ภาคผนวก ก

สารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับเทคนิค FISH

1.1 5 M NaCl

ชั่ง NaCl 58 กรัม ใส่ลงในน้ำ Milli-Q ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร กวนจนละลายซึ่งอาจต้องใช้เวลานาน แล้วจึงนำไป Autoclave

1.2 1 M TRIS-HCl

ชั่ง TRIS-HCl 31.5 กรัม ใส่ลงในน้ำ Milli-Q ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ทำให้ละลาย และปรับค่า pH 7.2 ด้วย 2M NaOH แล้วจึงนำไป Autoclave (ไม่ควรใช้ TRIS แต่ควรใช้ TRIS-HCl ในการเตรียมสาร)

1.3 10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ใส่ลงในน้ำ Milli-Q ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร รอจนกว่าละลายประมาณ 20 นาที เก็บในขวด stock ไม่ต้อง Autoclave (ควรเตรียมสารใน fume hood เพราะว่า SDS ทำให้เกิดอาการระคายเคือง)

1.4 0.5 M EDTA

ชั่ง EDTA disodium hydrate 18.6 กรัม ใส่ลงในน้ำ Milli-Q ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 7.2 ด้วย NaOH ชนิดเม็ด ซึ่งอาจใช้จำนวนมาก หลังจากนั้นจึงนำไป Autoclave

1.5 Formamide

แบ่งใส่หลอด appendoff 2 มิลลิลิตร และเก็บในที่เย็น

1.6 Mounting fluid (Anti-fading solution)

ละลาย *p*-phenylenediamine (toxic) 100 มิลลิกรัม ใน 0.5 M $NaCO_3$ (pH 9.0) 10 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม glycerol 100 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 90 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด appendoff ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสไลด์

ล้างสไลด์ (Teflon-coated slides) ด้วยการต้มน้ำที่ใส่น้ำยา Teepol ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ทิ้งให้แห้ง จุ่มในสารลาย gelatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ chromium potassium sulfate 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ต้มในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส ทิ้งให้แห้ง เก็บสไลด์ในกล่องที่มิดชิดเพื่อพร้อมใช้งาน

3. การเตรียม Hybridization buffer

เตรียมในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร โดยเติม

5 M NaCl	360	µl
1 M Tris-HCl	40	µl
Formamide	a	µl (ขึ้นอยู่กับ Probe-ดูตารางภาคผนวก ก ที่ 1)
น้ำ Milli-Q	b	µl (ขึ้นอยู่กับ Formamide-ดูตารางภาคผนวก ก ที่ 1)
10% SDS	2	µl เติมสุดท้ายเพื่อป้องกันการตกตะกอน โดย

หยดลงบนฝาด้านในของหลอด จากนั้นคว่ำ-หงายหลอดให้เข้ากัน ห้ามเขย่าจะทำให้เกิดฟองได้

หมายเหตุ วัสดุทุกอย่างที่สัมผัส Formamide ให้ทิ้งรวมใส่ถุงไว้แยกไปกำจัด

ตารางภาคผนวก ก ที่ 1 การเตรียม Hybridization buffer

Table (Appendix) A1 Preparation of hybridization buffer

ปริมาณ Formamide (μl) = a	%Formamide บนหลุม	ปริมาณน้ำ Milli-Q (μl) = b
0	0	1,598
100	5	1,498
200	10	1,398
300	15	1,298
400	20	1,198
500	25	1,098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

ที่มา : Amann *et al.*, (1995)

4. การเตรียม Washing buffer

เตรียมในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

5 M NaCl	c	μl (ขึ้นอยู่กับ %Formamide-ดูตารางภาคผนวก ก ที่ 2)
1 M Tris-HCl	1	ml
น้ำ Milli-Q	ขึ้นอยู่กับปริมาณ NaCl-เติมให้ครบ 50 ml	
10% SDS	50	μl (เติมสุดท้าย)

ตารางภาคผนวก ก ที่ 2 การเตรียม Washing buffer

Table (Appendix) A2 Preparation of washing buffer

%Formamide	NaCl (M)	c µl 5 M NaCl	µl 5 M EDTA
0	0.900	9,000	-
5	0.636	6,360	-
10	0.450	4,500	-
15	0.318	3,180	-
20	0.225	2,250	500
25	0.159	1,590	500
30	0.112	1,120	500
35	0.080	800	500
40	0.056	560	500
45	0.040	400	500
50	0.028	280	500

ที่มา : Amann *et al.*, (1995)

ตารางภาคผนวก ก ที่ 3 โพรบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Table (Appendix) A3 Probes were used in this study

No.	Probe name	Sequence (5'-3')	Labeled	Specific	Reference
1	EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	fluorescein	Domain bacteria	Amann *et al.*, 1990
2	Lab158	GGTATTAGCA(T/C)CTGTTTCCA	Cy-3	*Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp.	Harmsen *et al.*, 1999
3	GV	AGG CCA CAA CCT CCA AGTAG	Cy-3	*Vibrio* spp.	Eilers *et al.*, 2000

ภาคผนวก ข

วิธีคำนวณ

1. การคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้ง

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (Arbitary Unit /ml)} = \frac{1000\mu l \times A}{B\mu l}$$

A คือค่าความเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใส

B คือปริมาตรส่วนใสที่หยดลงในหลุม

ที่มา : Schillinger และ Lucke (1989)

2. การคำนวณแบคทีเรียในลำไส้บด

$$\textbf{Total number of bacterial (cell/g)} = \frac{(a \times b)}{(c \times d \times e)}$$

a = number of bacterial cells per field of view

b = area of sample spot

c = area of the field of view (FOV)

d = volume and dilution of the sample applied

e = original volume of the sample used for hybridization

ที่มา : Davenport *et al.*, (2000) และ Olivera *et al.*, (2003)

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 ปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารกุ้งขาวทดลอง

Table (Appendix) C 1 Viable count (CFU/g) of *L. plantarum* in test diet

Day	Viable count (CFU/g) of *L. plantarum* in test diet			
	T1	T2	T3	T4
1	-	1.57×10^{3}	2.14×10^{6}	2.41×10^{9}
2	-	1.13×10^{3}	1.85×10^{6}	2.27×10^{9}
3	-	1.07×10^{3}	1.69×10^{6}	1.41×10^{9}
Mean	-	1.26×10^{3}	1.89×10^{6}	2.03×10^{9}

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 คุณภาพน้ำที่ใช้ตลอดการทดลอง

Table (Appendix) C 2 Water quality of this experiment

Treatment	**pH**	**Salt (ppt)**	**Alkalinity (mg/l)**	**Temperature (^{o}C)**
T1	7.40-7.71	16	94.0-95.0	26-28
T2	7.36-7.76	16	93.0-94.0	26-28
T3	7.39-7.77	16	92.5-94.0	26-28
T4	7.37-7.71	16	94.0-95.0	26-28

ตารางภาคผนวก ค ที่ 3 ปริมาณ *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งบดตามระยะเวลาต่างๆ

Table (Appendix) C 3 *L. plantarum* in white shrimp's intestine at various time

Hour	T1	T2 (cell/g intestine)	T3 (cell/g intestine)	T4 (cell/g intestine)
12	0	$6.09\times10^{6}\pm2.29\times10^{6}$	$2.88\times10^{6}\pm1.50\times10^{6}$	$8.40\times10^{6}\pm3.27\times10^{6}$
24	0	$1.86\times10^{7}\pm3.47\times10^{6}$	$3.18\times10^{7}\pm2.02\times10^{7}$	$1.27\times10^{7}\pm6.41\times10^{6}$
48	0	$4.97\times10^{6}\pm1.31\times10^{6}$	$7.07\times10^{6}\pm1.94\times10^{6}$	$1.85\times10^{7}\pm4.86\times10^{6}$
72	0	$1.27\times10^{7}\pm4.08\times10^{6}$	$1.27\times10^{7}\pm2.22\times10^{6}$	$1.93\times10^{7}\pm4.60\times10^{6}$

Means ± SD. Using FISH, 5-15 microscopic fields were counted

ตารางภาคผนวก ค ที่ 4 ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งบดตามระยะเวลาต่างๆ

Table (Appendix) C 4 *Vibrio* spp. in white shrimp's intestine at various time

Hour	T1 (cell/g intestine)	T2 (cell/g intestine)	T3 (cell/g intestine)	T4 (cell/g intestine)
1	$3.04x10^6 \pm 1.15x10^6$	$3.82x10^6 \pm 5.27x10^5$	$5.78x10^6 \pm 1.38x10^6$	$2.76x10^6 \pm 1.24x10^6$
2	$4.18x10^6 \pm 1.18x10^6$	$3.62x10^6 \pm 8.37x10^5$	$3.48x10^6 \pm 1.40x10^6$	$5.26x10^6 \pm 1.26x10^6$
3	$1.44x10^7 \pm 3.88x10^6$	$7.86x10^6 \pm 2.49x10^6$	$6.38x10^6 \pm 2.02x10^6$	$6.71x10^6 \pm 3.58x10^6$
6	$8.5x10^6 \pm 2.83x10^6$	$7.84x10^6 \pm 1.81x10^6$	$6.42x10^6 \pm 7.01x10^5$	$4.06x10^6 \pm 1.10x10^6$
12	$7.94x10^6 \pm 2.94x10^6$	$6.80x10^6 \pm 6.92x10^5$	$2.54x10^6 \pm 1.76x10^6$	$2.38x10^6 \pm 6.62x10^5$
24	$2.21x10^6 \pm 8.64x10^5$	$8.75x10^6 \pm 5.16x10^5$	$4.65x10^6 \pm 2.43x10^6$	$1.76x10^6 \pm 2.81x10^6$
48	$4.26x10^6 \pm 6.48x10^5$	$3.16x10^6 \pm 1.00x10^6$	$3.24x10^6 \pm 5.80x10^5$	$2.67x10^6 \pm 7.67x10^5$
72	$7.18x10^6 \pm 3.25x10^6$	$6.50x10^6 \pm 2.06x10^6$	$5.65x10^6 \pm 1.24x10^6$	$6.44x10^6 \pm 4.95x10^5$

Means ± SD. Using FISH, 5-15 microscopic fields were counted

ตารางภาคผนวก ค ที่ 5 การตายของกุ้งขาวจากการแช่เชื้อ *V. harveyi* ในระยะเวลา 14 วัน

Table (Appendix) C 5 Effect on mortality following *V. harveyi* immersion challenge in white shrimp held for 14 days

Treatment		**No. dead/no. total**	**Mortality rate (%)**
T1	**R1**	5/10	50
	R2	7/10	70
	R3	6/10	60
		Mean% mortality±SD	60.00 ± 10.00^{c}
T2	**R1**	5/10	50
	R2	5/10	50
	R3	5/10	50
		Mean% mortality±SD	50.00 ± 0.00^{bc}
T3	**R1**	4/10	40
	R2	5/10	50
	R3	4/10	40
		Mean% mortality±SD	43.33 ± 5.77^{ab}
T4	**R1**	2/10	20
	R2	4/10	40
	R3	3/10	30
		Mean% mortality±SD	30.00 ± 10.00^{a}

Mean within column not sharing a common superscript are statistically different ($p<0.05$)