ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกโปรไบโอติกยีสต์จากกุ้งกุลาดำ

ผู้เขียน นางสาวจิตรวี เชยชม

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2547

บทคัดย่อ

ทำการแยกยีสต์ได้จำนวน 1 x 10^2 – 1.3 x10^2 CFU/g ซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำจำนวน 120 ตัว ที่เก็บได้จากฟาร์มกุ้ง 6 ฟาร์ม ในบริเวณจังหวัดพัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช โดยพบยีสต์ในระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ส่วน คือ 1 x 10^2, 1.19 x 10^2, 1.3 x 10^2 และ 1.25 x 10^2 CFU/g จาก ปาก-กระเพาะ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และส่วนซีกัม ตามลำดับ และทำการคัดเลือกคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของกุ้ง พบว่ามียีสต์ 7 ไอโซเลตที่สามารถเจริญที่ระดับ pH 4 – 8 อุณหภูมิ 18 – 30 องศาเซลเซียส สามารถใช้เกลือไนเตรท และย่อยโปรตีน และจากการบ่งชนิดยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cryptococcus* sp.AJ43, *Candida* sp.AJ70, *Cryptococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Pichia* sp. AJ179, *Rhodotorula* sp. AJ181 และ *Malassezia* sp. AJ188 และจากการศึกษาการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก เมื่อทำการเลี้ยง *Leuconostoc dextranicum* AM20 ร่วมกับยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp.AJ70 สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc dextranicum* AM20 ให้มีจำนวนเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์อื่น และเมื่อนำไปผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งอายุ 1 เดือน เป็นเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมยีสต์ มีอัตราการเจริญ และอัตราการรอดสูงกว่า กลุ่มซึ่งให้อาหารที่ไม่ได้ผสมยีสต์ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากให้อาหารที่ผสมด้วยยีสต์แล้ว จึงทำการหาปริมาณยีสต์ พบว่าปริมาณยีสต์ทั้งหมด *Vibrio* sp. และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ พบว่า บริเวณลำไส้ส่วนปลายมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสามกลุ่มมากที่

สุด พบว่าในทุกกลุ่มทดลองจะมีปริมาณยีสต์ทั้งหมดมากกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่ *Vibrio* sp. มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อนำกุ้งกุลาดำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* เป็นเวลา 7 วัน พบว่า อัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ให้อาหารผสมยีสต์มีอัตราการรอดตายที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และอัตราการรอดตาย 100% ของกุ้งกุลาดำพบในกลุ่มที่มีการให้อาหารที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176 และ *Pichia* sp. AJ179 ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยีสต์มีอัตราการรอดตายเพียง 28.57% สำหรับการติดตามระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำหลังจากได้รับอาหารผสมยีสต์แล้ว พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดรวมในเลือดสูงสุด จำนวน 5.03×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในกลุ่มที่ให้อาหารผสมยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเท่ากับ 2.45×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มากที่สุด คือ 305.84 unit/min/mg protein ซึ่งพบในกลุ่มที่ผสมยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. AJ98 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 135.74 unit/min/mg protein สำหรับความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในเลือด พบว่ากลุ่มที่มีปริมาณแบคทีเรียเหลือน้อยที่สุด คือ *Cryptococcus* sp. AJ43 และ *Pichia* sp. AJ179 ซึ่งมีจำนวน 1.33×10^2 CFU/ml ในทั้งสองกลุ่มทดลอง ในขณะที่ *Malassezia* sp. AJ 188 กำจัดแบคทีเรียน้อยที่สุด ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียเหลืออยู่ 3.8×10^3 CFU/ml อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในทุกกลุ่มการทดลองของการกำจัดแบคทีเรียในเลือด สำหรับการศึกษาความสามารถในการเกาะเม็ดอาหารของยีสต์ ภายหลังจากใส่ไปในตู้ทดลองเป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่า จำนวนยีสต์ที่เกาะกับเม็ดอาหารในชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ พบอัตราการกระจายตัวสูงที่สุดในยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococus* sp.AJ98 คือ 23.41 CFU/h ในขณะที่กลุ่มที่มีอัตราการกระจายตัวน้อยที่สุด คือยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococus* sp. AJ43 ซึ่งมีอัตราการกระจายตัว 3.9 CFU/h

Thesis Title	Screening of Probiotic Yeast from Black Tiger Shrimp
Author	Miss Jitravee Cheychom
Major Program	Microbiology
Academic Year	2004

Abstract

The number of 1 x 10^2 – 1.3 x10^2 CFU/g isolates of yeast were isolated from digestive tracts of 120 black tiger shrimps which were collected from shrimp farms in Patthalung, Songkhla and Nakhon Sri Thammarat provinces in the South of Thailand. The results showed that there were numbers of yeast found in four parts of shrimp digestive tracts which 1 x 10^2, 1.19 x 10^2, 1.3 x 10^2 และ 1.25 x 10^2 CFU/g from foregut, front midgut, hind mid gut and cecum – hindgut respectively. Primary screening for shrimp probiotic have been done. It was found that there were 7 isolates of yeasts could grow under pH 4-8, temperature 18-30^{o}C, assimilate nitrate and utilize protein and those 7 isolates were identified as *Cryptococcus* sp. AJ43, *Candida* sp. AJ70, *Cryptococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176, *Pichia* sp. AJ179, *Rhodotorula* sp. AJ181 and *Malassezia* sp. AJ188. Growth promoting of the seven yeasts to lactic acid bacteria have been studied in mixed culture with *Leuconostoc dextranicum* AM20. The results showed that the highest cell numbers of *L. dextranicum* AM20 was found in mixed culture with *Candida* sp. AJ 70. More over, each of them was added to commercial feed of a month old black tiger shrimps rearing for 30 days. It was found that the shrimps fed with those yeasts had higher growth and survival rate than control group which was not fed with any yeast. After feeding with yeasts, total counts of yeasts, *Vibrio* spp. and bacteria in digestive tracts of shrimps

were studied using plate count method. The highest numbers of those three groups of microorganisms were found in hind midgut . Even the total yeast counts of each group were higher than the control group while the total *Vibrio* spp. counts were not significantly lower than the control group ($P<0.05$). Survived black tiger shrimp after feeding with yeasts and control group were challenged with *Vibrio harveyi.* Seven days after infection the survival rate of black tiger shrimps was significantly higher than the control group ($P<0.05$). Surprisingly, 100% survival rate of black tiger shrimp was found in treatments which fed with *Crytococcus* sp. AJ98, *Stengmatomyces* sp. AJ176 and *Pichia* sp. AJ179 while only 28.57% survival rate was found in the control group. Furthermore, the immune response of shrimps induced by yeasts was studied and the results showed that the highest total haemocyte count (THC) was found in the treatment fed with *Rhodotorula* sp. AJ181 which were 5.03×10^7 cell/ml when compared to the control group, 2.45×10^7 cell/ml. While the highest activity of phenoloxidase, 305.84 unit/min/mg protein, was found in the treatment fed with *Cryptococcus* sp. AJ98 and it was significantly different ($P<0.05$). when compared to the control group, 135.74 unit/min/mg protein. For the clearance ability of shrimps against bacteria in haemolymph, the results showed that the lowest numbers of bacteria left the haemolymph were found in the treatments fed with *Cryptococcus* sp. AJ43 and *Pichia* sp. AJ179 which were 1.33×10^2 CFU/ml in both treatments while there were 3.8×10^3 CFU/ml of bacteria were left in the *Malassezia* sp. AJ 188. Finally, the dispersion of yeast in the feed pellets after putting in the water of shrimp rearing in this experiment have been followed for 5 h. The results showed that the numbers of yeasts left in the pellet were not significantly different ($P<0.05$) from the first hour in all treatments. However, the highest dispersion rate was found in the treatment fed with *Cryptococcus* sp. AJ98, 23.41 CFU/h while the lowest dispersion rate was found in the treatment fed with *Cryptococcus* sp. AJ43, 3.9 CFU/h.