อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่าง น้ำจากบ่อเลี้ยงปลานิล ลำไส้และเมือกของปลานิล ในบ่อของสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลานิล *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ AQSA 001

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง
   3.1 Nutrient Agar (NA) และ Nutrient Broth (NB)
   3.2 Plate Count Agar (PCA)
   3.3 Tryptic Soy Broth (TSB) Tryptic Soy Agar (TSA)
   3.4 Todd-Hewitt Broth
   3.5 Brain Heart Infusion Broth (BHIB) และ Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย
   4.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (Centrifuge, Kubota 5800)
   4.2 เครื่อง Spectrophotometer (spectronic 401; Milton Roy)
   4.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
   4.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert รุ่น WB 14)
   4.5 ตู้เขี่ยเชื้อ
   4.6 ตู้บ่มเชื้อ (Sibata รุ่น SAI-600)
   4.7 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
   4.8 กล้องจุลทรรศน์
   4.9 อุปกรณ์ในการบดตัวอย่าง
   4.10 เครื่องแก้วที่จำเป็น เช่น หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แท่งแก้วรูปตัวแอล

5. อุปกรณ์ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

5.1 โหลแก้วรูปทรงกระบอกขนาดความจุปริมาตร 12 ลิตร จำนวน 48 ใบ

5.2 ไฟเบอร์สำหรับพักน้ำขนาดความจุปริมาตร 1,000 ลิตร

5.3 อาหารเม็ดลอยน้ำ

5.4 อุปกรณ์สำหรับให้อากาศ

6. สัตว์ทดลอง

6.1 ปลานิล ขนาดอายุ 21 วัน จำนวน 2,000 ตัว

วิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae*

1.1 การแยกเชื้อและการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่าง

1.1.1 การแยกเชื้อจากน้ำในบ่อเลี้ยงปลา โดยนำตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาที่สถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และเจือจางครั้งละ 10 เท่า (Serial Ten-fold dilution) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี spread plate ในอาหาร PCA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนแบคทีเรียโดยเลือกจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้บนอาหาร PCA มาเขี่ยบนอาหาร NA นำเชื้อที่แยกได้ไปเลี้ยงให้เชื้อมีอายุ 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบและนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซสเซียส

1.1.2 การแยกเชื้อจากลำไส้ โดยผ่าท้องปลานิลเริ่มผ่าจากที่รูเปิดที่ทวารตัดเปิดช่องท้อง และเก็บลำไส้ออกมา ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม นำไปบดโดยใช้เครื่องบด แล้วเติมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1.1.1

1.1.3 การแยกเชื้อจากเมือก โดยทำการขูดเมือกจากตัวปลาแล้วนำไปละลายในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1.1.1

1.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae*

1.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Cross streak technique ตามวิธีของ Kekessy and Piguet (1970)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ในข้อ 1.1 โดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่เตรียมใหม่ ๆ อายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง ในอาหาร NA มาขีดเชื้อในลักษณะให้เป็นเส้นแนวยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อ และขีดเชื้อ *S. agalactiae* (เชื้อทดสอบ) ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค Streptococolosis ในปลานิล ตามแนวขวางกับเชื้อที่นำมาทดสอบ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งที่เกิดขึ้น โดยถ้าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคได้ จะพบว่าแบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคจะไม่สามารถเจริญในบริเวณใกล้แนวการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคไว้ใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

1.2.2 การคัดเลือกโดยวิธี Agar well diffusion techniques ตามวิธีการของ Tagg and Mcgiven (1971)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2.1 ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว BHI บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์โดยนำไปปั่นแหว่งที่ขนาด 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำการเก็บเฉพาะสารละลายส่วนใส กรองผ่านแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อซึ่งมีอนุภาคของรูพรุนขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วทำการเตรียมเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว BHI 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มา spread บนอาหาร BHIA จากนั้นเจาะหลุมด้วย cork borer แล้วดูดส่วนสารละลายใสที่ได้จากขั้นต้นมาหยอดลงหลุม

หลุมละ 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ทำการตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนใสรอบ ๆ หลุมที่หยดสารละลาย

1.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และมีคุณสมบัติเหมาะสมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมาทำการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้รูปร่าง การติดสีแกรม การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Voges Proskauer reaction, H_2S production/TSI, Gelatinase production, Oxidase production, Catalase production, Nitrate reduction/N_2 gas, Urease production, Citrate Utilization, Propionate Utilization, Arginine dihydrolase production, Lecithinase production, Esculin hydrolysis, Starch hydrolysis, Production of acid from Glucose, Manitol, D-Xylose, L-Arabinose และ Trehalose โดยเปรียบเทียบคุณลักษณะจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Clauss, 1986)

1.4 การประเมินขนาดของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยดัดแปลงตามวิธีของ Arun *et al*. (1987); Zheng and Slavik (1999) และ Laemmli (1970)

1.4.1 การประเมินขนาดของโปรตีนโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ที่สุด จากการทดลองข้อที่ 1.2 และ1.3 มาทำการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว BHI บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48-96 ชั่วโมง ทำการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียด้วยวิธี Ammonium sulphate precipitation โดยการนำอาหารที่เลี้ยงเชื้อไปปั่นตกตะกอนที่ 6,000 rpm นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนสารละลายใสนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ (55 เปอร์เซ็นต์ saturation) โดยค่อย ๆ เติมและกวนเบา ๆ ตลอดเวลา ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 9,000 rpm นาน 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนสารละลายใสทิ้งเหลือเฉพาะตะกอนที่ก้นหลอด จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-PAGE โดยใช้ separating gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide 15 เปอร์เซ็นต์ (Invitrogen) โดยนำตะกอนที่ได้เติม 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 อัตราส่วน 1:1 หยดตัวอย่างลงในหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร ใช้

กระแสไฟฟ้า 100 Volt นาน 4 ชั่วโมง ย้อมสีเจลด้วย staining solution (0.2 เปอร์เซ็นต์ Coomassie Brilliant Blue R-250 ที่ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์ methanol และ 7 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) นาน 10 นาที แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (25 เปอร์เซ็นต์ methanol และ 7 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนของตัวอย่างที่พบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (Mark^{TM} 12) คำนวณน้ำหนักโปรตีนของตัวอย่าง โดยดัดแปลงจาก Wilson *et al.* (1983) (โดยการวัดระยะห่างของแถบโปรตีนมาตรฐานแต่ละแถบจากหัว running gel จำนวน 4 เจล ค่าเฉลี่ยที่ได้นำมา plot กราฟ เทียบกับขนาดน้ำหนักโปรตีนมาตรฐานหาน้ำหนักโปรตีนของตัวอย่าง โดยลากเส้นตัดกราฟ)

1.4.2 การทดสอบความสามารถของโปรตีนที่ได้จากวิธี SDS-PAGE ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสารยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม peptide antibiotics ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ราและยีสต์ จะมีขนาดโมเลกุลไม่เกิน 14 kDa (Bodanszky and Perlman, 1964) ทำการทดลองในข้อ 1.4.1 แต่แผ่นเจลไม่ต้องทำการย้อมสี เพื่อป้องกันผลของสีย้อมที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย เลือกขนาดของโปรตีนที่มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 1-14 kDa มาวางบนอาหาร TSA ที่ทำการ spread ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณส่วนรอบ ๆ ส่วนของแผ่นโปรตีนที่วาง หากมีส่วนใสเกิดขึ้นแสดงว่าแผ่นเจลที่มีโปรตีนขนาดดังกล่าวมีสารยับยั้งแบคทีเรียอยู่

2. การศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อปลานิล และศึกษาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เหมาะสมในการทดสอบความคุ้มโรค

2.1 ศึกษาความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อปลานิล

2.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลปลอดโรคขนาดอายุประมาณ 21 วัน มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดปริมาตร 500 ลิตร เพื่อปรับสภาพให้ลูกปลาคุ้นเคยกับสภาพห้องทดลองเป็นเวลา 3-4 วัน ให้อาหารปลาสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง และให้อากาศตลอดระยะเวลาในการปรับสภาพและขณะทดลอง

2.1.2 การเตรียมหน่วยทดลอง

ภายหลังปรับสภาพลูกปลาเป็นเวลา 3-4 วัน แล้วนำลูกปลาจำนวน 20 ตัว ใส่ลงในโหลทรงกระบอกความจุ 12 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดปริมาตร 5 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลา และให้อาหารเม็ดลอยน้ำวันละ 2 ครั้ง เลี้ยงลูกปลาในโหลทดลองเป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพของโหลทดลอง

2.1.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 1.3 ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเลือกเขี่ยโคโลนีเดี่ยวนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงและเก็บตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ไป inoculate ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการประเมินแบคทีเรียที่มีชีวิตใน 1 มิลลิลิตร จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนแบคทีเรียที่นับได้โดยวิธี spread plate ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Tortora *et al*. (1982) ดังต่อไปนี้

1) ทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียที่ได้ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ค่า absorbance ที่ 0.03, 0.06, 0.09, 0.12 และ 0.15 ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2) นำสารละลายแบคทีเรียในแต่ละ absorbance มาเจือจางครั้งละ 10 เท่า (serial ten-fold dilution) ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นจาก 10^{1}-10^{7} cfu/มิลลิลิตร

3) ใช้ไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดสารละลายแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^{4}-10^{7} cfu/มิลลิลิตร ของแต่ละ absorbance หยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วทำการ spread plate ให้ทั่วและทำ 2 ซ้ำในแต่ละ dilution ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละ absorbance ของแต่ละ dilution แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตร

4) นำค่า absorbance ที่ระดับต่าง ๆ และจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร มาหาความสัมพันธ์ในรูปสมการเส้นตรงของลอกการิทึม เพื่อใช้เป็นสมการมาตรฐานในการประมาณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในสภาพที่มีชีวิตใน 1 มิลลิลิตร

5) ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้มีความเข้มข้นเป็น $1x10^8$ cfu/มิลลิลิตร จากสมการมาตรฐานของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่หาได้จากข้อ 4) ในสารละลายน้ำเกลือ ในอัตรา 1:100 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ $1x10^6$ cfu/มิลลิลิตร พร้อมกับทำการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย ด้วยวิธี spread plate เพื่อยืนยันระดับปริมาณของแบคทีเรียก่อนใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1.4 การดำเนินการทดลอง

นำปลานิลทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1.2 มาวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 กลุ่มการทดลอง (treatments) ได้แก่ กลุ่มการทดลองที่ 1 จะเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย และกลุ่มการทดลองที่ 2-4 จะเป็นกลุ่มการทดลองที่ใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ในแต่ละกลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ (replication) ให้อาหารปลาวันละ 2 มื้อ ในช่วง 9.00 น. และ 16.00 น. ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักลูกปลา ให้อากาศและไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดช่วงเวลา 14 วัน การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียจะเตรียมเพียงครั้งเดียวตลอดการทดลองซึ่งเตรียมจากข้อ 2.1.3 ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายตามต้องการ โดยแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุมผลลบ (ไม่ใส่สารละลายแบคทีเรีย)

กลุ่มการทดลองที่ 2 ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^5 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 3 ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 4 ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^7 cfu/มิลลิลิตร

2.2 การศึกษาความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่เหมาะสมในการทดสอบความคุ้มโรค

2.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลปลอดโรคขนาด 21 วัน มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดปริมาตร 500 ลิตร เพื่อปรับสภาพให้ลูกปลาคุ้นเคยกับสภาพห้องทดลองเป็นเวลา 3-4 วัน ให้อาหารปลาสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง และให้อากาศตลอดระยะเวลาในการปรับสภาพและขณะทดลอง

2.2.2 การเตรียมหน่วยทดลอง

ภายหลังปรับสภาพลูกปลาเป็นเวลา 3-4 วัน แล้วนำลูกปลาจำนวน 20 ตัวใส่ลงในโหลทรงกระบอกความจุ 12 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดปริมาตร 5 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลาและให้อาหารเม็ดลอยน้ำวันละ 2 ครั้ง เลี้ยงลูกปลาในโหลทดลองเป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพของโหลทดลอง

2.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเลือกเขี่ยโคโลนีเดี่ยวนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นแหว่งและเก็บตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ไป inoculate ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการประเมินแบคทีเรียที่มีชีวิตใน 1 มิลลิลิตร จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนแบคทีเรียที่นับได้โดยวิธี spread plate ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Tortora *et al*. (1982) ดังต่อไปนี้

1) ทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียที่ได้ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ค่า absorbance ที่ 0.03, 0.06, 0.09 และ 0.10 ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

2) นำสารละลายแบคทีเรียในแต่ละ absorbance มาเจือจางครั้งละ 10 เท่า (serial ten-fold dilution) ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นจาก 10^{1}-10^{7} cfu/มิลลิลิตร

3) ใช้ไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดสารละลายแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^{4}-10^{7} cfu/มิลลิลิตร ของแต่ละ absorbance หยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA แล้วทำการ spread plate ให้ทั่วและทำ 2 ซ้ำในแต่ละ dilution ทำการ spread สารละลายแบคทีเรียให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้งแล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละ absorbance ของแต่ละ dilution แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตร

4) นำค่า absorbance ที่ระดับต่าง ๆ และจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร มาหาความสัมพันธ์ในรูปสมการเส้นตรงของลอกการิทึม เพื่อใช้เป็นสมการมาตรฐานในการประมาณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในสภาพที่มีชีวิตใน 1 มิลลิลิตร

5) ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้มีความเข้มข้นเป็น $1x10^{8}$ cfu/มิลลิลิตร จากสมการมาตรฐานของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่หาได้จากข้อ 4) ในสารละลายน้ำเกลือ ในอัตรา 1:100 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ $1x10^{6}$ cfu/มิลลิลิตร พร้อมกับทำการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรีย ด้วยวิธี spread plate เพื่อยืนยันระดับปริมาณของแบคทีเรียก่อนใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2.4 การดำเนินการทดลอง

เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลานิลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หรือใกล้เคียงโดยไม่ทำให้ปลาตายอย่างเฉียบพลัน โดยก่อนการทดลองจะงดอาหารปลาที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้สารละลายแบคทีเรียใส่ในโหลทดลอง โดยกลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มที่ไม่มีการใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นตัวชี้วัดความเหมาะสมของสภาพการเลี้ยงตลอดช่วง 7 วัน และกลุ่มการ

ทดลองที่ 2-6 เป็นกลุ่มที่ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยแบ่งระดับของความเข้มข้นสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ใส่เป็น 5 ระดับคือ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 cfu/มิลลิลิตร โดยแต่ละระดับมี 3 ซ้ำ ระหว่างนี้ทำการให้อาหารวันละ 2 มื้อ ในช่วง 9.00 น. และ 16.00 น. ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักลูกปลา แล้วทำการสังเกตลักษณะการตายและทำการบันทึกอัตราการตายทุกวัน แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปจัดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อไป โดยในการทดลองนี้สามารถแบ่งกลุ่มการทดลองเป็นดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุมผลลบ (ไม่ใส่สารละลายแบคทีเรีย)

กลุ่มการทดลองที่ 2 ใส่สารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^5 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 3 ใส่สารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 4 ใส่สารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^7 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 5ใส่สารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^8 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 6ใส่สารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^9 cfu/มิลลิลิตร

3. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลภายใต้สภาพห้องทดลอง

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลปลอดโรคขนาด 21 วัน มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดปริมาตร 500 ลิตร เพื่อปรับสภาพให้ลูกปลาคุ้นเคยกับสภาพห้องทดลองเป็นเวลา 3-4 วัน ให้อาหารปลาสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง และให้อากาศตลอดระยะเวลาในการปรับสภาพและขณะทดลอง

3.2 การเตรียมหน่วยทดลอง

ภายหลังปรับสภาพลูกปลาเป็นเวลา 3-4 วัน แล้วนำลูกปลาจำนวน 20 ตัวใส่ลงในโหลทรงกระบอกความจุ 12 ลิตร ที่บรรจุน้ำจืดปริมาตร 5 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลาและให้อาหารเม็ดลอยน้ำวันละ 2 ครั้ง เลี้ยงลูกปลาในโหลทดลองเป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้คุ้นเคยกับสภาพของโหลทดลอง

3.3 การดำเนินการทดลอง

นำปลานิลทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 มาวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 5 กลุ่มการทดลอง (treatments) ได้แก่ กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารละลายของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นกลุ่มชี้วัดความเหมาะสมของสภาพการเลี้ยงตลอดระยะเวลา 14 วัน กลุ่มการทดลองที่ 2-4 เป็นกลุ่มการทดลองที่มีการใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ร่วมกับสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 2 และกลุ่มการทดลองที่ 5 เป็นกลุ่มที่ใส่เฉพาะสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เพียงชนิดเดียว เพื่อเป็นการชี้ให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีการใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย (positive control) ในแต่ละกลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ ให้อาหารวันละ 2 มื้อ ในช่วง 9.00 น. และ 16.00 น. ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักลูกปลาและให้อากาศตลอด ช่วงเวลา 14 วัน โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็นดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุมผลลบ (ไม่ใส่สารละลายแบคทีเรีย)

กลุ่มการทดลองที่ 2 ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^5 cfu/มิลลิลิตร และสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 3 ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร และสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 4 ใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^7 cfu/มิลลิลิตร และสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 5 กลุ่มควบคุมผลบวกใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 cfu/มิลลิลิตร โดยไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variane) ของอัตราการตายของปลานิลในแต่ละกลุ่มการทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการตายของลูกปลานิลในแต่ละกลุ่มการทดลอง ด้วยวิธี Duncan’s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

5. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองนี้เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2550