รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

The development of vaccination and feed additive inclusion via encapsulation techniques to stimulate the immune system of marine fish species infected with parasitic and bacterial pathogens

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
จารุนันท์ ประทุมยศ

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

รหัสโครงการ 2558A10803045
สัญญาเลขที่ 161/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

The development of vaccination and feed additive inclusion via encapsulation techniques to stimulate the immune system of marine fish species infected with parasitic and bacterial pathogens

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
จารุนันท์ ประทุมยศ
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. 2559

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ และจารุนันท์ ประทุมยศ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *P. jadinii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.45×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเม็ดเจลที่ตรึงยีสต์ *Pichia sp.* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุด ร้อยละ 21.20 ± 0.57 กรดโอเลอิกและกรดไลโนเลอิกร้อยละ 17.83 ± 0.35 และ 3.14 ± 0.10 ตามลำดับ ในขณะที่พบกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมดในเม็ดเจลแห้งร้อยละ 32.16 และ 20.36 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำ *P. jadinii* และปรสิต *Cryptocaryon irritans* ที่เก็บรวบรวมได้ปริมาณมากนำมาทดสอบชนิดของวัสดุและวิธีการตรึงเซลล์ เพื่อไม่ให้ละลายออกมาในน้ำ พบว่าสามารถตรึงตัวอย่างได้ด้วย โซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5

ต่อมานำอาหารที่ผลิตได้มาทดสอบต่อการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ให้กินอาหารทดลองหลายสูตรต่อการต้านทานปรสิตชนิด *C. irritans* โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (4x3 Completely Randomised Design) อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุมประกอบด้วยสูตรอาหารปลากะพง สูตรที่ 2 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย สูตรที่ 3 ประกอบด้วยอาหารปลาชุดควบคุมผสมยีตส์ *P. jadinii* สูตรที่ 4 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม Sodium alginate อาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 49-51 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมัน 12-13 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองในปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 6.21 ± 0.79 กรัมและความยาวเฉลี่ย 8.15 ± 0.58 เซนติเมตร ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์ โดยให้ปลากินอาหารทดลองแต่ละสูตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์แรกของการทดลองหลังจากนั้นเปลี่ยนให้ปลาทุกชุดการทดลองกินอาหารชุดควบคุมต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำปลากะพงขาวจำนวน 30 ตัวต่อชุดการทดลองไปเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 เซลล์/ปลา 1 ตัว พบว่าปลาที่กินอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีอัตราการรอดตายร้อยละ 83 และปลาที่กินอาหารสูตร 3 และ 4 มีอัตราการรอดตายร้อยละ 93 และ 90 ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซนต์รอดตายสัมพัทธ์ (RPS) พบว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตร 3 มีค่า RPS สูงสุดที่ 59

ในระหว่างการทดลองทำเก็บตัวอย่างเลือดปลาเริ่มต้นการทดลอง ตัวอย่างเลือดปลากินอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ตัวอย่างเลือดปลาที่กินอาหารชุดควบคุมหลังจากกินอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ และตัวอย่างเลือดปลาหลังจากเผชิญเชื้อเป็นระยะเวลา 3 7 และ 14 วัน เพื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้น ได้แก่ กิจกรรมไลโซไซม์ในซีรั่ม ปลาที่กินอาหารสูตรที่ 2 และ 3 ที่มีปรสิตและยีสต์เป็นองค์ประกอบมีปริมาณไลโซไซม์สูงกว่าปลากินอาหารชุด

ควบคุม และมีปริมาณไลโซไซม์ในซีรั่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง เมื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวโดยเทคนิค ELISA พบว่าปลาที่กินอาหารที่มีปรสิตและยีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีแนวโน้มของระดับของแอนติบอดีสูงกว่าปลาที่กินอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มีโซเดียมอัลจิเนตเป็นองค์ประกอบ โดยที่ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิตและยีสต์มีค่าใกล้เคียงกันเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 4 สัปดาห์ ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงพบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้น โดยเฉพาะปลาที่กินอาหารสูตรที่ 2 3 และ 4 และเมื่อให้ปลาเผชิญเชื้อแล้วเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีของปลาที่กินอาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 สูงขึ้น ส่วนระดับแอนติบอดีของปลาที่กินอาหารสูตรที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แต่เมื่อปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาหลังจากเผชิญเชื้อแล้ว 7 วัน ระดับแอนติบอดีของปลาสูงขึ้นในทุกชุดการทดลองซึ่งตรงกันข้ามกับปริมาณโปรตีนในซีรั่มที่มีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่มี *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตายเป็นส่วนผสมมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มสูงกว่าในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปรสิต *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย และยีสต์ *P. jadinii* สามารถกระตุ้นให้ปลาตอบสนองต่อแอนติเจนโดยสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

การทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ที่ให้กินอาหารทดลอง 4 สูตรต่อการต้านทานปรสิตชนิด *Cryptocaryon irritans* โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดเช่นเดียวกับปลากะพงขาว อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุม สูตรที่ 2 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย สูตรที่ 3 ประกอบด้วยอาหารปลาชุดควบคุมผสมยีตส์ *P. jadinii* สูตรที่ 4 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม Sodium alginate อาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 37-51 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมัน 16-19 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ปลาการ์ตูนส้มขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 1.18 ± 0.22 กรัมและความยาวเฉลี่ย 3.79 ± 0.27 เซนติเมตร ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์ โดยให้ปลากินอาหารทดลองแต่ละสูตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์แรกของการทดลองหลังจากนั้นเปลี่ยนให้ปลาทุกชุดการทดลองกินอาหารชุดควบคุมต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำปลาการ์ตูนจำนวน 30 ตัว/ซ้ำ ไปเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 1,500 เซลล์/ปลา 1 ตัว พบว่าพบว่าปลาที่กินอาหารสูตร 2 มีอัตราการรอดสูงสุด 100% รองลงมาได้แก่ปลากินอาหารสูตร 3 และ 4 มีอัตราการรอด 97% ทั้งสองชุด ส่วนปลาชุดควบคุม มีอัตราการรอดที่ 93% และเมื่อนำมาหาค่าอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) พบว่า ปลาปลาที่กินอาหารสูตร 2 และ 3 มีค่า RPS สูงถึง 100 และ 57 ตามลำดับ การทดลองครั้งที่ 2 ปลาการ์ตูนมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.97 ± 0.11 ก. และขนาดเฉลี่ย 3.38 ± 0.14 ซม. ให้กินอาหาร 4 สูตรเดิม โดยให้กินอาหารสูตรทดลอง 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารสูตร 1 ต่ออีก 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย นำปลาแต่ละชุดการทดลองมาจำนวน 30 ตัว/ซ้ำ ให้เผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 1,500 theronts/ปลา 1 ตัว เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดตายของปลาการ์ตูนชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ 28.89%, 55.56%, 23.33% and 68.89% ตามลำดับ ค่า RPS ของชุดการทดลองที่ 2 มีค่า

ในระหว่างการทดลอง ทำเก็บตัวอย่างเลือดปลาเมื่อครบสัปดาห์ที่เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยน แปลงของระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นในซีรั่ม สำหรับการทดลองในปลาการ์ตูนครั้งที่ 1 พบว่าค่าแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีค่าสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาพบว่าชุดการทดลองที่ 2 มีค่าโปรตีนสูงสุดที่ ที่สัปดาห์ที่ 6 และในการทดลองกับปลาการ์ตูนครั้งที่ 2 ไม่พบค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ antibody titers และระดับของโปรตีนในซีรั่มปลาทั้ง 4 ชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

The development of vaccination and feed additive inclusion via encapsulation techniques to stimulate the immune system of marine fish species infected with parasitic and bacterial pathogens

Supannee Leethochavalit, Janjarus Watanachote and Jarunan Pratoomyo

Abstract

The marine yeast *Pichia* sp. was cultured in a sugarcane bagass media adjusted to a salinity of 25 ppt. for a period of 96 h. Peak growth was observed at 72 h when the cell number reached 2.45 x 10^8 cells/ml. The fatty acid components of the immobilized yeast cells in calcium alginate beads were subsequently analysed. Palmitic acid represented the main component with a value of 21.20 ± 0.57%. Oleic and linoleic acids were also detected and found to represent 17.83 ± 0.35% and 3.14± 0.10% respectively. The total saturated and total monounsaturated fatty acid components of the dried yeast cells beads were 32.61% and 20.36% respectively. Effective immobilization of the *Pichia* sp. cells was achieved using a combination of 1.2% w/v sodium alginate and 1.5% w/v calcium chloride for the appropriate restriction of gross nutrients within the yeast cells.

