

บทที่ 3

ผลการทดลอง

งานวิจัยฉบับนี้ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากเชื้อไวรัสทอราโรควิริโอซิสและโปรไบโอติก โดยทำการแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ 1. การศึกษาองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสทอราโรควิริโอซิสในสภาพการเลี้ยงเชิงการค้าของระบบการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (intensive system) ในบ่อดิน เพื่อศึกษาถึงค่าปกติขององค์ประกอบเลือดและสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่ทำการศึกษาในทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัส โดยทำการศึกษาใน 3 พื้นที่การเลี้ยงบริเวณภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบ เพื่อสรุปถึงผลกระทบของการเกิดโรคทอราต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน จากนั้นทำการยืนยันผลการศึกษาที่ได้จากบ่อดินอีกครั้งหนึ่งในการทดลองที่ 2 โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวจากผลของการติดเชื้อไวรัสทอรา แบคทีเรียก่อโรครวมถึงประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อก่อโรคและการควบคุมเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารกุ้งด้วยโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ โดยทำการตรวจสอบค่าองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของกุ้งจำนวน 6 ชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย

- T1 กุ้งขาวปกติได้รับอาหารปกติ (Control)
- T2 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 (VH)
- T3 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อไวรัสทอรา (TSV)
- T4 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 050 (VH+LP)
- T5 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อไวรัสทอราพร้อมกับ *V. harveyi* AAHRC 01 (TSV+VH)
- T6 กุ้งขาวปกติที่ได้รับเชื้อไวรัสทอราและเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 050 (TSV+VH+LP)

เพื่อยืนยันถึงการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารกุ้ง เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสทอรา รวมถึงการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงชุมชนแบคทีเรียเมื่อเกิดการติดเชื้อ *V. harveyi* และ *V. harveyi* ร่วมกับเชื้อไวรัสทอรา นอกจากนี้ยังทำการศึกษาดังประสิทธิภาพของโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 050 ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสภาวะที่มีการติดเชื้อ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวและ *V. harveyi* ร่วมกับเชื้อไวรัสทอรา

3.1 ศึกษาค่าองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของ กุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อดิน

วิเคราะห์ค่าองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราทำการวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count), ค่า Oxyhemocyanin ในน้ำเลือด, ปริมาณกลูโคส (blood glucose)

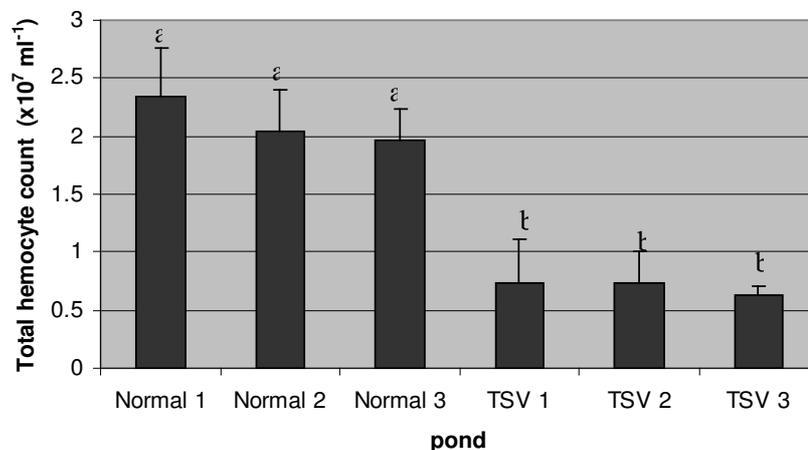
ศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวม (total bacteria) และ แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา โดยทำการศึกษาในดับและดับอ่อน, ลำไส้ส่วนต้น, และลำไส้ส่วนปลาย ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งที่มีสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอราจาก 3 พื้นที่การเลี้ยงของภาคใต้ตอนล่าง รวมถึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งตัวอย่างด้วยเทคนิค FISH เพื่อทำการศึกษาดังผลของสภาพพื้นที่การเลี้ยงต่อลักษณะของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารแต่ละส่วนทั้งในสภาวะที่กุ้งมีสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารแต่ละส่วนที่ทำการศึกษา เพื่ออธิบายถึงผลกระทบของการเป็นโรคทอราต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวในสภาวะการเลี้ยงจริงในบ่อดิน

3.1.1 ค่าองค์ประกอบเลือดกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อดิน

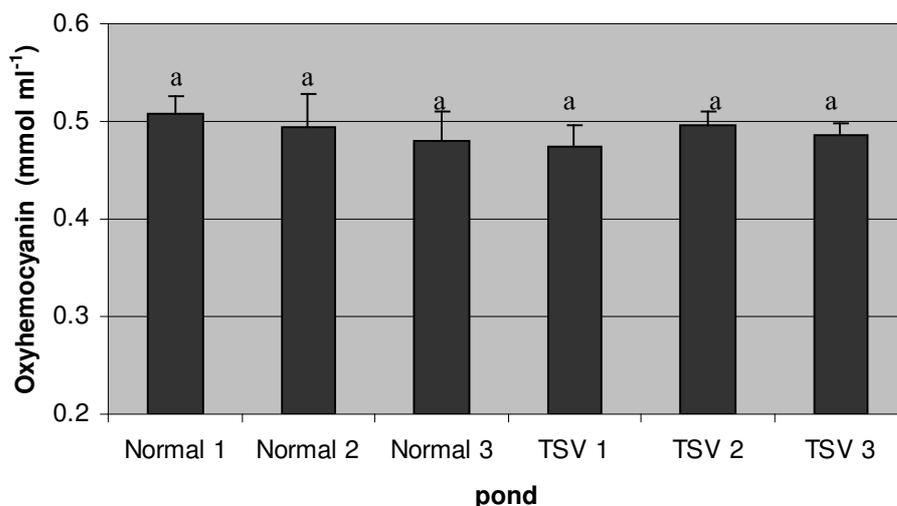
ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งปกติในบ่อดินจากทั้ง 3 แหล่ง พบว่ามีปริมาณเฉลี่ยระหว่าง 1.83×10^7 - 2.44×10^7 เซลล์/มล. โดยทั้ง 3 บ่อมีปริมาณเม็ดเลือดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อทำการตรวจสอบกุ้งติดเชื้อไวรัสทอราทั้ง 3 บ่อ พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ โดยกุ้งติดเชื้อไวรัสทอราจะมีปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ยระหว่าง 6.2×10^6 - 7.7×10^6 เซลล์/มล. ดังภาพที่ 12

ปริมาณ Oxyhemocyanin ในน้ำเลือดของกุ้งปกติในบ่อดินจากทั้ง 3 แหล่ง พบว่ามีปริมาณเฉลี่ยระหว่าง 0.48-0.51 มิลลิโมล/มล. และกุ้งติดเชื้อไวรัสทอรา มีปริมาณเฉลี่ยระหว่าง 0.47-0.50 มิลลิโมล/มล. เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังภาพที่ 13

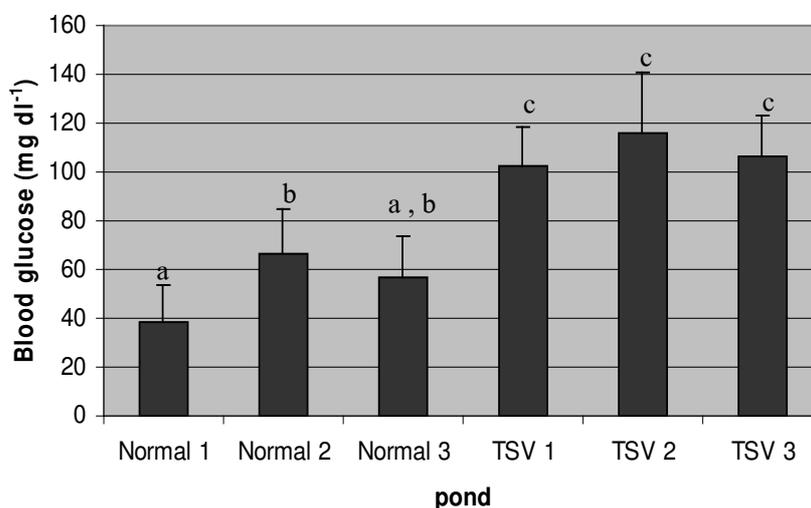
ปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดของกุ้งปกติจากทั้ง 3 แหล่งพบว่ามีปริมาณเฉลี่ยระหว่าง 38.17 - 66.08 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยกุ้งปกติจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก (normal 1) มีปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดไม่แตกต่างกับกุ้งปกติจากแหล่งเลี้ยงจากทะเลสาบสงขลา (normal 3) ($P < 0.05$) และกุ้งปกติจากแหล่งเลี้ยงจากฝั่งตะวันออก (normal 2) มีปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดไม่แตกต่างกับกุ้งปกติจากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา ($P < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดของกุ้งติดเชื้อไวรัสจะมีปริมาณเฉลี่ยระหว่าง 102.74-115.85 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งกุ้งติดเชื้อไวรัสจากทุกแหล่งเลี้ยงมีปริมาณกลูโคสเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติพบว่า กุ้งติดเชื้อมีปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดมากกว่ากุ้งปกติจากทุกแหล่งอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 12 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อดิน โดย Normal 1 และ TSV1 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก, Normal 2 และ TSV2 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก, Normal 3 และ TSV3 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา ค่าเฉลี่ยในภาพที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)



ภาพที่ 13 ปริมาณ Oxyhemocyanin ในน้ำเลือดของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อดินโดย Normal 1 และ TSV1 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก, Normal 2 และ TSV2 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก, Normal 3 และ TSV3 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา ค่าเฉลี่ยในภาพที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)



ภาพที่ 14 ปริมาณกลูโคสในน้ำเลือดของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อดินโดย Normal 1 และ TSV1 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก, Normal 2 และ TSV2 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก, Normal 3 และ TSV3 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา ค่าเฉลี่ยในภาพที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)

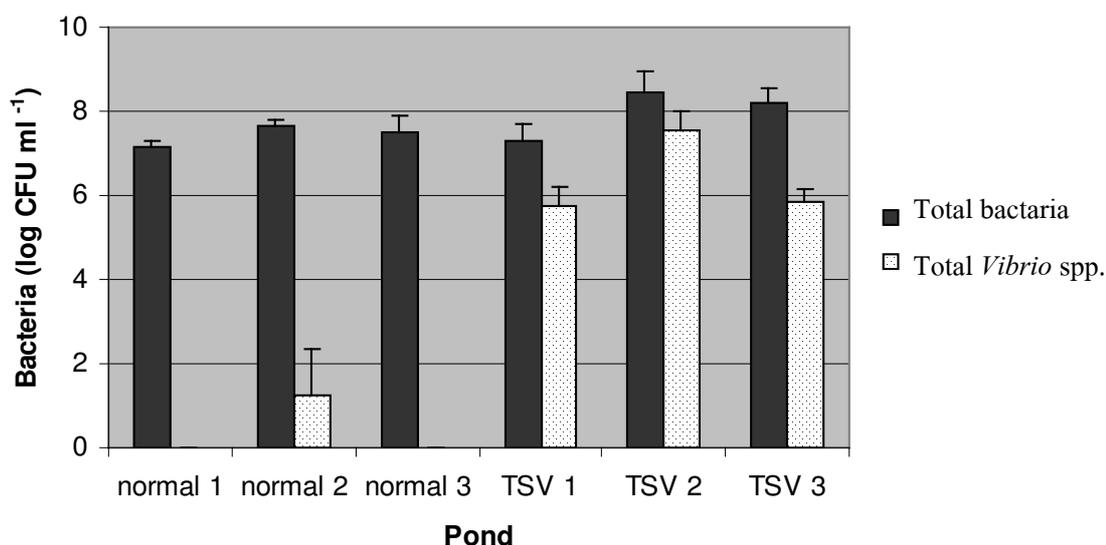
3.1.2 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อดินโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

จากการตรวจสอบตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสทอราจาก 3 แหล่งเลี้ยงที่สำคัญในภาคใต้ของประเทศไทย โดยการการสุมตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสทอราอย่างละ 1 บ่อจากแต่ละแหล่งเลี้ยง ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คืออาหาร TSA ที่มีการเติมเกลือ 1.5% และอาหาร TCBS ที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ตามลำดับ โดยทำการตรวจสอบในทางเดินอาหาร 3 ส่วนได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลาย แต่เนื่องจากข้อมูลที่ได้มีการกระจายตัวในช่วงกว้าง ดังนั้นจึงทำการปรับฐานข้อมูลของจำนวนแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นข้อมูลในรูป \log_{10} และไม่นำข้อมูลดังกล่าวไปวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในทางเดินอาหารทุกส่วนที่ทำการศึกษาของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักแต่อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียรวมก็มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสทอรา ในขณะที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสในทุกส่วนของทางเดินอาหารที่ทำการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับและตับอ่อน ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญในการชีวิตสุขภาพกุ้ง

3.1.2.1 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา

ข้อมูลปริมาณแบคทีเรียรวมมีการกระจายในช่วงกว้างและไม่สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียรวมในตับและตับอ่อนของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสออกจากกันได้ชัดเจน โดยแบคทีเรียรวมในตับและตับอ่อนของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสมีปริมาณระหว่าง 7.14-8.45 $\log\text{CFU ml}^{-1}$ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียรวมในตับและตับอ่อนก็มีแนวโน้มสูงขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสทอรา นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. จะมีปริมาณสูงขึ้นอย่างชัดเจนในกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสจากทุกแหล่งเลี้ยง โดยกุ้งปกติจะพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนเฉลี่ยระหว่าง 0-1.26 $\log\text{CFU ml}^{-1}$ ในขณะที่กุ้งติดเชื้อไวรัสพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนเฉลี่ยระหว่าง 5.73-7.53 $\log\text{CFU ml}^{-1}$ ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งจากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนประชากรในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัส น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม

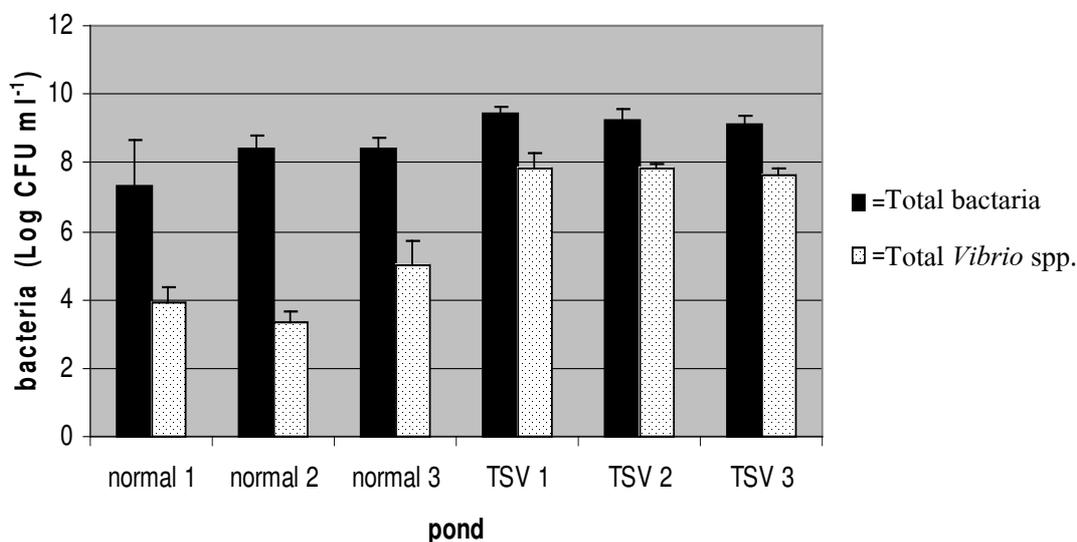
Vibrio spp. มีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียรวมของกึ่งติดเชื้อไวรัสมีการเพิ่มสูงขึ้นไม่มากนักเมื่อทำการเปรียบเทียบกับกึ่งปกติ



ภาพที่ 15 ปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในต้นและต้นอ่อนของกึ่งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อดินโดย Normal 1 และ TSV 1 คือ ตัวอย่างกึ่งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก, Normal 2 และ TSV 2 คือ ตัวอย่างกึ่งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก, Normal 3 และ TSV 3 คือ ตัวอย่างกึ่งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา

3.1.2.2 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา

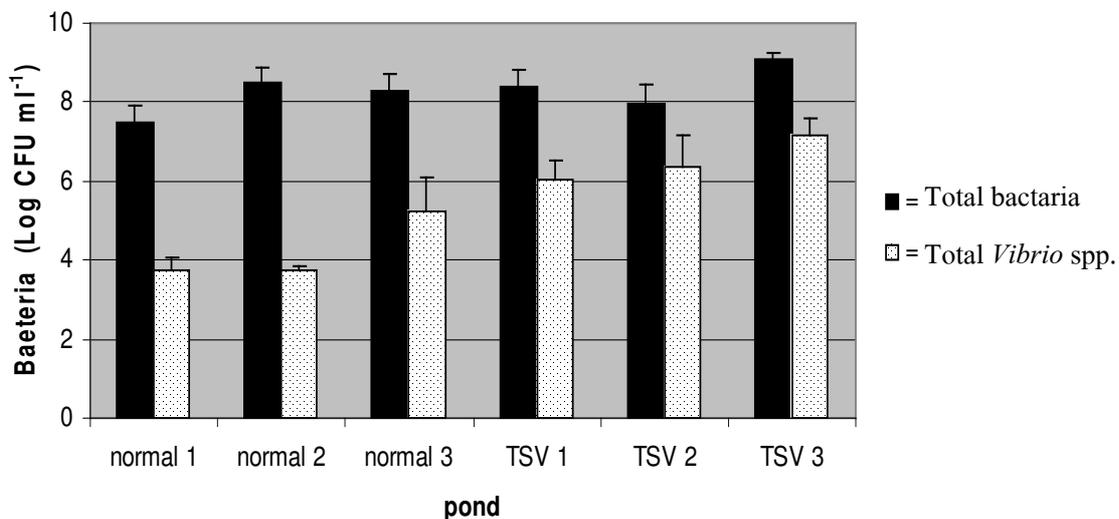
จากการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวมในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งปกติและติดเชื้อไวรัสพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมมีการกระจายตัวในช่วงกว้าง โดยแบคทีเรียรวมในลำไส้ของกึ่งปกติทั้ง 3 แหล่งมีปริมาณระหว่าง 7.33-8.41 logCFU ml⁻¹ และแบคทีเรียรวมในลำไส้ของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสมีปริมาณระหว่าง 9.14-9.44 logCFU ml⁻¹ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของแบคทีเรียรวมในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสทอราคี่มีแนวโน้มที่สูงขึ้นจากกึ่งปกติ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งติดเชื้อไวรัสจากทั้ง 3 แหล่งมีปริมาณสูงกว่ากึ่งปกติอย่างชัดเจน โดยมีปริมาณระหว่าง 7.65-7.86 logCFU ml⁻¹ ในขณะที่กึ่งปกติพบในปริมาณระหว่าง 3.35-4.99 logCFU ml⁻¹ ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาว ปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อดินโดย Normal 1 และ TSV 1 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก, Normal 2 และ TSV 2 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก, Normal 3 และ TSV 3 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา

3.1.2.3 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา

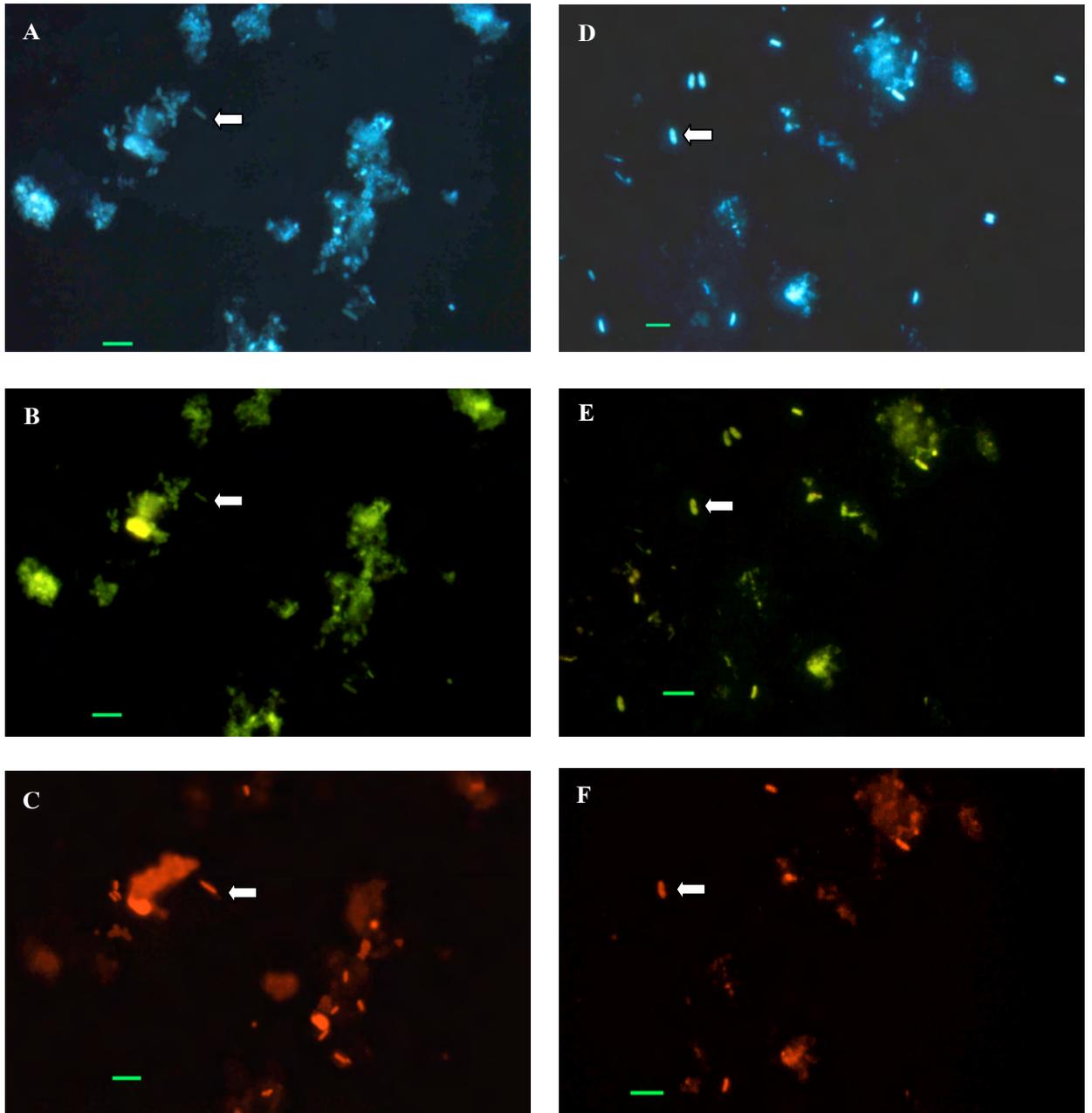
ปริมาณแบคทีเรียรวมในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสมีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก จากการศึกษาพบว่าลำไส้ส่วนปลายมีปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยของทั้งกุ้งปกติอยู่ระหว่าง 7.51-8.49 logCFU ml⁻¹ และติดเชื้อไวรัสทอรา มีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ระหว่าง 7.96 - 9.11 logCFU ml⁻¹ ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งปกติและติดเชื้อไวรัสมีการกระจายตัวในช่วงที่กว้าง โดยกุ้งปกติจะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. น้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัส ยกเว้นกุ้งปกติจากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลาจะมีปริมาณใกล้เคียงกับกุ้งติดเชื้อไวรัส โดยกุ้งปกติพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในปริมาณระหว่าง 3.74-5.26 logCFU ml⁻¹ ในขณะที่กุ้งติดเชื้อไวรัสทอราพบ *Vibrio* spp. ในปริมาณระหว่าง 6.06-7.17 logCFU ml⁻¹ นอกจากนี้ข้อมูลที่พบยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากทุกแหล่งเลี้ยงมีปริมาณไม่แตกต่างแตกต่างกันมากนัก ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาว ปกติและติดเชื้อไวรัสในบ่อคิน โดย Normal 1 และ TSV 1 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตก, Normal 2 และ TSV 2 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก, Normal 3 และ TSV 3 คือ ตัวอย่างกุ้งปกติและติดเชื้อ TSV จากแหล่งเลี้ยงทะเลสาบสงขลา

3.1.3 การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสในปอดด้วยเทคนิค FISH

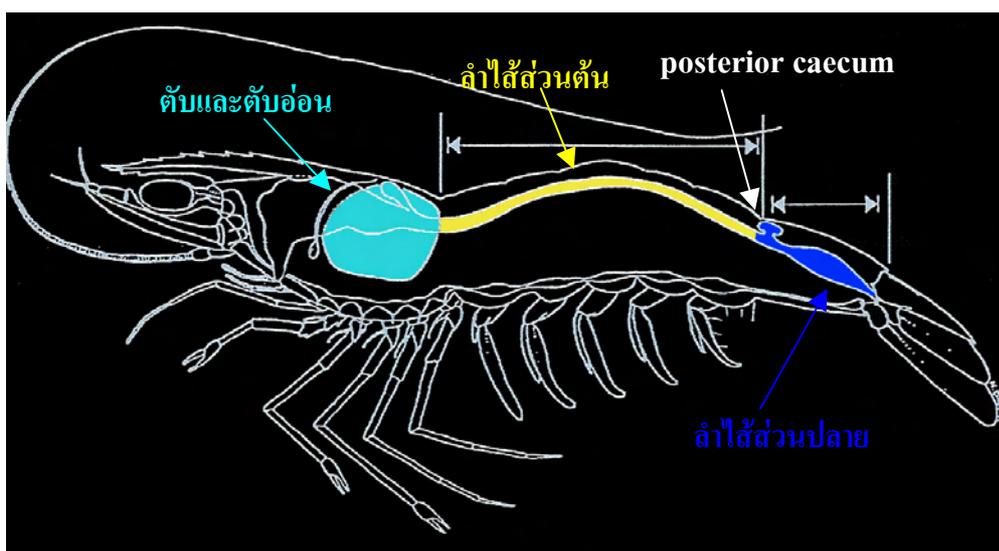
ในการวิจัยครั้งนี้จะทำการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในปอดด้วยเทคนิค FISH ซึ่งผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าทางเดินอาหารแต่ละส่วนของกุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติมีส่วนของกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มของแบคทีเรียเด่นที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งขาวเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสทอรา จากการใช้โพรบ 2 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ที่สามารถตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมด (*Eubacteria*) และโพรบที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาทำการ hybridization พร้อมกันในตัวอย่างที่ทำการศึกษาร่วมกับการย้อมเซลล์ด้วยสารย้อมเรืองแสง DAPI สามารถที่จะแสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาในทางเดินอาหารของกุ้งได้จากการที่เซลล์แบคทีเรียมีการเรืองแสงที่แตกต่างกัน โดยเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกเซลล์จะสามารถติดสีเรืองแสงของ DAPI ได้ซึ่งจะมีการเรืองแสงสีน้ำเงิน ในขณะที่โพรบ EUB338 mixed ซึ่งเป็นโพรบที่ใช้ในการติดตามแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacteria* ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้โพรบ EUB338 mixed ที่ติดฉลากสารเรืองแสง 2 ชนิด ได้แก่ Fluorescein ซึ่งแสดงการเรืองแสงสีเขียวและ Rhodamine ซึ่งแสดงการเรืองแสงสีแดง โดยจะทำการเลือกใช้สีที่มีความแตกต่างจากโพรบจำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในส่วนต่างๆของทางเดินอาหารที่ศึกษา ซึ่งตัวอย่างลักษณะการเรืองแสงของกลุ่มแบคทีเรียแสดงภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ภาพการเรืองแสงของกลุ่มจุลินทรีย์ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ที่ถ่ายในพื้นที่เดียวกัน A-C คือภาพของกลุ่มแบคทีเรียในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกิ้งชวาปกติและ D-F คือภาพของเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนปลายของกิ้งชวาปกติ โดยภาพ A และ D ข้อมด้วยสีข้อมเรืองแสง DAPI ภาพ B และ E ตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งหมด และภาพ C และ F ตรวจสอบด้วยโพรบ LGC mixed ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม LGC Bar, 5 μm .

3.1.3.1 การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารกึ่งขาพกติด้วย ปกติที่เลี้ยงในป๋อดินด้วยเทคนิค FISH

ทำการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกึ่งขาพกติด้วยเทคนิค FISH โดยแบ่งทางเดินอาหารที่ทำการศึกษออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ดับและดับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย โดยเริ่มจาก posterior caecum จนถึง anus ดังแสดงในภาพที่ 19 ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างจาก 3 แหล่งเลี้ยงของภาคใต้ตอนล่าง เพื่อศึกษาถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของทางเดินอาหารที่ทำการศึกษาจากสภาวะปกติของกึ่งขาพกติในสภาพการเลี้ยงจริงในป๋อดินรวมถึงผลของสภาพพื้นที่การเลี้ยงต่อโครงสร้างชุมชนแบคทีเรีย

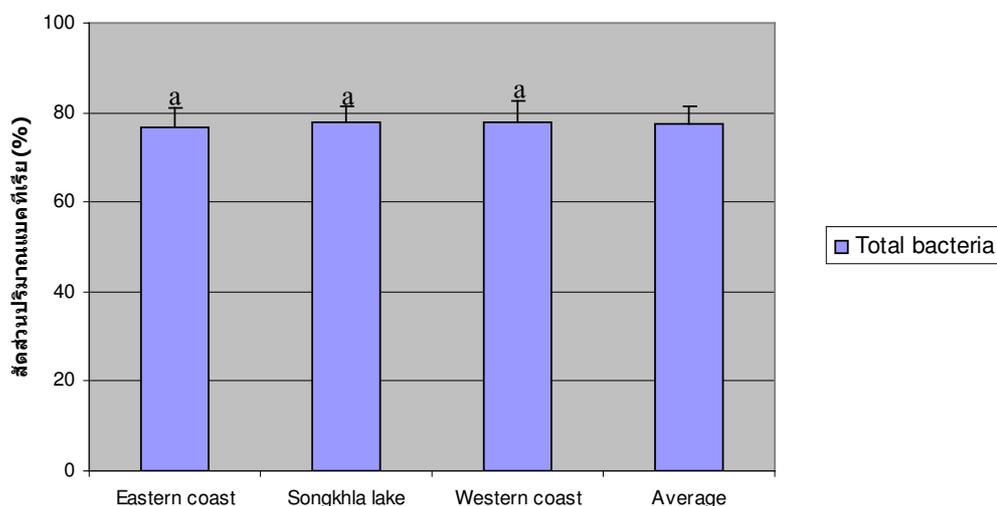


ภาพที่ 19 แสดงส่วนของทางเดินอาหารกึ่งขาพกติที่ทำการศึกษา

3.1.3.1.1 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในดับและดับอ่อนของกึ่งขาพกติ

จากการตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียในดับและดับอ่อนของกึ่งขาพกติที่เลี้ยงในป๋อดินด้วยเทคนิค FISH จากตัวอย่างกึ่งขาพกติทั้ง 3 แหล่งพบว่า มีปริมาณของ *Eubacteria* ในระหว่าง 76.77-78.00% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI (ภาพที่ 20) ซึ่งการตรวจสอบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากทั้ง 3 แหล่งการเลี้ยงแสดงให้เห็นถึงลักษณะของโครงสร้างประชากรที่ใกล้เคียงกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยตัวอย่างกึ่งขาพกติจากแหล่งเลี้ยงฝั่ง

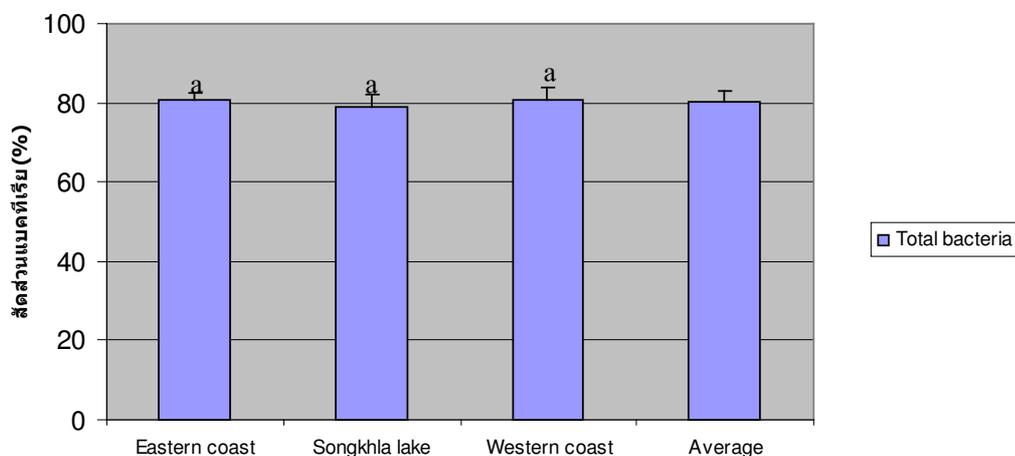
ตะวันออกและแหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลามิแบคทีเรียกลุ่ม β -proteobacteria และ γ -proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก โดยกึ่งจากแหล่งเลี้ยงตะวันออกพบ $29.88 \pm 5.84\%$ และ $26.36 \pm 5.56\%$ ตามลำดับและกึ่งจากแหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลาพบ $27.96 \pm 4.09\%$ และ $29.77 \pm 10.81\%$ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามกลุ่ม γ -proteobacteria หรือ β -proteobacteria ก็มีปริมาณไม่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับแบคทีเรียกลุ่ม LGC ขณะที่ตัวอย่างกึ่งจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกมีแบคทีเรียกลุ่ม β -proteobacteria, γ -proteobacteria, และ LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในสัดส่วน $28.74 \pm 6.23\%$, $22.40 \pm 0.91\%$ และ $26.11 \pm 2.10\%$ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข. ที่ 1) เมื่อทำการวิเคราะห์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria พบว่ากึ่งตัวอย่างจากทุกแหล่งเลี้ยงมีสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในดับและดับอ่อนระหว่าง 0.39 - 1.09% ของ γ -proteobacteria ทั้งหมดและมีสัดส่วนของ Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก โดยมีสัดส่วนระหว่าง 80.00 - 88.45% (ตารางภาคผนวก ข. ที่ 2) ขณะที่สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC พบว่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักซึ่งมีสัดส่วนประมาณ 41.97 - 47.47% ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม LGC ทั้งหมดเช่นเดียวกันในทุกแหล่งเลี้ยง (ตารางภาคผนวก ข. ที่ 3)



ภาพที่ 20 แสดงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนแบคทีเรียทั้งหมดในดับและดับอ่อนของกุ้งขาวปกติเมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ในการทำ FISH เทียบกับการใช้สีย้อม DAPI โดยแท่งกราฟที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ

3.1.3.1.2 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวปกติ

การตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นจากกุ้งขาวสุขภาพปกติที่เลี้ยงในบ่อดินทั้ง 3 แหล่งพบว่า มีปริมาณของ *Eubacteria* ในระหว่าง 78.78–80.81 % ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI (ภาพที่ 21) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุมชน จุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนต้นประกอบด้วยแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากการตรวจสอบ โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวส่วนต้นจากทั้ง 3 แหล่งด้วยเทคนิค FISH พบว่า ลักษณะของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียมีความใกล้เคียงกัน โดยมีแบคทีเรียกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยกุ้งจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออกพบ $34.77 \pm 1.34\%$ กุ้งจากแหล่งที่ใช้ น้ำจากทะเลสาบสงขลาพบ $34.50 \pm 3.56\%$ กุ้งจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกพบ $39.93 \pm 2.69\%$ แต่ชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งจากแหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลานอกจากจะมีแบคทีเรียกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักแล้วยังพบว่ามีแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria ในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างที่สถิติ ($P < 0.05$) กับแบคทีเรียในกลุ่ม LGC ในขณะที่ลำไส้ส่วนต้นของกุ้งจากแหล่งอื่นพบว่า γ -proteobacteria group เป็นแบคทีเรียในกลุ่มรอง นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม CFB, HGC, α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, และ Other bacteria ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยพบสัดส่วนระหว่าง 4.80–5.53%, 2.19–4.40%, 2.92–3.19%, 7.14–7.55% และ 17.98–9.74% ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 4) เมื่อทำการวิเคราะห์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria พบว่ากุ้งตัวอย่างจากทุกแหล่งเลี้ยงมีแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. และแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก ในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีสัดส่วนเฉลี่ยของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. และ Other bacteria ระหว่าง 47.08–49.15% และ 46.53–50.03% ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 5) ขณะที่สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC พบว่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยงเช่นเดียวกัน โดยกุ้งจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออกพบ $42.15 \pm 2.34\%$ กุ้งจากแหล่งที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลาพบ $40.53 \pm 8.98\%$ กุ้งจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกพบ $43.32 \pm 1.90\%$ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองเช่นเดียวกันในทุกแหล่งเลี้ยง ถึงแม้ว่าตัวอย่างกุ้งจากแหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบจะพบว่ามีปริมาณของ Other bacteria groups ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับแบคทีเรียกลุ่ม LGC ก็ตาม (ตารางภาคผนวก ข ที่ 6)

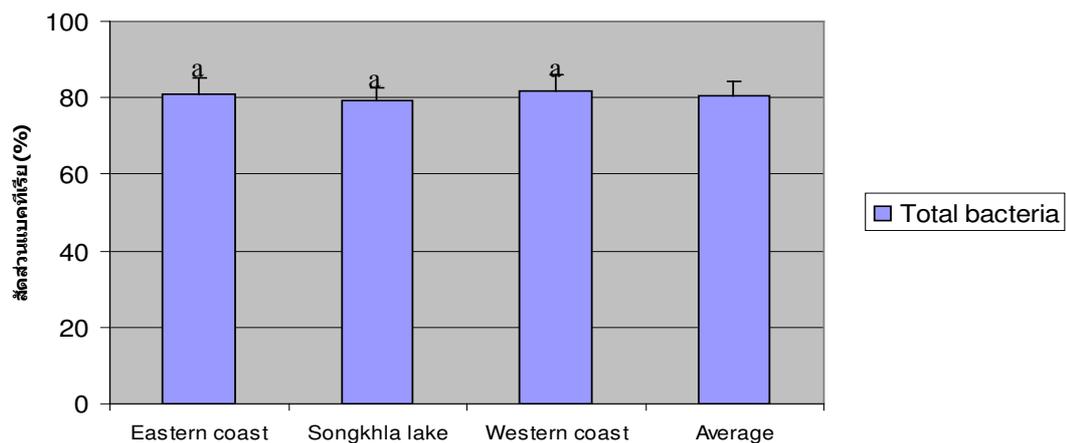


ภาพที่ 21 แสดงสัดส่วนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวปกติเมื่อตรวจสอบด้วย โพรบ EUB338 mixed ในการทำ FISH เทียบกับการใช้สีย้อม DAPI โดยแท่งกราฟ ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P>0.05$)

3.1.3.1.3 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติ

ชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายมีปริมาณของ *Eubacteria* ในระหว่าง 79.05 – 81.74 % ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI (ภาพที่ 22) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่พบในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติ จากทั้ง 3 แหล่งเลี้ยงมีโครงสร้างที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยประกอบด้วย แบคทีเรียกลุ่มหลัก 3 กลุ่ม ได้แก่ LGC, γ -Proteobacteria, และ Other bacteria ซึ่งมีปริมาณรวมกันมากกว่า 80% ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวจากฟาร์มตะวันออกและแหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลาจะมีแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มเป็นกลุ่มเด่น โดยลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวจากแหล่งเลี้ยงฟาร์มตะวันออก พบในสัดส่วน $26.56\pm 2.83\%$, $27.92\pm 1.33\%$, และ $29.18\pm 0.94\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวจากแหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลา พบในสัดส่วน $28.84\pm 2.79\%$, $26.65\pm 3.30\%$, และ $27.58\pm 1.36\%$ ตามลำดับ กุ้งจาก แหล่งเลี้ยง ฟาร์มตะวันตกพบแบคทีเรียกลุ่ม LGC เป็นกลุ่มเด่นในสัดส่วน $35.53\pm 2.05\%$ ในขณะที่ γ -Proteobacteria group, และ Other bacteria groups เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองโดยพบใน สัดส่วน $21.96\pm 1.58\%$ และ $26.23\pm 3.74\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆในโครงสร้าง ประชากรแบคทีเรียของลำไส้ส่วนปลาย โดยพบแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในสัดส่วนระหว่าง 7.11-

7.84% β -Proteobacteria ในสัดส่วนระหว่าง 4.46-4.76% α -Proteobacteria ในสัดส่วนระหว่าง 3.15-3.43% และ HGC ในสัดส่วนระหว่าง 0.56-1.64% (ตารางภาคผนวก ข ที่ 7) เมื่อทำการวิเคราะห์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria พบว่ากึ่งตัวอย่างจากทุกแหล่งเลี้ยงมีแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักและมีปริมาณมากกว่า 60% ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่ม γ -proteobacteria และพบ Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -proteobacteria ระหว่าง 25.45-40.28% ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่ม γ -proteobacteria (ตารางภาคผนวก ข ที่ 8) ขณะที่สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC พบว่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยง และมีสัดส่วนมากกว่า 50% ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (ตารางภาคผนวก ข ที่ 9)



ภาพที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติเมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ในการทำ FISH เทียบกับการใช้สีย้อม DAPI โดยแท่งกราฟที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)

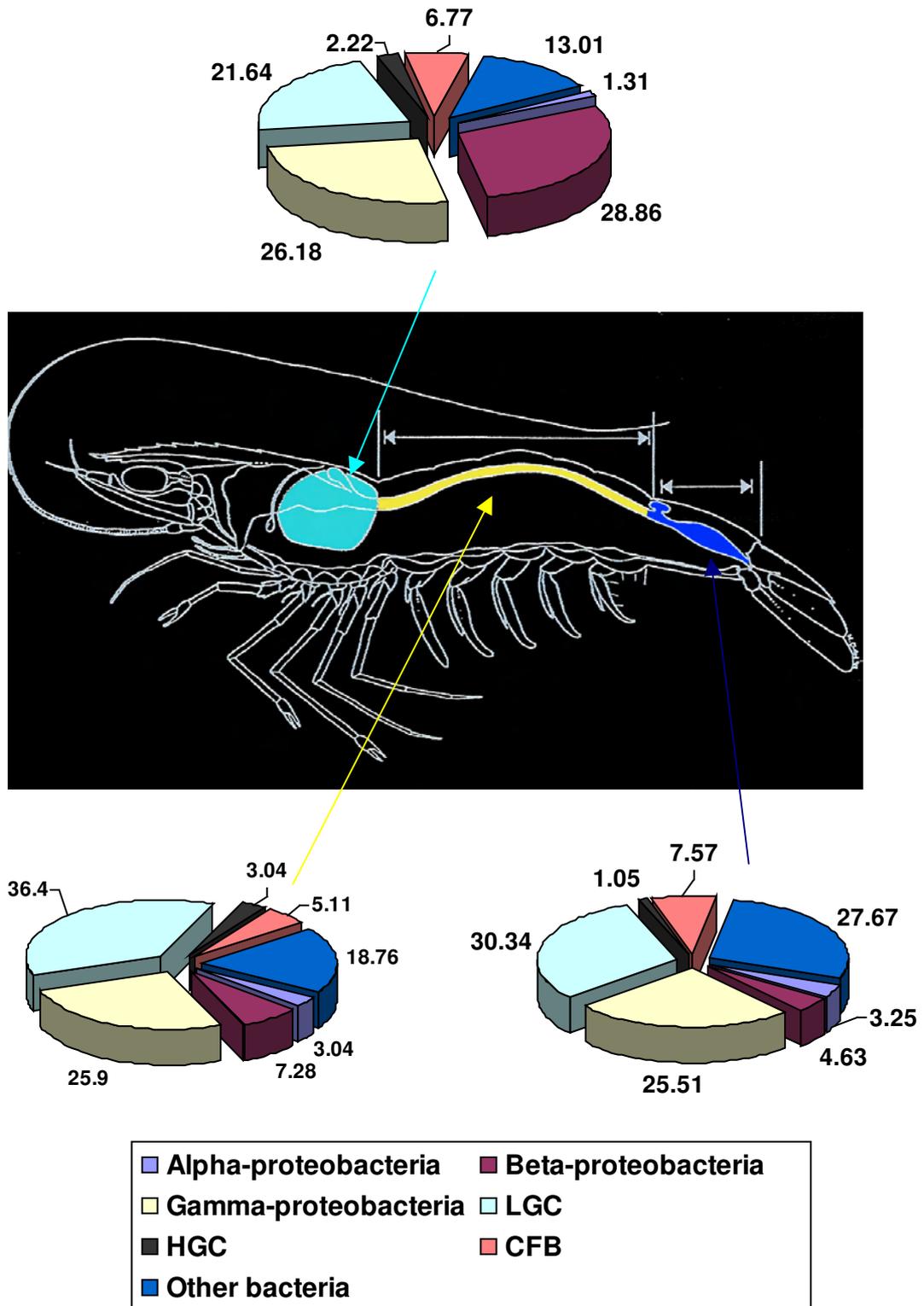
3.1.3.1.4 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารที่ทำการศึกษาของกุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติในบ่อดิน

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพบว่า สัดส่วนของ *Eubacteria* ในทุกส่วนของทางเดินอาหารของกุ้งที่มีสุขภาพปกติเมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed มีสัดส่วนระหว่าง 77.58–80.06% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสารย้อมเรืองแสง DAPI นอกจากนี้ยังพบว่าในทางเดินอาหารทุกส่วนที่ทำการศึกษาจากแต่ละพื้นที่การเลี้ยงมีสัดส่วนของ *Eubacteria* ไม่แตกต่างกันมากนัก

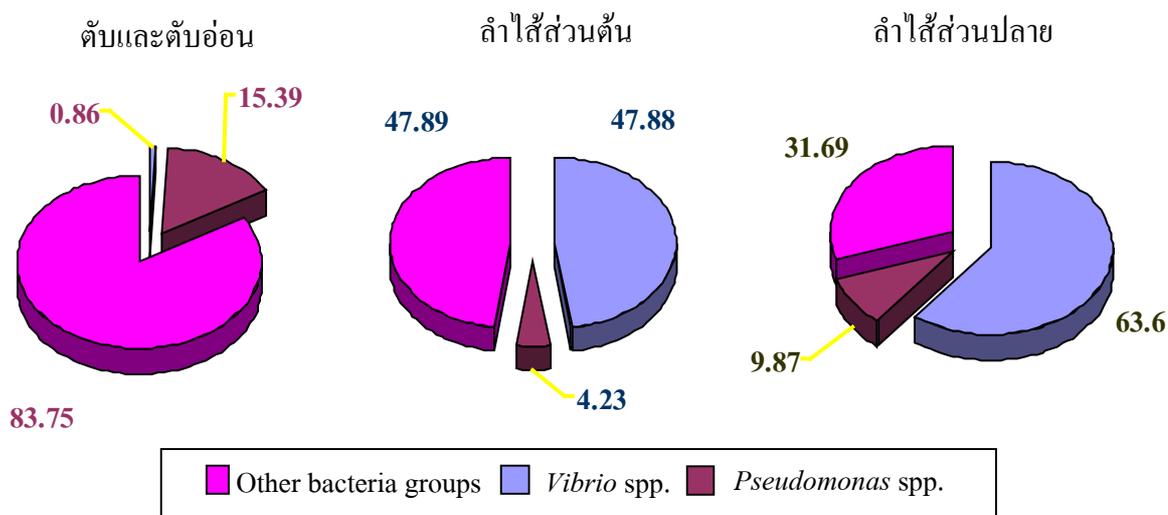
โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในระดับและดับอ่อนของกุ้งขาวสุขภาพปกติจากทั้ง 3 แหล่งเลี้ยงที่การศึกษาพบว่า มีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacteria* คิดเป็น 77.58±3.68% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI โดยมี β -proteobacteria group และ γ -proteobacteria group เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก ซึ่งมีสัดส่วนคิดเป็น 28.86±4.81% และ 26.18±6.88% ของ *Eubacteria* ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียในกลุ่มรอง โดยมีสัดส่วน 21.64±5.17% เมื่อเทียบกับปริมาณ *Eubacteria* ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เช่น α -Proteobacteria group, HGC group, และ CFB group ในสัดส่วน 1.31±0.90%, 2.22±0.66%, 6.77±1.35% ตามลำดับ โดยสัดส่วนของ HGC group และ α -proteobacteria group ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งจากการศึกษาในระดับและดับอ่อนโดยใช้โพรบที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้ง 6 กลุ่มในการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ EUB338 mixed สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ประมาณ 87% ของปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed โดยมี Other bacteria groups ในสัดส่วน 13.01±7.14 % (ตารางภาคผนวก ข ที่ 1) เมื่อทำการวิเคราะห์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria พบว่า Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกใน γ -proteobacteria group เป็นมีสัดส่วนสูงสุด 83.75±0.42% ในขณะที่ *Pseudomonas* spp. และกลุ่ม *Vibrio* spp. มีสัดส่วน 15.39±5.81% และ 0.86±1.42% ของ γ -proteobacteria ทั้งหมดที่ตรวจสอบได้จากโพรบ GAM42a ในการทำ FISH ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 2) และจากการวิเคราะห์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น โดยมีสัดส่วน 44.44±4.29% ของ LGC ทั้งหมดซึ่งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. ในปริมาณสัดส่วน 19.26±5.87%, 10.26±3.45%, และ 5.73±3.75% ตามลำดับและสัดส่วนของ *Enterococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางภาคผนวก ข ที่ 3)

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลาย แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประชากรของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน โดยมีแบคทีเรีย LGC group เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักและ γ -proteobacteria group เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าในลำไส้ส่วนปลายจะพบ Other bacteria groups ในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับแบคทีเรียกลุ่ม LGC และ γ -proteobacteria โดยในลำไส้ส่วนต้นพบ LGC group และ γ -proteobacteria group ในสัดส่วน $36.40 \pm 3.53\%$ และ $25.90 \pm 4.89\%$ โดยมี Other bacteria groups ในสัดส่วน $18.76 \pm 6.90\%$ ในขณะที่ลำไส้ส่วนปลายพบ LGC group γ -proteobacteria group, และ Other bacteria groups ในสัดส่วน $30.34 \pm 4.66\%$, $25.51 \pm 3.34\%$, และ $27.66 \pm 2.41\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม α -Proteobacteria, HGC, และ CFB ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วน โดยลำไส้ส่วนต้นพบ $3.04 \pm 0.53\%$, $3.04 \pm 1.87\%$, และ $5.11 \pm 0.63\%$ ตามลำดับและในลำไส้ส่วนปลายพบ $3.25 \pm 0.70\%$, $1.06 \pm 0.70\%$, และ $7.57 \pm 1.10\%$ ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -proteobacteria ของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนพบว่า มีแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัดส่วนที่สูงถึง $44.88 \pm 10.52\%$ และ $63.60 \pm 7.01\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria ทั้งหมดที่ตรวจสอบได้จากโพรบ GAM42a และมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ในสัดส่วน $4.23 \pm 3.71\%$ และ $9.87 \pm 5.61\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria ทั้งหมดในขณะที่มี Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกใน γ -proteobacteria group ในสัดส่วน $47.89 \pm 12.03\%$ และ $31.69 \pm 12.84\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria ทั้งหมดขณะที่การตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม LGC พบว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนเช่นเดียวกันโดยมีสัดส่วน $42.00 \pm 4.89\%$ และ $62.91 \pm 8.58\%$ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกลุ่ม LGC ทั้งหมดที่ตรวจสอบได้จากโพรบ LGC mixed นอกจากนี้ยังพบ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. ในชุมชนแบคทีเรียของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนโดยลำไส้ส่วนต้นพบ $22.61 \pm 3.57\%$, $6.80 \pm 1.22\%$, และ $14.48 \pm 1.69\%$ ตามลำดับและในลำไส้ส่วนปลายพบ $7.21 \pm 0.83\%$, $10.83 \pm 3.10\%$, และ $2.98 \pm 2.02\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม LGC ในลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลายมีสัดส่วน $14.10 \pm 8.42\%$ และ $16.08 \pm 10.27\%$ ตามลำดับ

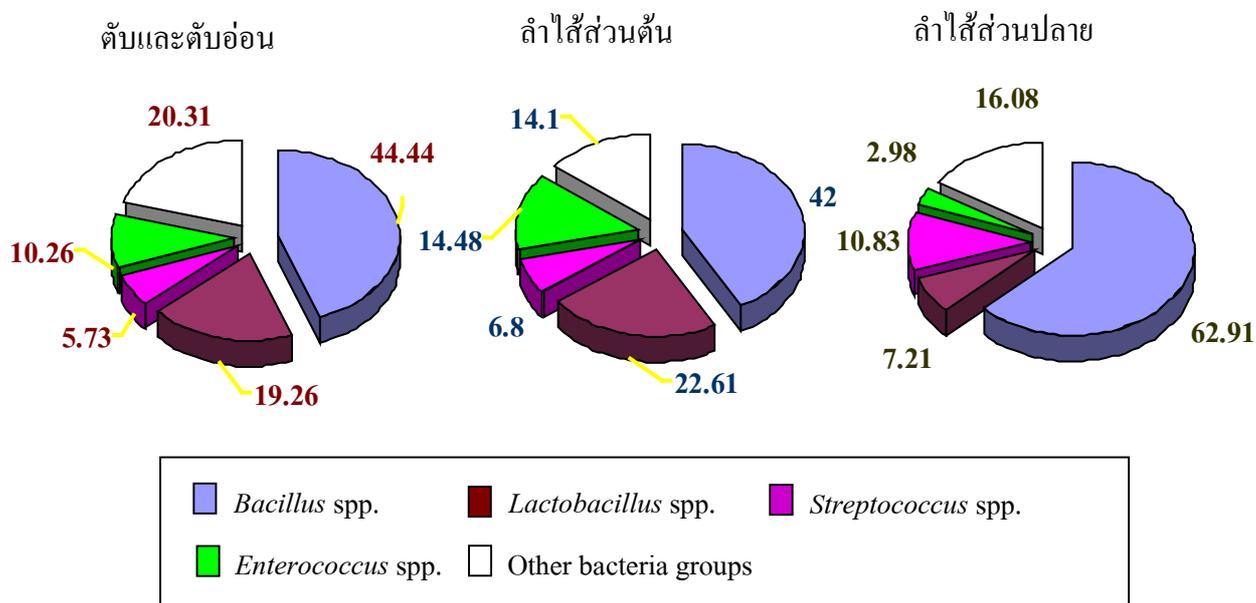
ซึ่งโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในแบคทีเรียกลุ่มหลักของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วน รวมถึงสัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม γ -proteobacteria และ LGC ที่ได้จากการศึกษาทางเดินอาหารของ กุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติในบ่อดินแสดงในภาพที่ 23, 24, และ 25 ตามลำดับ



ภาพที่ 23 แสดงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียกลุ่มหลักของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้นและลำไส้ส่วนปลายที่ได้จากการศึกษาในกิ้งขาวที่มีสุขภาพปกติในบ่อดิน



ภาพที่ 24 สัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม γ -proteobacteria ของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งขาวสุขภาพปกติในบ่อคินที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ GAM42a



ภาพที่ 25 สัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม LGC ของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งขาวสุขภาพปกติในบ่อคินที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ LGC mixed

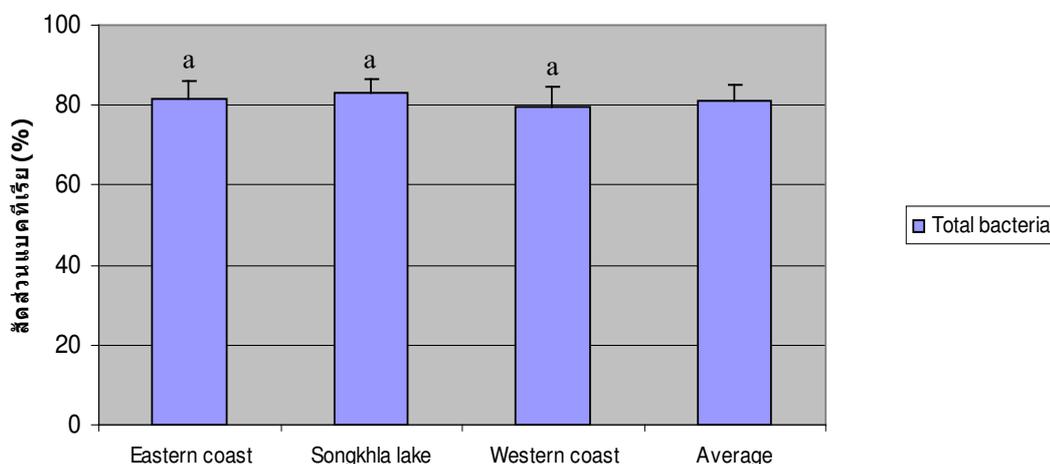
3.1.3.2 การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อดินโดยเทคนิค FISH

ทำการตรวจสอบ โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราด้วยเทคนิค FISH โดยแบ่งทางเดินอาหารที่ทำการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน เช่นเดียวกับการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งปกติและทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ใกล้เคียงกับการศึกษาในกุ้งปกติ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวจากผลของไวรัสทอรา เพื่อศึกษาถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของทางเดินอาหารที่ทำการศึกษาจากสภาวะติดเชื้อไวรัสของกุ้งขาวในสภาพการเลี้ยงจริงในบ่อดินรวมถึงผลของสภาพพื้นที่การเลี้ยงต่อ โครงสร้างชุมชนแบคทีเรีย

3.1.3.2.1 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอรา

จากการใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อดิน โดยข้อมูลจากตัวอย่างกุ้งทั้ง 3 แหล่งพบว่าในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสมีปริมาณของ *Eubacteria* เฉลี่ยคิดเป็น $80.88 \pm 3.80\%$ ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสารย้อมเรืองแสง DAPI (ภาพที่ 26) ซึ่งการตรวจสอบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากทั้ง 3 แหล่งเลี้ยงแสดงให้เห็นถึงลักษณะของโครงสร้างประชากรที่สอดคล้องกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยมีแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียที่มีสัดส่วนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกุ้งติดเชื้อไวรัสจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก แหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลา และแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกมีสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria $80.03 \pm 12.36\%$, $79.24 \pm 6.06\%$, และ $61.02 \pm 9.30\%$ ของแบคทีเรียทั้งหมดตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ มีสัดส่วนไม่เกิน 12% ของแบคทีเรียทั้งหมด โดยมีแบคทีเรียในกลุ่ม LGC และ Other bacteria เป็นแบคทีเรียที่มีสัดส่วนสูงซึ่งมีสัดส่วนเฉลี่ยระหว่าง 9.94-7.43% และ 4.49-11.2% ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 10) เมื่อทำการตรวจสอบแบคทีเรียในกลุ่ม γ -Proteobacteria พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยมีสัดส่วนสูงถึง 85.58-86.79% สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยง (ตารางภาคผนวก ข ที่ 11) นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria ที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -Proteobacteria มีเพียง 8.77-7.75% ของทั้งหมดเท่านั้น (ตารางภาคผนวก ข ที่ 11) ขณะที่การตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม LGC

พบว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่เรียกกลุ่มหลักเหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยมีสัดส่วนระหว่าง 39.92-52.34% (ตารางภาคผนวก ข ที่ 12)

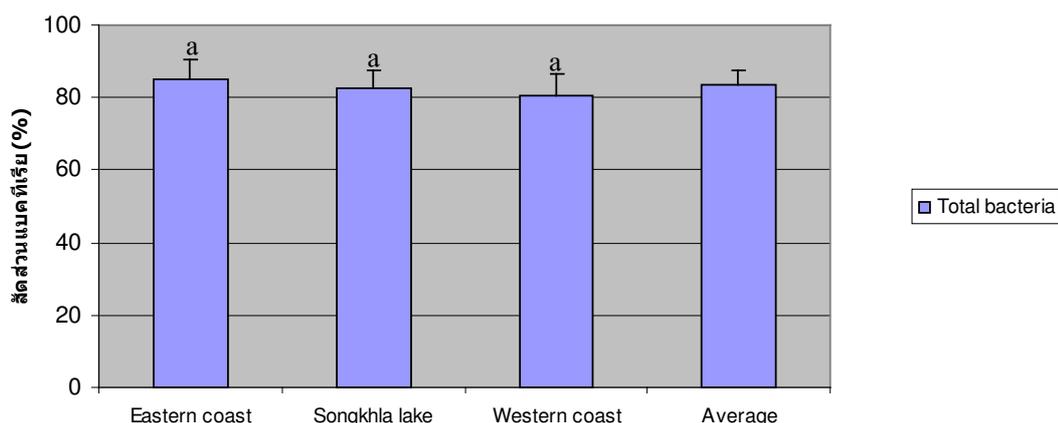


ภาพที่ 26 แสดงสัดส่วนแบคทีเรียทั้งหมดในดับและดับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอรา เมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ในการทำ FISH เทียบกับการใช้สีย้อม DAPI โดยแท่งกราฟที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)

3.1.3.2.2 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวติดเชื้อไวรัสทอรา

จากการใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อดิน พบว่ามีปริมาณ *Eubacteria* เฉลี่ยคิดเป็น $83.56 \pm 4.18\%$ ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสารย้อมเรืองแสง DAPI (ภาพที่ 27) และโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่พบมีลักษณะคล้ายคลึงกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยมีแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียที่เรียกกลุ่มหลัก ซึ่งมีสัดส่วนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากการตรวจสอบในกุ้งติดเชื้อจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก แหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลา และแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกพบว่า มีสัดส่วนของ γ -Proteobacteria group $49.06 \pm 4.27\%$, $48.28 \pm 2.24\%$ และ $56.68 \pm 3.17\%$ ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่พบประกอบด้วย LGC group และ Other bacteria groups เป็นกลุ่มรอง โดยมีสัดส่วนระหว่าง 12.38- 24.31% นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆในสัดส่วนระหว่าง 0.26-3.18% ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม HGC, CFB, β -Proteobacteria และ α -Proteobacteria (ตารางภาคผนวก ข ที่ 13) เมื่อทำการตรวจ

สอบกลุ่มแบคทีเรียย่อยในกลุ่ม γ -Proteobacteria พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยมีสัดส่วนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยง โดยกุ้งติดเชื้อไวรัสจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก แหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลาและแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัดส่วน $82.79 \pm 11.11\%$, $89.09 \pm 4.35\%$, และ $73.39 \pm 8.48\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมดตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria มีเพียง 3.87-20.84% ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมด (ตารางภาคผนวก ข ที่ 14) ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่ม LGC พบว่าประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีสัดส่วนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกุ้งติดเชื้อไวรัสจากแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันออก แหล่งเลี้ยงที่ใช้น้ำจากทะเลสาบสงขลาและแหล่งเลี้ยงฝั่งตะวันตกพบแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ในสัดส่วน $63.37 \pm 19.81\%$, $54.38 \pm 11.06\%$, และ $51.17 \pm 7.03\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม LGC ทั้งหมดตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 15)



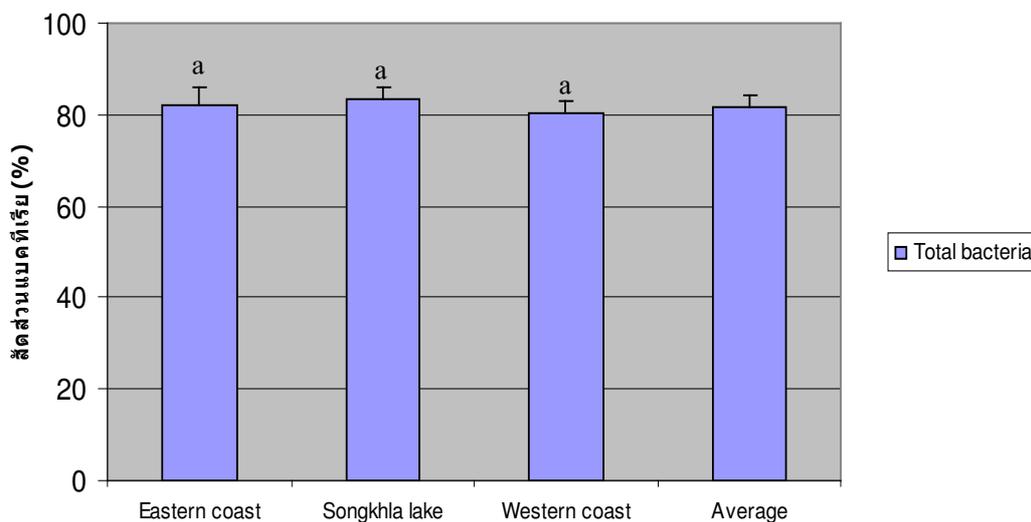
ภาพที่ 27 สัดส่วนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวติดเชื้อไวรัสทอราเมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ในการทำ FISH เทียบกับการใช้สีย้อม DAPI กราฟที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)

3.1.3.2.2 โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวติดเชื้อไวรัส

ทอรา

ชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสมีปริมาณของ *Eubacteria* เฉลี่ยคิดเป็น $81.73 \pm 2.69\%$ ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยสารย้อมเรืองแสง DAPI (ภาพที่ 28) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่พบในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสจากทั้ง 3 แหล่งเลี้ยงมีโครงสร้างที่ไม่แตกต่างกัน

มากนัก ซึ่งประกอบไปด้วย แบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก ซึ่งมีสัดส่วนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในทุกแหล่งเลี้ยงที่ทำการศึกษา จากการตรวจสอบในกล้องจุลทรรศน์จากแหล่งเลี้ยงฟุ้งตะวันออก รอบทะเลสาบสงขลา และแหล่งเลี้ยงฟุ้งตะวันตกพบว่า มีสัดส่วนของ γ -Proteobacteria group $46.20 \pm 5.32\%$, $45.07 \pm 5.44\%$ และ $47.86 \pm 6.93\%$ ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ที่พบประกอบด้วย Other bacteria groups เป็นกลุ่มรองเช่นเดียวกันในทุกแหล่ง โดยมีสัดส่วนระหว่าง $21.01-25.97\%$ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ในสัดส่วนระหว่าง $0.72-7.81\%$ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม HGC, CFB, β -Proteobacteria และ α -Proteobacteria group (ตารางภาคผนวก ข ที่ 16) เมื่อทำการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียย่อยในกลุ่ม γ -Proteobacteria พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยมีสัดส่วนสูงถึง $74.77-82.04\%$ สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เหมือนกันในทุกแหล่งเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria และ *Pseudomonas* spp. มีเพียง $3.87-20.84\%$ และ $7.17-7.94\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมดตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 17) ในการตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่ม LGC พบว่าประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก โดยมีสัดส่วนระหว่าง $54.50-55.24\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม LGC ทั้งหมด สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกันในทุกแหล่งเลี้ยงและมีแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria เป็นกลุ่มรอง โดยมีสัดส่วนระหว่าง $25.28-34.73\%$



ภาพที่ 28 สัดส่วนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวติดเชื้อไวรัสทอราเมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed ในการทำ FISH เทียบกับการใช้สีย้อม DAPI กราฟที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P > 0.05$)

3.1.3.2.3 สรุปโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารที่ทำการศึกษาของกิ้งขาวที่ติดเชื้อทอราในปอดดิน

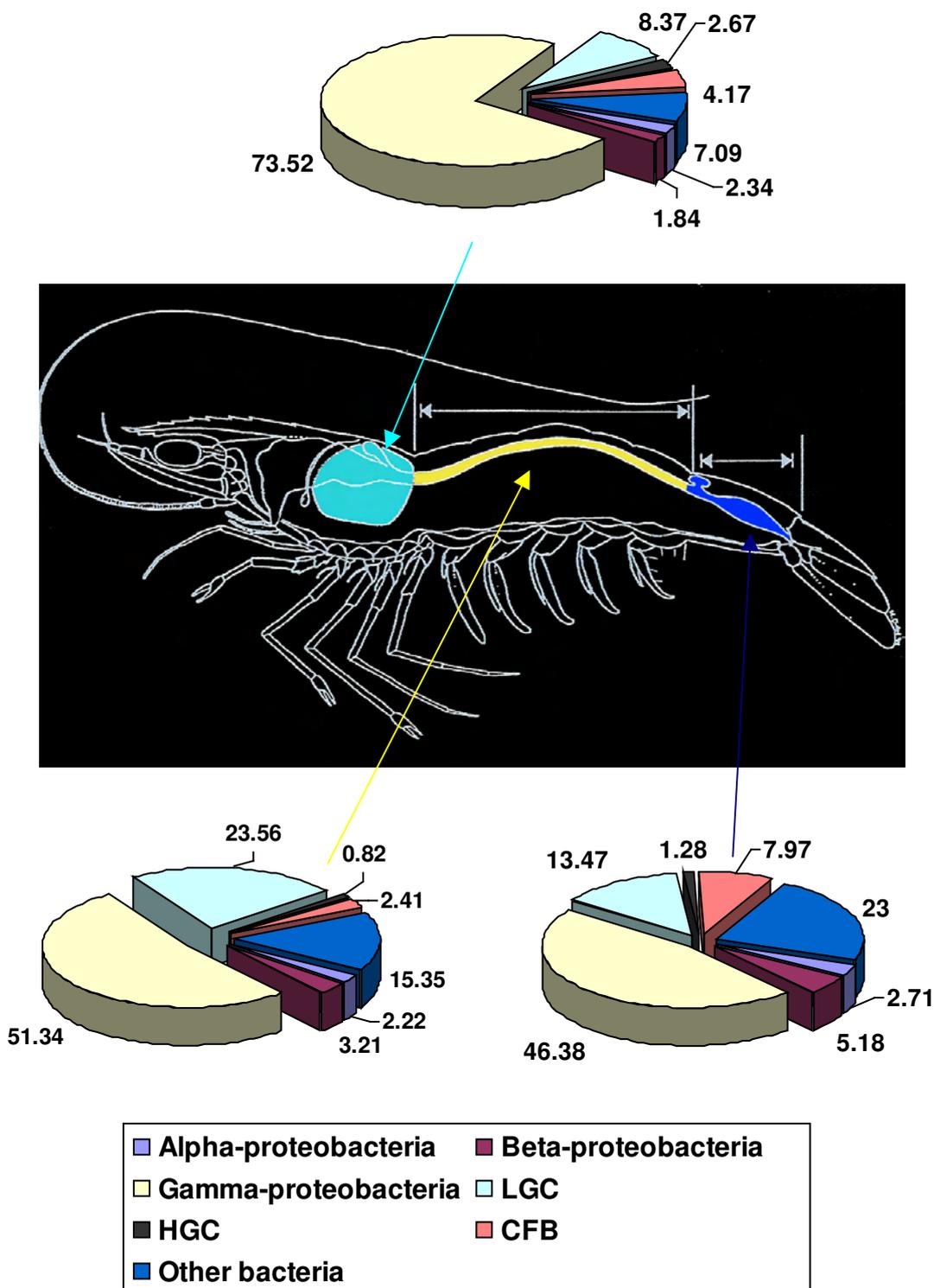
จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์สัดส่วนของ *Eubacteria* ในทุกส่วนของทางเดินอาหารของกิ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราเมื่อตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed มีสัดส่วนระหว่าง 80.88–83.56% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบตรวจสอบด้วยสารย้อมเรืองแสง DAPI นอกจากนี้ยังพบว่าในทางเดินอาหารทุกส่วนที่ทำการศึกษาจากแต่ละพื้นที่การเลี้ยงมีสัดส่วนของ *Eubacteria* ไม่แตกต่างกันมากนัก เช่นเดียวกับข้อมูลสัดส่วนของ *Eubacteria* ที่พบในทางเดินอาหารของตัวอย่างกิ้งขาวที่มีสุขภาพปกติ

ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระดับและดับอ่อนของกิ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ EUB338 mixed พบว่าโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียจากทั้ง 3 พื้นที่การเลี้ยงมีโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน โดยประกอบด้วย γ -proteobacteria group เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเพียงชนิดเดียวในชุมชนแบคทีเรียในสัดส่วนที่สูงถึง 73.52 ± 12.53 % โดยมี LGC group, Other bacteria group, และCFB group เป็นแบคทีเรียกลุ่มรอง ซึ่งมีสัดส่วนคือเป็น 8.37 ± 2.21 %, 7.09 ± 4.46 %, และ 4.17 ± 3.81 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ในชุมชนแบคทีเรียในระดับและดับอ่อนของกิ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัส โดยพบ α -Proteobacteria group ในสัดส่วน 2.34 ± 2.61 % β -Proteobacteria ในสัดส่วน 2.34 ± 2.61 % และ HGC ในสัดส่วน 2.64 ± 2.06 % ซึ่งจากการศึกษาในระดับและดับอ่อนโดยใช้โพรบที่จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้ง 6 กลุ่มในการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ EUB338 mixed สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ประมาณ 92.91% ของปริมาณเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบตรวจสอบด้วยโพรบ EUB338 mixed โดยมี Other bacteria groups ในสัดส่วน 7.09 ± 4.46 % (ตารางภาคผนวก ข ที่ 10) เมื่อทำการตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -proteobacteria group พบว่า มีแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัดส่วนที่สูงถึง 86.26 ± 4.07 % ของ γ -proteobacteria ทั้งหมดที่ตรวจสอบได้จากโพรบ GAM42a และมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ในสัดส่วน 4.04 ± 2.37 % ในขณะที่มี Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกใน γ -proteobacteria group ในสัดส่วนเพียง 9.70 ± 4.48 % (ตารางภาคผนวก ข ที่ 11) ซึ่งต่ำกว่าที่พบในระดับและดับอ่อนของกิ้งขาวปกติมาก ขณะที่การตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม LGC พบว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น โดยมีสัดส่วน 49.83 ± 9.89 % ของ LGC ทั้งหมดที่ตรวจสอบได้จากโพรบ LGC mixed นอกจากนี้ยังพบ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. ในชุมชนแบคทีเรียของดับและดับอ่อนในสัดส่วน 17.56 ± 4.42 %, 15.16 ± 4.42 %

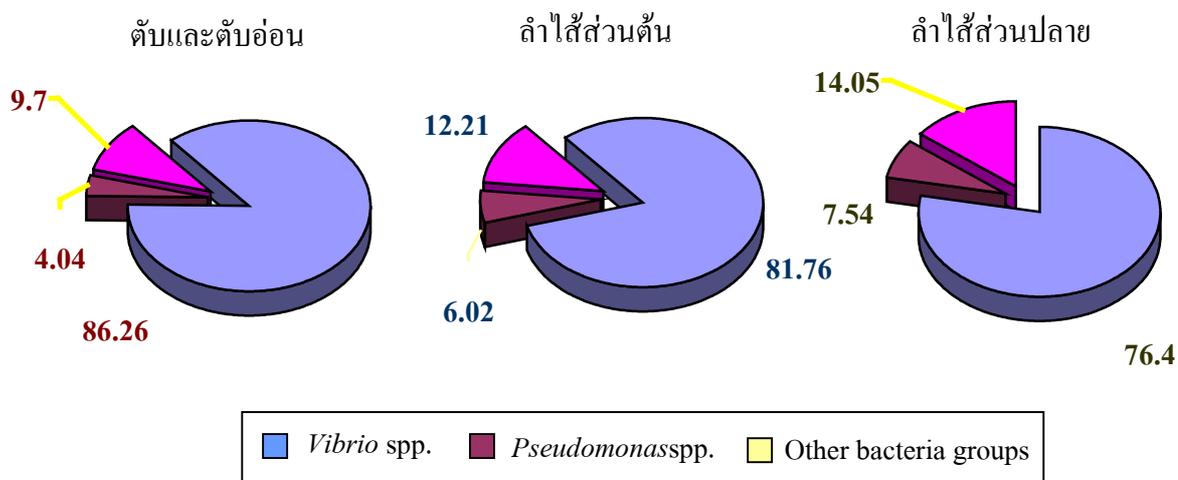
และ $4.72 \pm 4.92\%$ ตามลำดับ และมี Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกใน LGC group ในสัดส่วน $14.74 \pm 9.70\%$ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 12)

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลาย แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประชากรของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน คือ γ -proteobacteria group ซึ่งมีสัดส่วน $51.34 \pm 4.95\%$ และ $46.38 \pm 5.29\%$ ในขณะที่ลำไส้ส่วนต้นพบแบคทีเรียกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองในสัดส่วน $23.56 \pm 3.88\%$ แต่ในลำไส้ส่วนปลายจะพบ Other bacteria groups เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองในสัดส่วน $23.00 \pm 5.63\%$ แต่อย่างไรก็ตามในลำไส้ส่วนต้นก็พบ Other bacteria groups เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสัดส่วนสูงสุดเป็นอันดับที่ 3 ในสัดส่วน $15.35 \pm 8.12\%$ และลำไส้ส่วนปลายก็พบ LGC group เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีสัดส่วนสูงสุดเป็นอันดับที่ 3 ในสัดส่วน $13.47 \pm 2.60\%$ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม α -Proteobacteria, HGC, และ CFB ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วน โดยในลำไส้ส่วนต้นพบ $2.22 \pm 0.60\%$, $0.82 \pm 0.077\%$, และ $2.41 \pm 0.52\%$ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 13) และในลำไส้ส่วนปลายพบ $2.71 \pm 1.15\%$, $1.28 \pm 1.02\%$, และ $7.97 \pm 1.70\%$ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 16) เมื่อทำการตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -proteobacteria ของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนพบว่า มีแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัดส่วนที่สูงถึง $81.76 \pm 10.01\%$ และ $78.40 \pm 10.28\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม γ -proteobacteria ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยโพรบ ALF42a และพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ในสัดส่วน $6.02 \pm 1.64\%$ และ $7.54 \pm 2.12\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ลำไส้ส่วนต้นพบ Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกใน γ -proteobacteria group ในสัดส่วน $12.21 \pm 10.41\%$ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 14) และลำไส้ส่วนปลายพบ Other bacteria groups ในสัดส่วน $14.05 \pm 10.84\%$ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 17) ขณะที่การตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม LGC พบว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนเช่นเดียวกัน โดยมีสัดส่วน $56.31 \pm 13.08\%$ และ $54.91 \pm 9.71\%$ ของแบคทีเรียกลุ่ม LGC ทั้งหมดที่ได้จากการตรวจสอบด้วยโพรบ LGC mixed นอกจากนี้ยังพบ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. ในชุมชนแบคทีเรียของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนโดยในลำไส้ส่วนต้นพบ $14.50 \pm 6.18\%$, $1.11 \pm 1.37\%$, และ $3.46 \pm 1.59\%$ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 15) และมี Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกใน LGC group ในสัดส่วน $24.62 \pm 15.17\%$ และ $31.26 \pm 11.95\%$ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ข ที่ 18)

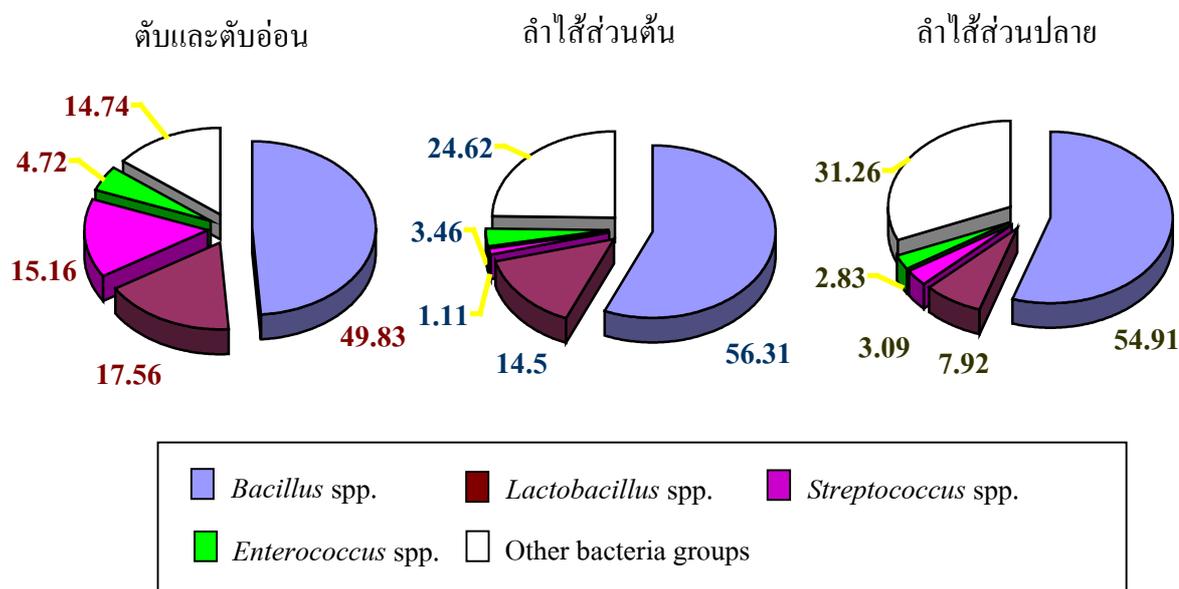
ซึ่งโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในแบคทีเรียกลุ่มหลักของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วน รวมถึงสัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม γ -proteobacteria และ LGC ที่ได้จากการศึกษาทางเดินอาหารของกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดินแสดงในภาพที่ 29, 30, และ 31 ตามลำดับ



ภาพที่ 29 แสดงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในแบคทีเรียกลุ่มหลักของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลายที่ได้จากการศึกษาของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดิน



ภาพที่ 30 สัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม γ -proteobacteria ของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดินที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ GAM42a

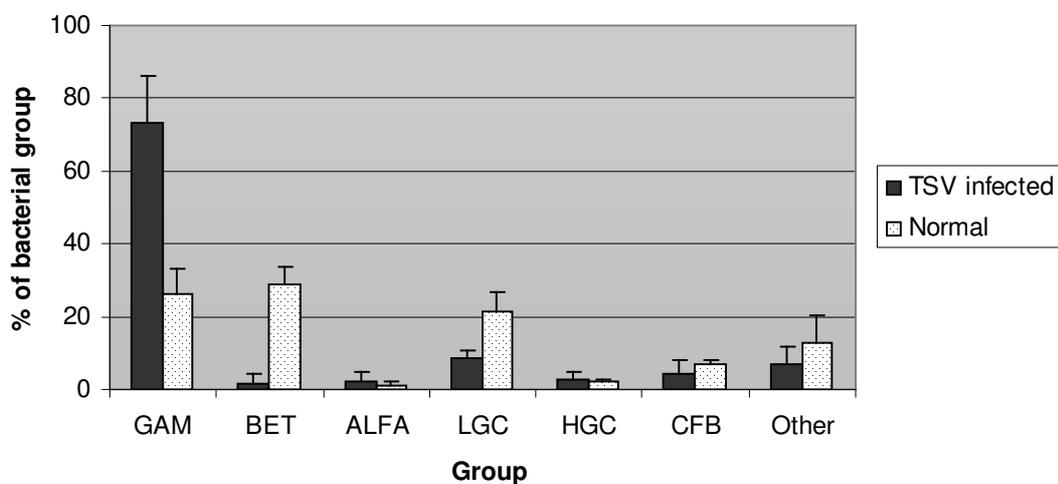


ภาพที่ 31 สัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม LGC ของทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดินที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH โดยการเปรียบเทียบกับโพรบ LGC mixed

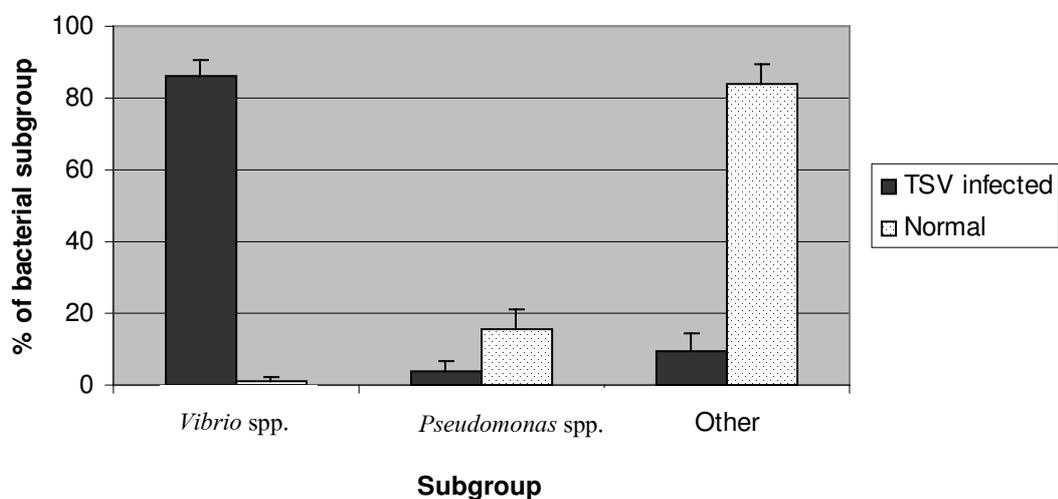
3.1.3.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวเมื่อติดเชื้อไวรัสทอรา ในปอด

3.1.3.3.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้ง ขาวเมื่อติดเชื้อไวรัสทอรา

จากเปรียบเทียบข้อมูลของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนแบคทีเรียรวมในตับและตับอ่อนของกุ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่องค์ประกอบในโครงสร้างประชากรแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียกลุ่มเด่นของโครงสร้างประชากร ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มเด่นในตับและตับอ่อนของกุ้งปกติประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่ม ได้แก่ β -Proteobacteria และ γ -Proteobacteria แต่เมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส จะพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นจะเป็นแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เพียงกลุ่มเดียวเท่านั้น โดยสัดส่วนเฉลี่ยของแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria มีการเพิ่มขึ้นเป็น 73.52% ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด หรือเพิ่มขึ้นถึง 180% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกุ้งปกติ และ β -Proteobacteria group มีสัดส่วนที่ลดลงเหลือเพียง 1.84% ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด หรือมีการลดลงถึง 93.62% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกุ้งปกติ นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ก็มีสัดส่วนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อกุ้งขาวเกิดการติดเชื้อไวรัส ดังแสดงในภาพที่ 32 เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกกลุ่ม γ -Proteobacteria ที่ทำการศึกษาพบว่าสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -Proteobacteria มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 33 ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสมีสัดส่วนของ *Vibrio* spp. เพิ่มสูงถึงเป็น 89.7% ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมดหรือเพิ่มขึ้นถึง 99.30 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกุ้งปกติ ในขณะที่สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria ที่เป็นสมาชิกของ γ -Proteobacteria group มีสัดส่วนลดลงเหลือเพียง 9.70% ของสัดส่วนแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมดหรือลดลง 88.42% เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกของ LGC โดยพบว่าการติดเชื้อไวรัสทอราไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของกลุ่ม LGC ของตับและตับอ่อน โดยเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัสยังคงพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก และแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ Other bacteria groups เป็นแบคทีเรียกลุ่มรอง เช่นเดียวกับตับและตับอ่อนจากกุ้งปกติ (ภาพที่ 34)

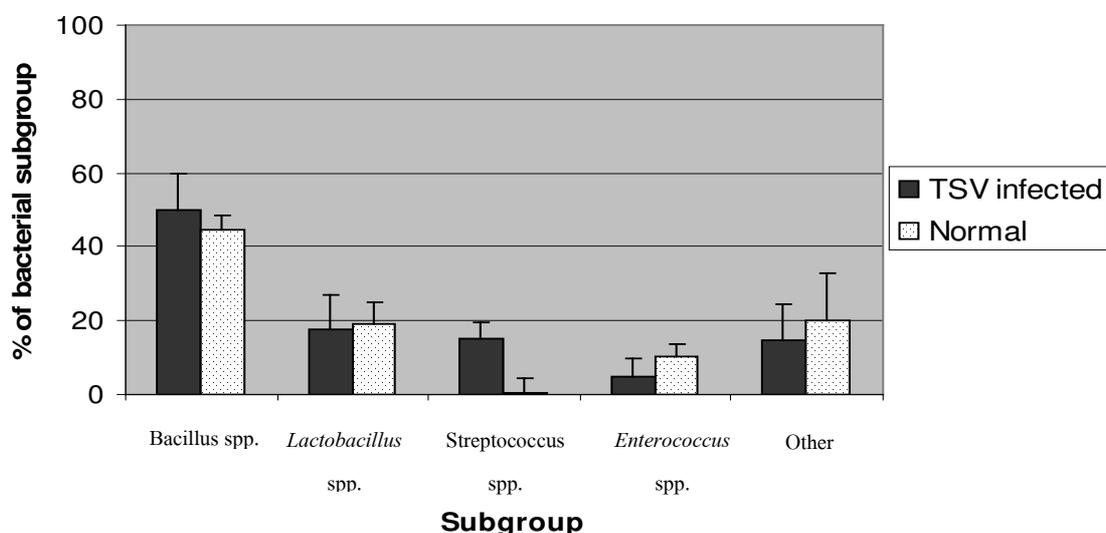


ภาพที่ 32 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในตับและตับอ่อนกึ่งชาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อคิน



ภาพที่ 33 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม γ -Proteobacteria จากตับและตับอ่อนกึ่งชาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อคิน

หมายเหตุ GAM = γ -Proteobacteria, BET = β -Proteobacteria, ALFA = α -Proteobacteria, LGC = LGC group, HGC = HGC group, CFB = CFB group, Other = Other bacteria groups



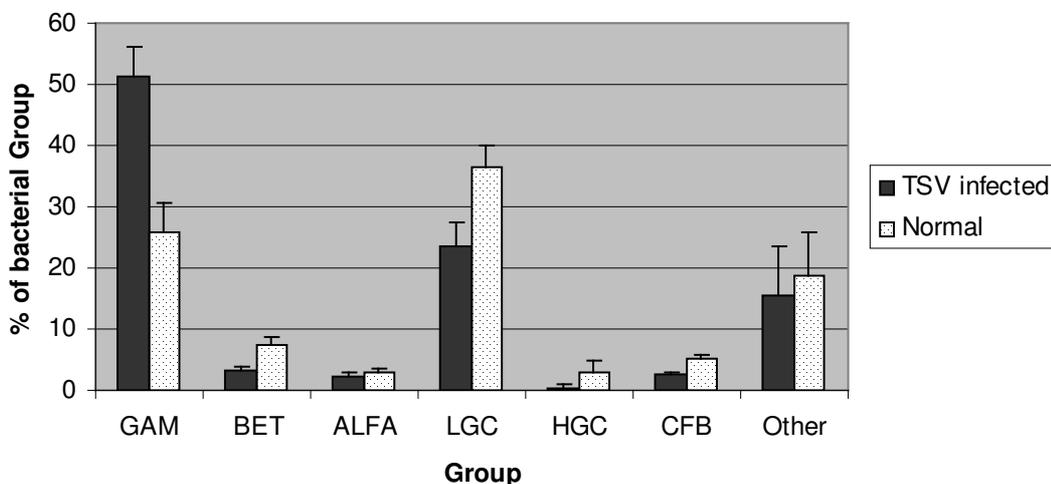
ภาพที่ 34 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม LGC จากตับและตับอ่อนกึ่งชาวปกติ และติดเชื้อไวรัสทอรัในบ่อดิน

3.1.3.3.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งชาวเมื่อติดเชื้อไวรัสทอรั

จากการเปรียบเทียบข้อมูลโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งชาวที่เลี้ยงในบ่อดิน ซึ่งมีสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอรั แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของแบคทีเรียรวมทั้งหมดในลำไส้ส่วนต้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่จากข้อมูลแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของชุมชนแบคทีเรีย โดยโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งชาวสุขภาพปกติพบแบคทีเรียในกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่น ในสัดส่วน 36.40 ± 3.53 % และ γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองในสัดส่วน 25.90 ± 4.89 % นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในกลุ่ม Other bacteria ในสัดส่วน 18.76 ± 6.90 % ในขณะที่กึ่งชาวติดเชื้อไวรัสทอรัพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นซึ่งมีสัดส่วนคิดเป็น 51.33 ± 4.95 % หรือมีสัดส่วนสูงขึ้นจากที่พบในกึ่งปกติ 41.02 % และแบคทีเรียกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองในสัดส่วน 23.56 ± 3.86 % หรือมีสัดส่วนลดลงจากที่พบในกึ่งปกติ 35.27 % ในขณะที่พบแบคทีเรียในกลุ่ม Other bacteria ในสัดส่วน 15.35 ± 8.12 % ดังแสดงใน ภาพที่ 35

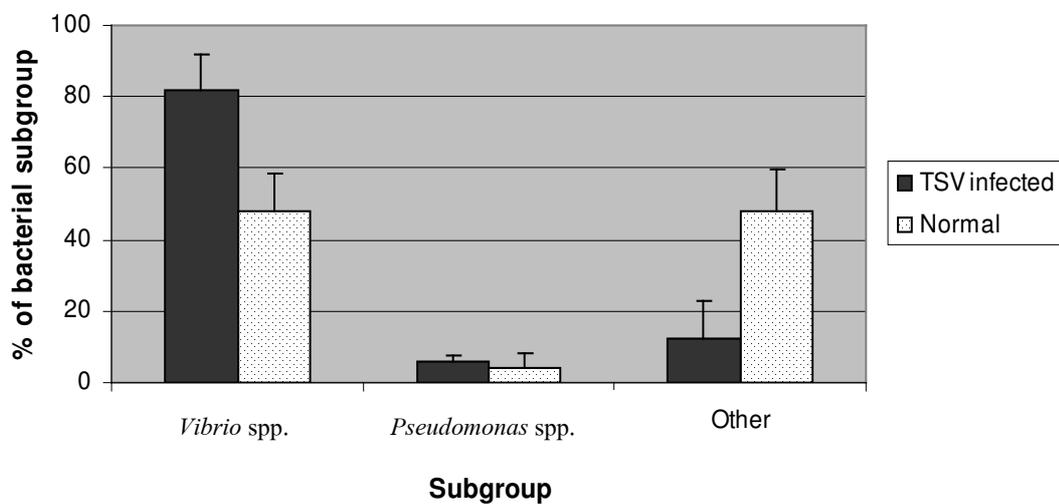
เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -Proteobacteria ที่ทำการศึกษพบว่าสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกใน γ -Proteobacteria

group มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนถึงแม้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งปกติเช่นเดียวกับที่พบในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสก็ตาม (ภาพที่ 36) ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอรา มีสัดส่วนของ *Vibrio* spp. สูงขึ้นเป็น $81.76 \pm 10.02\%$ ของปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมดหรือเพิ่มขึ้นถึง 96.16% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกึ่งปกติ ที่พบ $47.88 \pm 10.57\%$ ในขณะที่สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Other bacteria ที่เป็นสมาชิกของ γ -Proteobacteria group มีสัดส่วนลดลงเหลือเพียง $12.22 \pm 10.4\%$ ของสัดส่วนแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ -Proteobacteria ทั้งหมด หรือลดลง 74.48% เมื่อเทียบกับกึ่งปกติ นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกของ LGC group (ภาพที่ 37) โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสทอราไม่แตกต่างจากกึ่งปกติ คือยังคงเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. แต่แบคทีเรียกลุ่มรองของกึ่งติดเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ Other bacteria ในขณะที่กึ่งปกติพบว่าแบคทีเรียกลุ่มรองคือ กลุ่ม *Lactobacillus* spp. เพียงกลุ่มเดียว ซึ่ง Other bacteria groups ที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม LGC มีการเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกึ่งเกิดการติดเชื้อไวรัส โดยมีสัดส่วนเพิ่มสูงขึ้น 74.61% เมื่อเทียบกับกึ่งปกติ

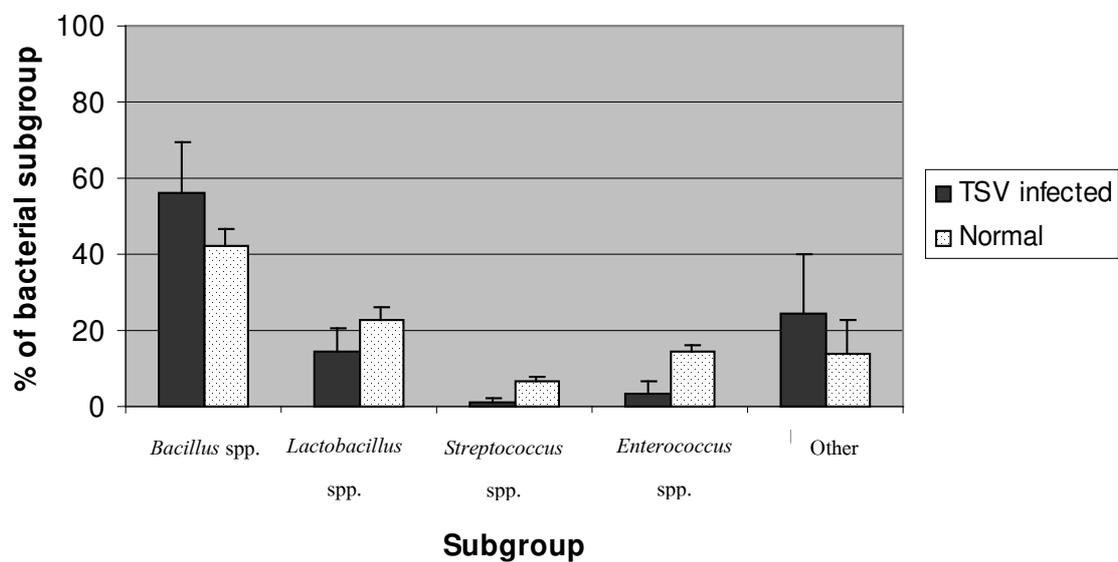


ภาพที่ 35 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกึ่งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในบ่อดิน

หมายเหตุ GAM = γ -Proteobacteria, BET = β -Proteobacteria, ALFA = α -Proteobacteria, LGC = LGC group, HGC = HGC group, CFB = CFB group, Other = Other bacteria groups



ภาพที่ 36 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม γ -Proteobacteria จากลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดิน

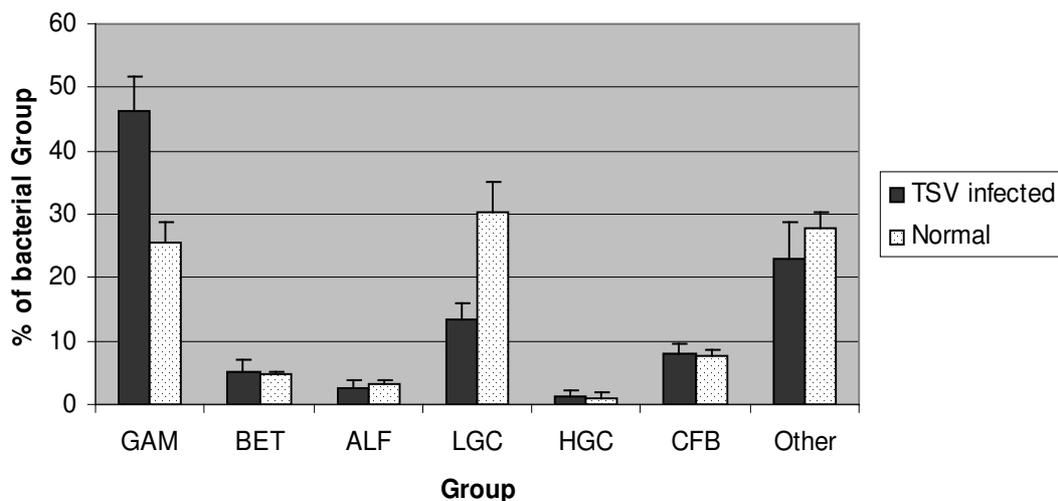


ภาพที่ 37 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม LGC จากลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดิน

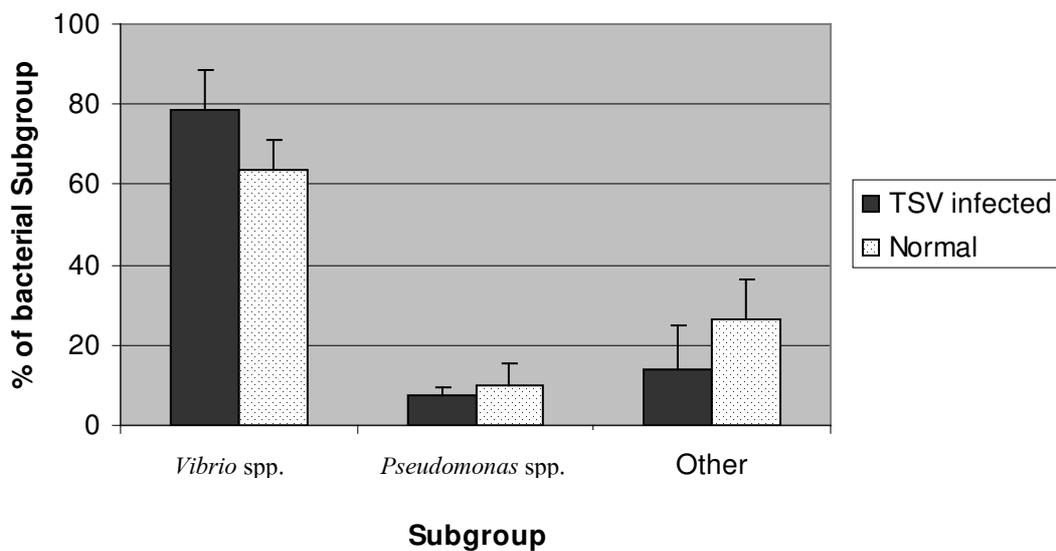
3.1.3.3.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกึ่งขาวเมื่อติดเชื้อไวรัสทอรา

จากการเปรียบเทียบข้อมูลประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกึ่งขาวที่มีสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอรา แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสทอราไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของแบคทีเรียรวมเมื่อเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในลำไส้แต่อย่างใด โดยลำไส้ส่วนปลายของกึ่งปกติและกึ่งติดเชื้อไวรัสมีสัดส่วนแบคทีเรียเฉลี่ย $79.50 \pm 5.11\%$ และ $80.34 \pm 1.79\%$ ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอราต่อกึ่งขาวปกติ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับทางเดินอาหารส่วนอื่นๆ ที่ทำการศึกษา โดยโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกึ่งปกติพบแบคทีเรียในกลุ่ม LGC และ Other bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลัก ซึ่งมีสัดส่วน $30.34 \pm 4.66\%$ และ $27.74 \pm 2.47\%$ ตามลำดับ ในขณะที่มีแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มรอง ในสัดส่วน $25.51 \pm 3.34\%$ และมีสัดส่วนไม่แตกต่างกับ Other bacteria groups อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ซึ่งโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่พบในลำไส้ของกึ่งปกติ มีความแตกต่างกับโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่พบในลำไส้ส่วนเดียวกันของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสทอรา (ภาพที่ 38) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม γ -Proteobacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเพียงกลุ่มเดียวและมีสัดส่วนสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่า มีสัดส่วน $46.38 \pm 5.29\%$ หรือมีสัดส่วนสูงขึ้นจากที่พบในกึ่งขาวปกติ 81.81% ในขณะที่ Other bacteria groups เป็นแบคทีเรียกลุ่มรอง ในสัดส่วน $23.00 \pm 5.63\%$ และแบคทีเรียในกลุ่ม LGC เป็นกลุ่มที่มีสัดส่วนสูงเป็นอันดับสาม โดยมีสัดส่วน $13.47 \pm 2.60\%$ เมื่อนำข้อมูลไปเทียบกับกึ่งปกติพบว่า LGC group มีสัดส่วนลดลงถึง 55.60%

เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกกลุ่ม γ -Proteobacteria ที่ทำการศึกษา พบว่าสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกใน γ -Proteobacteria group ในกึ่งติดเชื้อไวรัสไม่แตกต่างจากที่พบในกึ่งปกติ โดยมีแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นกลุ่มเด่นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 39) แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนเฉลี่ยของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่พบในลำไส้ส่วนปลายของกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสก็มีสัดส่วนสูงกว่าที่พบในลำไส้ของกึ่งปกติถึง 23.27% ในการศึกษาเปรียบเทียบสัดส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม LGC ที่พบในลำไส้ส่วนปลายของกึ่งขาวปกติและติดเชื้อไวรัส พบว่าโครงสร้างประชากรของกลุ่มไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก โดยมีแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักเช่นเดียวกัน โดยกึ่งปกติพบในสัดส่วน $62.91 \pm 8.58\%$ และในกึ่งติดเชื้อไวรัสพบในสัดส่วน $54.91 \pm 9.71\%$ (ภาพที่ 40)

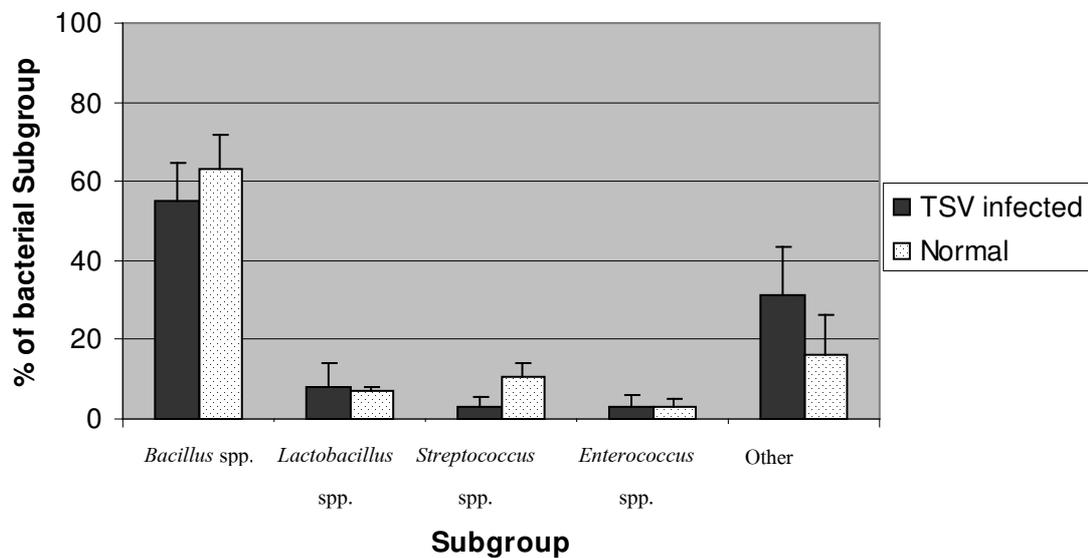


ภาพที่ 38 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดิน



ภาพที่ 39 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม γ -Proteobacteria จากลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราโนบอดิน

หมายเหตุ GAM = γ -Proteobacteria, BET = β -Proteobacteria, ALFA = α -Proteobacteria, LGC = LGC group, HGC = HGC group, CFB = CFB group, Other = Other bacteria groups



ภาพที่ 40 การเปรียบเทียบสัดส่วนกลุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม LGC จากลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัสทอราในปอดคิน