รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

Study on antimicrobial peptides gene expression in infected shrimp, *Litopenaeus vannamei* with probionts and virus challenge after fed with dietary probiotics and immunostimulants supplementations

มลฤดี สนธิ

ศรีภาพรรณ ธาระนารถ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 (ต่อเนื่อง)
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2557A10802191

สัญญาเลขที่ 2/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

Study on antimicrobial peptides gene expression in infected shrimp, *Litopenaeus vannamei* with probionts and virus challenge after fed with dietary probiotics and immunostimulants supplementations

มลฤดี สนธิ

ศรีภาพรรณ ธาระนารถ

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 2/2558

บทคัดย่อ

การใช้โปรไบโอติกและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยง ประสบความสำเร็จในการป้องกันและควบคุมโรคสัตว์น้ำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อติดตามผลของยีสต์เซลล์ และจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำหมักสับปะรด และ เชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* ที่มีต่อการแสดงออกของยีนต้านจุลชีพชนิด *Crustin, Penaeidin3* (*LitvanPEN3*) และ *Anti-lypopolysaccharide factor* (*LvALF1*) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน 40, 60 และ 90 วัน โดยเทคนิค Quantitative real time PCR จากผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ โปรไบโอติกจากน้ำหมัก และเชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* มีการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* (Up-regulation) ตลอดช่วงระยะเวลาของการทดลอง สำหรับยีน *LvALF1* ไม่มีการแสดงออกในกุ้งทดลอง (Down-regulation) จากการทดลองนี้เสนอแนะได้ว่าการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระดับฟาร์ม 1 มื้อ/สัปดาห์ ให้ผลการแสดงออกของแอนติไมโครเบียลที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่ากุ้งที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและแบคทีเรียโปรไบโอติกมีความต้านทานเชื้อได้ดีกว่ากุ้งในบ่อควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Abstract

Use of probiotics and immunostimulants has been widely accepted in shrimp aquaculture for prevent and control diseases. The objective of this study is to determine the effect of whole cell yeast and probiotics bacteria on antimicrobial gene expression in hemocyte of shrimps cultured in ponds. The expressions of AMPs gene; *Crustin,Penaeidin3 (LitvanPEN3)* and *Anti-lypopolysaccharide factor (LvALF1)* were observed by quantitative real time PCR at 40, 60 and 90 days after cultured in pond. The result showed that shrimps fed diet supplemented with whole cell yeast, probiotic bacteria from papaya preparations and *Bacillus subtilis* had up-regulation of *Crustin* and *LitvanPEN3* expression whereas *LvALF1* had down-regulation. This experiment suggested that shrimps fed with dietary probiotic and whole cells yeast supplementation in farm level are still not clear because it had no different with control group. However, shrimps fed with dietary probiotic and whole cells yeast supplementation had bacterial resistant more than control group.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า **ดร. มลฤดี สนธิ** ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัย เรื่อง **การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ**

(Study on antimicrobial peptides gene expression in infected shrimp, *Litopenaeus vannamei* with probionts and virus challenge after fed with dietary probiotics and immunostimulants supplementations)

รหัสโครงการ 2557A10802191 / สัญญาเลขที่ 2/2558 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 690,000 บาท (หกแสนเก้าหมื่นบาทถ้วน)

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี วันที่ 1 ตุลาคม 2557 - 30 กันยายน 2558

บทคัดย่อ

การใช้โปรไบโอติกและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยง ประสบความสำเร็จในการป้องกันและควบคุมโรคสัตว์น้ำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อติดตามผลของยีสต์เซลล์ และจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำหมักสับปะรด และ เชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* ที่มีต่อการแสดงออกของยีนต้านจุลชีพชนิด *Crustin, Penaeidin3* (*LitvanPEN3*) และ *Anti-lypopolysaccharide factor* (*LvALF1*) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน 40, 60 และ 90 วัน โดยเทคนิค Quantitative real time PCR จากผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ โปรไบโอติกจากน้ำหมัก และเชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* มีการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* (Up-regulation) ตลอดช่วงระยะเวลาของการทดลอง สำหรับยีน *LvALF1* ไม่มีการแสดงออกในกุ้งทดลอง (Down-regulation) จากการทดลองนี้เสนอแนะได้ว่าการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระดับฟาร์ม 1 มื้อ/สัปดาห์ ให้ผลการแสดงออกของแอนติไมโครเบียลที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่ากุ้งที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและแบคทีเรียโปรไบโอติกมีความต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่ากุ้งในบ่อควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Abstract

Use of probiotics and immunostimulants has been widely accepted in shrimp aquaculture for prevent and control diseases. The objective of this study is to determine the effect of whole cell yeast and probiotics bacteria on antimicrobial gene expression in hemocyte of shrimps cultured in ponds. The expressions of AMPs gene; *Crustin,Penaeidin3 (LitvanPEN3)* and *Anti-lypopolysaccharide factor (LvALF1)* were observed by quantitative real time PCR at 40, 60 and 90 days after cultured in pond. The result showed that shrimps fed diet supplemented with whole cell yeast, probiotic bacteria from papaya preparations and *Bacillus subtilis* had up-regulation of *Crustin* and *LitvanPEN3* expression whereas *LvALF1* had down-regulation. This experiment suggested that shrimps fed with dietary probiotic and whole cells yeast supplementation in farm level are still not clear because it had no different with control group. However, shrimps fed with dietary probiotic and whole cells yeast supplementation had pathogenic bacterial resistant more than control group.

Output/ Outcome

I - intermediate results = ผลสำเร็จกึ่งกลาง คือ ทราบข้อมูลเกี่ยวกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบใด หรือชนิดใด ที่สามารถกระตุ้นให้กุ้ง มีความสามารถในการหลั่ง antimicrobial peptide ได้ และมีแนวโน้มที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับฟาร์มได้ โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมง่าย มีต้นทุนการผลิตราคาถูก

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นวิธีการหนึ่งในการจัดการสุขภาพ การเพาะเลี้ยงกุ้งต้องอาศัยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาเลี้ยง

2. ผลการทดลองในครั้งนี้ถูกทดลองในกุ้งขาว ที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt อุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 25-27 °C มีการจัดการฟาร์ม และคุณภาพน้ำ เพื่อให้กุ้งได้ผลผลิต และมีการเสริมเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียโปรไบโอติก สัปดาห์ละ 1 มื้อ เท่านั้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 100 วัน กุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ย 21 กรัม เมื่อมีการทดลองในเงื่อนไขอื่น ๆ การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide อาจเปลี่ยนแปลงไป

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ……. ข
บทคัดย่อ……..... ค
สารบัญ……... ง
สารบัญตาราง…… จ
สารบัญภาพ……..... ฉ
บทที่
1 บทนำ
ที่มาและความสำคัญของปัญหา…… 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย…….. 2
ขอบเขตของการวิจัย……..... 2
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย……..... 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย……..... 4
2 เนื้อเรื่อง
ทบทวนวรรณกรรม ……..... 4
วิธีดำเนินการวิจัย.....……..... 18
ผลการวิจัย..... 31
3 อภิปรายผลการวิจัย……..... 35
4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....…….. 39
รายงานการเงิน……....……. 40
บรรณานุกรม…….. 41
ภาคผนวก..... 47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ช่วงกิจกรรมของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้ง……	14
2.1	แสดงไพรเมอร์ของยีน *Crustin, Penaeidin, Anti-lipopolysaccharide factor (LvALF)* และ *Beta-actin* ที่ใช้ในปฏิกิริยา.....	29
2.2	ส่วนประกอบของสารผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT- PCR สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* และ *Crustin*…….	30
2.3	ส่วนประกอบของสารผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีน *LvALF1*……	30
2-4	อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับเครื่อง LightCycler®96 SW1.1 (Roch).....	31

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1-1	รูปแบบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง……	14
1-2	ชนิดของครัสติน……...	15
1-3	รูปโครงสร้างของพีเนียดิน……	16
2-1	สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) สำหรับนับจำนวนเซลล์ยีสต์.....	19
2-2	ตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และA B C D (ช่องW) ……..	19 15
2-3	ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมักสับปะรด……...	20
2-4	ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมัก Super biotic.....	21
2-5	แสดงอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่ผสมน้ำหมักในแต่ละชนิด……	22
2.6	แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม.....	23
2-7	การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)……	24
3.1	การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกุ้ง โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR……	31
3.2	การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้ง โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR…….....	32
3.3	การแสดงออกของยีน *LvALF1*ในเม็ดเลือดกุ้ง โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR…….....	33
3-4	การตายสะสมของกุ้งภายหลังการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*…..	34
ก-1	LightCycler®96 SW1.1……	48
ก-2	กราฟแสดงจำนวนของ product ที่เกิดจากการส่งสัญญาณของ SYBR Green I dye เมื่อมีการเพิ่มของ product (รูป S shape) ซึ่งจะเปิดแสดงบนโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1……...	49
ก-3	แสดงค่า Cq ในโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1…….	50

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้ง นับว่าเป็นอาหารทะเลที่มีผู้นิยมบริโภคมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยประเทศไทยมีอุตสาหกรรมกุ้งเป็นอุตสาหกรรมส่งออกหลักที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก เนื่องจากกุ้งทะเลสามารถนำรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท (TFFA, 2014) ส่งผลให้วิธีการเลี้ยงกุ้งทะเลในปัจจุบันได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณมาก การเลี้ยงกุ้งในระบบที่มีความหนาแน่นสูง มีการให้อาหารปริมาณมาก นำไปสู่การเพิ่มอินทรีย์สารในบ่อ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ทำให้กุ้งเกิดความเครียด อ่อนแอ ยอมรับเชื้อได้มากขึ้น แบคทีเรียก่อโรคกลุ่มฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) ที่อยู่ในตัวกุ้งมีการปรากฏขึ้น อีกทั้งแบคทีเรียเหล่านี้อาจมีการเพิ่มจำนวนในน้ำ และดิน ก่อให้เกิดการระบาดของโรคในกุ้งในเวลาต่อมา นอกจากนี้ยังมีการระบาดของโรคที่เกิดจากไวรัส และปรสิตด้วยเช่นกัน ซึ่งกำลังส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก (Thitamadee et al., 2016) วิธีการแก้ไขที่ผ่านมา และยังคงใช้กันอยู่จนถึงทุกวันนี้ก็คือ การนำยาปฏิชีวนะมาใช้กันอย่างกว้างขวาง การใช้ยาที่ไม่ถูกต้อง และขาดการควบคุมเช่นนี้ จึงนำมาซึ่งความสิ้นเปลือง แล้วยังก่อให้เกิดปัญหาตามมา ได้แก่ ปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม เกิดปัญหาการตกค้าง และการสะสมของยาในสัตว์น้ำ และมนุษย์ที่บริโภคสัตว์น้ำ (Capone et al., 1996) ท้ายที่สุดทำให้เกิดการกีดกันทางการค้า และปัญหาการส่งออกกุ้ง จากปัญหาดังกล่าวนี้ จึงเริ่มมีการศึกษาถึงวิธีการต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกัน และควบคุมโรคในสัตว์น้ำ แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยง และลดปริมาณการใช้ยาลง รวมทั้งวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันประสบความสำเร็จในปลา โดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลา (Sakai, 1999) และจากการที่กุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงเช่นกัน การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในกุ้ง จึงเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้จะเข้ามามีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำให้กุ้งพร้อมที่จะรับมือกับเชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอม (Rowley et al., 2007; Smith et al., 2003) ได้ในขณะที่เลี้ยงในบ่อกุ้ง จึงมีการศึกษาค้นคว้าแนวทางการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้วยการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลากหลายอย่าง เช่น เบต้ากลูแคน (β-glucan) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan : PG) เป็นต้น (ปริยดานุ์ จารุคม และคณะ, 2553) มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อโรคได้ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity) ซึ่งพารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกันที่

สามารถนำมาใช้ในการเป็นตัวบ่งชี้ระดับของสุขภาพกุ้ง ได้แก่ ภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ(humoral immune system) เช่น เอนไซม์ไลโซไซม์, เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, antimicrobial peptides(AMPs) และภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cellular immune system) เช่น granulocyte, hyalinocyte, semi-granulocyte โดยการศึกษาในปัจจุบันสนใจเกี่ยวกับ AMPs หรือ เปปไทด์ต้านจุลชีพ เนื่องจากจะออกฤทธิ์ในช่วงกว้าง และมีกลไกการทำงานคล้ายกับยาปฏิชีวนะแต่ไม่ได้มีการตกค้างในตัวสัตว์น้ำ เปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในกุ้ง ได้แก่ ครัสติน (crustin) ไลโซไซม์ (lysozyme) แอนติไลโพพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopolysaccharide factor, ALF) และพีเนียดิน (penaeidin, PEN) เป็นต้น (นพวรรณ วรมงคลชัย, 2553)

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดครัสติน (crustin) พีเนียดิน (PEN) และแอนติไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ แฟกเตอร์ (antilipopolysaccharide factor, ALF) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน เซลล์ยีสต์ และจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งได้ เพื่อเพิ่มผลผลิตและปลอดสารตกค้างต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์เซลล์ (whole cell yeast) และโปรไบโอติก จากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ ที่ผสมอาหารให้กุ้งกิน โดยติดตามการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides)

3. ขอบเขตของการวิจัย

เลี้ยงกุ้งในบ่อดิน ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บ่อขนาด 10x20 ม. อัตราการปล่อยกุ้งโพสต์ลาร์วา 30 จำนวน 10,000 ตัว/ 200 ตร.ม. กุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สัปดาห์และ 1 ครั้ง ตลอดการเลี้ยงที่ 100 วัน ในวันที่ 40, 60, 90 วันหลังการลี้ยง สุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละบ่อ เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ ได้แก่ ครัสติน (crustins), พีนาอิดิน (penaedins) และ anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) โดยใช้เทคนิค quantitative real –time PCR

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกษตรกรเลือกใช้ ได้แก่:

- โปรไบโอติกจากน้ำหมัก ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ชนิดต่าง ๆ เช่น *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp.

- สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น ผลิตภัณฑ์จากยีสต์ เบต้ากลูแคน

แนวคิดในงานวิจัย:

1. โปรไบโอติกชนิดใด ที่มีประสิทธิภาพในการสนับสนุนให้กุ้งขาว มีการหลั่งของ antimicrobial peptide ชนิดต่าง ๆ ได้ดีที่สุด

2. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือผลผลิตที่มาจากยีสต์ ชนิดใดที่มีประสิทธิภาพในการสนับสนุนให้กุ้งขาว มีการการหลั่ง ของ antimicrobial peptide ชนิดต่าง ๆ ได้ดีที่สุด

การประยุกต์ใช้งานวิจัย:

1. เป็นการทดสอบ และยืนยัน การใช้โปรไบโอติก หรือเชื้อที่มีประโยชน์ ที่มีประสิทธิภาพจริง ๆ ในการนำมาใช้ในกุ้งขาว เพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อก่อโรค

2. เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง มีความรู้ และมั่นใจในผลิตภัณฑ์ ที่เลือกใช้ โดยไม่สูญเปล่า ต่อการลงทุนในการใช้ โปรไบโอติก สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. **ด้านเศรษฐกิจ:**

- เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ได้ความรู้ และทราบถึงชนิดของโปรไบโอติก สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี ที่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้สามารถเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ได้อย่างมั่นใจว่า สิ่งที่เลือกนี้ มีผลต่อการส่งเสริมสุขภาพในกุ้ง และลดการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อได้

2. **ด้านวิชาการ:**

- นักวิจัยได้รับข้อมูลใหม่ ๆ จากงานวิจัยนี้ และอาจนำไปศึกษาต่อยอดได้

- ผู้ทำวิจัยได้รับความรู้ และประสบการณ์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อการถ่ายทอดประสบการณ์และความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ให้แก่นิสิตในคณะ ที่จะจบออกไปทำงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งก็เป็นการถ่ายทอดความรู้นี้ ไปสู่เกษตรกรอีกช่องทางหนึ่ง

6. การทบทวนวรรณกรรม

6.1 ภูมิคุ้มกันกุ้ง และบทบาทของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีต่อกุ้งทะเล

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นระบบที่ไม่สามารถจดจำความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพต่าง ๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมี 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immune response) ซึ่งเป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด เช่น กระบวนการฟาโกไซโทซีส (phagocytosis activity) การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion activity) กระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ (encapsulation) กระบวนการเกิดจุดสีดำที่เปลือก (melanisation) ที่เกี่ยวข้องกับระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade, proPO) กระบวนการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ (cytotoxic reactions) และแบบที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ (humoral immune response) ที่เป็นการทำงานของโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเลือด เช่น แอคกลูตินิน (agglutinin) สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine like factors) โมดูเลเตอร์ (modulators) สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting proteins) และสารน้ำที่เป็นผลิตภัณฑ์จากระบบโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งอยู่ในเซลล์เม็ดเลือด สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide, AMPs) โดยทั้ง 2 ระบบนี้จะมีการทำงานร่วมกัน เพื่อทำหน้าที่ป้องกันและทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง (Soderhall and Cerenius, 1992)

การทำงานของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ที่รวมทั้งภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ และภูมิคุ้มกันโดยการหลั่งสารน้ำ ซึ่งการกระตุ้นจะเกิด

ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หรือสารในระบบภูมิคุ้มกันไปในทางที่เพิ่มขึ้น (immune-compromise) โดยมีผลต่อการเพิ่มการป้องกันโรค และลดปัจจัยที่มีผลต่อการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ในระหว่างการเลี้ยง (Sakai, 1999)

เมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ก็จะเกิดกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้ง โดยเริ่มจากการจับกันระหว่าง Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ผ่านตัวรับ Pattern Recognition Proteins (PRPs) หรือ Pattern Recognition Receptors (PRRs) ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกได้ว่าสิ่งแปลกปลอมนี้อาจเป็นอันตราย (danger signal) จากนั้นโมเลกุลหรือโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal molecules) จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน เซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในระบบเลือดจะเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม โดยปฏิกิริยา chemotaxis ต่อมาจะเกิดกระบวนการกำจัด หรือทำลายสิ่งแปลกปลอมออกนอกร่างกาย โดยทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือด และสารที่อยู่ในน้ำเลือด (Wang and Wang 2013) เมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง กุ้งก็จะมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องเช่นกัน

6.2 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ ยา สิ่งมีชีวิต สารเคมี หรือสารประกอบใด ๆ ก็ตาม ที่มีผลต่อกลไกการตอบสนองของ ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ (Anderson, 1992) วัตถุประสงค์ของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันคือส่งเสริมประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รักษาระดับ และเพิ่มระยะเวลาการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งลดผลกระทบของการกดภูมิคุ้มกัน ที่มีสาเหตุมาจากความเครียดในระหว่างเลี้ยง (Barman et al., 2013) การที่สัตว์น้ำมีความแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันโรคสูง จะช่วยลดความเสี่ยงของการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคระบาดในช่วงเวลานั้นได้ มีงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ที่รายงานถึงความสำเร็จของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์เพื่อควบคุมโรค สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีการทดลองในกุ้งมีหลายประเภทซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากสารประกอบจากสิ่งมีชีวิต (biological substances) ดังต่อไปนี้

1) สารประกอบหรืออนุพันธ์ที่ได้จากแบคทีเรีย (bacterial derivatives) นักวิจัยได้มีการนำสารประกอบจากแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคในกุ้ง สารประกอบหรืออนุพันธ์จากแบคทีเรียสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ PRRs หรือ PRPs ที่มีชื่อว่า lipopolysaccharide binding proteins (LGBPs) และ peptidoglycan recognition protein (PGRPs) อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Tassanakajonet al., 2013) ปัจจุบันมีการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้

เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลากหลายรูปแบบ เช่น แบคเทอรินที่ผลิตมาจากเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่ได้จากกระบวนการหมัก (probiotic bacteria)

- Bacterin คือแบคทีเรียที่มีชีวิต แต่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuated bacterin) หรือแบคทีเรียที่ทำให้ตาย (killed bacterin) แบคเทอรินส่วนใหญ่ที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้ง นิยมเตรียมมาจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ซึ่งมีรายงานว่าให้ผลดีในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น งานวิจัยของ Pais et al. (2008) พบว่าแบคเทอรินที่เตรียมจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำได้ นอกจากนี้กุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคเทอรินที่เตรียมจากเชื้อ *V. alginolyticus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและกิจกรรมการต้านเชื้อเพิ่มขึ้น (Powell et al., 2011)

- ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide, LPS) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จากงานวิจัยพบว่า LPS สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในกุ้งได้ โดยผ่านการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Sritunyalucksana et al., 1999) Xian et al. (2009) รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์ และแกรนูลาร์ของกุ้งขาวลดลง ภายหลังการได้รับ LPS ซึ่งเป็นผลมาจากการดีแกรนูเลชันของเม็ดเลือด ทำให้เกิดการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในเวลาต่อมา

- เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan, PG) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้แบบไม่จำเพาะของกุ้งได้ เช่น กุ้ง *Marsupenaeus japonicas* ที่ได้รับ PG ที่สกัดได้จาก *Bifidobacterium thermophilum* ผสมอาหาร มีการแสดงออกของยีน serine protenase ในเม็ดเลือดเพิ่มขึ้น (Rattnachai et al., 2005) สำหรับในประเทศไทย มีการทดลองใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกันอย่างแพร่หลาย จากงานวิจัยของนิตยา ยิ้มเจริญ และคณะ (2549) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดนี้มีผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) สารประกอบหรืออนุพันธ์ที่ได้จากยีสต์ (yeast derivatives) จากการค้นพบโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ (PRRs หรือ PRPs) ที่มีชื่อว่าβ-glucan binding proteins (βGBPs) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Soderhall and Cerenius., 1992) จึงมีการทดลองใช้ยีสต์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากขึ้น นักวิทยาศาสตร์ทั้งในและต่างประเทศประสบผลสำเร็จในการใช้เบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ที่สกัดจากผนังเซลล์ยีสต์ และการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น กุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคนสกัดจากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomycese cerevisiae* ผสมอาหาร มีภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อ *V. harveyi* และ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome

Virus, WSSV) เพิ่มขึ้น (Bai et al., 2014) นอกจากนี้กุ้งกุลาดำที่ได้รับ yeast cell suspension จากยีสต์ทะเล *Candida aquaetextoris* S527 ผสมอาหารพบว่ามีการแสดงออกของเพปไทด์ต้านจุลชีพเพิ่มขึ้น (Babu et al., 2013)

3) สารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ (nutritional factors) สารเสริมอาหารที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีการใช้ในอุตสาหกรรมกุ้ง ได้แก่ วิตามินซี, วิตามินอี, แอสตาแซนทิน, กรดไขมัน และกรดอะมิโน

- วิตามิน (vitamins) เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อสัตว์น้ำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีรายงานการใช้ วิตามินซี (Lee and Shiau, 2002a) และวิตามินอี (Lee and Shiau, 2004) ในกุ้ง โดยมีผลต่อการทำงานของ interferon และส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยา chemotaxis ของเม็ดเลือดซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase activity,SOD) ในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำด้วย (Qiao et al., 2011)

- แอสตาแซนทิน (astaxantin) เป็นสารสีชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigments)ทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อในร่างกายสัตว์ไม่ให้ถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากหน้าที่ดังกล่าวจึงมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำด้วย กุ้งกุลาดำที่ได้รับแอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* (นนทวิทย์ อารีย์ชน และคณะ, 2549) และ *Dunaliella* sp. (Supamattaya et al., 2005) โดยการผสมอาหาร มีผลทำให้กุ้งมีอัตรารอด และความต้านทานต่อเชื้อเพิ่มขึ้น

- กรดอะมิโน (amino acids) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาต่าง ๆ ทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต การได้รับกรดอะมิโนที่เหมาะสมและเพียงพอ จะช่วยรักษาความสมดุลทางสรีรวิทยาของร่างกายได้ จากงานวิจัย กุ้งขาวที่ได้รับกรดอะมิโนชนิดโปรลีน (proline) (Xie et al., 2012) ไลซีน (lysine) (Xie et al., 2015) และทรีโอนิน (threonine) (Zhou et al., 2013) ด้วยการผสมอาหาร พบว่ามีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น

- แร่ธาตุ (minerals) ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ในการเลี้ยงกุ้งจะมีการเสริมแร่ธาตุในอาหาร ซึ่งนอกเหนือจากการเพิ่มการเจริญเติบโตแล้ว ก็ยังมีรายงานว่ามีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอีกด้วย กุ้งที่กินอาหารผสมซิงก์ (zinc) (Shiau and Jiang, 2006) และคอปเปอร์ (copper) (Lee and Shiau, 2002b) มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมแร่ธาตุ

4) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) คือคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบกันเป็นสายยาว นักวิทยาศาสตร์ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้โพลีแซคคาไรด์ เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดย

จะเข้าจับกับโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ ที่มีชื่อว่า lectin receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Tassanakajonet al., 2013) ตัวอย่างของสารที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ เช่น ไคตินและไคโตซาน ที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง ปู หมึก ซึ่งมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มการเจริญเติบโต (Niu et al., 2013)และถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเช่นกัน (Wang and Chen, 2005)

5) สารสกัดจากพืชสมุนไพร และพืช (herbal plant and plant extracts) การทดลองใช้สมุนไพรในการควบคุมโรคกุ้งประสบผลสำเร็จอย่างดีในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย พืชและสมุนไพรสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ไกลเซอริน สารลิควิริติน และกลาบริดิน รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน น้ำมันหอมระเหย ซาโปนิน และ สารอะซาไดแรคตินฯลฯ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2013; Hai, 2015) กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมสารสกัดกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียน *(Durio zibethinus)* (Pholdaeng and Pongsamart, 2010)และสาร polyvinylpyrolidone ที่สกัดได้จากพญายอ (*Clinacanthus nutans*) (Direkbusarakom et al., 1996) มีภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเพิ่มขึ้น กุ้งขาวที่ได้รับสารกลุ่ม phenolic alkanon ที่สกัดได้จากขิง (*Zingerone officinale*) (Chang et al., 2012) สารซาโปนินที่สกัดจากยัคคา (*Yacca scidigera*)(Yang et al., 2015)และสารสกัดจากว่านท้องใบม่วง (*Gynura bicolor*) (Wu et al., 2015) โดยการผสมอาหารให้กิน มีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อเชื้อ *V. alginolyticus* และไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น

6) สารสกัดจากสาหร่ายทะเล (seaweed extracts) สาหร่ายประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น n-3 และ n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) โพลิแซคคาไรด์ แร่ธาตุ วิตามิน และสารประกอบโพลีฟีนอล (Bertin, 2003) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น fucoidan, sodium alginate, sulfated galactan, laminarin และ carragenan จากงานวิจัยในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ได้รับ fucoidan ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และมีความต้านทานต่อเชื้อ *V. alginolyticus* และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น (Immanuel et al., 2012; Kitikiew et al., 2013) กุ้งขาววัยอ่อนที่ได้รับสาร sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria fisheri* ผ่านอาร์ทีเมีย มีการตอบสนอง และกิจกรรมการต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น (Wongprasert et al., 2014)

6.3 การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

จากคุณสมบัติของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่ว่าระยะเวลาของการกระตุ้นมีขีดจำกัด หรือค่อนข้างสั้น ซึ่งต้องมีการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง (Hai, 2015) และการที่กุ้งมีหลายช่วงอายุ ระยะเวลา

หรือรูปแบบของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล ก็มักจะมีคำถามเกิดขึ้นว่า จะใช้เมื่อไหร่ จะใช้อย่างไร ปริมาณเท่าไหร่ และใช้ระยะเวลานานเท่าใด จึงจะเกิดประสิทธิผลมากที่สุด จากตารางที่ 1 ได้รวบรวมตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ในกุ้ง ซึ่งมีวิธีการใช้ ปริมาณ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน

6.3.1 วิธีการใช้

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปจะใช้เมื่อมีความเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม หรือคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยง และในช่วงที่มีการระบาดของโรค เพื่อเตรียมพร้อมให้กุ้งสามารถรับมือกับเชื้อโรคที่จะเข้ามาในร่างกายได้ตลอดเวลา ในปัจจุบันนี้มีสารประกอบหลายชนิดที่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ วิธีการให้ก็มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน นักวิทยาศาสตร์ได้ทดลองถึงการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่หลากหลายวิธี ได้แก่ การแช่ (immersion) การฉีด (injection) และการกิน โดยผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูป (diet supplementation) และการส่งผ่านอาร์ทีเมีย (via *Artemia*) ซึ่งวิธีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้ง จะถูกพิจารณาร่วมกับระยะหรืออายุ และรูปแบบการเลี้ยงด้วย เช่น กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะนอเพลียส และซูเอียที่เลี้ยงในโรงเรือน (hatchery) ที่ได้รับเบต้ากลูแคนด้วยวิธีการแช่ มีอัตราการรอดสูงภายหลังจากปล่อยเลี้ยงในบ่อดิน (Sung et al., 1998) การฉีดจัดว่าเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากสารดูดซึมได้อย่างรวดเร็วและมั่นใจได้ว่าสารเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำได้ตามปริมาณที่ใช้ การฉีดนิยมใช้กับกุ้งขนาดใหญ่ที่มีขนาด 10 กรัมขึ้นไป หรือพ่อแม่พันธุ์ แต่ข้อเสียของการฉีดคือต้องใช้แรงงานเป็นจำนวนมาก และก่อให้เกิดความเครียดได้สูง การทดลองเกี่ยวกับการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่มักจะใช้วิธีการผสมอาหารให้กุ้งกิน เพราะนอกจากจะไม่ก่อให้เกิดความเครียดแล้วยังใช้ได้กับกุ้งในปริมาณมาก ๆ และใช้ได้จริงในระดับฟาร์ม รวมทั้งมีต้นทุนที่ไม่สูงมากนัก อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์อาจมีการละลายไปกับน้ำ และอาจถูกทำลายโดยกรดหรือน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร มีรายงานการใช้อาร์ทีเมียเป็นตัวนำส่งสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อลดข้อจำกัดในข้างต้นซึ่งก็ให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งได้ (Wongprasert et al., 2014) แต่ขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องเลี้ยงอาร์ทีเมีย เนื่องจากวิธีการผสมอาหารเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้จริงในระดับฟาร์มได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการผลิตอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่มีการสูญหายไป เช่น อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผลิตมาจากโรงงานโดยตรง เพื่อให้ง่ายต่อการใช้และเป็นมาตรฐานเดียวกัน

6.3.2 ปริมาณและระยะเวลาที่ใช้

ปริมาณและระยะเวลาของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณสูง-ต่ำเกินไป อาจจะลดประสิทธิภาพของการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หรืออาจเกิดการกดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ (Jian and Wu, 2003) อย่างไรก็ตาม ผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณ (dose) ที่ใช้ (Harikrishnan et al., 2011) ตัวอย่าง เช่น Pholdaeng and Pongsamart (2010) ศึกษาผลของ polysaccharide gel ที่สกัดจากเปลือกทุเรียน โดยการผสมอาหารให้กุ้งกินที่ระดับ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผลการทดลองพบว่า ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม กุ้งมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตามปริมาณในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้องมีการศึกษาในสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่ละชนิด เพื่อหาระดับที่เหมาะสมที่สุด และสามารถนำมาใช้ได้จริงในระดับฟาร์มต่อไป

ระยะเวลาในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการเลี้ยงกุ้ง และความเสี่ยงต่อการเกิดการระบาดของโรคในระหว่างเลี้ยง (Barman et al., 2013) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระยะเวลาที่ยาวนานอาจกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ รายงานวิจัยในปัจจุบันนอกจากจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณที่ต้องใช้ (dose) แล้ว ก็ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสมอีกด้วย เช่น ทดลองของฉัทชนันศิริไพศาล และคณะ (2549) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 ก./ อาหาร 1 กก. นาน 4 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ให้ 2 และ 3 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และได้เสนอแนะไว้ว่าการให้เบต้ากลูแคน 1 เดือน หยุดให้ 1 เดือน ที่ความเข้มข้นเท่าเดิม จะมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันกุ้งให้สูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมยีสต์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ทุกวัน การให้ 3 วันต่อครั้ง และ 10 วันต่อครั้ง (Babu et al., 2013)

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ได้ผลดีในกุ้งนอกเหนือจากวิธีการใช้ ระยะเวลาและปริมาณที่ใช้ ต้องคำนึงถึงสภาวะความสมบูรณ์และความแข็งแรงของร่างกายของกุ้งในขณะนั้น อายุของกุ้ง สภาพแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่ร่วมด้วย (ชนกันต์, 2013) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นเพียงการส่งเสริมให้กุ้งมีความพร้อมในการป้องกันตัวเอง ซึ่งต้องทำควบคู่ไปกับการจัดการสิ่งแวดล้อมที่ดี การดูแลเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาเลี้ยง

6.4 โปรไบโอติก

โปรไบโอติก คืออาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ทำหน้าที่ช่วยในการปรับสมดุลลำไส้ของสัตว์น้ำ เพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรคต่าง ๆ และยังช่วยพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำโดยมี

การสร้างเมือกบริเวณลำไส้ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสร้างกรดแลคติก เนื่องจากกรดแลคติกจะมีการสร้าง Bacteriocin คือเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ

การทำงานของโปรไบโอติก

ในสัตว์บกโปรไบโอติกทำงานโดยการนำสิ่งชีวิตเข้าไปในระบบทางเดินอาหารและเข้าไปรบกวนเชื้อก่อโรคโดยการผลิตโมเลกุลยับยั้งและ/หรือ เข้าไปแย่งอาหารและออกซิเจนโดยตรงแต่สำหรับสัตว์น้ำโปรไบโอติกทำงานโดยการเข้าไปอาศัย และเข้าไปสร้างพื้นที่ภายในระบบย่อยอาหารโดยเฉพาะที่เยื่อเมือกบุผิวของลำไส้ ซึ่งส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่ใช้จะเป็นพวก Lactic acid bacteria และจะเจริญเติบโตอยู่ในเยื่อเมือกบุผิวของลำไส้ได้ แต่อย่างไรก็ตาม โปรไบโอติกเหล่านี้ก็ไม่ได้อยู่ในระบบย่อยอาหารเสมอไปยกเว้น *Lactobacillus* นอกจากนี้ โปรไบโอติกยังช่วยเพิ่มสารอาหารเช่น กรดไขมัน ไบโอติน และวิตามินบี 12 ซึ่งช่วยให้สัตว์มีสุขภาพที่ดีขึ้น

คุณสมบัติของโปรไบโอติก

1. เป็นแบคทีเรียที่ดี สามารถต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้
2. ทำให้ host แข็งแรงมีความต้านทานโรค
3. มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
4. สามารถสร้างกรดแลคติค ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่าง ๆ ได้ดีขึ้น
5. สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น
6. สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย

ประโยชน์ของโปรไบโอติก

1. ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย: โปรไบโอติกผลิตสารยับยั้งที่มีความหลากหลายของสารประกอบทางเคมีที่มีการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งสารเหล่านี้ประกอบไป

ด้วย bacteriocins, sideropheres, lysozymes, proteases, hydrogen peroxides และ อื่น ๆ ซึ่ง Bacteriocins ถูกสร้างโดย Lactic Acid Bacteria (LAB) และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

2. ยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยการเข้าไปแย่งที่ยึดเกาะและอาหารบริเวณพื้นผิวของลำไส้ และป้องกันไม่ให้เชื่อก่อโรคเพิ่มจำนวน

3. เป็นตัวแย่งสารอาหาร: โปรไบโอติกจะเป็นตัวแย่งสารอาหาร ไม่เช่นนั้นสารอาหารจะถูกใช้โดยเชื้อก่อโรค ซึ่งการแย่งสารอาหารนี้มีบทบาทสำคัญต่อสภาพแวดล้อมของ microbiota ในระบบลำไส้

4. เป็นแหล่งสารอาหารและย่อยเอนไซม์

5. ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

6. ช่วยปรับคุณภาพน้ำ: โปรไบโอติกช่วยปรับคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงให้ดีขึ้น เนื่องจากโปรไบโอติกสามารถหมุนเวียนสารอินทรีย์ในบ่อได้ยกเว้นการบำบัด แอมโมเนีย ไนไตร์ท และ ไนเตรท

7. มีปฏิกิริยาต่อแพลงก์ตอนพืช: โปรไบโอติกมีส่วนในการฆ่าแพลงก์ตอนพืชหลายชนิดโดยเฉพาะแพลงก์ตอนพืชที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ขี้ปลาวาฬ

8. สามารถต้านไวรัสบางชนิดได้

ข้อจำกัดของการใช้โปรไบโอติก

โปรไบโอติกสามารถใช้ได้ตลอดเวลา แต่ไม่ควรใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพ เพราะจะต้องใช้จุลินทรีย์จำนวนมากขึ้น ทำให้มีต้นทุนสูง และขณะที่ใช้ต้องให้ออกซิเจนในน้ำเพิ่มขึ้น

6.4 เปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides, AMPs)

เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอย่างเชื้อแบคทีเรีย รา พืช สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบว่าสารเหล่านี้มักเป็นสารในระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immunity) มีความสามารถในการเลือกจับ (selectivity) สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง ภายในของสายเปปไทด์มักจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก ซึ่งการมีกรดอะมิโนจำนวนมากนั้นส่งเสริมให้เปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติในการเลือกจับกับเซลล์แบคทีเรียผ่านประจุลบของฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อร่วมกับสารบางชนิดที่เชื้อสารขึ้น (สรศักดิ์ อินทรสูติ, 2556)

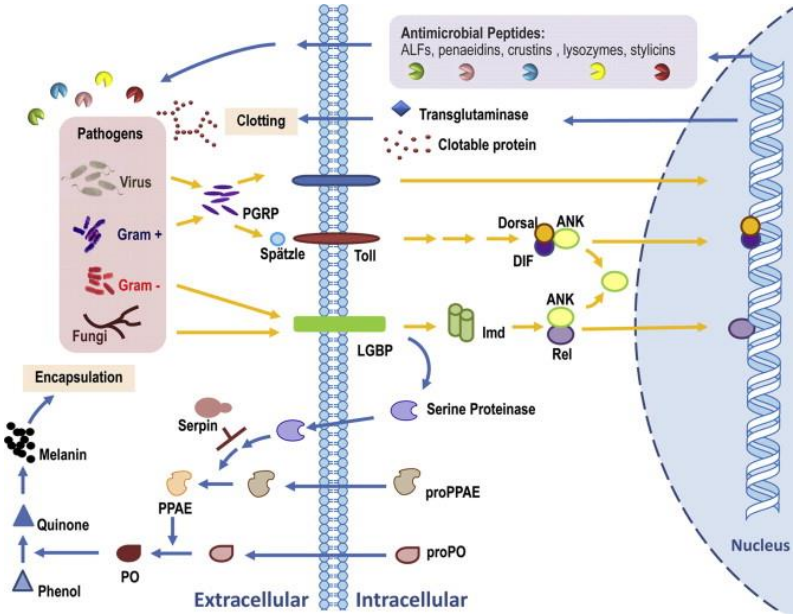
เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นการป้องกันที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันที่ติดตัวมาแต่กำเนิดโดยเฉพาะกุ้ง ซึ่งขาดภูมิคุ้มกันที่ปรับตัวได้ (Boman, 2003; Dimarcq et al., 1998; Bulet et al., 1999; Destoumieux et al., 2000; Cuthbertson et al., 2008; Zasloff et al., 2002; Tincu et al., 2004; Vargas-Albores et al., 2004) เพราะพวกเขามีขนาดเล็ก โครงสร้างเป็นแอมฟิฟาติก (amphipathic) และcationic พวกเขาสามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปยังตำแหน่งที่ติดเชื้อ (Brogden KA., 2005) ในกุ้งสกุลPenaeus 4กลุ่มหลักของ AMP ที่อยู่ในเม็ดเลือด (haemocytes) คือ penaeidins, crustins, anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) และlysozymes

- Penaeidins จะต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive), เชื้อราที่มีเส้นสาย (filamentous fungi) (Destoumieux et al., 1999) ไวรัส (viruses) และโพรโทซัว (protozoans) (Bachere et al., 2003)

- Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) ต้านจุลชีพในช่วงกว้าง ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) (Somboonwiwat et al., 2005; de la Vega et al., 2008)

- Crustins มีผลกระทบส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมบวกในทะเล (Zhang et al., 2007; Relf et al., 1999; Bartlett et al., 2002) เป็นกลุ่มที่กระจายอย่างกว้างขว้างของAMP แยกได้ครั้งแรกจาก Shore crab, *Carcinus maenas* ครัสตินเป็น cationic cysteine-rich น้ำหนักโมเลกุล 7-14 kDa มี isoelectric point ในช่วง 7.0-8.7 และประกอบด้วย whey-acidic protein(WAP) ที่ carboxy terminus (Smith et al., 2008) ครัสตินได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นโปรตีนต้านจุลชีพที่มีความสำคัญใน plasma และ haemocyte granules ของครัสตาเชียน

AMPs เหล่านี้เป็นการสังเคราะห์ซึ่งมีบทบาทสำคัญและถูกเก็บอยู่ในเม็ดเลือด (haemocytes) และAMPsจะถูกปล่อยออกมาจากเม็ดเลือดด้วยการชักนำโดยการติดเชื้อของแบคทีเรีย (Munoz et al., 2002; Soderhall et al., 1998; Bachere et al., 2000) AMPs จะสังเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้การเผาผลาญที่ต่ำ ที่จัดเก็บไว้ได้อย่างง่ายดายจำนวนมาก และพร้อมใช้ง่ายในไม่ช้าหลังเกิดการติดเชื้อ ฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วในช่วงกว้าง (Hancock ,1997, 2001; Prenner et al., 1999) เนื่องมาจากAMPs มีขนาดเล็ก มีโครงสร้าง amphipathic และมีลักษณะ cationic AMPs สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในตำแหน่งที่ติดเชื้อ (Brogden, 2005) AMPs สามารถฆ่าแบคทีเรียในความเข้มข้นไมโครโมล สนับสนุนกลไกที่ไม่พึ่งตัวรับ (non-receptor) เป็นวิธีของ AMPs ซึ่งAMPs จำนวนมาก แสดงความจำเพาะที่โดดเด่นสำหรับ prokaryotes และเป็นพิษต่ำสำหรับ eukaryotic ปรากฏการณ์นี้เป็นสิ่งที่สนับสนุนในการค้นคว้าAMPs และการแสวงหาผลประโยชน์เป็นยาปฏิชีวนะใหม่ที่มีศักยภาพ (Zasloff, 1992) **ภาพที่ 1-1**



ภาพที่ 1-1 รูปแบบแผนผังของระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง (ที่มา : Anchalee Tassanakajon et al., 2013)

ตารางที่ 1-1 ช่วงกิจรรมของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้ง ที่มา : Anchalee Tassanakajon *et al.*(2013)

Family	Isoform	Antimicrobial activity	Other activity
Crustins	Cru*Fc*	Gram-positive bacteria	
	Fc-crus 2	Gram-positive bacteria	
	Fc-crus 3	Gram-positive bacteria	
	crustin*Pm*1	Gram-positive bacteria	Agglutination
	crustin*Pm*5	Gram-positive bacteria	
	crustin*Pm*7	Gram-positive bacteria Gram-negative bacteria	Agglutination
	SWD*Fc*	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; Fungi	Protease inhibitory activity against subtilisin A and protein K
	SWD*Pm*	Gram-positive bacteria	Protease inhibitory activity against subtilisin A
	CruslikeFc1	Gram-positive bacteria	
Penaeidin	*Litvan*Pen2	Gram-positive bacteria; Fungi	
	*Litvan*Pen3	Gram-positive bacteria; Fungi	
	*Litvan*Pen4	Gram-positive bacteria; Fungi	
	*Fenchi*Pen5	Gram-negative bacteria; Gram-positive bacteria; Fungi	
	*Penmon*Pen	Gram-positive bacteria	
	*Penmon*Pen3	Gram-positive bacteria; Fungi	Cytokine
	*Penmon*Pen5	Gram-positive bacteria; Fungi; virus	
Lysozyme	*P. vannamei*	Gram-negative bacteria	
	M. japonicus	Gram-negative bacteria	
	F. chinensis	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
	P. monodon	Gram-negative bacteria	
	F. merguiensis	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
	L stylirostris	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
Antilipopolysaccharide factors	ALF*Pm*2	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
	ALF*Pm*3	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; Fungi; virus	LPS and LTA binding activity
	*Ls*ALF1	Virus	
	*Mj*ALF1		LPS neutralizing activity

6.4.1 เปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดครัสติน (Crustin)