The present study set out follow changes in a number of selected immune parameters in Asian seabass, *Lates calcarifer*, that were fed a range of experimental diets and then subsequently challenged with the infective stages of the ciliate *Cryptocaryon irritans*. A 4 x 3, completely randomised design was used to investigate the responses of the fish fed the experimental diets. The four experimental diets were: 1) the control diet, *i.e.* a seabass basal feed; 2) inactivated theronts of *C. irritans* mixed with the same control diet that was used as diet 1; 3) a mixture of the control diet and the yeast *Pichia* sp.; and, 4) a mixture of the control diet and sodium alginate. All the experimental diets contained between 49-51% protein and 12-13% lipid. The initial weight and length of the fish were 6.21 ± 0.79 g and 8.15 ± 0.58 cm respectively. Throughout the 4-week long feeding trial, the fish were fed at 3% body weight day^{-1}. Each group of fish were fed on their relevant experimental diet for two weeks and then were switched onto the control diet for a further two weeks. At the end of the feeding period, 30 fish from each treatment group were taken and challenged with live theronts of *C. irritans* at a dose of 15,000 theronts $fish^{-1}$. Eighty-three percent of the fish fed diets 1 and 2 survived the challenge, while 93% and 90% of those fed diets 3 and 4 respectively survived.

During the trial, blood samples were taken at key time points from each group of fish to monitor lysozyme activity; samples were taken at the start and end of the feeding period with the experimental diets and then on days 3, 7 and 14 post-challenge. The highest levels of lysozyme activity were seen by the end of the fourth week on the experimental diets, with the fish in the groups fed diets 2 and 3 having higher levels of lysozyme than those fed the control diet. An ELISA confirmed that the levels of serum antibody in the fish fed diets 2 and 3 for two weeks had increased and were better than those fish fed on diets 1 and 4. By the end of the feeding period at the end of week 4, the fish fed diets 2 and 3 had similar levels of serum antibody. Serum protein was found to increase throughout the trial in those groups of fish fed on diets 2, 3 and 4, which had higher levels than those fed the control diet. The level of serum antibody in the groups of fish fed diets 1-3, increased after the fish were challenged with *C. irritans,* while the levels of serum antibody in the fish given diet 4 remained unchanged throughout the trial. Seven days after the fish were challenged with the parasite, trophonts could be seen on the bodies of the fish and the levels of antibody serum rose while the levels of protein serum fell in all the experimental fish. The fish fed the diet containing the inactivated theronts of *C. irritans*, however, had higher levels of protein serum than those fed the control diet indicating that the inactivated theronts and the *Pichia* sp. were able to stimulate the *L. calcarifer* to respond to the antigens of the parasite by increasing their levels of antibody.

Finally, this study set out follow changes in a number of selected immune parameters in clownfish, *Amphiprion ocellaris*, that were fed a range of experimental diets and then subsequently challenged with the infective stages of the ciliate *Cryptocaryon irritans*. A 4 x 3, completely randomised design was used to investigate the responses of the fish fed the experimental diets. The four experimental diets were: 1) the control diet, *i.e.* an ornamental basal feed; 2) inactivated theronts of *C. irritans* mixed with the same control diet that was used as diet 1; 3) a mixture of the control diet and the yeast *Pichia* sp.; and, 4) a mixture of the control diet and sodium alginate. All the experimental diets contained between 37-51% protein and 16-19% lipid. Based on the first experiment, the initial weight and length of the fish were 1.18 ± 0.22 g and 3.79 ± 0.27 cm respectively. Throughout the 4-week long feeding trial, the fish were fed at 3% body weight day^{-1}. Each group of fish were fed on their relevant experimental diet for two weeks and then were switched onto the control diet for a further two weeks. At the end of the feeding period, 30 fish from each treatment group were taken and challenged with live theronts of *C. irritans* at a

dose of 1,500 theronts fish^{-1} for 2 weeks. The survival rate of each group were 93%, 100%, 97% and 97%, respectively. These results showed no significantly difference in survival rate. The RPS of treatment 2 and 3 were 100 and 57, respectively. The second experiment, the initial weight and length of the fish were 0.97 ± 0.11 g and 3.38 ± 0.14 cm respectively. The same diet is used in this experiment. Each group were fed on their experiment diet for one week then were swithched onto control diet for one week until 8 weeks. Then, 30 fish from each treatment group were taken and challenged with live theronts of *C. irritans* at a dose of 1,500 theronts fish^{-1} for 3 weeks. The survival rate of each group were 28.89%, 55.56%, 23.33% and 68.89%, respectively. The RPS of fish fed diet 2 was 38.

