ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกุ้งกุลาดำ
ผู้เขียน	นายสุภฎา คีรีรัฐนิคม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2548

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีการสร้างแคโรทีนอยด์รวมสูงสุด(3.03-3.54 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ในสภาวะมีแสง ไม่มีอากาศจำนวน 4 ไอโซเลท (TM3, TN5, TM11B and SV2) ได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัสโรโดแบคเตอร์ (*Rhodobacter*) เมื่อศึกษาลำดับเบสของ 16s rDNA พบว่า ไอโซเลท SV2 และ TN5 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Rhodobacter sphaeroides* (99.79 % similarity) ส่วนไอโซเลท TM3 และ TM11B มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Rhodobacter* sp. (94.06 % similarity) จากนั้นนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 4 ไอโซเลท มาศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

จัดเตรียมอาหารทดลองเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) อาหารทดลองเสริมเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ละไอโซเลทในระดับความเข้มข้น 5 % น้ำหนักแห้ง เทียบกับอาหารชุดควบคุมซึ่งไม่เสริมเซลล์แบคทีเรีย ทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารแต่ละสูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม และอาหารทดลองเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์มีการเจริญเติบโตสูงสุด ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และแอสตาแซนทีนมีค่าสูงสุดในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ การเสริม *Rhodobacter* sp. TM11B มีผลให้สีตัวกุ้งเข้มกว่าชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเสริมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไอโซเลทอื่นๆ แต่ไม่มีผลให้ปริมาณแอสตาแซนทีนในตัวกุ้งเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) มีค่าสูงขึ้นในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ และ *Rhodobacter* sp. TM11B พบเซลล์ตาย และการเสื่อมสภาพของเซลล์บุผิวท่อตับอ่อน ในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริม *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท SV2 และ TN5 จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่ามีเพียง *Rhodobacter* sp. TM11B ที่มีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอาหารกุ้งกุลาดำ อย่างไรก็ตามการเสริมเซลล์ดังกล่าวเป็นปริมาณมากในอาหารมีผลให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง ดังนั้นจึง

จำเป็นต้องลดปริมาณการเสริมเซลล์ในอาหารโดยที่แคโรทีนอยด์รวมจะยังคงมีปริมาณสูงในอาหาร ด้วยเหตุนี้จึงนำ *Rhodobacter* sp. TM11B มาศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการสร้างแคโรทีนอยด์และการเจริญสูงสุด จากการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ และปริมาณ แคโรทีนอยด์รวมมีค่าสูงสุดในอาหารเลี้ยงเซลล์เสริมยีสต์สกัด (yeast extract) และ เปปโตน (peptone) 3 กรัมต่อลิตร โมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) 1 กรัมต่อลิตร และเฟอร์ริก ซิเตรท (ferric citrate) 5 ไมโครโมล ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อค่าเท่ากับ 7 ที่ปริมาณเกลือ 5 % มีผลให้เกิดการสร้างแคโรทีนอยด์สูงสุด จากการศึกษานี้พบว่า *Rhodobacter* sp. TM11B มีการสร้างแคโรทีนอยด์รวมสูงขึ้น 227.2 % เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ G5 ปกติโดยไม่มีผลต่อปริมาณเซลล์ในระหว่างการผลิต

เมื่อนำเซลล์แห้งของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำในระดับ 1-5 % เปรียบเทียบกับอาหารเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ 100 ppm และเซลล์สไปรูลินาแห้ง ในระดับความเข้มข้น 3 % พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ *Rhodobacter* sp. TM11B มีการเจริญเติบโตต่ำ ทั้งนี้อัตราการแลกเนื้อ และการรอดตายไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ *Rhodobacter* sp. TM11B 1 % กับกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมอาหารเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ 100 ppm เซลล์สไปรูลินาแห้ง 3% และอาหารชุดควบคุม ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดต่ำในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ *Rhodobacter* sp. TM11B 3-5% อย่างไรก็ตามพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงสุดในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ *Rhodobacter* sp. TM11B 5% ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และแอสตาแซนทีนในตัวกุ้งมีค่าสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์สไปรูลินาแห้ง 3% ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ *Rhodobacter* sp. TM11B 5% มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และแอสตาแซนทีน ไดเอสเทอร์ เพิ่มขึ้นกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเซลล์ *Rhodobacter* sp. TM11B ในด้านการปรับปรุงสีของตัวกุ้งมีค่าต่ำ เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์สไปรูลินาเสริมในอาหารกุ้ง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงผลของแหล่งสารสีธรรมชาติอื่นต่อการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค องค์ประกอบเลือด ความทนทานต่อความเครียด และผลที่มีต่อสีตัวกุ้ง โดยศึกษาผลของอาหารเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ 50 ppm บีตา-แคโรทีนสังเคราะห์ 125 ppm และ 200 ppm บีตา-แคโรทีนสกัดจาก สาหร่ายดูนาลิเอลลา (Dunaliella extract, Betatene®) 125 ppm และเซลล์สไปรูลินาแห้ง 3% เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในกุ้งกุลาดำขนาด 12 กรัม พบว่าการเจริญเติบโต การรอดตายและความต้านทานโรคไม่มีความแตกต่างทางสถิติในอาหารทดลองทุกสูตร ส่วนปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอออกจากน้ำเลือด (clearance of pathogenic vibrio) ไม่มีความแตกต่างกันในกุ้งขนาด 12-15 กรัม ที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทีนสังเคราะห์ 100 ppm บีตา-แคโรทีนสังเคราะห์ 125 ppm และ 250 ppm บีตา-แคโรทีนสกัดจากสาหร่ายดูนาลิเอ

ลลา (Dunaliella extract, Betatene®) 250 ppm และเซลล์สไปรูลินาแห้ง 6% นอกจากนี้ปริมาณแอสตาแซนทีนในตัวกุ้งไม่มีความแตกต่างกันในอาหารทดลองที่เสริมแคโรทีนอยด์ทุกสูตร จากผลการทดลองนี้จึงเลือกบีตา-แคโรทีนสกัดจากสาหร่ายดูนาลิเอลลา (Algro Natural®) มาศึกษาถึงผลของความเข้มข้นต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ความต้านทานโรค ความทนทานต่อความเครียด และผลต่อสีตัวกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งที่มีขนาด 1-2 กรัม ซึ่งได้รับอาหารเสริม Algro Natural® 125-300 ppm มีการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมที่ได้รับอาหารไม่เสริม Algro Natural® ทั้งนี้ปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง แต่กุ้งที่ได้รับอาหารเสริม Algro Natural® 300 ppm มีการรอดตายจากโรคตัวแดงดวงขาวสูงกว่าชุดการทดลองอื่น รวมทั้งมีความทนทานต่อความเครียดจากการขาดออกซิเจนมากขึ้น ส่วนกุ้งขนาด 12-15 กรัมที่ได้รับอาหารทดลองดังกล่าวมีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงตามระดับของ Algro Natural® ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร (r = -0.97) ขณะที่ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอออกจากน้ำเลือดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละชุดการทดลอง ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม และปริมาณแอสตาแซนทีนในตัวกุ้งมีค่าสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม Algro Natural® ในระดับความเข้มข้น 200-300 ppm แต่ความต้านทานโรคและความทนทานต่อความเครียดจากการขาดออกซิเจนมีค่าสูงสุดในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริม Algro Natural® 300 ppm จากการทดลองทำให้ทราบว่าการเสริม Algro Natural® 125 ppm ให้ผลในด้านการปรับปรุงสีตัวกุ้งกุลาดำได้ใน 6 สัปดาห์ ขณะที่การเสริม Algro Natural® 300 ppm มีผลให้กุ้งกุลาดำมีความต้านทานต่อโรคตัวแดงดวงขาว และทนทานต่อความเครียดได้มากขึ้น

Thesis Title	Evaluation of Possible Application of Photosynthetic Bacteria in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)
Author	Mr. Suphada Kiriratnikom
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2005

ABSTRACT

Four isolates (TM3, TN5, TM11B and SV2) of the photosynthetic bacteria which having the highest carotenoids production under anaerobic light condition (average carotenoids content of 3.03-3.54 mg/g dry cell weigh) were obtained from shrimp ponds. All of the isolates are the members of purple bacteria which belong to the purple-non sulfur family *Rhodospirillaceae* in the genus Rhodobacter. From the sequencing of 16s rDNA and phylogenic analysis, isolate SV2 and TN5 shown 99.79 % similarity to the *Rhodobacter sphaeroides* the isolates TM3 and TM11B shown 94.06 % similarity to *Rhodobacter* sp. All of 4 isolates were selected for study in the potential as feed supplement (effects on growth performance and pigmentation) in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

