Roles and regulation of the AI-2 quorum sensing of *Vibrio parahaemolyticus* in nitrification biofilter of shrimp recirculating system.

Mr. Monchai Pumkaew

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Environmental Engineering
Department of Environmental Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

บทบาทและการควบคุมของระบบควอรัมเซนซิงชนิดเอไอ-2 ใน *Vibrio parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่บนตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ

นายมนต์ชัย พุ่มแก้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Roles and regulation of the AI-2 quorum sensing of *Vibrio parahaemolyticus* in nitrification biofilter of shrimp recirculating system.
By	Mr. Monchai Pumkaew
Field of Study	Environmental Engineering
Thesis Advisor	Associate Professor WIBOONLUK PUNGRASMI, Ph.D.
Thesis Co Advisor	Sorawit Powtongsook, Ph.D.
	Kallaya Sritunyalucksana, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Doctor of Philosophy

.....
Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor SUPOT TEACHAVORASINSKUN, D.Eng.)

DISSERTATION COMMITTEE

.....
Chairman
(Assistant Professor CHAIYAPORN PUPRASERT, Ph.D.)

.....
Thesis Advisor
(Associate Professor WIBOONLUK PUNGRASMI, Ph.D.)

.....
Thesis Co-Advisor
(Sorawit Powtongsook, Ph.D.)

.....
Thesis Co-Advisor
(Kallaya Sritunyalucksana, Ph.D.)

.....
Examiner
(Associate Professor TAWAN LIMPIYAKORN, Ph.D.)

.....
Examiner
(Associate Professor Benjaporn Suwannasilp, Ph.D.)

.....
External Examiner
(Chumporn Soowannayan, Ph.D.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

มนต์ชัย พุ่มแก้ว : บทบาทและการควบคุมของระบบควอรัมเซนซิงชนิดเอไอ-2 ใน *Vibrio parahaemolyticus* ที่อาศัยอยู่บนตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชันในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งแบบหมุนเวียนน้ำ. (Roles and regulation of the AI-2 quorum sensing of *Vibrio parahaemolyticus* in nitrification biofilter of shrimp recirculating system.) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร. วิบูลย์ลักษณ์ พึ่งรัศมี, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สรวิศ เผ่าทองศุข,ดร.กัลยาณ์ ศรีธัญญลักษณา

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกกุ้งที่สำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในระบบให้คงตัวและสามารถเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ความหนาแน่นสูงมากยิ่งขึ้นโดยข้ามข้อจำกัดเรื่องพื้นที่การเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ยังมีความกังวลเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในระบบตัวกรองชีวภาพ ทำให้ต้องมีการศึกษาถึงบทบาทของระบบตัวกรองชีวภาพในแง่ของความปลอดภัยทางชีวภาพ โรคกุ้งตายด่วน หรือที่รู้จักในชื่อ AHPND/EMS มีการแพร่กระจายไปยังฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยหลายพื้นที่ ส่งผลให้ประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตที่อยู่ในขั้นวิกฤติ สาเหตุการตายของกุ้งมาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ วิบริโอ พาราฮิโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*; VP_{AHPND}) ชนิดที่มีพลาสมิดในการสร้างสารพิษ ที่เรียกว่า ToxA และ ToxB แต่ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการสร้างและการปล่อยสารพิษนี้ งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายคือ 1) เพื่อศึกษาการทำงานของตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชัน โดยพิจารณาถึงผลของสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อกลุ่มวิบริโอที่อาศัยอยู่บนตัวกรองในชุดทดลองระดับห้องปฏิบัติการ 2) เพื่อศึกษาบทบาทของระบบควอรัมเซนซิ่งชนิดเอไอ-2 ต่อการสร้างสารพิษในเชื้อ VP_{AHPND} ผลวิจัยในส่วนแรกพบว่า เชื้อ VP_{AHPND} สามารถเจริญเติบโตในตัวกรองชีวภาพได้หากมีสารอินทรีย์คาร์บอนที่เพียงพอ การขาดสารอินทรีย์ทำให้จำนวนเชื้อ VP_{AHPND} มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ยังพบว่า สารอินทรีย์ (น้ำตาลกลูโคส) มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยอยู่บนตัวกรองชีวภาพและที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ เชื้อแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปพบมากกว่า 10^8 หน่วยโคโลนีต่อชิ้นตัวกรอง นอกจากนี้ยังตรวจพบสารสื่อสารชนิด เอไอ-2 ในระบบตัวกรองชีวภาพไนตริฟิเคชัน ผลวิจัยในส่วนที่สองด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ SDS-PAGE และ Western Blot พบว่า การเติมสารสื่อสารที่สกัดได้จากแบคทีเรียนชนิดอื่น *Vibrio Campbellii* ชนิดกลายพันธุ์ (BB170) ในสัดส่วน 1% 5% และ 9% v/v สามารถเหนี่ยวนำการสร้างสารพิษ ToxA และ ToxB ของเชื้อ VP_{AHPBD} ในทางตรงกันข้ามการเติมสารประกอบฟูราโนน (Furanone C-30) เพื่อยับยั้งการทำงานของระบบควอรัมเซนซิ่งที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ 5 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้การปล่อยสารพิษถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากผลวิจัยจึงสามารถสรุปได้ว่า ระบบควอรัมเซนซิ่งชนิดเอไอ-2 ของแบคที่เรีย VP_{AHPND} มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างสารพิษที่เป็นปัจจัยให้เกิดโรคกุ้งตายด่วน แม้ว่าสารสื่อสารชนิดเอไอ-2 ที่ตรวจพบในน้ำของระบบตัวกรองชีวภาพจะอยู่ในระดับที่ไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่การสะสมของสารสื่อสารในระบบตัวกรองชีวภาพอาจเพิ่มความเสี่ยงของการก่อโรค AHPND ได้เร็วยิ่งขึ้น ดังนั้น การควบคุมและป้องกันโรคกุ้งตายด่วนในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหมุนเวียนน้ำที่อาศัยตัวกรองชีวภาพในการบำบัดฯ นอกจากจะตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ VP_{AHPND} ในระบบแล้ว ควรคำนึงถึงปริมาณสารสื่อสารควอรัมเซนซิ่งที่ส่งผลต่อการสร้างปัจจัยการก่อโรคในเชื้อก่อโรคต่างๆในระบบด้วยเช่นกัน

สาขาวิชา วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5571449721 : MAJOR ENVIRONMENTAL ENGINEERING
KEYWORD: VP-AHPND, Binary toxins, Quorum sensing, Autoinducer-2, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), Early mortality syndrome (EMS), Biofilter, Shrimp recirculating system

Monchai Pumkaew : Roles and regulation of the AI-2 quorum sensing of *Vibrio parahaemolyticus* in nitrification biofilter of shrimp recirculating system.. Advisor: Assoc. Prof. WIBOONLUK PUNGRASMI, Ph.D. Co-advisor: Sorawit Powtongsook, Ph.D., Kallaya Sritunyalucksana, Ph.D.

Thailand is the largest shrimp producing and exporter among Southeast Asia. Up-to-Date, Recirculating Aquaculture System (RAS) have been developed in order to control water quality and enable to conduct intensive cultivation without limitation of land-based cultivation method. Nevertheless, there is concern about pathogenic contamination in Biofilter. Therefore, the role of biofilter in terms of biosecurity is required to study. Recently, shrimp Early Mortality Syndrome (EMS) as known as AHPND/EMS, has spread to shrimp farm in several areas of Thailand. This contributes to severe productivity losses in the shrimp farm industry. It is evident that the causative agent of AHPND disease is bacteria *Virbrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}), containing specific plasmid for producing bacterial toxins; ToxA and ToxB. however, it is still unclear about the biological mechanism used for toxin production and secretion. Therefore, the objectives of this research are to 1) to study the function of nitrification biological filters and the effects of organic substances on bacteria population in the filters in lab scale 2) to study the role of AI-2 quorum sensing on the toxin secretion related to VP_{AHPND}. The first results found that VPAHPND can grow on biofilm matrix if there was any sufficient organic carbon source. Lack of organic carbon source significant led to elimination of VPAHPND. Moreover, organic substances (glucose) had an effect on changing in the number of bacteria in the biological filters and in the suspended of water. Heterotrophic bacteria were commonly found in Biofilter Unit (over 10^8 CFU/bead). Moreover, AI-2 like activity, using bioassay, could be observed in Nitrification Biofilter Unit, this was confirmed that AI-2 signal is ubiquitous in marine biofilter. In the second experiment, based on SDS-PAGE and Western Blotting results, the study found that addition of Cell-free supernatant obtained from the mutant *Vibiro Campbellii* (BB170) into culture medium (TSB+1.5%NaCl) at 1% 5% and 9% v/v could induce ToxA and ToxB production in VP_{AHPND}. There was a strong correlation between the significant change of the toxin production and AI-2 like activity. In contrast, addition of Furanone C-30, a QS inhibitor, at 1 micromolar and 5 micromolar resulted in the significant toxin secretion ($P<0.05$). From the results aforementioned, this study can be concluded that AI-2 quorum sensing of VP_{AHPND} plays an important role on the AHPND-toxin production. Although the AI-2 like activity in the biological filter had a lower level compared with the culture medium, the accumulation of AI-2 signal molecule may result in the increasing risk of AHPND infection. Therefore, the control and prevention of AHPND/EMS in shrimp cultivation using

Field of Study:	Environmental Engineering	Student's Signature .....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost, I would like to offer my sincere gratitude to my dear supervisor, Assoc. Prof. Wiboonluk Pungrasmi, who always has a good support and give a valuable advice throughout my dissertation.

I would like to express my gratitude to my co-advisor, Dr. Kallaya Sritunyalucksana-Dangtip for giving a precise advice and supporting space and instrument for conducting my experiment. Without her help and her team support, I cannot reach this stage.

I would like to express my deepest appreciation to my co-advisor, Dr. Sorawit Powthongsook for his support and guidance during my study.

In addition, I would like to express my cordial thanks to all members,especially Dr.Suparat Taengchaiyaphum, who always support me in conducting experiment at CENTEX Laboratory. Without their corporation, I could not have gotten such valuable data.

This research has been financially supported by Newton Fund Institutional Links (to K. Sritunyalucksana, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand) and Agricultural Research Development Agency (ARDA) (To K. Sritunyalucksana). As well as the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Research Fund granted by the Graduate School, Chulalongkorn University. This work was done through the program of Office of Higher Education Commission (OHEC) and the S&T postgraduate Education and Research Development Office (PERDO). Some scientific equipment and facilities were provided by the Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM) and the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand. Additional Microplate Spectrophotometer equipment support was obtained from the Thai Government Stimulus Package (TKK2555).

I am also greatly indebted to Chulalongkorn University for giving a Ph.D. scholarship. I promise I will be a good lecturer who make student successful.

Last but not least, my achievement would have never been possible unless there is heart full support, encouragement and understanding from my family and my colleges at Mahidol University, Kanchanaburi Campus.

Monchai Pumkaew

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

TABLE OF CONTENTS

Page

..... Error! Bookmark not defined.

ABSTRACT (THAI) ..... Error! Bookmark not defined.

..... Error! Bookmark not defined.

ABSTRACT (ENGLISH) ..... Error! Bookmark not defined.

ACKNOWLEDGEMENTS ..... Error! Bookmark not defined.

TABLE OF CONTENTS ..... Error! Bookmark not defined.

LIST OF TABLES ..... Error! Bookmark not defined.

LIST OF FIGURES ..... Error! Bookmark not defined.

REFERENCES ..... Error! Bookmark not defined.

VITA ..... Error! Bookmark not defined.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

LIST OF TABLES

Page

No table of figures entries found.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

LIST OF FIGURES

Page

No table of figures entries found.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

REFERENCES

(Tran, Nunan et al. 2013)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

VITA

NAME	MONCHAI PUMKAEW
DATE OF BIRTH	18 December 1978
PLACE OF BIRTH	Petchaburi Province
INSTITUTIONS ATTENDED	2010 Master of Engineering, M.Eng. (Environmental engineering) Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Thailand 2001 Bachelor of Engineering, B.Eng. (Environmental engineering) Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Thailand
HOME ADDRESS	79/54 Moo 6 Supalai Ville Bang-Muang, Bang-Yai district, Nonthaburi 11140

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University