บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

3.1.1 *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะแสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก

3.2.1 Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS) (HIMEDIA, India)

3.2.2 Trypticase soy broth (TSB) + NaCl 2 เปอร์เซ็นต์

3.2.3 Trypticase soy broth (TSB) + NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ และGlycerol 15 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 Nutrient agar (NA) (HIMEDIA, India)

3.2.5 Nutrient broth (NB) (HIMEDIA, India)

3.2.6 Minimal medium (MM)

สารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

สารเคมีใช้ในงานวิจัยนี้จะแสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข

3.3.1 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Alcohol)

3.3.2 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Alcohol)

3.3.3 อะกาโรสเจล (Agarose Gel)

3.3.4 เดทตอล (Dettol)

3.3.5 Taq 2x Master mix (Apsalagen, Korea)

3.3.6 TAE Buffer (1x)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3.7 RedSafe (iNtRON, Korea)

3.3.8 100 bp DNA Ladder (GenedireX, USA)

3.3.9 โซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (NaCl 1.5%)

3.3.10 โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (NaCl 0.85%)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ

3.4.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.4.1.2 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.4.1.3 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven)

3.4.1.4 เครื่องชั่งดิจิตอล (Analytical Balance)

3.4.1.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.4.1.6. ไมโครเวฟ (Microwave)

3.4.1.7 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.4.1.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater)

3.4.1.9 เครื่องปั่นผสม (Vortex)

3.4.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.4.1.11 เครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส (Electrophoresis)

3.4.1.12 ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Deep freeze)

3.4.1.13 เครื่องยูวี (UV-transluminator)

3.4.1.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

อุปกรณ์

3.4.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

3.4.2.2 หลอดเซนติฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.4.2.3 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) ขนาด 2-10, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

3.4.2.4 หลอดเก็บเชื้อ (Cryovials)

3.4.2.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.4.2.6 บีกเกอร์ (Beaker)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4.2.7 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

3.4.2.8 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.4.2.9 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)

3.4.2.10 ปากคีบ (Forcep)

3.4.2.11 ไม้บรรทัด (Ruler)

3.4.2.12 เม็ดลูกแก้ว (Gas beads)

3.4.2.13 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

3.4.2.14 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.4.2.15 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.4.2.16 กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminum foil)

3.4.2.17 พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.4.2.18 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)

3.4.2.19 ปั๊มออกซิเจน (Oxygen pump)

3.4.2.20 ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.4.2.21 คิวเวต (Cuvette)

3.4.2.22 ถัง (Tank) ขนาด 15 ลิตร

3.4.2.23 หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (1.5 ml microcentrifuge tube)

วิธีดำเนินงานวิจัย

การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1

นำจุลินทรีย์ 3 ชนิด *B. subtilis, B. megaterium และ B. licheniformis* ต่อเชื้อลงใน Slant (NA) บ่มอุณหภูมิ 35-40°C นาน 12-24 ชม. จากนั้นทำเป็น Starter โดยการขูดเชื้อมาเต็ม Loop ลงใน NB ที่เตรียมไว้ 40 ml ที่มี Magnetic bar กวนด้วย Magnetic Stirrer นาน 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ที่เปิดแอร์) จะได้เป็นเชื้อ Starter ทำการขยายเชื้อในอาหาร Minimal Medium (MM) โดยการเติม Starter แต่ละเชื้อ 40 ml ลงในอาหาร MM (4 ลิตร) เลี้ยงจุลินทรีย์ต่อไปประมาณ 36-72 ชม. (กวนด้วย Magnetic Stirrer) ตลอดเวลาหรือให้อากาศโดยใช้แอร์ปั๊ม จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ชนิดน้ำ จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนเชื้อตั้งต้นด้วยวิธีการหาปริมาณแบคทีเรียรวม (total plate count) ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

การศึกษาชนิดของน้ำและอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการขยายหัวเชื้อให้เพิ่มจำนวนได้สูงสุด และหาความแตกต่างระหว่างการใช้น้ำตาลทรายหรือกากน้ำตาลเป็นส่วนผสมในการขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 รวมทั้งศึกษาชนิดของน้ำที่เหมาะสมในการนำมาขยายเพื่อให้ได้ปริมาณ *Bacillus* (เชื้อจุลินทรีย์ ปม.1) มากที่สุดและมีเชื้อ *Vibrio* (สาเหตุของโรค) ปนเปื้อนน้อยที่สุด โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ดังนี้

ตารางที่ 3.1 ชนิดของน้ำ อาหาร และน้ำตาลที่ใช้การทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2
1.1 น้ำจืด + อาหารกุ้ง+น้ำตาลทราย	2.1 น้ำจืด + อาหารกุ้ง+กากน้ำตาล
1.2 น้ำทะเล+อาหารกุ้ง+น้ำตาลทราย	2.2 น้ำทะเล+อาหารกุ้ง+กากน้ำตาล
1.3 น้ำทะเลฆ่าเชื้อ+อาหารกุ้ง+น้ำตาลทราย	2.3น้ำทะเลฆ่าเชื้อ+อาหารกุ้ง+กากน้ำตาล
1.4 น้ำบ่อเลี้ยงกุ้งฆ่าเชื้อ+อาหารกุ้ง+น้ำตาลทราย	2.4 น้ำบ่อเลี้ยงกุ้งฆ่าเชื้อ+อาหารกุ้ง+กากน้ำตาล
1.5 น้ำบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ฆ่าเชื้อ+อาหารกุ้ง+น้ำตาลทราย	2.5 น้ำบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ฆ่าเชื้อ+อาหารกุ้ง+กากน้ำตาล

ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ชนิดน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำตาลทราย หรือ กากน้ำตาล 50 กรัม หรือ 50 มิลลิลิตร อาหารกุ้ง 50 กรัม นำส่วนผสมทั้งหมดคลุกเคล้าให้เข้ากัน เทลงในน้ำที่เตรียมไว้ในแต่ละถังจำนวน 20 ลิตร โดยในแต่ละชุดการทดลอง จะทำการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยให้อากาศเบา ๆ ปิดฝาถังให้มิดชิด และดำเนินการเก็บตัวอย่าง ศึกษาปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* โดยใช้อาหาร MYP (Mannitol-egg yolk polymyxin-B Agar และศึกษาปริมาณวิบริโอรวมโดยใช้อาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar) ปริมาณแบคทีเรียรวมโดยใช้ อาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) ก่อนการทดลองและหลังการทดลองที่ 3, 6, 12, 24, 23, 48, 60, 72 ชม. และ 7 วัน ด้วยเทคนิค total plate count

การเตรียมอาหารกุ้งที่ผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1

การเตรียมอาหารเพื่อที่จะให้สำหรับกุ้งนั้นจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ (ปม.1) กับเชื้อจุลินทรีย์ *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำหรือสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (broth) โดยที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 10^7 CFU/ml อย่างละ 1 ช้อนชา (5 มิลลิลิตร) จากนั้นนำอาหารกุ้งไซส์ขนาดเล็กมา 2 ช้อนชา (10 มิลลิลิตร) ทำการคลุกเคล้าแยกกันอย่าให้มีการเปียกมาก เพราะจะทำให้เป็นก้อนได้ยาก ผึ่งอาหารในถาด ส่วนกลุ่มชุดควบคุมจะให้อาหารกุ้งที่ไม่ได้ผสมเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ เลย

การให้อาหารสำหรับกุ้งจะให้จำนวนประมาณ 2 ช้อนชา ต่อถัง โดยจะให้ตอนเช้า กลางวัน และตอนเย็น ส่วนตอนค่ำจะไม่มีการให้ เนื่องจากกุ้งจะมีการกินอาหารไม่หมด อาจทำให้เกิดน้ำเสียส่งผลต่อกุ้ง 70-80 เปอร์เซ็นต์ กุ้งมีความสามารถในการกินซากตะกอนหรือส่วนที่เหลือจากตอนเย็นได้ดี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง

การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียก่อโรคเพื่อติดเชื้อในกุ้ง

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (หน่วยตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบสัตว์น้ำ) ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND (มีการสร้าง toxin) ในการทำวิจัยครั้งนี้ โดยนำโคโลนีของเชื้อดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จำนวน 1-5 เพลท ขึ้นไป บ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่อายุ 24-48 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จำนวน 1 loop มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ที่มีการเติม NaCl 2% ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนทั้งหมด 10 ฟลาส จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ได้บ่มเขย่าไว้จำนวน 10 ฟลาส มารวมใส่ในขวดดูแรนขนาด 1,000 มิลลิลิตร ในขวดเดียวกัน แล้วทำการเจือจางจนถึง 10^{-3} เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (OD_{540nm}) โดยกำหนดให้ 1 OD_{540nm} มีค่าเท่ากับจำนวนเชื้อ 10^9 CFU/ml แล้วทำการคำนวณปริมาณเชื้อที่จะใช้ในการติดเชื้อในกุ้งให้ได้ 10^8 CFU/ml (infective dose) ตามวิธีการของ Khimmakthong & Sukkarun (2017 : 107-112)

จากนั้นทำการทดสอบการมีชีวิตของเชื้อด้วยวิธี total plate count โดยทำการดูดสารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* มาทำการเจือจางที่ 10^{-3}–10^{-6} จากนั้นทำการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS อย่างละ 3-5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วทำการคำนวนปริมาณเชื้อที่มีชีวิตในหน่วย CFU/ml

สารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เหลือจะแบ่งใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เพื่อนำไปสกัด DNA และทำการตรวจสอบด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค AHPND ได้ ตามวิธีการดังจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ ปม.1 ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในกรณีลูกกุ้งมีการติดเชื้ออยู่ก่อน แล้วจึงได้รับอาหารผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ปม.1)

การติดเชื้อในกุ้งและการให้อาหาร

ทำการติดเชื้อในกุ้งด้วยการนำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ Post larvae 21 (PL21) จำนวน 300 ตัว แช่ในถังที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* 10^8 CFU/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากทำการติดเชื้อแล้ว นำกุ้งไปใส่ในถังใหม่ที่มีน้ำทะเลสะอาด เพื่อล้างตัวกุ้ง กุ้งจะถูกแยกใส่ถังที่มีน้ำทะเลปริมาตร 75 ลิตร ความเค็ม 23 ppt และมีการให้อากาศ จำนวนทั้งหมด 5 ถัง (จำนวนกุ้ง 60 ตัวต่อ

ถัง) โดยมีถังที่ 6 คือกุ้งที่ไม่ติดเชื้ออีกจำนวน 60 ตัว ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไป มีการให้อากาศตลอดเวลา และมีการให้อาหารที่มีการผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ทุกวัน โดยแต่ละถังจะให้อาหารดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การให้อาหารของกุ้งในแต่ละถัง

ถังที่	อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง
1	กุ้งติดเชื้อและเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ เป็นชุดควบคุม (Control)
2	กุ้งติดเชื้อและเลี้ยงด้วยอาหารผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ปม.1)
3	กุ้งติดเชื้อและเลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* (BS)
4	กุ้งติดเชื้อและเลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* (BL)
5	กุ้งติดเชื้อและเลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. megaterium* (BM)
6	กุ้งไม่ติดเชื้อ (uninfected) และเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ

ทำการบันทึกวันที่กุ้งมีการตายและจำนวนที่ตายเพื่อประเมินอัตราการรอดชีวิต โดยทำการคำนวณจาก

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\% survival)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมด}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งที่ตายระหว่างการทดลองเกิดจากการติดเชื้อก่อโรค AHPND จริง จึงนำซากกุ้งที่ตายมาตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี PCR ดังวิธีการในหัวข้อการตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบเฉียบพลันด้วยวิธี PCR

การยุติการทดลอง

ทำการยุติการทดลองเมื่อจำนวนกุ้งในกลุ่มทดลองกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งมีการตายมากกว่าร้อยละ 50 โดยยุติการทดลองด้วยการนับจำนวนกุ้งที่เหลือรอดชีวิตทั้งหมดในแต่ละถัง แล้วจับกุ้งทั้งหมดใส่ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ที่มีน้ำของแต่ละถัง มัดด้วยหนังยาง และไม่มีการให้อากาศ

การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้ง

นำกุ้งที่ตายหลังจากการยุติการทดลอง ซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู แล้วทำการชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการผ่าแยกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ตับ กล้ามเนื้อกุ้ง ลำไส้ แล้วนำเนื้อเยื่อเหล่านี้ มาทำการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรค AHPND ด้วยวิธี PCR

ภาพที่ 3.1 การติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งที่ทำการทดลอง

การตรวจหาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบเฉียบพลันด้วยวิธี PCR

การสกัด DNA

กรณีที่กุ้งตายระหว่างทำการทดลอง

จะสกัด DNA โดยนำซากกุ้งที่ตายมาล้างด้วย 1.5% NaCl ซับด้วยกระดาษทิชชูที่ปลอดเชื้อ คีบตับ และกล้ามเนื้อกุ้ง แยกแต่ละส่วนใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube บดด้วยแท่งแก้วให้ละเอียดพร้อมกับดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+NaCl 2% ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นบดด้วยแท่งแก้วให้ละเอียดอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง และนำไปแช่แข็งที่ตู้เย็น -4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งที่ตายระหว่างการทดลองจนกว่าจะยุติการทดลอง เมื่อยุติการทดลองแล้ว จึงนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของกุ้งที่ตายระหว่างการทดลองที่ถูกเก็บแช่แข็งไว้ใน -4 องศาเซลเซียส มาละลายด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ บดด้วยแท่งแก้วให้ละเอียดดูดส่วนใสปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยง 1 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้ส่วนใส (supernatant) กับตะกอน (pellet) ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป จะเหลือตะกอน (pellet) เพื่อนำมาสกัด DNA

กรณีกุ้งตายจากการถูกยุติการทดลอง

จะสกัด DNA โดยทำการแยกชิ้นส่วนต่าง ๆ ของกุ้ง คือตับ ชิ้นเนื้อ ลำไส้ แยกแต่ละเนื้อเยื่อใส่ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube บดด้วยแท่งแก้วให้ละเอียด ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+NaCl 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บดด้วยแท่งแก้วอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง หรือจนมีลักษณะอาหารขุ่น ต่อมาดูดส่วนใสที่บ่มไว้ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 ml (microcentrifuge tube) หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป จะเหลือตะกอน (pellet) เพื่อนำมาสกัด DNA

กรณีตัวอย่างจากบ่อเพาะเลี้ยง

น้ำ: นำตัวอย่างน้ำ 1 ml เติม 9 ml TSB+2% NaCl

ดิน: นำตัวอย่างดิน 1 กรัม เติม 9 ml TSB+2% NaCl

กุ้ง: นำตัวอย่างกุ้งที่บดละเอียดชั่งมา 1 กรัม เติม 9 ml TSB+2% NaCl

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง หรือจนมีลักษณะอาหารขุ่น ต่อมาดูดส่วนใสที่บ่มไว้ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 ml (microcentrifuge tube) หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป จะเหลือตะกอน (pellet) เพื่อนำมาสกัด DNA

ในขั้นตอนการสกัด DNA จะเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในส่วนของตะกอน ปั่นผสมให้ตะกอนแตก แล้วพันด้วยพลาสติกที่ปิดอาหาร (M-Wrap) เพื่อป้องกันน้ำเข้า ต้มในน้ำเดือด 5 นาที รอให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงอีก 1 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เช่นเดิม ดูดส่วนใส (supernatant) มาใส่หลอด 1.5 ml (microcentrifuge tube) หลอดใหม่ นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

การทำ PCR

นำ DNA ที่สกัดไว้แล้วมาทำ PCR โดยใช้ primer จำเพาะสำหรับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรค AHPND ตามวิธีการตรวจมาตรฐานของกรมประมง ดังแสดงในตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ในตารางที่ 3.4 อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำ PCR ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.3 primer จำเพาะต่อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรค AHPND

Primer name	Sequences (5’ ⟶ 3’)	Target	Product
Vp-flaE-79F	5’ -GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT -3’	*V. parahaemolyticus*	897 bp
Vp-flaE-34R	5’ -ATTATCGATCGTGCCACTCAC -3’		
TUMSAT-Vp 1F	5’ -CGCAGATTTGCTTTTGTGAA -3’	*V. parahaemolyticus* ที่มีพลาสมิดผิดปกติ	500 bp
TUMSAT-Vp 1R	5’ -AGAAGCTGGCCGAAGTGATA -3’		
TUMSAT-Vp 3F	5’ -GTGTTGCATAATTTTGTGCA -3’	*V. parahaemolyticus* ที่มีพลาสมิดสร้างสารพิษ (Toxin)	360 bp
TUMSAT-VP 3R	5’-TTGTACAGAAACCACGACTA -3’		

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR

PCR components	Volume (µl)/reaction	Final concentration
DNA free water	5.60	-
2X PCR master mix	10.00	1X
10 µM F/R Mix Primer (V-flaE, Vp1, Vp3)	2.40	0.2 µM each
DNA Template	2.00	
Total	20.00	

ตารางที่ 3.5 อุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำ PCR

Vp_{AHPND}	Cycle No.	Temperature	Time (34 min)
Initial denature	1	94 °C	3 min
Denature	94	94 °C	30 sec
Annealing		60 °C	30 sec
Extension		72 °C	30 sec
Final extension	1	72 °C	2 min
Holding		15 °C	∞

การตรวจสอบ PCR product

ในขั้นตอนนี้จะวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเตรียม 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1X TBE Buffer ให้ความร้อนจนละลายหมดด้วยเครื่องไมโครเวฟ วางไว้จนกระทั่งอุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส เติม RedSafe 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่ถาดบล็อกเจลทิ้งไว้ให้เย็น ต่อมาทำการหยดสี loading dye บนแผ่นพาราฟิล์มใช้ไมโครปิเปต (Micropipette) ดูด PCR Product 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีที่เตรียมไว้ 2 ไมโครลิตร จากนั้นโหลดลงบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้แล้วในเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส ทำการโหลด DNA Marker เพื่อสำหรับบอกตำแหน่งแถบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดย Positive control คือ DNA ของเชื้อที่ก่อโรคตับอักเสบเฉียบพลัน ส่วน Negative control คือ DNA จากกุ้งที่ไม่ติดเชื้อหรือน้ำกลั่น ในการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาส่องด้วยเครื่อง UV-transluminator เพื่อดู

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยถ้าเป็นเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (มีการสร้าง toxin) ที่เป็นสาเหตุของโรค AHPND จะปรากฏแถบของ PCR product ทั้ง 3 ขนาด คือขนาด 360 bp, 500 bp, และขนาด 897 bp ส่วนเชื้อชนิดอื่นหรือเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรค AHPND จะไม่มีแถบดังกล่าวปรากฏขึ้น

การศึกษาผลของเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ที่มีต่อคุณภาพน้ำ

ทำการศึกษาผลของเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ที่มีต่อคุณภาพน้ำโดยการวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าอัลคาไลน์นิตี้หรือค่าความเป็นด่าง ค่าความเค็ม ค่าแอมโมเนีย และค่าไนไตรท์ ในตู้เลี้ยงกุ้งในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาผลของเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ต่อการควบคุมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกร

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ กุ้ง และดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาวของเกษตรกร อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรีที่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 จำนวน 5 ฟาร์ม ตามวิธีการเก็บตัวอย่างมาตรฐานของกรมประมง ดังนี้

ตัวอย่างน้ำ : เก็บตัวอย่างน้ำใส่ภาชนะที่สะอาดปริมาตรอย่างน้อย 300 ml แล้วนำไปแช่เย็นพร้อมกับเขียนชื่อฟาร์มและหมายเลขบ่อแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือภายใน 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างดิน : เก็บตัวอย่างดิน บ่อละ 3-4 จุด (เก็บจากกลางบ่อ และริมบ่อ ตั้งแต่พื้นบ่อจนลึกลงไปประมาณ 10 ซม.) รวมกันประมาณ 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกใหม่ ๆ หรือภาชนะที่สะอาดปราศจากเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อภายนอก แล้วนำไปแช่เย็น พร้อมกับเขียนชื่อฟาร์มและหมายเลขบ่อ แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างกุ้ง : สุ่มตัวอย่างกุ้งให้กระจายทั่วบ่อ ให้ได้กุ้งไม่น้อยกว่า 200 ตัว/บ่อ ใส่ตัวอย่างกุ้งมีชีวิตในถุงพลาสติกที่มีน้ำทะเลสะอาด และอัดอากาศ มัดปากถุงให้แน่น พร้อมกับเขียนชื่อฟาร์มและหมายเลขบ่อแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยง เพื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer และขั้นตอนการทำ PCR ตามวิธีการตรวจมาตรฐานของกรมประมง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาคำนวนค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มตัวอย่างจะใช้สถิติ t-test การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่มตัวอย่างขึ้นไปจะใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) ด้วย Tukey's multiple comparison test และการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตใช้สถิติ log-rank test กำหนดให้การมีนัยสำคัญทางสถิติจะมีค่า *P* values < 0.05 ซึ่งการวิเคราะห์ทางสถิตินี้ใช้โปรแกรม SPSS 11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี