

Thesis Title	Metagenomics of Bacteria in Midgut of Thai Farm Honey Bees	
Author	Mr. Terd Disayathanoowat	
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua	Co-advisor
	Dr. Wasu Pathom-aree	Co-advisor
	Prof. Dr. J. Peter W. Young	Co-advisor

ABSTRACT

This study investigated bacterial community structure of the midgut of *Apis mellifera* and *A. cerana indica* in Thailand to understand how bacterial communities develop in *Apis* species. The bacterial species present in replicate colonies from different locations and life stages were analysed. The PCR-amplification of bacterial 16S rRNA gene fragments and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analyses revealed a total of 16 distinct Terminal Restriction Fragments (T-RFs), 12 of which were shared between *A. mellifera* and *A. cerana* populations.

The T-RFs were affiliated to *Beta-* and *Gamma-proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinomycetes*. The *Gammaproteobacteria* were found to be common in all stages of honey bee. In addition, the *Firmicutes* group was mainly found in the worker bees. Bacterial community structure showed no difference amongst the replicate colonies, but was affected to some degree by geographical location, life stage, and species of honey bees.

Aerobic bacteria were isolated from midgut of *A. cerana indica* on five different media. The highest count (5.4×10^7 colony forming units (CFU/g)) was obtained on Eosin methylene blue (EMB) media. Fifty-eight isolates were purified and identified using 16S rRNA sequence. Two groups of Gammaproteobacteria and Firmicutes were found. The most abundant species were *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* and *Enterobacter cloacae*. To determine their role in promoting nutrient availability, enzyme synthesis and inhibition of bee pathogens; protease and lipase activities of some bacterial isolates were investigated. Assimilation of fourteen carbon substrates was studied. D-Mannose and Raffinose showed favorable utilization. *Paenibacillus larvae*, the cause of American foulbrood was inhibited by compound produced from some members of *Klebsiella*.

In *A. mellifera*, aerobic bacteria were isolated on five different media. The highest count (7.84×10^7 CFU/g) was obtained on Tryptic Soy Agar (TSA) media. Ninety-six isolates were purified and identified using biochemical tests methods. Two groups of Gammaproteobacteria and Firmicutes were found. The most abundant species were *Pseudomonas aeruginosa*, *E. cloacae* and *E. aerogenes*. To determine their role in nutrient promotion, enzyme synthesis and inhibitory effect of bee pathogens; protease and lipase activities of some bacterial isolates were investigated.

Assimilation of fourteen carbon substrates was studied. D-Mannose and Raffinose showed favorable utilization amongst isolates. *P. larvae*, the etiological agent of

American foulbrood was inhibited by compound produced from some members of *Staphylococcus*.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

เมทาจีโนมิกส์ของแบคทีเรียในลำไส้ส่วนกลางของ
ผึ้งเลี้ยงไทย

ผู้เขียน

นายเทิด ดิษยธนูวัฒน์

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ. ดร. ยี่มณี ตระกูลพั้ว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อ. ดร. วสุ ปฐมอารีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Prof. Dr. J. Peter W. Young อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มุ่งตรวจสอบชุมชนชีพของแบคทีเรียในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งเลี้ยงไทยทั้ง 2 ชนิด คือ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และผึ้งโพรงไทย (*A. cerana indica*) โดยเก็บตัวอย่างลำไส้ส่วนกลางจากผึ้งทั้ง 2 ชนิด จากจังหวัดเชียงราย น่าน และลำพูน จังหวัดละ 3 รัง และแต่ละรังเก็บตัวอย่างจากผึ้งงาน 3 ระยะคือ ตัวอ่อน ดักแด้ และ ตัวเต็มวัย ใช้การตรวจสอบ 2 วิธี คือ การเลี้ยงเชื้อบนอาหารและการศึกษาทางอณูชีววิทยา ในการศึกษาทางอณูชีววิทยานั้นได้เลือกใช้ไพรเมอร์ที่จับบริเวณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของดีเอ็นเอรวมที่สกัดจากลำไส้ส่วนกลาง มาเพิ่มจำนวน แล้วทำการแยกความแตกต่างของลำดับเบสของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการทาง Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมด 16 ชิ้นส่วน โดย 12 ชิ้นส่วนพบในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งทั้ง 2 ชนิด เมื่อทำการตรวจสอบชนิดแบคทีเรียของชิ้นส่วนทั้งหมดพบว่า เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของ *Beta- and Gamma-proteobacteria*, *Firmicutes* และ *Actinomycetes* โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Gamma-proteobacteria* พบเป็นชนิดเด่นในลำไส้ส่วนกลางทั้ง 3 ระยะการเจริญเติบโตของผึ้งทั้ง 2 ชนิด พบ *Firmicutes* เป็นจำนวนมากเมื่อผึ้งเจริญขึ้นมาในระยะตัวเต็มวัย สำหรับการเปรียบเทียบชุมชนชีพของแบคทีเรียในด้านปัจจัยต่างๆ นั้นพบว่า มีความแตกต่างของชุมชนชีพแบคทีเรียในลำไส้ส่วนกลางอย่างมีนัยสำคัญ ในปัจจัยบางระดับของ ระยะห่างของแหล่งเลี้ยง ระยะการเจริญเติบโต และ ชนิดของผึ้ง

สำหรับการศึกษาโดยวิธีแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารนั้น เชื้อที่แยกจากลำไส้ส่วนกลางของ ผึ้งโพรงไทย *A. cerana indica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด พบว่า บนอาหาร Eosin methylene blue (EMB) สามารถแยกเชื้อได้มากที่สุด โดยแยกจากผึ้งตัวเต็มวัย ได้จำนวนแบคทีเรียถึง 7.84×10^7 colony forming unit (CFU/g) 96 ไอโซเลท จากนั้นทำการจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางอนุชีววิทยาของยีน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดสามารถแยกได้อยู่ใน 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ Gammaproteobacteria และ Firmicutes โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* และ *Enterobacter cloacae* ตามลำดับ นอกจากการบ่งชนิดแล้ว ยังมีการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ พบว่า มีบางเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไลเปสและ โปรตีเอสได้ในปริมาณน้อย และการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 14 ชนิดนั้น พบว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ดีมากบนอาหารที่มีน้ำตาล D-Mannose และ Raffinose สำหรับการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผึ้งนั้นพบว่า มีแบคทีเรียบางชนิดในจีนัส *Klebsiella* สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Paenibacillus larvae* อันเป็นสาเหตุของโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน

สำหรับการศึกษาโดยวิธีแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารจากลำไส้ส่วนกลางของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด พบว่า บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) สามารถแยกเชื้อได้มากที่สุด โดยแยกจากผึ้งตัวเต็มวัย ได้จำนวนแบคทีเรียถึง 5.4×10^7 CFU/g จากตัวอย่างทั้งหมดสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 99 ไอโซเลท จากนั้นทำการจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดสามารถแยกได้อยู่ใน 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ Gamma-proteobacteria และ Firmicutes โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ แบคทีเรียบางเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มไลเปสและ โปรตีเอสได้ในปริมาณน้อย และการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 14 ชนิดนั้นให้ผลเช่นเดียวกันกับแบคทีเรียที่แยกได้จาก *A. cerana indica* สำหรับการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผึ้งนั้นพบว่า มีแบคทีเรีย *Staphylococcus* 1 ชนิด สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Paenibacillus larvae* อันเป็นสาเหตุของโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน