

## การประยุกต์ใช้โปรตีนต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial Peptides) ควบคุมโรคเรืองแสงในกุ้งขาววัยอ่อน

### Application of Antimicrobial Peptides for the Control of Vibriosis in White Shrimp Larvae

กรวิกา ศรีวัฒนวรรณ<sup>1</sup> ประทีป สองแก้ว<sup>1</sup> และ นฤต อินทรสังข<sup>2</sup>

<sup>1</sup>คณะเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ ต. พะวง อ. เมือง จ. สงขลา 90100

<sup>2</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ต. เขารูปช้าง อ. เมือง จ. สงขลา 90000

#### บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ Cecropin D ภายใต้ชื่อการค้า GladShrimp<sup>®</sup> โดยการตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ เพื่อนำไปใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งขาววัยอ่อนพบว่า Cecropin D มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 5,028 activity units/ml และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) เทียบกับ Cecropin A มาตรฐานที่ระดับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองใช้ GladShrimp<sup>®</sup> ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ปริมาณเริ่มต้น  $10^7$  cfu/ml ในน้ำเลี้ยงกุ้งขาวที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 ส่วนในล้านส่วน (ppm) เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline 0.3 ppm พบว่าการเติม GladShrimp<sup>®</sup> ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm ทำให้อัตราการรอดของลูกกุ้งขาววัยอ่อนที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีค่าสูงที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติม GladShrimp<sup>®</sup>

#### ABSTRACT

This study aimed to determine characteristics of the antimicrobial peptides, Cecropin D (GladShrimp<sup>®</sup>) its application for the control of *Vibrio harveyi*, the causative agent of luminous bacterial disease of white shrimp. The bioassay results showed that GladShrimp<sup>®</sup> exhibited inhibitory activity against *V.harveyi* with unit activity of 5,028 activity units/ml. GladShrimp<sup>®</sup> also showed Minimal Inhibitory Concentration (MIC) compared to the standard Cecropin A (Sigma, USA) at 2.50  $\mu$ g/ml. This study was conducted the white shrimp larvae experiment with regard to the vibriosis prevention by using, GladShrimp<sup>®</sup> at 0-10 ppm. It was found that the application of 10 ppm of GladShrimp<sup>®</sup> into the rearing tank gave the highest survival rate of white shrimp larvae challenged with *V. harveyi*. ( $10^7$  cfu/ml), compared to the oxytetracycline 0.3 ppm.

#### บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นแบบหนาแน่น (Super intensive system) ใช้พื้นที่กุ้งจากโรงเพาะฟักและมีการปล่อยในอัตราที่หนาแน่นส่งผลให้เกิดน้ำเสียจากการขับถ่ายและอาหารที่เหลือตกค้างทำให้ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเพิ่มขึ้นและเข้าทำลายกุ้งได้โดยตรง หากพบพันธุกรรมก่อโรคและติดเชื้อมักจะทำให้เกิดโรคระบาดในกุ้งขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงพบมากที่สุดจากบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติตลอดบริเวณชายฝั่งของประเทศไทย (ชัยวุฒิ สุตทองคง. 2539) นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวแพร่ระบาดในต่างประเทศ เช่น ประเทศไต้หวัน (Kou et al. 1989) ฟิลิปปินส์ (Lavilla- Pitogo et al. 1990,

Baticados et al. 1990) ออสเตรเลีย และอินโดนีเซีย (Owens et al. 1992) ดังนั้นเกษตรกรจึงมีการควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อการเพาะพันธุ์กุ้ง โดยการเข้ายาปฏิชีวนะและสารเคมีจึงทำให้เกิดการตกค้างในดินและน้ำเลี้ยง เป็นสาเหตุให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา เกษตรกรจึงจำเป็นต้องเพิ่มการเข้ายาปฏิชีวนะและสารเคมีให้มากขึ้น จนทำให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้งและสิ่งแวดล้อม (ลิลลา เรื่องแป้น. 2545) มีการตรวจพบการปนเปื้อนสารปฏิชีวนะเกินมาตรฐาน ต่างประเทศจึงส่งคืนผลิตภัณฑ์กุ้งส่งออกจากประเทศไทยและสั่งงดการนำเข้ากุ้งจากไทย

Cecropin เป็นเปปไทด์ด้านจุลินทรีย์ที่มีประจุบวกมาก (Cationic peptides) พบครั้งแรกในน้ำเลือดของหนอนไหม *Hyalophora cecropia* ซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก ภายหลังพบ Cecropin มากมายในสัตว์จำพวกแมลง หรือแม้แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เปปไทด์ในกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็นเกลียวตรงแบบ  $\alpha$  - helix แยกเป็นสองส่วนเชื่อมต่อกันคล้ายบานพับ มีคุณสมบัติของปลายข้างหนึ่งมีประจุบวกและชอบน้ำส่วนอีกข้างหนึ่งไม่มีประจุ (Amphipathic) โดยปลายด้าน C-terminal เป็นด้านที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3 - 4 kDa (Vizioli and Salzet. 2002) มีความยาวของกรดอะมิโนประมาณ 31 - 39 หน่วย มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในวงกว้าง (Kjuul et al. 1999) โดย Cecropin มีความไวในการต้านแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก เปปไทด์ชนิดนี้จะไม่ถูกสร้างเก็บไว้ในเซลล์เพราะจะถูกเอนไซม์ย่อยสลาย สิ่งมีชีวิตจะมีการสร้างเมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมนอกเซลล์ หรือเพื่อเป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคเท่านั้นและพบว่าปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับ Cecropin อย่างแพร่หลาย เช่นมีการถ่ายโอนยีน Cecropin D ซึ่งมีความยาวของกรด

อะมิโน 36 หน่วยเข้าสู่ต้นยาสูบ พบว่ายาสูดที่ได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าวสามารถต้านทานโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* (Huang et al. 1992) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Li และคณะ (1998) มีการถ่ายโอนยีน Cecropin B เข้าสู่ใบยาสูบเช่นกัน โดยพบว่ายาสูดสามารถต้านทานต่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* ได้ดีกว่าพืชปกติ และยังประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนยีน Cecropin B และ Cecropin P1 เข้าไปในเซลล์เอ็มบริโอของปลาแซลมอน พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของปลาได้ (Sharmasik and Chen. 2003) ในประเทศจีนก็มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Cecropin อย่างต่อเนื่อง จนในปัจจุบันได้ค้นพบยีน Md-Cec ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 63 หน่วย ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่สมบูรณ์ (Mature protein) จำนวน 40 หน่วย และโปรตีนส่งสัญญาณ (Signal protein) จำนวน 23 หน่วย ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดี (Liang et al. 2006)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพของ Cecropin D รวมทั้งเป็นการหาแนวทางการประยุกต์ใช้เปปไทด์ด้านจุลินทรีย์ในการควบคุมแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งขาววัยอ่อนซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของไทย Cecropin D เป็นสารสกัดจากหนอนไหม (*Antheraea pernyi*) เป็นสารมาจากธรรมชาติ (Huang et al. 1992) จึงไม่ส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมรวมถึงเป็นการลดการใช้ยาและสารเคมีที่มีราคาค่อนข้างแพงซึ่งส่งผลกระทบต่อวงการตกค้างของสาร ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทั้งในด้านข้อมูลและผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง Cecropin D ภายใต้ชื่อการค้า GladShrimp<sup>®</sup> จากบริษัทผู้ผลิต Shenzhen Yipeng Bio-Engineering LTD. (SYBE) ประเทศจีน ซึ่งมีตัวแทนจำหน่ายคือ บริษัท Glad Nutritional Company ประเทศฮ่องกง (Hong Kong) ผลการวิจัยครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นการศึกษาค้นคว้าความเป็นไปได้ในการนำ Cecropin D มาใช้ควบคุมโรคเรืองแสงในกุ้งขาวเป็นครั้งแรก

## อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

### 1. การตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพของ Cecropin D

ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์โดยสังเกตจาก สี กลิ่น ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total dissolve solid, TDS) ค่าการนำไฟฟ้า และค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter (Sartorius, PP50, Germany) และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพจากคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V.harveyi* โดยวิธีชีววิเคราะห์ (Bioassay) ตามวิธีการของ Professor Huang Ziran (ติดต่อส่วนตัว) เพื่อหาค่าประสิทธิภาพการยับยั้ง (Microbial inhibition activity assay) มีหน่วยเป็น activity units/ml โดยการคำนวณตามสูตรดังนี้  $U$  (activity units/ml) เท่ากับ  $1000 \times 2^D$  ( $U$ , unit/ml) โดยที่ค่า  $D$  คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone - เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมทดสอบ

### 2. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) ของ GladShrimp®

เจือจาง GladShrimp® ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า (Two-fold serial dilution) เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีจำนวนเชื้อประมาณ  $10^7$  CFU/ml ใส่ในหลอดฝาปิดหลอดละ 50 ไมโครลิตร คูณสารละลาย GladShrimp แต่ละความเข้มข้นปริมาณ 50 ไมโครลิตร มาใส่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) เติมเกลือร้อยละ 1.5 นับโคโลนีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยทำการเปรียบเทียบกับสารบริสุทธิ์ Cecropin A (Sigma, USA) (ดัดแปลงจาก Hancock, 1999)

### 3. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Cecropin D ต่อการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในกุ้งขาววัยอ่อน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งเป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุมไม่เติม GladShrimp® ชุดที่ 2,3 และ 4 เติม GladShrimp® ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5, 10 ppm และชุดที่ 5 เติมยา Oxytetracycline (OTC) 0.3 ppm ลงในน้ำเลี้ยงกุ้งขาววัยอ่อน โดยเตรียมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเข้มข้น 30 ppm ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวให้มีความเค็มประมาณ 20 พีพีที ใส่ในตู้กระจกขนาดความจุ 50 ลิตร จากนั้นปล่อยลูกกุ้งขาวระยะโพสท์ลาร์วา 15 (PL-15) ในอัตราความหนาแน่น 50 ตัว/ลิตรให้อาหารสำเร็จรูป 1 สัปดาห์ เพื่อให้ลูกกุ้งปรับตัว เติมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ให้มีจำนวนในน้ำประมาณ  $10^7$  cfu/ml ทุกชุดการทดลอง จากนั้นเติม GladShrimp® แต่ละความเข้มข้นให้กระจายทั่วบ่อวันเว้นวันตลอดการทดลอง 15 วัน วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (One-way Analysis of Variance; ANOVA) ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ซึ่งการวิเคราะห์ทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.11.5 และ Excel 97 คำนวณหาอัตรารอดของลูกกุ้งจากสูตร

$$\text{อัตราการรอด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนลูกกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนลูกกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ตัว)}}$$

### 4. การนับจำนวนแบคทีเรียรวมในน้ำด้วยสารเรืองแสง 4', 6' Diamidino-2-phenylindone (DAPI)

นับปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำจำนวน 3 ครั้งในวันที่ 2, 8 และ 15 ของการทดลอง โดยตริงตัวอย่างน้ำ 1-5 มิลลิลิตร ผ่านเยื่อกรอง (Polycarbonate filter) ขนาดรู (Pore size) 0.2  $\mu\text{m}$  เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 mm โดยใช้ Vacuum pump ตามวิธีการของ Glöckner และคณะ (1996) แล้วนับจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดด้วยสารเรืองแสง DAPI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Epifluorescence (Olympus BX51, Japan) ถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพแบบ CCD (Olympus DP50, Japan) และ

โปรแกรมบันทึกภาพ Viewfinder Lite (Olympus, Japan) นับจำนวนแบคทีเรียโดยใช้โปรแกรม Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center at San Antonio ; UTHSCSA, USA) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Glöckner, Fuchs และ Amann (1999)

#### 5. การนับจำนวนแบคทีเรีย *V. harveyi* ในน้ำบนอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)

เก็บตัวอย่างน้ำมาเจือจางด้วยสารละลายเกลือแกงที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และนำมาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นับจำนวนโคโลนีสีเขียวทั้งหมดของแบคทีเรียในจิ้นัส *Vibrio* spp. โดยถือว่าเป็นปริมาณรวมของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

#### 6. การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ตรวจวัดคุณภาพน้ำในหน่วยทดลอง ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ความเค็ม (Salinity) อุณหภูมิ (Temperature) ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหลายพารามิเตอร์ Multiparameter YSI และหาปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Ammonium test และ Nitrite test ที่ใช้ร่วมกับเครื่อง Spectroquant NOVA 60 (Merck Ltd., Germany)

### ผลการศึกษา

#### 1. คุณสมบัติพื้นฐานทางกายภาพและทางเคมี และชีวภาพของ GladShrimp®

จากการตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางกายภาพและเคมีพบว่าสารละลาย GladShrimp® มีสีน้ำตาล มีกลิ่นคล้ายน้ำหมักยีสต์ ค่าปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมดเท่ากับ 2,020 มก./ล. ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.3 ค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 4,050  $\mu\text{S}/\text{cm}$  และจากการทดสอบ Bioassay พบว่า GladShrimp® มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 5,028 activity units/ml

#### 2. ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) ของ GladShrimp®

แบคทีเรีย *V. harveyi* MIC Range 0.313 - 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า MIC<sub>50</sub> มีค่าเท่ากับ 2.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารบริสุทธิ์ Cecropin A (Sigma, USA)

#### 3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Cecropin D ต่อการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งขาววัยอ่อน

หลังการทดลองนับจำนวนลูกกุ้งขาว (ตารางที่ 1) พบว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) โดยที่ชุดที่ 4 มีอัตราการรอดสูงสุดคือ ร้อยละ  $83.6 \pm 4.5$  และชุดที่ 1 มีอัตราการรอดต่ำที่สุด คือ ร้อยละ  $54.3 \pm 4.7$  ส่วนชุดที่ 3, 2 และ 5 มีอัตราการรอดเท่ากับร้อยละ  $72.0 \pm 4.4$ ,  $66.7 \pm 3.8$  และ  $61.0 \pm 9.0$  ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

#### 4. จำนวนแบคทีเรียรวมในน้ำด้วยสารเรืองแสง 4', 6' Diamidino-2-phenylindone (DAPI)

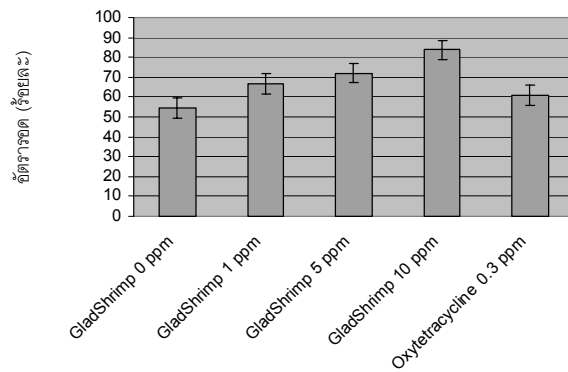
การตรวจนับแบคทีเรียรวมด้วยสารเรืองแสง 4', 6' Diamidino-2-phenylindone (DAPI) ครั้งที่ 1 พบว่าทุกชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) โดยชุดที่ 5 มีปริมาณแบคทีเรียรวมน้อยที่สุด ชุดที่ 3 และชุดที่ 4 มีปริมาณแบคทีเรียรวมมากที่สุด ในปริมาณเท่ากัน (ตารางที่ 2) การตรวจนับแบคทีเรียรวมครั้งที่ 2 พบว่าทุกชุดการทดลองปริมาณแบคทีเรียรวมมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) โดยชุดที่ 4 มีปริมาณแบคทีเรียรวมน้อยที่สุด ส่วนชุดการทดลองที่มีปริมาณแบคทีเรียรวมมากที่สุดคือ ชุดที่ 1 การตรวจนับเชื้อรวม ครั้งที่ 3 พบว่า ทุกชุดการ

ทดลองปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) โดยชุดที่ 4 มีปริมาณเชื้อน้อยที่สุด ส่วนชุดการทดลองที่มีปริมาณแบคทีเรียรวมมากที่สุดคือ ชุดที่ 1 (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 อัตราการรอดและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของลูกกุ้งขาวหลังชักนำให้เป็นโรคเรืองแสง

ชุดการทดลอง	อัตราการรอด (ร้อยละ)
1. GladShrimp <sup>®</sup> 0 ppm	54.3 <sup>cd</sup> ± 4.7
2. GladShrimp <sup>®</sup> 1 ppm	66.7 <sup>bc</sup> ± 3.8
3. GladShrimp <sup>®</sup> 5 ppm	72.0 <sup>b</sup> ± 4.4
4. GladShrimp <sup>®</sup> 10 ppm	83.7 <sup>a</sup> ± 4.5
5. Oxytetracycline 0.3 ppm	61.0 <sup>c</sup> ± 9.0

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $p < 0.05$ )



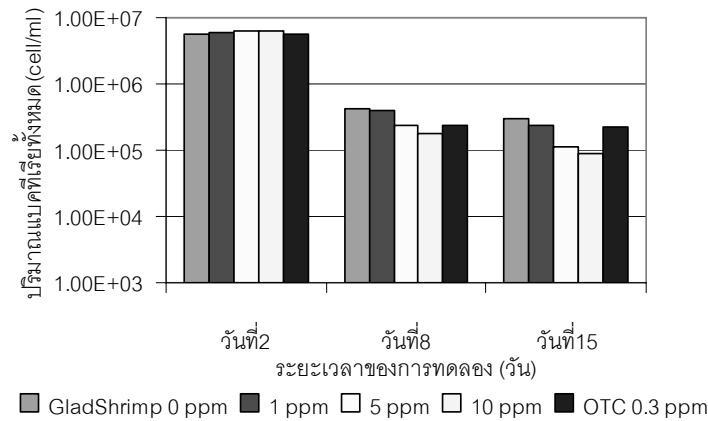
ภาพที่ 1 อัตราการรอดของลูกกุ้งขาวหลังจากชักนำให้ติดแบคทีเรีย *V. harveyi*

ตารางที่ 2 จำนวนแบคทีเรียรวมจากการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม DAPI

ชุดการทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียรวม (เซลล์/มิลลิลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 8	วันที่ 15
1. GladShrimp <sup>®</sup> 0 ppm	5.7×10 <sup>6 ab</sup>	4.1×10 <sup>5 a**</sup>	3.0×10 <sup>5 a**</sup>
2. GladShrimp <sup>®</sup> 1 ppm	6.0×10 <sup>6 a</sup>	4.0×10 <sup>5 a</sup>	2.3×10 <sup>5 b</sup>
3. GladShrimp <sup>®</sup> 5 ppm	6.1×10 <sup>6 a**</sup>	2.4×10 <sup>5 b</sup>	1.1×10 <sup>5 c</sup>
4. GladShrimp <sup>®</sup> 10 ppm	6.1×10 <sup>6 a**</sup>	1.7×10 <sup>5 c*</sup>	0.9×10 <sup>5 c*</sup>
5. Oxytetracycline 0.3 ppm	5.5×10 <sup>6 b*</sup>	2.4×10 <sup>5 b</sup>	2.2×10 <sup>5 b</sup>

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $p < 0.05$ )

\* หมายถึงปริมาณเชื้อที่พบน้อยที่สุด, \*\* หมายถึงปริมาณเชื้อที่พบมากที่สุด



ภาพที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจนับจากการย้อมสี 4', 6' Diamidino-2-phenylindone (DAPI) ตลอดระยะเวลาของการทดลอง

#### 5. จำนวนแบคทีเรีย *V. harvey* ในน้ำลงบนอาหาร TCBS

ผลจากการติดตามเชื้อครั้งที่ 1 ทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ผลจากการติดตามปริมาณเชื้อครั้งที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) ผลจากการติดตามปริมาณเชื้อครั้งที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) โดยชุดที่ 1 มีปริมาณเชื้อสูงสุด และชุดที่ 4 มีปริมาณเชื่อน้อยที่สุด (ตารางที่ 3) ผลจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่ไม่ใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร TCBS พบว่าทุกชุดการทดลองเชื้อมีแนวโน้มลดลง โดยชุดที่ 4 พบเชื้อกลุ่มดังกล่าวที่น้อยที่สุด (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* กลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร TCBS

ชุดการทดลอง	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml)		
	วันที่ 2	วันที่ 8	วันที่ 15
1. GladShrimp® 0 ppm	$1.6 \times 10^6$ a**	$2.2 \times 10^4$ a**	$1.5 \times 10^3$ a**
2. GladShrimp® 1 ppm	$1.5 \times 10^6$ a	$1.4 \times 10^4$ b	$3.2 \times 10^2$ b
3. GladShrimp® 5 ppm	$1.3 \times 10^6$ a	$8.6 \times 10^3$ bc	$2.1 \times 10^2$ b
4. GladShrimp® 10 ppm	$1.0 \times 10^6$ a*	$4.6 \times 10^3$ c*	$9.3 \times 10^*$ b
5. Oxytetracycline 0.3 ppm	$1.4 \times 10^6$ a	$1.5 \times 10^4$ ab	$3.4 \times 10^2$ b

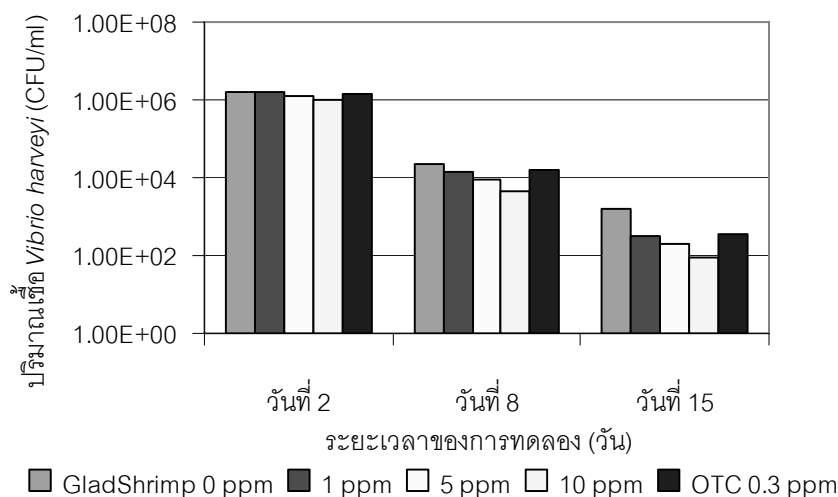
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $p < 0.05$ )

\* หมายถึงปริมาณเชื่อน้อยที่สุด, \*\* หมายถึงปริมาณเชื้อที่พบมากที่สุด

#### 6. คุณภาพน้ำในตู้ทดลอง

เมื่อใช้ GladShrimp® ควบคุมแบคทีเรีย *V. harvey* ในกุ้งขาววัยอ่อนเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า คุณภาพน้ำมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักถือว่าอยู่ในระดับปกติในการเลี้ยงกุ้ง โดยค่าคุณภาพน้ำต่างๆ อยู่ในช่วงดังต่อไปนี้ ค่าความเค็มอยู่

ในช่วง 21.87-21.92 พีพีที อุณหภูมิอยู่ในช่วง 27.31-27.46 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7.70-8.16 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำอยู่ในช่วง 7.70-9.08 มก./ล. และปริมาณแอมโมเนียในน้ำอยู่ในช่วง 0.11-0.21 มก./ล.



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในตู้ทดลองภายหลังการติดตามเชื้อจำนวน 3 ครั้ง

#### สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากการทดลองประยุกต์ใช้ Cecropin D เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคเรืองแสงทำให้มีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะในกุ้งขาววัยอ่อน โดยการเติม Cecropin ลงไปในน้ำเลี้ยงกุ้งโดยตรง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดสูงที่สุดและสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในน้ำได้มากที่สุดแสดงให้เห็นว่า GladShrimp<sup>®</sup> มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เหมือนกับยาปฏิชีวนะ (ลิลลา เรืองแป้น. 2545) นอกจากนี้ชุดที่ใช้ยาปฏิชีวนะพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ในปริมาณมาก อาจเกิดจากแบคทีเรียมีการดื้อยา (ประดิษฐ์ ชมชื่นชอบ และ ลิลลา เรืองแป้น. 2547) นอกจากนี้จากการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาสามารถยืนยันได้ว่ากุ้งขาวที่เป็นโรคเรืองแสงจะมีเนื้อเยื่อที่เสียหายถูกทำลายจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. และผลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างจากความเข้มข้น 5 ppm ดังนั้นเกษตรกรสามารถเลือกใช้ความเข้มข้น 5 ppm เติมนลงในน้ำเลี้ยงกุ้งเพื่อลดต้นทุนการผลิตและในการอนุบาลลูกกุ้งพบว่า Cecropin ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ และปัจจุบันกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้ Cecropin ผสมในอาหารเพื่อช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวตัวเต็มวัยให้สามารถในการต้านทานโรคและเป็นการป้องกันโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสซึ่งสามารถแก้ปัญหาให้กับเกษตรกรได้อย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น

#### เอกสารอ้างอิง

ชัยวุฒิ สุดทองคง. (2539). การแยกชนิดและการดื้อยาของแบคทีเรียเรืองแสงในบริเวณแหล่งน้ำชายฝั่งของประเทศไทย.

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ ชมชื่นชอบ และ ลิลลา เรืองแป้น. (2547). "ประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพและการดื้อยาของแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนใต้," วารสารการประมง. 57(5), 395-402.

ลิลลา เรืองแป้น. (2545). "ปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง," วารสารการประมง. 55(3), 203-212

- Baticados, M. C. L. (1990). "Disease of penaeid shrimp in the Philippines". Aquaculture Extension Manual. Tigbauan, Iloilo : Philippines.
- Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A. and Pernthaler, J. (1996). "An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria," Systematic Applied Microbiology. 19, 403–406.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. and Amann, R. (1999). "Bacterioplankton composition in lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization," Applied and Environmental Microbiology. 65, 3721-3726.
- Handcock, R. E. W. and Chapple, D.S. (1999). "Peptide antibiotics," Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 43(6), 1317-1323.
- Huang, Z. R., Xu, F., Zhuang, Z. and Li, J. (1992). "Transfer of synthetic antibacterial peptide D gene of *Antheraea pernyi* into tobacco plant. Journal of South China Agricultural University. 13(4), 1-5.
- Kjuul, A. K., Bullesbach, E. E., Espelid, S., Dunham, R., Jørgensen, T. Q. and Styrvold, O. B. (1999). Journal of Fish Disease. 22, 387-394.
- Kou, G. H., Chen, S. H. and Huang, S. L. (1989). "Studies on bacteria infection for culture *Penaeus monodon*," In; Abstract of ROC-JAPAN Symposium on Fish Disease. 6-7 Nov. 1989.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. R. and De la Pena, L. C. (1990). "Occurrence of Luminous bacteria disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines," Aquaculture. 91, 1-13.
- Li, N. J., Yuan, S. Q., and Huang, Z. R. (1998). "Transfer of Cecropin B gene into tobacco plant and confer the bacterial wild resistance," Journal of Agricultural Biotechnology. 6(6), 178-184.
- Liang, Y., Wang, J. X., Zhao, X. F., Du, X. J. and Xue, J. F. (2006). "Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*," Developmental & Comparative Immunology. 30(3), 249-257.
- Owens, L., Muir, P., Sutton, D. and Wingfield, M. (1992). "The pathology of microbial diseases in tropical Australian Crustacea," Diseases in Asian Aquaculture, (pp. 165-172). Manila : Fish Health Section Asian Fisheries Society.
- Winder, D., Gunzburg, W.H., Erfle, V. and Salmons, B. (1998). Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. Biochemical Biophysical Research. Communications, 242(3), 608-612.
- Sharmasik, A. and Chen, T. T. (2003). "Bacteriocidal activity of Cecropin B and Cecropin P1 expressed in fish cell (CHSE-214): application in controlling fish bacterial pathogens," Aquaculture. 220, 183-194.
- Vizioli, J. and Salzet, M. (2002). "Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates," Trends in Pharmacological Sciences. 23(11), 494-496.

