

**192941**

ติดฉลาก BS11 ด้วยโปรตีนจีเอฟพีเพื่อใช้ในการติดตาม BS11 โดยการนำพลาสมิด pAD44-12 ที่มียีน *gfpmut3a* เข้าสู่คอมพีเทนท์ BS11 ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ได้ BS11-GFP ซึ่งจะเห็นการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากการเลี้ยง BS11-GFP ไป 50 รุ่น ในอาหารเหลวที่ไม่มียาปฏิชีวนะเป็นตัวคัดเลือก พบว่าความเสถียรของพลาสมิดใน BS11 เท่ากับ 77.85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสม BS11-GFP ในอาหารกุ้งในอัตราส่วนเซลล์สดต่ออาหารกุ้ง เท่ากับ 1:3 ได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ  $10^5$  CFU/กรัม และเมื่อนำอาหารกุ้งไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบ BS11-GFP ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีเขียว การเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสม BS11-GFP ในระดับบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าการเจริญของกุ้ง ปริมาณ BS11 ในน้ำ และปริมาณ BS11 ในลำไส้ ไม่มีความแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงด้วย BS11 แสดงว่ายีน *gfpmut3a* ไม่มีผลต่อคุณสมบัติของ BS11 และเมื่อตัดเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบ BS11-GFP ที่มีการเรืองแสงสีเขียวบริเวณผนังลำไส้กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11-GFP แสดงว่า BS11-GFP สามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร และสามารถเข้าไปยึดเกาะกับผนังลำไส้กุ้งกุลาดำได้

**192941**

A green fluorescent protein (GFP) expressing plasmid, pAD44-12 carrying *gfpmut3a* gene, was introduced into competent *Bacillus* S11 (BS11) by electroporation for labeling BS11 in order to allow *in vivo* detection. Electrotransformation of BS11 resulted in clone BS11-GFP which fluoresce green under fluorescence microscope. Plasmid stability, during approximately 50 generations of growth without antibiotic selection, was 77.85 percent. BS11-GFP was mixed into shrimp feed at the ratio of 1:3 (wet cell weight per shrimp feed) to get final concentration  $\sim 10^5$  CFU  $g^{-1}$ . Detectability of green fluoresce cells under fluorescence microscope from BS11-GFP mixed-feed shrimp was observed. After feeding shrimp 3 times daily in 400 liters cement tanks for 9 weeks, average shrimp weight, number of BS11 in cultured water and in shrimp's gut showed no difference between BS11-GFP treatment and BS11 treatment. These results suggest that *gfpmut3a* gene has no effect on BS11 properties and shrimp growth. Sections of shrimp's intestines prepared by following the procedure of histological techniques were examined under fluorescence microscope. Detection of green fluoresce BS11-GFP on the surface of intestines demonstrated that BS11-GFP in shrimp feed survived and adhered on shrimp intestines' surface.