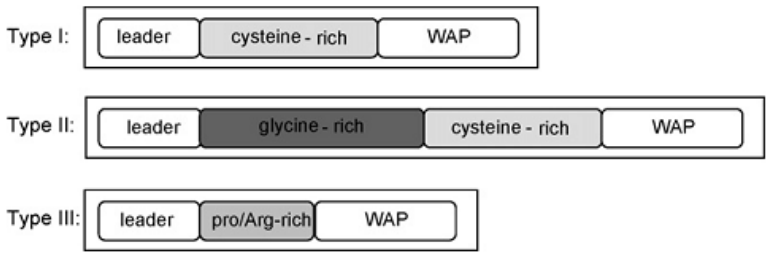
ครัสตินเป็นเปปไทด์ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ลักษณะมี cysteine-rich (12 cysteines) บริเวณ C-terminal ซึ่งประกอบด้วย WAP domain และมีบริเวณอนุรักษ์กรดอะมิโนซีสเตอีน จำนวน 8 ตัว ซึ่งสามารถสร้าง 4 พันธะไดซัลไฟด์ เปปไทด์ครัสตินถูกจำแนกได้ 3 ชนิด (Smith *et* al., 2008) ครัสตินทุกชนิดจะประกอบไปด้วย N-terminal signal sequence และ C-terminal WAP domain ซึ่ง WAP domain พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง และ WAP domain มีหน้าที่ทางชีวภาพหลายชนิด ซึ่งมีทั้งสมบัติการต้านทานจุลชีพ (antimicrobial) และการยั้งยั้งโปรตีนเนส (protease inhibitors) (Sallenave, 2008; Hagiwara et al., 2003)

ครัสตินชนิดแรก (type I) ประกอบด้วย carcinins เป็นครัสตินตัวแรกที่พบใน shore crab, *C. maenas* เปปไทด์เหล่านี้มี cysteine-rich บริเวณของความยาวตัวแปรระหว่าง signal portion และ WAP domain ครัสติน type I หลักๆจะพบใน crab และ crayfish

ครัสตินชนิดที่สอง (type II) มีบริเวณที่ซ้ำกันของ glycine-rich ก่อนส่วนของ cysteine-rich และ WAP domain glycine ที่ซ้ำกันมักจะอยู่ระหว่าง 20 และ 50 ตัว type IIอาจจะเกี่ยวข้องกับ tran-membrane domain (Bartlett et al., 2002) และtype II เริ่มต้นเกิดขึ้นในกุ้ง

ครัสตินชนิดที่สาม (type III) มีการกำหนดไว้โดย single WAP domain (SWD) และบริเวณที่สั้นระหว่าง signal sequence และ WAP domain ประกอบด้วย proline และ arginine (Jimenez-Vega et al., 2004)

ครัสตินทุกชนิดจะมี N-terminal และ C-terminal WAP domain และระหว่างบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ครัสตินจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่หลากกลาย **ภาพที่ 1-2**



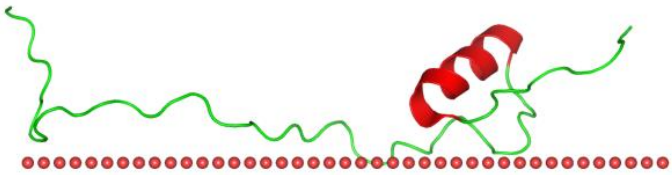
ภาพที่ 1-2 ชนิดของครัสติน

ที่มา : Jessica *et al*., (2009)

ครัสตินจัดเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพประเภทหนึ่งที่พบในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสัตว์จำพวกกุ้ง(crustacean) มีการศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของครัสตินพบว่า crustin*Pm*1 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดี ในขณะที่ crustin*Pm*7 สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งทั้งสองแบบของครัสติน พบในเม็ดเลือด (haemocyte) ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) การต้านเชื้อแบคทีเรียของครัสตินจะอาศัยความสามารถของตัวกุ้ง ครัสตินจะไปเกาะติดเซลล์แบคทีเรียและทำให้เสียระบบที่เหมาะสมทางกายภาพเคมีของผิวภายนอกแบคทีเรีย (Pasapong et al., 2012)

6.4.2 เปปไทด์ต้านจุลชีพชนิด Penaeidin

Penaeidin, PEN เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพ ซึ่งพบเฉพาะในกุ้งตระกูล Penaeidin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพได้มากมายทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา พบครั้งแรกในกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) (Destoumieux et al, 1997) มีขนาดประมาณ 5.5-6.6 kDa มีหลาย Isoforms ได้แก่ Penaeidin 2, 3 และ 4 มีคุณสมบัติในการต้านทานแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อรา รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด โครงสร้างของ penaeidin ประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆคือ proline-rich domain (PRD) อยู่ทางปลายด้านอะมิโน และ cysteine-rich domain (CRD) อยู่ทางปลายด้านคาร์บอกซิล (Destoumieux et al, 1997; Destoumieux et al, 2000)



ภาพที่ 1-3 รูปโครงสร้างของ Penaeidin

ที่มา : Andrei Lomize, Mikhail Lomize and Irina Pogozheva (2005)

Penaeidin, PEN เป็น AMP ชนิดหนึ่ง พบว่ามีการแสดงออกหนาแน่นมากในส่วนของเหงือก และเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกมากในส่วนของหัวใจ ตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อใต้เปลือก และลำไส้ส่วนท้าย และยังพบว่ามีการแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของลำไส้ส่วนกลาง และกล้ามเนื้อ โดยไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในส่วนของลำไส้ส่วนหน้า นอกจากนี้ยังพบ penaeidin mRNA ในเซลล์ระยะ Postlarva สูงกว่า Nauplius I (9 ชั่วโมงหลังจากฟักเป็นตัว)

และสูงกว่าระหว่างระยะลอกคราบ แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงมีการพัฒนาที่ระยะลอกคราบนี้(จารุวรรณ ชินกร, 2550)เช่นเดียวกับ Munoz et al. (2002) ได้รายงานผลการศึกษาการแสดงออกของยีน และการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อต่างๆ ต่อการต้านทานเชื้อโรค แสดงให้เห็นว่าการหลั่ง Penaeidin จะถูกควบคุมจากเม็ดเลือดชนิด Large granulocytes โดยจะมีการสร้างออกมาและแพร่กระจายไปตามกระแสเลือดและแทรกในเนื้อเยื่อของกุ้ง โดยมี 2 ขั้นตอนที่เกิดขึ้น คือขั้นแรกเม็ดเลือดเคลื่อนตัวไปที่บริเวณติดเชื้อภายใน 12 ชั่วโมงแรก ไปรวมตัวกันมากขึ้นแล้วหลั่ง Penaeidin ออกมา ต่อมาเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนเลือดและในเนื้อเยื่อจะเพิ่มการสร้าง Penaeidin ซึ่งอาจจะเกิดการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือด สุดท้ายเมื่อเม็ดเลือดพบกับแบคทีเรียจะทำให้เกิดการทำงานของ Penaeidinโดยจะทำให้เกิดการแตกของเซลล์ของเชื้อโรค นอกจากนี้ยังพบว่า Penaeidin ยังทำหน้าที่จับกับแบคทีเรีย เพื่อกระตุ้นให้เกิด Opsonic activity ในที่สุด

6.4.3 เปปไทด์ต้านจุลชีพชนิด Anti-lipopolysaccharide factor (ALF)

แอนติไลโพพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (Anti-lipopolysaccharide Factor) หรือ ALF เป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่ม AMP โดยในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจำพวก Arthropods มีการศึกษาครั้งแรกใน Amebocytes ของแมงดาทะเล (Horseshoe Crab) *Limulus polyphemus* และ *Tachypleus tridentatus* พบครั้งแรกในเม็ดเลือดของแมงดาทะเล โดยให้ชื่อว่า LALF และ TALF ตามลำดับ (Tanaka et al., 1982) ซึ่งยีน ALF เป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเป็น Cationic ทำหน้าที่ในการจับและยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแกรมลบ ชนิด R อย่างรุนแรง โดยสามารถจับกับ Endotoxin ที่เป็นส่วนประกอบของ Lipopolysaccharide (LPS) ที่ผนังเซลล์แล้วขจัดพิษของ Endotoxin ได้ (Morita et al., 1985) แต่ในบางครั้งยังพบว่า ALF สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราเส้นใยได้อีกด้วย (Somboonwiwat et al., 2005) และยังมีความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย (Li et al., 2008) ยีน ALF มีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก และลำไส้ (Liu et al., 2005)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopeneaus vannamei*) ระยะโพสต์ลาร์วา 30 เลี้ยงในบ่อดิน (PE slope) ขนาด 10X20 ม. ที่มีน้ำเค็ม 15 ppt ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อัตราการปล่อยกุ้ง บ่อละ 10,000 ตัว/ 200 ตร.ม. สุ่มกุ้งตรวจโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) ไวรัสทอร่า (Taura Syndrom Virus, TSV) โรคไวรัส Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) และแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์สร้าง ท็อกซิน, โรคไมโครสปอริเดียน *Enterocytozoon hepatopenaei* โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูป วันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น และให้อาหารสำเร็จรูปผสมเซลล์ยีสต์ และแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการหมักสับปะรดและ เชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ให้อากาศตลอดเวลา ควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อดินให้เหมาะสมกับการเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ความเค็มประมาณ 15 ppt ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ไม่น้อยกว่า 4.5 ppm อุณหภูมิ 25-28 °C ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5-8.5 ค่าอัลคาลินิตี้อยู่ในช่วง 120-150 mg/ml ค่าแอมโมเนีย และไนไตรท์ ไม่เกิน 1 ppm และ 0.5 ppm ตามลำดับ เลี้ยงกุ้งทั้งหมด 100 วัน และเก็บตัวอย่างกุ้งมาดูดเลือดในวันที่ 40, 60, 90 วัน หลังการลี้ยง เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ ได้แก่ ครัสติน (crustins), พีนาอิดิน (penaedins) และanti-lipopolysaccharide factors (ALFs) โดยใช้เทคนิค quantitative real –time PCR

2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*

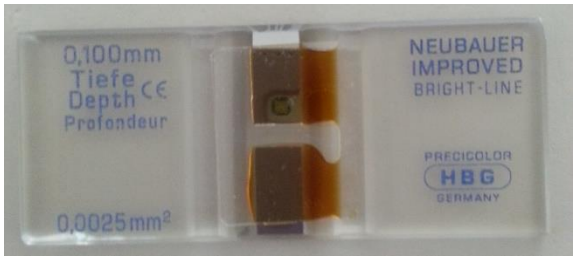
นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรคในกุ้งมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีเกลือผสม 1.5% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600})ให้ได้เท่ากับ 0.6 (10^8 cfu/ml)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 100 วัน (น้ำหนักกุ้งต่อตัว = 21 กรัม) นำกุ้งมาบ่อละ 45 ตัว เพื่อนำมาฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* บริเวณขาเดินคู่ที่ 5 ปริมาณ 0.1 ml จากนั้นนับอัตราการป่วยและตายต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5 วัน นำข้อมูลมาคำนวณค่าอัตราการตายสะสม (Cumulative mortality) ของกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลอง

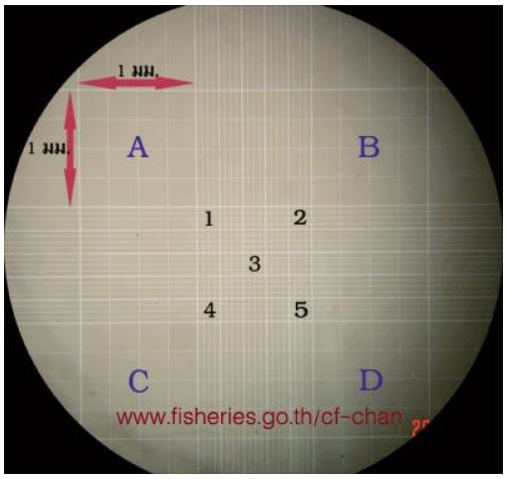
2.3 การเตรียมอาหารทดลอง

2.3.1 การเตรียมอาหารผสมเซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

(1) นำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากสถาบันวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มาทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์บน haemocytometer หรือ สไลด์นับเม็ดเลือด **ภาพที่ 2-1** เพื่อคำนวณเซลล์ยีสต์ใน stock โดยใช้ auto pipette 1 มิลลิลิตร ดึงยีสต์ออกมา 100 ไมโครลิตร หรือ 0.1 มิลลิลิตร จากขวด stock ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร ปิด cover glass และค่อยๆปล่อยยีสต์ที่ดึงมาจาก stock จนเต็มตารางนับเซลล์ยีสต์ช่อง W (ช่อง A B C D) **ภาพที่ 2-2** จะสามารถคำนวณปริมาตรน้ำได้จาก พื้นที่ตาราง × ความลึก เมื่อนับจำนวนเซลล์ยีสต์ในตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็จะได้จำนวนยีสต์ต่อปริมาตรน้ำของตารางนั้น จากนั้นคำนวณเป็น จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร



ภาพที่ 2-1 สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) สำหรับนับจำนวนเซลล์ยีสต์



ภาพที่ 2-2 ตารางบนผิว Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และA B C D (ช่องW)

ที่มา : http://www.fisheries.go.th/cfchan/plankton/hema/hema.htm

(2) เมื่อคำนวณเซลล์ยีสต์ใน stock โดยเทียบจาก 0.1 มิลลิลิตรที่ทราบจำนวนเซลล์ (cell/ml) จึงทำการเทียบจำนวนเซลล์ยีสต์จาก stock เพื่อต้องการทราบปริมาตรที่มีจำนวนยีสต์ 10^9 เซลล์/ มิลลิลิตร

(3) นำปริมาตรที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ต้องการ ได้แก่ ยีสต์ 10^9 เซลล์นำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส 12,000 G เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บเซลล์ยีสต์ที่ตกตะกอนไว้ใน NaCl 0.85% เก็บแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำไปผสมอาหารให้ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

(4) นำอาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมกับยีสต์ ด้วยวิธีสเปรย์ยีสต์ที่เตรียมไว้ในข้างต้นลงบนอาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยตรง จากนั้นผสมน้ำมันหมึกลงไป 100 มิลลิลิตร ต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม คลุกผสมน้ำมันหมึกจนทั่วอาหาร ผึ่งลมให้แห้ง แล้วจึงเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ไม่ให้อาหารโดนแสง

2.3.2 การเตรียมน้ำหมักจากสับปะรด

นำน้ำตาลทรายขาว 2 กิโลกรัม ต้มกับน้ำสะอาด 3 ลิตร จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้ ต่อมานำสับปะรดสุกปลอกเปลือก และตาของสับปะรดออก เหลือเพียงแต่เนื้อ จากนั้นนำเนื้อสับปะรดมาสับบดละเอียด ประมาณ 10 กิโลกรัม นำส่วนผสมทั้งสองอย่างเทใส่ลงในถังที่มีฝาปิดสนิท ใส่โยเกิร์ตรสธรรมชาติ 2 ถ้วย และยีสต์ทำขนมปัง 25 กรัม เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นปิดฝาให้สนิท (ภาพที่ 2-3)

ภาพที่ 2-3 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมักสับปะรด

นำน้ำหมักสับปะรด มาทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บน haemocytometer หรือสไลด์นับเม็ดเลือด เพื่อคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ใน stocking โดยใช้ auto pipette 1 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำออกมา 100 ไมโครลิตร หยอดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด เพื่อนับจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่อง R (ช่อง A B C D F) คำนวณปริมาตรน้ำได้จาก พื้นที่ตาราง X ความลึก เมื่อนับจำนวนเซลล์ในตาราง

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็จะได้จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ต่อปริมาตรน้ำของตารางนั้น จากนั้นคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร

เมื่อคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ใน stocking โดยเทียบจาก 0.1 มิลลิลิตร ที่ทราบจำนวนเซลล์ (cell/ml) จึงทำการเทียบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์จาก stocking เพื่อต้องการทราบปริมาตรที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ 10^9 cell/ ml

นำอาหารกุ้งสำเร็จรูป มาผสมกับเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก ด้วยวิธีสเปรย์น้ำหมักกากถั่วเหลือง, น้ำหมักสับปะรด, น้ำหมักกากน้ำตาล ลงไปบนอาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยตรง จากนั้นผสมน้ำมันหมึกลงไป 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารกุ้ง 500 กรัม คลุกผสมน้ำมันหมึกจนทั่วอาหาร แล้วจึงทิ้งผึ่งลมให้แห้ง แล้วจึงเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วจึงนำไปเลี้ยงกุ้งที่ทำการทดลอง

2.3.3 ขั้นตอนการผสม *Bacillus subtilis* (Super Biotic®)ในอาหารกุ้ง

นำถังที่มีฝาปิดสนิท เทน้ำกลั่นใส่ถัง 4 ลิตร จากนั้นนำอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม กากน้ำตาล 10 กิโลกรัม และจุลินทรีย์โปรไบโอติกสำเร็จรูป (Super Biotic) 1 กิโลกรัม คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน หลังจากนั้นให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นปิดฝาให้สนิท (ภาพที่ 2-4)

ภาพที่ 2-4 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมัก Super biotic

นำอาหารกุ้งสำเร็จรูป มาผสมกับเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก (1 ลิตรต่ออาหาร 10 กก.) ด้วยวิธีสเปรย์ลงไปบนอาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยตรง จากนั้นผสมน้ำมันหมึกลงไป 1 ลิตร คลุกผสมน้ำมันหมึกจนทั่วอาหาร แล้วจึงทิ้งผึ่งลมให้แห้ง แล้วจึงเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วจึงนำไปเลี้ยงกุ้งที่ทำการทดลอง

ก. **ข.** **ค.** **ง.**

ภาพที่ 2-5 แสดงอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่ผสมน้ำหมักในแต่ละชนิด

ก. อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสมน้ำมันหมึก (กลุ่มควบคุม)

ข. อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสมยีสต์ (whole cells) 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.

ค. อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสมน้ำหมักสับปะรด 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.

ง. อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสม Super biotic® 1 ลิตร/อาหาร 10 kg.

2.4 การออกแบบและการวางแผนการทดลอง

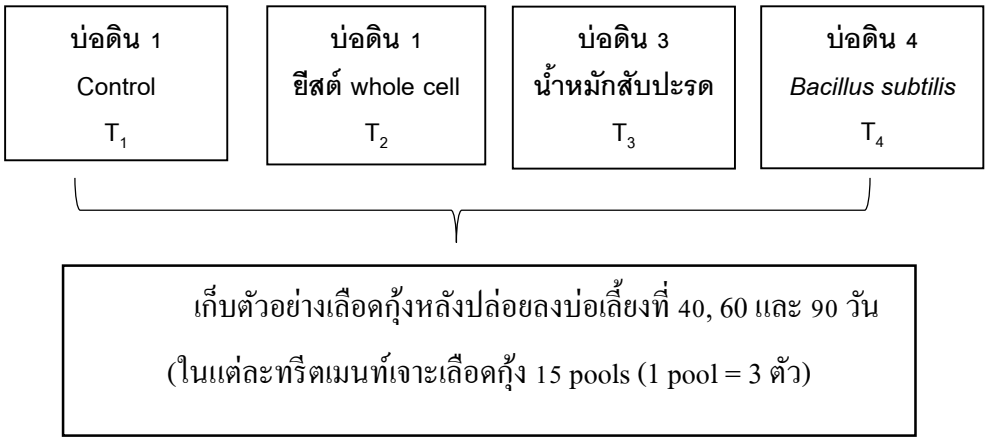
แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ในแต่ละกลุ่มการทดลองมี 3 ซ้ำ (ภาพที่ 2-6) ดังนี้

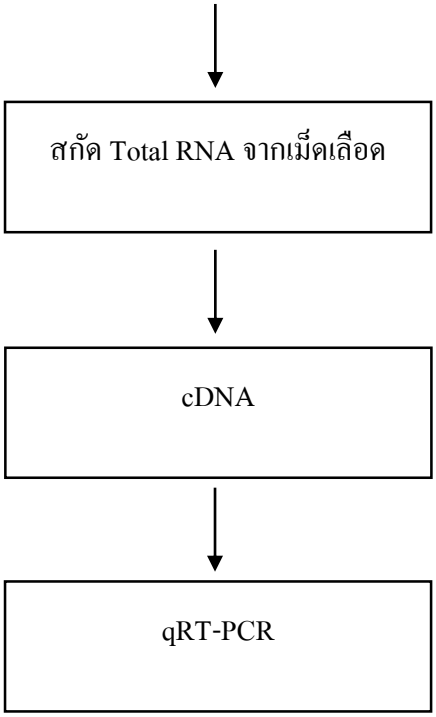
กลุ่มการทดลองที่ 1 อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสมน้ำมันหมึก (ชุดควบคุม)

กลุ่มการทดลองที่ 2 อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสมยีสต์ (whole cells) 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.

กลุ่มการทดลองที่ 3 อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสมน้ำหมักสับปะรด 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.

กลุ่มการทดลองที่ 4 อาหารกุ้งสำเร็จรูป ผสม Super biotic® 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.





ภาพที่ 2-6 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

2.5 การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง

ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมหลังปล่อยเลี้ยงในบ่อดิน ในวันที่ 40, 60 และ 90 วัน โดยการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งที่แอ่งเลือดบริเวณขาเดินของกุ้ง (ภาพที่ 2-7) โดยใช้เข็มเบอร์ 26G พร้อม syringe ดูดสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด MAS (อัตราส่วน 1:1) ใส่ในหลอด Falcon ขนาด 10 มิลลิลิตร (ในแต่ละทรีตเมนท์เจาะเลือดกุ้ง 15 pools (1 pool = 3 ตัว) เพื่อนำไปสกัด RNA และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่อไป

ภาพที่ 2-7 การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

2.6 การสกัดอาร์เอ็นเอ จากเม็ดเลือดกุ้ง

2.6.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA extraction)

นำเลือดกุ้งไปปั่นเหวี่ยง 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

↓

เทส่วนใสทิ้ง เติม Tri-Reagent (Trizol) 1 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

↓

เติม Chloroform 0.2 ml นำมาเขย่าด้วยเครื่อง Vortex หลอดละ 1 นาที เวียนซ้ำจนครบ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

↓

ดูดส่วนใสไปยัง tube 1.5 ml หลอดใหม่ และเติม *Isopropanol* 0.5 ml เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 12000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

↓

เทส่วนใสออกล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ เติม 75% Ethanol 1 ml และปั่นเหวี่ยงที่ 12000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

↓

นำ Ethanol ออกโดยคว่ำบนทิชชู่ประมาณ 10 นาที และทำการ air-dried

↓

จะเก็บตะกอนอาร์เอ็นเอใน DEPC RNase free water ที่ -80 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในการตรวจสอบและวัดคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี

2.6.2 การหาปริมาณและวัดคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

นำตะกอนอาร์เอ็นเอที่เก็บไว้ใน -80 ° มาละลาย โดยแช่บนน้ำแข็ง 15-30 นาที

↓

นำมาตรวจสอบและวัดคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

↓

ผสม RNA 1 µl+ TE buffer 4 µl + Dyne (6X Loading Dye) 1 µl

↓

เติมน้ำ 10X TAE ลงในเครื่อง Gel Electrophoresis แล้วปิเปตส่วนผสมที่เตรียมไว้ลงในวุ้นอะกาโรส run ที่ 50 Vol 10 นาที และ 70 Vol 10 นาที

↓

ย้อมด้วย Ethedium bromide 30 วินาที

↓

แล้วนำไปแช่น้ำ 1 ชั่วโมง

วัดคุณภาพของอาร์เอ็นเอวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี

↓

ผสม RNA 0.5 µl กับ DEPC 49.5 µl

↓

วัดค่าดูดกลืนแสง(OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

↓

หาความบริสุทธิ์ และปริมาณ RNA ด้วยสูตร ปริมาณ RNA (ng/µl) = OD_{260} *40*dilution

↓

นำเจลเข้าเครื่อง Gel Doc XR

2.6.3 การสังเคราะห์ 1st strand cDNA ด้วยชุด Kit SuperScript® III First-Stand (Invitrogen)

นำ RNA + Hexamer Primer +10 mM dNTP+ DEPC-trated water (ผสมกันให้ปริมาตรรวม 10 µl) บ่มที่ 65 °C 5 นาที วางบนน้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที

↓

เติม Random Hexamers บ่มที่ 25 °C, 10 นาที & 50 °C, 50 นาที และ 85 °C, 5 นาที เอามาวางบนน้ำแข็งทันที (ขั้นตอนนี้ทำต่อเนื่องกัน) — — → cDNA Synthesis Mix

10x RT Buffer	2 µl
25 mM $MgCl_2$	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNase OUT	1 µl
SuperScript® III First-Stand	1 µl
รวม 10 µl	

↓

เติม RNase H 1 µl บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

↓

จะได้ cDNA ต้นแบบสำหรับทำ RT-PCR ต่อไป — — → นำมาตรวจสอบและวัดคุณภาพของ cDNA

↓

- ตรวจสอบ cDNA ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis
- วัดคุณภาพและปริมาณของ cDNA ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี

2.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

เจือจาง cDNA เป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และติดตามการแสดงออกของยีนโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการศึกษา (ตารางที่ 2-1) และเตรียมส่วนผสมของสารละลาย ดังตารางที่ 2-2 และ 2-3 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง LightCycler®96 SW1.1 ตั้งอุณหภูมิดังตารางที่ 2-4 และ *Beta-actin* ที่ใช้ในปฏิกิริยา

ตารางที่ 2-1 แสดงไพรเมอร์ของยีน *Crustin, Penaeidin, Anti-lipopolysaccharide factor (LvALF)*

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (bp)	Ref.
Crustin	F-ACGAGGCAACCATGAAGG R-TCGTTGGAACAGGTTGTGG	141	Wang *et al*, 2007
Beta-actin	F-CCACGAGACCACCTACAAC R-AGCGAGGGCAGTGATTTC	142	Ji *et al*, 2009
Penaeidin 3 *(LitvanPEN3)*	F-CACCCTTCGTGAGACCTTTG R- AATATCCCTTTCCCACGTGAC	141	Takuji Okumura., 2007
Anti- *lipopolysaccharide* *Factor (LvALF1)*	F-CATTCGGCCTTGACTTCG R-ATCCAGGACACCACATCCTG	259	Enrique de la Vega, 2007

ตารางที่ 2-2 ส่วนประกอบของสารผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT- PCR สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* และ *Crustin*

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาตร (µl)
4µM Primer (F)	0.2 µM	1 µl
4µM Primer (R)	0.2 µM	1 µl
Master mix		10 µl
H_2O		6 µl
cDNA Sample (10 ng/µl)	20 ng	2 µl
Total		20 µl

ตารางที่ 2-3 ส่วนประกอบของสารผสมที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีน *LvALF1*

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาตร (µl)
4µM Primer (F)	0.2 µM	1 µl
4µM Primer (R)	0.2 µM	1 µl
Master mix		10 µl
H_2O		4 µl
cDNA Sample (10 ng/µl)	40 ng	4 µl
Total		20 µl

ตารางที่ 2-4 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา qRT-PCR สำหรับเครื่อง LightCycler®96 SW1.1 (Roch)

Step	**Temperature (°c)**			**Time (s)**	**Cycles**
	PEN	***Crustin***	***LvALF***		
Pre-incubation	95	95	95	60	1
3 steps	95	95	95	30	40
Amplification	60	60	58	30	
	72	72	68	30	
Melting	95	95	95	10	1
	65	65	65	60	
	97	97	97	1	

2.8 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ศึกษาการแสดงออกของยีน Antimicrobial peptide โดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) โดยใช้อัตราส่วนของยีนที่สนใจกับ Reference gene ทำการ Calibrate กับชุดควบคุม (Control)

3. ผลการวิจัย

3.1 การตรวจสอบเชื้อที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักสับปะรด

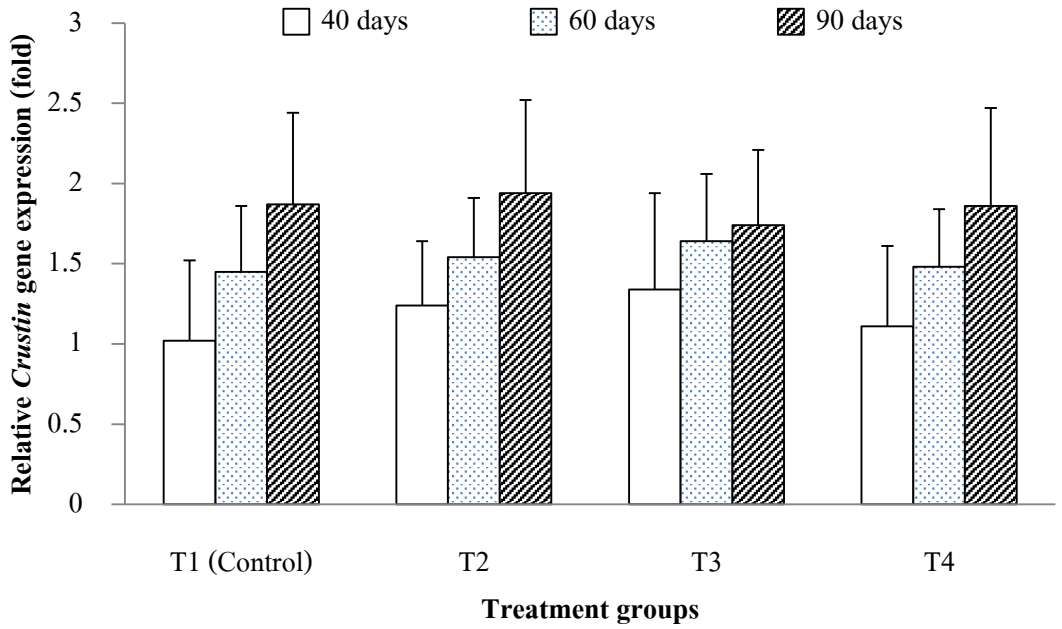
เมื่อน้ำหมักมีพีเอชในช่วง 3.7-4.0 นำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ได้ โดยดูจากลักษณะของโคโลนี (colony morphology) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypic Soy Agar (TSA) และการย้อมแกรม (gram stain) ผลที่ได้พบว่าแบคทีเรียจากน้ำหมักสับปะรด มีเชื้อ 3 ชนิด และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด และยืนยันเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมัก *Bacillus subtilis* ซึ่งพบว่ามีเชื้อ 1 ชนิด และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นกัน

3.2 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ในจุลินทรีย์จากน้ำหมักสับปะรด และ *Bacillus subtilis*

การศึกษาการแสดงออกของ Antimicrobial peptide ของยีน *Crustin, Penaeidin 3 (Litvan PEN3) และ LvALF1* ในกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและโปรไบโอติก ด้วยเทคนิค quantitative Real-Time PCR โดยใช้ β-*actin* เป็นยีนควบคุม (reference gene) ได้ผลดังต่อไปนี้

3.2.1 การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกุ้ง

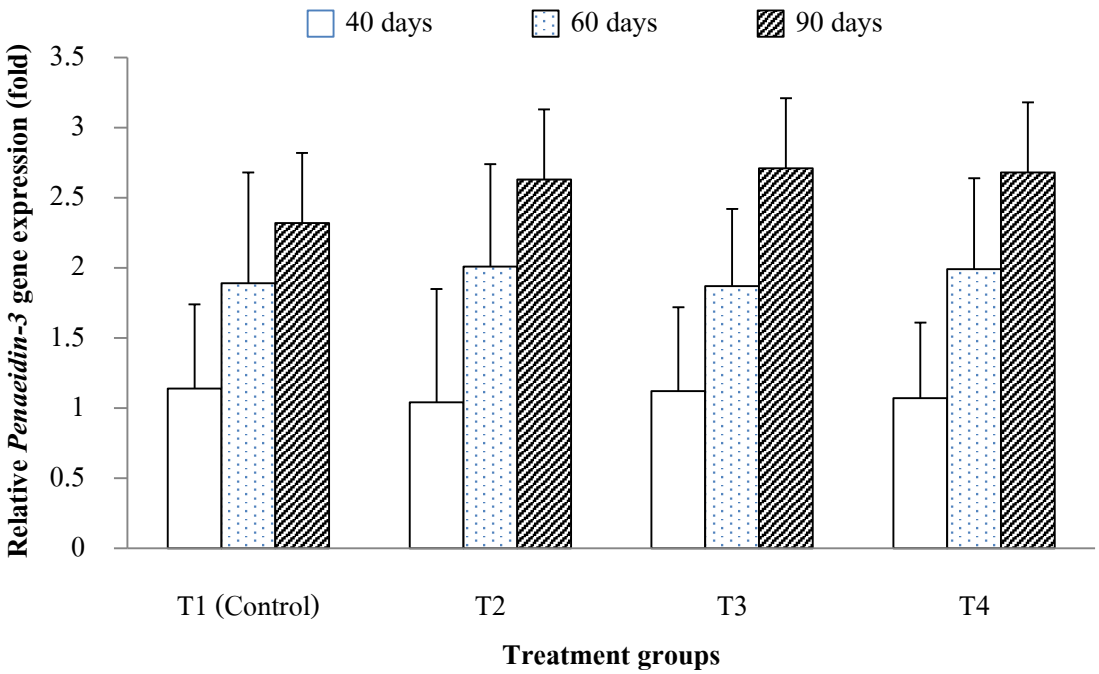
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค quantitative Real-time PCR พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาที่ 40 วัน, 60 และ 90 วัน กุ้งที่ได้รับได้รับเซลล์ยีสต์ แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการหมักสับปะรด และ *Bacillus subtilis* มีการแสดงออกของยีน *Crustin* (up-regulation) กลุ่มควบคุมมีการแสดงออกสูงสุด รองลงมาคือกุ้งที่ได้รับอาหารหมักสับปะรด กุ้งที่ได้รับ *Bacillus subtilis* และกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ (whole cell) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกุ้งในทุกชุดทดลองมีการแสดงออกของยีน *Crustin* ไม่แตกต่างกัน ตลอดช่วงที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกุ้งที่โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

3.2.2 การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3*

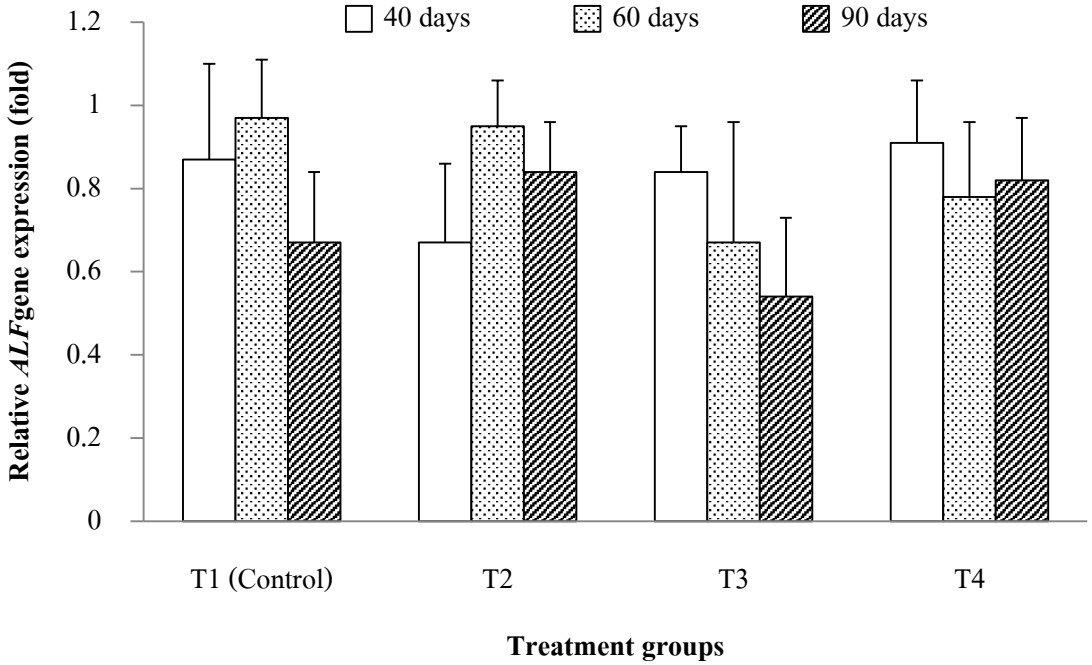
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค quantitative Real-time PCR พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาที่ 40 วัน, 60 และ 90 วัน กุ้งที่ได้รับได้รับเซลล์ยีสต์ แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการหมักสับปะรด และ *Bacillus subtilis* มีการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* (up-regulation) กลุ่มควบคุมมีการแสดงออกสูงสุด รองลงมาคือกุ้งที่ได้รับอาหารหมักสับปะรด กุ้งที่ได้รับ *Bacillus subtilis* และกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ (whole cell) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกุ้งในทุกชุดทดลองมีการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ไม่แตกต่างกัน ตลอดช่วงที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-2 การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้ง โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

3.2.3 การแสดงออกของยีน *LvALF1*

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค quantitative Real-time PCR พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาที่ 40 วัน, 60 และ 90 วัน กุ้งที่ได้รับได้รับเซลล์ยีสต์ แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการหมักสับปะรด และ *Bacillus subtilis* ไม่มีการแสดงออกของยีน *LvALF1* (down-regulation) กลุ่มควบคุมมีการแสดงออกสูงสุด รองลงมาคือกุ้งที่ได้รับอาหารหมักสับปะรด กุ้งที่ได้รับ *Bacillus subtilis* และกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ (whole cell) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกุ้งในทุกชุดทดลองมีการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ไม่แตกต่างกัน ตลอดช่วงที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 3-3)



ภาพที่ 3-3 การแสดงออกของยีน *LvALF1* ในเม็ดเลือดกุ้ง โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

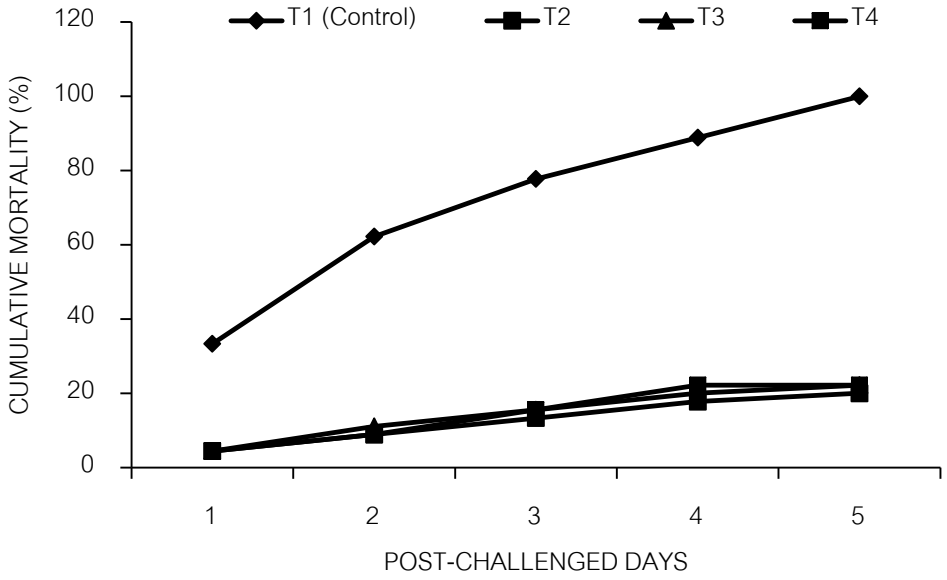
3.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ้งตั้งแต่ระยะโพสท์ลาร์วา 30 (Postlarva 30) กุ้ง 40, 60 และ 100 วัน หลังปล่อยเลี้ยงในบ่อดิน

จากการสุ่มตัวอย่างกุ้งทดลองในแต่ละกลุ่ม มาทดสอบการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) ไวรัสทอร่า (Taura Syndrom Virus, TSV) โรคไวรัส Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) และแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์สร้างท็อกซิน โรคไมโครสปอริเดียน *Enterocytozoon hepatopenaei* โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ไม่พบการติดเชื้อดังกล่าวในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินตลอดระยะเวลาของการทดลองที่ 100 วัน

3.4 อัตราการตายของกุ้งภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus*

กุ้งที่ได้รับได้รับเซลล์ยีสต์ แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการหมักสับปะรด และ *Bacillus subtilis* มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยในวันที่ 5 หลังการติดเชื้อ กุ้งในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมถึง 91% ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารผสม

เซลล์ยีสต์ โปรไบโอติกจากน้ำหมักสับปะรด มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 26% และกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* มีอัตราการตายสะสม เท่ากับ 22%



ภาพที่ 3-4 การตายสะสมของกุ้งภายหลังการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

4. อภิปรายผลการวิจัย

4.1 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ (whole cell)

การใช้ยีสต์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากคุณสมบัติของยีสต์ที่มีเบต้ากลูแคนที่ผนังเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้ (Manner et al., 1973) และจากการศึกษาในเร็ว ๆ นี้ มีรายงานว่าที่ผนังเซลล์เม็ดเลือดกุ้งมีรีเซ็ปเตอร์ (receptor) ที่จำเพาะสำหรับเบต้ากลูแคน ได้แก่ dectin-1 และ toll-like receptor (TLR)-2 ซึ่งจะกระตุ้น Syk และ Raf-1 การกระตุ้นนี้มีผลต่อกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Goodridge et al. , 2009) จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ในการทดลองนี้ พบว่า กุ้งมีการแสดงออก (up-regulation) ของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* สอดคล้องกับการศึกษา Time series expression ของยีนครัสตินในกุ้งขาว (ขนาด 15-20 กรัม) ที่ได้รับเบต้ากลูแคนที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* (Taito co. Ltd, Tokyo, Japan) 2 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าการแสดงออกของ mRNA ของครัสติน มีการแสดงออกมากที่สุดใน 24 ชั่วโมง และการทดลองของ Rattanachai et al. (2004) ที่ทดลองเสริม peptidoglycan ในอาหารของกุ้ง *Marsupenaeus japonicas* พบการแสดงออกของครัสตินตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 วัน นอกจากนี้ยังการทดลองของ Yu-Chi Wang et al. (2007) ได้ศึกษาการแสดงออกในเวลาที่แตกต่างกันของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในการตอบสนองต่อการได้รับอาหาร β-1 ,3-glucan ที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0%, 0.2% และ 1 %) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่า กุ้งที่ได้รับการเสริมเบต้ากลูแคนเข้าสู่ร่างกาย ไม่มีการแสดงออก (down- regulation) ของยีน *Penaeidin* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องจนถึง 7 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับการเสริมเบต้ากลูแคนเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่องมีแนวโน้มทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น พบว่า มีการแสดงออกของยีน *Penaeidin* (up-regulation) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รวมทั้งจารุวรรณ ชินกร (2550) ได้ศึกษาผลของการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารที่ระดับ 1, 3 และ5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *Penaeidin* มีการแสดงออกอย่างเห็นได้ชัดเจนตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลองและยีนมีการแสดงออกได้สูงที่สุดในวันที่ 14 ของการให้อาหารเสริมเบต้ากลูแคน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

กุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ มีการผลิต *Crustin* และ *LitvanPEN3* เพิ่มขึ้น เมื่อมีการให้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งในการทดลองนี้พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมด้วยเซลล์ยีสต์ในวันที่ 60 และ 90 วันจะเห็นว่าการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ในกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ มี

แนวโน้มเพิ่มขึ้น (up-regulation) มากกว่าวันที่ 40 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีสต์มีการปรับตัวในระยะแรก โดยเมื่อเซลล์ยีสต์เข้าไปในร่างกายของสัตว์น้ำ เซลล์ยีสต์จะมีการปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะต่อมาเซลล์ยีสต์จะเริ่มมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้ รายงานของ Antony et al. (2011) ทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนครัสตินในกุ้งขนาด 20-25 กรัม โดยใช้ 0.2% glucan ที่สกัดจาก *Candida haemulonii* S27 glucan และ *Candida sake* S165 glucan และ 10%(w/w) ของ marine yeast ที่ได้จาก *Candida haemulonii* S27 whole cell และ *Candida sake* S165 whole cell พบว่า มีการเพิ่มผลผลิตของ crustin-like AMP ซึ่งยีสต์ *C. haemulonii* (marine yeast) หรือ whole cell เป็นรูปแบบที่ดีที่สุดของการแสดงออกของยีนAMPs หลังการฉีดเชื้อ WSSV แสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมด้วยยีสต์ทั้งเซลล์ (whole cell) มีประสิทธิภาพการแสดงออกของ AMPs มากกว่ายีสต์สกัด

จากการทดลองผสมเซลล์ยีสต์ในครั้งนี้ยังไม่พบการแสดงออกของยีน *LvALF1* อย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากการติดตามในระยะเวลาที่ห่างกัน ซึ่งจากการทดลองของ นวนิตย์ คล่องแคล่ว (2552) และ Li *et al.* (2008) ได้เสนอแนะอย่างตรงกันว่า การกระตุ้นการแสดงออกของยีน ALF นี้จะเกิดขึ้นในระยะสั้นและหายไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งต้องมีการติดตามระดับชั่วโมง และ Nagoshi *et al.* (2006) ก็ได้รายงานว่ายีน *ALF* มีความแปรปรวนสูง มีการแสดงออกอย่างรวดเร็ว

4.2 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียโปรไบโอติกจากน้ำหมักสับปะรด และ *Bacillus subtilis*

การใช้โปรไบโอติกในรูปแบบต่าง ๆ เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการติดตามการ transcription ของ mRNA ของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* พบว่ากุ้งที่ได้รับแบคทีเรียโปรไบโอติกจากน้ำหมักสับปะรด ในทุกรูปแบบ มีการแสดงออก (up-regulation) ของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* การใช้โปรไบโอติกในปัจจุบันมีส่วนช่วยในการเสริมสุขภาพกุ้งที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ด้านใหญ่ ๆ คือ การทำงานของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ จะเข้าไปแทนที่แบคทีเรียก่อโรค โดยการแย่งอาหาร และหลั่งเอนไซม์ที่ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถลงเกาะที่ผนังเซลล์ของลำไส้ได้ และการทำงานอีกด้านหนึ่งคือ การทำหน้าที่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยเมื่อแบคทีเรีย เข้าสู่ร่างกายกุ้งจะมีการทำงานของโปรตีนกลุ่ม Pattern recognition receptors (PRRs) ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนในกลุ่ม specific pattern recognition proteins (PAMPs) ที่มาจากแบคทีเรีย และต่อมาจะกระตุ้น signaling pathways ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รวมทั้งกระบวนการ phagocytosis, nodule formation, encapsulation และ การสังเคราะห์ของ AMPs ซึ่งจะเห็นได้ว่า การทำงานของ AMP ต้องมีการกระตุ้นด้วยเชื้อต่าง ๆ ที่เซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือดก่อน

จึงจะเกิดกระบวนการในขั้นต้นได้ การศึกษาการใช้โปรไบโอติกในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เริ่มมีการศึกษากันมากขึ้น เช่นการศึกษาของ Swapna *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพ ชนิดครัสติน ในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก กลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Micrococcus* sp. ในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก สามารถกระตุ้นการทำงานของยีนครัสตินให้เพิ่มมากขึ้น เปปไทด์นี้จะทำให้ไวรัสไม่สามารถสังเคราะห์สารพันธุกรรมได้ ส่งผลให้อัตราการตายของกุ้งที่รับเชื้อลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก (2553) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสติน (Crus*Sp*) พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ และการศึกษาของ (Rattanachai *et al*. 2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Crustin-like peptide ในกุ้ง *M. japonicus* จากเม็ดเลือด พบว่ามีลำดับ นิวคลีโอไทด์คล้ายกับ *L. setiferus*, *L. vannamei* และ *C. maenas* ถึง 80%, 80% และ 44% ตามลำดับ จากการตรวจสอบการแสดงออก ด้วยวิธี RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ เม็ดเลือด ตับและตับอ่อน เหงือก ลำไส้ส่วนหน้า ลำไส้ส่วนกลาง กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อใต้เปลือก และรังไข่ พบว่า Crustin ของกุ้งมีการแสดงออกในส่วนเม็ดเลือดเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *Crustin* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ 1, 3 และ 7 วัน หลังให้อาหารที่ผสมเปปติโดกลัยแคน (ส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมบวก)

จากการศึกษาครั้งนี้วันที่ 60 และ 90 กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก มีการแสดงออก (up-regulation) ยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* มากกว่าที่ 40 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นอาจจะมีการปรับตัวเข้าสู่ตัวของกุ้ง โดยระยะแรกจะมีการสะสมอาหาร การปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ในตัวกุ้ง และ เพิ่มจำนวน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) อาจส่งผลให้การแสดงออกของยีนนี้ไม่สูงมากนักในระยะแรกของการได้รับโปรไบโอติก แต่เมื่อมีการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง อาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีจำนวนมากพอ ที่จะช่วยในการกระตุ้นการสร้าง หรือการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ได้ ซึ่งจากการศึกษาของ จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ และคณะ (2553) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมต่อความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้ โดยการเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจวัดการทำงานของภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสในวันที่ 7 และ 14 ของการเลี้ยง พบว่าหลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 7 วัน ไม่มีความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดระหว่างชุดทดลอง หลังจากที่ทดลองเลี้ยงต่อไป 14 วัน พบว่า น้ำมันกระเทียมมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาว การทดลองในครั้งนี้อาจเสนอแนะได้ว่า ถ้า

ต้องการส่งเสริมให้มีการทำงานของเปปไทด์ชนิด *Crustin* และ *LitvanPEN3* ควรมีการใช้โปรไบโอติกอย่างต่อเนื่อง

จากการหมักแบคทีเรียโปรไบโอติก พบแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด 3 กลุ่ม (ยังไม่ได้จำแนกชนิด) ซึ่งจากการศึกษาของ Enujiugha (2009) พบว่ากุ้งกุลาดำ ขนาด 10-12 กรัม ที่ได้รับอาหารผสมเชื้อแบคทีเรียที่หลากลายชนิด (*B. subtilis*, *Micrococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp.) สามารถกระตุ้นปริมาณเม็ดเลือดรวม กระบวนการฟาโกไซโทซีส และการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์ได้มากขึ้น รวมทั้งการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มวิบริโอ ก็เพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้อาจเป็นเพราะว่าสับปะรดประกอบไปด้วยสารอาหารที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น มีวิตามินซีและวิตามินบีสูง และที่สำคัญมีเอนไซม์ บรอมีเลน (Bromelain) ช่วยยับยั้งการอักเสบ มีฤทธิ์ช่วยในระบบการย่อยอาหาร สามารถย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง ช่วยลดหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่มวิบริโอได้ดี ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำพาสารอาหาร เข้าสู่เนื้อเยื่อในร่างกาย นอกจากนี้สับปะรด ยังประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน แมงกานีส ปริมาณมาก (ชัยวุฒิ สุดทองคง, 2556) การทดลองนี้พบว่า การใช้แบคทีเรียที่หลากหลายชนิดมีแนวโน้มให้ผลในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าเชื้อเดี่ยว (*Bacillus subtilis*) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้การแสดงออกของยีนที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม

แต่จากการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่ากุ้งทดลองในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสูงที่สุดถึง 91% ในขณะที่กุ้งที่ได้รับแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ได้จากการหมัก และเชื้อเดี่ยว *Bacillus subtilis* มีอัตราการตายสะสม 26% และ 22% เท่านั้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียจากน้ำหมักสับปะรดและเชื้อเดียว *Bacillus subtilis* มีความต้านทานต่อการติดเชื้อได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม antimicrobial peptide มีการผลิตในนิวเคลียสของเม็ดเลือดและหลั่งออกมาที่น้ำเลือดกุ้งตลอดเวลา ถ้ามีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าต่าง ๆ แต่จะทำงานได้หรือไม่นั้น ต้องมีการทดสอบ หรือมีการศึกษาด้าน Proteomic เพื่อศึกษาถึงการทำงานของเพ็บไทด์เหล่านี้ต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และแบคทีเรียโปรไบโอติก สามารถส่งเสริมสุขภาพในกุ้งที่เลี้ยงได้ ถึงแม้ว่าในแต่ละชุดทดลองการแสดงออกของยีนไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ซึ่งให้ผลไม่สอดคล้องกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ เป็นไปได้ว่าการเลี้ยงในบ่อดินมีปัจจัยต่าง ๆ มากมาย ที่เป็นตัวกำหนดภาวะสุขภาพของสัตว์น้ำ รวมทั้งอีกทั้งกุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ การที่กุ้งมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในระหว่างการเลี้ยง ตลอดระยะเวลาที่ 100 วัน การจัดการฟาร์มในรูปแบบต่าง ๆ ในระหว่างการเลี้ยง อาจมีผลต่อระดับ antimicrobial peptide ชนิดต่าง ๆ ได้ ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกแต่ละชนิด สิ่งที่ต้อง

คำนึงถึงคือ งบประมาณ ความสะดวกในการใช้ วัตถุดิบในท้องถิ่นนั้น ๆ ด้วย แต่อย่างไรก็ตามต้องระวังการปนเปื้อนจากแบคทีเรียตัวอื่นที่จะเกิดขึ้นจากการหมัก ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.8-4.0 เท่านั้น

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระดับฟาร์ม 1 มื้อ/ สัปดาห์ ยังให้ผลที่ไม่ชัดเจน ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่ากุ้งที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและแบคทีเรียโปรไบโอติกมีความต้านทานเชื้อได้ดีว่ากุ้งในบ่อควบคุม

2. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้องมีการใช้อย่างต่อเนื่อง จึงจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งได้

3. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และแบคทีเรียโปรไบโอติก ควรพิจารณาถึงต้นทุนการผลิต

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นวิธีการหนึ่งในการจัดการสุขภาพ การเพาะเลี้ยงกุ้งต้องอาศัยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาเลี้ยง

2. ผลการทดลองในครั้งนี้ถูกทดลองในกุ้งขาว ที่เลี้ยงในความเค็ม 15 ppt อุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 25-27 °C มีการจัดการฟาร์ม และคุณภาพน้ำ เพื่อให้กุ้งได้ผลผลิต และมีการเสริมเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียโปรไบโอติก สัปดาห์ละ 1 มื้อ เท่านั้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 100 วัน กุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ย 21 กรัม เมื่อมีการทดลองในเงื่อนไขอื่น ๆ การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide อาจเปลี่ยนแปลงไป

6. ผลผลิต

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ: *อยู่ในระหว่างการดำเนินงาน*

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2557A10802191 สัญญาเลขที่ 2/2558

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ “การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ”

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. มลฤดี สนธิ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง กันยายน พ.ศ. 2558

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	345,000	เมื่อ กุมภาพันธ์ 2558
งวดที่ 2 (40%)	276,000	เมื่อ มิถุนายน 2558
งวดที่ 3 (10%)	69,000	เมื่อ กันยายน 2559
รวม	690,000 บาท	

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	69,000	69,000	0
2. ค่าจ้าง	114,000	114,000	0
3. ค่าสารเคมี วัสดุสิ้นเปลือง	358,000	358,000	0
4. ค่าใช้สอย และวัสดุต่าง ๆ	60,000	60,000	0
5. ค่าไฟฟ้าในบ่อเลี้ยง	20,000	20,000	0
6. ค่าสาธารณูปโภค	69,000	69,000	0
รวม	690,000	690,000	0

(……..)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

เกรียงศักดิ์ พูนสุข, สุทธิพงศ์ อุริยะพงศ์สรรค์, ไพรัตน์ ศรแผลง และพลสัณห์ มหาขันธ์. (2550). แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์*. ปีที่ 17.

เกื้อการุณย์ ครูส่ง. (2554). *การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ CrustinPm1 และ CrustinPm7 จากกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon*. ปัญหาพิเศษ, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์. (2541). *การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิต การใช้และความต้องการ Probiotics ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์*. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ. หน้า 40.

จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และศิริพร สิทธิประณีต. (2553). *การศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพในปูทะเล* (*Scylla paramamosain*). รายงานการวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา.

จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก, ปิติ อ่ำพายัพ, อัญชลี ทัศนาขจร และศิริพร สิทธิประณีต. (2551). *การศึกษาลักษณะสมบัติและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพคัรสตินจากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล* (*Scylla paramamosain*). ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ, เจนจิตต์ คงกำเนิด, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และจิราพร เกษรจันทร์. (2553). *ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว*. งานวิจัย. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง.

จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ, ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และพัชรี ซุ่นสั้น. (2553). *ผลการเสริม Schizochytrium Limacinum* (*D. Honda & Yokochi, 1998*) *ในอาหารต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และความทนทานของกุ้งขาว (Litopenaeus vannamei Boone, 1931)*. การวิจัยประยุกต์. สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา. กรมประมง.

เจนนุช ว่องธวัชชัย. (2547). *ผลของยาและสารเคมีต่อสุขภาพกุ้ง*. ในรายงานการวิจัยเรื่อง " บทวิเคราะห์และ สังเคราะห์งานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย " สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2546. 46-73.

ฉวีวรรณ นาคบุตร. (2555). *หลอดเลือดและส่วนประกอบของเลือด*. วันที่ค้นข้อมูล 02 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.slideshare.net/wan1966/ss-11385965.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2546). *สัตว์น้ำเศรษฐกิจ*. วันที่ค้นข้อมูล 12 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://darawan.awardspace.info/

ชวนพิศ สิทธิมังค์. (2555). *สัตว์เศรษฐกิจ.* วันที่ค้นข้อมูล 12 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://51011811299g7.blogspot.com/2012/04/blog-post_8152.html.

ชัยวุฒิ สุดทองคง. (2556). *การศึกษากลุ่มอาการตายด่วนหรือ EMS ในกุ้งทะเล*. รายงานการวิจัย. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร.

ทัศนีย์ เชื้อทอง. (2539). *โปรไบโอติก.* รายงานประกอบวิชา Advanced in Regulation and Control of Microbial Synthesis. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 68.

ทัศนีย์ พาณิชย์กุล. (2553). *ผลกระทบต่อการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ Plasmodium vivax*. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

ธวัชชัย สันติกุล. (2545). *การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม.* วันที่ค้นข้อมูล 12 กันยายน 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.thaircmsolutions.com

นพวรรณ วรมงคลชัย. (2553). *การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและสมบัติการต้านไวรัสจุดขาวของเพปไทด์ต้านจุลชีพจากกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์. สาขาชีววิทยา. หน้า 122

นิตยา ยิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อารีย์ชน, ชุมพล ศรีทอง และนิติ ชูเชิด. (2549). การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44*. กรุงเทพฯ. หน้า 214-228.

ปริยดานุ์ จารุคม, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, นิติ ชูเชิด และ ชลอ ลิมสุวรรณ. (2551). ผลของ PROMUTASETM 200 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48*. กรุงเทพฯ. หน้า 29-35.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. (2528). *หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์*. หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 2. ภาควิชาสัตวศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. หน้า 576.

พิษณุ วรรณธง, นิวุฒิ หวังชัย, มงคล สมัญญา และชนกันต์ จิตมนัส. (2548). *การเพิ่มศักยภาพการผลิตกุ้งก้ามกรามในเขตภาคเหนือโดยการใช้โปรไบโอติก*. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ยุทธพล คงกระจ่าง และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. (2554). การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และปริมาณเชื้อวิบริโอในกุ้งขาวแวนนาไม. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49*. กรุงเทพฯ. หน้า 400-407.

รัชนีวรรณ ทวีแก้ว. (2549). *เทคนิค PCR. วิทยาไวรัสเบื้องต้น*. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

แลบ อินเตอร์. (2556). *ศูนย์ข้อมูลกุ้ง สไตล์ไทยแท้.* วันที่ค้นข้อมูล 20 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.shrimpcenter.com/page0015.html.

วรรณพร ฮุ้ยสกุล, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และกัญญา ปัญญาชาติรักษ์. (2549). *ผลของโปรไบโอติก Lactobacillus* spp. *ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด*. ปัญหาพิเศษ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณิภา เพี้ยงภักตร์. (2539). *การใช้แบคทีเรียในอาหารกุ้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วลัยพร ทิมบุญธรรม, มังกร โรจน์ประภากร, สุริยา สาสนรักกิจ, เสรี เจริญกิจมงคล และเปรมสุดา สมาน. (2544). การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39*. กรุงเทพฯ. หน้า 370-377.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อารีย์ชน. (2550). ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำจากแหล่งธรรมชาติ ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45*. กรุงเทพฯ. หน้า 166-173.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และเปรมสุดา สมาน. (2538). จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งทะเล. *วารสารวาริชศาสตร์*. 1(2). หน้า 210.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ: *มหาวิทยาลัย*เกษตรศาสตร์.

อีสท์เอเชียอควาคัลเจอร์ จำกัด. (2556). *จุลินทรีย์โปรไบโอติก.* วันที่ค้นข้อมูล 28 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://www.eastasiaaquaculture.com/

อุทัย เก้าเอี้ยน. (2549). *โปรไบโอทิคส์.* บทความปริทัศน์. สงขลานครินทร์เวชสาร. สงขลา. 24(4). หน้า 315-323.

Alexopoulos C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. New York: Wiley. ISBN 0-471-52229-5.

Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S. and Warr, G.W. (2002). Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol*. 4: 278-93.

Brock, J.A. and Main, K. (1994). A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei*. Honolulu: Makapuu. 234-236.

Pisuttharachai, D., Fernand F. Fagutao, M., Yasuike, H., Aono, Y., Yano, K., Hidehiro K., Takashi A. and Ikuo H. (2009). Characterization of crustin antimicrobial proteins from Japanese spiny lobster *Panulirus japonicas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 1049–1054.

Fuller R. (1992). Probiotic the Scientific Basis. *Chapman & Hall*, London. 398.

Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman R.W. and Warr, G.W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol*. 25: 565-577.

Hauton, C., Brockton V. and Smith, V.J. (2006). Cloning of a crustin-like, single-whey acidicdomain antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, Homarus gammarus, and its response to infection with bacteria. *Mol. Immunol*. 43: 1490-1496.

Jimenez, V.F. and Vargas, A.F. (2005). A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol*. 29: 385-391.

Ji, P.F., Yao, C.L. and Wang, Z.Y. (2009). Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(4), 563-570.

Josephine, A.M., Mizer, H.E. and Wilson, M.E. (1991). Laborotory manual and workbook in microbiology, Application to patient care. 4th Ed Wm. C. publisher.

Kuan, F.L., Chiu, H.C., Shiud, Y.L., Cheng, W. and Chun, H.L. (2010). Effects of the probiotic, Bacillus subtilis E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28, 837-844.

Lehrer, R.I. and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol*. 11: 23-27.

Tonganunt, M., Wongmanee, K., Sartthai, S., Chotigeat W. and Phongdara, A. (2008). Crustin protein Amk1 from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) Inhibits *Vibrio harveyi* and *Staphylococcus aureus. Songklanakarin J. Sci. Technol*, 30 (3), 291-296.

Nauth, K.R. (2004). Yogurt. In Handbook of food and beverage fermentation technology. Hui, Y.H., Goddik, L.M., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W.K., Stanfield, P.S. and Toldra, F. (editors). Marcel Dekker, Inc. New York. pp.125-145.

Qasba PK. and Kumar S. 1997. Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. Crit Rev Biochem Mol Biol 32, 255-306. http://dx.doi.org/10.3109/10409239709082574

Rattanachai, A., Hirono, I., Ohira, T., Takahashi, Y. and Aoki, T. (2004). Molecular cloning and expression analysis of alpha 2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*. 16: 599-611.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271–288.

Smith, V.J., Fernandes, M. O., Kemp, G.D. and Hauton, C. (2007). Crustins enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. Elsevier Editorial System(tm) for Developmental & Comparative Immunology Manuscript Draft. 07, 179.

Stoss, T. D., Nickell, M. D., Hardin, D. Derby, C. D. and Clintock, T. S. (2003). Inducible transcript expressed by reactive epithelial cells at sites of olfactory sensory neuron proliferation. *J. Neurobiol*. 58: 355-368.

Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki T. and Tassanakajon, A. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis. Aquat. Org*. 61: 123-135.

Swapna, P., Singhb, B., Sudheerb, N.S., Vrindab, S., Priyajab, P. and Philip, R. (2011). Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*, 216, 184–194.

Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P. and Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology.* 34, 954–967.

Tomasinsig, L. and Zanetti, M. (2005). The cathelicidins: structure, function and evolution. Curr. *Prot. Pept. Sci*. 6: 23-34.

Vargas, A.F. (1995). The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol*. 3:153-156

Vargas, A.F., Vega, F.J., and Soderhall, K. (1996). A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaues californiensis*) which enhance the activation of prophenoloxidase system by 1, 3-glucan. *Dev. Comp. Immunol*. 20: 299-306.

Wang, Y.C., Chang, P.S. and Chen, H.Y. (2007). Tissue expressions of nine genes important to immune defence of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei. Fish & Shellfish Immunology*, 23, 1161-1177.

ภาคผนวก ก

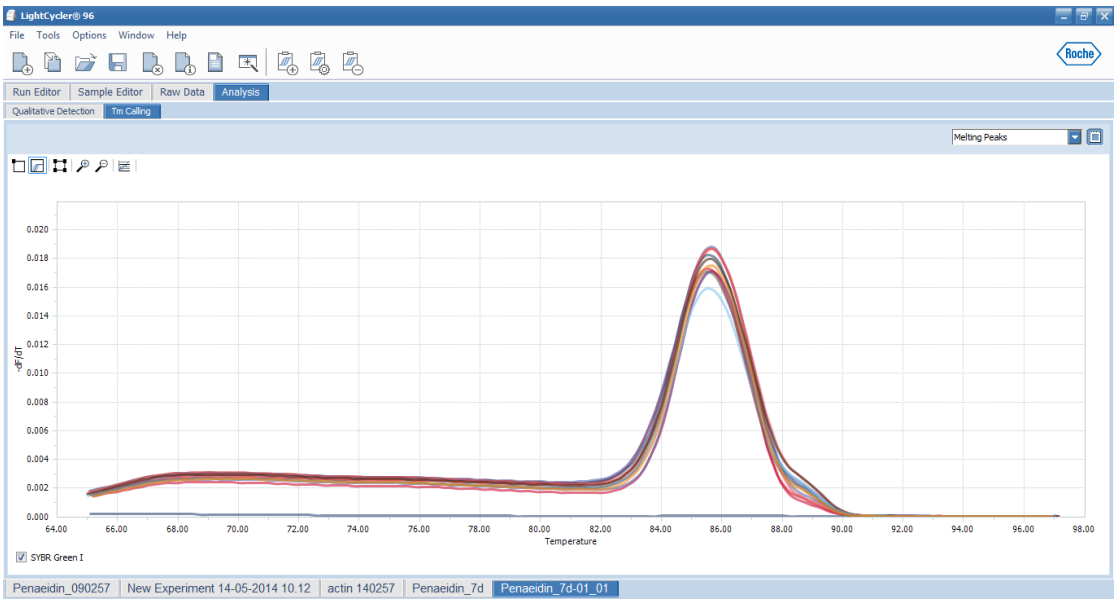
ลักษณะโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1 และตัวอย่างการคำนวณข้อมูลโดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)

ภาคผนวก ค

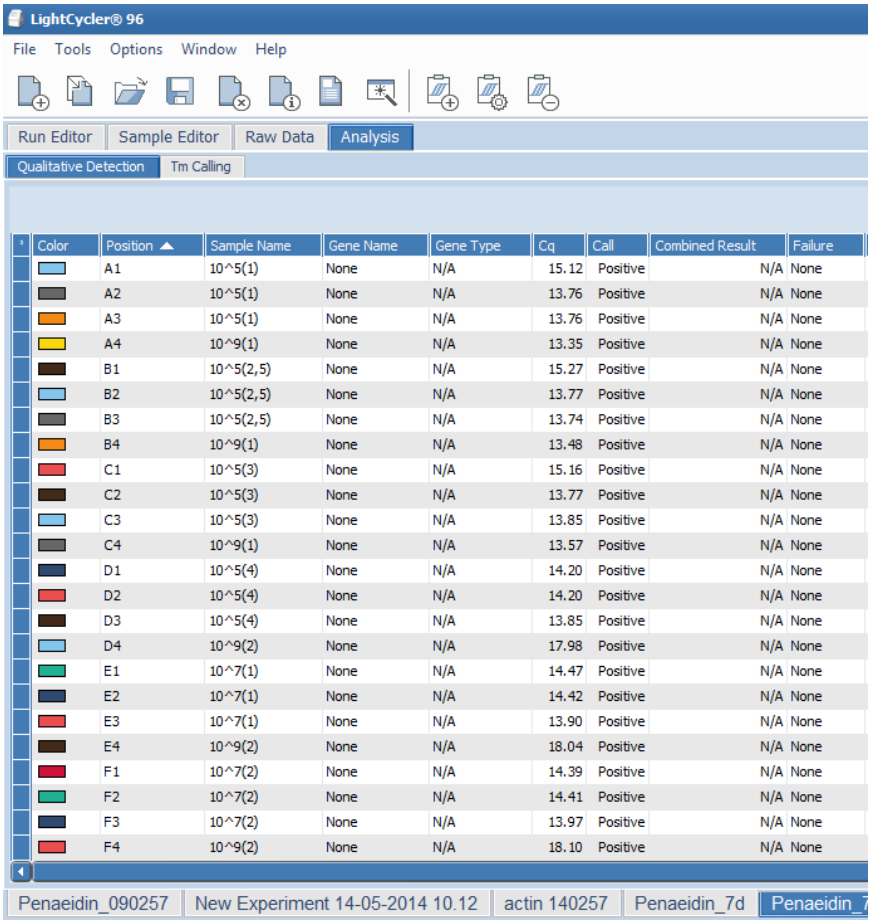
ลักษณะโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1 และตัวอย่างการคำนวณข้อมูลโดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)

ภาพที่ ก-1 LightCycler®96 SW1.1

ภาพที่ ก-2 กราฟแสดงจำนวนของ product ที่เกิดจากการส่งสัญญาณของ SYBR Green I dye เมื่อมีการเพิ่มของ product (รูป S shape) ซึ่งจะเปิดแสดงบนโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1



ภาพที่ ก-3 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting peaks ของ PCR product แต่ละตัว ซึ่งจะเปิดแสดงบนโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1



Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result	Failure
	A1	10^5(1)	None	N/A	15.12	Positive	N/A	None
	A2	10^5(1)	None	N/A	13.76	Positive	N/A	None
	A3	10^5(1)	None	N/A	13.76	Positive	N/A	None
	A4	10^9(1)	None	N/A	13.35	Positive	N/A	None
	B1	10^5(2,5)	None	N/A	15.27	Positive	N/A	None
	B2	10^5(2,5)	None	N/A	13.77	Positive	N/A	None
	B3	10^5(2,5)	None	N/A	13.74	Positive	N/A	None
	B4	10^9(1)	None	N/A	13.48	Positive	N/A	None
	C1	10^5(3)	None	N/A	15.16	Positive	N/A	None
	C2	10^5(3)	None	N/A	13.77	Positive	N/A	None
	C3	10^5(3)	None	N/A	13.85	Positive	N/A	None
	C4	10^9(1)	None	N/A	13.57	Positive	N/A	None
	D1	10^5(4)	None	N/A	14.20	Positive	N/A	None
	D2	10^5(4)	None	N/A	14.20	Positive	N/A	None
	D3	10^5(4)	None	N/A	13.85	Positive	N/A	None
	D4	10^9(2)	None	N/A	17.98	Positive	N/A	None
	E1	10^7(1)	None	N/A	14.47	Positive	N/A	None
	E2	10^7(1)	None	N/A	14.42	Positive	N/A	None
	E3	10^7(1)	None	N/A	13.90	Positive	N/A	None
	E4	10^9(2)	None	N/A	18.04	Positive	N/A	None
	F1	10^7(2)	None	N/A	14.39	Positive	N/A	None
	F2	10^7(2)	None	N/A	14.41	Positive	N/A	None
	F3	10^7(2)	None	N/A	13.97	Positive	N/A	None
	F4	10^9(2)	None	N/A	18.10	Positive	N/A	None

ภาพที่ ก-4 แสดงค่า Cq ในโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1

ตารางที่ ก-1 การคำนวณข้อมูลจากโปรแกรม LightCycler®96 SW1.1 โดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)

	Name	Cq_PEN.	Cq_actin	Δcq	ΔΔcq=Δcq-mean	2^-ΔΔcq	Each pool-mean	SD	Pool-Mean	SD
2	10^5(1),2	13.58	15.55	-1.97	0.61	0.66	0.66	7.62	0.62	0.07
3	10^5(1),2	13.64	15.47	-1.83	0.75	0.60				
4	10^5(1),2	13.36	15.45	-2.09	0.49	0.71				
5	10^5(2)	12.50	14.45	-1.95	0.63	0.65	0.64	0.11		
6	10^5(2)	12.36	14.52	-2.16	0.42	0.75				
7	10^5(2)	12.79	14.44	-1.65	0.93	0.53				
8	10^5(5)	11.75	13.50	-1.75	0.83	0.56	0.58	0.02		
9	10^5(5)	11.74	13.59	-1.85	0.73	0.60				
10	10^5(5)	11.87	13.61	-1.74	0.84	0.56				
11	10^7(1)	12.98	14.61	-1.63	0.95	0.52	0.47	0.05	0.46	0.14
12	10^7(1)	13.14	14.50	-1.36	1.22	0.43				
13	10^7(1)	13.04	14.49	-1.45	1.13	0.46				
14	10^7(2)	12.66	14.23	-1.57	1.01	0.50	0.60	0.11		
15	10^7(2)	12.49	14.30	-1.81	0.77	0.59				
16	10^7(2)	12.30	14.38	-2.08	0.50	0.71				
17	10^7(4)	12.36	13.27	-0.91	1.67	0.32	0.30	0.04		
18	10^7(4)	12.35	13.32	-0.97	1.61	0.33				
19	10^7(4)	12.74	13.35	-0.61	1.97	0.26				

<u>วิธีการคำนวณ</u>

(1) □cq = Cq of Penaeidin – Cq of beta actin (gene reference)
(ค่า Cq มาจาก โปรแกรม LightCycler®96 SW1.1)

(2) □□cq = □cq – mean □cq of control

(3) จากนั้นคำนวณโดยสูตร $2^{-\Delta\Delta cq}$

(4) นำค่าเฉลี่ยแต่ละ pool ของแต่ละชุดการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย (Each pool-mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD)

(5) นำค่าเฉลี่ยของทุก pool ในชุดการทดลองเดียวกันมาหาค่าเฉลี่ย(Pool-Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) จากนั้นใช้ค่าสุดท้ายไปพลอตกราฟ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษา