ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้และการติดตามโปรไบโอติกในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

ผู้เขียน นายบุญกอบ วิริยพงศ์สุธี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาชุมชนแบคทีเรีย เนื่องจากทำให้ทราบถึงชนิด และจำนวนของจุลินทรีย์ในที่อยู่อาศัยอย่างแท้จริง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงชนิด และปริมาณของกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งขาว จากการทดสอบชนิดของน้ำยารักษาสภาพและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาว พบว่าการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อด้วยน้ำยารักษาสภาพ บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนน้ำยารักษาสภาพเป็นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการตรวจสอบได้ชัดเจนกว่าการเก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และ RNA friendly fixative ทั้งนี้การเก็บรักษาตัวอย่างลำไส้ของกุ้งขาวไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่สามารถให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนกว่าการเก็บรักษาตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลองใช้ rRNA-targeted oligonucleotide probe หรือ DNA probe สำหรับ Eubacteria domain (EUB338) ที่ติดฉลากด้วย fluorescein เป็น probe สำหรับการตรวจสอบ พบว่าแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ในลำไส้ของกุ้งขาวเกาะกลุ่มรวมอยู่กับอาหาร บางส่วนกระจายอยู่ทั่วไปในลำไส้ ทั้งนี้ไม่พบการยึดเกาะกับผนังลำไส้โดยตรง

จากการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อประยุกต์ใช้ในกุ้งขาว พบว่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบบนอาหารแข็งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้สูง (12.50 $\pm$ 0.50 และ 12.83 $\pm$ 0.29 มิลลิเมตร ตามลำดับ) และเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* (10^3 CFU/ml) พบว่าการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* มีแนวโน้มลดลงจากการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *L. plantarum*

การประยุกต์ใช้ *L. plantarum* ผสมกับอาหารนำไปเลี้ยงกุ้งขาวและติดตามโดยใช้ rRNA-targeted oligonucleotide probe หรือ DNA probe สำหรับเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp.

(Lab158) ที่ติดฉลากด้วย Cy3 เป็น probe สำหรับการตรวจสอบ จากการติดตาม *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งบด พบว่าในชุดควบคุม ไม่พบเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวหลังจากหยุดให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 สำหรับชุดทดลองที่ 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) สามารถนับเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวหลังจากหยุดให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 12, 24, 48 และ 72 จากติดตามในลำไส้กุ้งบด และสามารถยืนยันการคงอยู่ของ *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวโดยใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบด้วยกล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (epifluorescence microscope) และกล้องคอนโฟคอลเลเซอร์ สแกนนิง (confocal laser scanning microscope) เมื่อนำกุ้งขาวที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนมาทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธีการแช่ (immersion challenge) เป็นเวลา 14 วัน พบว่า การผสมเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/g (ชุดการทดลองที่ 4) ทำให้กุ้งขาวมีอัตราการตายเพียง 30 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบกับชุดควบคุมซึ่งมีอัตราการตายของกุ้งขาวสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title	Application and Pursuance of Probiotics in White Shrimp (*Penaeus vannamei*)
Author	Mr. Boonkob Viriyapongsutee
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2005

ABSTRACT

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique is a very efficient technique to evaluate microbial community dynamics in various environments. It is possible to apply this technique to study the intestinal microflora in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Studies on different fixatives and optimum temperature for preservation of tissue samples revealed that the fixation with 10% buffered formalin for 12 hours and subsequent preservation in 70% ethanol gave the positive results in comparison with the fixation with Davidson's fixative and RNA friendly fixative. Among samples examined the intestine samples of white shrimp stored in -20°C gave better signaling than those kept at 4°C. Using rRNA-targeted oligonucleotide probe or DNA probe to eubacteria domain (EUB338 probe) labeled with fluorescein showed that most intestinal microflora of white shrimp aggregated in the intestinal contents, or dispersed in the lumen. There was no evidence of the attachment of the microflora with the intestinal epithelia.

Selection of probiotics bacteria for application in white shrimp was conducted by culturing *Lactobacillus plantarum* in specific media containing 0.5-3.0% NaCl. Agar well diffusion plate assay showed that *L. plantarum* had a high inhibitory activity against *Vibrio harveyi* and *V. parahaemolyticus* (12.50 $\pm$ 0.50 and 12.83 $\pm$ 0.29 mm, respectively). Co-culture experiment with *V. harveyi* (10^3 CFU/ml) indicated that growth of *V. harveyi* decreased with increasing *L. plantarum* population under *in vitro* conditions.

Application of *L. plantarum* in feed raised white shrimp and pursuing *L. plantarum* using rRNA-targeted oligonucleotide probe or DNA probe to *Lactobacillus* spp. group (Lab158) labeled with Cy3 were studied. It was found that *L. plantarum* was not detected in intestinal tract of the control group after stopped feeding the feed mixed with probiotic at 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hour. In the experiments 2 (*L. plantarum* 10^3 CFU/g in test diet), 3

(*L. plantarum* 10^6 CFU/g in test diet) and 4 (*L. plantarum* 10^9 CFU/g in test diet), *L. plantarum* was detected at 12, 24, 48 and 72 hours post feeding the feed mixed with probiotic. *L. plantarum* were aggregated with the intestinal contents which detected by FISH technique examined under epifluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy. After challenging 1 month old shrimps with a pathogen, *V. harveyi*, by immersion for 14 days, it was found that mixing *L. plantarum* in the feed at a concentration of 10^9 CFU/g resulted in improved survival with only 30% mortality of which was significantly lower ($p < 0.05$) than those of the control group with 60% mortality.