

## โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

กิตติชนม์ อุเทนะพันธ์<sup>1</sup> บุญกอบ วิริยพงศ์สุธี<sup>2</sup> นุกูล อินทระสังขา<sup>3</sup>  
และ กิจการ สุภมาตย์<sup>4</sup>

### Abstract

U-taynapun, K.<sup>1</sup>, Viriyapongsutee, B.<sup>1</sup>, Intrasingkha, N.<sup>2</sup> and Supamattaya, K.<sup>1</sup>  
**Bacterial community from gut of white shrimp, *Penaeus vannamei*,  
cultured in earthen ponds**  
Songklanakarin J. Sci. Technol., May 2007, Suppl 2 : 247-259

The Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique and conventional method were used to analyse the bacterial community in the gut of white shrimp cultured in earthen ponds. Samples were collected from three parts, hepatopancreas, anterior intestine and posterior intestine. Gut bacterial community was enumerated by 15 probes in FISH and 3 bacterial culture technique media. The results showed that bacteria specific probes determined bacterial community and *Eubacteria* as the dominant group of microbial community in the studied gut portions.  $\beta$ -Proteobacteria group (29.53 $\pm$ 5.39%) and  $\gamma$ -Proteobacteria group (26.18 $\pm$ 6.88%) were major groups of bacterial flora in the hepatopancreas. In contrast, low G+C gram positive

<sup>1</sup>Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand. <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Muang, Songkhla, 90000 Thailand.

<sup>1</sup>นักศึกษาลูกสูตร วท.ม. สาขาวิชาสัตวศาสตร์ <sup>2</sup>วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ) นักวิทยาศาสตร์ <sup>3</sup>Dr. rer. Nat. (Aquatic Animal Diseases) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 <sup>4</sup>Ph.D. (Microbiology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Corresponding e-mail: kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2549      รับลงพิมพ์ 20 พฤศจิกายน 2549

bacteria group (LGC) was the most abundant group detected in anterior intestine ( $36.40 \pm 3.53\%$ ) and posterior intestine ( $30.32 \pm 4.63\%$ ). *Vibrio* spp. were detected very less in hepatopancreas ( $0.25 \pm 0.43\%$ ) and were present in 3 of 9 samples. In the case of bacterial detection using cultivation method, the number of bacterial groups verified by TSA, TCBS and MRS showed high variation in every part of the studied digestive tract portions; however, no *vibrio* or lactic acid bacteria were present in the hepatopancreas of healthy shrimp. This study reveals the proportion of bacterial community in the digestive tract of white shrimp which can be used as important database for studying the change of the bacterial community in an abnormal condition including the efficiency of probiotics in the gut (*in vivo*) of white shrimp.

**Key words :** fluorescent *in situ* hybridization (FISH), bacterial communities, gut, *Penaeus vannamei*

### บทคัดย่อ

กิตติชนม์ อุเทนพะพันธ์ บุญกอบ วิริยพงศ์สุธี นุกูล อินทระสังขา และ กิจการ สุภมาตย์  
โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ที่เลี้ยงในบ่อดิน  
ว. สงขลานครินทร์ วิทยาเขต. พฤษภาคม 2550 ฉบับพิเศษ 2 : 247-259

การวิเคราะห์โครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน โดยใช้เทคนิค fluorescent *in situ* hybridization (FISH) และการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำการศึกษาในตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ลำไส้ส่วนต้น (anterior intestine) และลำไส้ส่วนปลาย (posterior intestine) โดยใช้ oligonucleotide probes 15 เส้น และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในทางเดินอาหารเป็นกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ โดยในส่วนของตับและตับอ่อนพบว่ามีแบคทีเรียกลุ่ม  $\beta$ -Proteobacteria group และ  $\gamma$ -Proteobacteria group เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นซึ่งมีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนคิดเป็น  $29.53 \pm 5.39\%$  และ  $26.18 \pm 6.88\%$  ตามลำดับ ลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลายมีแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C gram positive bacteria (LGC) group เป็นกลุ่มหลัก โดยคิดเป็น  $36.45 \pm 3.53\%$  และ  $30.32 \pm 4.63\%$  ตามลำดับ และพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* เพียง  $0.25 \pm 0.43\%$  ในตับและตับอ่อน โดยมีการตรวจพบเชื้อเพียง 3 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ขณะที่การตรวจสอบแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งทั้งสามส่วนมีปริมาณแตกต่างกันอย่างมากในแต่ละตัวอย่างและไม่พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* และ lactic acid bacteria ในตับและตับอ่อน จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนแบคทีเรียในสังคมจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในสภาวะผิดปกติของกุ้งรวมถึงประสิทธิภาพการทำงานของโปรไบโอติกในทางเดินอาหารของกุ้งขาวต่อไป

ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยระบุเป็นที่แน่ชัดว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์เจ้าบ้าน (Hooper et al., 2001; Tuohy et al., 2003) ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหาร วิตามิน รวมถึงการควบคุมเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร (Hart et al., 2002) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้ส่งผลโดยตรงต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่สามารถที่จะอธิบายถึงโครงสร้างและองค์ประกอบของ

กลุ่มแบคทีเรียที่สำคัญและเป็นประโยชน์ในระบบชุมชนแบคทีเรียประจำถิ่นของสัตว์น้ำได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกุ้ง ซึ่งองค์ประกอบของชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในชุมชนแบคทีเรียของทางเดินอาหารในสัตว์น้ำจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ประการ ไม่ว่าจะเป็นชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ ลักษณะทางกายภาพของทางเดินอาหารของสัตว์แต่ละชนิด (Imaoka et al., 1996) รวมไปถึงสายพันธุ์ อาหาร ฤดูกาล การจัดการฟาร์มและสภาวะความเครียดของสัตว์เจ้าบ้าน แต่

อย่างไรก็ดีในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำอย่างกว้างขวางเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นเชื้อโปรไบโอติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ที่ได้นำแบคทีเรียประจำถิ่นในกลุ่ม *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. (Chythanya *et al.*, 2002; ศิริรัตน์ และคณะ, 2548) เข้ามาใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* sp. นอกจากนี้ยังมีรายงานระบุถึงการพบเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง เช่น Zuberi และคณะ (1985) ได้รายงานการพบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Flavobacterium* ในลำไส้ของกุ้งแชบ๊วย Oxley และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งแชบ๊วยในธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas* และ *Vibrio* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* เป็นแบคทีเรียเด่นในลำไส้ส่วนกลางและลำไส้ส่วนปลาย แต่อย่างไรก็ดีการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเทคนิคที่ยุ่ยากและมีความคลาดเคลื่อนสูงจากปัจจัยจำกัดต่างๆ ของเทคนิค (Amann, 1995) ดังนั้นจึงได้มีการพยายามนำเอาวิธีการติดตามแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูล RNA (RNA approach) โดยใช้เทคนิค Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) เข้ามาใช้ในการติดตามกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจในทางเดินอาหารของกุ้ง (บุญกอบ และคณะ, 2548)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ใช้ในการติดตามชิ้นส่วนของ rRNA ที่สนใจโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับเบสบนสาย rRNA มาใช้ในการออกแบบ oligonucleotide probe หรือเรียกสั้นๆ ว่า probe ยาวประมาณ 20 nucleotide ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่สนใจ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงโดยมีเป้าหมายอยู่บนสาย rRNA ที่มีตำแหน่ง complement กับ probe ภายในเซลล์ ซึ่งโดยปกติภายในเซลล์จะมีปริมาณของสาย rRNA จำนวนมาก (ประมาณ  $10^3$ - $10^5$  copy/เซลล์) (Amann *et al.*, 1997) เมื่อ probe เข้าไปจับกับเป้าหมายทำให้สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียเรืองแสงภายใต้กล้อง

จุลทรรศน์แบบ epifluorescent หรือแบบ confocal laser scanning หรือติดตามด้วยเครื่อง flow cytometer เพื่อที่จะทำการตรวจสอบและนับจำนวนของแบคทีเรียในตัวอย่างจากรายงานที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิค FISH ไปตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียในตัวอย่างหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Trebesius *et al.*, 2000) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Jensen *et al.*, 1999) การติดตามแบคทีเรียในดินและตะกอนดินรวมถึงการติดตามแบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสีย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้เทคนิค FISH ในการติดตามกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจในทางเดินอาหารของกุ้งขาว

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน โดยแบ่งส่วนของทางเดินอาหารของกุ้งขาวออกเป็น 3 ส่วน ทำการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH และเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เทคนิค FISH ทำการตรวจสอบโดยใช้ probe 15 เส้น ในการจัดกลุ่มของแบคทีเรียออกเป็น 6 group นอกจากนี้นำ LGC group มาจัดกลุ่มย่อยออกเป็น 5 subgroup และ  $\gamma$ -Proteobacteria group มาจัดกลุ่มย่อยออกเป็น 3 subgroup โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจาก 16S และ 23S rRNA phylogenetic tree รวมถึงการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สีย้อมเรืองแสง DAPI (4,6-diamidina-2-phenylindole) และเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดในการตรวจสอบแบคทีเรีย

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (complete randomized design, CRD) โดยศึกษาปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน โดยเก็บตัวอย่างกุ้งขาวสุขภาพดีและไม่มีโรคระบาดจากบ่อเลี้ยงจำนวน 3 บ่อ แบ่งทางเดินอาหารของกุ้งขาวออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ดับและดับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลาย ซึ่งจะตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ตัวอย่างบ่อละ 3 ตัวอย่าง ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะทำการบดส่วน

ของทางเดินอาหารที่ต้องการของกุ้ง 3 ตัวรวมกัน ซึ่งการศึกษาปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนแบคทีเรียด้วยวิธี FISH จะทำการตรวจสอบด้วย probe 12 ชุดๆ ละ 2 ซ้ำ โดยแต่ละชุดจะประกอบด้วย probe EUB 338 mix และ probe ที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่ทำการติดตาม ในการศึกษาปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร 3 ชนิดๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 2 ความเข้มข้น

#### การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินของเกษตรกรจากแหล่งเลี้ยงกุ้งขาว 3 แหล่ง ได้แก่ แหล่งเลี้ยงจากฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) ทำการเก็บตัวอย่างในเขต อ.ระโนด จ.สงขลา แหล่งเลี้ยงจากทะเลสาบสงขลา ทำการเก็บตัวอย่างในเขต อ.ปากพะยูน จ.พัทลุง และจากฝั่งตะวันตก (ทะเลอันดามัน) ทำการเก็บตัวอย่างในเขต อ.ละงู จ.สตูล โดยเก็บตัวอย่างกุ้งจากแหล่งเลี้ยงจำนวนแหล่งละ 1 บ่อ ในระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2548 ซึ่งกุ้งขาวที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นกุ้งขาวที่มีอายุระหว่าง 45-80 วัน สุขภาพดีไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสสำคัญ ได้แก่ White spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), Yellow head baculovirus (YBV) และทำการตรวจยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR รวมถึงไม่แสดงอาการการติดเชื้อโรคแบคทีเรียหรือมีประวัติการเลี้ยงปลาปฏิชีวนะในระหว่างการเลี้ยง มีอัตราการเจริญเติบโตและการกินอาหารที่เหมาะสมกับอายุของกุ้ง โดยเก็บตัวอย่างกุ้งขาวบ่อละ 18 ตัวจากการสุ่มกุ้งในยอรอบบ่อเลี้ยง

#### การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจสอบด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้กุ้งบ่อละ 3 ตัวอย่างๆ ละ 2 ความเข้มข้น โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการบดรวมส่วนของทางเดินอาหารชนิดเดียวกันจากกุ้ง 3 ตัว โดยการสับกุ้งโดยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1-2 นาที และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเปลือกโดยการใช้อีทานอล 70% ตัดแยกทางเดินอาหารของกุ้งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และ

ลำไส้ส่วนปลายด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นบดแต่ละส่วนของทางเดินอาหารจากตัวอย่างกุ้ง 3 ตัวรวมกันในสารละลายเกลือแกง (NaCl) 1.5% และปรับความเข้มข้นเป็น 0.1 กรัม/มล. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Trypticase Soy Agar (TSA: Merck, Darmstadt, Germany), de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS: Merck, Darmstadt, Germany) ซึ่งเติมเกลือแกง 1.5% และ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS: Merck, Darmstadt, Germany)

#### เทคนิค Fluorescent *in situ* hybridization

การเตรียมตัวอย่างลำไส้กุ้งบด (ตัดแปลงจากบุญกอบ และคณะ, 2548)

ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ใช้ตัวอย่างบ่อละ 3 ตัวอย่าง โดยบดแต่ละส่วนของทางเดินอาหารของกุ้ง 3 ตัวรวมกันให้ละเอียดจากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย probe แต่ละชนิดๆ ละ 3 ซ้ำ โดยการสับกุ้งทันทีเมื่อนำขึ้นจากบ่อโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1-2 นาที ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณเปลือกโดยการใช้อีทานอล 70% และรักษาสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งโดยการฉีดสารละลายฟอร์มาลิน 10% แล้วคองในสารละลายฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C แล้วย้ายเก็บในอีทานอล 70% ที่อุณหภูมิ -20°C จากนั้นนำมาตัดแยกทางเดินอาหารของกุ้งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนกลางและลำไส้ส่วนปลาย โดยแต่ละส่วนของทางเดินอาหารจะบดรวมกันจากกุ้ง 3 ตัว ในอีทานอล 70% โดยทุกตัวอย่างจะมีปริมาณของเนื้อเยื่อ 0.1 กรัม/มล. จากนั้นนำไปทำให้เซลล์กระจายตัวด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) (Kubota, in-sonator 201M, Japan) ที่ 80 W เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง ภายใต้อุณหภูมิต่ำ และยืนยันการคงตัวของเซลล์แบคทีเรียโดยนำเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ในสกุลต่างๆ เช่น *Bacillus* sp., *Vibrio* sp. และ *Escherichia coli* ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนมาทำให้เซลล์กระจายด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงที่ระดับเดียวกันและตรวจสอบการคงอยู่ของเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมสีเรืองแสง DAPI (5 µg/ml) จากนั้นทำเก็บรักษาตัวอย่างที่พร้อมนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาศึกษาต่อไป

การตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH (ดัดแปลงจาก Amann, 1995)

นำตัวอย่างลำไส้ของกิ้งก่าที่ระดับการเจริญที่ เหมาะสม 1 µl เกลี่ยลงบนเทฟลอนสไลด์ (Teflon slide) ที่งให้แห้ง นำไปตั้งน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ด้วย เอทานอล 70% 80% และ 100% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วทิ้งให้แห้ง ทำการบ่มตัวอย่างกับ probe แต่ละชนิด (Table 1) โดยแต่ละตัวอย่างจะบ่ม probe พร้อมกัน 2 ชนิด คือ probe EUB 338 mix ที่ใช้ในการตรวจสอบกลุ่ม *Eubacteria* (Thimm and Tebbe, 2003) และ probe ที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ โดยให้สีการติดฉากของ probe EUB 338 mix ด้วยสีเรืองแสงที่ต่างจาก probe ที่จำเพาะกับกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ ทำการ hybridization ในสารละลาย hybridization buffer (NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM, SDS 0.01% และความเข้มข้น formamide ตามชนิดprobe) โดยมี probe ความเข้มข้น 25 ng/µl นำตัวอย่างกับ probe บ่มในตู้

ควบคุมอุณหภูมิ (TECHNE, hybridizer HB-1D) ที่อุณหภูมิ 46°C ในสภาพที่เต็มไปด้วยไอของ hybridization buffer และปราศจากแสงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (Tris-HCl 20 mM, SDS 0.01% และ NaCl ความเข้มข้นตามชนิดของ probe) 1 ครั้งที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แห้ง นำสไลด์ไปย้อมสีเซลล์ทั้งหมด ด้วยสีเรืองแสง DAPI (5 µg/ml) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หยอด anti-fading solution (p-phenylenediamine 0.1% ในสารละลายผสมของ NaCO<sub>3</sub> กับ glycerol) ลงบนสไลด์เพื่อชะลอการจางหายของสารเรืองแสง แล้วจึงปิดด้วยกระจกปิด (cover glass) ก่อนนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ epifluorescent (Olympus, BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง cooled CCD (Olympus, DP70) ซึ่งผลจากการใช้ probe ที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียรวมกับการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI สามารถแสดงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ จากเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีเรืองแสงต่างกัน โดยเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกเซลล์จะสามารถติดสี

Table 1. FISH probes

Name	Specificity	dye***	Sequence of probe (5'-3')	Reference
EUB 338 mix*	Eubacteria	Flu/Rho		
EUB 338	most Bacteria	Flu/Rho	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann R.T., 1995
EUB II	Planctomycetales	Flu/Rho	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Daims et al., 1999
EUB III	Verrucomicrobiales	Flu/Rho	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Daims et al., 1999
LGC354 mix**	LGC group	Cy3		
LGC354A	most Lactobacillales	Cy3	TGG AAG ATT CCC TAC TGC	Meier et al., 1999
LGC354B	most Bacillales	Cy3	CGG AAG ATT CCC TAC TGC	Meier et al., 1999
LGC354C	most Streptococcaceae	Cy3	CCG AAG ATT CCC TAC TGC	Meier et al., 1999
ALF1B	α-Proteobacteria group	Cy3	CGT TCG YTC TGA GCC AG	Manz et al., 1992
BET42a	β-Proteobacteria group	Flu	GCC TTC CCA CTT CGT TT	Manz et al., 1992
BET42a Comp			GCC TTC CCA CAT CGT TT	Manz et al., 1992
GAM42a	γ-Proteobacteria group	Cy3	GCC TTC CCA CAT CGT TT	Manz et al., 1992
GAM42a Comp.			GCC TTC CCA CTT CGT TT	Manz et al., 1992
CFB560	CFB group	Cy3	WCC CTT TAA ACC CAR T	Louise et al., 2002
HGC69A	HGC group	Cy3	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	Roller et al., 1994
HGC69A Comp			TAT AGT TAC GGC CGC CGT	Roller et al., 1994
LAB158	Lactic acid bacteria	Cy3	GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA	Harmsen et al., 1999
Enc131	<i>Enterococcus</i> spp.	Flu	CCC CTT CTG ATG GGC AGG	Behr et al., 2000
Pseumonas	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cy3	GAT CCG GAC TAC GAT CGG TTT	Schleifer et al., 1992
G V	<i>Vibrio</i> spp.	Cy3	AGG CCA CAA CCT CCA AGT AG	Eilers et al., 2000

Sequence in IUPAC code, \* Mix EUB 338, EUB II, EUB III in same volume, \*\* Mix LGC354a, LGC354b, LGC354c in same volume, \*\*\* Flu = Fluorescein, Rho = Rhodamine, Cy3 = Cy3 (red color)

เรืองแสงของ DAPI โดย DAPI ที่มีความจำเพาะต่อ DNA หรือ RNA สายคู่ โดยจะเชื่อมต่อกับสาย DNA หรือ RNA ที่ตำแหน่งของเบส A-T และ A-U ซึ่งเกิดการเรืองแสงสีน้ำเงิน ในขณะที่ probe EUB338 mix ซึ่งเป็น probe ที่ใช้ในการติดตามแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacteria* ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ probe EUB338 mix ที่ติดสารเรืองแสง 2 ชนิด ได้แก่ Fluorescein ซึ่งแสดงการเรืองแสงสีเขียวและ Rhodamine ซึ่งแสดงการเรืองแสงสีแดง โดยจะทำการเลือกใช้สีที่มีความแตกต่างจาก probe จำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ ในการปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด จะทำการสุ่มนับ 10 พื้นที่/ตัวอย่าง/ซ้ำ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยจะทำการเจือจางตัวอย่างทางเดินอาหารกุ้งบดให้มีปริมาณแบคทีเรียรวมระหว่าง 500-1000 เซลล์/พื้นที่ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1980)

#### ผลการทดลอง

##### การเจือจางแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวทั้ง 3 ส่วนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ข้อมูลปริมาณแบคทีเรียที่พบมีการกระจายตัวในช่วงกว้าง โดยขึ้นอยู่กับอวัยวะที่นำมาตรวจสอบ กล่าวคือ พบปริมาณแบคทีเรียรวมบนอาหารแข็ง TSA ในตับและตับอ่อน  $3.4 \pm 2.2 \times 10^7$  ในลำไส้ส่วนต้น  $30.8 \pm 30.2 \times 10^7$  และในลำไส้ส่วนปลาย  $23.04 \pm 23.85 \times 10^7$  CFU $g^{-1}$  ตามลำดับ และไม่พบการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนของกุ้งที่การเจือจางระดับ  $10^{-1}$  บนอาหารแข็ง TCBS แต่พบการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจางโดยพบจำนวน 2 ตัวอย่างๆ ละ 6 และ 10 โคโลนีตามลำดับ (ข้อมูลไม่แสดง) นอกจากนี้พบว่าบริเวณลำไส้มีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าในตับและตับอ่อน และไม่

พบการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ในตับและตับอ่อนของกุ้ง แต่จะพบมากในบริเวณลำไส้ส่วนต้น (Table 2)

##### การตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินโดยเทคนิค FISH

การนำตัวอย่างแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., *E. coli* ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนมาทำให้เซลล์กระจายตัวด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงในระดับ 80 W 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที ภายใต้อุณหภูมิที่ไม่มีผลต่อการแตกสลายของเซลล์แบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) (ข้อมูลไม่แสดง) และจากการตรวจสอบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลายโดยเทคนิค FISH พบว่าทางเดินอาหารแต่ละส่วนของกุ้งขาวมีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มของแบคทีเรียเด่นที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการใช้ probe ที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียรวมกับการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมเรืองแสง DAPI สามารถแสดงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ จากเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีเรืองแสงต่างกัน โดยเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกเซลล์จะสามารถติดสีเรืองแสงของ DAPI ได้ซึ่งจะมีการเรืองแสงสีน้ำเงิน ในขณะที่ probe EUB338 mix ซึ่งเป็น probe ที่ใช้ในการติดตามแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacteria* ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ probe EUB338 mix ที่ติดสารเรืองแสง 2 ชนิด ได้แก่ fluorescein และ rhodamine โดยจะทำการเลือกใช้สีที่มีความแตกต่างจาก Probe จำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการ (Figure 1) จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารที่ศึกษา (Figure 2)

##### โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งขาว

จากการตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินโดยเทคนิค FISH พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacteria* คิดเป็น  $77.58 \pm 3.68\%$  ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยมี  $\beta$ -Proteobacteria group และกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria group มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนสูงที่สุดมีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนคิดเป็น  $28.86 \pm 4.81\%$

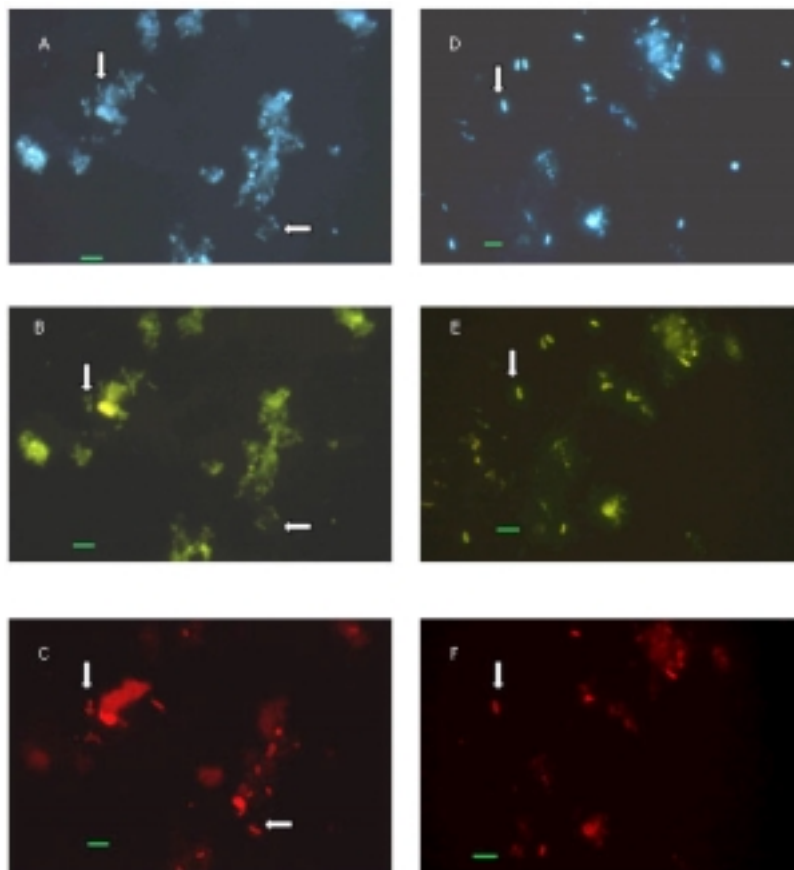
**Table 2. Enumeration of total bacteria, *Vibrio* spp., and lactic acid bacteria counts (CFUml<sup>-1</sup>) from diferent parts of white shrimp gut grown on different media**

Medium	Amount of bacteria (CFUg <sup>-1</sup> )		
	Hepatopancreas	Anterior intestine	Posterior intestine
TSA (x10 <sup>7</sup> )	3.4±2.2 (0.9-6.4)	30.8±30.2 (0.64-88.50)	23.04±23.85 (1.1-67.0)
TCBS (x10 <sup>4</sup> )	-	8.0±18.90 (0.11-58.0)	13.29-26.55 (0.31-76.0)
MRS (x10 <sup>3</sup> )	-	14.54±26.61 (0-73)	1.64±3.15 (0-9)

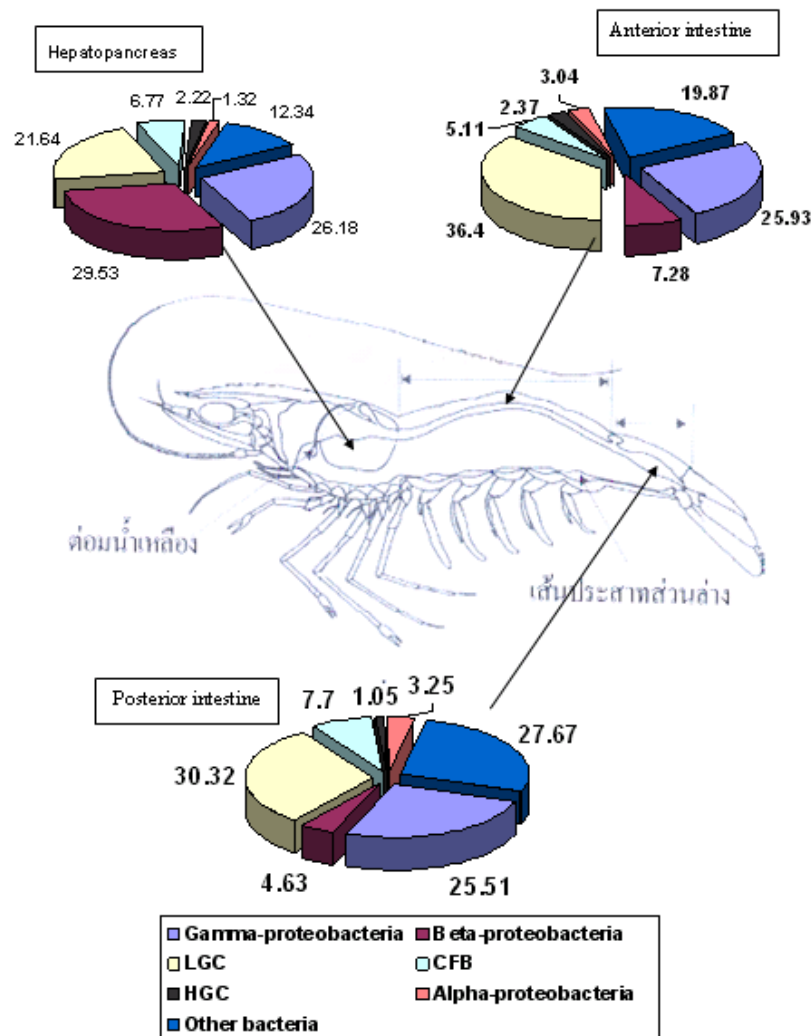
The data represent triplicates from each of three shrimps' gut.

The number in parentheses indicate the range of minimum-maximum value

- = not detected or lesser than 10 CFUg<sup>-1</sup> detected on agar



**Figure 1. Epifluorescent micrographs of microbial communities (arrows) were detected by FISH technique. Hepatopancreas of white shrimp in same field using DAPI (A) and specific probe EUB338 mix (B), LGC354 mix (C) were shown from A-C. Posterior intestine of white shrimp in same field using DAPI (D) and specific probe EUB338 mix (E), LGC354 mix (F) were shown from D-F. Bar, 5 μm.**



**Figure 2. Percentages of bacterial community in detected digestive tract of white shrimp**  
(Color figure can be viewed in the electronic version)

และ 26.18±6.88% ของ *Eubacteria* ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในกลุ่ม LGC group, CFB group, High G+C gram positive bacteria (HGC) group,  $\alpha$ -Proteobacteria group ในเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ลดลงตามลำดับและเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของ HGC group และ  $\alpha$ -Proteobacteria group ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) (Table 3) เมื่อทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -proteobacteria group พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สัดส่วน

ของกลุ่ม *Pseudomonas* spp. 3.39±0.94% และกลุ่ม *Vibrio* spp. 0.25±0.43% ของ *Eubacteria* (Table 4) ขณะที่เปอร์เซ็นต์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC group พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Bacilles 9.61±2.56% ของ *Eubacteria* สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p<0.05$ ) และแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria, *Enterococcus* spp. Streptococcaceae ในปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ลดลงตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของ *Enterococcus* spp. และ Streptococcaceae ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) (Table 5)



**Table 3. Percentages of bacterial group from shrimp gut by hybridization with specific group of bacterial probes base on DAPI or EUB338 mix probe**

Population	Stain/probe	Percentages of bacterial group (mean±SD)		
		Hepatopancreas	Anterior intestine	Posterior intestine
Total Eubacteria	DAPI/EUB mix	77.58±3.68	80.06±2.69	79.5±15.17
γ-Proteobacteria group	GAM42a	26.18±6.88 <sup>1</sup>	25.90±4.89 <sup>2</sup>	25.51±3.34 <sup>2</sup>
β-Proteobacteria group	BET42a	28.86±4.81 <sup>1</sup>	7.28±1.29 <sup>3</sup>	4.63±0.52 <sup>4</sup>
LGC group	LGC354mix	21.64±5.17 <sup>2</sup>	36.40±3.53 <sup>1</sup>	30.32±4.63 <sup>1</sup>
CFB group	CFB560	6.77±1.35 <sup>3</sup>	5.11±0.63 <sup>3,4</sup>	7.57±1.10 <sup>3</sup>
HGC group	HGC69a	2.21±0.67 <sup>4</sup>	3.04±1.87 <sup>4</sup>	1.05±0.70 <sup>5</sup>
α-Proteobacteria group	ALF1B	1.32±0.90 <sup>4</sup>	3.04±0.53 <sup>4</sup>	3.25±0.70 <sup>4,5</sup>
Other bacteria groups		13.02	19.23	27.67

Values in the same row sharing a common superscript are not significantly different (P>0.05).

**Table 4. Percentages of bacterial subgroup in γ-Proteobacteria group from shrimp gut by hybridization with specific group of bacterial probes base on EUB338 mix probe**

Population	probe	Percentages of bacterial group (mean±SD)		
		Hepatopancreas	Anterior intestine	Posterior intestine
<i>Vibrio</i> spp.	G V	0.25±0.43	12.18±2.81	16.17±2.47
<i>Pseudomonas</i> spp.	Pseumonas	3.39±0.94	1.03±0.86	2.47±1.19
Other bacteria group		22.54	12.69	6.87

Values in the same row sharing a common superscript are not significantly different (P>0.05).

**Table 5. Percentages of bacterial subgroup in LGC group from shrimp gut by hybridization with specific group of bacterial probes base on EUB338 mix probe**

Population	probe	Percentages of bacterial group (mean±SD)		
		Hepatopancreas	Anterior intestine	Posterior intestine
Bacillales	LGC354B	9.61±2.561	15.28±2.241	19.03±3.761
Lactic acid bacteria	LAB158	4.17±1.722	8.27±1.782	2.19±0.422,3
Streptococcaceae	LGC354C	1.21±0.753	2.49±0.594	3.20±0.662
<i>Enterococcus</i> spp.	Enc131	2.26±1.073	5.31±1.073	0.95±0.673
Other bacteria group		4.39	5.05	4.97

Values in the same row sharing a common superscript are not significantly different (P>0.05).

โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาว

จากการใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียด้วย probe ชนิดต่างๆ ในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน พบว่า มีโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่ประกอบด้วยแบคทีเรียในกลุ่มของ *Eubacteria* คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สัดส่วน 80.06±2.69% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดซึ่งมีแบคทีเรียกลุ่ม

LGC group เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) คิดเป็น 36.40±3.53% ของ *Eubacteria* และพบแบคทีเรียในกลุ่ม γ-Proteobacteria group, β-Proteobacteria group, CFB group, α-Proteobacteria group และ HGC group ในเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ลดลงตามลำดับ (Table 3) เมื่อทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์

สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria group พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของกลุ่ม *Vibrio* spp.  $12.18 \pm 2.81\%$  และ *Pseudomonas* spp.  $1.03 \pm 0.86\%$  ของ *Eubacteria* (Table 4) ขณะที่เปอร์เซ็นต์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC group พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม Bacillales  $15.28 \pm 2.24\%$  ของ *Eubacteria* ซึ่งสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria, *Enterococcus* spp. Streptococceae มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ลดลงตามลำดับ (Table 5)

#### โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาว

จากการตรวจสอบชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ส่วนปลายของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินด้วยเทคนิค FISH พบว่า มีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มของ *Eubacteria* คิดเป็น  $79.51 \pm 5.17\%$  ของปริมาณเซลล์ทั้งหมด โดยมีแบคทีเรียกลุ่มกลุ่ม LGC group เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) คิดเป็น  $30.32 \pm 4.63\%$  ของ *Eubacteria* และพบว่าเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแต่ละกลุ่มแบคทีเรียมีปริมาณต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มแบคทีเรีย โดยพบแบคทีเรียในกลุ่มของ  $\gamma$ -Proteobacteria group, CFB group,  $\beta$ -Proteobacteria group,  $\alpha$ -Proteobacteria group และ HGC group ในเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ลดลงตามลำดับ (Table 3) ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria group ของลำไส้ส่วนปลาย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของกลุ่ม *Vibrio* spp.  $16.17 \pm 2.47\%$  และ *Pseudomonas* spp.  $2.47 \pm 1.19\%$  ของ *Eubacteria* (Table 4) และการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์สัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม LGC group พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.  $19.03 \pm 3.76\%$  ของ *Eubacteria* สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ๆ มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนที่ลดลงตามลำดับ (Table 5)

#### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวด้วยอาหารทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียมีการกระจายตัวในช่วงกว้างใน 3 ส่วนของทางเดินอาหาร

ที่ทำการศึกษา และมีการตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในตับและตับอ่อนน้อยมาก ในขณะที่เปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในลำไส้ทั้งสองส่วนมีปริมาณไม่ถึง 1% ของแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหาร TSA ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Gomez-Gil และคณะ (1998) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นกลุ่มหลักในทุกส่วนของทางเดินอาหารของกุ้งขาว และรายงานว่าพบ *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนมากถึง  $4.30 \times 10^4$  CFUg<sup>-1</sup> ( $1.11 \times 10^2 - 2.67 \times 10^5$  CFUg<sup>-1</sup>) โดยตรวจพบโคโลนีสีเขียว 61.72% บนอาหารแข็ง TCBS ในขณะที่การทดลองครั้งนี้พบโคโลนีสีเหลืองบนอาหารแข็ง TCBS เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาพของกุ้งตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบแตกต่างกัน

ในการประยุกต์เทคนิค FISH เพื่อศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้ง แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารของกุ้งที่ได้ทำการแบ่งออกเป็น 6 group นอกจากนี้ นำ LGC group มาจัดกลุ่มย่อยออกเป็น 5 subgroup และ  $\gamma$ -Proteobacteria group มาจัดกลุ่มย่อยออกเป็น 3 subgroup โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจาก 16S และ 23S rRNA Phylogenetic tree ทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่มีสุขภาพดีและเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารเมื่อสัตว์เจ้าบ้านอยู่ในสถานะเครียดหรือได้รับสารปฏิชีวนะ (Knarreborg et al., 2002) ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Kimura et al., 1976; Swidsinski et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารสามารถเปลี่ยนแปลงได้จากสาเหตุหลายๆ ประการ ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล (Al-Harbi et al., 2004) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงตามช่วงชีวิตของสัตว์เจ้าบ้าน อาหารและปัจจัยอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ส่งผลเสียต่อสัตว์เจ้าบ้าน

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินที่มีสุขภาพดีโดยเทคนิค FISH แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าในทุกส่วนของทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ทำการศึกษามีปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของ *Eubacteria* เป็นองค์ประกอบหลักของชุมชนจุลินทรีย์ โดยพบสูงถึง  $77.58 \pm 3.68\%$  ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่พบในตับและตับอ่อน

80.06±2.69% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดในลำไส้ส่วนต้น และ 77.58±3.68% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดในลำไส้ส่วนปลาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hart และคณะ (2002) ที่กล่าวว่า โดยส่วนใหญ่ของชุมชนจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของสัตว์จะมีแบคทีเรียเป็นกลุ่มหลักและมีความหลากหลายสูง ในขณะที่โครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารของกุ้งขาวมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของตับและตับอ่อนกับลำไส้ทั้งสองส่วน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งในแง่ของกลุ่มแบคทีเรียหลักและปริมาณเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเมื่อเทียบกับปริมาณ *Eubacteria* ทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะแวดล้อมในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นค่าความเป็นกรดต่าง สารอาหารรวมถึงเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการย่อยอาหารของกุ้ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ไก่ของ Lu และคณะ (2003) ที่พบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนของแบคทีเรียกลุ่มเด่นระหว่างลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของไก่ และสอดคล้องสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคในการติดตาม rRNA เช่น การศึกษาของ Depalnce และคณะ (2000) ที่ศึกษาในหนูและ Pryde และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาในหมู รวมถึงในมนุษย์ (Suau *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999) แต่เมื่อนำโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลายมาทำการเปรียบเทียบ พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มหลักเป็นกลุ่มเดียวกัน คือ LGC group รวมถึงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียอื่นๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมและปัจจัยจำกัดในการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ทั้งสองส่วนไม่แตกต่างกันมากนัก

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

- บุญกอบ วิชัยพงศ์สุทธิ ดอกกรัก ชัยสาร สุภญา ศิริรัฐนิคม นุกูล อินทรสังขา พูนสุข ประเสริฐสรพร และกิจการ สุขมาตย์. 2548. การใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vanamei*). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27(1) : 275-282.
- ศิริรัตน์ สีหานาท ลือชัย บุตุคูป สมคิด แจ็งกลาง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2548. การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกราม. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27(1) : 265-274.
- Al-Harbi, A. and Naim Uddin, M. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 229: 37-44.
- Amann, R.I. 1995. *In situ* identification of microorganism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic probe. In J.D.van Elsas, and F.J. de Bruijn eds., *Molecular Microbial ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Amann, R.I., Glockner, F.O. and Neef, A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol Rev*. 20: 191-200.
- Behr T., Koob, C., Schedl, M., Mehlen, A., Meier, H., Knopp, D., Frahm, E., Obst, U., Schleifer, K., Niessner R. and Ludwig W. 2000. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst. Appl. Microbiol*. 23: 563-572.
- Chythanya, R., Karunasagar, Indrani and Karunasagar, Iddya. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*. 208: 1-10.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Sysy. Appl. Microbiol*. 22: 434-444.

- Depalnce, B., Hristova, K.R., Oakley, H.A., McCracken, V.J., Aminov, R., Machie, R.I. and Gaskins, H.R. 2000. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *AEM*. 66: 2166-2174.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F. and Aman, R. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3044-3051.
- Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V. and Guerra-Flores, A.L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163:1-9.
- Harmsen, H.J., Elfferich, P., Schut, F. and Welling, G. 1999. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. *Microb. Ecol. Health. Dis.* 11, 3-12.
- Hart, A.L., Stagg, A.J., Frame, M., Graffner, H., Glise, H., Falk, P. and Kamm, M.A. 2002. Review article: the role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol ther.* 16: 1383-1393.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, P.G., Falk, P.G. and Gordon, J.I. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291:881-884.
- Imaoka, A., Matsumoto, S., Setoyama, H. and Okada, Y. 1996. Proliferative recruitment of intestine intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice. *Eur. J. Immunol.* 26(4): 945-948.
- Jensen, T.K., Boye, M., Hagedorn-Olsen, T., Riising, J. and Angen, O. 1999. *Actinobacillus Pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescence *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.* 36: 258-261.
- Kimura, N., Mimura, F., Nishida, S. and Kobayashi, A. 1976. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chicken. *Poult. Sci.* 55: 1375-1383.
- Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, M., Jensen, B.B. and Tannoch, G.W. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic level of various ades. *AEM*. 68: 5918-5924.
- Louise, A.O., Weightman, A.J. and Fry, J.C. 2002. New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific 16s Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe reveal high bacterial diversity in rever Taff Epilithin. *AEM*. 68(1): 201-210.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B. and Hofacre, C. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *AEM*. 69(11): 6816-6824.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of Proteobacteria: problem and solution. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1999. Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 186-196.
- Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J. App. Micro.* 93: 214-223.
- Pryde, S.E., Richardson, A.J., Stewart, C.S. and Flint, H.J. 1999. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of pig. *AEM*. 65: 5372-5377.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high G+C content using 23s rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*. 140: 2849-2858.
- Schleifer, K.H., Amann, R., Ludwig, W., Rothmund, C., Springer, N. and Dorn, S. 1992. Nucleic acid probes for the identification and *in situ* detection of *Pseudomonas*, p. 127-134. **In** Galli, E., Silver, S. and Witholt, B. (eds.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. *Principle and Procedures of Statistic*. 2<sup>th</sup> edition. New York: McGraw Hill. 63p.

- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J., Gibson, G., Collins, M. and Dore, J. 1999. Direct analysis of gene encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut, AEM. 65: 4799-4807.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H. and Hale, L.P. 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence *in situ* hybridization study in mice. World J. Gastroenterology. 11(8): 1131-1140.
- Thimm, T. and Tebbe, C.C. 2003. Protocol for rapid fluorescence *in situ* hybridization of bacteria on cryosection of microarthopods. AEM. 69: 2875-2878.
- Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J. And Hass, R. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescence *in situ* hybridization. Gut. 46: 608-614.
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W. and Gibson, G.R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today. 8(15): 692-700.
- Weng, L., Rubin, M. and Bristow, J. 2006. Application of sequence-based methods in human microbial ecology. Genome Res. 16: 316-322.
- Zuberi, R., Qadri, R.B., Siddiqui, P.M. 1985. Quantitative and qualitative aspects of bacterial flora of Karachi coastal water shrimp (*Penaeus merguensis* and *Metapenaeus monoceros*). Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene. 181(3-5): 418-29.