บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่สำคัญ

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัท
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Kokusan, Japan
เครื่องวัดค่าพี-เอช (pH meter)	Orion, USA
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (รุ่น Spectronic Genesys 2)	Milton Roy,USA
เครื่องทำแห้งในภาวะเหยือกแข็ง (Freeze Dryer หรือ Lyophilizer)	Heterice co, Ltd, Japan
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)	Hepaire, England
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	ALP, Japan
เครื่องบด (Homogenizer)	Nissei, Japan
ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven)	Memmert, Germany
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Memmert, Germany
เครื่องเขย่า (Shaker)	Gerhart, Germany
แผ่นให้ความร้อน (Hot plate)	Gerhart, Germany
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Olympus, USA
Microtiter plate 96 หลุม	Nunclon, USA

3.1.2 สารเคมีที่สำคัญ

สารเคมี	บริษัท
Formaldehyde Solution (Formalin)	BDH Chemical Ltd. England
Glutaraldehyde	Fluca Chemical CO, USA
L-Cystine	Sigma, USA
Thioglycolic acid	Fluga Chemical CO, USA
Resazurin	Fluga Chemical CO, USA
MEM Vitamins Solution	Gibco Chemical CO, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MEM Essential amino acid+glutamine	Gibco Chemical CO, USA
Latex beads (polystysene)	Sigma Chemical CO, Ltd
(particle diameter 1.16 μ , 10% suspension)	

สารเคมีอื่นๆ เป็นของ บริษัท Merck จำกัด USA

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. TCBS Agar (Thiosulfate-Citrate -Bile Salt Sucrose Agar) , Difco
2. Brain Heart Infusion Broth (Difco) with 1.5% NaCl
3. Brain Heart Infusion Broth (Difco) with 2.0% NaCl
4. Lobster Hemolymph Medium (LHM), Gibco
5. Minimum Medium (David and Mingioli, 1966)
6. PYG (Peptone Yeast Extract Medium)

สูตรและวิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

3.2.1 แบคทีเรีย

1. *Clostridium butyricum* สายพันธุ์ HA-1 (MAFF 519001)
2. *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ D003
3. *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ D331
4. *Vibrio* sp สายพันธุ์ D006

เชื้อ *Clostridium butyricum* สายพันธุ์ HA-1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก National Grassland Research Institute, Japan สำหรับเตรียมเซลล์เพื่อใช้ทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่วนเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus, V. harveyi* และ *Vibrio* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้ง เครือเจริญโภคภัณฑ์ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ใช้สำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วน *Vibrio* sp ใช้สำหรับการตรวจหาระดับของ bactericidin

3.2.2 เชื้อไวรัสหัวเหลือง (Yellow Head Virus,YHV) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้ง เครือเจริญโภคภัณฑ์ โดยแยกไวรัสจากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลือง เพื่อใช้สำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อจากไวรัสหัวเหลือง เพื่อทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อหัวเหลือง

3.3 สารกระตุ้นทางการค้าที่ใช้ในการทดสอบ

IE-04 เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Nippon Kayaku CO.Ltd. ที่เตรียมจาก *C. butyricum* MIYAIRI ซึ่งทำให้แห้งโดยวิธี spray dry เพื่อเก็บในรูปผงสำหรับใช้ในการผสมอาหาร

3.4 การเตรียม Stock แบคทีเรีย

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* sp มาเพาะเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 100 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วน *V. harveyi* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 100 ml บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนเซลล์ที่ได้มาเติมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI 10 ml. ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ และมี glycerol 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กเก็บที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้

ส่วน *C. butyricum* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PYG ปริมาตร 200 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนเซลล์ที่ได้มาเติมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PYG ที่มี 20% glycerol (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 แบ่งใส่หลอดขนาดเล็กเก็บที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.5 สัตว์ทดลอง

นำกุ้งกุลาดำที่ได้จากฟาร์มบริษัทเอกชนอายุหลังคว่ำประมาณ 1 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 0.8 กรัม และอายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 8-15 กรัม มาเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 10 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพเพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป ปริมาณที่ให้ต่อวันเท่ากับ 4.5-10% ของน้ำหนักตัว (กุ้งน้ำหนักประมาณ 0.8 กรัม ให้อาหาร 10% และกุ้งน้ำหนักประมาณ 8-15 กรัม ให้อาหาร 4.5%) โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อ คือเวลา 7.00 น. 14.00 น.และ 22.00 น. และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันๆ ละ 50%

3.6 การติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Growth Curve) ที่ใช้ในการทดสอบ

3.6.1 *C. butyricum* สายพันธุ์ HA-1 (MAFF 519001)

นำเชื้อ *C. butyricum* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70°C (ข้อ 3.3) ปริมาตร 0.5 ml เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PYG ปริมาตร 200 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยไม่มีการให้อากาศ ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PYG บ่มที่อุณหภูมิ 37°C สร้างกราฟแสดงการเจริญระหว่างปริมาณเซลล์กับเวลา (แสดงผลในข้อ 1 ภาคผนวก จ)

3.6.2 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ D003

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70°C (ข้อ 3.3) ปริมาตร 20 µl เพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ซึ่งเพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 45 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30°C สร้างกราฟแสดงการเจริญระหว่างปริมาณเซลล์กับเวลา (แสดงผลในข้อ 2 ภาคผนวก จ)

3.6.3 *Vibrio sp.* สายพันธุ์ D006

นำเชื้อ *Vibrio sp.* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70°C (ข้อ 3.3) ปริมาตร 20 µl เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ซึ่งเพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 45 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30°C สร้างกราฟแสดงการเจริญระหว่างปริมาณเซลล์กับเวลา (แสดงผลในข้อ 3 ภาคผนวก จ)

3.6.4 *V. harveyi* สายพันธุ์ D331

นำเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70°C (ข้อ 3.3) ปริมาตร 25 µl เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ซึ่งเพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 45 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30°C สร้างกราฟแสดงการเจริญระหว่างปริมาณเซลล์กับเวลา (แสดงผลในข้อ 4 ภาคผนวก จ)

3.7 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

3.7.1 *V. parahaemolyticus* D003

นำ *V. parahaemolyticus* D003 ปริมาตร 20 µl จาก stock culture ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -70°C มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 100 ml บ่มเชื้อที่ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^{5}-10^{6} CFU/ml นำไปใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งทดลอง (Injection Challenge)

3.7.2 *V. harveyi* D331

นำเชื้อ *V. harveyi* D331 ปริมาตร 25 µl จากเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 100 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาใช้ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีการแช่ (Immersion Challenge)

3.8 การทดสอบหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

3.8.1 การเหนี่ยวนำด้วยไวรัสหัวเหลือง (YHV)

3.8.1.1 การตรวจสอบทางด้านพยาธิสภาพ

หลังจากเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองจนกุ้งทดลองอ่อนแอและเริ่มตายสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งที่เริ่มตายในทุกการทดลอง ดองตัวอย่างด้วย Davidson's Fixative และตรวจเช็คการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ เพื่อยืนยันว่ากุ้งทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามวิธีการในภาคผนวก ข

3.8.2 การเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi*

หลังจากเหนี่ยวนำกุ้งทดลองด้วยแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หรือ *V. harveyi* จนกุ้งทดลองอ่อนแอและเริ่มตาย สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งที่เริ่มตายในทุกการทดลองมาทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่ากุ้งทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. harveyi*

3.8.2.1 การตรวจสอบด้านแบคทีเรีย

นำกุ้งทดลองที่เพิ่งตายมาทำการแยกเชื้อจากเลือดและตับทำการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18

ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้มาทำการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อแยกเชื้อว่าเป็นชนิด *V. parahaemolyticus* หรือ *V. harveyi* ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำตามการจำแนกใน Bergey's manual of systematic bacteriology (Baumann and Schubert, 1986)

3.8.2.2 การตรวจสอบทางพยาธิสภาพ เช่นเดียวกับข้อ 3.8.1

3.9 การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) เพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

นำกุ้งป่วยเป็นโรคหัวเหลืองจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มาทำการเจาะเลือดจากแอ่งเลือดด้านท้อง ผสมกับอาหารเหลว LHM ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นนำมาทำการเจือจางด้วยอาหารเหลว LHM ให้มีความเข้มข้นเป็น 1: 10,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) หลังจากนั้นนำมาฉีดเข้าในกุ้งปกติ น้ำหนักประมาณ 15-20 กรัม โดยฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 2 และ 3 ตัวละ 0.1 ml เลี้ยงกุ้งไว้นานประมาณ 3-5 วัน จนกระทั่งกุ้งอ่อนแอและเริ่มตายนำกุ้งที่ตายมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิที่ -70°C และนำมาแยกส่วนเหงือกของกุ้งมาผสมกัน และทำการบดให้ละเอียดด้วย Homogenizer ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เจือจางด้วยอาหารเหลว LHM ในอัตราส่วน 1:5 เท่า นำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ลอยอยู่บนตะกอน มาทำการกรองด้วย membrane filter ขนาด 450 นาโนเมตร เก็บส่วนใสที่ได้แยกไว้ในหลอดขนาดเล็กเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยวิธีการแช่

3.10 การเตรียมเซลล์ *C. butyricum* เพื่อใช้ในการทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

นำ *C. butyricum* จาก stock culture ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PYG ปริมาตร 200 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เติมฟอร์มาลีน 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทิ้งไว้นาน 18 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์ที่ได้ทำให้แห้งในสภาพเยือกแข็ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.11 การเตรียมอาหารผสมสารกระตุ้นทางการค้า IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* เพื่อใช้ในการทดสอบ

เตรียมอาหารกุ้งตามสูตรในภาคผนวก ง โดยผสมสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ผสมลงในอาหาร ในความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ต้องการทดสอบ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3.12 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ทางการค้า IE-04 ที่จะนำไปใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยเซลล์ของ *C. butyricum*

3.12.1 เตรียมสารกระตุ้นจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า IE-04 ความเข้มข้น 0, 100, 500, 1,000 และ 5000 ppm ตามวิธีในข้อ 3.11

3.12.2 นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนัก 8-10 กรัม เลี้ยงในบ่อปูนขนาด 10 ตัน กลุ่มละ 200 ตัว จำนวน 5 กลุ่มการทดลองโดยให้อาหารทดลองนาน 1 สัปดาห์ จำนวน 3 มื้อต่อวัน โดยให้อาหาร 5% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50%

3.12.3 นำกุ้งทดลองจาก ข้อ 3.12.2 มาทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยนำมาทดสอบ ดังนี้

3.12.3.1 ความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยการเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* เข้ากล้ามเนื้อ ทำการทดสอบกลุ่มละ 8 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.12.3.2 ความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มีเชื้อ YHV 1: 10,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง ทำการทดสอบกลุ่มละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว

3.12.3.3 ทดสอบหาค่า bactericidin โดยเจาะเลือดจากกุ้งกลุ่มละ 10 ตัว นำมาผสมกัน โดยทดสอบค่าหลังจากให้อาหารผสมสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 7 วันและหลังจากหยุดให้อาหารผสมสารกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน

3.12.3.4 ทดสอบหา % phagocytosis และ phagocytic index หลังจากให้อาหารผสมสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 7 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 7 วัน จากกุ้งทดลองกลุ่มละ 5 ตัว

3.13 การทดสอบสารกระตุ้นทางการค้า IE-04 ความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ทดสอบ เปรียบเทียบกับการกระตุ้นจากเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 90 วัน

3.13.1 เตรียมสารกระตุ้นจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า IE-04 ความเข้มข้น 0, 100 และ 200 ppm ตามวิธีข้อ 3.11

3.13.2 นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนัก 0.8 กรัม เลี้ยงในบ่อปูนขนาด 10 ตันบ่อละ 280 ตัว กลุ่มละ 2 บ่อ ให้อาหารทดลองวันละ 3 มื้อ โดยเริ่มให้อาหารวันละ 10 % ต่อน้ำหนักตัว และปรับปริมาณอาหารเพิ่มขึ้น 10 % ทุก ๆ 10วันเป็นเวลา 90 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50% ตรวจสอบคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงทุก 10 วัน

3.13.3 นำกุ้งทดลองจากข้อ 3.13.2 มาทำการทดสอบหลังจากให้อาหารผสมสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน

3.13.3.1 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ทำการทดลองกลุ่มละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.13.3.2 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มีเชื้อ YHV ความเข้มข้น 1: 20,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มละ 4 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว

3.13.3.3 ทดสอบหาค่า bactericidin โดยเจาะเลือดจากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว มาผสมกัน

3.13.3.4 ทดสอบหาค่า % phagocytosis และ phagocytic index จากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว

3.14 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการกระตุ้นด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ เพื่อทดสอบเปรียบเทียบกับสารกระตุ้นทางการค้า IE-04

3.14.1 เตรียมเซลล์ของ *C. butyricum* (ตามข้อ 3.10) ผสมในอาหารกุ้งตามวิธีข้อ 3.11 ให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200 และ 500 ppm

3.14.2 นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักประมาณ 10 กรัม เลี้ยงในบ่อปูนขนาด 10 ตัน บ่อละ 300 ตัว ให้อากาศและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50% โดยให้อาหารผสมเซลล์ของ *C. butyricum* วันละ 3 มื้อ ปริมาณอาหารที่ให้ วันละ 5% ต่อน้ำหนักตัว เป็นเวลา 7 วัน และเปลี่ยนเป็นอาหารปกติ

3.14.3 นำกุ้งทดลองจากข้อ 3.14.2 มาทำการทดสอบหลังจากให้อาหารผสมเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 7 วัน และหลังจากเปลี่ยนเป็นอาหารปกติ 7 วัน

3.14.3.1 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ กลุ่มละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.14.3.2 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง YHV โดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มีเชื้อ YHV ความเข้มข้น 1: 20,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.14.3.3 ทดสอบหาค่า bactericidin โดยเจาะเลือดจากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว มาผสมกัน

3.14.3.4 ทดสอบหาค่า % phagocytosis และ phagocytic index จากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว

3.15 ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารกระตุ้นทางการค้า IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

3.15.1 เตรียมอาหารกุ้งผสมสารกระตุ้นจาก IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ตามข้อ 3.11 ให้มีความเข้มข้น 0 และ 100 ppm

3.15.2 นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักประมาณ 8 กรัม เลี้ยงในบ่อปูนขนาด 1 ตัน บ่อละ 55 ตัว กลุ่มละ 4 บ่อ ให้อากาศ และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50% โดยให้อาหารทดลองวันละ 3 มื้อ ปริมาณอาหารที่ให้วันละ 5 % ต่อน้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน และเปลี่ยนเป็นอาหารปกติ ตรวจสอบคุณภาพน้ำทุก 7 วัน

3.15.3 นำกุ้งทดลองจากข้อ 3.15.2 มาทำการทดสอบหลังจากให้อาหารผสมสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้อาหารทดลอง 7 วัน ดังนี้

3.15.3.1 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มี *V. harveyi* ความเข้มข้น 10^5-10^6 CFU/ml กลุ่มละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.15.3.2 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มีเชื้อ YHV ความเข้มข้น 1: 20,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.15.3.3 ทดสอบหาค่า bactericidin โดยเจาะเลือดจากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว มาผสมกัน

3.15.3.4 ทดสอบหาค่า % phagocytosis และ phagocytic index จากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว

3.16 ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารกระตุ้นทางการค้า IE-04, เซลล์ของ *C. butyricum* และสารผสมระหว่างสารกระตุ้น IE-04 กับเซลล์ของ *C. butyricum*

3.16.1 เตรียมสารกระตุ้นจาก IE-04 และ *C. butyricum* ผสมอาหารให้มีความเข้มข้น 100 ppm และสารผสมของ IE-04 กับเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ให้มีความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ตามวิธีข้อ 3.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.16.2 นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักประมาณ 15 กรัม เลี้ยงในบ่อปูนขนาด 10 ตัน บ่อละ 300 ตัว ให้อากาศ และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 50% โดยให้อาหารทดลองวันละ 3 มื้อ ปริมาณอาหารที่ให้วันละ 4% ของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 7 วัน และเปลี่ยนเป็นอาหารปกติ

3.16.3 นำกุ้งทดลองจากข้อ 3.16.2 มาทำการทดสอบหลังจากให้อาหารทดลองนาน 7 วัน และหยุดให้อาหารทดลอง 7 วันและ 14 วัน ดังนี้

3.16.3.1 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียโดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มี *V. harveyi* ความเข้มข้น 10^5-10^6 CFU/ml กลุ่มละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.16.3.2 ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการเหนี่ยวนำด้วยการแช่กุ้งในน้ำที่มีเชื้อ YHV ความเข้มข้น 1: 20,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

3.16.3.3 ทดสอบหาค่า bactericidin โดยเจาะเลือดจากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว มาผสมกัน

3.16.3.4 ทดสอบหาค่า % phagocytosis และ phagocytic index จากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว

3.17 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

3.17.1 การทดสอบโดยใช้วิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

เตรียมตู้ทดลอง ขนาดความจุน้ำ 40 ลิตร ใส่กุ้งทดลองตู้ละ 10 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมตามวิธีข้อ 3.7.1 ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^5-10^6 CFU/ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อระหว่างปล้องที่ 2 และ 3 ตัวละ 0.1 ml เช็คอัตรารอดของกุ้งทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

3.17.2 การทดลองโดยใช้วิธีการแช่

เตรียมตู้ทดลอง ใส่น้ำ 40 ลิตร ใส่กุ้งทดลองตู้ละ 10 ตัว นำเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 3.7.2 มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ และนำเซลล์ที่ได้ใส่ตู้ทดลอง (ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^5-10^6 CFU/ml) เลี้ยงกุ้งทดลองเป็นเวลา 7 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ

สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ ทำโดยเลี้ยงกุ้งทดลอง 10 ตัว ในตู้ทดลองน้ำ 40 ลิตร โดยไม่เปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นเวลา 7 วัน เช็คอัตรารอดของกุ้งทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

3.18 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV)

นำกุ้งทดลองใส่ในถังพลาสติก ขนาด 45 ลิตร ใส่น้ำความเค็ม 15 ppt 30 ลิตร เติมเชื้อ YHV ที่เตรียมตามวิธีข้อ 3.9 เติมลงในน้ำให้มีความเจือจาง 1: 20,000 เท่า (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นใส่กุ้งกุลาดำที่จะทดสอบ 30 ตัวต่อถัง ให้อากาศตลอดเวลา โดยแช่กุ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายกุ้งไปใส่ในถังขนาด 1 ตัน ที่มีน้ำ 200 ลิตร และเลี้ยงกุ้งทดลองไว้นาน 10-14 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เช็คอัตรารอดของกุ้งทุกวัน

สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ YHV ทำเช่นเดียวกับกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ แต่แช่กุ้งในน้ำที่ไม่มีการเติมเชื้อ YHV และเลี้ยงกุ้งทดลองเป็นเวลา 10-14 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ

3.19 การศึกษาระดับของ bactericidin ตามวิธีที่ดัดแปลงจากของ Schwab และ Reeves (1966) และ Adams (1991)

3.19.1 เตรียมเชื้อ *Vibrio* sp. (D006) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 20 µl จาก stock culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ เจือจางแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^3 CFU/ml โดยใช้ Minimum medium

3.19.2 เจาะเลือดและน้ำเหลืองจากแอ่งเลือดด้านท้องจากกุ้งทดลอง กลุ่มละ 10 ตัว ตัวละ 0.2 มล. นำมาผสมกัน และทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเลือดที่ได้มาแยกส่วนน้ำโดยใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อกดให้เลือดแตกออกจากกัน นำส่วนน้ำเลือดที่ได้มาผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เจือจางน้ำเลือดด้วย minimum medium ใน microtiter plate ที่ความเจือจาง 1:10, 1:20, ..., 1: 20480 โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย 0.1 ml จากนั้นเติม *Vibrio* sp. ที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.19.1 ปริมาตร 0.1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งในแต่ละความเจือจางโดยหยด 20 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS จำนวน 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มควบคุมสำหรับการทดสอบ

กลุ่มควบคุมสำหรับการทดสอบ คือ กลุ่มที่เติม Minimum medium 0.1 ml และเติม *Vibrio* sp 0.1 ml โดยไม่มีการเติมน้ำเลือด

I 18820116

จุดยุติ คือ ความเข้มข้นของน้ำเลือดต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 50% โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \left[1 - \frac{\text{จำนวนโคโลนีของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{จำนวนโคโลนีของกลุ่มควบคุมสำหรับการทดสอบ}} \right] \times 100$$

3.20 การศึกษา % phagocytosis และ phagocytic index ตามวิธีที่ดัดแปลงจากของ Paterson และคณะ (1974)

เจาะเลือดจากแอ่งเลือดด้านท้อง (Ventral sinus) 0.25 ml ด้วยเข็มเบอร์ 25 ความยาว 1 นิ้ว ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ที่มี cysteine 50 mg/ml เป็นสารกันเลือดแข็งในอัตราส่วน 1: 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดโดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) จากนั้นปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดให้เท่ากับ $1x10^{6}$ cells/ml หยดเซลล์เม็ดเลือดลงบนสไลด์ที่สะอาด 100 µl เติม Latex bead ที่เจือจางด้วย LHM ในอัตราส่วน 1:100 เท่า (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 100 µl ผสมกับหยดเลือดบนสไลด์ บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้อง ($25^{\circ}C$) เป็นเวลา 45 นาที เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.125% (ปริมาตร/ปริมาตร) (ตามวิธีข้อ 7 ภาคผนวก ก) จำนวน 5 หยด เพื่อตรึงเซลล์เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับสไลด์ออกด้วย LHM นำแผ่นสไลด์ย้อมด้วยสี Wright-Giemsa (ตามวิธีในภาคผนวก ค) ตรวจสอบการเกิด phagocytosis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 300 เซลล์

$$\% \text{ phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เกิด phagocytosis}}{\text{จำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{phagocytic index} = \frac{\text{จำนวน latex bead ที่ถูกจับกิน}}{\text{จำนวนเซลล์ที่เกิด phagocytosis}}$$

3.21 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำในการทดลอง

ได้แก่ ความเค็ม, ความเป็นกรด ด่าง, ปริมาณแอมโมเนีย, ไนเตรท, ไนไตรท์ และค่าความเป็นด่าง ตามวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (APHA, 1980)

3.22 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบข้อมูลด้วยวิธี Duncan New Multiple range test (Stat Graphic Version 5.0)

3.23 การหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

$$RPS = \left[1 - \frac{\text{เปอร์เซนต์การตายของกลุ่มทดลอง}}{\text{เปอร์เซนต์การตายของกลุ่มควบคุม}} \right] \times 100$$

โดยกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ (negative control) ต้องมีอัตราการตายน้อยกว่า 10%
กลุ่มควบคุมที่ได้รับเชื้อ (positive control) ต้องมีอัตราการตายตายมากกว่า 50%

3.24 สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้ง บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน)
จังหวัดสมุทรสาคร

3.25 ระยะเวลาทดลอง

กันยายน พ.ศ. 2537 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2538

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย