

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งขาวแวนนาไม (ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Litopenaeus vannamei* , Boone 1993) เป็นกุ้งประจำถิ่นของทวีปอเมริกา พบแพร่กระจายในบริเวณมหาสมุทรแปซิฟิก เป็นกุ้งที่อยู่ในความต้องการของตลาดโลก ทำให้มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญในหลายประเทศไม่เว้นแม้แต่ประเทศไทย โดยกุ้งขาวแวนนาไมถูกนำมาเลี้ยงในทวีปเอเชียครั้งแรกในปี พ.ศ.2539 ที่ประเทศไต้หวัน และเริ่มแพร่ขยายการเพาะเลี้ยงไปในหลายๆประเทศของทวีปเอเชีย (ประจวบ หล้าอุบล, 2537) แต่ปัจจุบันจากสถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ปี 2555 มีการลดผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ทำให้ราคากุ้งปรับตัวสูงขึ้น ส่งผลต่อราคากุ้งในปี 2556 เนื่องจากการเกิดปัญหาการระบาดของโรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome , EMS) ในกุ้งขาวแวนนาไมบริเวณพื้นที่เลี้ยงภาคตะวันออก และบางส่วนของภาคใต้ (ณาตยา ศรีจันทิก, 2555)

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาว ยังคงประสบปัญหาการระบาดของโรคอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิต และได้ผลตอบแทนที่ไม่คุ้มค่ากับการลงทุน โรคระบาดจากโรคติดเชื้อชนิดต่างๆ เช่น โรคที่เกิดจากไวรัส ได้แก่ โรคทอราซินโดรม (Taura Syndrome Virus, TSV) โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Disease, WSD) และโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โรคขี้ขาว (White feces syndrome) โรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome, EMS) และในบางครั้งตายแบบไม่ทราบสาเหตุหรือคุณภาพน้ำ ทำให้เกษตรกรแก้ปัญหาด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ เกิดปัญหาสารตกค้าง ทั้งในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดการต่อต้านเชื้อที่ก่อโรคซึ่งจะยากต่อการควบคุมรักษา และการให้วัคซีนในกุ้งพบว่า ยังไม่มีความเป็นไปได้ เพราะกุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจง

ในปัจจุบันจึงมีการหันมาสนใจเกี่ยวกับการใช้สารเสริมสุขภาพ หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ซึ่งสารเหล่านี้จะเข้ามามีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำให้กุ้งพร้อมที่จะรับมือกับเชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอม (Rowley *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2003) ได้ในขณะที่เลี้ยงในบ่อกุ้ง จึงมีการศึกษาค้นคว้าแนวทางการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้วยการใส่สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลากหลายอย่าง เช่น เบต้ากลูแคน(β -glucan) ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide : LPS) และเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan : PG) เป็นต้น (ปริญญ์ จารุคม และคณะ, 2553) มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อโรคได้ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

immunity) แบบไม่จำเพาะเจาะจง(non-specific immunity) ซึ่งพารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกันที่สามารถนำมาใช้ในการเป็นตัวบ่งชี้ระดับของสุขภาพกุ้ง 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 และมีกลไกการทำงานคล้ายกับยาปฏิชีวนะแต่ไม่ได้มีการตกค้างในสัตว์น้ำ เปปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในกุ้ง ได้แก่ ครัสติน (crustin) ไลโซไซม์ (lysozyme) แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopolysaccharide factor, ALF) และเพนียดิน (penaeidin, PEN) เป็นต้น (นพวรรณ วรมงคลชัย, 2553)

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดครัสติน (crustin) เพนียดิน (PEN) และแอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (antilipopolysaccharide factor, ALF) ในเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน เซลล์ยีสต์ และจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเบต้ากลูแคน ยีสต์เซลล์ (whole cell yeast) และ โปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ ที่ผสมอาหารให้กุ้งกิน โดยติดตามการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides)

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ ประกอบด้วย 3 กลุ่ม หลัก ๆ ได้แก่ anti-lipopolysaccharide factors (ALFs), ครัสติน (crustins) และ เพนียดิน (penaeidins) ในกุ้งขาวที่ตอบสนองออกมา ภายหลังการได้รับเบต้ากลูแคน ยีสต์เซลล์ (whole cell yeast) และจุลินทรีย์โปรไบโอติก จากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกษตรกรเลือกใช้ ได้แก่:

- โพรไบโอติกจากน้ำหมัก ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ชนิดต่าง ๆ เช่น *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp.
- สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น ผลิตภัณฑ์จากยีสต์ เบต้ากลูแคน

แนวคิดในงานวิจัย:

1. โพรไบโอติกชนิดใด ที่มีประสิทธิภาพในการสนับสนุนให้กุ้งขาว มีการหลั่งของ antimicrobial peptide ชนิดต่าง ๆ ได้ดีที่สุด ทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะของการติดเชื้อ
2. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือผลผลิตที่มาจากยีสต์ ชนิดใดที่มีประสิทธิภาพในการสนับสนุนให้กุ้งขาว มีการหลั่งของ antimicrobial peptide ชนิดต่าง ๆ ได้ดีที่สุด ทั้งกุ้งในสภาวะปกติ และสภาวะของการติดเชื้อ

การประยุกต์ใช้งานวิจัย:

1. เป็นการทดสอบ และยืนยัน การใช้โพรไบโอติก หรือเชื้อที่มีประโยชน์ ที่มีประสิทธิภาพจริง ๆ ในการนำมาใช้ในกุ้งขาว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อก่อโรค
2. เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง มีความรู้ และมั่นใจในผลิตภัณฑ์ ที่เลือกใช้ โดยไม่สูญเสียต่อการลงทุนในการใช้ โพรไบโอติก สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โพรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ด้านเศรษฐกิจ:

- เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ได้ความรู้ และทราบถึงชนิดของโปรไบโอติก สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี ที่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้สามารถเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ได้อย่างมั่นใจว่า สิ่ง que เลือกนี้ มีผลต่อการส่งเสริมสุขภาพในกุ้ง และลดการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อได้

2. ด้านวิชาการ:

- นักวิจัยได้รับข้อมูลใหม่ ๆ จากงานวิจัยนี้ และอาจนำไปศึกษาต่อยอดได้
- ผู้ทำวิจัยได้รับความรู้ และประสบการณ์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อการถ่ายทอดประสบการณ์และความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ให้แก่นิสิตในคณะ ที่จะจบออกไปทำงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งก็เป็นการถ่ายทอดความรู้นี้ ไปสู่เกษตรกรอีกช่องทางหนึ่ง

การทบทวนวรรณกรรม

1. ภูมิคุ้มกันกึ่ง และบทบาทของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีต่อกึ่งทะเล

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

การทำงานของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ที่รวมทั้งภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ และภูมิคุ้มกันโดยการหลั่งสารน้ำ ซึ่งการกระตุ้นจะเกิดในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หรือสารในระบบภูมิคุ้มกันไปในทางที่เพิ่มขึ้น (immune-compromise) โดยมีผลต่อการเพิ่มการป้องกันโรค และลดปัจจัยที่มีผลต่อการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ในระหว่างการเลี้ยง (Sakai, 1999)

เมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ก็จะเกิดกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกึ่ง โดยเริ่มจากการจับกันระหว่าง Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) ผ่านตัวรับ Pattern Recognition Proteins (PRPs) หรือ Pattern Recognition Receptors (PRRs) ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถจำแนกได้ว่าสิ่งแปลกปลอมนี้อาจเป็นอันตราย (danger signal) จากนั้นโมเลกุลหรือโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal molecules) จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน เซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในระบบเลือดจะเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม โดยปฏิกิริยา chemotaxis ต่อมาจะเกิดกระบวนการกำจัด หรือทำลายสิ่ง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกึ่งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

แปลกปลอมออกนอกร่างกาย โดยทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือด และสารที่อยู่ในน้ำเลือด (Wang and Wang 2013) เมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง กุ้งก็จะมีภูมิต้านทานต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องเช่นกัน

2. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ ยา สิ่งมีชีวิต สารเคมี หรือสารประกอบใด ๆ ก็ตาม ที่มีผลต่อการตอบสนองของ ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ (Anderson, 1992) วัตถุประสงค์ของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันคือส่งเสริมประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รักษาโรค และเพิ่มระยะเวลาการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งลดผลกระทบของการกดภูมิคุ้มกัน ที่มีสาเหตุมาจากความเครียดในระหว่างเลี้ยง (Barman et al., 2013) การที่สัตว์น้ำมีความแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันโรคสูง จะช่วยลดความเสี่ยงของการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคระบาดในช่วงเวลานั้นได้ มีงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ที่รายงานถึงความสำเร็จของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ เพื่อควบคุมโรค 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 (Tassanakajon et al., 2013) ปัจจุบันมีการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลากหลายรูปแบบ เช่น แบคทีเรียที่ผลิตมาจากเซลล์แบคทีเรีย และสารสกัดที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่ได้จากกระบวนการหมัก (probiotic bacteria)

- Bacterin คือแบคทีเรียที่มีชีวิต แต่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuated bacterin) หรือแบคทีเรียที่ทำให้ตาย (killed bacterin) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้ง นิยมเตรียมมาจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp.) ซึ่งมีรายงานว่าให้ผลดีในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น งานวิจัยของ Pais et al. (2008) พบว่าแบคทีเรียที่เตรียมจากเชื้อ *Vibrio harveyi* สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำได้ นอกจากนี้กุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียที่เตรียมจากเชื้อ

V.alginolyticus มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและกิจกรรมการต้านเชื้อเพิ่มขึ้น (Powell et al., 2011)

- โพลีโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide, LPS) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จากงานวิจัยพบว่า LPS สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในกุ้งได้ โดยผ่านการทำงานของระบบโปรตีนฟีนอลออกซิเดส (Sritunyalucksana et al., 1999) Xian et al. (2009) รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดชนิดซีมิเกรนูลาร์ และเกรนูลาร์ของกุ้งขาวลดลง ภายหลังการได้รับ LPS ซึ่งเป็นผลมาจากการตีเกรนูลชันของเม็ดเลือด ทำให้เกิดการทำงานของระบบโปรตีนฟีนอลออกซิเดสในเวลาต่อมา

- เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan, PG) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้แบบไม่จำเพาะของกุ้งได้ เช่น กุ้ง *Marsupenaeus japonicus* ที่ได้รับ PG ที่สกัดได้จาก *Bifidobacterium thermophilum* ผสมอาหาร มีการแสดงออกของยีน serine protease ในเม็ดเลือดเพิ่มขึ้น (Rattnachai et al., 2005) สำหรับในประเทศไทย มีการทดลองใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกันอย่างแพร่หลาย จากงานวิจัยของ นิตยา ยิมเจริญ และคณะ (2549) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดนี้มีผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) สารประกอบหรืออนุพันธ์ที่ได้จากยีสต์ (yeast derivatives) จากการค้นพบโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ (PRRs หรือ PRPs) ที่มีชื่อว่า β -glucan binding proteins (β GBPs) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Soderhall and Cerenius., 1992) จึงมีการทดลองใช้ยีสต์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากขึ้น นักวิทยาศาสตร์ทั้งในและต่างประเทศประสบผลสำเร็จในการใช้เบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ที่สกัดจากผนังเซลล์ยีสต์ และการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น กุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคนสกัดจากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผสมอาหาร มีภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อ *V. harveyi* และ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) เพิ่มขึ้น (Bai et al., 2014) นอกจากนี้กุ้งกุลาดำที่ได้รับ yeast cell suspension จากยีสต์ทะเล *Candida aquatextoris* S527 ผสมอาหารพบว่าการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพเพิ่มขึ้น (Babu et al., 2013)

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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

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

- แอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นสารสีชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigments) ทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อในร่างกายสัตว์ไม่ให้ถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน จาก หน้าที่ดังกล่าวจึงมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำด้วย กุ้งกุลาดำที่ได้รับแอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* (นนทวิทย์ อาริย์ชน และคณะ, 2549) และ *Dunaliella* sp. (Supamattaya et al., 2005) โดยการผสมอาหาร มีผลทำให้กุ้งมีอัตราการรอด และความต้านทานต่อเชื้อ เพิ่มขึ้น

- กรดอะมิโน (amino acids) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน เป็นสารตั้งต้นของ ปฏิกิริยาต่าง ๆ ทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต การได้รับกรดอะมิโนที่เหมาะสมและเพียงพอ จะช่วย รักษาความสมดุลทางสรีรวิทยาของร่างกายได้ จากงานวิจัย กุ้งขาวที่ได้รับกรดอะมิโนชนิดโพรลีน (proline) (Xie et al., 2012) ไลซีน (lysine) (Xie et al., 2015) และทรีโอนีน (threonine) (Zhou et al., 2013) ด้วยการผสมอาหาร พบว่ามีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น

- แร่ธาตุ (minerals) ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ในการเลี้ยง กุ้งจะมีการเสริมแร่ธาตุในอาหาร ซึ่งนอกเหนือจากการเพิ่มการเจริญเติบโตแล้ว ก็ยังมีรายงานว่า มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอีกด้วย กุ้งที่กินอาหารผสมซิงค์ (zinc) (Shiau and Jiang, 2006) และคอปเปอร์ (copper) (Lee and Shiau, 2002b) มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และการผลิตซูเปอร์ ออกไซด์แอนไอออนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมแร่ธาตุ

4) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) คือคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบกันเป็นสายยาว นักวิทยาศาสตร์ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้โพลีแซคคาไรด์ เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดย จะเข้าจับกับโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ ที่มีชื่อว่า lectin receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Tassanakajon et al., 2013) ตัวอย่างของสารที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ เช่น โคลดินและโคโตซาน ที่สกัด ได้จากเปลือกกุ้ง ปู หมึก ซึ่งมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มการเจริญเติบโต (Niu et al., 2013) และ ถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเช่นกัน (Wang and Chen, 2005)

5) สารสกัดจากพืชสมุนไพร และพืช (herbal plant and plant extracts) การทดลองใช้สมุนไพรในการควบคุมโรคภัยประสพผลสำเร็จอย่างดีในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย พืชและสมุนไพรสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โกลเซอริน สารลิควิดิน และกลาบรีดิน รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน น้ำมันหอมระเหย ซาโปนิน และ สารอะซาไคแรคติน ฯลฯ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2013; Hai, 2015) กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมสารสกัดกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียน (*Durio zibethinus*) (Pholdaeng and Pongsamart, 2010) และสาร polyvinylpyrrolidone ที่สกัดได้จากพญาขอ (*Clinacanthus nutans*) (Direkbusarakom et al., 1996) มีภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเพิ่มขึ้น กุ้งขาวที่ได้รับสารกลุ่ม phenolic alkanon ที่สกัดได้จากจิง (*Zingerone officinale*) (Chang et al., 2012) สารซาโปนินที่สกัดจากยัคคา (*Yacca scidigera*) (Yang et al., 2015) และสารสกัดจากว่านป้อมใบม่วง (*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) โพลีแซคคาไรด์ 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)

3. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

จากคุณสมบัติของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่ว่าระยะเวลาของการกระตุ้นมีขีดจำกัด หรือค่อนข้างสั้น ซึ่งต้องมีการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง (Hai, 2015) และการที่กุ้งมีหลายช่วงอายุ ระยะเวลาหรือรูปแบบของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล ก็มักจะมีความถามเกิดขึ้นว่า จะใช้เมื่อไหร่ จะใช้อย่างไร ปริมาณเท่าไร และใช้ระยะเวลานานเท่าใด จึงจะเกิดประสิทธิผลมากที่สุด จากตารางที่ 1 ได้รวบรวมตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ในกุ้ง ซึ่งมีวิธีการใช้ ปริมาณ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

3.1 วิธีการใช้

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปจะใช้เมื่อมีความเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม หรือคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยง และในช่วงที่มีการระบาดของโรค เพื่อเตรียมพร้อมให้กุ้งสามารถรับมือกับเชื้อโรคที่จะเข้ามาในร่างกายได้ตลอดเวลา ในปัจจุบันนี้มีสารประกอบหลายชนิดที่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ วิธีการให้ก็มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน นักวิทยาศาสตร์ได้ทดลองถึงการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่หลากหลายวิธี ได้แก่ การแช่ (immersion) การฉีด (injection) และการกิน โดยผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูป (diet supplementation) และการส่งผ่านอาร์ทีเมีย (via *Artemia*) ซึ่งวิธีที่ใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้ง จะถูกพิจารณา ร่วมกับระยะหรืออายุ และรูปแบบการเลี้ยงด้วย เช่น กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะอนุเพเลียส 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 ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการผลิตอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่มีการสูญเสียไป เช่น อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผลิตมาจากโรงงานโดยตรง เพื่อให้ง่ายต่อการใช้และเป็นมาตรฐานเดียวกัน

3.2 ปริมาณและระยะเวลาที่ใช้

ปริมาณและระยะเวลาของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณสูง-ต่ำเกินไป อาจลดประสิทธิภาพของการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน หรืออาจเกิดการกดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้ (Jian and Wu, 2003) อย่างไรก็ตามผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณ (dose) ที่ใช้ (Harikrishnan et al., 2011) ตัวอย่าง เช่น Pholdaeng and Pongsamart (2010) ศึกษาผลของ polysaccharide gel ที่สกัดจาก

เปลือกทุเรียน โดยการผสมอาหารให้กิ้งกิ้งในระดับ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผลการทดลองพบว่า ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม กิ้งมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตามปริมาณในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้องมีการศึกษาในสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่ละชนิด เพื่อหาระดับที่เหมาะสมที่สุด และสามารถนำมาใช้ได้จริงในระดับฟาร์มต่อไป

ระยะเวลาในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการเลี้ยงกิ้ง และความถี่ต่อการเกิดการระบาดของโรคในระหว่างเลี้ยง (Barman et al., 2013) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระยะเวลาที่ยาวนานอาจลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ รายงานวิจัยในปัจจุบันนอกจากจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณที่ต้องใช้ (dose) แล้ว ก็ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสมอีกด้วย เช่น ทดลองของจันทน์ศิริไพศาล และคณะ (2549) พบว่ากิ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 ก./อาหาร 1 กก. นาน 4 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ให้ 2 และ 3 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และได้เสนอแนะไว้ว่าการให้เบต้ากลูแคน 1 เดือน หยุดให้ 1 เดือน ที่ความเข้มข้นเท่าเดิม จะมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันกิ้งให้สูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง กิ้งกุลาคำที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรให้ทุกวัน การให้ 3 วันต่อครั้ง และ 10 วันต่อครั้ง (Babu et al., 2013)

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ได้ผลดีในกิ้งนอกเหนือจากวิธีการใช้ ระยะเวลาและปริมาณที่ใช้ ต้องคำนึงถึงสภาวะความสมบูรณ์และความแข็งแรงของร่างกายของกิ้งในขณะนั้น อายุของกิ้ง สภาพแวดล้อมที่กิ้งอาศัยอยู่ร่วมด้วย (ชนกันต์, 2013) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นเพียงการส่งเสริมให้กิ้งมีความพร้อมในการป้องกันตัวเอง ซึ่งต้องทำควบคู่ไปกับการจัดการสิ่งแวดล้อมที่ดี การดูแลเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาเลี้ยง

4. เปปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides, AMPs)

เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอย่างเชื้อแบคทีเรีย รา ฟีชี สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไปจนถึงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบว่าสารเหล่านี้มักเป็นสารในระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immunity) มีความสามารถในการเลือกจับ (selectivity) สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง ภายในของสายเปปไทด์มักจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก ซึ่งการมีกรดอะมิโนจำนวนมากนั้นส่งเสริมให้เปปไทด์ต้านจุลชีพมีคุณสมบัติในการเลือกจับกับเซลล์แบคทีเรียผ่านประจุลบของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ที่เซลล์เมมเบรนของเชื้อ ร่วมกับสารบางชนิดที่เชื้อสารขึ้น (สรศักดิ์ อินทรสูติ, 2556)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกิ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

เปปไทด์ต้านจุลชีพเป็นการป้องกันที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันที่ติดตัวมาแต่กำเนิด โดยเฉพาะกุ้ง 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 โครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) และ cationic พวกเขาส่งการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปยังตำแหน่งที่ติดเชื้อ (Brogden KA., 2005) ในกุ้งสกุล *Penaeus* 4 กลุ่มหลักของ AMP ที่อยู่ในเม็ดเลือด (haemocytes) คือ penaeidins, crustins, anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) และ lysozymes

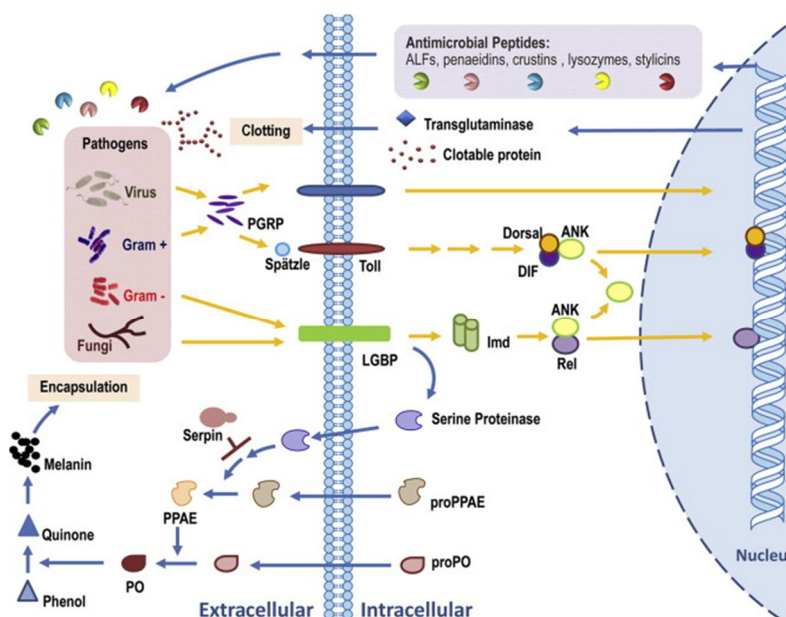
- Penaeidins จะต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive), เชื้อราที่มีเส้นสาย (filamentous fungi) (Destoumieux *et al.*, 1999) ไวรัส (viruses) และ โปรโตซัว (protozoans) (Bachere *et al.*, 2003)

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

- Crustins มีผลกระทบต่อแบคทีเรียแกรมบวกในทะเล (Zhang *et al.*, 2007; Relf *et al.*, 1999; Bartlett *et al.*, 2002) เป็นกลุ่มที่กระจายอย่างกว้างขวางของ AMP 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 ของครัสตาเซียน

AMPs เหล่านี้เป็นการสังเคราะห์ซึ่งมีบทบาทสำคัญและถูกเก็บอยู่ในเม็ดเลือด (haemocytes) และ AMPs จะถูกปล่อยออกมาจากเม็ดเลือดด้วยการชักนำโดยการติดเชื้อของแบคทีเรีย (Munoz *et al.*, 2002; Soderhall *et al.*, 1998; Bachere *et al.*, 2000) AMPs จะสังเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้การเผาผลาญที่ต่ำ ที่จัดเก็บไว้ได้อย่างง่ายดายจำนวนมาก และพร้อมใช้งานในไม่ช้าหลังเกิดการติดเชื้อ ฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วในช่วงกว้าง (Hancock, 1997, 2001; Prenner *et al.*, 1999) เนื่องจาก AMPs มีขนาดเล็ก มีโครงสร้าง amphipathic และมีลักษณะ cationic AMPs สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วในตำแหน่งที่ติดเชื้อ (Brogden, 2005) AMPs สามารถฆ่าแบคทีเรียในความเข้มข้นไมโครโมล (micromolar) สัมผัสบนกลไกที่ไม่พึ่งตัวรับ (non-receptor) เป็นวิธีของ AMPs ซึ่ง AMPs จำนวนมาก แสดงความจำเพาะที่โดดเด่นสำหรับ prokaryotes และเป็นพิษสำหรับ eukaryotic ปรัชญาการนี้ เป็นสิ่งที่สนับสนุนในการค้นคว้า AMPs และการแสวงหาผลประโยชน์เป็นยาปฏิชีวนะใหม่ที่มีศักยภาพ (Zasloff, 1992) **ภาพที่ 1-1**

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ



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

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

Family	Isoform	Antimicrobial activity	Other activity
Crustins	CruFc	Gram-positive bacteria	Agglutination
	Fc-crus 2	Gram-positive bacteria	
	Fc-crus 3	Gram-positive bacteria	
	crustinPm1	Gram-positive bacteria	
	crustinPm5	Gram-positive bacteria	
	crustinPm7	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	Agglutination Protease inhibitory activity against subtilisin A and protein K Protease inhibitory activity against subtilisin A
	SWDFc	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; Fungi	
	SWDPm	Gram-positive bacteria	
	CruslikeFc1	Gram-positive bacteria	
Penaeidin	LitvanPen2	Gram-positive bacteria; Fungi	Cytokine
	LitvanPen3	Gram-positive bacteria; Fungi	
	LitvanPen4	Gram-positive bacteria; Fungi	
	FenchPen5	Gram-negative bacteria; Gram-positive bacteria; Fungi	
	PenmonPen	Gram-positive bacteria	
	PenmonPen3	Gram-positive bacteria; Fungi	
	PenmonPen5	Gram-positive bacteria; Fungi; virus	
Lysozyme	<i>P. vannamei</i>	Gram-negative bacteria	
	<i>M. japonicus</i>	Gram-negative bacteria	
	<i>F. chinensis</i>	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
	<i>P. monodon</i>	Gram-negative bacteria	
	<i>F. merguensis</i>	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
	<i>L. styllostis</i>	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
	ALFPm2	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria	
Antilipopolysaccharide factors	ALFPm3	Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; Fungi; virus	LPS and LTA binding activity
	LsALF1	Virus	LPS neutralizing activity
	MjALF1		

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกึ่งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส

ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

4.1 เปปไทด์ต้านจุลชีพชนิดครัสติน (Crustin)

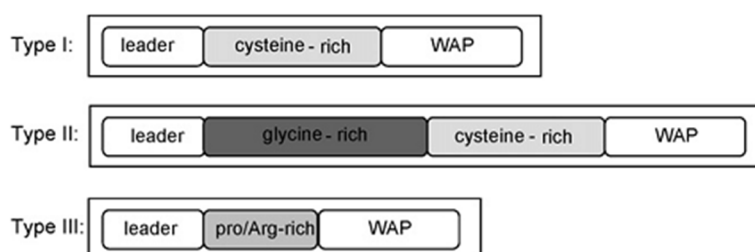
ครัสตินเป็นเปปไทด์ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ลักษณะมี cysteine-rich (12 cysteines) บริเวณ C-terminal ซึ่งประกอบด้วย WAP domain และมีบริเวณอนุรักษ์กรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวน 8 ตัว ซึ่งสามารถสร้าง 4 พันธะไดซัลไฟด์ เปปไทด์ครัสตินถูกจำแนกได้ 3 ชนิด (Smith *et al.*, 2008) ครัสตินทุกชนิดจะประกอบไปด้วย N-terminal signal sequence และ C-terminal WAP domain ซึ่ง WAP domain พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง และ WAP domain มีหน้าที่ทางชีวภาพหลายชนิด ซึ่งมีทั้งสมบัติการต้านทานจุลชีพ (antimicrobial) และการยับยั้งโปรตีนเนส (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 II อาจจะเกี่ยวข้องกับ tran-membrane domain (Bartlett *et al.*, 2002) และ type 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) ครัสตินจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่หลากหลาย ภาพที่ 2-5



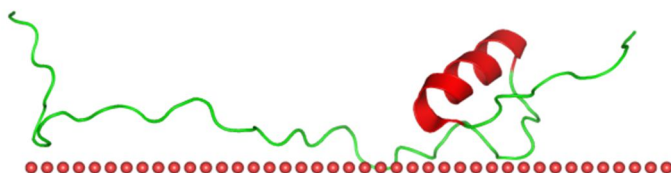
ภาพที่ 1-2 ชนิดของครัสติน

ที่มา : Jessica *et al.*, (2009)

ครัสตินจัดเป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพประเภทหนึ่งที่พบในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสัตว์จำพวกกุ้ง (crustacean) มีการศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของครัสตินพบว่า crustinPm1 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดี ในขณะที่ crustinPm7 สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งทั้งสองแบบของครัสติน พบในเม็ดเลือด (haemocyte) ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) การต้านเชื้อแบคทีเรียของครัสตินจะอาศัยความสามารถของตัวกุ้ง ครัสตินจะไปเกาะติดเซลล์แบคทีเรียและทำให้เสียระบบที่เหมาะสมทางกายภาพเคมีของผิวภายนอกแบคทีเรีย (Pasapong *et al.*, 2012)

4.2 เปปไทด์ด้านจุลชีพชนิด Penaeidin

Penaeidin, PEN เป็นเปปไทด์ด้านจุลชีพ ซึ่งพบเฉพาะในกุ้งตระกูล Penaeidae 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 ส่วนใหญ่ๆ คือ 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 เนื้อเยื่อได้เปลือก และลำไส้ส่วนท้าย และยังพบว่าการแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของลำไส้ส่วนกลาง และกล้ามเนื้อ โดยไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในส่วนของลำไส้ส่วนหน้า นอกจากนี้ยังพบ penaeidin mRNA ในเซลล์ระยะ Postlarva สูงกว่า Nauplius I (9 ชั่วโมงหลังจากฟักเป็นตัว) และสูงกว่าระหว่างระยะลอกคราบ แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงมีการพัฒนาที่

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ระยะลอกคราบนี้(จารูวรรณ ชินกร, 2550)เช่นเดียวกับ Munoz *et al.* (2002) ได้รายงานผลการศึกษา การแสดงออกของยีน และการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อต่างๆ ต่อการต้านทานเชื้อโรค แสดงให้เห็นว่า การหลั่ง Penaeidin จะถูกควบคุมจากเม็ดเลือดชนิด Large granulocytes โดยจะมีการสร้างออกมา และแพร่กระจายไปตามกระแสเลือดและแทรกในเนื้อเยื่อของกุ้ง โดยมี 2 ขั้นตอนที่เกิดขึ้น คือขั้น แรกเม็ดเลือดเคลื่อนตัวไปที่บริเวณติดเชื้อภายใน 12 ชั่วโมงแรก ไปรวมตัวกันมากขึ้นแล้วหลั่ง Penaeidin ออกมา ต่อมาเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนเลือดและในเนื้อเยื่อจะเพิ่มการสร้าง Penaeidin ซึ่งอาจจะเกิดการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือด สุดท้ายเมื่อเม็ดเลือดพบกับแบคทีเรียจะทำให้เกิดการ ทำงานของ Penaeidin โดยจะทำให้เกิดการแตกของเซลล์ของเชื้อโรค นอกจากนี้ยังพบว่า Penaeidin ยังทำหน้าที่จับกับแบคทีเรีย เพื่อกระตุ้นให้เกิด Opsonic activity ในที่สุด

4.3 เปปไทด์ต้านจุลชีพชนิด Anti-lipopolysaccharide factor (ALF)

แอนติไลโปพอลิแซ็กคาไรด์แฟกเตอร์ (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 โดยสามารถจับ กับ Endotoxin ที่เป็นส่วนประกอบของ Lipopolysaccharide (LPS) ที่ผนังเซลล์แล้วจัดพิษของ Endotoxin ได้ (Morita *et al.*, 1985) แต่ในบางครั้งยังพบว่า ALF สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราเส้นใยได้อีกด้วย (Somboonwivat *et al.*, 2005) และยังมีความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าไปใน ร่างกายได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย (Li *et al.*, 2008) ยีน ALF มีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก และลำไส้ (Liu *et al.*, 2005)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งขาว ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน และเซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

2.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวที่มีสุขภาพแข็งแรงขนาด 8-13 กรัม และให้ผลลบการตรวจโรคไวรัสด้วยเทคนิค PCR มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 1,000 ลิตร (1 ตัน) ภาพที่ 2-1 โดยแบ่งใส่ 15 ถัง ถึงละ 80 ตัว ควบคุมคุณภาพน้ำให้มีความเค็มอยู่ที่ 20-22 พีพีที ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ไม่น้อยกว่า 4.5 พีพีเอ็ม อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ที่ 7.5-8.5 ค่าแอมโมเนียไม่ควรเกิน 1 พีพีเอ็ม ค่าไนไตรท์ไม่ควรเกิน 0.5 พีพีเอ็ม และ ค่าอัลคาไลน์อยู่ในช่วง 80-160 พีพีเอ็ม ทุกกลุ่มการทดลอง เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูป 5% ของน้ำหนักตัว วันละ 3 มื้อ เป็นเวลา 5 วัน เพื่อปรับสภาพก่อนทำการทดลอง เมื่อครบ 5 วันในการปรับสภาพและสังเกตพฤติกรรมของกุ้งมีสภาวะปกติในถังทดลอง จึงทำการเริ่มเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง



ภาพที่ 2-1 การออกแบบระบบที่ใช้เลี้ยงกุ้งทดลอง

2.1.2 การเตรียมอาหารทดลอง

(1) นำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากสถาบันวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มาทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์บน haemocytometer หรือ สไลด์นับเม็ดเลือด ภาพที่ 2-2 เพื่อคำนวณเซลล์ยีสต์ใน stock โดยใช้ auto pipette 1 มิลลิลิตร คึงยีสต์ออกมา 100 ไมโครลิตร หรือ 0.1 มิลลิลิตร จากขวด stock ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร ปิด cover glass และค่อยๆ ปล่อยยีสต์ที่คึงมาจาก stock จนเต็มตาราง

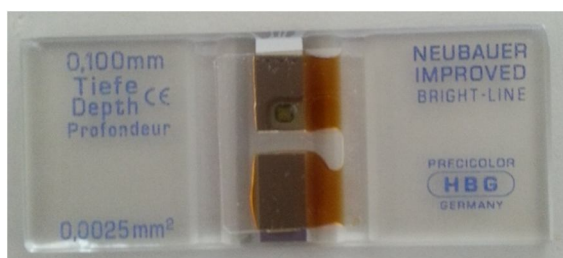
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

นับเซลล์ยีสต์ช่อง W (ช่อง A B C D) ภาพที่ 2-3 จะสามารถคำนวณปริมาตรน้ำได้จาก พื้นที่ตาราง $\times$ ความลึก เมื่อนับจำนวนเซลล์ยีสต์ในตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็จะได้จำนวนยีสต์ต่อปริมาตรน้ำของตารางนั้น จากนั้นคำนวณเป็น จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร

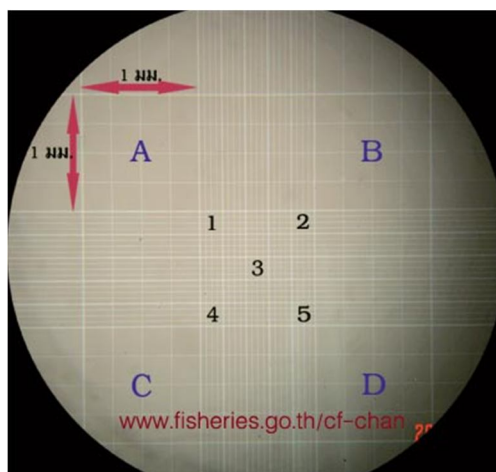
(2) เมื่อกำหนดเซลล์ยีสต์ใน stock โดยเทียบจาก 0.1 มิลลิลิตรที่ทราบจำนวนเซลล์ (cell/ml) จึงทำการเทียบจำนวนเซลล์ยีสต์จาก stock เพื่อต้องการทราบปริมาตรที่มีจำนวนยีสต์ 10^5 , 10^7 , 10^9 เซลล์/ มิลลิลิตร

(3) นำปริมาตรที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ต้องการ ได้แก่ ยีสต์ 10^5 , 10^7 , 10^9 เซลล์นำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส 12,000 G เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บเซลล์ยีสต์ที่ตกตะกอนไว้ใน NaCl 0.85% เก็บแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำไปผสมอาหารให้ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ให้เท่ากันทั้งสามสูตรอาหารยีสต์ (Whole cell)

(4) เตรียมผงยีสต์บริสุทธิ์ 2 กรัม ต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม นำผงยีสต์บริสุทธิ์มาละลายด้วยน้ำ 30 มิลลิลิตร



ภาพที่ 2-2 สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) สำหรับนับจำนวนเซลล์ยีสต์



ภาพที่ 2-3 ตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และ A B C D (ช่อง W)

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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

นำอาหารกึ่งสำเร็จรูปผสมกับยีสต์ ด้วยวิธีสเปรย์ยีสต์ลงบนอาหารกึ่งสำเร็จรูป โดยตรง จากนั้นผสมน้ำมันหมักลงไป 100 มิลลิลิตร ต่ออาหารกึ่ง 1 กิโลกรัม คลุกผสมน้ำมันหมัก จนทั่วอาหาร ผึ่งลมให้แห้งไว้ประมาณ 2 วัน แล้วจึงเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทและห่อภาชนะ ด้วยฟลอยเพื่อไม่ให้อาหารโดนแสง ซึ่งจะมีการเตรียมอาหารสองครั้ง คือ อาหารของ 7 วันแรก และ 7 วันหลัง และนำไปเลี้ยงกุ้งที่ทำการทดลอง

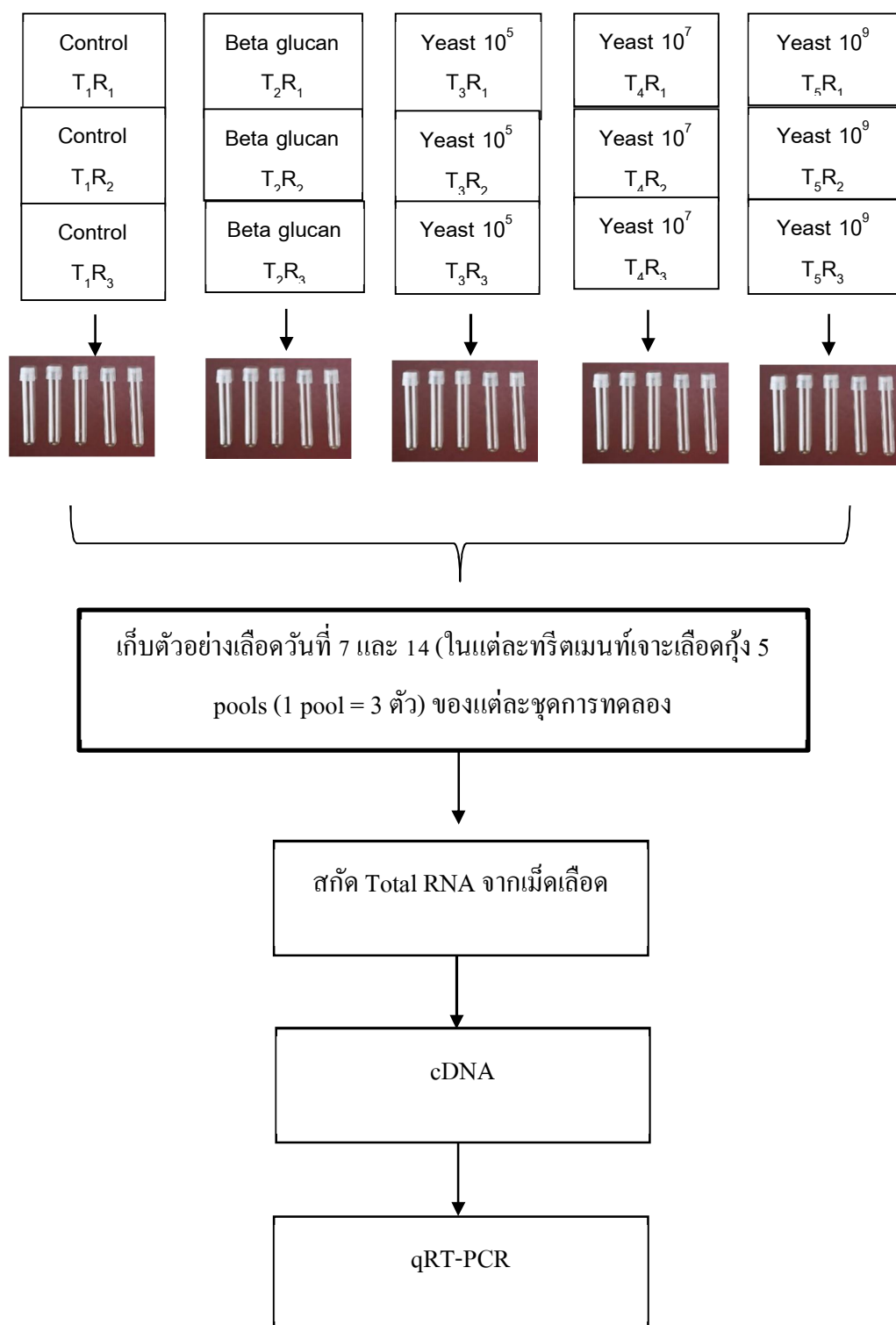
2.1.3 ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพน้ำและปริมาณแบคทีเรียก่อนการเลี้ยงและครบ 7 วัน และ 14 วัน

- (1) เก็บตัวอย่างน้ำในถังเลี้ยง เพื่อให้น้ำทุกถังเลี้ยงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมเท่ากันทุก บ่อ โดยค่าพารามิเตอร์ที่วัด ได้แก่ DO, temperature, pH, ammonia, nitrite, nitrate และ alkalinity
- (2) ตรวจสอบแบคทีเรียวิบริโอในน้ำและในคืบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar) และตรวจสอบสภาพตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- (3) เก็บชิ้นน้ำหนักแห้งของอาหารเหลือ

2.1.4 การออกแบบและการวางแผนการทดลอง

แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มการทดลอง ในแต่ละกลุ่มการทดลองมี 3 ซ้ำ (ภาพที่ 2-4) ดังนี้

- กลุ่มการทดลองที่ 1 อาหารกึ่งสำเร็จรูป เบอร์ 3 ผสมน้ำมันหมัก (ชุดควบคุม)
- กลุ่มการทดลองที่ 2 อาหารกึ่งสำเร็จรูป เบอร์ 3 ผสมยีสต์สกัด (β -glucan) 2 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
- กลุ่มการทดลองที่ 3 อาหารกึ่งสำเร็จรูป เบอร์ 3 ผสมยีสต์จากซานอ้อย 10^5 เซลล์/อาหาร 1 กิโลกรัม
- กลุ่มการทดลองที่ 4 อาหารกึ่งสำเร็จรูป เบอร์ 3 ผสมยีสต์จากซานอ้อย 10^7 เซลล์/อาหาร 1 กิโลกรัม
- กลุ่มการทดลองที่ 5 อาหารกึ่งสำเร็จรูป เบอร์ 3 ผสมยีสต์จากซานอ้อย 10^9 เซลล์/อาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 2-4 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเลือดกึ่งขาวแวนนาไม

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

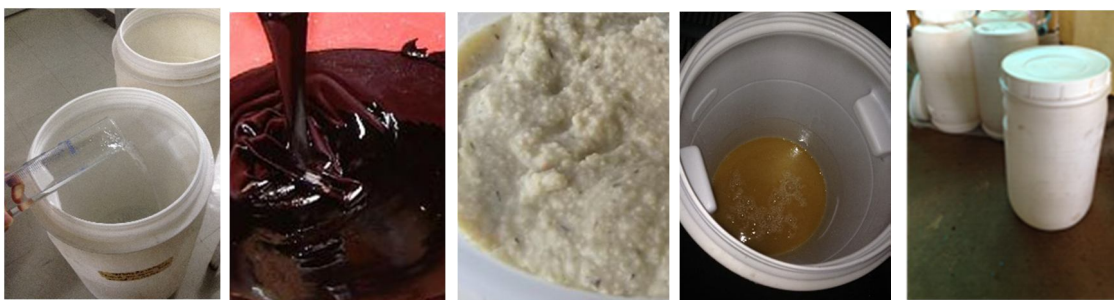
2.2 ศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งขาว ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติกจากน้ำหมัก

2.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวขนาด 8-13 กรัม โดยคัดกุ้งให้มีขนาดเท่าๆกัน ไม่แตก size มาเลี้ยงในบ่อไฟเบอร์ขนาด 1,000 ลิตร (1 ตัน) โดยแบ่งใส่ 12 ถัง ถึงละ 80 ตัว ควบคุมคุณภาพน้ำให้มีความเค็มอยู่ที่ 10-22 พีพีที ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ไม่น้อยกว่า 4.5 พีพีเอ็ม อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ที่ 7.5-8.5 ค่าแอมโมเนียไม่ควรเกิน 1 พีพีเอ็ม ค่าไนไตรท์ ไม่ควรเกิน 0.5 พีพีเอ็ม และค่าอัลคาไลน์อยู่ในช่วง 80-160 พีพีเอ็ม ทุกกลุ่มการทดลอง เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูป 5% ของน้ำหนักตัว วันละ 3 มื้อ เป็นเวลา 5 วัน เพื่อปรับสภาพก่อนทำการทดลอง เมื่อครบ 5 วันในการปรับสภาพและสังเกตพฤติกรรมของกุ้งมีสภาวะปกติในถังทดลอง จึงทำการเริ่มเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก เป็นเวลา 14 วัน

2.2.2 ขั้นตอนการทำน้ำหมักกากถั่วเหลือง

นำถั่วที่มีฝักปิดสนิท เทน้ำกลั่นใส่ถึง 4 ลิตร จากนั้นนำกากถั่วเหลือง 80 กรัม และกากน้ำตาล 12 กรัม เทถึง ใส่โยเกิร์ตธรรมชาติ 2 ถ้วย เพื่อเร่งปฏิกิริยา คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นปิดฝาให้สนิท (ภาพที่ 2-5)



ภาพที่ 2-5 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักกากถั่วเหลือง

2.2.3 ขั้นตอนการทำน้ำหมักสับปะรด

นำน้ำตาลทรายขาว 2 กิโลกรัม ต้มกับน้ำสะอาด 3 ลิตร จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้ ต่อมานำสับปะรดสุกปอกเปลือก และตาของสับปะรดออก เหลือเพียงแต่เนื้อ จากนั้นนำเนื้อสับปะรดมาสับบดละเอียด ประมาณ 10 กิโลกรัม นำส่วนผสมทั้งสองอย่างเทใส่ลงในถังที่มีฝักปิดสนิท ใส่โยเกิร์ตธรรมชาติ 2 ถ้วย และยีสต์ทำขนมปัง 25 กรัม เพื่อ

เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นปิดฝาให้สนิท (ภาพที่ 2-6)



ภาพที่ 2-6 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมักสับปะรด

2.2.4 ขั้นตอนการทำน้ำหมักกากน้ำตาล

นำถังที่มีฝาปิดสนิท เทน้ำกลั่นใส่ถัง 4 ลิตร จากนั้นนำอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม กากน้ำตาล 10 กิโลกรัม และ โปรไบโอติกสำเร็จรูป (Super Biotic) 1 กิโลกรัม คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน หลังจากนั้นให้ออกซิเจนตลอดเวลา หลังจากนั้นปิดฝาให้สนิท (ภาพที่ 2-7)



ภาพที่ 2-7 ภาพแสดงส่วนผสมในการหมักน้ำหมัก Super biotic

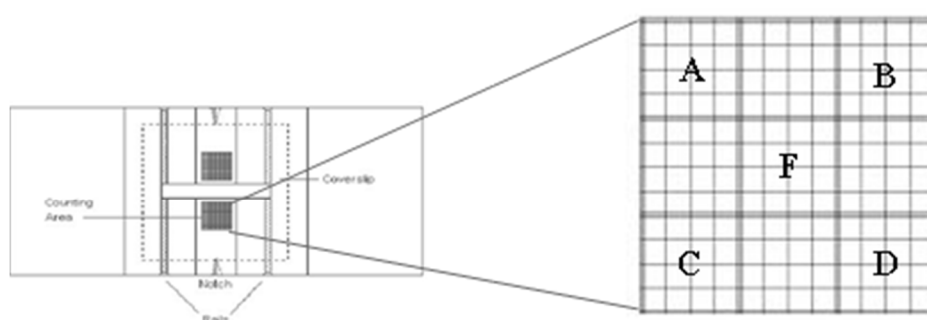
2.2.5 การเตรียมอาหารทดลอง

นำน้ำหมักกากถั่วเหลือง น้ำหมักสับปะรด และน้ำหมักกากน้ำตาล (Super biotic) มาทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บน haemocytometer หรือ สไลด์นับเม็ดเลือด เพื่อคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ใน stocking โดยใช้ auto pipette 1 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำออกมา 100 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด เพื่อนับจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่อง R (ช่อง A B C D F) (ภาพที่ 2-8) คำนวณปริมาตรน้ำได้จาก พื้นที่ตาราง × ความลึก เมื่อนับจำนวนเซลล์ในตารางภายใต้กล้อง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

จุลทรรศน์ ก็จะได้อ่านของเชื้อจุลินทรีย์ต่อปริมาตรน้ำของตารางนั้น จากนั้นคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร

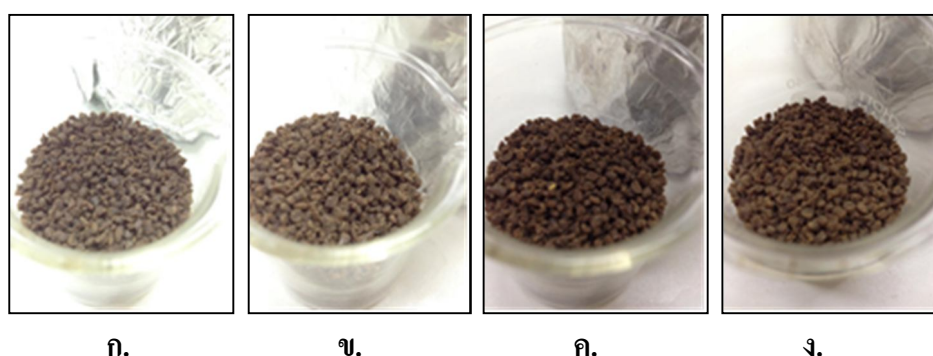
เมื่อคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ใน stocking โดยเทียบจาก 0.1 มิลลิลิตรที่ทราบจำนวนเซลล์ (cell/ml) จึงทำการเทียบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์จาก stocking เพื่อต้องการทราบปริมาตรที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ 10^9 cell/ml



ภาพที่ 2-8 ตารางบนผิว Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา: <http://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/Haemocytometer.htm>

นำอาหารกุ้งสำเร็จรูปเบอร์ 3 มาผสมกับเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก ด้วยวิธีสเปรย์น้ำหมักกากถั่วเหลือง, น้ำหมักสับปะรด, น้ำหมักกากน้ำตาล ลงไปบนอาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยตรง จากนั้นผสมน้ำมันหมักลงไป 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารกุ้ง 500 กรัม คลุกผสมน้ำมันหมักจนทั่วอาหาร แล้วจึงทิ้งผึ่งลมให้แห้งไว้ประมาณ 2 วัน แล้วจึงเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วจึงนำไปเลี้ยงกุ้งที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 2-9)



ภาพที่ 2-9 แสดงอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่ผสมน้ำมันหมักในแต่ละชนิด

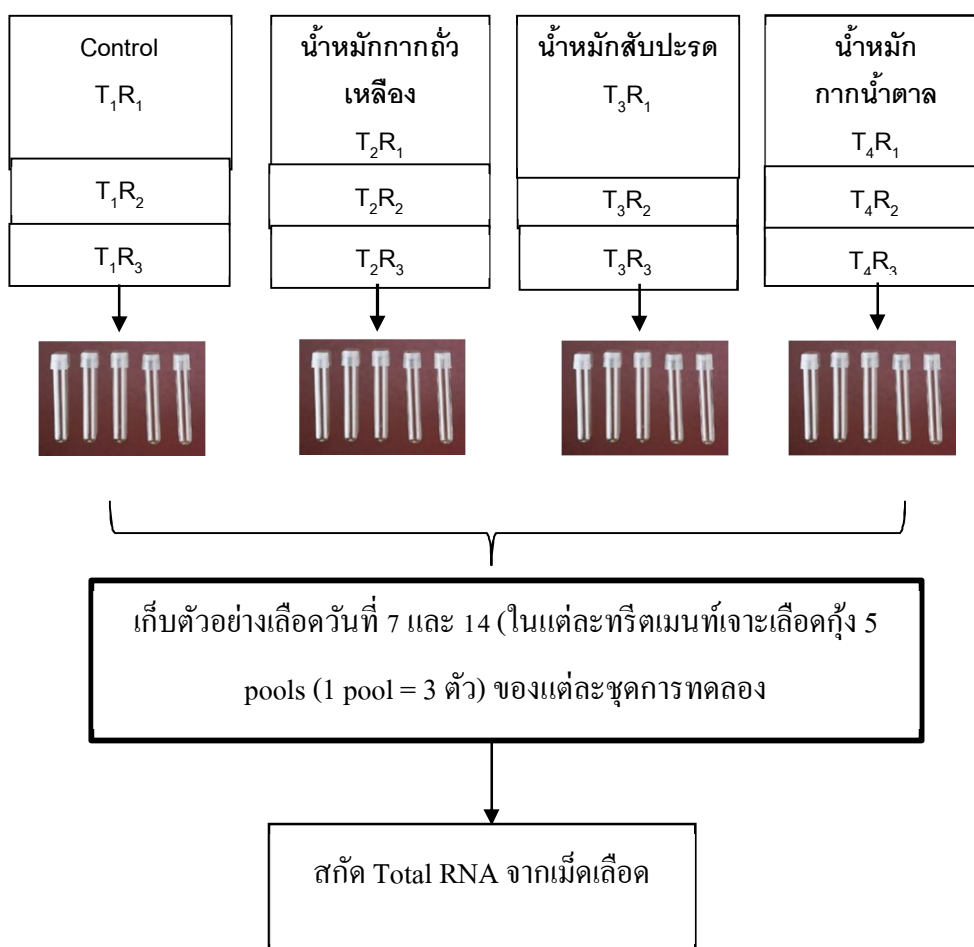
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

- ก. อาหารกุ้งสำเร็จรูปเบอร์ 3 ผสมน้ำมันหมึก (กลุ่มควบคุม)
- ข. อาหารกุ้งสำเร็จรูปเบอร์ 3 ผสมน้ำหมึกกากถั่วเหลือง/ 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.
- ค. อาหารกุ้งสำเร็จรูปเบอร์ 3 ผสมน้ำหมึกสับปะรด/ 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.
- ง. อาหารกุ้งสำเร็จรูปเบอร์ 3 ผสมน้ำหมึกกากน้ำตาล/ 10^9 เซลล์/อาหาร 1 kg.

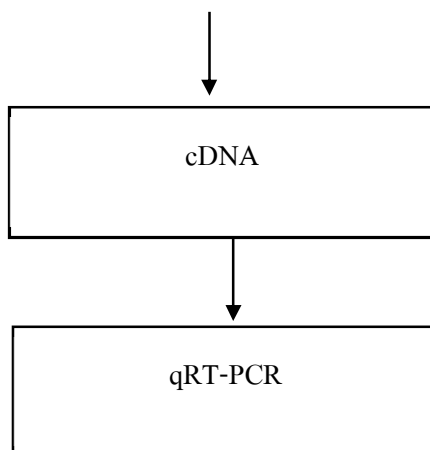
2.2.6 การวางแผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD (Complete Randomized Design) แบ่งชุดการทดลองเป็น 4 กลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองมี 3 ซ้ำ โดยในแต่ละชุดการทดลองให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก (ภาพที่ 2-10) ดังนี้

- กลุ่มการทดลองที่ 1 อาหารกุ้งเบอร์ 1 ผสมน้ำมันหมึก (กลุ่มควบคุม)
- กลุ่มการทดลองที่ 2 อาหารกุ้งเบอร์ 1 ผสมน้ำหมึกกากถั่วเหลือง/ 10^9 เซลล์/อาหาร 1kg.
- กลุ่มการทดลองที่ 3 อาหารกุ้งเบอร์ 1 ผสมน้ำหมึกสับปะรด/ 10^9 เซลล์/อาหาร 1kg.
- กลุ่มการทดลองที่ 4 อาหารกุ้งเบอร์ 1 ผสมน้ำหมึกกากน้ำตาล/ 10^9 เซลล์/อาหาร 1kg.



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ



ภาพที่ 2-10 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

2.3 การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง

ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติก ในวันที่ 7 และ 14 โดยการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง ที่แอ่งเลือดบริเวณขาเดินของกุ้ง (ภาพที่ 2-10) โดยใช้เข็มเบอร์ 26G พร้อม syringe คัดสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (อัตราส่วน 1:1) ใส่ในหลอด Falcon ขนาด 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่อไป



ภาพที่ 2-11 การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

2.4 การสกัดอาร์เอ็นเอ จากเม็ดเลือดกึ่ง

2.4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA extraction)

นำเลือดกึ่งไปปั่นเหวี่ยง 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 เวียนช้าจนครบ 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 ออกโดยคว่ำบนทิชชูประมาณ 10 นาที และทำการ air-dried

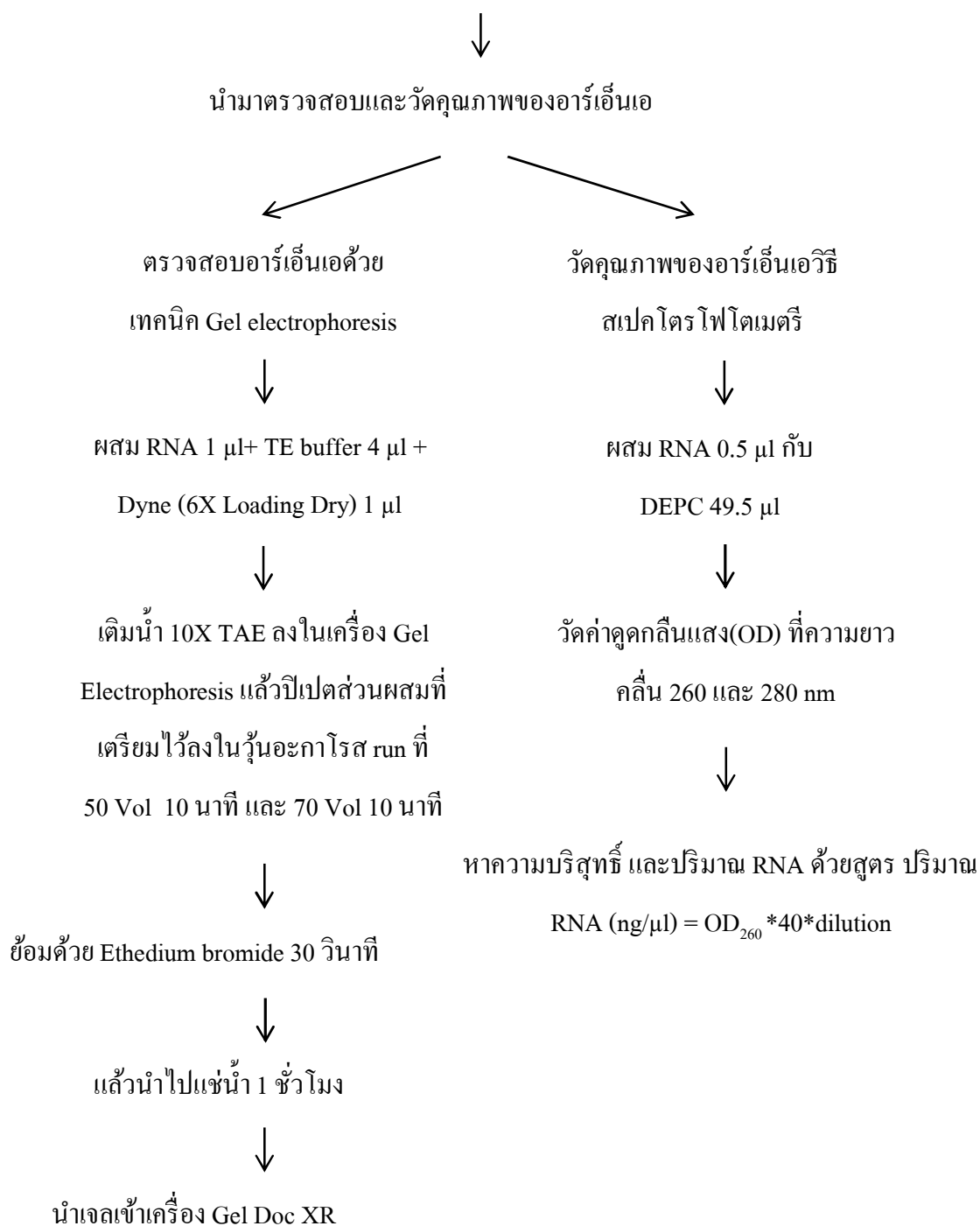


จะเก็บตะกอนอาร์เอ็นเอใน DEPC RNase free water ที่ -80 °C จนกว่าจะนำมาใช้ใน

การตรวจสอบและวัดคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

2.4.2 การหาปริมาณและวัดคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

นำตะกอนอาร์เอ็นเอที่เก็บไว้ใน -80° มาละลาย โดยแช่น้ำแข็ง 15-30 นาที



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

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

นำ RNA + Hexamer Primer + 10 mM dNTP +
DEPC-treated 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 (ขั้นตอนนี้ทำ
ต่อเนื่องกัน)



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



จะได้ cDNA ต้นแบบสำหรับทำ RT-PCR
ต่อไป

— — →

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

— — →

นำมาตรวจสอบและวัด
คุณภาพของ cDNA



ตรวจสอบ cDNA ด้วย
เทคนิค Gel electrophoresis



วัดคุณภาพและปริมาณของ cDNA
ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

2.5 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

ตารางที่ 2-1 แสดงไพรเมอร์ของยีน *Crustin*, *Penaeidin*, *Anti-lipopolysaccharide factor (LvALF)* และ *Beta-actin* ที่ใช้ในปฏิกิริยา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (bp)	Ref.
<i>Crustin</i>	F-ACGAGGCAACCATGAAGG R-TCGTTGGAACAGGTTGTGG	141	Wang <i>et al</i> , 2007
<i>Beta-actin</i>	F-CCACGAGACCACCTACAAC R-AGCGAGGGCAGTGATTTC	142	Ji <i>et al</i> , 2009
<i>Penaeidin 3 (LitvanPEN3)</i>	F-CACCCTTCGTGAGACCTTTG R-AATATCCCTTTCCACGTGAC	141	Takuji Okumura., 2007
<i>Anti-lipopolysaccharide Factor (LvALF1)</i>	F-CATTTCGGCCTTGACTTCG 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 ₂ O		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 ₂ O		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
	<i>LitPEN3</i>	<i>Crustin</i>	<i>LvALF</i>		
Pre-incubaion	95	95	95	600	1
3 steps Amplification	95	95	95	30	40
	60	60	58	30	
	72	72	68	30	
Melting	95	95	95	10	1
	65	65	65	60	
	97	97	97	1	

2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

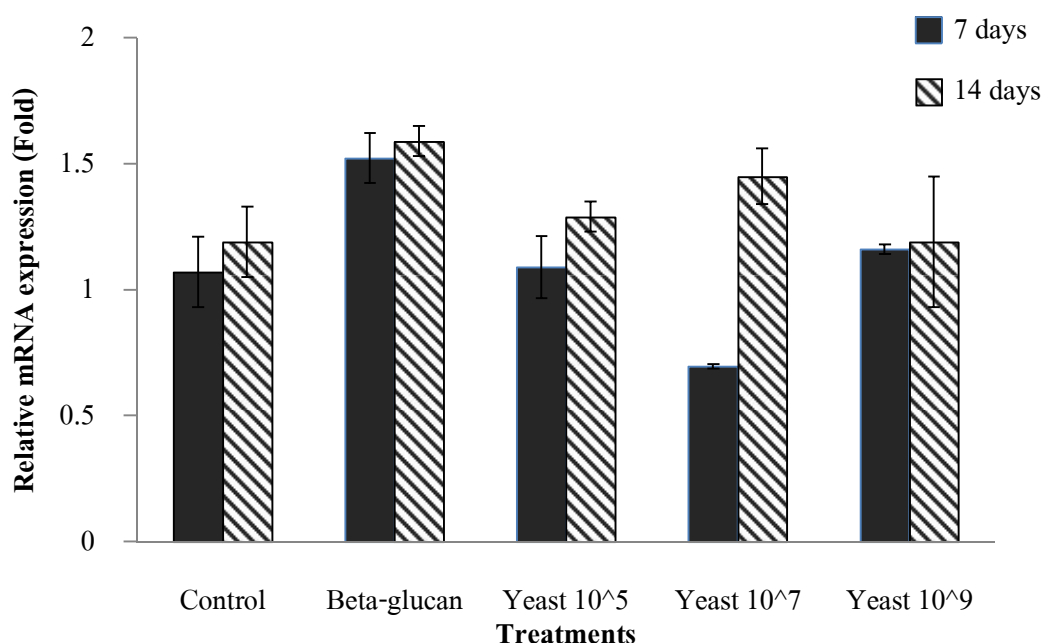
3. ผลการวิจัย

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

3.1 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ในปริมาณที่แตกต่างกัน

3.1.1 การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ปริมาณที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค quantitative Real-time PCR พบว่าในช่วง 7 วันแรก กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคน มีการแสดงออกของยีนชนิดครัสติน 1.5 เท่า (up-regulation) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ขณะที่กุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ปริมาณ 10^5 และ 10^7 cells ไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ (down-regulation) ส่วนกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ที่ 10^9 cells มีการแสดงออกของยีนเป็น 1.2 เท่าของกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ปริมาณที่แตกต่างกันของ 7 วันและ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

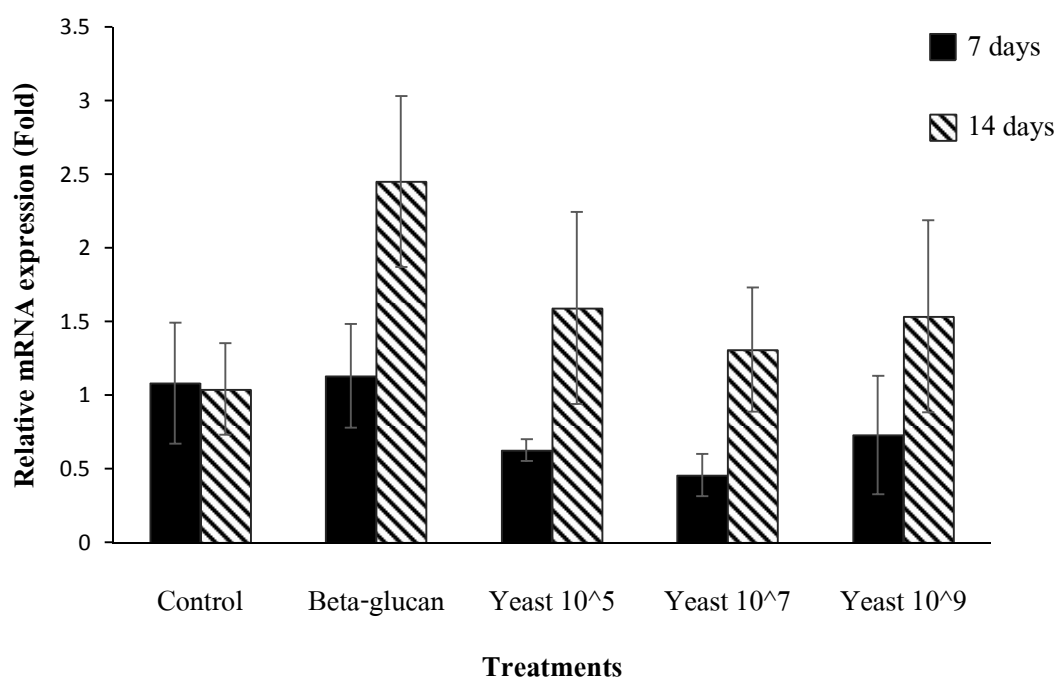
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

สำหรับวันที่ 14 พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคน มีการแสดงออกของยีนชนิดครัสติน 1.6 เท่า (up-regulation) ขณะที่กุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ปริมาณ 10^9 cells ไม่มีการแสดงออก (down-regulation) ส่วนกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์ปริมาณ 10^5 และ 10^7 cells มีการแสดงออก (up-regulation) เป็น 1.3 เท่า และ 1.4 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 3-1)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างช่วง 7 วัน และ 14 วัน พบว่า การทดลองที่ 14 วัน กุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ที่ระดับต่าง ๆ มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนครัสตินเพิ่มขึ้น (up-regulation) มากกว่าวันที่ 7 โดยที่ยีสต์ที่ระดับ 10^7 cells มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารผสมเซลล์ยีสต์ด้วยกัน (ภาพที่ 3-1)

3.1.2 การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ปริมาณที่ต่างกัน

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative Real-Time PCR พบว่าในระยะเวลา 7 วัน กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน มีการแสดงออก (up-regulation) ของยีน *LitvanPEN3* เป็น 1.13 เท่า ในขณะที่กุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์จากชานอ้อย ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^7 และ 10^9 cells ไม่มีการแสดงออก (down regulation) (ภาพที่ 3-2)



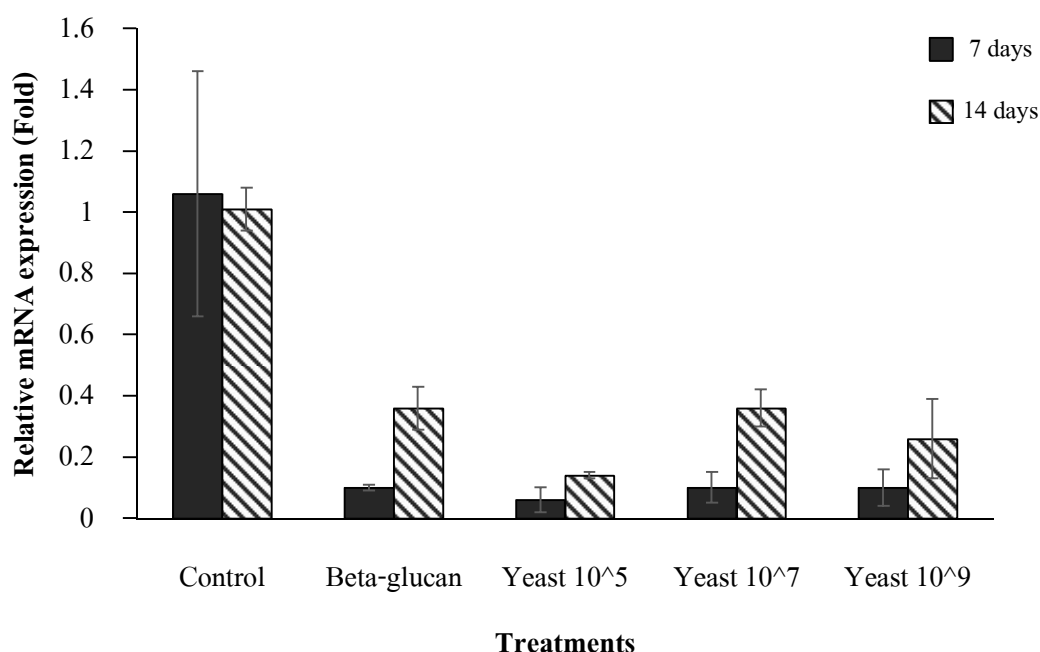
ภาพที่ 3-2 การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ปริมาณที่ต่างกันของ 7 วันและ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

สำหรับวันที่ 14 พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน มีการแสดงออก (up-regulation) ของยีน *Litvan PEN3* เป็น 2.45 เท่า และเซลล์ยีสต์จากชานอ้อย ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^7 และ 10^9 cells มีการแสดงออก (up-regulation) ของยีน เป็น 1.59, 1.31 และ 1.54 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 3-2) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างช่วง 7 วัน และ 14 วัน พบว่า การทดลองที่ 14 วัน การแสดงออกของยีน *Litvan PEN3* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (up-regulation) มากกว่าวันที่ 7 (ภาพที่ 3-2)

3.1.3 การแสดงออกของยีน *LvALF1* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ปริมาณที่ต่างกัน

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative Real-Time PCR พบว่าในระยะเวลา 7 และ 14 วัน กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน และเซลล์ยีสต์จากชานอ้อย ไม่มีการแสดงออก (down-regulation) ของยีน *LvALF1* (ภาพที่ 3-3)



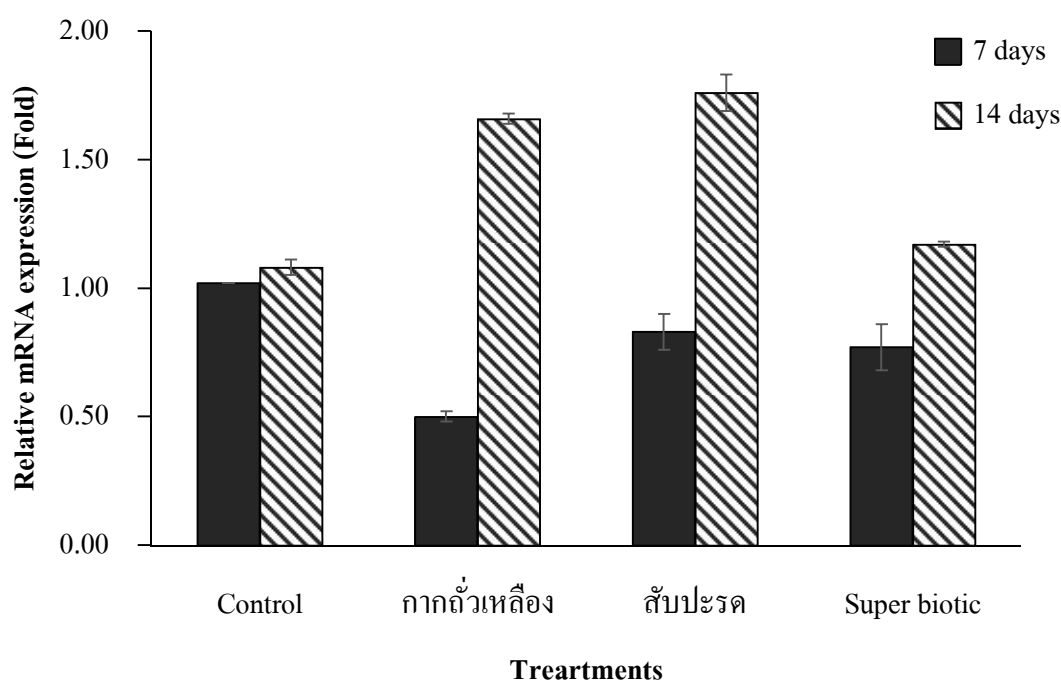
ภาพที่ 3-3 การแสดงออกของยีน *LvALF1* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ปริมาณที่ต่างกันของ 7 วันและ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

3.2 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ

การแสดงออกของ Antimicrobial peptide ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับจากอาหารเสริมโปรไบโอติก ในรูปแบบต่าง ๆ คือ น้ำหมักกากถั่วเหลือง, น้ำหมักสับปะรด และน้ำหมักกากน้ำตาล (Super biotic) โดยมีระดับความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ 10^9 cells/ml ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.2.1 การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่า ที่ระยะเวลา 7 วัน ไม่มีการแสดงออกของยีน *Crustin* (down-regulation) ในทุกกลุ่มการทดลอง ในขณะที่วันที่ 14 ของการให้อาหารเสริม พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมน้ำหมักมีการแสดงออกของยีน *Crustin* (ภาพที่ 3-4)

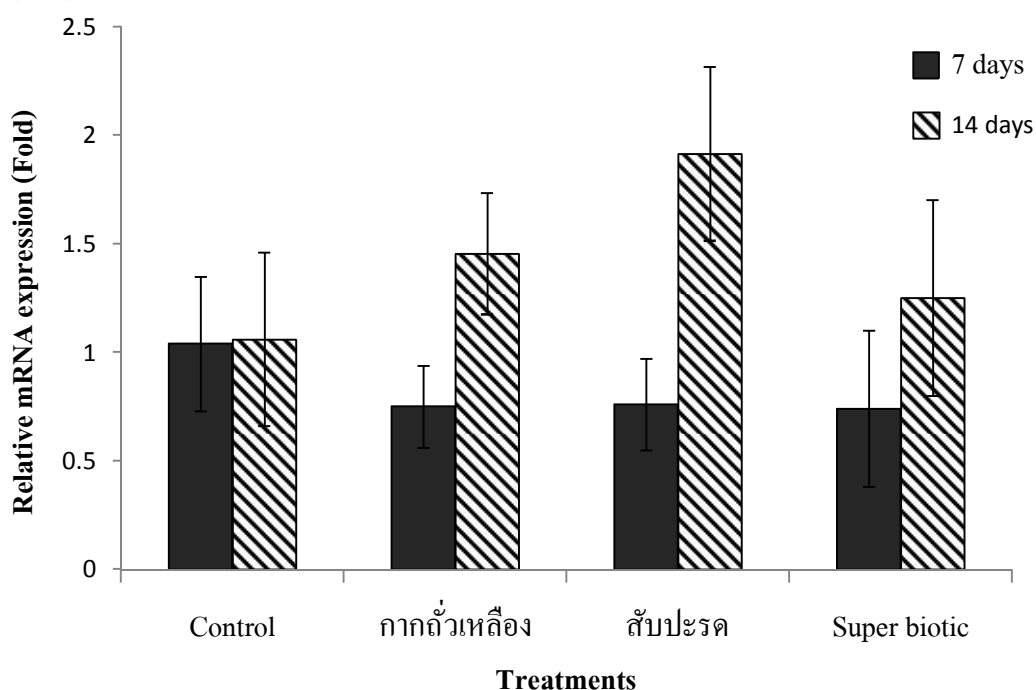


ภาพที่ 3-4 การแสดงออกของยีน *Crustin* ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

สำหรับวันที่ 14 พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกชนิด ต่าง ๆ มีการแสดงออกของยีนครัสติน (up-regulation) โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมกับน้ำหมัก สับปะรดมีการแสดงออกของยีนครัสตินสูงที่สุด (1.76 เท่า) รองลงมา คือ น้ำหมักกากถั่วเหลือง (1.66 เท่า) และ Super biotic (1.17 เท่า) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (control)

3.2.2 การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ด้วยเทคนิค quantitative Real-Time PCR ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนครัสติน (down-regulation) ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 3-5)

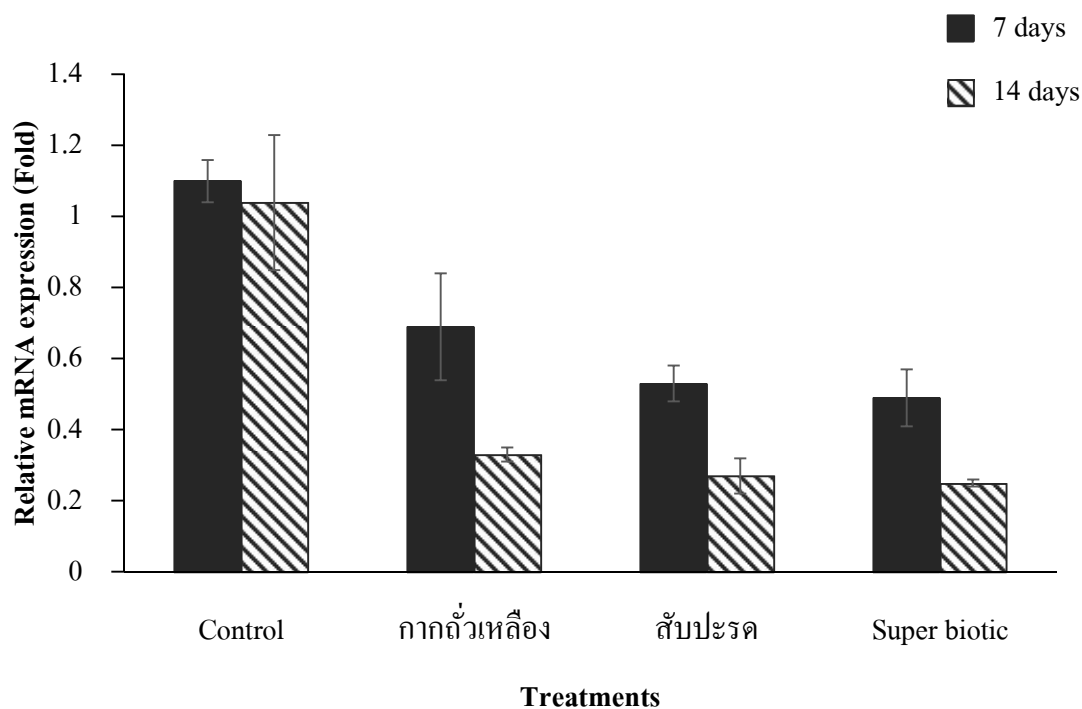


ภาพที่ 3-5 การแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

สำหรับวันที่ 14 พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักสับปะรดมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *LitvanPEN3* สูงที่สุด (1.86) รองลงมาคือน้ำหมักกากถั่วเหลือง (1.47) และ Super biotic (1.21) (ภาพที่ 3-5)

3.2.3 การแสดงออกของยีน *LvALF1* ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative Real-Time PCR พบว่าในระยะเวลา 7 และ 14 วัน กึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ ไม่มีการแสดงออก (down-regulation) ของยีน *LvALF1* (ภาพที่ 3-6)



ภาพที่ 3-6 การแสดงออกของยีน *LvALF1* ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ระยะเวลา 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค quantitative Real-time PCR

4. อภิปรายผลการวิจัย

4.1 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนและเซลล์ยีสต์ในปริมาณที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ในเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนและอาหารผสมเซลล์ยีสต์ในปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกัน พบว่า การให้อาหารเสริมเบต้ากลูแคนมีการแสดงออก (up-regulation) ของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* มากที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างของกลูแคน ที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดเล็ก เช่น กลูโคส ซึ่งจะง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (Manner *et al.*, 1973) นอกจากนี้ เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมของกึ่ง เนื่องจากเม็ดเลือดกึ่งมีรีเซปเตอร์ (receptor) สำหรับเบต้ากลูแคนมี ได้แก่ dectin-1 และ toll-like receptor (TLR)-2 ซึ่งจะกระตุ้น Syk และ Raf-1 การกระตุ้นนี้มีผลต่อกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Goodridge *et al.*, 2009) จากการศึกษา Time series expression ของยีนครัสตินในกึ่งขาว (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 ในอาหารของกึ่ง *Marsupenaeus japonicas* พบการแสดงออกของครัสตินตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 7 วัน นอกจากนี้ยังการทดลองของ Yu-Chi Wang *et al.*, 2007 ได้ศึกษาการแสดงออกในเวลาที่แตกต่างกันของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งขาวเวนนาไมในการตอบสนองต่อการได้รับอาหาร β -1,3-glucan ที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0%, 0.2% และ 1 %) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่า กึ่งที่ได้รับการเสริมเบต้ากลูแคนเข้าสู่ร่างกาย ไม่มีการแสดงออก (down-regulation) ของยีน *Penaeidin* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องจนถึง 7 วัน พบว่ากึ่งที่ได้รับการเสริมเบต้ากลูแคนเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่องมีแนวโน้มทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น พบว่า มีการแสดงออกของยีน *Penaeidin* (up-regulation) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รวมทั้งจาร์วรณ ชินกร (2550) ได้ศึกษาผลของการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารที่ระดับ 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในกึ่งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *Penaeidin* มีการแสดงออกอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลองและยีนมีการแสดงออกได้สูงที่สุดในวันที่ 14 ของการให้อาหารเสริมเบต้ากลูแคน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในการทดลองที่ 14 วันจะเห็นว่าการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ในกุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ที่ระดับต่าง ๆ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (up-regulation) มากกว่าวันที่ 7 โดยยีสต์ที่ระดับ 10^7 เซลล์ต่อกิโลกรัมอาหาร มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารผสมยีสต์ด้วยกัน สำหรับอาหารผสมยีสต์ 10^5 เซลล์ต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณน้อยเกินไปอาจจะไม่กระตุ้น และอาหารผสมยีสต์ 10^9 เซลล์ต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้ง ดังนั้นจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมจะมีประสิทธิภาพต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

กุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ มีการผลิต *Crustin* และ *LitvanPEN3* ได้เพิ่มขึ้น เมื่อมีการให้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งในการทดลองนี้พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมด้วยเซลล์ยีสต์ในวันที่ 14 มีการผลิต *Crustin* และ *LitvanPEN3* ได้มากกว่าวันที่ 7 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีสต์มีการปรับตัวในระยะแรก โดยเมื่อเซลล์ยีสต์เข้าไปในร่างกายของสัตว์น้ำ เซลล์ยีสต์จะมีการปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะต่อมาเซลล์ยีสต์จะเริ่มมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้ รายงานของ Antony et al. (2011) ทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนคริสตินในกุ้งขนาด 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 เป็นรูปแบบที่ดีที่สุดของการแสดงออกของยีน AMPs หลังการฉีดเชื้อ WSSV แสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมด้วยยีสต์ทั้งเซลล์ (whole cell) มีประสิทธิภาพการแสดงออกของ AMPs มากกว่ายีสต์สกัด

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

4.2 การแสดงออกของยีน antimicrobial peptide ในเม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจากน้ำหมักชนิดต่าง ๆ

การใช้โปรไบโอติกในรูปแบบต่าง ๆ เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการติดตามการ transcription ของ mRNA ของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* พบว่า วันที่ 7 กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกในทุกรูปแบบ ไม่มีการแสดงออก (down-regulation) ของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ซึ่งตรงกันข้ามกับวันที่ 14 ของการเลี้ยงพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกชนิดน้ำหมักสับปะรด มีการแสดงออกของยีน (up-regulation) นี้สูงที่สุด รองลงมา คือ น้ำหมักกากถั่วเหลือง และ Super biotic ตามลำดับ ในอาหารหมักแต่ละสูตรมีจุลินทรีย์แกรมบวก การใช้โปรไบโอติกในปัจจุบันมีส่วนช่วยในการเสริมสุขภาพกุ้งที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ด้านใหญ่ ๆ คือ การทำงานของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ จะเข้าไปแทนที่แบคทีเรียก่อโรค โดยการแย่งอาหาร และหลั่งเอนไซม์ที่ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถลงเกาะที่ผนังเซลล์ของลำไส้ได้ และการทำงานอีกด้านหนึ่งคือ การทำหน้าที่ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยเมื่อแบคทีเรีย เข้าสู่ร่างกายกุ้งจะการทำงานของโปรตีนกลุ่ม Pattern recognition receptors (PRRs) ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนในกลุ่ม specific pattern recognition proteins (PAMPs) ที่มาจากแบคทีเรีย และต่อมาจะกระตุ้น signaling pathways ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รวมทั้งกระบวนการ phagocytosis, nodule formation, encapsulation และการสังเคราะห์ของ AMPs ซึ่งจะเห็นได้ว่า การทำงานของ AMP ต้องมีการกระตุ้นด้วยเชื้อต่าง ๆ ที่เซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือดก่อน จึงจะเกิดกระบวนการในขั้นต้นได้ การศึกษาการใช้โปรไบโอติกในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เริ่มมีการศึกษากันมากขึ้น เช่นการศึกษาของ (Swapna *et al.*, 2011) ได้ทำการศึกษากการแสดงออกของยีนเปปไทด์ด้านจุลชีพ ชนิดครัสติน ในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ที่ประกอบไปด้วยกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก กลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Micrococcus* sp. ในขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก สามารถกระตุ้นการทำงานของยีนครัสตินให้เพิ่มมากขึ้น เปปไทด์นี้จะทำให้ไวรัสไม่สามารถสังเคราะห์สารพันธุกรรมได้ ส่งผลให้อัตราการตายของกุ้งที่รับเชื้อลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก (2553) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ด้านจุลชีพครัสติน (*CrusSp*) พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ และการศึกษาของ (Rattanachai *et al.* 2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *Crustin-like peptide* ในกุ้ง *M. japonicus* จากเม็ดเลือด พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ *L. setiferus*, *L. vannamei* และ *C. maenas* ถึง 80%, 80% และ 44% ตามลำดับ จากการตรวจสอบการแสดงออก ด้วยวิธี RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ เม็ด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

เลือด ดับและดับอ่อน เหงือก ถ้าใส่ส่วนหน้า ถ้าใส่ส่วนกลาง กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อได้เปลือก และรังไข่ พบว่า Crustin ของกุ้งมีการแสดงออกในส่วนเม็ดเลือดเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *Crustin* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 1, 3 และ 7 วัน หลังให้อาหารที่ผสมเปปติโดกลัยแคน (ส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมบวก)

จากการศึกษาครั้งนี้วันที่ 14 กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก มีการแสดงออก (up-regulation) ยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ในขณะที่วันที่ 7 ไม่พบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในกุ้ง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้น อาจจะมีการปรับตัวเข้าสู่ตัวของกุ้ง โดยระยะแรกจะมีการสะสมอาหาร การปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ในตัวกุ้ง และ เพิ่มจำนวน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) อาจส่งผลให้การแสดงออกของยีนนี้ไม่พบในระยะแรกของการได้รับโปรไบโอติก แต่เมื่อมีการกระตุ้นใน ทุก ๆ วันจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกสามารถมีการเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ ให้มีจำนวนที่มากพอ ที่จะช่วยในการกระตุ้นการสร้าง หรือการแสดงออกของยีน *Crustin* และ *LitvanPEN3* ได้ ซึ่งจากการศึกษาของ จำริญศรี ถาวรสุวรรณ และคณะ (2553) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมต่อความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้ โดยการเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจวัดการทำงานของภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสในวันที่ 7 และ 14 ของการเลี้ยง พบว่าหลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 7 วัน ไม่มีความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดระหว่างชุดทดลอง หลังจากทดลองเลี้ยงต่อไป 14 วัน พบว่า น้ำมันกระเทียมมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาว การทดลองในครั้งนี้อาจเสนอแนะได้ว่า ถ้าต้องการส่งเสริมให้มีการทำงานของเปปไทด์ชนิด *Crustin* และ *LitvanPEN3* ควรมีการใช้โปรไบโอติกอย่างต่อเนื่อง

การศึกษาในครั้งนี้ยังพบอีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ชนิดน้ำหมักสับปะรด มีการแสดงออกของยีนนี้สูงที่สุด เพราะในการทดลองนี้ เชื้อที่อยู่ในน้ำหมักชนิดนี้ มีแบคทีเรีย แกรมบวก ทั้งหมด 3 ชนิด ในขณะที่การหมักกากถั่วเหลืองให้เชื้อแกรมบวก 2 ชนิด และน้ำหมักกากน้ำตาล ให้แบคทีเรียแกรมบวกเพียงชนิดเดียว จึงเป็นไปได้ว่า การที่มีเชื้อหลายชนิดสามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการผลิตเปปไทด์ชนิดนี้ ได้มากกว่าเชื้อเดี่ยว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Enujiugha (2009) ที่ได้ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ขนาด 10-12 กรัม โดยการเสริมเชื้อแบคทีเรียแบบเดี่ยว (*Bacillus subtilis*) และแบบผสมหลายเชื้อ (*B. subtilis*, *Micrococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp.) จากผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเชื้อแบคทีเรียที่หลากหลายชนิด สามารถกระตุ้นปริมาณเม็ดเลือดรวม กระบวนการฟาโกไซโทซิส และการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ได้มากขึ้น รวมทั้งการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลุ่ม vibrio ก็เพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

นอกจากนี้อาจเป็นเพราะว่าสับปะรดประกอบไปด้วยสารอาหารที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น วิตามินซีและวิตามินบีสูง และที่สำคัญมีเอนไซม์ บรอมีเลน (Bromelain) ช่วยยับยั้งการอักเสบ มีฤทธิ์ช่วยในระบบการย่อยอาหาร สามารถย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง ช่วยลดหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่มไวรัสโอได้ดี ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำพาสารอาหาร เข้าสู่เนื้อเยื่อในร่างกาย นอกจากนี้สับปะรด ยังประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน แมงกานีส ปริมาณมาก (ชัยวุฒิ สุตทองคง, 2556) การทดลองนี้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า การใช้แบคทีเรียที่หลากหลายชนิด ให้ผลในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าเชื้อเดี่ยว

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. อาหารเสริมเบต้ากลูแคน และเซลล์ยีสต์ (whole cell yeast) สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการผลิต antimicrobial peptide ชนิด Crustin และ Penaeidin ได้
2. อาหารจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำหมัก สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการผลิต antimicrobial peptide ชนิด Crustin และ Penaeidin (up-regulation) ได้ โดยเฉพาะน้ำหมักจากสับปะรด มีแนวโน้มกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยการผลิต AMP ในกุ้งได้ดีที่สุด
3. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้องมีการใช้อย่างต่อเนื่อง จึงจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งได้
4. จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ยีสต์สามารถใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวได้ ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพการกระตุ้นอาจจะไม่ดีเท่าเบต้ากลูแคน แต่เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนการผลิต การใช้ยีสต์ที่เลี้ยงจากขาน้อยยังคงมีต้นทุนถูกกว่ามาก
5. การใช้น้ำหมักสับปะรดเป็นแนวทางเลือกของเกษตรกร ซึ่งมีวิธีการทำน้ำหมักที่ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้วัสดุที่หาได้ในท้องถิ่น และมีราคาถูก จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า น้ำหมักสับปะรดสามารถใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวได้ดี แต่อย่างไรก็ตามต้องระวังการปนเปื้อนจากแบคทีเรียตัวอื่นที่จะเกิดขึ้นจากการหมัก ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.8-4.0 เท่านั้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ผลการทดลองในครั้งนี้ เป็นการรายงานผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการนำไปใช้ในระดับฟาร์มจะต้องมีการศึกษาในระดับฟาร์มต่อไป

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

2. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นวิธีการหนึ่งในการจัดการสุขภาพ การเพาะเลี้ยงกุ้งต้องอาศัยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาเลี้ยง

6. ผลผลิต

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ: อยู่ในระหว่างการดำเนินงาน

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2557A10802191 สัญญาเลขที่ 3/2557

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ “การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ”

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. มลฤดี สนธิ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึง กันยายน พ.ศ. 2557

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	291,500	เมื่อ กุมภาพันธ์ 2557
งวดที่ 2 (40%)	233,200	เมื่อ มีนาคม 2558
งวดที่ 3 (10%)	58,300	เมื่อ กันยายน 2558
รวม	583,000 บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	58,300	58,300	0
2. ค่าจ้าง	114,000	114,000	0
3. ค่าวัสดุ	332,400	332,400	0
4. ค่าใช้สอย	20,000	20,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าสาธารณูปโภค	58,300	58,300	0
รวม	583000	583,000	0

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ด้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

บรรณานุกรม

- เกรียงศักดิ์ พูนสุข, สุทธิพงศ์ อริยะพงศ์สรรค์, ไพรัตน์ ศรีแสง และพลสันต์ มหำจันทร์. (2550). แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์*. ปีที่ 17. เก็บถาวร ณ ครุส่ง. (2554). การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของ *CrustinPm1* และ *CrustinPm7* จาก กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. ปัญหาพิเศษ, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คณินิจ ก่อธรรมฤทธิ์. (2541). การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิต การใช้และความต้องการ *Probiotics* ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ. หน้า 40.
- จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และศิริพร ลิทธิประณีต. (2553). การศึกษาลักษณะสมบัติของเปปไทด์ต้านจุลชีพในปูทะเล (*Scylla paramamosain*). รายงานการวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา.
- จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก, ปิติ อำพาชีพ, อัญชลี พัฒนাজร และศิริพร ลิทธิประณีต. (2551). การศึกษาลักษณะสมบัติและวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพครัสตินจากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล (*Scylla paramamosain*). ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ, เจนจิตต์ คงกำเนิด, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และจิราพร เกษรจันทร์. (2553). ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว. งานวิจัย. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง.
- จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ, ไพบุลย์ บุญลิปตานนท์, จูอะดิ พงศ์มณีรัตน์ และพัชร ชุ่นสั้น. (2553). ผลการเสริม *Schizochytrium Limacinum* (D. Honda & Yokochi, 1998) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และความทนทานของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). การวิจัยประยุกต์. สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา. กรมประมง.
- เจนนุช ว่องวัชรชัย. (2547). ผลของยาและสารเคมีต่อสุขภาพกุ้ง. ในรายงานการวิจัยเรื่อง “บทวิเคราะห์และสังเคราะห์งานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2546. 46-73.
- ฉวีวรรณ นาคบุตร. (2555). หลอดเลือดและส่วนประกอบของเลือด. วันที่ค้นข้อมูล 02 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก <http://www.slideshare.net/wan1966/ss-11385965>.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

- ชลอ ลิมสุวรรณ. (2546). *สัตว์น้ำเศรษฐกิจ*. วันที่ค้นข้อมูล 12 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก <http://darawan.awardspace.info/>
- ชวนพิศ ลิทธิมรงค์. (2555). *สัตว์เศรษฐกิจ*. วันที่ค้นข้อมูล 12 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก http://51011811299g7.blogspot.com/2012/04/blog-post_8152.html.
- ชัยวุฒิ สุตทองคง. (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 พาณิชกุล. (2553). *ผลกระทบต่อการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ Plasmodium vivax*. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.
- ธวัชชัย สันติกุล. (2545). *การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม*. วันที่ค้นข้อมูล 12 กันยายน 2556, เข้าถึงได้จาก <http://www.thaiermsolutions.com>
- นพวรรณ วรมงคลชัย. (2553). *การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและสมบัติการต้านไวรัสของกุ้งขาวของเพปไทด์ด้านจุลชีพจากกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์. สาขาชีววิทยา. หน้า 122
- นิตยา ยิมเจริญ, นนทวิทย์ อารีชน, ชุมพล ศรีทอง และนิติ ชูเชิด. (2549). *การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon)*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. กรุงเทพฯ. หน้า 214-228.
- ปริญญ์ จารุคม, วัชรียา ฐิวิโรจน์กุล, นิติ ชูเชิด และ ชลอ ลิมสุวรรณ. (2551). *ผลของ PROMUTASET M 200 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (Litopenaeus vannamei)*. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. กรุงเทพฯ. หน้า 29-35.
- พันทิพา พงษ์เพ็ชรจันทร์. (2528). *หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์*. หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 2. ภาควิชาสัตวศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. หน้า 576.
- พิษณุ วรรณธง, นิวุฒิ หวังชัย, มงคล สมัญญา และชนกันต์ จิตมนัส. (2548). *การเพิ่มศักยภาพการผลิตกุ้งก้ามกรามในเขตภาคเหนือโดยการใช้โปรไบโอติก*. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

- ยุทธพล คงกระจำง และนงนุช เลาหะวิสุทธี. (2554). การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และปริมาณเชื้อไวรัสโอโนกึ่งขาวแวนนาไม. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. กรุงเทพฯ. หน้า 400-407.
- รัชนิวรรณ ทวีแก้ว. (2549). เทคนิค PCR. วิทยาไวรัสเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.
- แลบ อินเตอร์. (2556). ศูนย์ข้อมูลกุ้ง สไตร์ไทยแท้. วันที่ค้นข้อมูล 20 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก <http://www.shrimpcenter.com/page0015.html>.
- วรรณพร อัยสกุล, ชลอ ลีมสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และกัญญา ปัญญาชาติรักษ์. (2549). ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus* spp. ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด. ปัญหาพิเศษ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรรณภา เพ็งภักตร์. (2539). การใช้แบคทีเรียในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วลัยพร ทิมบุญธรรม, มังกร โรจน์ประภากร, สุริยา สาสนรักกิจ, เสรี เจริญกิจมงคล และเปรมสุดา สมาน. (2544). การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. กรุงเทพฯ. หน้า 370-377.
- วัชรวิภา ฐิวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อาริย์ชน. (2550). ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากไส้กุ้งกุลาดำจากแหล่งธรรมชาติ ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. กรุงเทพฯ. หน้า 166-173.
- ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต, สมเกียรติ ปิยะธีรชิตวิโรกุล และเปรมสุดา สมาน. (2538). จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งทะเล. วารสารวาริชศาสตร์. 1(2). หน้า 210.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อิสท์เอเชียอควาแคลเจอร์ จำกัด. (2556). จุลินทรีย์โปรไบโอติก. วันที่ค้นข้อมูล 28 ตุลาคม 2556, เข้าถึงได้จาก <http://www.eastasiaaquaculture.com/>
- อุทัย แก้วเย็น. (2549). โปรไบโอติกส์. 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 acidic domain 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). Laboratory 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., Sarthai, 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., Priyajib, 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 (*Penaeus 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

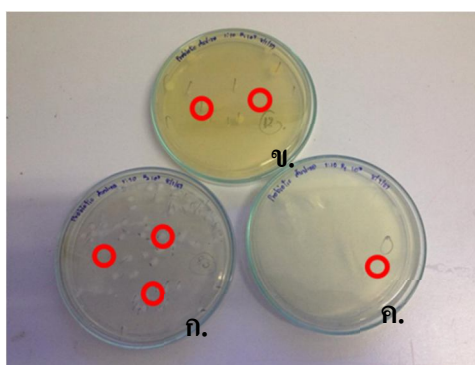
ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (TSA) ย้อมสีแกรม ตรวจสอบแบคทีเรีย
วibriโอในน้ำ/ตับและตับอ่อนบนอาหาร TCBS และตรวจสอบลักษณะตับภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชืบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (TSA) ย้อมสีแกรม ตรวจสอบแบคทีเรียไวรัสใน
น้ำ/ตับและตับอ่อนบนอาหาร TCBS และตรวจสอบลักษณะตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อจากน้ำหมักสับประรด น้ำหมักกากถั่วเหลือง และน้ำหมักกากน้ำตาล โดยทำ
การ ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักแต่ละชนิด ชนิดละ 0.1 ml ผสมกับน้ำเกลือ 0.9 ml จากนั้นทำการ
Dilution ให้ได้ 10^9 แล้วปิเปตน้ำหมักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 1 ml บ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง สังเกต
และบันทึกข้อมูล



ภาพ ก-1 แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSA

ก. น้ำหมักสับประรด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

ข. น้ำหมักสับประรด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

ค. น้ำหมักสับประรด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

พบว่า น้ำหมักสับประรดมีโคโลนีทั้งหมด 3 รูปแบบ น้ำหมักกากถั่วเหลืองมีโคโลนี 2 ชนิด
และน้ำตาลมีโคโลนีรูปแบบเดียว

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อโดยการย้อมสีแกรม (Gram staining)

การย้อมแกรมเป็นเทคนิคในการศึกษาจุลินทรีย์ โดยดูสีที่ย้อมติดกับตัวจุลินทรีย์ลักษณะการย้อมติดที่ตัวเซลล์เป็นแบบ differential strain ซึ่งเป็นการใช้สีย้อมมากกว่าหนึ่งชนิด สีจะติดตามไซโทพลาสซึมและผนังเซลล์ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้

ผู้ที่คิดค้นการย้อมสีวิธีนี้คือ Hans Christian Gram ในปี ค.ศ. 1884 ผลของการย้อมสีแกรมทำให้จำแนกแบคทีเรียออกได้ 2 กลุ่ม คือ

1. แกรมบวก (Gram Positive) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีน้ำเงินม่วง
2. แกรมลบ (Gram Negative) แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแดง

ขั้นตอนการย้อมสีแกรม

เริ่มต้นจากการป้ายเชื้อที่ต้องการย้อมลงบนแผ่นสไลด์ ควรใช้ดินสอเขียนแก้วช่วยระบุตำแหน่งที่ป้าย เพื่อความสะดวกในการย้อมและการดูสไลด์



Smear เชื้อที่ต้องการย้อมลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง จากนั้นตรึงตัวเซลล์ด้วยการผ่านเปลวไฟ (ระวังเซลล์จะแตกตายก่อนด้วย) การตรึงเซลล์จะช่วยให้เซลล์แห้งติดกับแผ่นกระจกสไลด์



หยด crystal violet บนเชื้อที่ smear นานประมาณ 1 - 2 นาที แล้วเทสีทิ้ง



หยดสารละลายไอโอดีนตามลงไปนานประมาณ 2 นาที แล้วเททิ้ง

สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้เซลล์ย้อมติดสีได้ดีขึ้น



ล้างสีด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที แล้วจึงตามด้วยน้ำกลั่น



หยดสี Safranin O บนเชื้อนานประมาณ 15-30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำ แล้วจึงมองเซลล์ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์

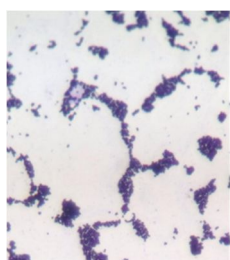
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ตาราง ก-1 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงระหว่างการย้อมแกรมของแบคทีเรีย

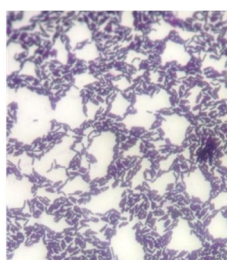
สีและสารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1. crystal violet	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. สารละลายไอโอดีน	สารละลายไอโอดีนร่วมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง	สารละลายไอโอดีนร่วมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง
3. เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	ไซโตพลาสซึมและผนัง เซลล์สูญเสีย น้ำ จึงเกิดการเหี่ยวหรือหดตัว ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดเล็ก สารประกอบของสีซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกมาได้ เซลล์จึงติดสีม่วง	สารพอลิปิดที่ผนัง เซลล์ถูกละลายออกไป ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น สารละลายของสีจึงสามารถละลายออกจากเซลล์ได้ เซลล์ไม่ติดสี
4.Safranin	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีนี้ เซลล์ติดสีม่วงตามเดิม	เซลล์ติดสีแดงของSafranin

ที่มา : Josephine (1991)

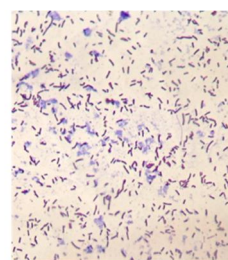
จากการย้อมสีน้ำหมักทั้ง 3 ชนิด พบว่า แบคทีเรียที่เกิดขึ้นจากการหมักของน้ำหมักสับปะรด น้ำหมักกากถั่วเหลือง และน้ำหมักกากน้ำตาล เป็นแกรมบวก



ก.



ข.



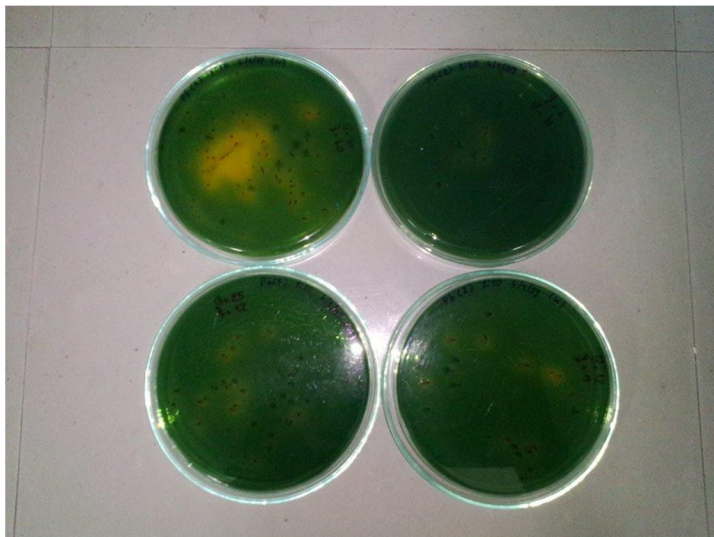
ค.

ภาพ ก-2 เชื้อโปรไบโอติกที่ได้จากน้ำหมักแต่ละชนิด

- ก. น้ำหมักกากถั่วเหลือง
- ข. น้ำหมักสับปะรด
- ค. น้ำหมักกากน้ำตาล

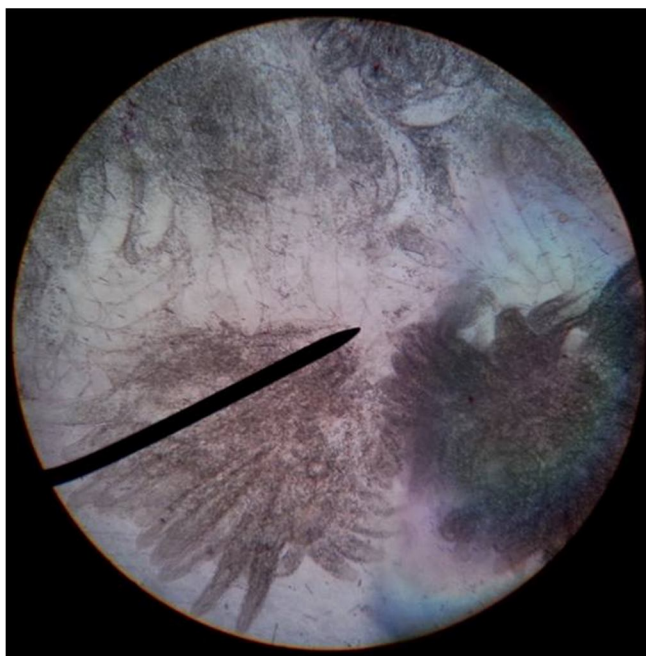
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกึ่งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ตรวจสอบแบคทีเรีย *Vibrio* ในน้ำ/ตับและตับอ่อนบนอาหาร TCBS



ภาพที่ ก-3 ภาพแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ที่เจริญบนอาหาร TCBS จากน้ำและตับกุ้งในบ่อเลี้ยงทดลอง

ตรวจสอบลักษณะตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ ก-4 ลักษณะตับของกุ้งในบ่อเลี้ยงทดลอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ภาคผนวก ข

น้ำหนัก และความยาวของกึ่งขาวแวนนาไม อาหารเหลือ และผลของคุณภาพน้ำ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกึ่งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ภาคผนวก ข

น้ำหนัก (g) ความยาว (cm) กุ้งขาวแวนนาไม อาหารเหลือ และผลของคุณภาพน้ำ

ตาราง ข-1 การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน

พารามิเตอร์	วันที่	ระดับช่วงของค่าที่วัดได้				
		Control	Beta-glucan	Yeast 10 ⁵	Yeast 10 ⁷	Yeast 10 ⁹
ออกซิเจนละลายน้ำ	7	5.1-6.2	5.0-6.2	5.3-6.7	4.7-6.0	5.2-6.7
(mg/L)	14	4.8-7.2	5.6-7.1	5.5-7.5	5.0-7.0	4.7-7.2
อุณหภูมิ (°C)	7	20.8-24.8	20.7-25.0	20.9-24.9	21.5-24.8	20.2-24.8
	14	18.8-21.0	18.7-21.2	18.8-20.9	18.9-21.2	17.9-21.3
พีเอช	7	7.2-7.8	7.0-7.8	7.0-7.9	7.1-7.9	7.0-7.7
	14	7.4-8.0	7.4-8.0	7.2-7.9	7.3-8.0	7.3-7.9
แอมโมเนีย	7	0.04-0.32	0.08-0.32	0.05-0.29	0.14-0.19	0.02-0.31
	14	0.02-0.73	0.14-0.53	0.02-0.61	0.30-0.39	0.02-0.17
ไนไตรท์	7	0.02-0.03	0.02	0.02	0.02-0.03	0.02-0.03
	14	0.02	0.02	0.01-0.02	0.01-0.02	0.02
ความเค็ม (ppt)		20-22				
อัลคาไลน์ (ppm)		80-160				

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ตาราง ข-2 ชั่งวัดน้ำหนักและความยาวกุ่ม

ชุดการทดลอง	วันที่ 7		วันที่ 14	
	น้ำหนัก(g)	ความยาว(cm)	น้ำหนัก(g)	ความยาว(cm)
Control	9.40±0.79	11.07±0.34	10.83±1.52	12.09±0.44
Beta-glucan	9.31±0.67	11.48±0.49	10.46±0.91	12.42±1.08
Yeast 10 ⁵	9.27±1.59	11.51±0.66	10.51±1.47	12.20±0.48
Yeast 10 ⁷	10.71±1.23	11.62±0.37	12.10±1.00	12.40±0.44
Yeast 10 ⁹	8.61±1.20	11.40±0.42	10.20±0.92	12.11±0.20

ตาราง ข-3 อาหารเหลือภายในถังทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง (น้ำหนักอาหารแห้ง)

ชุดการทดลอง	วันที่ 7		วันที่ 14	
	อาหารที่ให้/วัน (g)	อาหารเหลือ/วัน (g)	อาหารที่ให้/วัน (g)	อาหารเหลือ/วัน (g)
Control	12	3.59-8.78	12	2.61-6.82
Beta-glucan	12	5.60-7.40	12	4.54-5.97
Yeast 10 ⁵	12	6.45-10.25	12	4.73-6.31
Yeast 10 ⁷	12	4.77-8.63	12	3.91-6.45
Yeast 10 ⁹	12	5.17-9.84	12	3.88-7.71

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ตาราง ข-4 น้ำหนัก ความยาวของกิ้งก่าที่เลี้ยงด้วยโปรไบโอติก

ชุดการทดลอง	วันที่ 7		วันที่ 14	
	น้ำหนัก (g)	ความยาว (cm)	น้ำหนัก (g)	ความยาว (cm)
Control	12.33±0.68	10.83±0.80	11.80±0.80	10.10±2.00
น้ำหมักสับปะรด	10.09±2.58	11.83±1.06	9.94±1.84	10.90±1.59
น้ำหมักกากถั่วเหลือง	9.94±1.85	11.67±0.58	9.15±1.82	11.10±0.81
น้ำหมักกากน้ำตาล	8.41±2.79	10.85±1.05	9.94±1.88	10.17±1.80

ตาราง ข-5 อาหารกิ้งก่าที่เหลือภายในถึงทดลองระยะเวลาการเลี้ยง (น้ำหนักอาหารแห้ง)

ชุดการทดลอง	วันที่ 7		วันที่ 14	
	อาหารที่ให้/วัน	อาหารที่เหลือ/วัน	อาหารที่ให้/วัน	อาหารที่เหลือ/วัน
	(g)	(g)	(g)	(g)
Control	12	3.59-8.78	12	2.61-6.82
น้ำหมักสับปะรด	12	7.82-3.77	12	8.51-5.72
น้ำหมักกากถั่วเหลือง	12	6.22-3.90	12	7.99-5.35
น้ำหมักกากน้ำตาล	12	6.91-3.18	12	7.07-5.34

ตาราง ข-6 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน

พารามิเตอร์	วันที่	Control	กากถั่วเหลือง	ตับประด	Super biotic
ออกซิเจนละลายน้ำ	7	5.1-6.2	4.3-5.9	4.7-5.9	4.9-6.3
(mg/L)	14	4.8-7.2	4.3-6.0	4.6-5.7	4.7-6.0
อุณหภูมิ	7	20.8-24.8	20.8-25.0	20.8-25.0	20.8-25.0
(°C)	14	18.8-21.0	19.1-23.0	19.3-23.0	19.5-23.0
พีเอช	7	7.2-7.8	7.4-7.8	7.4-7.8	7.4-7.8
	14	7.4-8.0	7.6-7.8	7.7-8.0	7.7-8.0
แอมโมเนีย	7	0.04-0.32	0.02-0.06	0.02-0.09	0.02-0.03
(ppm)	14	0.02-0.73	0.06-0.10	0.06-0.08	0.03-0.06
ไนไตรท์	7	0.02-0.03	0.06-0.07	0.06-0.07	0.05-0.06
(ppm)	14	0.02	0.06-0.07	0.06-0.07	0.07-0.09
ความเค็ม	7	20-22	20-22	20-22	20-22
(ppt)	14	20-22	20-22	20-22	20-22
อัลคาไลน์	7	80-160	80-160	80-160	80-160
(ppm)	14	80-160	80-160	80-160	80-160

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ภาคผนวก ค

ลักษณะโปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1 และตัวอย่างการคำนวณข้อมูล
โดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta C_q}$)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

ภาคผนวก ค

ลักษณะโปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1 และตัวอย่างการคำนวณข้อมูล
โดยวิธีการของ Livak ($2^{-\Delta\Delta C_q}$)

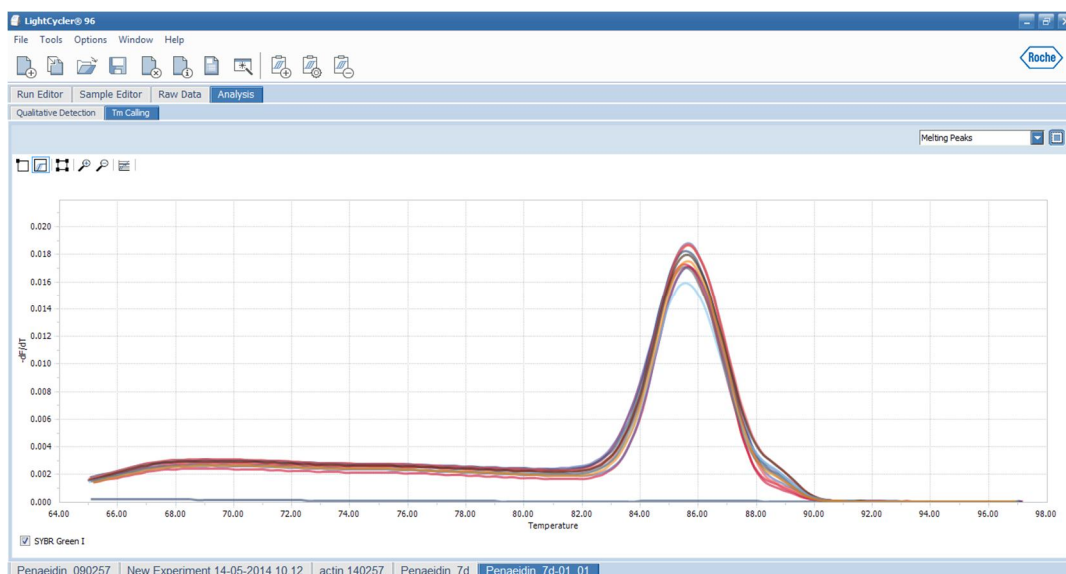


ภาพที่ ค-1 LightCycler® 96 SW1.1



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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ



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

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
 ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

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

1	Name	Cq_PEN.	Cq_actn	ΔCq	$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \text{mean}$	$2^{-\Delta\Delta Cq}$	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				

วิธีการคำนวณ

(1) $\Delta Cq = Cq \text{ of Penaeidin} - Cq \text{ of beta actin (gene reference)}$

(ค่า Cq มาจาก โปรแกรม LightCycler® 96 SW1.1)

(2) $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \text{mean } \Delta Cq \text{ of control}$

(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

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. นางสาวมลฤดี สอนธิ เลขบัตรประจำตัวประชาชน 36706 00493 686

Miss Molruedee SONTHI

ตำแหน่ง อาจารย์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

57 หมู่ 1 ถนนชลประทาน ต. โขมอ อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี 22170

โทรศัพท์ที่ทำงาน: 039-310000

โทรศัพท์มือถือ: 086-1569561

โทรสาร: 039-310128

E-mail: molruedee@buu.ac.th, mamsonthi@gmail.com

2. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2543 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา

พ.ศ. 2547 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วาริชศาสตร์) มหาวิทยาลัยบูรพา

พ.ศ. 2556 Ph.D (Parasitology, Microbiology) Montpellier University,
ประเทศฝรั่งเศส

3. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

- โรคสัตว์น้ำ (Fish and shellfish diseases)
- ภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ (Fish and shellfish immunology)
- Host-pathogen interaction

4. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

- ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อม ปริมาณและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550

5. หัวหน้าโครงการวิจัย และแหล่งทุน

1. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสตัวแดงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) กับการถ่ายทอดโรคในกุ้งกุลาดำ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส
ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

2. การศึกษาภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้บีต้ากลูแคนในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link 1807 แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550
3. ลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เป็นโรคตายด่วน. แหล่งทุน: คณะเทคโนโลยีทางทะเล ประจำปีงบประมาณ 2555 งบประมาณ 50,000 บาท
4. รูปแบบการจัดการฟาร์ม และการควบคุมอินทรีย์สารในบ่อกุ้งของเกษตรกร เพื่อป้องกันโรคตายด่วน ในกุ้งทะเล แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2557 งบประมาณ 222,000 บาท
5. การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2557 งบประมาณ 580,000 บาท และ 2558 (ต่อเนื่อง) งบประมาณ 690,000 บาท
6. การปรากฏของ Covert Mortality Nodavirus ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี แหล่งทุน: คณะเทคโนโลยีทางทะเล ประจำปีงบประมาณ 2558 งบประมาณ 60,000 บาท

6. ผลงานวิชาการ

- สุทัศน์ แดงสมสุขเจริญ, นภาพร เลียดประถม, บัญชา นิลเกิด และมลฤดี สนิธิ. (2550). ผลของแอมโมเนียต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวาน. การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2550 กรุงเทพฯ.
- วศิน ชวนะเดมิย์ และ มลฤดี สนิธิ. (2552). ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไวรัสตัวแดงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) กับการถ่ายทอดโรคในกุ้งกุลาดำ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณปี 2550-2551 เสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ชลี ไพญุกยกิจกุล, มลฤดี สนิธิ, เบญจมาศ ไพญุกยกิจกุล และ บัญชา นิลเกิด. (2552). การศึกษาภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้เบต้ากลูแคนในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link 1807. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณปี 2550-2551 เสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- มลฤดี สนิธิ และ กรรณิการ์ เชื้อชาญยนต์. (2555). ลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เป็นโรคตายด่วน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

มฤดี สนิธิ และนิศาตร์ณ์ ดาราวิโรจน์. (2558). รูปแบบการจัดการฟาร์ม และการควบคุมอินทรีย์สารในบ่อกุ้งของเกษตรกร เพื่อป้องกันโรคตายด่วน ในกุ้งทะเล. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีงบประมาณ 2557 เสนอสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา.

Sonthi, M., Toubiana, M., Pallavicini, A., Venier, P. and Roch, P. (2011). Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide Mytimycin (MytM) from the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biotechnology*; 13-857.

Sonthi, M., Cantet, F., Toubiana, M., Trapani, M.R., Parisi, M., G., Cammarata, M. and Roch, P. (2012). Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM). *Fish and Shellfish Immunology*; 32-45.

Cantet, F., Toubiana, M., Parisi, M.G., Sonthi, M., Cammarata, M. And Roch, P. (2012). Individual variability of mytimycin gene expression in mussel. *Fish & Shellfish Immunology*; 1-4.

Napaporn Leadprathom, Pornpimon Teangtarn, Kedsiri Ing-Kanorn, Jayakody A. Sumith and Molruedee Sonthi. (2012). Determining the Effect of Sediment Resuspension from the Activity of Phenoloxidase in Penaeid Shrimp Post Larvae. *American Journal of Environmental Sciences* 8; 304-310.

Molruedee Sonthi, Mylène TOUBIANA and Philippe ROCH. Antifungal peptide, Mytimycin (MytM) from Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Burapha University International Conference 2013 July 4 - 6, 2013, Pattaya Chonburi Thailand. (poster presentation)

มฤดี สนิธิ, วราวุฒิ สืบเพ็ง และบัลลังก์ เนื่องแสง. (2014). ผลของเบต้ากลูแคนต่อองค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคไวรัสในปลานิลแดง (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*). นำเสนอปากเปล่า ในการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6, 20-21 มีนาคม 2557, มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.

มะลิวัลย์ กุตะโค, ทนงศักดิ์ โตเจริญ, มฤดี สนิธิ, รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ. (2558). ปริมาณผลผลิตและรูปแบบโปรตีนคอลลาเจนจากเกล็ดปลาทะเลบ่อดำ (*Liza subviridis*) ที่สกัดด้วยเปปซินความเข้มข้นแตกต่างกัน. แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1; 562-567.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

7. โครงการซึ่งยังอยู่ระหว่างดำเนินการ

1. การศึกษาการแสดงออกของเปปไทด์ต้านจุลชีพในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ภายหลังการใช้โปรไบโอติก และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ แหล่งทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558
2. การปรากฏของ Covert Nodavirus ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี แหล่งทุน: คณะเทคโนโลยีทางทะเล ประจำปีงบประมาณ 2558