A test diet containing 100 ppm synthetic astaxanthin, 5% dry weight of each photosynthetic bacterial isolates and control diet were fed to juvenile black tiger shrimp for 8 weeks. Growth performances were highest in the control and the group fed with synthetic astaxanthin. Total carotenoid and astaxanthin level were highest in shrimp fed with 100 ppm astaxanthin. Supplementation of *Rhodobacter* sp. TM11B provided a little improvement of body color when compared to the control and the other PSB diets, but did not significantly increase the deposition of astaxanthin. Phenoloxidase activity and total hemocytes were increased in the group fed synthetic astaxanthin and *Rhodobacter* sp. TM11B supplemented diets. Cell necrosis and degeneration in the hepatopancreatic tubular epithelium and atrophic changes were observed in shrimp fed with the diet containing *Rhodobacter sphaeroides* SV2 or *Rhodobacter sphaeroides* TN5. Of the photosynthetic bacterial cells isolates tested, only *Rhodobacter* sp. TM11B, could possible be used as a dietary supplement in black tiger shrimp. However, high inclusion of

bacterial cells supplement could be an adversed effect to the growth performance. Therefore, the *Rhodobacter* sp. TM11B were selected to the optimization studies for enhanced the total carotenoid content and growth with a practical culture medium. The highest cell mass and total carotenoids production were obtained in the modified G5 medium which contained 3 g/l of yeast extract and peptone supplemented with 1 g/l of monosodium glutamate. The addition of 5 μM ferric citrate increased the total carotenoids production to the highest level at 120 hr of incubation, but did not affect the growth of *Rhodobacter* sp. TM11B. The optimum pH for maximum growth and total carotenoids production is 7. The optimum level of sodium chloride for maximum growth and highest total carotenoids content was 5 %. By this optimization, the total carotenoids content of *Rhodobacter* sp. TM11B can be increased to 227.2 % compared to the normal G5 medium.

Lyophilized cells of *Rhodobacter* sp. TM11B cultured from previous condition were added in shrimp diet in the concentrations of 1-5 % compare to the negative control without bacterial supplementation, positive control using 100 ppm synthetic astaxanthin and 3 % of dried-*Spirulina*. At the end of feeding trial (week 8) the retardation of the body weight were observed in all carotenoids supplemented diets. Feed conversion rates and survival were not significantly difference in the group fed control, 100 ppm astaxanthin, 3% Spirulina and 1% *Rhodobacter* sp. TM11B. A reduction of total hemocytes were observed in the group fed 3-5 % *Rhodobacter* sp. TM11B, however the highest phenoloxidase activity was found in shrimp fed 5 % *Rhodobacter* sp. TM11B. The highest total carotenoids and free astaxanthin in the shrimp cacass found in the group fed 3 % *Spirulina* supplemented diet. Slightly increment of total carotenoids and di-ester astaxanthin were observed in the shrimp fed 5% *Rhodobacter* sp. TM11 B when compared to the control group. However, the efficiency of this photosynthetic bateria isolate is lower than *Spirulina* and synthetic astaxanthin-supplemented diet, therefore the further studies were undertaken to determined the effects of various sources of natural carotenoid on growth performance, disease resistance, blood parameters, stress tolerance and pigmentation in black tiger shrimp. The shrimp (1-2 g body weight) were fed with negative control diet without carotenoid while diet 2 to 6 contain 50 ppm astaxanthin, 125 ppm β-carotene, 200 ppm β-carotene, 125 ppm Betatene® and 3 % dried *Spirulina* for 6 weeks. At the end of experiment, weight gain and survival were not significantly difference among shrimp fed each test diets. The resistance to WSSV infection and salinity stress tolerance were not significantly difference among treatments. Total hemocyte

counts, phenoloxidase activity and clearance of pathogenic vibrio from the hemolymph were not significantly different among juvenile shrimp (12-15 g body weight) fed the test diet contained 100 ppm astaxanthin, 125 ppm β-carotene, 250 ppm β-carotene, 250 ppm Betatene® and 6 % dried *Spirulina* or control diet without carotenoid. Astaxanthin levels were not significantly different in the shrimp fed all carotenoid-supplemented diets. From the results of this study, the commercially available Dunaliella extract (Betatene® or Algro Natural®) was selected to determined the effects of various concentration on growth, blood parameters, disease resistance and pigmentation in black tiger shrimp. Small shrimp (1-2 g body weight) fed 125-300 ppm Algro Natural® – supplemented diet for 8 weeks showed higher weight gain and survival compared to the control. There was no significant difference in total hemocyte count and phenoloxidase activity among treatment. Shrimp fed 300 ppm Algro Natural® exhibited higher resistance to WSSV infection than other groups and also became more tolerable to the stress (low dissolve oxygen condition). The juvenile shrimp (12-15 g body weight) fed the same diet for 6 weeks showed a negatively correlation in total hemocyte counts to the increase in Algro Natural® in test diet ($r = -0.97$). Phenoloxidase activity and clearance of pathogenic vibrio from the hemolymph were not significantly different. Total carotenoid and astaxanthin levels were highest in shrimp fed 200-300 ppm Algro Natural®. However, the resistance to WSSV and stress tolerance were found in the group fed 300 ppm Algro Natural®. In conclusion, 125 ppm Algro Natural® was suitable for growth and pigmentation, but the supplementation of 300 ppm of Algro Natural® in shrimp diet for 6 weeks, would be increased the disease and stress resistance in the black tiger shrimp.