บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA

เครื่องทำให้แข็งและแห้ง (Lyophilizer) รุ่น EYELA ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Psychrotherm controlled environment incubator shaker) รุ่น 6-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA

เคมีภัณฑ์

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแบรนฮาตอินฟิวชัน (Brain heart infusion broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างกุ้งและตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อหาแบคทีเรียประจำถิ่น

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำและน้ำเก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้ง จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดสมุทรปราการ และจังหวัดสมุทรสาคร บ่อที่เก็บตัวอย่างเป็นบ่อดินมีขนาดตั้งแต่ 3-5 ไร่ ลึกประมาณ 1.5 เมตร เป็นบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีอายุประมาณ 2-3 เดือน โดยเก็บตัวอย่างใส่ในหลอดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในที่เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ

2. คัดเลือกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

นำตัวอย่างกุ้ง (มาตัดทางเดินอาหารโดยวิธีปราศจากเชื้อ (sterile technique) และดึงส่วนทางเดินอาหารออกมาชั่งน้ำหนัก (กรัม)) และน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง นำมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เพื่อหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และในอาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio* spp. หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมมาทำลายเซลล์ที่มีชีวิต และเพื่อเป็นการกระตุ้นสปอร์ของแบคทีเรียที่มีการสร้างสปอร์ โดยการทำ heat shock ที่ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. นำมาปมที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ดูผลการทดลองโดยนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และนำแบคทีเรียที่แยกได้มาเขี่ยบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยว ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเก็บเชื้อไว้ในอาหารแข็งเอียงทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เพื่อไว้เป็น stock culture และนำไปใช้ต่อไป

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้งของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

3.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

เขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ลงในอาหารเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) สำหรับเตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 25 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำส่วนน้ำใสมาวัดค่าพีเอช แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้ง

สายพันธ์ของเชื้อทดสอบบางสายพันธ์ที่ก่อโรคในคนได้แก่ *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อทดสอบที่ก่อโรคในกุ้งได้แก่ *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas aeruginosa,Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum, Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio cholera* จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้ง เครือเจริญโภคภัณฑ์

นำเชื้อทดสอบ 1 ลูปจากอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ลงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. ด้วย 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ค่า 1.0 เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อทดสอบ (Schillinger และ Lucke, 1989)

3.3 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น (Well diffusion assay)

นำเชื้อทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 มา 1 มล. หยดลงบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 4) และใช้สำลีพันปลายไม้เขี่ยให้เชื้อกระจายทั่วทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ระนาบทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาเจาะหลุมด้วยแท่งเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. เบอร์ 5 เจาะลงบนวุ้นจำนวน 4 หลุม ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ นำส่วนน้ำใสที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 มาหยอดลงในหลุม

หลุมละ 80 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลุม นำไปแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 2 ชม. เพื่อให้ส่วนน้ำใสซึมเข้าไปในวุ้น และป้องกันเชื้อทดสอบเจริญ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ดูผลการทดลองโดยการวัดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (Clear zone inhibition) (Schillinger และ Lucke, 1989)

3.4 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลวโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm.

การทดลองมี 2 ชุดคือ ชุดควบคุม นำเชื้อทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 มา 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มล. ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชนิดเหลว 3 มล. การทดลองอีกชุดใช้เชื้อทดสอบ 1 มล. เติมลงในหลอดทดลองขนาด 10 มล. ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชนิดเหลว 2 มล. และเติมส่วนน้ำใสที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาณ 1 มล. แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. ทุกๆ 3 ชม. เป็นเวลา 36 ชม. นำมาเขียนกราฟและคำนวณค่าการเจริญที่แบคทีเรียแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (Doulbing time) (ภาคผนวก ค) (Barefoot และ Klaenhammer, 1983)

4. ตรวจวัดการเจริญ และศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อทดสอบของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

4.1 การเตรียม *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเพื่อวัดการเจริญ

เขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. ให้ได้ค่า 1.0 เพื่อให้เป็นหัวเชื้อในการวัดการเจริญ

4.2 การตรวจวัดการเจริญ

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 มา 6 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารยับยั้ง (Antimicrobial substance) ปริมาตร 200 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชม. แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวัดการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 660 nm. นำส่วนที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำส่วนน้ำใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น ตามการทดลองข้อ 3.3 และนำส่วนน้ำใสไปวัดค่าพีเอช

4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อทดสอบของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

เตรียมหัวเชื้อเหมือนข้อ 4.1 โดยนำมาแปรผันหาภาวะที่เหมาะสมดังนี้

4.3.1 ศึกษาภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 20, 28, 30, 37 °ซ และที่อุณหภูมิห้อง (เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และ ไม่เขย่า)

4.3.2 ศึกษาภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแปรผันอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3)

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแบรนฮาตอินฟิวชัน (ภาคผนวก ก ข้อ 8)

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 5)

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (ภาคผนวก ก ข้อ 7)

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น ตามการทดลองข้อ 3.3

5.ตรวจสอบสมบัติ และรูปร่างลักษณะของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

ศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจำแนกแบคทีเรีย โดยยึดหลักการจัดจำแนกตาก Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986)

ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสี (Pigment) ของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) และลักษณะการเจริญในอาหารเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3)

การติดสีแกรม

นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) อายุ 24 ชม. มาย้อมดูการติดสีแกรม (ภาคผนวก ข ข้อ 1-4) ดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมเอ็นโดสปอร์

นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) อายุ 48 ชม. มาย้อมเอ็นโดสปอร์ (ภาคผนวก ก ข้อ 5) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

ลักษณะทางชีววิทยาและชีวเคมี

การทดสอบการเคลื่อนที่

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 8) โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก

ปลูกเชื้อลงในอาหาร Huge and Leifson's O-F medium (ภาคผนวก ก ข้อ 9) อีกหลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหลวปิดหน้าประมาณ 2 เซนติเมตร นำทั้งสองหลอดบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดก๊าซ โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเป็น Oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้งสองหลอดแสดงว่าเป็น Fermentation

เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อะซิติก แลคติก หรือ ฟอร์มิก จากกลูโคส เนื่องจากเมทิลเรดจะเปลี่ยนสีในช่วงพีเอช 6.0 (สีเหลือง) และพีเอช 4.4 (สีแดง) จัดว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองให้ผลเป็นลบ

การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges proskauer test)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (ภาคผนวก ก ข้อ 11) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ทดสอบโดยเติมแอลฟาแนฟทอล (α-Naphthol) 5% ปริมาตร 0.3 มล. ก่อนจึงใส่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40% ปริมาตร 0.2 มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 9) เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที หรือ 24 ชม. แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน (Acetoin) จากวัฏจักรบิวทีรีนไกคอล (Butylene glycol pathway) ซึ่ง 40% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จะเปลี่ยนกลับให้อะซิโตอินกลายเป็นไดอะซิติล (Diacetyl) และเกิดสารประกอบสีแดง โดยการเร่งปฏิกิริยาของแอลฟาแนฟทอล ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ผลเป็นลบ

การสร้างยูรีเอส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารคริสเตนส์ยูเรีย (Christensen's urea) (ภาคผนวก ก ข้อ 12) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1-4 วัน ถ้าปรากฏสีชมพูสดบนอาหาร แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างยูรีเอสย่อยสลายยูเรียให้แอมโมเนียออกมาทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง จึงเปลี่ยนสีฟีนอลเรดจากสีส้ม (พีเอช 6.8) กลายเป็นสีชมพูเข้ม (พีเอช 8.1) ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีอาหารให้ผลเป็นลบ (Ederer, Che และ Blazeric, 1971)

การใช้ไนเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวไนเตรท (Nitrate broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 13) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้นโดยการเติมกรดซัลฟานิลิค (Sulfanilic acid) 2-3 หยด และแอลฟาแนพทิลลามีน (α-Napthylamine) (ภาคผนวก ข ข้อ 10) ลงไปตามลำดับ ถ้าเกิดสีแดงภายใน 30 วินาที ให้ผลเป็นบวก สีแดงที่เกิดขึ้น เนื่องจากไนไตรท์ที่เกิดขึ้น ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟานิลิค ได้สารประกอบประเภทเกลือไดอะโซเนียม (Diazonium) และเกลือที่ได้นี้จะรวมตัวกับแอลฟาแนพทิลลามีน ทำให้เกิดสีแดงของอะโซดาย (Azodye) ที่ละลายน้ำได้ แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ บางครั้งไนไตรท์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็น

แอมโมเนียอาหารจึงไม่เปลี่ยนสี ดังนั้นจึงต้องใส่ผงสังกะสีลงไปทดสอบ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง เนื่องจากสังกะสีไปดึงออกซิเจนจากไนเตรทให้กลายเป็นไนไตรท์ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้ไนเตรทได้ให้ผลเป็นลบ ถ้าไม่เกิดสีแดง แสดงว่าไนไตรท์เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียหมดจึงให้ผลเป็นบวก

การใช้ซิเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon's citrate agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 14) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ได้แอมโมเนียที่มีสมบัติเป็นเบสทำให้บรอมไทมอลบลูเปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้โซเดียมซิเตรทได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียวเหมือนเดิม

การสร้างเจลาติเนส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบในหลอดอาหารเจลาติน (ภาคผนวก ก ข้อ 15) บ่มที่ 22 °ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็น 30 นาที ทำเปรียบเทียบกับหลอดอาหารที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าหลอดที่ใส่เชื้อสูญเสียสมบัติการแข็งตัว แสดงว่าเชื้อสร้างเจลาติเนสย่อยเจลาตินได้ ให้ผลเป็นบวก

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแข็งทีเอสไอ (TSI agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 16) 2 ครั้งต่อ 1 หลอดอาหาร ครั้งแรกแทงลงไปในอาหารที่เอียงจนสุดหลอด ครั้งที่สองจะลากไปบนผิวหน้าอาหารที่เอียง ปมที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์จะให้สีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่ปลูกเชื้อ อ่านผลเป็นบวก นอกจากนี้อาหารแข็งทีเอสไอ ยังสามารถทดสอบได้ 2 ชนิดคือ ทดสอบการใช้น้ำตาล และทดสอบการเกิดก๊าซ เพราะในอาหารมีน้ำตาล 3 ชนิดคือ กลูโคส 1 ส่วน แลคโตส 10 ส่วน และซูโครส 10 ส่วน มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักได้จะเจริญที่ก้นหลอด แต่ถ้าใช้น้ำตาลในกระบวนการออกซิเดชัน จะมีการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร แบคทีเรีย

ที่ใช้กลูโคสได้อย่างเดียวในกระบวนการหมัก จะทำให้มีกรดเกิดน้อยจึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอด ส่วนที่ผิวจะมีสีแดง ถ้าใช้ซูโครสหรือแลคโตสด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวหน้าอาหารเพราะมีกรดเกิดขึ้นจำนวนมาก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสี แสดงว่าไม่มีการหมัก และถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาลฟองก๊าซจะอยู่ในวุ้นอาหาร

การย่อยสลายโปรตีน

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งนมพร่องไขมัน (Skim milk agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 17) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยโปรตีนได้จะเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ (Gerhardt และคณะ, 1981)

การย่อยสลายแป้ง

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งแป้ง (Starch agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 18) ปมที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูผลการทดลองโดยราดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อที่เจริญแสดงว่าเชื้อย่อยแป้งได้ (Gerhardt และคณะ, 1981)

การย่อยสลายไขมัน

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งทวีน 80 (Tween 80 agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 19) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยสลายไขมันได้จะเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนีเชื้อที่เจริญ (Demspey และ Kitting, 1987)

การตกตะกอนไข่แดง

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเอ็กโยร์ค (Egg yolks agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 20) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

ดูผลการทดลองโดยเชื้อที่ตกตะกอนไข่แดงจะเกิดตะกอนขุ่นขาวรอบโคโลนี และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีแดงเป็นสีชมพู

การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเม็ดเลือดแดง (Blood agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 21) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ดูผลการทดลองโดยเชื้อที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์จะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อแสดงผลเป็น β- haemolysis ถ้าเชื้อย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบางส่วน ผลเป็น α-haemolysis ถ้าเชื้อไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ผลเป็น γ-haemolysis

การสร้างเอนไซม์นิวคลีเอส

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งดีเอ็นเนส (DNase test agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 21) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. หลังจากนั้นนำมาราดด้วย 0.1 N HCl บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. ดูผลการทดลองโดยจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อที่เจริญ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์นิวคลีเอสย่อยดีเอ็นเอได้

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (Phenol red broth base) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 1% (ภาคผนวก ก ข้อ 23) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรด ทำให้อินดิเคเตอร์ฟีนอลเรดในอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0-10% บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่ 4-55 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่พีเอชต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่ปรับพีเอชเป็น 4-12 บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

6. นำ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ และเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน

6.1 การเตรียม *Bacillus* S11 มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก มาเลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 25 นาที นำส่วนเซลล์ที่ปั่นแยกได้มาใช้ในการทดลอง นำเซลล์ *Bacillus* S11 มาผสมอาหารกุ้งโดยใช้อัตราส่วนการผสมเท่ากับ 1:3 คือใช้เซลล์ *Bacillus* S11 1 กรัมต่ออาหารกุ้ง 3 กรัม แบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่มทดลอง (แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ) โดยเตรียมอาหารดังนี้

1. กลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป (ภาคผนวก ก ข้อ 24) โดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11

2. กลุ่มที่ใช้เซลล์ *Bacillus* S11 (Fresh cells) ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำ (ภาคผนวก ก ข้อ 24)

3. กลุ่มที่ใช้เซลล์ *Bacillus* S11 ละลายใน 0.85% NaCl (Fresh cells in NSS) และให้อาหารกุ้งกุลาดำ (ภาคผนวก ก ข้อ 24)

4. กลุ่มที่ใช้เซลล์ *Bacillus* S11 ในรูปผงแห้ง (Lyophilized cells) โดยการทำแช่แข็งและแห้ง (Lyophilization) ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำ (ภาคผนวก ก ข้อ 24)

1186479129

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำ และจำนวน *Bacillus* S11 ที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำในรูปแบบต่างๆ โดยวิธี Total plate counts (cfu/g)

6.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดนครปฐม น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 0.7-0.8 กรัม มาเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 80x74x87 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุน้ำได้ประมาณ 400 ลิตร อัตราการปล่อยกุ้งเท่ากับ 40 ตัวต่อตารางเมตร ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพเพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปตามการทดลองข้อ 6.1 ปริมาณอาหารที่ให้ต่อวันประมาณ 10 % ของน้ำหนักตัว (ภาคผนวก ง) โดยให้อาหารวันละ 3 เวลาคือเวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น. ระบบเลี้ยงกุ้งเป็นระบบหมุนเวียนแบบปิด (Closed recirculating watar system) แบบระบบกรองชีวภาพแยกกับระบบเลี้ยง (Manasveta และคณะ, 1989) เก็บตัวอย่างทุก 21 วัน ศึกษาผลดังนี้

- น้ำหนักกุ้งกุลาดำ (กรัม)
- ความยาวกุ้งกุลาดำ (เซนติเมตร)
- อัตราการรอดชีวิต (ตัว)

ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในอาหารกุ้ง โดยใช้ ANOVA Tast ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ Duncan's multiple ranga tast ระดับนัยสำคัญ 0.05

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยวิธี Total plate counts (cfu/ml)
- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. จากลำตัวกุ้ง โดยวิธี Total plate counts (cfu/g)
- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในทางเดินอาหาร โดยวิธี Total plate counts (cfu/g)
- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในขี้กุ้ง โดยวิธี Total plate counts (cfu/g)

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *Bacillus* S11 ใช้อาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ส่วน *Vibrio* sp. ใช้อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งทุกสัปดาห์ดังนี้

- พีเอช (pH meter)
- อุณหภูมิ (Thermometer)
- ความเค็ม (Salinometer)
- ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO Meter, YSI)
- แอมโมเนียม (Ammonium test Kit บริษัท Merck, Germany)
- ไนไตรท์ (Nitrite test Kit บริษัท Merck, Germany)
- ไนเตรท (Nitrate test Kit บริษัท Merck, Germany)
- ฟอสเฟต (Phosphate test Kit บริษัท Merck, Germany)

6.3 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

เชื้อ *Vibrio harveyi* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้งเครือเจริญโภคภัณฑ์ นำเชื้อ *V. harveyi* มาเลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 28 °ซ เป็นเวลา 18 ชม. เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำมาใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีการแช่ (Immersion challenge) (จันทนา นิธิเมธาโชค, 2539) จำนวน *V. harveyi* ที่ใส่ประมาณ $3.0x10^5$ cfu/ml ลงในบ่อเลี้ยงกุ้ง 4 กลุ่มการทดลอง โดยใช้กุ้งจำนวน 20 ตัวที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 100 วัน นำมาทดสอบเป็น ระยะเวลา 10 วัน (ในวันที่ 7 ของการทดลองได้เติม *V. harveyi* จำนวน 3.0×10^7 cfu/ml) ทุก 2 วันติดตามผลการทดลองดังนี้

- อัตราการรอด (ตัว) ทดสอบอัตราการรอดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้ *Bacillus* S11 ผสมในอาหารกุ้ง โดยใช้ Duncan's multiple range test ระดับนัยสำคัญ 0.05
- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้งโดยวิธี Total plate counts (cfu/ml)
- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ในทางเดินอาหาร โดยวิธี Total plate counts (cfu/g)

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *Bacillus* S11 ใช้อาหารแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ส่วน *V.harveyi* ใช้อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

6.4 การทดสอบหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

หลังจากเหนี่ยวนำกุ้งกุลาดำที่ทดลองด้วย *V. harveyi* จนกุ้งเริ่มอ่อนแอและเริ่มตาย สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งที่ตายมาทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่ากุ้งทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V.harveyi* โดยนำกุ้งทดลองที่ตายมาทำการแยกเชื้อจากทางเดินอาหาร เขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 18 ชม. นำโคโลนีที่ได้มาทำการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อแยกว่าเป็น *V. harveyi* ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำตามการจำแนกใน Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Baumann และ Schubert, 1986) และทดสอบการติดเชื้อภายนอก (External invasive condition) โดยสังเกตเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อ *Vibrio* sp. จะถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง เป็นผลให้มีขนาดเล็กลงและมีสีคล้ำ และจะแสดงอาการคือ กุ้งจะมาเกาะอยู่ตามบริเวณขอบบ่อ อ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร สีของกุ้งจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีฟ้า (พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และคณะ, 2537)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย