

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

ศึกษาวิธีการเตรียมลำไส้ของกุ้งขาวที่เหมาะสมจากการเปรียบเทียบการใช้ยารักษาภาพ 3 ชนิดคือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์, น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) (Humason, 1972) และน้ำยา RNA friendly fixative (Hasson *et al.*, 1997) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์โดยใช้วิธีบล่าไล่เพื่อนับเชิงปริมาณ และบนเนื้อเยื่อเพื่อยืนยันการคงอยู่ของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของ กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

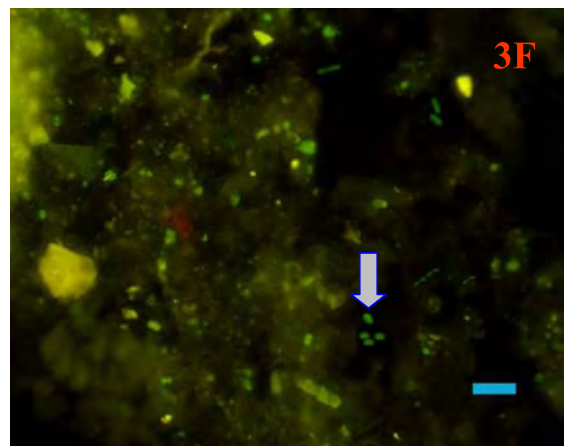
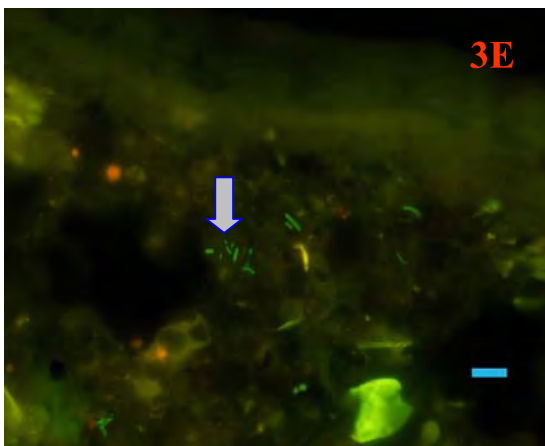
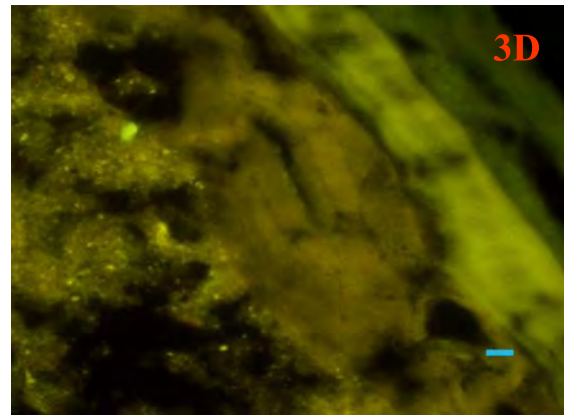
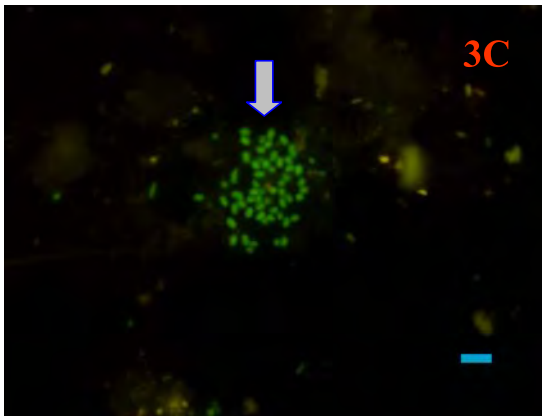
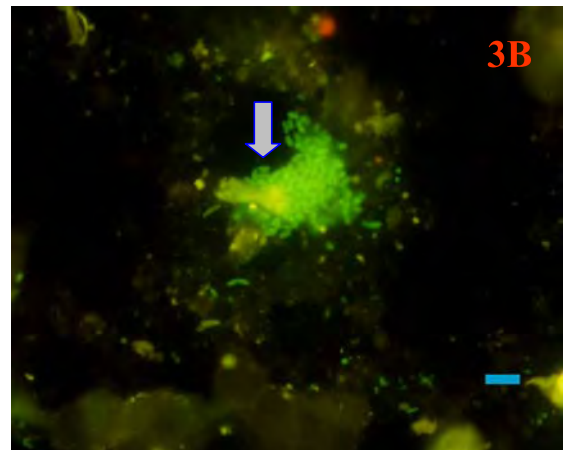
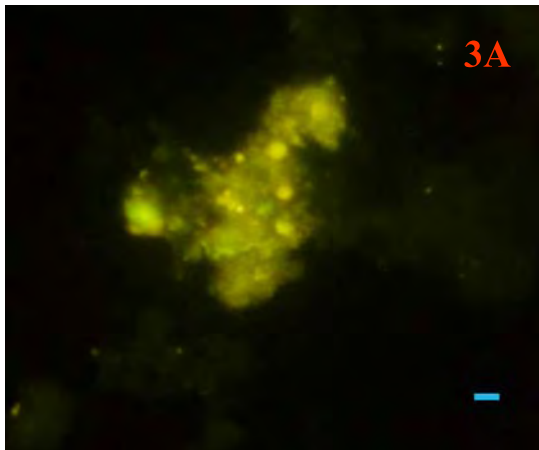
3.1.1 การตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH โดยใช้วิธีบล่าไล่

การตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH โดยใช้วิธีบล่าไล่ที่ผ่านการรักษาภาพด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ คือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์, น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และน้ำยา RNA friendly fixative พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH ในลำไส้ที่ผ่านการรักษาภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH ในลำไส้ที่ผ่านการรักษาภาพด้วยน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และน้ำยา RNA friendly fixative

ลำไส้ของกุ้งขาวบดที่ผ่านการรักษาภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยไม่เติมโพรบ EUB338 ไม่พบการเรืองแสงของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ของกุ้งขาว แต่พบว่าเกิดการเรืองแสงขึ้นเองของวัตถุหรือเศษอาหารต่างๆ ในตัวอย่าง (autofluorescence) (ภาพที่ 3A) สำหรับตัวอย่างลำไส้ของกุ้งขาวบดที่ผ่านการรักษาภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10% แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส นำไป hybridization ด้วยโพรบ EUB338 ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (domain bacteria) (Amann *et al.*, 1990) พบการเรืองแสงของแบคทีเรียในตัวอย่างลำไส้ของกุ้งขาวบด โดยแบคทีเรียมีการเกาะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่กับก้อนของอาหาร (ภาพที่ 3B และ 3C)

3.1.2 การตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH ในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารกุ้งขาว

การใช้น้ำยาเควิดสัน (Davidson's fixative) (Humason, 1972) และ RNA friendly fixative (Hasson *et al.*, 1997) รักษาสภาพตัวอย่างกุ้งขาวเพื่อนำมาเตรียมเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH พบว่าไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียในตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวได้เลย แต่เมื่อเปลี่ยนน้ำยาเป็นฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาตัดเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ตัดแปลงจากวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งเพื่อทำ *in situ* hybridization โดยทั่วไป ซึ่งตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง rotary microtome ให้ได้ความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน แล้ว hybridization ด้วยโพรบ EUB338 ที่จำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (domain bacteria) พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้โดยมองเห็นเซลล์เรืองแสงสีเขียวขึ้นมาสำหรับเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวที่ผ่านการรักษาด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยไม่เติมโพรบ EUB338 จึงไม่มีการเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียเกิดขึ้นแต่อย่างใด (ภาพที่ 3D) ส่วนเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวที่รักษาสภาพในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH สามารถตรวจพบการเรืองแสงสีเขียวของเซลล์แบคทีเรียเกาะกลุ่มรวมอยู่กับอาหารและบางส่วนกระจายอยู่ทั่วไปในลำไส้ ทั้งนี้ไม่พบการยึดเกาะกับผนังลำไส้โดยตรง (ภาพที่ 3E) ในขณะที่เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวที่รักษาสภาพ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็สามารถพบการเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียได้เช่นกัน แต่จากการสังเกตโครงสร้างของเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวพบว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ที่สมบูรณ์และคงสภาพได้ดีกว่าการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3F)



ภาพที่ 3 A-F ภาพการเรืองแสงของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ใช้โพรบ EUB338 ติดฉลากด้วย fluorescein **A.** ลำไส้กุ้งขาวบดไฮบริดไดซ์ด้วยการไม่เติมโพรบ EUB338 ที่ติดฉลากด้วย fluorescein ในไฮบริดไดซ์เซชัน บัฟเฟอร์ **B.** กลุ่มจุลินทรีย์เกาะติดกับอาหารที่อยู่ในลำไส้ส่วนกลางตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ใช้โพรบ EUB338 ติดฉลากด้วย fluorescein (ลำไส้บดที่รักษาสภาพและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) **C.** ลำไส้บดที่รักษาสภาพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส **D.** เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวไฮบริดไดซ์ด้วยการไม่เติมโพรบในไฮบริดไดซ์เซชัน บัฟเฟอร์ **E.** เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวรักษาสภาพและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส **F.** เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวรักษาสภาพและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Bar scale = 5 μm)

Figure 3 A-F Epifluorescence micrographs of microbial communities (arrow) were detected by FISH and the EUB338 Fluorescein-labeled gene probe. **A.** Crushed white shrimp's intestine was hybridized by hybridization buffer without being added EUB338 Fluorescein-labeled gene probe (Negative control). **B.** Bacterial colonization on food bolus in the midgut (arrow), as detected by FISH technique and the EUB338 Fluorescein-labeled gene probe (Crushed intestine was fixed and stored at -20°C probe). **C.** Crushed intestine was fixed and stored at 4°C . **D.** Intestine tissue of white shrimp was hybridized by hybridization buffer without being added EUB 338 Fluorescein-labeled gene probe (Negative control). **E.** Intestinal tissue of white shrimp was fixed and stored at -20°C . **F.** Intestinal tissue of white shrimp was fixed and stored at 4°C . (Bar scale = 5 μm)

3.2 การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย

คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคแบคทีเรียในกุ้งขาวคือ *V. haveyi* และ *V. parahaemolyticus* และยับยั้งการเจริญของ *V. haveyi* เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) เพื่อนำไปเลี้ยงกุ้งขาวต่อไป

3.2.1 การทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ

จากผลการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 8 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดสามารถทนต่อความโซเดียมคลอไรด์ได้ถึง

ระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสังเกตจากการเจริญของเชื้อ โดยดูความขุ่นที่เกิดขึ้น และนำไปหยดบนอาหาร MRS agar สำหรับ *Lactobacillus* sp. และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ TSA สำหรับ *Bacillus* sp. ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อยืนยันการเจริญของเชื้อทั้ง 8 ชนิด พบว่ามีการเจริญของเชื้อทั้ง 8 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ

Table 5 Microbial growth in agar specific media at the various concentrations of NaCl

No.	Bacteria	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%
1	<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	+	+
2	<i>L. brevis</i>	+	+	+	+	+	+
3	<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+
4	<i>L. plantarum</i>	+	+	+	+	+	+
5	<i>B. amyloliquefacien</i>	+	+	+	+	+	+
6	<i>B. coagulan</i>	+	+	+	+	+	+
7	<i>B. licheniformis</i>	+	+	+	+	+	+
8	<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+

+ Bacteria can grow on agar specific media

- Bacteria can not grow on agar specific media

3.2.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธี agar well diffusion

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี agar well diffusion ตามวิธีการดัดแปลงจาก Schillinger and Lucke (1989) ด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 4 ชนิด คือ *B. amyloliquefacien*, *B. coagulan*, *B. licheniformis* และ *B. subtilis* พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. ทั้ง 4 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* (ตารางที่ 6) และ *V. parahaemolyticus* (ตารางที่ 7) ได้ ซึ่งสังเกตจากไม่มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเกิดขึ้น จึงไม่สามารถคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้ง (Arbitrary Unit) ได้ แต่เมื่อใช้เชื้อ *Lactobacillus* sp. จำนวน 4 ชนิด คือ *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* และ *L. plantarum* ตามลำดับ พบว่า *Lactobacillus* sp. ทั้ง 4 ชนิดสามารถยับยั้ง

V. harveyi โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสคือ 9.50 ± 0.50 , 10.83 ± 0.76 , 10.33 ± 0.58 และ 12.50 ± 0.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4A) และสามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* โดยมีความกว้างของ clear zone คือ 9.83 ± 0.29 , 11.67 ± 0.58 , 10.50 ± 0.50 และ 12.83 ± 0.29 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4B)

เมื่อเปรียบเทียบความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ทั้ง 4 ชนิด พบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้ง *V. harveyi* โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส และกิจกรรมการยับยั้ง (Arbitrary Unit) สูงที่สุด คือ 12.50 ± 0.50 มิลลิเมตร และ 50.00 ± 0.00 AU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 6) และสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสและกิจกรรมการยับยั้ง (Arbitrary Unit) สูงที่สุด คือ 12.83 ± 0.29 มิลลิเมตร และ 55.53 ± 9.58 AU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7)

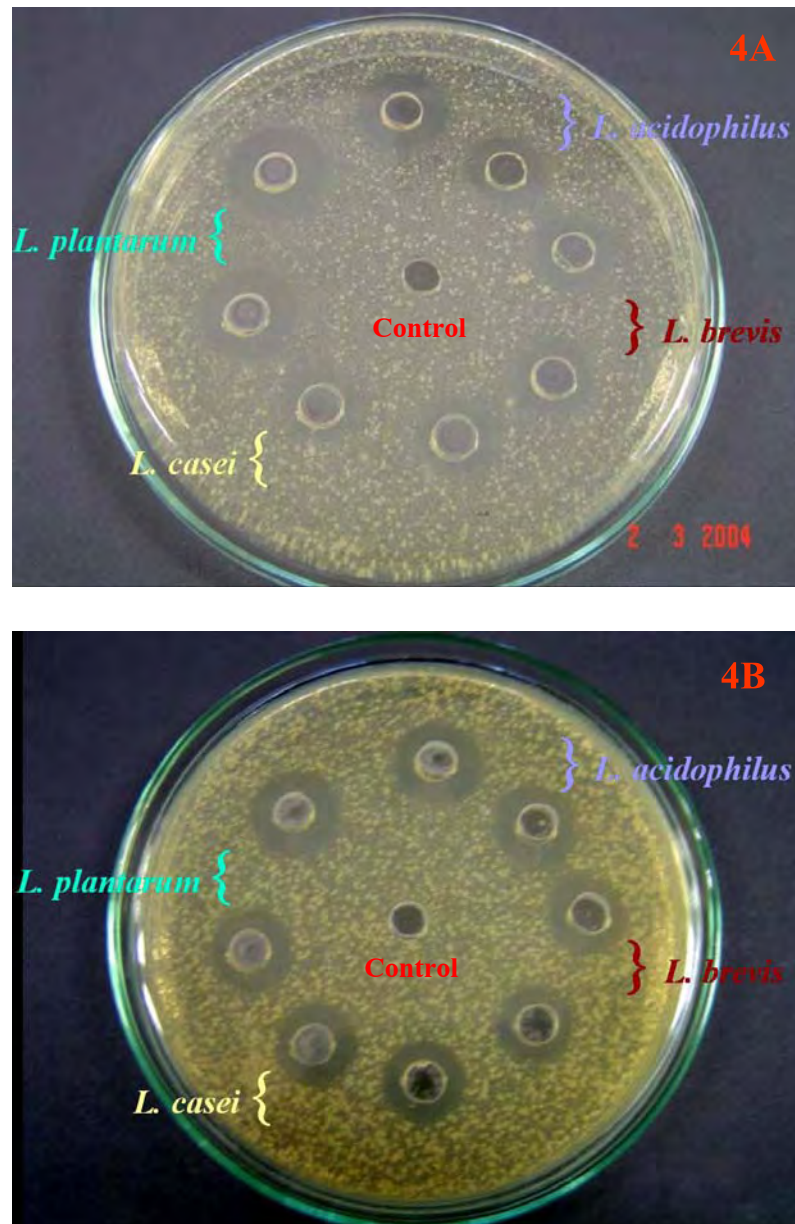
ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี agar well diffusion

Table 6 Inhibitory activity of selected microbial against *V. harveyi* by agar well diffusion method

No.	Bacteria	End dilution effect inhibitory zone	Volume of supernatant dropped in holes (μ l)	Diameter of inhibitory zone (mm)	Arbitrary Unit (AU/ml)
1	<i>B. amyloliquefacien</i>	0	50	0	0
2	<i>B. coagulan</i>	0	50	0	0
3	<i>B. licheniformis</i>	0	50	0	0
4	<i>B. subtilis</i>	0	50	0	0
5	<i>L. acidophilus</i>	2.00 ± 0.00^a	50	9.50 ± 0.50^a	40.00 ± 0.00^a
6	<i>L. brevis</i>	2.33 ± 0.29^{ab}	50	10.83 ± 0.76^{ab}	46.60 ± 5.77^{ab}
7	<i>L. casei</i>	2.17 ± 0.29^{ab}	50	10.33 ± 0.58^b	43.40 ± 1.96^{ab}
8	<i>L. plantarum</i>	2.50 ± 0.00^b	50	12.50 ± 0.50^c	50.00 ± 0.00^b

Data were mean values of triplicate determination \pm standard deviation

Means within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4 A-B A. ความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ทั้ง 4 ชนิด ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* หลุมกลางหยดน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้น

B. ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ทั้ง 4 ชนิด ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* หลุมกลางหยดน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้น

Figure 4 A-B A. Petri dish containing four strains of *Lactobacillus* sp. showed inhibitory zone against the growth of *V. harveyi*. No inhibitory zone was found in the control. B. Petri dish containing four strains of *Lactobacillus* sp. showed inhibitory zone against the growth of *V. parahaemolyticus*. No inhibitory zone was found in the control.

ตารางที่ 7 ผลการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

Table 7 Inhibitory activity of selected microbial against *V. parahaemolyticus* by agar well diffusion method

No.	Bacteria	End dilution effect inhibitory zone	Volume of supernatant dropped in holes (μl)	Diameter of inhibitory zone (mm)	Arbitrary Unit (AU/ml)
1	<i>B. amyloliquefacien</i>	0	50	0	0
2	<i>B. coagulan</i>	0	50	0	0
3	<i>B. licheniformis</i>	0	50	0	0
4	<i>B. subtilis</i>	0	50	0	0
5	<i>L. acidophilus</i>	2.00 ± 0.00 ^a	50	9.83 ± 0.29 ^a	40.00 ± 0.00 ^a
6	<i>L. brevis</i>	2.33 ± 0.29 ^{ab}	50	11.67 ± 0.58 ^{ab}	46.67 ± 5.77 ^{ab}
7	<i>L. casei</i>	2.17 ± 0.29 ^{ab}	50	10.50 ± 0.50 ^{ab}	43.33 ± 5.77 ^{ab}
8	<i>L. plantarum</i>	2.78 ± 0.48 ^b	50	12.83 ± 0.29 ^b	55.53 ± 9.58 ^b

Data were mean values of triplicate determination ± standard deviation

Means within columns not sharing the same superscript are significantly different (p < 0.05).

3.2.3 วิธี Co-culture

จากการทดลองนำเชื้อ *L. plantarum* ระดับความเข้มข้น 10^2 , 10^3 และ 10^4 CFU/ml เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* ระดับความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ในน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมหาอาหารกุ้งสำเร็จรูป (ตัวแทนของสารอินทรีย์) ที่มีความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 10 วัน พบว่าวันที่ 2 ของการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุมไม่มีการเติมเชื้อ *L. plantarum*), ชุดการทดลองที่ 2 (เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^2 CFU/ml) และชุดการทดลองที่ 3 (เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^3 CFU/ml) มีการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ก่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 4 (เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^4 CFU/ml) แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 วัน การเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ของชุดการทดลองที่ 4 มีแนวโน้มเริ่มลดลง (ตารางที่ 8) ในขณะที่การเจริญของ *L. plantarum* ในระหว่างเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* ในวันที่ 2 ของชุดการทดลองที่ 4 (เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^4 CFU/ml) มีการเจริญสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 9)

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ 4 (เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^4 CFU/ml) มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* ระดับความเข้มข้น 10^3 CFU/ml สำหรับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งมีเชื้อ *L. plantarum* ระดับความเข้มข้น 10^2 และ 10^3 CFU/ml ตามลำดับ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* ระดับความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ได้

ตารางที่ 8 ปริมาณเชื้อ *V. harveyi* (CFU/ml) ในการทดลองด้วยวิธี co-culture ตามระยะเวลาต่าง ๆ

Table 8 Co-culture method showed the growth of *V. harveyi* with *L. plantarum* at different initial concentrations (colony-forming unit; CFU).

Treatments	<i>V. harveyi</i> ($\times 10^5$ CFU/ml)					
	Day-0	Day-2	Day-4	Day-6	Day-8	Day-10
T1 (VH 10^3)	0.01	38.60 ± 3.50^b	9.00 ± 7.00^b	1.00 ± 0.30^a	3.60 ± 1.50^c	0.53 ± 0.02^a
T2 (LP 10^2 :VH 10^3)	0.01	40.00 ± 7.00^b	3.60 ± 0.39^a	0.20 ± 0.01^a	1.61 ± 0.01^a	1.50 ± 0.51^a
T3 (LP 10^3 :VH 10^3)	0.01	44.00 ± 4.00^b	9.00 ± 0.98^b	2.40 ± 0.58^b	2.20 ± 0.07^b	1.60 ± 0.80^a
T4 (LP 10^4 :VH 10^3)	0.01	14.80 ± 2.00^a	21.0 ± 7.00^c	3.70 ± 0.56^c	1.60 ± 0.50^a	1.00 ± 0.53^a

Means within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p < 0.05$).

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อ *L. plantarum* (CFU/ml) ในการทดลองตามระยะเวลาต่างๆ

Table 9 Co-culture method showed the growth of *L. plantarum* with *V. harveyi* at different initial concentrations (colony-forming unit; CFU).

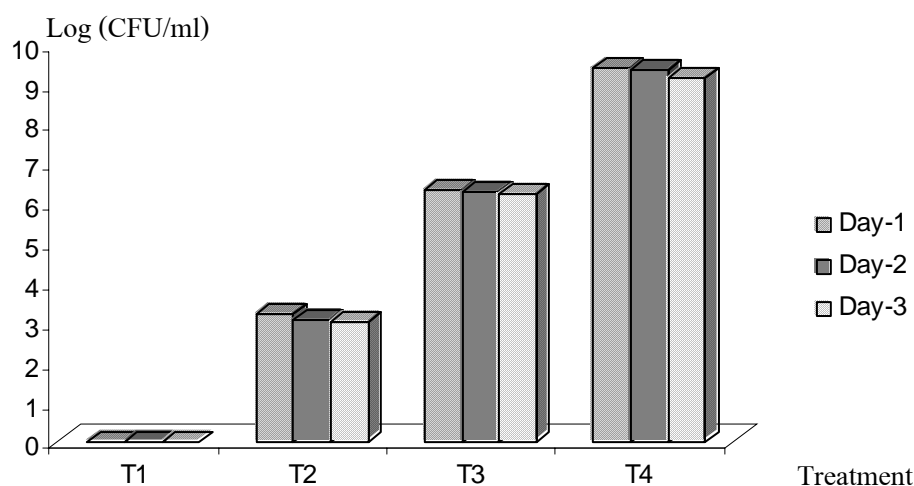
Treatments	<i>L. plantarum</i> ($\times 10^3$ CFU/ml)					
	Day-0	Day-2	Day-4	Day-6	Day-8	Day-10
T2 (LP 10^2 :VH 10^3)	0.10	8.00 \pm 0.00 ^a	0.20 \pm 0.00 ^a	0.80 \pm 0.00 ^a	nd	nd
T3 (LP 10^3 :VH 10^3)	1.00	9.50 \pm 4.50 ^a	5.40 \pm 1.70 ^a	1.50 \pm 1.00 ^a	0.30 \pm 0.42 ^a	0.40 \pm 5.65 ^a
T4 (LP 10^4 :VH 10^3)	10.00	110.00 \pm 5.00 ^b	55.00 \pm 7.90 ^b	2.80 \pm 1.60 ^a	0.90 \pm 1.27 ^a	nd

Means within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p < 0.05$)

nd = not detected

3.3 การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในกึ่งขาวโดยการนำเซลล์สดผสมกับอาหารกึ่งขาว

เนื่องจากการทดลองมีการให้อาหารผสมโปรไบโอติก (*L. plantarum*) เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน ดังนั้นก่อนเริ่มการทดลองเลี้ยงกึ่งขาวจึงตรวจสอบปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารกึ่งขาวด้วยวิธีการนำอาหารกึ่งขามาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* สามารถคงอยู่ในอาหารกึ่งทดลองในปริมาณเชื้อที่ต้องการทั้ง 3 วัน คือ อาหารชุดทดลองที่ 1 คืออาหารชุดควบคุม ไม่พบเชื้อ *L. plantarum*, อาหารชุดทดลองที่ 2 มีปริมาณ *L. plantarum* อยู่ในช่วง 1.07×10^3 ถึง 1.57×10^3 CFU/g, อาหารชุดทดลองที่ 3 มีปริมาณ *L. plantarum* อยู่ในช่วง 1.69×10^6 ถึง 2.14×10^6 CFU/g และอาหารชุดทดลองที่ 4 มีปริมาณ *L. plantarum* อยู่ในช่วง 1.41×10^9 ถึง 2.41×10^9 CFU/g (ภาพที่ 5 และตารางภาคผนวก ค ที่ 1)



ภาพที่ 5 ปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารกึ่งแต่ละชุดทดลอง

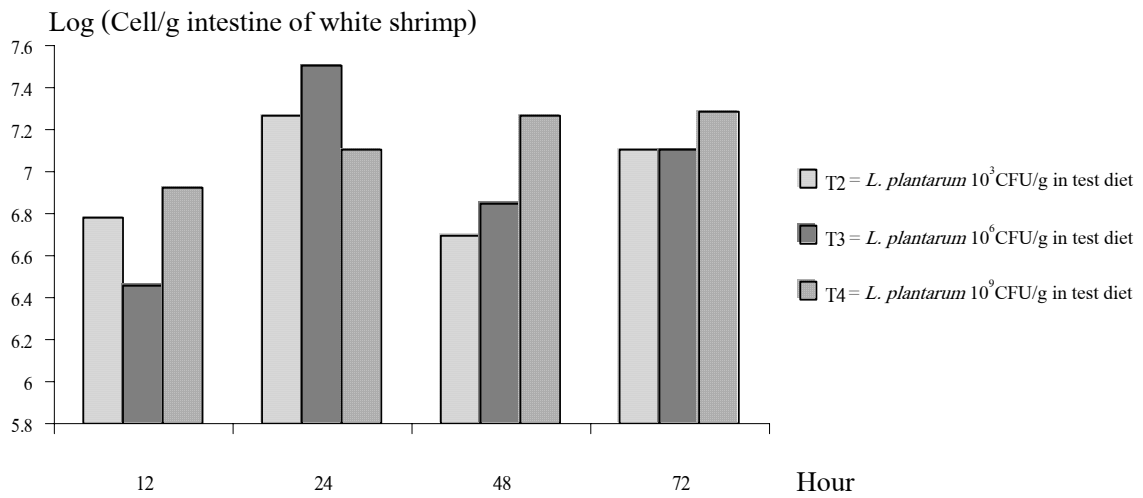
(ชุดควบคุมไม่เติมเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารกึ่ง, ชุดทดลองที่ 2 เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^3 CFU/g, ชุดทดลองที่ 3 เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^6 CFU/g และชุดทดลองที่ 4 เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^9 CFU/g)

Figure 5 Viable count (CFU/g) of *L. plantarum* in various test diet

(T1= without *L. plantarum* in test diet, T2 = *L. plantarum* 10^3 CFU/g in test diet, T3 = *L. plantarum* 10^6 CFU/g in test diet and T4 = *L. plantarum* 10^9 CFU/g in test diet)

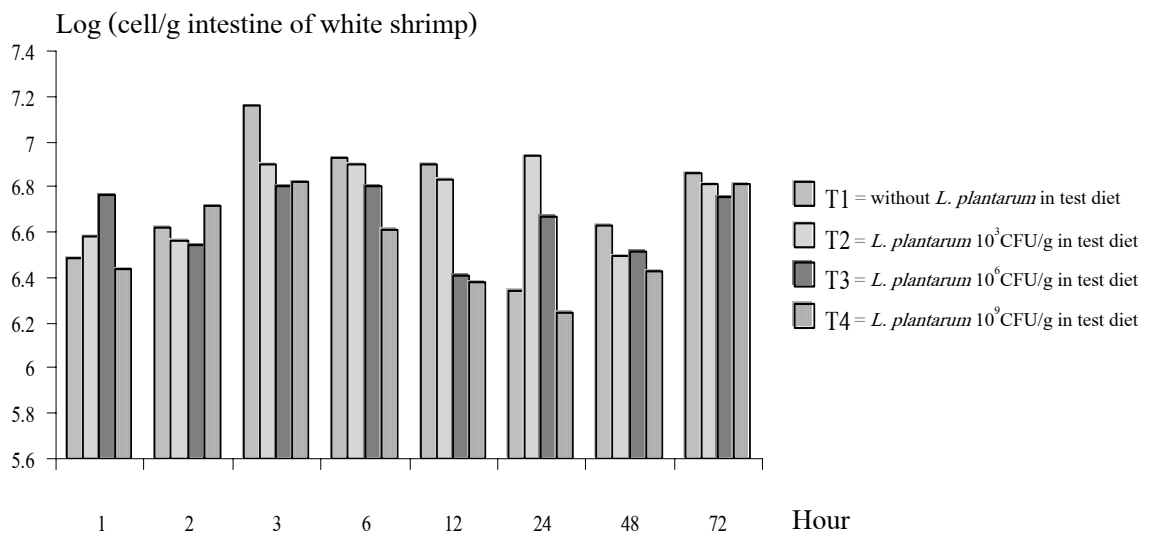
3.3.1 การติดตาม *L. plantarum* ในลำไส้กึ่งขูดด้วยเทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

จากการนำเซลล์สดของ *L. plantarum* ผสมกับอาหารกึ่งขูด และได้แบ่งเป็นชุดการทดลองที่ 1 (ไม่เติมเชื้อ *L. plantarum*), ชุดการทดลองที่ 2 (เติมเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 10^3 CFU/g), ชุดการทดลองที่ 3 (เติมเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 CFU/g) และชุดการทดลองที่ 4 (เติมเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/g) ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ นำไปเลี้ยงกึ่งขูดที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 9.21 ± 0.51 กรัม ซึ่งมีอายุ 45 วัน คุณสมบัติของน้ำที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่การเริ่มเตรียมน้ำ ตรวจสอบได้ดังนี้ ความเค็มของน้ำ 16 ส่วนในพัน (ppt), อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส, อัลคาไลน์ตี 94 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเป็นกรด-ด่าง 7.7 ในระหว่างการทดลองคุณสมบัติทั้ง 4 ประการมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (ตารางภาคผนวก ค ที่ 2) โดยให้อาหารผสม โปรไบโอติก 3 วัน ให้อาหารปกติ 4 วันสลับกันเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยเก็บตัวอย่างกึ่งขูดหลังจากหยุคให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ของแต่ละวัน เพื่อติดตาม *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกึ่งขูดในชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *L. plantarum* โดยการนำลำไส้ของกึ่งขูดส่วนกลาง (midgut) และส่วนท้าย (hindgut) มาบดให้ละเอียดแล้วเกลี่ยลงบนสไลด์ นำมาไฮบริดไคซ์ด้วย hybridization buffer ที่มี 25 เปอร์เซ็นต์ formamide (ตารางภาคผนวกที่ 1) โดยใส่โพรบ Lab158 ที่จำเพาะเจาะจงกับ *Lactobacillus* spp. และ *Enterococcus* spp. (ตารางภาคผนวกที่ 3) ติดฉลากด้วย Cy3 ตรวจสอบด้วยกล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (epifluorescence microscope) ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า ปรากฏว่า ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ของชุดทดลองที่ 1 ไม่พบเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกึ่งขูด ชุดทดลองที่ 2, 3 และ 4 สามารถนับเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกึ่งขูด หลังจากหยุคให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 12, 24, 48 และ 72 ซึ่งปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 2 อยู่ในช่วง 4.97×10^6 ถึง 1.86×10^7 เซลล์ต่อกรัมลำไส้ของกึ่งขูด, ปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 3 อยู่ในช่วง 2.88×10^6 ถึง 3.18×10^7 เซลล์ต่อกรัมลำไส้ของกึ่งขูด และปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 4 อยู่ในช่วง 8.40×10^6 ถึง 1.93×10^7 เซลล์ต่อกรัมลำไส้ของกึ่งขูด (ตารางภาคผนวก ค ที่ 3 และภาพที่ 6) ตามลำดับ สำหรับปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กึ่งขูดที่ติดตามในระยะเวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค FISH โดยใส่โพรบ GV ติดฉลากด้วย Cy3 ที่จำเพาะเจาะจงกับ *Vibrio* spp. พบว่าปริมาณของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 4 มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ 1 คือชุดควบคุม (ตารางภาคผนวก ค ที่ 4 และภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 ปริมาณ *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งขาวที่ติดตามในระยะเวลาต่างๆ ด้วยเทคนิค FISH

Figure 6 *L. plantarum* in shrimp's intestine at various time with FISH technique

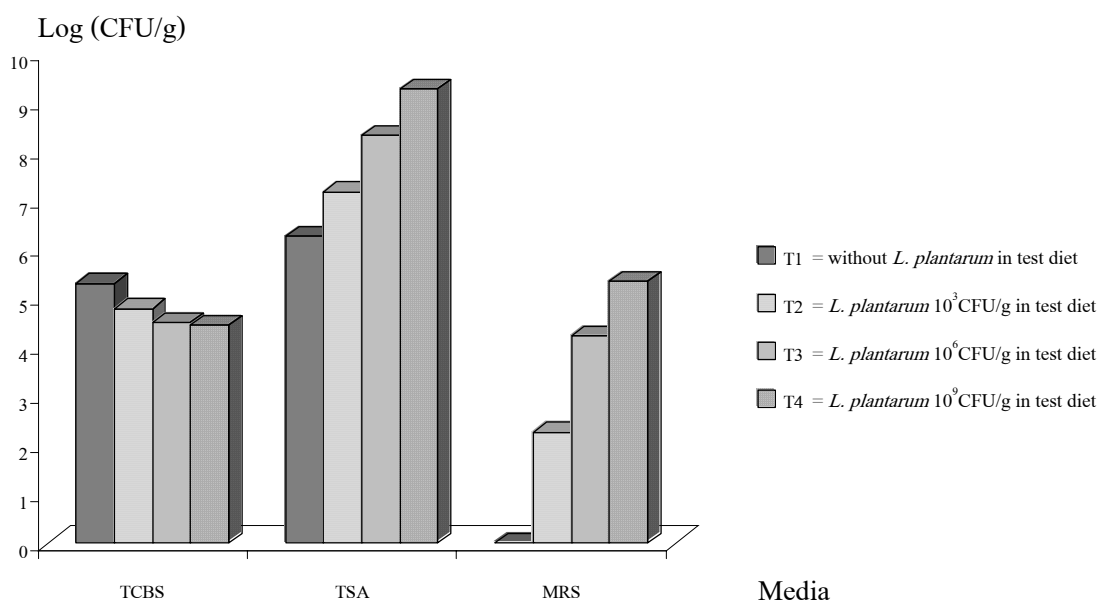


ภาพที่ 7 ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวที่ติดตามในระยะเวลาต่างๆ ด้วย เทคนิค FISH

Figure 7 *Vibrio* spp. in shrimp's intestine at various time with FISH technique

เมื่อครบชั่วโมงที่ 72 ทำการเก็บตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวแต่ละชุดการทดลองนำมาบดแล้ว เจือจาง 10, 100, 1,000, 10,000 เท่าในน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS, TSA และ MRS agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ของแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งคือกลุ่มควบคุม มีปริมาณเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. สูงที่สุด คือ 2.0×10^5 CFU/g, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. ของชุดทดลองที่ 4 สูงที่สุด คือ 1.9×10^9 CFU/g และ 2.2×10^5 CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

ซึ่งจากการติดตาม *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งขาวทั้งวิธีที่ติดตามด้วยเทคนิค FISH และการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า *L. plantarum* ก็ยังสามารถคงอยู่ในลำไส้กุ้งขาวได้แม้ว่าเวลาจะผ่านไป 72 ชั่วโมงแล้วก็ตาม

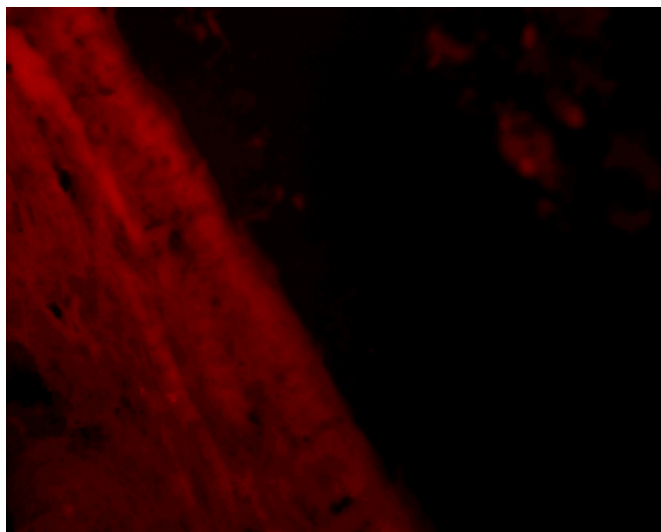


ภาพที่ 8 ปริมาณเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp., ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ชั่วโมงที่ 72

Figure 8 Viable count (CFU/g) of *Vibrio* spp., viable count (CFU/g) of bacteria and viable count (CFU/g) of *Lactobacillus* spp. grew on various media at 72 hour

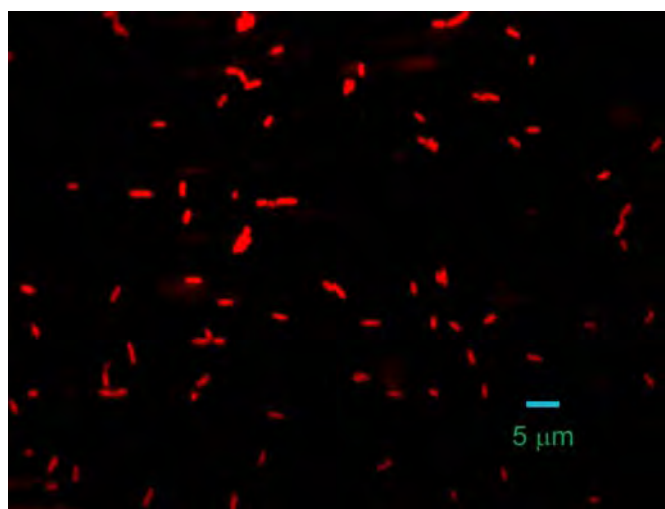
3.3.2 การติดตาม *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวโดยใช้เทคนิค FISH

จากการติดตาม *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งขาวทั้งวิธีที่ติดตามด้วยเทคนิค FISH และการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่า *L. plantarum* สามารถคงอยู่ในลำไส้กุ้งขาวได้แม้ว่าเวลาจะผ่านไป 72 ชั่วโมง ดังนั้นเพื่อยืนยันการคงอยู่ของเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวจึงนำตัวอย่างลำไส้กุ้งของแต่ละชุดการทดลองมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา จากนั้นจึงทำการติดตาม *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวโดยใช้เทคนิค FISH พบว่าเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ *L. plantarum*) ไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ Lab158 ซึ่งมีความจำเพาะกับ *Lactobacillus* spp. และ *Enterococcus* spp. (Harmsen, 1999) ติดฉลากด้วย Cy3 ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่นของการถูกกระตุ้นด้วยแสงประมาณ 550 นาโนเมตร (Moter and Gobel, 2000) ไม่พบการเรืองแสงของ *L. plantarum* เกิดขึ้น แสดงว่าไม่มีเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวชุดการทดลองที่ 1 (ภาพที่ 9) และเพื่อตรวจสอบการทำงานของโพรบ Lab158 จึงใช้เชื้อ *L. plantarum* ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (positive control) ไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 จึงปรากฏการเรืองแสงสีแดงเกิดขึ้น (ภาพที่ 10) สำหรับเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวของชุดการทดลองที่ 2 (เติมเชื้อ *L. plantarum* ที่มีปริมาณเชื้อ 10^3 CFU/g) ไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 พบการเรืองแสงสีแดงของเชื้อ *L. plantarum* (ภาพที่ 11A) เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 2 ไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ EUB338 ซึ่งจำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (Amann *et al.*, 1995) ติดฉลากด้วย fluorescein ซึ่งดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นประมาณ 492 นาโนเมตรจึงพบการเรืองแสงสีเขียวของเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ (ภาพที่ 11B) เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวของชุดการทดลองที่ 2 ที่ย้อมด้วยสี 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ติด DNA ทั้งหมด ซึ่งพบแบคทีเรียติดสีฟ้า (ภาพที่ 11C) และจากการสังเกตภาพจะพบแบคทีเรียรวมอยู่เป็นกลุ่ม และบางเซลล์ก็อาจจะกระจายอยู่บนผนังลำไส้ ซึ่งภาพที่ถ่ายจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์สามารถมองภาพได้เพียง 2 มิติเท่านั้น (Trebesius *et al.*, 2000) จึงยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนมากนัก ดังนั้นจึงนำตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวจากแต่ละชุดการทดลองไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ตรวจสอบการเรืองแสงของแบคทีเรียด้วยกล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิ่ง (confocal laser scanning microscope) เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง พบว่าเนื้อเยื่อของกุ้งขาวชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีการเรืองแสงของแบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้ ซึ่งแสดงว่าเชื้อที่ติดสารเรืองแสงสีแดง คือ *L. plantarum* (ภาพที่ 12A, 12B และ 12C)



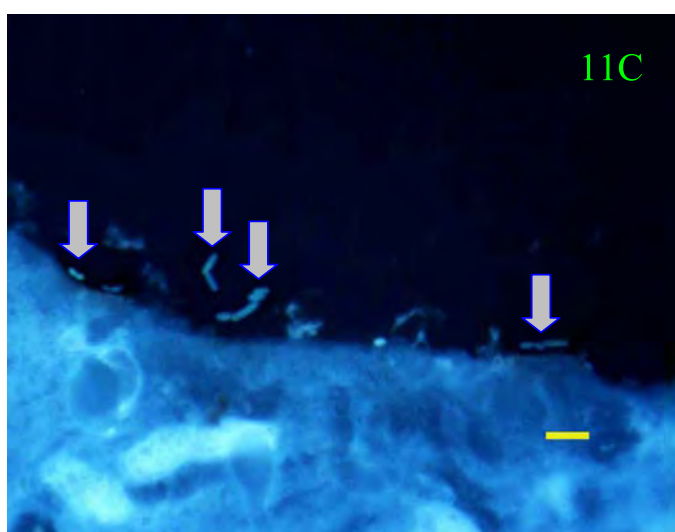
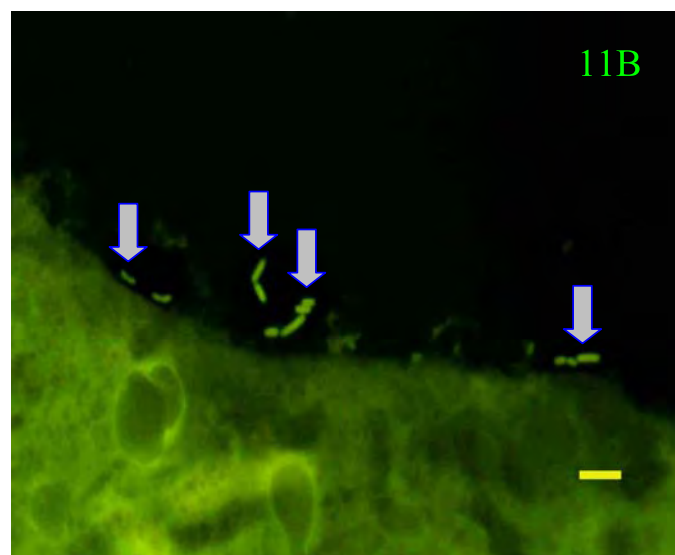
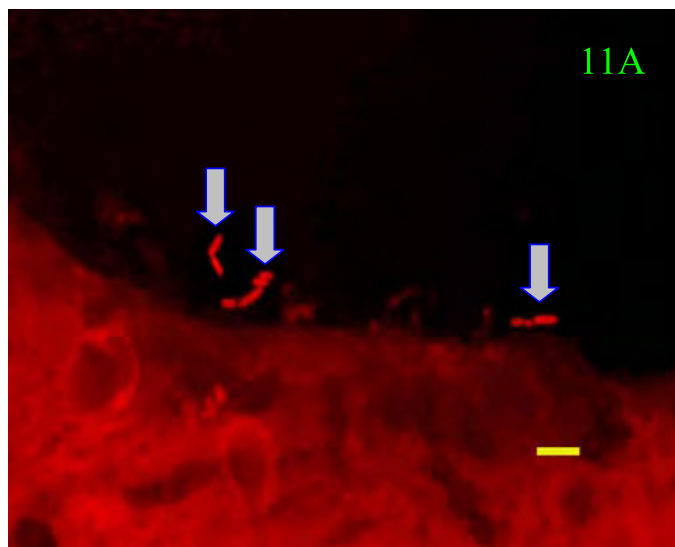
ภาพที่ 9 เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดควบคุม ไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ไม่มีการเรืองแสงของ *L. plantarum* เกิดขึ้น (Bar = 5 μm)

Figure 9 Intestine tissue of white shrimp in treatment 1 (control group) hybridized by hybridization buffer with Lab158 Cy3-labeled gene probe, detected by epifluorescence microscopic (Bar = 5 μm)



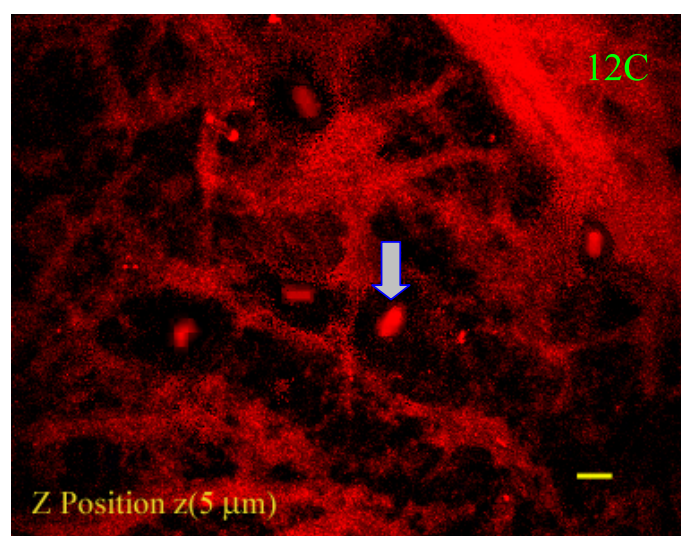
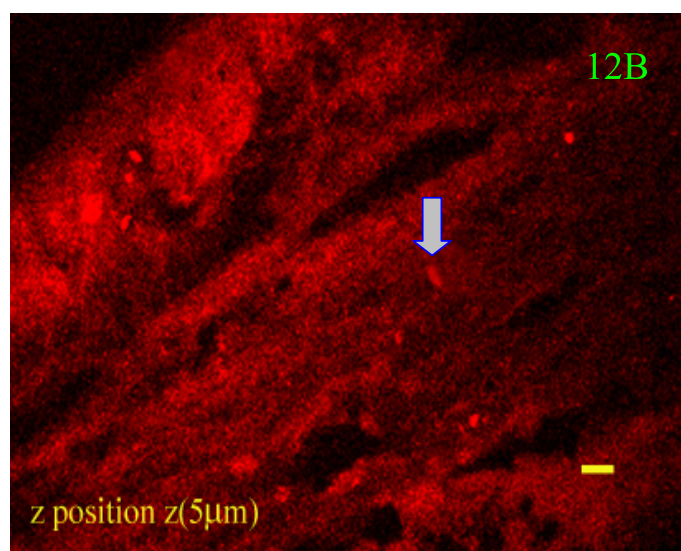
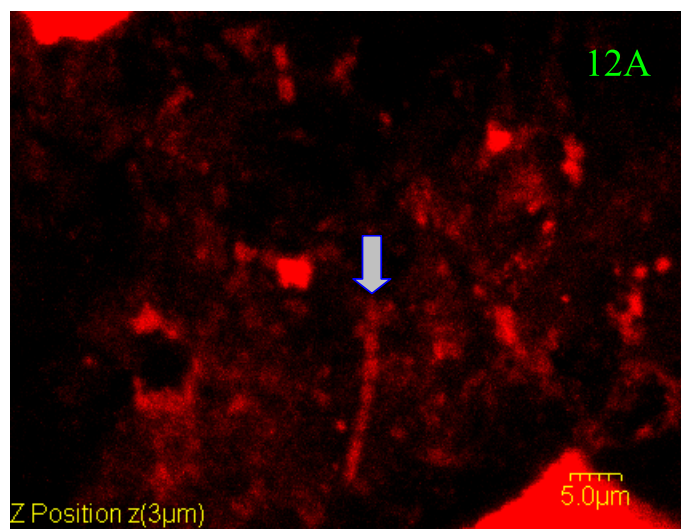
ภาพที่ 10 *L. plantarum* ไฮบริดไดซ์ด้วยโพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ตรวจสอบด้วยกล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (Bar = 5 μm)

Figure 10 *L. plantarum* hybridized by hybridization buffer with Lab158 Cy3-labeled gene probe, detected by epifluorescence microscopic (Bar = 5 μm)



ภาพที่ 11 A-C ภาพการเรืองแสงของกลุ่มจุลินทรีย์ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ใช้โพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3, EUB338 ติดฉลากด้วย fluorescein และย้อมด้วยสี 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) **A.** เชื้อ *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 2 (ศรชี้) ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้โพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 **B.** แบคทีเรียในเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวชุดการทดลองที่ 2 (ศรชี้) ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้โพรบ EUB338 ติดฉลากด้วย fluorescein **C.** แบคทีเรียในเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวชุดการทดลองที่ 2 (ศรชี้) ตรวจสอบโดยการย้อมด้วยสี DAPI ตรวจสอบผลด้วยกล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (Bar = 5 μ m)

Figure 11 A-C Epifluorescence micrographs of microbial communities (arrow) were detected by FISH technique by using Lab158 Cy3-labeled gene probe, EUB338 Fluorescein-labeled gene probe and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dye staining **A.** *L. plantarum* in intestine tissue of white shrimp in treatment 2 (arrow) were detected by FISH technique and Lab158 Cy3-labeled gene probe **B.** Bacteria in intestine tissue of white shrimp in treatment 2 (arrow) were detected by FISH technique and EUB338 fluorescein-labeled gene probe **C.** Bacteria in intestine tissue of white shrimp in treatment 2 (arrow) were stained with DAPI, detected by epifluorescence microscopic (Bar = 5 μ m)

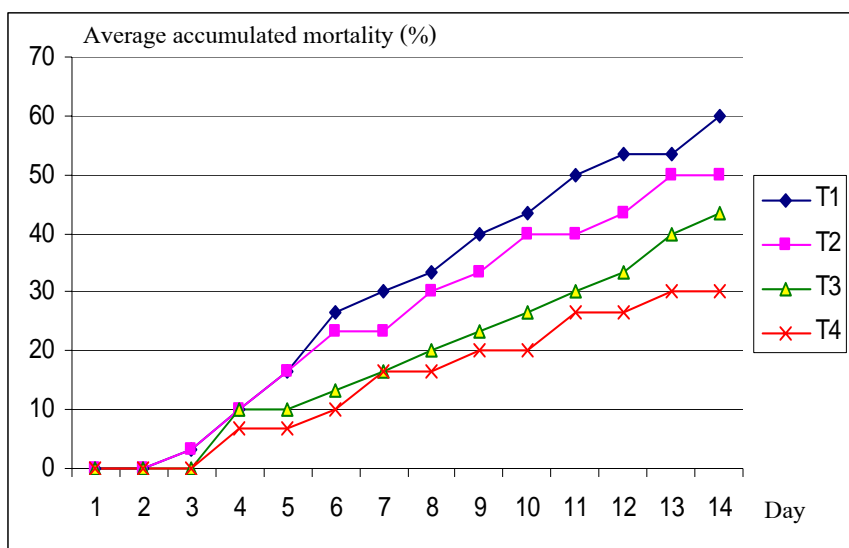


ภาพที่ 12 A-C *A. L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 2 (ศรชี้) ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้โพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ตรวจสอบผลด้วยกล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิ่ง **B.** *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 3 (ศรชี้) ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้โพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ตรวจสอบผลด้วยกล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิ่ง **C.** *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวชุดการทดลองที่ 4 (ศรชี้) ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยใช้โพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ตรวจสอบผลด้วยกล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิ่ง (Bar = 5 μ m)

Figure 12 A-C *A. L. plantarum* in intestine tissue of white shrimp in treatment 2 were detected by FISH technique by using Lab158 Cy3-labeled gene probe, detected by confocal laser scanning microscopic **B.** *L. plantarum* in intestine tissue of white shrimp in treatment 3 (arrow) were detected by FISH technique by using Lab158 Cy3-labeled gene probe, detected by confocal laser scanning microscopic **C.** *L. plantarum* in intestine tissue of white shrimp in treatment 4 (arrow) were detected by FISH technique by using Lab158 Cy3-labeled gene probe, detected by confocal laser scanning microscopic (Bar = 5 μ m)

3.3.3 การทดสอบความต้านทานต่อโรค

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 1 เดือน นำกุ้งที่เหลือแต่ละชุดการทดลองจำนวน 10 ตัว มาทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง โดยวิธีการแช่ (immersion challenge) และบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) มีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 คือ 50, 43 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ 4 มีอัตราการตายน้อยที่สุด คือ 30 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 13 และตารางภาคผนวก ค ที่ 5)



ภาพที่ 13 อัตราการตายสะสมของกุ้งแต่ละชุดการทดลองภายในระยะเวลา 14 วัน (ชุดควบคุมไม่เติมเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารกุ้ง, ชุดทดลองที่ 2 เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^3 CFU/g, ชุดทดลองที่ 3 เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^6 CFU/g และชุดทดลองที่ 4 เติมเชื้อ *L. plantarum* 10^9 CFU/g)

Figure 13 Cumulative mortality of white shrimp infected *V. harveyi* by immersion challenge held for 14 days. (T1= without *L. plantarum* in test diet, T2 = *L. plantarum* 10^3 CFU/g in test diet, T3 = *L. plantarum* 10^6 CFU/g in test diet and T4 = *L. plantarum* 10^9 CFU/g in test diet)