

ชื่อวิทยานิพนธ์	โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากไวรัสทอรา โรควิบรีโอซิสและโพรไบโอติกในกุ้งขาว ( <i>Penaeus vannamei</i> )
ผู้เขียน	นายกิตติชนม์ อุเทนพะพันธุ์
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2549

### บทคัดย่อ

เทคนิค Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาชุมชนแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ จึงนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากเชื้อไวรัสทอรา, โพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, และแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* AAHRC 01 จากการศึกษาชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อคินโดยการแบ่งทางเดินอาหารออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลาย แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียมีความแตกต่างกัน โดยตับและตับอ่อนกุ้งปกติจะพบแบคทีเรียกลุ่ม  $\beta$ -Proteobacteria และ  $\gamma$ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในสัดส่วน  $28.86 \pm 4.81\%$  และ  $26.18 \pm 6.88\%$  ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เพียง  $0.86 \pm 1.42\%$  ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria ทั้งหมด ในขณะที่ชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนพบว่า มี *Low G+C Gram-Positive Bacteria* (LGC) เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น โดยในลำไส้ส่วนต้นพบในสัดส่วน  $36.40 \pm 3.52\%$  และในลำไส้ส่วนปลายพบ  $30.34 \pm 4.66\%$  แต่เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสทอราพบว่า แบคทีเรียกลุ่มหลักในตับและตับอ่อนเปลี่ยนเป็นแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria เพียงชนิดเดียวในสัดส่วน  $73.52 \pm 12.53\%$  และพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัดส่วนสูงถึง  $86.26 \pm 4.07\%$  ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria ทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนที่พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria จนการเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส โดยในลำไส้ส่วนต้นพบในสัดส่วน  $51.34 \pm 4.95\%$  และลำไส้ส่วนปลายพบ  $46.38 \pm 5.29\%$  ของแบคทีเรียทั้งหมด ในขณะที่การศึกษาร่องปลอกเลือดแสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อทอราทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งลดลง ปริมาณกลูโคสสูงขึ้น และไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Oxyhemocyanin ในน้ำเลือดของกุ้ง

จากการทดสอบยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสทอราและ *V. harveyi* AAHRC 01 รวมถึงการได้รับโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 050 ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาในตับและตับอ่อนและลำไส้ (anterior intestine+posterior intestine) ด้วยเทคนิค FISH ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสทอรา, เชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01, และเชื้อไวรัสทอราพร้อมกับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทั้งตับและตับอ่อนและลำไส้ของกุ้งที่ทำการศึกษา ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติก ร่วมกับการให้เชื้อก่อโรค แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* TISTR 050 มีศักยภาพในการควบคุมปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. รวมถึงการรักษาสมดุลของชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งทั้งสองส่วนที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการยังแสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อไวรัสทอราและ/หรือ *V. harveyi* AAHRC 01 มีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงและปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดสูงขึ้น แต่ในชุดการทดลองที่เสริมโปรไบโอติกพบว่าการติดเชื้อไวรัสทอราและ/หรือ *V. harveyi* AAHRC 01 ไม่มีผลต่อองค์ประกอบเลือดของกุ้งมากนัก แต่อย่างไรก็ตาม *L. plantarum* TISTR 050 สามารถคงอยู่ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ไม่นานนัก โดยสามารถคงอยู่ในตับและตับอ่อนได้นานกว่า 24 ชั่วโมงในขณะที่สามารถอยู่ในลำไส้ได้นานกว่า 5 วัน

<b>Thesis Title</b>	Gut Bacterial Community Structure and Their Alteration Due to Taura Syndrome Virus, Vibriosis, and Probiotic in White Shrimp ( <i>Penaeus vannamei</i> )
<b>Author</b>	Mr. Kittichon U-taynapun
<b>Major Program</b>	Aquatic Science
<b>Academic Year</b>	2006

### ABSTRACT

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique is very efficient for evaluate microbial community dynamics in various environments. It is possible to apply this technique for study shrimp gut bacterial community and its dynamic when stimulated with Tuara syndrome virus (TSV), probiotic (*L. plantarum* TISTR 050) and pathogenic bacteria (*V. harveyi* AAHRC 01). By education from earthen ponds, bacterial community structure in every part, that study, of healthy white shrimp gut were defferent from TSV infected. The samples were collected from three part i.e., hepatopancreas, anterior intestine, and posterior intestine. The results of healthy white shrimp gut showed that  $\beta$ -Proteobacteria group (28.86 $\pm$ 4.81%) and  $\gamma$ -Proteobacteria group (26.18 $\pm$ 6.88%) were major groups of bacterial flora, found in hepatopancreas which *Vibrio* spp. were detected less about 0.86 $\pm$ 1.42% of total  $\gamma$ -Proteobacteria group. In contrast, *Low G+C Gram-Positive Bacteria* (LGC) group was the most abundant group in the both of intestinal tract (36.40 $\pm$ 3.52% in anterior intestine and 30.34 $\pm$ 4.66% in posterior intestine). In the case of TSV infected white shrimp, bacterial community structures were seriously changed from healthy white shrimp. Only  $\gamma$ -Proteobacteria group was dominance bacterial group in three part of shrimp gut (73.52 $\pm$ 12.53% in hepatopancreas, 51.34 $\pm$ 4.95% in anterior intestine, and in 46.38 $\pm$ 5.29% posterior intestine), in particular *Vibrio* spp. were detected as high up to 86.26 $\pm$ 4.07% of total  $\gamma$ -Proteobacteria group in hepatopancreas. The blood parameters analysis had shown that TSV could reduce the total blood cell but glucose level in heamolymph increase, however there was no effect to change the level of oxyhemocyanin in heamolymph

The effect of TSV, *L. plantarum* TISTR 050, and *V. harveyi* AAHRC 01 on dynamic of bacterial communities in shrimp gut were studied in seted system. The samples were

collected from two parts, hepatopancreas and intestine (anterior intestine+posterior intestine). The results confirmed that TSV, *V. harveyi* AAHRC 01, and TSV combined with *V. harveyi* AAHRC 01 could increase  $\gamma$ -Proteobacteria group and *Vibrio* spp. in both gut sections. The combination of *L. plantarum* TISTR 050 and virus or pathogenic bacteria showed the potential of *L. plantarum* TISTR 050 to control *Vibrio* spp. and maintain the bacterial community equability in shrimp gut. Blood parameters analysis in seted system showed that TSV, *V. harveyi* AAHRC 01, and TSV combined with *V. harveyi* AAHRC 01 could reduce level of total blood cell but increase glucose level in haemolymph. Conversely TSV and/or *V. harveyi* AAHRC 01 have on strong effect on blood parameters of probiotic-treated shrimp. However, *L. plantarum* TISTR 050 can not be detected in shrimp gut in long period of time, that it was found in hepatopancreas up to 24 hr. and 5 days in intestine.