar (Merk, Darmstadt, Germany)

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



(ก) (ข)

ภาพที่ 13 (ก) ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine Agar (ข) ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Vibrio harveyi* Agar (ภาพโดยจำลอง แสงส่ง)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 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 (Merk, Darmstadt, Germany)

3.2 สารเคมีสำหรับย้อมแกรม

3.2.1 Crystal violet solution

3.2.2 Gram's iodine solution

3.2.3 Gram's alcohol

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.4 Safranin O solution

3.3 สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.3.1 Catalase reagent (ศิริบัญชา, นนทบุรี, ประเทศไทย)

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

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 ลูป (Inoculating loop)

4.13 สายยางและหัวทราย

4.14 หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

4.15 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. เครื่องมือ

5.1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope; Olympus, CH30RF200, Japan)

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

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

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

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

5.6 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer; Vortex-2 Genie, 2-101915, USA)

5.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge; Eppendoff, Cectrifuge 5804R, Gurmany)

5.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Cintra 400 Double beam, Melbourne, Australia)

5.9 เครื่องวัดความขุ่น (Turbidimeter; HACH, 2100 N, USA)

5.10 เครื่องวัดความเค็ม (Salinity Refractometer; Atago, 2441-W05, Japan)

5.11 เครื่องวัดความความเป็นกรด-ด่าง (Denver instrument, UB-10, Bangkok, Thailand)

5.12 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจน (DO meter; YSI, 85, USA)

5.13 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate; Heidolph, 3001, Germany)

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

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

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

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

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

5.19 ออโตปิเปต (Autopipette; Gilson, NEO, Villiers-le-Bel, France)

6. จุลินทรีย์

6.1 แบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 จาก รศ.ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

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

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

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ทำเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ในบ่อดินจำลองโดยเพาะเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปแบบต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เติมโพรไบโอติกและทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมและคุณภาพน้ำทางกายภาพเป็นระยะเวลา 120 วัน การทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ในบ่อขนาด 100 ลิตร ด้วยอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปแบบต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นทำการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยการเติม *V. harveyi* เป็นเวลา 28 วัน โดยในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความสามารถในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคทำการตรวจปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ลำไส้และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ส่วนการทดลองที่ 3 ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในบ่อขนาด 100 ลิตร ด้วยอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปแบบต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นทำการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยการเติม *V. harveyi* เป็นเวลา 10 วัน โดยในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคทำการตรวจปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง

การทดลองที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 และคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อดินจำลอง

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

1.1.1 นำแบคทีเรียโพรไบโอติก BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 นำเซลล์ที่ได้จากแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสทิ้ง

1.1.3 เติม 0.1% Peptone water ให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้งทำจนครบ 3 รอบ เพื่อเป็นการล้างเซลล์

1.1.4 นำ Cell Suspension ของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 AU ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกเท่ากับ 10^{10} CFU/ml

1.1.5 นำ Cell Suspension ของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาเติม 20 % (w/v) Skim milk solution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 % (w/v) Skim milk solution จากนั้นแช่แข็งในตู้แช่ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาแช่ในเครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

1.1.6 นำผงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้มานับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

1.2 การเตรียมเซลล์ยีสต์ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) ตามวิธีของ Nimrat et al. (2011)

1.2.1 นำยีสต์โพรไบโอติก BUU 01 และ BUU 02 เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.2 นำเซลล์ที่ได้จากยีสต์โพรไบโอติกแต่ละชนิดไปทำการปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสทิ้ง

1.2.3 เติม 0.1% Peptone water ให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม และนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้งทำจนครบ 3 รอบเพื่อเป็นการล้างเซลล์

1.2.4 นำ Cell Suspension ของยีสต์โพรไบโอติกแต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 AU ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^{10} CFU/ml

1.2.5 นำ Cell Suspension ที่ได้เติม 20 % (w/v) Skim milk solution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 % (w/v) Skim milk solution จากนั้นแช่แข็งในตู้แช่ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาแช่ในเครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

1.2.6 นำผงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกที่ได้มานับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ

1.3.1 นำอาหารเลี้ยงกุ้งทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T1)

ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T2)

ส่วนที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T3)

ส่วนที่ 4 ชุดควบคุมไม่เติมโพรไบโอติก (C)

1.3.2 นำอาหารเลี้ยงกุ้งจากข้อ 1.3.1 และอาหารชุดควบคุมมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ปริมาณ *Bacillus* spp. และยีสต์ โดยปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและ *Bacillus* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.4 การเตรียมบ่อดินจำลองสำหรับเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง

1.4.1 เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 0.8 × 1.2 × 0.6 เมตร ที่มีระบบเติมอากาศและระบบหมุนเวียนน้ำ (Re-circulating system) จำนวน 12 บ่อ แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 3 บ่อ

ชุดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับกับยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 3 บ่อ

ชุดที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 3 บ่อ

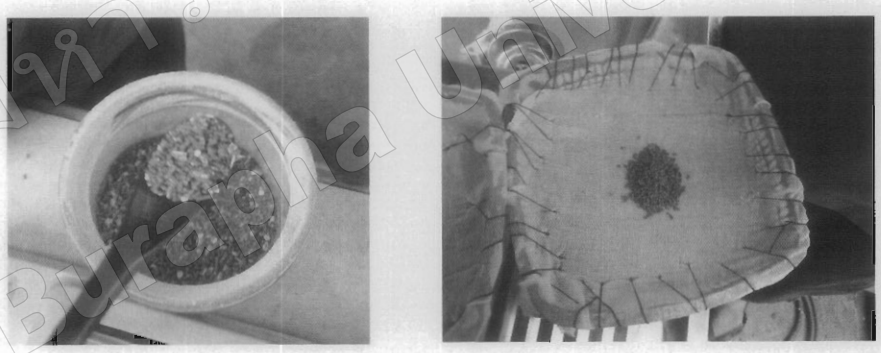
ชุดที่ 4 ไม่เติมโพรไบโอติก (ชุดควบคุม) 3 บ่อ

1.4.2 เติมดินจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองสูง 7 เซนติเมตร

1.4.3 เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อเลี้ยงเพาะเลี้ยงกุ้งจำลอง (ค่าความเค็มของน้ำเลี้ยงกุ้งเท่ากับ 5 ส่วนในพันส่วน; ppt) และทดสอบระบบหมุนเวียนน้ำเป็นเวลา 1 สัปดาห์

1.4.4 ปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ลงในบ่อทั้ง 12 บ่อ ๆ ละ 30 ตัว และให้อาหาร (ภาพที่ 14ก) ในช่วงเวลา 7.00 15.00 และ 23.00 น. ตามลำดับ โดยทำการให้อาหารในยอที่มี 1 ยอต่อบ่อเท่านั้น (ภาพที่ 14ข)

1.4.5 ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 120 วัน โดยตลอดระยะเวลา 120 วัน จะทำการตรวจปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae อัตราการรอดชีวิต และคุณภาพน้ำทางกายภาพ



(ก) (ข)

ภาพที่ 14 (ก) อาหารกุ้งขาวแวนนาไมที่ผสมโพรไบโอติก (ข) ยอสำหรับใส่อาหารเลี้ยงกุ้ง (ภาพโดยวีรสิทธิ์ ขาวผ่อง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.5 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงในบ่อดินจำลอง

1.5.1 สุ่มจับกุ้งจากแต่ละบ่อทดลอง บ่อละ 3 ตัว และเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงในแต่ละบ่อทดลองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในช่วงเริ่มต้นการทดลองและทุก ๆ 30 วัน ของการทดลองเป็นเวลา 120 วัน

1.5.2 นำกุ้งแช่ในสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

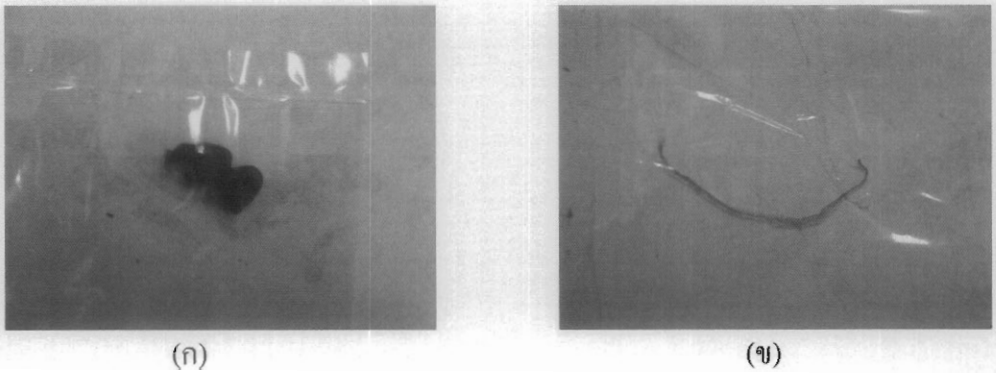
1.5.3 ผ่า Hepatopancreas (ภาพที่ 15ก) และลำไส้ (ภาพที่ 15ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำแต่ละส่วนของอวัยวะกุ้งในบ่อเดียวกันปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันในสารละลาย 0.85% Normal saline ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม

1.5.4 เจือจางตัวอย่างจากอวัยวะกุ้งและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย 0.85% Normal saline

1.5.5 ปิเปตสารละลายจากตัวอย่างจากอวัยวะกุ้งและน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA เพื่อนับปริมาณแบคทีเรียทางทะเล (Gullian et al., 2004) และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เพื่อนับปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae (Boonthai et al., 2011) จากนั้นเกลี่ยเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5.6 นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae นำมาคำนวณปริมาณแบคทีเรียดังสมการ

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



(ก) (ข)

ภาพที่ 15 (ก) Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไม (ข) ลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม (ภาพโดยวีรสิทธิ์ ขาวผ่อง)

1.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินจำลอง

นับจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน และนำมาประเมินอัตราการรอดชีวิตโดยคำนวณตามสมการ

$$\% \text{ อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

1.7 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อดินจำลอง ตามวิธีการของ Smith, Burford, Tabrett, Irvin, and Ward (2002)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตรวจวัดด้วย pH meter ค่าความขุ่นของน้ำตรวจวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่น (Turbidity meter) ค่าความเค็มตรวจวัดด้วยเครื่อง Salinometer Refractometer ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำและอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงตรวจวัดด้วยเครื่อง DO meter โดยทำการตรวจวัดน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ณ เวลา 5:00 และ 14:00 น. ทุก ๆ 15 วัน

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

2.1 การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

นำ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 001, 002, 003 และ 004 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA + 2% (w/v) NaCl จากนั้นนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic 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 บ่อ แบ่งออกเป็น 10 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 บ่อ ได้แก่ ชุดที่ 1 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 001 ชุดที่ 2 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ชุดที่ 3 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 003 ชุดที่ 4 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 004 ชุดที่ 5 (ชุดควบคุม) เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน และไม่เติมเชื้อก่อโรค ชุดที่ 6 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 001 ชุดที่ 7 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ชุดที่ 8 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 003 ชุดที่ 9 เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน และเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 004 ชุดที่ 10 (ชุดควบคุม) เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน และไม่เติมเชื้อก่อโรค

2.2.2 ปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 15 ลงในบ่อ ๆ ละ 50 ตัว

2.2.3 เตรียมหัวเชื้อ *V. harveyi* ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 2% (w/v) NaCl 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 ล้างเซลล์ด้วย 2% (w/v) Saline water 3 ครั้ง

2.2.5 นำ Cell suspension ของ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 AU (10^{10} CFU/ml) จากนั้นเติมลงในบ่อทดลองและปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^{7} CFU/ml พร้อมทั้งนำหัวเชื้อ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์และตัวอย่างน้ำในแต่ละบ่อหลังเติม *V. haveyi* แต่ละสายพันธุ์ลงไปมาตรวจหาปริมาณ *V. harveyi* แต่ละสายพันธุ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ VHA (Harris, Owens, & Smith, 1996)

2.2.6 ติดตามผลโดยบันทึกอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละวันและนำ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการก่อโรคเรืองแสงในกุ้งขาวแวนนาไมไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมต่อไป

2.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) สำหรับใช้เติมลงในอาหารกุ้งเพื่อศึกษาความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

สำหรับการเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 และยีสต์โพรไบโอติก BUU 01 และ BUU 02 ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011) และ Nimrat et al. (2011) ดังอธิบายมาแล้วในการทดลองที่ 1 จากนั้นนำผงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและผงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกที่ได้มานับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ เพื่อใช้ศึกษาความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

2.4.1 นำอาหารเลี้ยงกุ้งทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T1)

ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T2)

ส่วนที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T3)

ส่วนที่ 4 ชุดควบคุมไม่เติมโพรไบโอติก (C)

2.4.2 นำอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ จากข้อ 2.4.1 และอาหารชุดควบคุมมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ปริมาณ *Bacillus* spp. และยีสต์ สำหรับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Bacillus* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.5 การเตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ต่อการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

2.5.1 เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร จำนวน 12 บ่อ โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 4 ไม่เติมโพรไบโอติก (ควบคุม) จำนวน 3 บ่อ

2.5.2 เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลอง (ค่าความเค็มของน้ำเลี้ยงกุ้งเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน; ppt) จากนั้นปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ลงในบ่อทดลองทั้ง 12 บ่อ ๆ ละ 50 ตัว และให้อาหารในช่วงเวลา 7.00 15.00 และ 23.00 น. ตามลำดับ โดยทำการให้อาหารในยอที่มี 1 ยอต่อบ่อเท่านั้น โดยทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นจะทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำและปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 CFU/ml ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นนี้ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็น 10^7 CFU/ml โดยเติมในวันที่ 14 หลังจาก Challenge ครั้งแรก

2.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค

ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงตามวิธีการที่ได้อธิบายมาแล้วในข้อ 1.5 สำหรับแบคทีเรียทางทะเลใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MA (Gullian et al., 2004) ปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (Boonthai et al., 2011) และปริมาณ *V. harveyi* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ VHA (Harris et al., 1996) โดยในช่วงก่อนการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคทำการตรวจในช่วงเริ่มต้นการทดลองและวันที่ 30 ของการทดลองและเมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคทำการตรวจทุก ๆ 7 วัน

2.7 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค

นับจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ก่อนทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และเมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมทำการนับจำนวนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายของแต่ละชุดทดลองในแต่ละวันตลอดระยะเวลา 28 วัน และนำมาประเมินอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวโดยคำนวณตามสมการ

$$\% \text{ อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

2.8 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas, ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมี

2.8.1 คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวอย่าง Hepatopancreas, ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA TCBS agar และ VHA และจดบันทึกลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิด

2.8.2 นำไปแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว และนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการจัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ตามวิธีการของ Holt et al. (1994) และ Krieg and Holt (1984) การจัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Micrococcaceae และ Pseudomonadaceae ตามวิธีการของ Koneman, procop, Schrechenberger and Woods (2006) การจัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Bacillaceae ตามวิธีการของ Sneath, Mair, Sharpe and Holt (1986)

2.9 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Smith et al. (2002)

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.7 โดยทำการตรวจวัดทุก ๆ 7 วัน

การทดลองที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% (ดัดแปลงจาก Greenberg, Clesceri, & Eaton, 1992)

3.1.1 เตรียมตู้กระจกขนาด 0.2 × 0.4 × 0.25 เมตร จำนวน 12 บ่อ ที่บรรจุน้ำความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ใส่กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 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*

3.1.3 เก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละบ่อมาตรวจนับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ VHA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจนับปริมาณ *V. harveyi* ในแต่ละชุดการทดลอง

3.1.4 บันทึกจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LC 50 โดยใช้การวิเคราะห์แบบโปรบิท (probit analysis)

3.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งสำหรับใช้เติมลงในอาหารกุ้งเพื่อศึกษาความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

สำหรับการเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 และยีสต์โพรไบโอติก BUU 01 และ BUU 02 ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011) และ Nimrat et al. (2011) ดังอธิบายมาแล้วในการทดลองที่ 1 และนำผงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและผงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกที่ได้มานับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ เพื่อใช้ศึกษาความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

3.3.1 นำอาหารเลี้ยงกุ้งทางการค้าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T1)

ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T2)

ส่วนที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (T3)

ส่วนที่ 4 ชุดควบคุมไม่เติมโพรไบโอติก (C)

3.3.2 นำอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบบต่าง ๆ จากข้อ 3.3.1 และอาหารชุดควบคุมมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ปริมาณ *Bacillus* spp. และยีสต์ สำหรับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและ *Bacillus* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4 การเตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

3.4.1 เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร จำนวน 12 บ่อ โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 3 เติมยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 4 ไม่เติมโพรไบโอติก (ควบคุม) จำนวน 3 บ่อ

3.4.2 เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลอง (ค่าความเค็มของน้ำเลี้ยงกุ้งเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน; ppt) จากนั้นปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ลงในบ่อทดลองทั้ง 12 บ่อ ๆ ละ 50 ตัว และให้อาหารในช่วงเวลา 7.00 15.00 และ 23.00 น. ตามลำดับ

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค

ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงตามวิธีการที่ได้อธิบายมาแล้วในข้อ 1.5 สำหรับปริมาณแบคทีเรียทางทะเลใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MA (Gullian et al., 2004) ปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (Boonthai et al., 2011) และปริมาณ *V. harveyi* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ VHA (Harris et al., 1996) โดยในช่วงก่อนการทดลองความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจะทำการตรวจในช่วงเริ่มต้นการทดลองและวันที่ 30 ของการทดลองเมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจะทำการตรวจทุก ๆ ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 และตรวจอีกครั้งในวันที่ 7 และ 10

3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค

นับจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในช่วงก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และนับจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายของแต่ละชุดการทดลองในแต่ละวันในช่วงระยะเวลาการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำมาประเมินอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมตามสูตรการคำนวณในข้อ 2.7

3.7 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมี

สำหรับการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas, ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมีตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.8.1

3.8 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ตามวิธีการของ Smith et al. (2002)

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 1.7 โดยทำการตรวจทุก ๆ 7 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

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