

JIRAWADEE KAEWDA : EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* EXPRESSING L-GULONOLACTONE OXIDASE ON GROWTH PERFORMANCE, ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND IMMUNE RESPONSE AGAINST *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* IN NILE TILAPIA, *OREOCHROMIS NILOTICUS*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHATSIRIN NAKHARUTHAI, Ph. D., 68 PP.

Keyword: L-gulonolactone oxidase/Antioxidant/*Bacillus subtilis*/Antagonistic activity/
Nile tilapia/*Streptococcus agalactiae*

Due to its lack of the L-gulonolactone oxidase (*GULO*) enzyme, Nile tilapia is unable to synthesize vitamin C; thus, it requires an adequate level of exogenous vitamin C in its diet. To enhance antioxidant properties and vitamin C-related effects, this study aimed to evaluate the efficacy of recombinant probiotic *Bacillus subtilis* with the *GULO* gene integrated into its chromosome. In this study, fish were divided into four groups: those fed with a basal diet (CON), a basal diet + vitamin C (VC), a basal diet + wild-type *B. subtilis* (BS), and a basal diet + recombinant *B. subtilis* (BS+*GULO*). After 90 days of the feeding trial, the BS+*GULO* groups showed the highest improvements in final weight, weight gain, specific growth rate, average daily gain, and relative growth rate. The VC, BS, and BS+*GULO* groups exhibited increased total immunoglobulin and lysozyme activity; however, only the VC and BS+*GULO* groups showed elevated alternative complement 50 levels, phagocytic activity and improved antioxidant parameters compared to the control group. HPLC and qRT-PCR analyses revealed elevated serum vitamin C and intestinal *GULO* mRNA levels in the BS+*GULO* group. A challenge test showed increased pro-inflammatory gene expression and immune response against *Streptococcus agalactiae* in the BS+*GULO* group, indicating improved antagonistic activity over wild-type *B. subtilis*.

School of Animal Technology and Innovation Student's Signature Jirawadee Kaewda
Academic Year 2024 Advisor's Signature chatsirin Nakharuthai

จิราวดี แก้วดา : ผลของการเสริมรีคอมบิแนนท์โปรไบโอติก *Bacillus subtilis* ที่แสดงออกเอนไซม์ L-gulonolactone oxidase ในอาหาร ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* EXPRESSING L-GULONOLACTONE OXIDASE ON GROWTH PERFORMANCE, ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND IMMUNE RESPONSE AGAINST *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* IN NILE TILAPIA, *OREOCHROMIS NILOTICUS*)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฉัตรศิรินทร์ นาคฤทธิ์, 68 หน้า.

คำสำคัญ: แอล-กูโลโนแลคโตนออกซิเดส/สารต้านอนุมูลอิสระ/*Bacillus subtilis*/ความสามารถในการต้านเชื้อ/ปลานิล/*Streptococcus agalactiae*

ปลานิล ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้เอง เนื่องจากขาดเอนไซม์แอล-กูโลโนแลคโตนออกซิเดส (L-gulonolactone oxidase; *GULO*) จึงจำเป็นต้องได้รับวิตามินซีจากอาหารในปริมาณที่เพียงพอ เพื่อเสริมสร้างคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและผลที่เกี่ยวข้องกับวิตามินซี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของโปรไบโอติกชนิดรีคอมบิแนนท์ *Bacillus subtilis* ที่มีการแทรกยีน *GULO* ไว้บนโครโมโซม โดยใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำ ในการทดลอง ปลานิลถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารพื้นฐาน (CON) กลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานเสริมวิตามินซี (VC) กลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานเสริม *B. subtilis* สายพันธุ์ปกติ (BS) และกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานเสริม *B. subtilis* ชนิดรีคอมบิแนนท์ที่มีการแทรกยีน *GULO* (BS+*GULO*) หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่ากลุ่ม BS+*GULO* มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักสุดท้าย การเพิ่มน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่ม VC, BS และ BS+*GULO* มีระดับอิมมูโนโกลบูลินรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม พบว่าเฉพาะกลุ่ม VC และ BS+*GULO* เท่านั้นที่มีระดับของระบบคอมพลีเมนต์ทางเลือก กิจกรรมการกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว และค่าพารามิเตอร์ด้านสารต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC และ qRT-PCR พบว่าปลานิลในกลุ่ม BS+*GULO* มีระดับวิตามินซีในซีรัม และการแสดงออกของยีน *GULO* ในลำไส้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* พบว่ากลุ่ม BS+*GULO* มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการตอบสนองทาง

ภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ซึ่งสะท้อนถึงความสามารถในการต้านเชื้อ *S. agalactiae* ได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับ *B. subtilis* สายพันธุ์ปกติ