บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกราม

3.1.1 การรวบรวมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกราม

การรวบรวมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก จากหน่วยงานราชการในกรมประมงเขตพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี จังหวัดสุรินทร์ ที่มีรายงานการก่อโรค และจากแหล่งอื่นๆ เดือนละครั้ง ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถรวบรวมเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างได้ จาก 3 แหล่งดังกล่าวข้างต้น แยกเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่พบว่าป่วยเป็นโรคเรืองแสง แห่งละ 10 ตัว รวม 30 ตัว ทำการกำจัดเชื้อแบคทีเรียภายนอกโดยการจุ่มตัวอย่างในเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 1-2 ครั้ง ล้างในน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นทำการแยกเชื้อจากตับและตับอ่อน หรืออวัยวะบริเวณอื่นที่พบการเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar (Pronandisa, Spain) นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้เพื่อทำการศึกษาต่อไป เชื้อ *Vibrio* ที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ คือ *V. cholerae* R1 สายพันธุ์แยกจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon)* โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน ห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ *V. harveyi* ATCC 14126 จาก Prof. Dr. Kishio Hatai, Fish Diseases Laboratory, Nippon Veterinary and Animal Science University ประเทศญี่ปุ่น

3.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้นจากสถานที่เก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง จะทำการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำเบื้องต้นจากโรงเพาะฟักทุกครั้ง ตามวิธีของ APHA et al. (1992) โดยเก็บตัวอย่างน้ำ 3 จุด ของทุกโรงเพาะฟักที่เก็บตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดเป็นด่างอุณหภูมิ ความเป็นด่าง ความเค็มและ ปริมาณแอมโมเนียในน้ำ

3.1.3 การศึกษาชนิดของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง จะศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) ดังนี้

1) การทดสอบคุณสมบัติการติดสีย้อม Gram stain

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบน marine agar (MA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสไลด์แก้ว โดยหยดน้ำกลั่น ประมาณ 1 หยด เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย ที่ต้องการทดสอบ มากระจายบนหยดน้ำ ทิ้งให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง Fix ตัวอย่างด้วยความร้อน ผ่านสไลด์บนเปลวไฟให้พออุ่น นำไปย้อมสีแกรม และอ่านผลโดยส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์ (x100) โดยแยกเป็นแกรมบวกจะติดสีม่วง ส่วนแกรมลบจะติดสีแดง

2) การตรวจสอบหาเอนไซม์ oxidase

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบน MA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาทดสอบ oxidase ซึ่งเป็นการตรวจหาเอนไซม์ cytochrome oxidase ของเชื้อแบคทีเรีย โดยสารที่ใช้ทดสอบคือ oxidase test kit (Nissui) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ หยดน้ำลงบนวางกระดาษ oxidest test kit แล้วเขี่ยเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนกระดาษ test kit สังเกตผลที่เกิดขึ้นภายใน 10 วินาที โดยการทดสอบเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วง ภายในเวลา 5-10 วินาที จะให้ผลเป็นบวก หากเชื้อไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน โดยเวลานานกว่า 10 วินาที ให้ผลเป็นลบ

3) การทดสอบหาเอนไซม์ catalase

เอนไซม์ Catalase ซึ่งเป็นตัวเร่งการปล่อยออกซิเจนจาก hydrogen peroxide (H_2O_2) ดังสมการ การทดสอบกระทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบน marine agar ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + 2O_2$$

จากนั้นเขี่ยเชื้อแล้วนำมาใส่ลงในหลอดทดลองที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการเกิดฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในทันที ผลเป็นบวก เมื่อเกิดฟองก๊าซหลังจากใส่เชื้อลงไปหากไม่เกิดฟองก๊าซผลเป็นลบ (นนทวิทย์, 2537)

4) การทดสอบเชื้อด้วย API 20 NE และ API 20 E

API 20 NE เป็นชุดทดสอบที่ใช้ในการแยกชนิดแบคทีเรียแกรมลบที่เป็น non-fastidious และ non-enteric bacteria เช่น *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Vibrio, Aeromonas* ลักษณะเป็นชุดทดสอบ 20 ลักษณะภายใน Kit บรรจุด้วย substrates ที่แห้งสำหรับใช้ทดสอบ (O'Hara, 2005) เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามนำมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปั่นล้างเซลล์ 3 ครั้ง แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 NE (Biomerieux, France) และ API 20E (Biomerieux, France) ตามวิธีการที่กำหนดโดยบริษัทผู้ผลิต

5) การทดสอบความไวของเชื้อต่อ vibriostat agent 0/129

การทดสอบกับ vibriostat agent 0/129 ใช้วิธี Disc agar diffusion test ของ Cappuccino and Sherman (1992) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นล้างเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง จากนั้นทำการกระจายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar จนทั่ว วางแผ่น vibriostat agent 0/129 test kit ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้น บันทึกผล

3.2 การศึกษา homogeneity ของเชื้อที่แยกได้ โดยการทำ DNA-DNA hybridization

การทำประยุกต์จากวิธีการของ Kawamura et al. (1998) สำหรับการสกัด DNA จะประยุกต์มาจากวิธีการของ Darbre (1999) และสิรินดา (2541) genomic DNA สายเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ คือ unlabeled DNA สายเดี่ยวซึ่งถูกยึดไว้ที่ผิวของ microdilution wells จะถูก hybridization ด้วย biotinylated DNA ของแบคทีเรียที่ทราบชนิด จากนั้นจะตรวจหา biotinylated DNA โดย fluorogenic substrate และค่า homology values จะพิจารณาจาก fluorometric direct binding method

3.2.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง นำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Difco) ผสมน้ำทะเลสังเคราะห์ความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่น ล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วย TNE buffer เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส ได้โดยใช้ TNE buffer ปริมาตร 300-400 ไมโครลิตร จากนั้นเติม extraction buffer (SDS) โดยแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที เติม SDS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร Proteinase K ปริมาตร 6 ไมโครลิตร RNAase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตามลำดับ แช่ใน water bath 55 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 วินาที ดูดส่วนล่างทิ้ง ทำซ้ำอีกสองครั้ง ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 วินาที ดูดเอาเฉพาะส่วนบน ใส่ในหลอดใหม่ absolute ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของของเหลว เขย่าและสังเกตการตกตะกอนของ DNA จะเห็นเป็นเส้นใยขาวๆ เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้น นำไปปั่นแยก 1-2 นาที ดูดสารละลายออก เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนตะกอนเพื่อกระจายส่วน DNA บน rack หรือดีดด้วยนิ้ว จากนั้น ปั่นแยก 1 นาที เทส่วนบนออก wrap กันฝุ่น และนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ เติม TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือ เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA โดยการเจือจาง DNA 1/50 เท่านำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV spectrum) ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น (V530, Japan) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณ DNA โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ครั้งหนึ่ง และ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยที่ค่าการดูดกลืนแสงนั้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของ DNA ที่อยู่ในสารละลาย โดยมีค่ามาตรฐานดังนี้ คือในสารละลาย 1 OD_{260} (optical density) 1 Unit เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถนำไปประยุกต์หาความเข้มข้นของ DNA ได้คือ ความเข้มข้นของ DNA สายคู่ในสารละลาย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ A_{260} x 50 x dilution factor นอกจากนี้ทำการหาค่าความบริสุทธิ์ของ DNA ก่อนโดยนำ DNA ที่เจือจางแล้ว

มาหาค่าสัดส่วนระหว่างค่า A_{260} และค่า A_{280} โดยมีมาตรฐานกำหนดว่า ค่าสัดส่วน A_{260} / A_{280} อยู่ระหว่าง 1.65-1.85 จะสามารถบ่งชี้ได้ว่าสาย DNA คู่นั้นมีความบริสุทธิ์มีคุณภาพดีนำไปใช้งานได้ ค่าสัดส่วน A_{260} / A_{280} มีค่ามากกว่า 1.85 สามารถบ่งชี้ได้ว่าสาย DNA คู่นั้น มี RNA ปนเปื้อนอยู่ แต่ยังสามารถนำไปใช้ได้ และค่าสัดส่วน A_{260} / A_{280} มีค่าน้อยกว่า 1.65 สามารถบ่งชี้ได้ว่าสาย DNA นั้น มีโปรตีนและสารละลาย Phenol ละลายอยู่ ควรมีการทำความสะอาดก่อน

3.2.2 วิธีการทำ DNA-DNA hybridization

การเตรียม DNA สำหรับ DNA-DNA hybridization นำสารละลาย DNA มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ด้วย TE buffer นำไปอุ่นที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นรีบทำให้เย็นลงบนน้ำแข็ง เจือจางด้วยสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใน 10 mM PBS buffer โดยเจือจาง 10 เท่า โดยใช้สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ปริมาตร 630 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DNA ลงใน microtiter plate ก้นแบน (96 หลุม) หลุมละ 100 ไมโครลิตรโดยวางไว้บนน้ำแข็ง

การเตรียม DNA probe โดยนำสารละลาย DNA ที่วัดค่าได้เสร็จแล้ว มาเจือจางให้เป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมดเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วย TE buffer เติม photobiotin ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไม่ให้โดนแสง ต้องทำในที่มืดและเย็น วางใต้หลอดไฟกำลังไฟ 500 วัตต์ ระยะห่าง 15 เซนติเมตร บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที เติม Tris-HCl (pH 9.5) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้ดี เติม n-buthyl alcohol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixter ปั่นแยก 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 วินาที เท butanol ออก นำไปอุ่นที่ 100 องศาเซลเซียส 5 นาทีใน water bath จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ที่ 4 องศาเซลเซียส บนน้ำแข็ง เติม 0.3 เปอร์เซ็นต์ Dextran sulfate ในสารละลาย prehybridization solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย DNA

การทำ prehybridization โดยนำ microtiter plate ก้นแบน (96 หลุม) มาล้างที่ 30 องศาเซลเซียส ตลอดคืนด้วย 10 mM สารละลาย PBS ปริมาตร 400 ไมโครลิตร 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย prehybridization solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เติม Biotinylated DNA probe ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตามแนวนอน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 1xSSC 3 ครั้ง (400 ไมโครลิตร) เตรียม Streptoavidin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใน PBS ปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ลงในแต่ละหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร เว้นหลุมในแถวที่ 1 ไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 1xSSC 2-3 ครั้ง เตรียม diethanol amine buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ทำการเจือจาง 5 เท่า ด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร และใส่ p-NPP 6 เม็ด จากนั้นหยดใส่ใน microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 35 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย plate reader รุ่น (GDV Programnable MPT Reader DV 990 BV6) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

3.3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อ

3.3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงที่รวบรวมได้ มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Difco) ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาปั่นแยกที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเชื้อที่ได้ไป ล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีเชื้อประมาณ $1.0x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิตร นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร BHIB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกหลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 0-40 องศาเซลเซียส โดยต่างกัน 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ละระดับอุณหภูมิทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ (optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และในกรณีที่เชื้อไม่เจริญในหลอดทดลองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า จะนำไปทดสอบว่าเชื้อมีชีวิตอยู่หรือไม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA ที่เตรียมในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อยืนยันผล

3.3.2 การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญของเชื้อ

การเตรียมเชื้อสำหรับทดลองเหมือนกับข้อ 3.3.1 แต่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ละชุดการทดลองให้มีระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างภายในหลอดทดลองเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 N และโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 0.1 N เป็นตัวปรับระดับ pH กลุ่มควบคุมจะไม่ใส่สารเคมีทุกค่าของความเป็นกรดเป็นด่างใส่เชื้อที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารที่เตรียมไว้โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เท่ากันทุกหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง โดยแต่ละระดับความเป็นกรดเป็นด่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไป

วัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และในกรณีที่เชื้อไม่เจริญในหลอดทดลองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า จะนำไปทดสอบว่าเชื้อมีชีวิตอยู่หรือไม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA เพื่อยืนยันผล

3.3.3 การศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของเชื้อ

การเตรียมเชื้อสำหรับทดลองเหมือนกับข้อ 3.3.1 แต่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเค็ม 0, 10, 20, 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน ใส่เชื้อลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเท่ากันทุกหลอดโดยแต่ละระดับความเค็มทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และในกรณีที่เชื้อไม่เจริญในหลอดทดลองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า จะนำไปทดสอบว่าเชื้อมีชีวิตอยู่หรือไม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA เพื่อยืนยันผล

3.3.4 การศึกษาผลของแอมโมเนียต่อการเจริญของเชื้อ

การเตรียมเชื้อสำหรับทดลองเหมือนกับข้อ 3.3.1 จากการวิเคราะห์ข้อมูลคุณภาพน้ำเบื้องต้นในช่วงการเก็บตัวอย่างจึงทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีแอมโมเนีย 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแต่ละระดับแตกต่างกัน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหารที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เท่ากันทุกหลอด โดยแต่ละระดับปริมาณแอมโมเนียทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และในกรณีที่เชื้อไม่เจริญในหลอดทดลองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า จะนำไปทดสอบว่าเชื้อมีชีวิตอยู่หรือไม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA เพื่อยืนยันผล

3.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะใช้วิธี Disc agar diffusion test ของ Cappuccino and Sherman (1992) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง จากนั้นทำการกระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar จนทั่ววางแผ่น sensitivity disc ของยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบ จำนวน 15 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

ของ clear zone ที่เกิดขึ้น บันทึกผล ทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลมาตรฐานของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด

ตารางที่ 5 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษา

ยาปฏิชีวนะ	อักษรย่อ	ปริมาณที่ใช้ (ไมโครกรัม)
Amoxycillin	AML	10
Ampicillin	AP	10
Cloxacillin	CN	10
Doxycycline	DO	30
Erythomycin	E	15
Kanamycin	K	15
Neomycin	N	30
Norfloxacin	NOR	10
Oxolinic acid	OA	2
Oxytetracycline	OT	30
Penicillin	P	10
Polymyxin B	PB	300
Streptomycin	S	300
Sulfametoxazol-trimethoprim	S	10
Tetracycline	TE	30

3.5 การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ

3.5.1 การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในลูกกุ้งก้ามกราม

การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในลูกกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการแช่ (immersion technique) ทดสอบในลูกกุ้งจะใช้วิธีการแช่โดยเลือกเชื้อมา 1 สายพันธุ์ จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการรวบรวมเชื้อ เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ผสมน้ำทะเลสังเคราะห์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้โหลแก้วทดลอง ขนาดความจุ 2 ลิตร จำนวน 15 ใบ แบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ แต่ละโหลใส่น้ำที่ผสมน้ำทะเลเทียมความเค็ม 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโหลละ 1 ลิตร เติมเชื้อที่ต้องการทดสอบ แต่ละกลุ่มมีความเข้มข้น $1.0x10^5$, $1.0x10^6$, $1.0x10^7$, $1.0x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนอีกกลุ่มการทดลองเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นใส่กุ้งก้ามกรามอายุ 21 วัน ในโหล 30 ตัวต่อลิตร พร้อมให้อากาศตลอดเวลา อาหารที่ให้เป็นอาทีเมียร์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกการตายที่เกิดขึ้นภายใน 96 ชั่วโมง ในทุกระดับความเข้มข้น นำไปคำนวณหาค่า LC_{50} ตามวิธีของ (Reed Muench, 1983) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการตรวจสอบเชื้อที่อยู่ในน้ำ พร้อมกับสุ่มตัวอย่างลูกกุ้ง เพื่อตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของการตาย นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT (Duncan's New Mutiple Range Test) ด้วยโปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2544) เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเชื้อแต่ละระดับความเข้มข้น โดยหาจากเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5.2 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในลูกกุ้งก้ามกราม

การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ ทดสอบในลูกกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการแช่ (immersion technique) เลือกเชื้อมา 4 สายพันธุ์ จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการรวบรวมเชื้อเลือกสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตดีที่สุดของแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *V. cholerae* KKU 46001, *V. parahaemolyticus* KKU 47015, *V. mimicus* KKU 46010 และสายพันธุ์เปรียบเทียบ *V. harveyi* ATCC 14126 เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ผสมน้ำทะเลสังเคราะห์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีใช้โหลแก้วทดลอง ขนาดความจุ 2 ลิตร จำนวน 15 ใบ โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ แต่ละโหลใส่น้ำที่ผสมน้ำทะเลเทียมความเค็ม 1.5

เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโหลละ 1 ลิตร โดยเลือกเอาระดับความเข้มข้นที่เท่ากันซึ่งอาจมากกว่า หรือเท่ากับ LC_{50}ที่ได้ คือ ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ $1.0x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนกลุ่มควบคุมใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเท่ากับทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง จากนั้นใส่กุ้งก้ามกรามอายุ 21 วัน ในโหล 30 ตัวต่อลิตร บันทึกการตายที่เกิดขึ้นภายใน 96 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของการตายนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT (Duncan's New Mutiple Range Test) ด้วยโปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2544) เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์โดยหาจากเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม

การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในพ่อแม่กุ้งก้ามกรามโดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อเลือกเชื้อมา 4 สายพันธุ์ จากการข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการรวบรวมเชื้อโดยเลือกสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตดีที่สุดของแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *V. cholerae* KKU 46001, *V. parahaemolyticus* KKU 47015, *V. mimicus* KKU 46010 และสายพันธุ์เปรียบเทียบ *V. harveyi* ATCC 14126 เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHIB ผสมน้ำทะเลสังเคราะห์เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เตรียมพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามขนาด 50-60 กรัม จำนวน 450 ตัว โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ จำนวนซ้ำละ 30 ตัว ในถังที่จุน้ำ 20 ลิตร พร้อมให้อากาศตลอดเวลา ฉีดเชื้อที่ต้องการทดสอบในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่เตรียมไว้ โดยเลือกเอาระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ $1.0x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ฉีดเชื้อเข้าบริเวณกล้ามเนื้อข้างลำตัวกุ้งปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรต่อตัว ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเท่ากับกลุ่มที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ บันทึกการตายที่เกิดขึ้นภายใน 96 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของการตาย นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT (Duncan's New Mutiple Range Test) ด้วยโปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2544) เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์โดยหาจากเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์