ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว

จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ[1] เจนจิตต์ คงกำเนิด[1] มณฑิรา ถาวรยุติการต์[1] และจิราพร เกษรจันทร์[2]
[1] สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง ๑๓๐/๒ ต. พะวง อ. เมือง จ. สงขลา ๙๐๑๐๐
[2] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมประมง เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

บทคัดย่อ

จากการศึกษาในหลอด (*in vitro*) พบว่าน้ำมันกระเทียมสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้หลายชนิดได้แก่ *Vibrio alginolyticus, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* และ *V. damsela* แต่ไม่มีผลในการต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อศึกษาผลของน้ำมันกระเทียมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อในตัวกุ้ง (*in vivo*) โดยเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone) ด้วยอาหารเสริมน้ำมันกระเทียมแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0 (ชุดควบคุม), 2.5 และ 5.0 % เป็นเวลา 14 วัน และเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจวัดการทำงานของภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส พบว่าหลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 7 วัน ไม่มีความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดระหว่างชุดทดลอง แต่กิจกรรมของเม็ดเลือดได้แก่การสร้างซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันกระเทียม 2.5% มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมและชุด 5.0% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเลี้ยงกุ้งทดลอง 14 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมและการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมและชุด 2.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่กิจกรรมฟีนอลออกซิเดสมีแนวโน้มสูงกว่าแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) การทดสอบความต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีอัตรารอดตายสูงกว่าชุดควบคุมและชุด 2.5% ทั้งที่ 7 และ 14 วัน การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าน้ำมันกระเทียมมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาว โดยการเสริมน้ำมันกระเทียมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่ระดับ 2.5 และ 5.0% ช่วยเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย ระดับของน้ำมันกระเทียมที่ควรเสริมในอาหารคือ 5.0% และระยะเวลาในการเลี้ยง 14 วัน

คำสำคัญ: น้ำมันกระเทียม กุ้งขาว (*Litopenaeus vanamei* Boone) ภูมิคุ้มกัน ความต้านทานโรค

Efficacy of Oil Macerated Garlic Extract on Immune Responses and Diseases Resistance in White Shrimp (*Litopeneaus vannamei* Boone)

Jumroensri Thawonsuwan[1] Janejit Kongkumnerd[1] Montira Thavonyuthikarn[1] and Jiraporn Kasornchandra[2]
[1] Coastal Aquatic Animal Health Research Institute, 130/2 Pawong, Muang, Songkhla 90100
[2] Department of Fisheries, Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900

ABSTRACT

From *in vitro* antibacterial and antiviral studies, oil macerated garlic extract could inhibited the growth of several pathogenic bacteria like *Vibrio alginolyticus, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* and *V. damsela* while there was no antiviral activity. Then the effect of oil macerated garlic extract on immune response and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) was studied *in vivo*. Triplicate groups of shrimp were completely randomized to feed on 3 experimental diets supplemented with different levels of oil macerated garlic extract at 0 (control), 2.5 and 5.0 % for 14 days. At 7 days after feeding, there were no differences of total haemocyte count among treatments while the superoxide anion and phenoloxidase activity of shrimp fed 2.5% oil macerated garlic extract was significantly higher than control and 5.0% oil macerated garlic extract supplemented groups. At 14 days post feeding, total haemocyte count and superoxide anion of shrimp fed 5.0% oil macerated garlic extract supplemented diet were significantly greater than control and 2.5% oil macerated garlic extract supplemented groups while phenoloxidase activity was highest in 5.0% oil macerated garlic extract supplemented group however there were no statistic significant different among the groups. For *V. alginolyticus* resistance, shrimp fed 5.0% oil macerated garlic extract had the highest survival rate both at 7 and 14 days. From the results of this study oil macerated garlic extract supplementation at 2.5 and 5.0% enhanced the immune responses of white shrimp, however when considering the disease resistance, 5.0% of oil macerated garlic extract feeding for 14 day is suggested.

Keywords: Oil Macerated garlic extract, white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone), immunity, disease resistance

---

* จำเริญศรี พวงแก้ว เจนจิตต์ คงกำเนิด มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และจิราพร เกษรจันทร์. 2553. ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว. การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติครั้งที่ 7. วันที่ 7-8 กันยายน 2553 โรงแรมทวินโลตัส จังหวัดนครศรีธรรมราช. หน้า 91-102.

คำนำ

ปัจจุบันกุ้งขาว *(L. vannamei*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่เป็นสินค้าส่งออกลำดับต้นๆ ของประเทศไทย ปัญหาเรื่องโรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งแก้ปัญหาโดยใช้ยาต้านจุลชีพและสารเคมีในการควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อกุ้งซึ่งส่งผลต่อเนื่องถึงผู้บริโภค นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียบางชนิดยังเกิดปัญหาดื้อยาทำให้การใช้ยาไม่ได้ผล อีกทั้งชนิดของยาที่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำมีจำกัด สมุนไพรจึงเป็นที่สนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อให้สามารถนำมาใช้แทนยาต้านจุลชีพได้ เนื่องจากสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีและไม่มีผลตกค้างที่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค สำหรับเชื้อไวรัสยังไม่มียาหรือสารเคมีที่สามารถรักษาโรคให้หายได้แต่แนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้คือการทำให้กุ้งมีระบบการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคหรือระบบภูมิคุ้มกันที่แข็งแรงซึ่งสามารถทำได้หลายแนวทาง เช่น การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สารโปรไบโอติก สารนิวคลีโอไทด์ และการใช้สารสมุนไพร ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

กระเทียม (Garlic) เป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิต และเชื้อไวรัส (Haris, 2001) จากการศึกษาของวรวุฒิและคณะ (2547) พบว่าการใช้กระเทียมสดผสมในอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สามารถลดปริมาณพยาธิกรีการีนในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ และจากการศึกษาในหลอดทดลอง *(In vitro* study) พบว่ากระเทียมสดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งได้อีกด้วย (Kasornchandra *et al*., 2005; มณฑิราและคณะ, 2550) อย่างไรก็ตามสมพรและคณะ (2551) พบว่าการเสริมกระเทียมสดในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำช่วยเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกันแต่ไม่มีผลในการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยส่วนใหญ่กระเทียมถูกนำมาใช้ในลักษณะของกระเทียมสดซึ่งมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคืออัลไลซิน (Allicin) ฤทธิ์ทางชีวภาพของกระเทียมเกิดจากสารสำคัญรูปแบบต่างๆที่มีอยู่ในกระเทียมซึ่งมีซัลเฟอร์ (Sulfure) เป็นองค์ประกอบหลัก สารสำคัญดังกล่าวแตกต่างกันตามลักษณะของกระเทียมที่ใช้ กระเทียมสดจะมีสารอัลไลซินเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีแต่สารดังกล่าวไม่คงตัว สลายได้ง่าย ส่วนน้ำมันกระเทียมมีสารอะโจอีน (Ajoene) และสารประกอบอื่นที่เป็นอนุพันธุ์ของอัลไลซินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและเชื้อไวรัส (Yoshida *et al*., 1987) และมีความคงตัวมากกว่าสารอัลไลซินในกระเทียมสด จากการศึกษาผลของสารออกฤทธิ์จากกระเทียมต่อการฆ่าเชื้อไวรัสในหลอดทดลองพบว่าสารออกฤทธิ์อะโจอีน ซึ่งมีมากในน้ำมันกระเทียมมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารออกฤทธิ์รูปแบบอื่นในการฆ่าเชื้อไวรัส โดยมีรายงานประสิทธิภาพของสารสำคัญจากกระเทียมต่อความสามารถในการฆ่าเชื้อไวรัสในหลอดทดลองจากสูงไปต่ำได้แก่ อะโจอีน อัลไลซิน อัลลินเมธิลไธโอซัลฟิเนต และเมธิลอัลลินไธโอซัลฟิเนต ตามลำดับ (Weber *et al*., 1992) น้ำมันกระเทียมสามารถเตรียมได้ 2 วิธีคือ การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steaming) และการสกัดในน้ำมัน (Oil-macerated garlic extracts) น้ำมันที่ได้จากการกลั่นจะมีสาร diallyl disulfide และ diallyl trisulfide เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และต้านเชื้อแบคทีเรีย ส่วนน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมันจะมีอะโจอีนเป็นองค์ประกอบหลัก นักวิทยาศาสตร์พบว่าอะโจอีนมีคุณสมบัติทางยาที่สำคัญหลายประการ เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Naganawa *et al*., 1996) เชื้อรา (Eric, 1985) และไวรัส (Weber *et al*., 1992) ข้อมูลการใช้กระเทียมในรูปแบบของกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำมันจึงน่าสนใจในแง่คุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัสซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการเลี้ยงกุ้ง และในแง่ของวิธีการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากเกษตรกรสามารถเตรียมใช้เองได้ภายในฟาร์ม

งานวิจัยนี้มีขึ้นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำมันต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวเพื่อให้สามารถนำน้ำมันกระเทียมไปประยุกต์ใช้จริงในการป้องกัน และควบคุมโรคติดเชื้อของกุ้งขาวแวนนาไมในภาคสนามต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสในหลอดทดลอง
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสในกุ้งขาว

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมน้ำมันกระเทียม

นำกระเทียมชนิดกลีบใหญ่ที่มีขายในตลาด อ.เมือง สงขลา มาปอกเปลือก หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดด้วยโถปั่นอาหารให้ละเอียด นำกระเทียมที่ปั่นได้หมักในน้ำมันพืชในสัดส่วน 1:1 วางทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นแยกชั้นน้ำมันโดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง ทิ้งให้น้ำมันเกิดการแยกชั้น และเก็บชั้นน้ำมันใส่ขวด ปิดฝาให้สนิทเก็บที่ 4 ^{o}ซ. เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

2.1 เชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบความต้านทานเชื้อในหลอดทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งที่แยกบริสุทธิ์แล้ว 5 ชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. harveyi, V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Escherichi coli* ATCC 25922 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มีเกลือผสมอยู่ 1.5% สำหรับเชื้อ *E. coli* เลี้ยงในTSA ที่ไม่

ผสมเกลือ นำไปบ่มที่ 35°ซ. 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาปรับความเข้มข้นเชื้อให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland เบอร์ 0.5 (OD_{640} = 0.1) สำหรับใช้ในการทดสอบความต้านทานเชื้อในหลอดทดลอง

2.2 เชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบความต้านเชื้อในกุ้งทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มีเกลือผสมอยู่ 1.5% นำไปบ่มที่ 35°ซ. 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำมาปรับความเข้มข้นเชื้อให้ได้ 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 CFU/มล. และนำไปหาค่าความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้กุ้งขาวตาย 50% ภายในระยะเวลา 14 วัน โดยนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งขาว ตัวละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 10 ตัว บันทึกอัตราการตายของกุ้งทุกวัน

3. การเตรียมเชื้อไวรัส

เตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) จากกุ้งป่วยโดยตัดเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของกุ้งที่เป็นโรค บดในน้ำเกลือ 1.5% ในอัตราส่วน 1: 10 หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านหัวกรอง 0.20 ไมครอน แบ่งส่วนใสที่กรองได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ เก็บที่ -80°ซ. เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

หาความเข้มข้นเชื้อ WSSV ที่ทำให้กุ้งขาวตาย 50% ภายในเวลา 14 วัน โดยนำเชื้อไวรัสที่เตรียมได้มาเจือจางครั้งละ 10 เท่า และนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งขาว ตัวละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 10 ตัว บันทึกอัตราการตายของกุ้งทุกวัน

4. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในหลอด (i*n vitro*)

4.1 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย(Antibacterial efficacy)

ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันกระเทียมด้วยวิธี Agar diffusion (Birada *et al*., 2007; Ajayi *et al*., 2008) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hilton Agar 18 มิลลิลิตร ผสมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 2 มิลลิลิตรตามข้อ 2.1 เทส่วนผสมของอาหารและเชื้อแบคทีเรียในจานแก้ว วางทิ้งให้แข็ง ก่อนจะเจาะผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งเจาะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำน้ำมันกระเทียมและยาออกซีเตตราซัยคลินใส่ในหลุมที่เจาะไว้ ตัวอย่างละ 3 หลุม หลุมละ 30 ไมโครลิตร นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ 35°ซ. นาน 18-24 ชั่วโมง ทำการวัดวงใส (Clear zone) ที่เกิดจากการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารที่ทดสอบ

4.2 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัส (Antiviral efficacy)

ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากจรีพร (2546) โดยนำน้ำมันกระเทียมมาละลายใน 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อนจะเจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 5, 50 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายน้ำมันกระเทียมแต่ละความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรผสมกับเชื้อตัวแดงดวงขาว (WSSV) ความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขาวตาย 50% ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งขาว ตัวละ 100 ไมโครลิตร แล้วเลี้ยงกุ้งในตู้ทดลองขนาด 45 ลิตร บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที จำนวน 30 ลิตร และเก็บข้อมูลอัตราการตายของกุ้งทดลองเป็นเวลา 14 วัน โดยมีชุดควบคุม 2 ชุดได้แก่กุ้งที่ฉีดเชื้อตัวแดงดวงขาวซึ่งไม่ผสมน้ำมันกระเทียมและกุ้งที่ฉีดเชื้อตัวแดงดวงขาวผสมน้ำมันพืชละลายใน DMSO ซึ่งเป็นน้ำมันที่ใช้เตรียมน้ำมันกระเทียมที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับน้ำมันกระเทียม

5. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

5.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 8-10 กรัมจากฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกรซึ่งผ่านการตรวจสุขภาพทั่วไป และการตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มาเลี้ยงในถังพลาสติกความจุน้ำ 3000 ลิตร ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง เพื่อปรับสภาพกุ้งทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นระยะ เวลา 2 สัปดาห์ โดยเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มน้ำ 15 พีพีที และให้อาหารสำหรับกุ้งขาว (Commercial diet) วันละ 3 ครั้ง

5.2 การเตรียมอาหารทดลอง

ใช้อาหารกุ้งขาวเบอร์ 3 ในการเตรียมอาหารทดลอง 3 ชุด โดยชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุมไม่ผสมน้ำมันกระเทียม ชุดที่ 2 และ 3 ผสมน้ำมันกระเทียม 2.5 และ 5.0% ซึ่งเตรียมโดยนำน้ำมันกระเทียมที่เตรียมได้ในข้อ 1. มาเคลือบเม็ดอาหารให้ทั่ว และเก็บอาหารทดลองที่เตรียมเสร็จแล้วในตู้เย็นตลอดการทดลอง

5.3 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่าง

คัดเลือกกุ้งขาวที่ปรับสภาพเรียบร้อยแล้วที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (9.0 ±1.0 กรัม) ลงเลี้ยงในบ่อคอนกรีตซึ่งบรรจุน้ำทะเลความเค็ม 15 พีพีที ปริมาตร 500 ลิตร จำนวน 9 บ่อๆ ละ 50 ตัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 3 ชุด ชุดการทดละ 3 บ่อ ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง เปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 1 ครั้งหลังให้อาหารทดลองมื้อแรก 2 ชั่วโมง ควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งโดยตรวจวัด ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ และอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงทุกวันก่อนให้อาหารมื้อแรก และเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อตรวจวัดค่าอัลคาไลน์ พีเอช แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

เลี้ยงกุ้งทดลองเป็นเวลา 14 วัน และเก็บตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจสอบค่าการตอบสนองของภูมิคุ้มกันทุก 7 วัน โดยเจาะเลือดกุ้งแต่ละตัวจำนวน 15 ตัวต่อชุดการทดลอง จากบริเวณฐานขาว่ายน้ำคู่ที่ 3 ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ซึ่งแช่ในน้ำแข็ง ก่อนจะแบ่งตัวอย่างมาทำการตรวจวัดค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Haemocyte Count: THC) และชนิดของเม็ดเลือด (Differential Haemocyte Count) นำเลือดกุ้งที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัวมาเจือจางด้วย 10% Formalin ในอัตราส่วน 1:1 และนำไปนับจำนวนเม็ดเลือดรวมโดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer) คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการแยกเม็ดเลือดแต่ละชนิดดำเนินการโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเลือดที่ผสมในฟอร์มาลิน 20 ไมโครลิตรมาผสมกับสีย้อม Rose Bengal (1.2% ใน 50% เอธานอล) 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างเกลี่ยบนสไลด์ (Smear) และนำไปย้อมสีตามวิธีการของ Sritunyalucksana *et al*. (2005) นับตัวอย่างเม็ดเลือดประมาณ 200 เซลล์ และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแต่ละชนิด ได้แก่ ไฮยาลินเซลล์ เซมิแกรนูลาเซลล์ และ ลาจแกรนูลาร์เซลล์

2. การสร้างอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion production) ของเซลล์เม็ดเลือด

นำเลือดกุ้งที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัว 20 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด 2xL-15, pH 7.4 ที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวของเลือดแอลซิสเตอีนอยู่ 3 % (3% L-cysteine) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หลังจากนั้นเติม 2xL-15 (+5% FCS) ปริมาณ 1,360 ไมโครลิตร และใช้ไมโครปิเปตดูดเลือดที่เจือจางแล้ว 100 µl ใส่ในถาดหลุม (96 wells plate) ตัวอย่างละ 9 หลุม นำไปบ่มที่ 26-28 ^{o}ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย L-15 ก่อนจะเติม L-15, NBT, Zymosan อย่างละ 3 หลุม ๆ ละ 100 µl นำไปบ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง ที่ 26-28 ^{o}ซ. หลังจากนั้นดูดสารแต่ละหลุมทิ้ง 100 µl และตรึงเซลล์ (Fix cell) ด้วย absolute methanol ปริมาตร 100 µl เป็นเวลา 3 นาที ก่อนจะล้างด้วย 70% methanol 3 ครั้งๆ ละ 100 µl และทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาเติม 2 M KOH 140 ไมโครลิตร และ DMSO 120 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm และนำมาคำนวณค่า Spontaneous O_2^- และ Stimulated O_2^- ดังนี้ Spontaneous O_2^- = OD_{620} of NBT-$OD_{620}$of L-15 ; Stimulated O_2^- = $OD_{620}$of Zymosan-$OD_{620}$of NBT

3. การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity, PO)

นำเลือดกุ้งที่เจาะได้จากกุ้งแต่ละตัว 150 ไมโครลิตร ผสมกับ Cacodylate buffer (CAC buffer) 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำให้แข็งโดยใช้น้ำแข็งแห้งและเก็บตัวอย่างที่ -80 ^{o}ซ. เพื่อรอวิเคราะห์ เมื่อต้องการวิเคราะห์นำตัวอย่างมาละลายและบดด้วยหัวบด ก่อนจะนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000xg เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส (Haemolysate; HLS) ที่มีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มาวิเคราะห์ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Leonard *et al*. (1985) และ Hernández-López *et al*. (1996)โดยใช้ L-DOPA (L-dihydroxyphenyl alanine) เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา วิธีการดังกล่าวทำได้โดยนำ HLS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุม (96 wells plate) ตัวอย่างละ 3 หลุม เติมสารกระตุ้นปฏิกิริยา Trypsin (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม L- DOPA (3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 20 นาที นำค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงมาใช้ในการหาค่าแอคติวิตี้ ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al*. (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อให้ทราบค่าหน่วย/นาที (unit/min) ของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วย คือความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001 /นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ในสารละลาย

4. การทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่มีความรุนแรงสำหรับกุ้งขาว โดยปรับความเข้มข้นเชื้อให้ได้ระดับที่ทำให้กุ้งขาวตาย 50% ภายในระยะเวลา 14 วัน (10^7 CFU/ml) นำไปฉีดเข้าใต้กล้ามเนื้อกุ้งทดลอง 15 ตัวต่อชุดการทดลอง ตัวละ 0.1 มล. และตรวจนับอัตราการตายเป็นระยะเวลา 14 วัน นำกุ้งที่แสดงอาการป่วยมาเขี่ยเชื้อบนอาหาร TCBS เพื่อยืนยันสาเหตุการตายของกุ้ง

5. การทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัส

เตรียมเชื้อ WSSV ที่ความเข้มข้นซึ่งทำให้กุ้งขาวตาย 50% ภายในระยะเวลา 14 วัน (10^{-8}) นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งทดลอง 15 ตัวต่อชุดการทดลอง ตัวละ 0.1 มล. และตรวจนับอัตราการตายเป็นระยะเวลา 14 วัน นำกุ้งที่ตายมาตรวจยืนยันการตายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way Analysis of Variance; One way ANOVA) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วย Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two way Analysis of Variance; Two way ANOVA) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของน้ำมันกระเทียมและระยะเวลาในการเลี้ยง

ผลการศึกษา

1. ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียในหลอด (*in vitro* antibacterial)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันกระเทียมในหลอดทดลองพบว่าน้ำมันกระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้หลายชนิด โดยมีความกว้างของวงใส ตั้งแต่ 9.2 ถึง 13.0 มม. ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันกระเทียมโดยวิธี Agar diffusion

Bacteria	Diameters of inhibition zone (mm) (Mean±SD)	
	Oil macerated garlic extract*	Oxytetracyclin (30 μg)
E. coli ATCC 25922	9.2 ± 0.6	13.2 ± 1.1
V. harveyi	10.0 ± 0.7	16.5 ± 1.6
V. parahemolyticus	9.2 ± 0.7	13.1 ± 1.5
V. alginolyticus	9.7 ± 0.5	13.6 ± 1.3
V. vulnificus	12.9 ± 0.5	0
V. damsela	13.0 ± 0.0	0

* ศึกษาจากกระเทียม 3 ชุด ที่ซื้อจากตลาดที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน ชุดละ 3 ซ้ำ

2. ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไวรัสในหลอด (*in vitro* antiviral)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของน้ำมันกระเทียมในหลอดทดลองพบว่าน้ำมันกระเทียมไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

3. ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

3.1 ผลการตรวจสอบความสัมพันธ์ของระดับน้ำมันกระเทียมและระยะเวลาการเลี้ยงโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ 2 ทาง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Two way ANOVA พบว่าระดับของน้ำมันกระเทียมและระยะเวลาการเลี้ยงมีผลร่วมกันต่อค่าอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน แต่ไม่ผลต่อค่าอื่นๆ ที่ทำการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 2

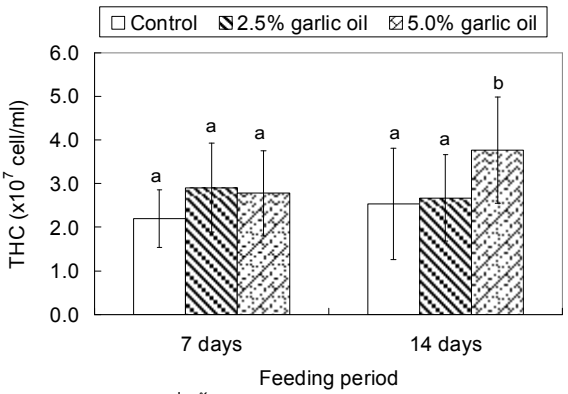
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสัมพันธ์ของระดับน้ำมันกระเทียมและระยะเวลาการเลี้ยงโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA)

พารามิเตอร์ที่ตรวจวัด	ระดับน้ำมันกระเทียม[1]	ระยะเวลา[2]	ระดับน้ำมันกระเทียม x ระยะเวลา
THC	*[3]	ns[4]	ns
Hyaline cell	*	*	ns
Semi-granular cell	*	ns	ns
Large-granular cell	ns	ns	ns
Spontaneous O_2^-	*	*	*
Stimulated O_2^-	*	*	*
PO activity	ns	ns	ns

หมายเหตุ [1]น้ำมันกระเทียม 3 ระดับ 0, 2.5, 5.0%, [2]ระยะเวลาในการเลี้ยง 2 ระยะ 7 และ 14 วัน, [3] * แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญ P=0.05, [4]ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

3.2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total Haemocyte Count: THC)

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% เป็นเวลา 14 วัน มีค่า 3.77×10^7 เซลล์/มล. ซึ่งสูงกว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ 7 วันหลังจากเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียมทั้ง 2 ระดับคือ 2.5% (2.91×10^7 เซลล์/มล.) และ 5% (2.78×10^7 เซลล์/มล.) มีแนวโน้มของปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงกว่ากุ้งชุดควบคุมซึ่งที่มีปริมาณเม็ดเลือด 2.19×10^7 เซลล์/มล. ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 7 และ 14 วัน
(ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

3.3 ปริมาณเม็ดเลือดแยกตามชนิด (Differential blood cell count: DHC)

หลังจากเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 7 และ 14 วัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5 และ 5.0% มีค่าสูงกว่าเม็ดเลือดของกุ้งชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติพบว่าเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์และแกรนูลาร์ ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% เป็นเวลา 7 วันมีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% เล็กน้อย แต่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจาก 14 วัน พบว่าเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% และกุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% เล็กน้อยแต่สูงกว่ากุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นกัน ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณเม็ดเลือดแยกตามชนิด (Differential Haemocyte Count: DHC) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

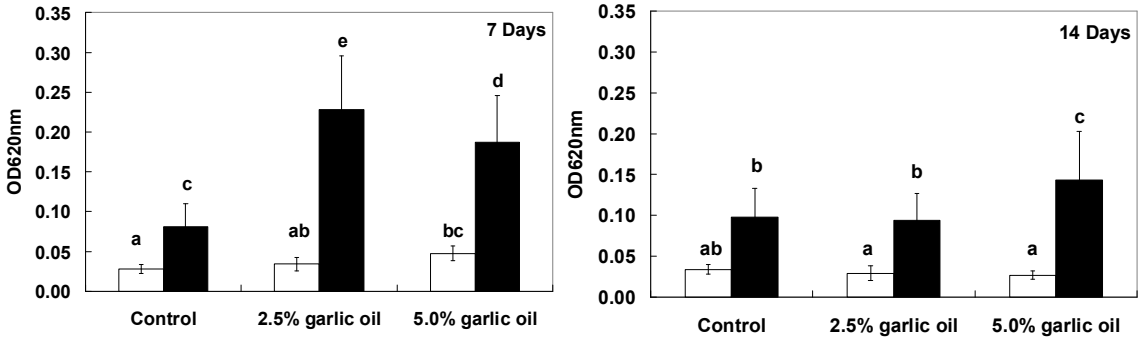
Parameters ($x10^7$ cell/ml)	Duration	Treatment		
		Control	2.5% Garlic oil	5.0% Garlic oil
Hyaline cell	7 days	1.71 ± 0.49^{a}	2.09 ± 0.57^{a}	2.13 ± 0.69^{a}
Semi-granular cell		0.29 ± 0.16^{a}	0.48 ± 0.29^{b}	0.38 ± 0.21^{ab}
Large-granular cell		0.19 ± 0.10^{a}	0.33 ± 0.22^{b}	0.27 ± 0.17^{ab}
Hyaline cell	14 days	1.99 ± 1.00^{a}	2.02 ± 0.80^{a}	2.93 ± 0.85^{b}
Semi-granular cell		0.29 ± 0.13^{a}	0.33 ± 0.19^{ab}	0.47 ± 0.25^{b}
Large-granular cell		0.26 ± 0.27^{a}	0.32 ± 0.23^{a}	0.37 ± 0.21^{a}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับที่แตกต่างกันของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4 การสร้างอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion production) ของเซลล์เม็ดเลือด

อนุมูลอิสระชนิดซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งโดยที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมหรือที่เรียกว่า Spontaneous O_2^- ที่ 7 วันหลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองมีค่าสูงสุดในกุ้งที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% สำหรับอนุมูลอิสระชนิดซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งโดยที่ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมหรือที่เรียกว่า Stimulated O_2^- ในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียมที่ 2.5 และ 5.0% มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียมที่ 2.5% มีค่าสูงกว่าที่ 5.0% อย่างมีนัย สำคัญทางสถิติด้วยเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 2

สำหรับที่ 14 วันหลังการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง ไม่มีความแตกต่างของค่า Spontaneous O_2^- ระหว่างชุดทดลอง ในขณะที่การสร้าง Stimulated O_2^- ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีค่าสูงกว่าที่ 2.5% และสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 2

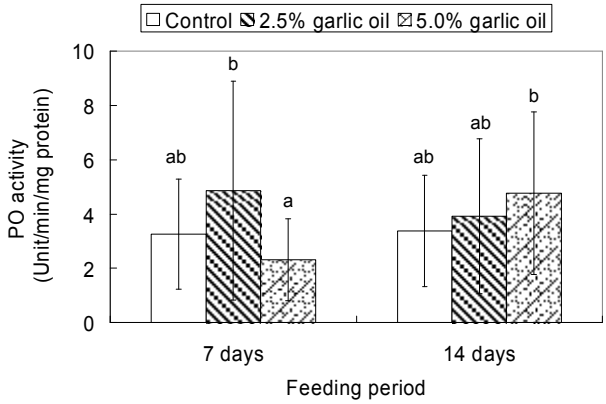


ภาพที่ 2 การสร้างอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน □ Spontaneous O_2^- ■ Stimulated O_2^- (ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

3.5 ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส(Phenoloxidase activity)

เมื่อพิจารณาที่ระดับเดียวกันของน้ำมันกระเทียมพบว่าค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5 % ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 7 และ 14 วัน แต่ กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดที่ 14 วันสูงกว่า 7 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 3

เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองพบว่าที่ 7 วัน ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% มีค่าสูงสุด โดยสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ($P>0.05$) สำหรับที่ 14 วัน ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีค่าสูงสุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลองดังแสดงในภาพที่ 3



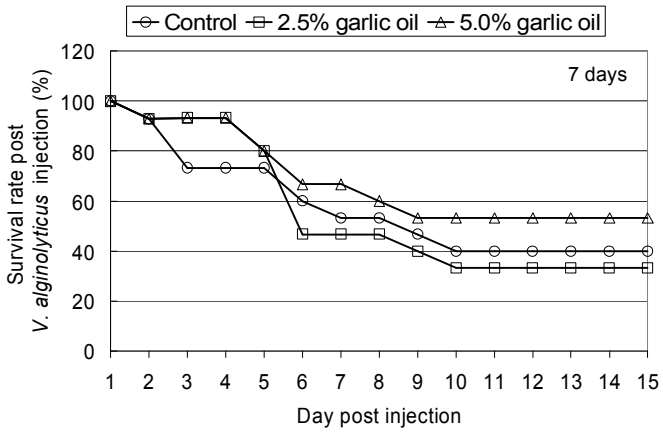
ภาพที่ 3 ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 7 และ 14 วัน
(ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

3.6 ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาว

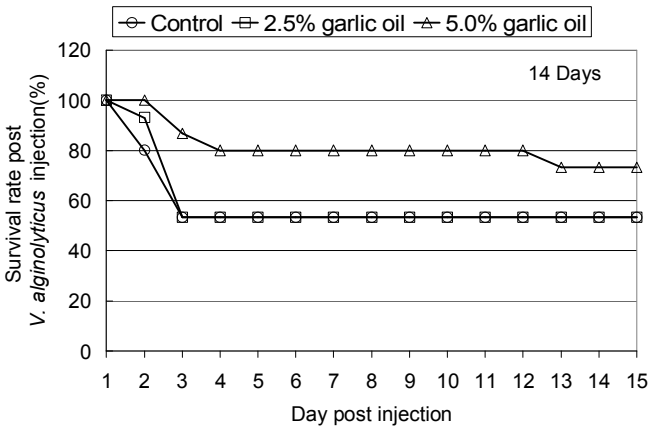
หลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 7 วันและนำกุ้งมาฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีอัตรารอดตายสูงสุดคือ 53% ในขณะที่อัตรารอดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% และชุดควบคุมมีอัตรารอด 33 และ 40% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 14 วัน อัตรารอดตายของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% มีค่า 73% ซึ่งสูงกว่าอัตรารอดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% และชุดควบคุมซึ่งมีอัตรารอดอยู่ที่ 53% เท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 5

3.7 ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการต้านทานเชื้อตัวแดงดวงขาว

หลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลอง 7 และ 14 วัน และนำกุ้งมาฉีดเชื้อตัวแดงดวงขาวพบว่า การเสริมน้ำมันกระทียมไม่มีส่วนช่วยให้อัตรารอดของกุ้งสูงขึ้น (ไม่แสดงข้อมูล)



ภาพที่ 4 อัตรารอดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วันและนำมาฉีดเชื้อ *V. alginolyticus*



ภาพที่ 5 อัตรารอดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 14 วัน และนำมาฉีดเชื้อ *V. alginolyticus*

วิจารณ์ผล

การใช้สมุนไพรสำหรับการเลี้ยงกุ้งเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เนื่องจากสมุนไพรมีกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายรูปแบบ ทั้งคุณสมบัติในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อโดยตรงและคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Weber *et al*., 1992) การศึกษาการยับยั้งเชื้อในหลอดทดลองเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารต่างๆ ที่สนใจ (Richards and Xing, 1993) จากการศึกษาในหลอดทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำมันกระเทียมมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งได้หลายชนิดได้แก่ *V. alginolyticus, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* และ *V. damsela* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ อย่างไรก็ตามการยับยั้งเชื้อ *V. alginolyticus, V. harveyi, V. parahaemolyticus* ของน้ำมันกระเทียมยังด้อยกว่ายาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินซึ่งเป็นยาที่อนุญาตให้ใช้ได้ในสัตว์น้ำ นอกจากนี้พบว่ายาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. vulnificus* และ *V. damsela* ได้ในขณะที่น้ำมันกระเทียมมีผลในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ดี สำหรับในกุ้งขาวยังไม่มีรายงานความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* และ *V. damsela* การทดลองครั้งนี้จึงไม่ได้ใช้เชื้อทั้งสองชนิดในการทดสอบความต้านทานเชื้อ แต่ใช้เชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งมีรายงานว่ากุ้งขาวมีความไวต่อเชื้อชนิดนี้ (Liu *et al*., 2004) จากการศึกษาของ Lawson *et al*. (1991) พบว่าน้ำมันกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำมันมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้แก่ไวนิลไดอีน (vinyldithiins) 70%, ไดอัลคิลซัลไฟด์ (dialkyl sulfides) 18% และอะโจอีน (Ajoene) (12%) และเป็นกระเทียมรูปแบบเดียวที่มีอะโจอีนเป็นองค์ประกอบ และจากการศึกษาของ Ohta *et al*. (1999) พบว่าสารอะโจอีนในน้ำมันกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำมันมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ได้โดยมีค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) 10-25 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งดีกว่าดีกว่าสารกลุ่มไวนิลไดอีนและไดอัลคิลซัลไฟด์ซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มล. นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Yoshida *et al*. (1998, 1999a, 1999b) ที่รายงานความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบของสารอะโจอีนที่ได้จากน้ำมันกระเทียมที่สกัดด้วยน้ำมัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันกระเทียมในการทดลองครั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารอะโจอีน แต่เนื่องจากการสกัดสารอะโจอีนมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง การทดลองครั้งนี้จึงไม่ได้สกัดสารอะโจอีนออกมาใช้แต่ใช้ในรูปแบบของน้ำมันซึ่งง่ายในการเตรียมและสะดวกต่อการนำไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งในฟาร์มของเกษตรกร

จากการศึกษาการทำงานของภูมิคุ้มกัน พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันกระเทียมมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับ 5.0% ในระยะเวลาการเลี้ยง 14 วัน เม็ดเลือดเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดเป็นตัวชี้วัดในทางบวกสำหรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเนื่องจากเม็ดเลือดมีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ได้แก่การจับกินสิ่งแปลกปลอม การสร้างอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค และการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Supamattaya *et al*., 2005)โดยทั่วไปกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือกุ้งที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสจะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง (Hsieh *et al*., 2008; Li *et al*., 2008; Song *et al*., 2003) ซึ่งส่งผลให้การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดมีประสิทธิภาพลดลงด้วยเช่นกัน การเสริมน้ำมันกระเทียมที่ระดับ 5.0% ในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนของกุ้งขาว เม็ดเลือดกุ้งมี 3 ชนิด ได้แก่ไฮยาลิน เซมิแกรนูลาร์ และลาจแกรนูลาร์ เม็ดเลือดแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกัน ไฮยาลินเซลล์ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ระหว่างกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมจะมีการสร้างอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ รวมทั้งซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนออกมาเพื่อฆ่าเชื้อโรค การเพิ่มขึ้นของไฮยาลินเซลล์จึงทำให้กุ้งสามารถจับกินสิ่งแปลกปลอมและสร้างอนุมูลอิสระได้มากขึ้น (Supamattaya *et al*., 2005) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียมที่ 2.5% และ 5.0% มีปริมาณไฮยาลินเซลล์สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการสร้างอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่สูงกว่าด้วยเช่นกัน สำหรับเม็ดเลือดชนิด เซมิแกรนูลาร์และลาจแกรนูลาร์ ทำหน้าที่เกี่ยวข้อง

กับการทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่ากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงในกุ้งที่มีปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์และลาจแกรนูลาร์สูง โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมน้ำมันกระเทียม 2.5% นาน 7 วัน มีค่ากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด และมีปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์และลาจแกรนูลาร์สูงสุดด้วย ในขณะที่กุ้งซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสมน้ำมันกระเทียม 5.0% นาน 14 วัน มีค่ากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดในและมีปริมาณเม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลาร์สูงสุดด้วยเช่นกัน จากผลการศึกษาภูมิคุ้มกันในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันกระเทียมมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญในการเลี้ยงกุ้งได้แก่ *V. alginolyticus* (Lee *et al*., 1996), *V. harveyi* (Liu *et al*., 1996), *V. parahaemolyticus* (Sung *et al*., 2001), *V. vulnificus* (Song and Sung, 1990), *V. damsela* (Song *et al*., 1993) ในการศึกษาครั้งนี้นำเชื้อ *V. alginolyticus* มาใช้ในการทดสอบความต้านทานเนื่องจากมีรายงานว่ากุ้งขาวมีความไวต่อเชื้อ *V. alginolyticus* โดยกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* $4x10^6$ cfu/ตัว มีอัตราการตายสูงถึง 76.7% (Liu *et al*., 2004) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันกระเทียมที่ 5.0% เป็นเวลา 7 และ 14 วัน มีอัตรารอดตายหลังการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* สูงกว่าชุดควบคุมและชุดที่เสริมน้ำมันกระเทียม 2.5% แสดงให้เห็นว่าน้ำมันกระเทียมช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *V.alginolyticus* ให้กุ้งขาวซึ่งอาจเนื่องมาจากผลของการยับยั้งเชื้อโดยตรงร่วมกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปว่าการเสริมน้ำมันกระเทียมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวที่ระดับ 2.5% และ 5.0% ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานเชื้อร่วมด้วยการใช้น้ำมันกระเทียมเสริมในอาหารที่ระดับ 5.0% สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 14 วัน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกันและความต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* และจากการศึกษาเอกสารไม่ปรากฏว่ามีการศึกษาน้ำมันกระเทียมในสัตว์น้ำมาก่อน รายงานนี้จึงเป็นครั้งแรกในการนำน้ำมันกระเทียมมาใช้กับกุ้งขาวซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

จรีพร เรืองศรี. (2546). การตอบสนองกึ่งจำเพาะของภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon* Fabricius) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 129 หน้า.

มณฑิรา ถาวรยุติการต์, จำเริญศรี พวงแก้ว, เพ็ญศรี บุญตามช่วย และจิราพร เกษรจันทร์. (2550). การคัดเลือกสมุนไพรไทยบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2550 กรมประมง ร่วมกับศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ วันที่ 3-5 กรกฎาคม 2550 ณ ห้องประชุมกรมประมง. หน้า 205-215.

วรวุฒิ ชัชวาลชัยพรรณ, มณฑิรา ถาวรยุติการต์, และจิราพร เกษรจันทร์. (2547). การใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากกระเทียมในการยับยั้งพยาธิ Gregarines ในกุ้งกุลาดำ. การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5 คุณภาพกุ้งไทย มาตรฐานความปลอดภัยระดับโลก 29-30 มีนาคม 2547 โรงแรมมิราเคลแกรนด์ คอนเวนชั่น กทม. หน้า 335-342.

สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และจำเริญศรี พวงแก้ว. (2551). ผลของกระเทียมสดต่อระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง ปีที่ 61 ฉบับที่ 4. หน้า 350-357.

Ajayi, I.A., Jonathan, S.G., Adewuyi, A. and R.A. Oderinde. (2008). Antimicrobial Screening of the Essential Oil of Some Herbal Plants from Western Nigeria. World Applied Sciences Journal 3 (1): 79-81.

Birada, S.S., Goun, N,R., Neogi, U. and R. Saumya. (2007). *In vitro* and *In vivo* Antibacterial Studies of Medicinal Plant on Motile Aeromonad Septicemia in Fish Caused by *Aeromonas hydrophila*. Journal of Fisheries and Aquatic Science 2(6): 417-421.

Eric, B. (1985). The chemistry of garlic and onions. Scientific American 252: 114-119.

Harish, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S. and D. Lloyd. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (Garlic). Applied Microbiology and Biotechnology 57: 282-286.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and F. Vargas-Albores. (1996). Activation of the prophenol-oxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology 113C: 61-66.

Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H. and C.M. Kuo. (2008). Immune and physiological response in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture 275: 335-341.

Kasornchandra, J., Chutchawanchaipan, W., Thavornyutikarn and J. Puangkaew. (2005). Application of garlic (*Allium sativum*) as an alternate therapeutic for marine shrimp. Proceeding of The JSPS-NRTC International Symposium 19-24 December 2005 Kasetsart University, Thailand. Page 114-119.

Lawson, L.D., Wang, Z.Y. and B.G. Hughes. (1991). Identification and HPLC Quantification of the Sulfides and Dialk(en)yl Thiosulfinates in Commercial Garlic Products. Planta Medica 57: 363-370.

Lee K.K., Yu S.R., Chen F.R., Yang T.Z. and P.C. Liu. (1996). Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn *Penaeus monodon*. Current Microbiology 32: 229-231.

Leonard, C., Söderhäll, K. and N.A. Ratcliffe. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. Insect Biochemistry 15: 803-810.

Li, C.C., Yeh, S.T. and J.C. Chen. (2008). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. Fish & Shellfish Immunology 25: 853-860.

Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, J.P. and J.C. Chen. (2004). *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16SrDNA sequencing. Diseases of Aquatic Organisms 61: 169-174.

Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H. and S.N. Chen. (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased prawn *Penaeus japonicus*. Current Microbiology 33:129-132.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randell. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Naganawa, R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and A. Suzuki. (1996). Inhibition of Microbial Growth by Ajoene, a Sulfur-Containing Compound Derived from Garlic. Applied and Environmental Microbiology 62 (11): 4238-4242.

Ohta, R., Yamada, N., Kaneko, H., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and A. Suzuki. (1999). *In vitro* Inhibition of the Growth of *Helicobacter pylori* by Oil-Marcerated Garlic Constituents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43 (7): 1811-1812.

Richards, R. and D. Xing. (1993). *In-vitro* evaluation of the antimicrobial activities of selected lozenges. Journal of Pharmaceutical Sciences 82: 1218-1220.

Song, Y.L. and H.H. Sung. (1990). Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacteria prepared from *Vibrio vulnificus*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 10:98-99.

Song, Y.L., Cheng, W. and C.H. Wang. (1993). Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. Journal of Invertebrate Pathology 61:24-31.

Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huang, C.C. and M.N. Lin. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology 14: 317-331.

Sritunyalucksana, K., Gangnonngiw, W., Archakunakorn, D., Fegan, S. and T.M. Flegel. (2005). Bacterial clearance and a new differential haemocyte staining method to access immunostimulant activity in shrimp. Disease of Aquatic Organisms 63: 89-94.

Sung, H.H., Hsu, S.F., Chen, C.K., Ting, Y.Y. and W.L. Chao. (2001). Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of Vibrio communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquaculture 192:101-110.

Supamattaya, K., Chittiwan, V. and M. Boonyaratpalin. (2005). Immunological factors in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, Lexington, Kentucky, USA, 22-25 May 2005.

Weber, N.D., Anderson, D.O., North, J.A., Murray, B.K., Lawson, L.D. and B.G. Hughes. (1992). *In vitro* Virucidal Effects of *Allium sativum* (Garlic) Extract and Compounds. Planta Medicine 58 (5): 417-423.

Yoshida, H., Iwata, N., Katsuzaki, H., Naganawa, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and A. Suzuki. (1998). Antimicrobial activity of a compound Isolated from an Oil-Macerated Garlic Extract. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 62 (5): 1014-1017.

Yoshida, H., Iwata, N., Katsuzaki, H., Ohta, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and A. Suzuki. (1999a). An Organosulfur Compound Isolated from Oil-Macerated Garlic Extract, and its Antimicrobial Effect. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 63 (3): 588-590.

Yoshida, H., Katsuzaki, H., Ohta, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and A. Suzuki. (1999b). Antimicrobial Activity of the Thiosulfinates Isolated from Oil-Macerated Garlic Extract. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 63 (3): 591-594.

Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H. and S. Nakagawa. (1987). Antifungal activity of ajoene derived from garlic. Applied and Environmental Microbiology 53 (3): 615-617.