During the trial, blood samples were taken at key time points from each group of clownfish to monitor an antibody titers by ELISA technique. In the first experiment, the antibody titers significantly increased when fish were fed with diet 2 and 3 at week 5 and 6, respectively. The highest protein serum were detected in clownfish fed with diet 2 at week 6. In the second experiment, the results showed no significant difference in antibody titers and protein serum during the experimental period.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี พ.ศ. 2558 เลขที่สัญญา 161/2558

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

สารบัญ ..... ญ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฑ

บทนำ 1

วิธีดำเนินการวิจัย 12

ผลการวิจัย 24

อภิปราย/วิจารณ์ 62

เอกสารอ้างอิง 79

ภาคผนวก 92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำทะเลเทียมที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในน้ำทะเลเทียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 27

3-2 ค่าการดูดกลืนแสงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffered saline, PBS) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 27

3-3 ค่าการดูดกลืนแสงของอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.0 28

3-4 ปริมาณโปรตีนจากปลาป่นที่หลุดออกมาเมื่อตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 29

3-5 ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* จากแคลเซียมอัลจิเนตในน้ำตัวอย่าง 30

3-6 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (เริ่มต้น N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront 34

3-7 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 10) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront 35

3-8 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง (ครั้งที่ 2) ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันและเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront 36

3-9 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront 36

3-10 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวจากการทดลองครั้งที่ 1 ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 6, 6.5 และ 7 37

3-11 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวจากการทดลองครั้งที่ 2 ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 4.5, 5 และ 6 38

3-12 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 3 และ 6 วัน โดยเทคนิค ELISA 42

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3-13 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวจากการทดลองครั้งที่ 2 ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และระหว่างการเผชิญที่เวลา 3, 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค ELISA..... 44

3-14 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และ 6และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6.5 และ 7..... 46

3-15 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 4.5, 5, และ 6..... 48

3-16 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลาการ์ตูนส้มขาวทั้ง 4 ทรีตเมนต์ ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront 53

3-17 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront..... 53

3-18 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลาการ์ตูนส้มขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง (ครั้งที่ 2) ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันและเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront (เริ่มต้น N=30)..... 54

3-19 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 2) ทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront..... 55

3-20 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 1) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 2, 4 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA..... 56

3-21 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 2) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยอาหาร 4 สูตร 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ แล้วนำไปเผชิญเชื้อ 3 สัปดาห์ ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อครบ 3 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA..... 58

3-22 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร 2 สัปดาห์และอาหารสูตรควบคุม 2 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือด ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6 59

3-23 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรสลับกับอาหารสูตรควบคุม สัปดาห์เว้นสัปดาห์ ทำการเจาะเลือด ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 11..... 60

4-1 งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารวัคซีนที่ใช้กินโดยใช้อัลจีเนตเป็นสารตรึงเซลล์..... 64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ข-1 สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil ที่แสดงผลจากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ 97

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1-1 วงชีวิตของปรสิต *Cryptocaryon irritans* 4

2-1 แผนผังการทำ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจากในซีรัมปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย *C. irritans* ระยะธีรอนต์และยีสต์ 20

2-2 กราฟโปรตีนมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นโปรตีนกับค่าดูดกลืนแสงช่วง 595 นาโนเมตร ในแผ่นไมโครไตเตอร์เพลท 21

3-1 รูปร่างของยีสต์ *Pichia jadinii* 24

3-2 โครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ *Pichia jadinii* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน 25

3-3 การแตกหน่อของยีสต์ *Pichia jadinii* 25

3-4 การเจริญของยีสต์ *Pichia jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที 26

3-5 ภาพตัดขวางเม็ดเจลที่ตรึงยีสต์ *Pichia jadinii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X 29

3-6 ชนิดและร้อยละของกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่สกัดได้จากเซลล์ตรึงยีสต์ *Pichia jadinii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต 31

3-7 ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง 32

3-8 Theront ของ *Cryptocaryon irritans* ภายใต้กล้อง 33

3-9 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 ก่อนการทดลอง 38

3-10 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) และ 4 ผ่านไป 2 สัปดาห์ 39

3-11 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ผ่านไป 2 สัปดาห์ 39

3-12 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองชุดการทดลองที่ 1 และ 4 ผ่านไป 4 สัปดาห์ 40

3-13 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ผ่านไป 4 สัปดาห์ 40

3-14 ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ทรีตเมนต์ 2) และยีสต์ (ทรีตเมนต์ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท ข) เส้นแนวโน้มของระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพง 43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3-15 ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ชุดการทดลองที่ 2) และยีสต์ (ชุดการทดลองที่ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 7 และ 14 วัน (3* 7*และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท ข) เส้นแนวโน้มของระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพง 45

3-16 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) 47

3-17 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน (3* 7* และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) 49

3-18 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide, stacking gel 4 % acrylamide) ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA) 50

3-19 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide, stacking gel 4 % acrylamide) ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง 4 ไมโครกรัมต่อแถว ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA) แถวที่ 2-6 คือซีรั่มจากปลากะพงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต 1 ครั้ง และแถวที่ 7-9 คือซีรั่มจากปลากะพงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต 2 ครั้ง 51

3-20 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 1) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 2, 4 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA 57

3-21 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 2) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยอาหาร 4 สูตร 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ แล้วนำไปเผชิญเชื้อ 3 สัปดาห์ ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อครบ 3 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA 58

3-22 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6 60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3-23 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรสลับกับอาหารสูตรควบคุม สัปดาห์เว้นสัปดาห์ ทำการเจาะเลือด ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 1 61
4-1 กระบวนการทำเซลล์ตรึงและโครงสร้างทางเคมีของโซเดียมอัลจีเนตพร้อมแผนภาพของจุลินทรีย์และไฮโดรเจล..... 65
ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์..... 95
ค-1 โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil 99
ค-2 โครมาโทรแกรมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ BS 6-2 ที่ 72 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที 99

บทนำ
Introduction

Encapsulation คือ กระบวนการตรึงสารสำคัญที่ต้องการใช้ให้อยู่ในรูปของแคปซูลที่ห่อหุ้ม ซึ่งแคปซูลนั้นจะมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่หลายร้อยนาโนเมตรไปจนถึงหลายมิลลิเมตร เปลือกหุ้มจะใช้เป็นส่วนเชื่อมประสานเพื่อรักษาการคงตัวและห่อหุ้มเพื่อป้องกันสารสำคัญภายในตลอดจนเป็นตัวขัดขวางเพื่อให้มีเฉพาะสารประกอบบางอย่างเท่านั้นที่แพร่เข้ามายังส่วนประกอบได้ สำหรับสารที่จะนำมาใช้ในการห่อหุ้มนั้นควรเป็นสารที่อยู่ในระดับที่สามารถนำมาบริโภคได้ โดยปกติสารที่ใช้เป็นเปลือกห่อหุ้มจะเป็นกลุ่มโพลีแซคคาไรค์ โปรตีนและไลปิด สำหรับอุตสาหกรรมด้านอาหารนั้นการตรึงสารมักใช้กรรมวิธี Spray drying ประโยชน์ของกระบวนการนี้เพื่อใช้ป้องกันไม่ให้ปล่อยออกสู่สภาวะแวดล้อมก่อนเวลาที่ต้องการ รวมถึงช่วยยืดอายุการเก็บและปลดปล่อยสารในอัตราคงที่เมื่อต้องการใช้งานไปยังเป้าหมายโดยตรง นอกจากนี้กระบวนการห่อหุ้มนี้ยังสามารถลดการระเหย และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในขณะบริโภคได้ (Nedovica et.al., 2011) เทคนิคในการตรึงสารสำคัญให้อยู่ในรูปแบบแคปซูลนั้นจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารที่จะห่อหุ้ม เปลือกและส่วนผสมของอาหารอื่น ๆ ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ (Kuang et al., 2010; Desai and Park, 2005; Carmen, 2007) โครงสร้างของแคปซูล ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ สารที่ถูกห่อหุ้ม เรียกว่าแกนกลาง และสารที่ใช้ห่อหุ้ม เรียกว่าสารห่อหุ้ม ที่จะเป็นตัวกำหนดให้แคปซูลมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ (บัณฑิต พรหมรักษา และคณะ, 2557) บทบาทของการ Encapsulation ทางด้านอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการป้องกันโรคมีการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างกว้างขวาง (Dey et al., 2015)

สำหรับสารอาหารที่ผสมในอาหารมีผลอย่างมากต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลา มีการวิจัยถึงชนิดและปริมาณสารอาหารต่อการต้านทานโรคของสัตว์น้ำมาเป็นระยะเวลานาน สารอาหารหลักประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน กรดไขมัน และสารอาหารปริมาณน้อย เช่น วิตามินซี วิตามินบี6 วิตามินอี วิตามินเอ และแร่ธาตุ เช่น ธาตุเหล็กและฟลูโอไรด์ ซึ่งบทบาทของวิตามินและแร่ธาตุไม่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยตรง แต่ช่วยเสริมการป้องกันโรคโดยให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้เหมาะสมดียิ่งขึ้นไป (Trichet, 2010) ปัจจุบันพบว่าในวงการอาหารสัตว์น้ำมีการใช้จุลินทรีย์และยีสต์หลายชนิดเป็นวัตถุดิบอาหารในรูปแบบของโปรตีนเซลล์เดี่ยว เช่น กลุ่ม *Bacillus,* กลุ่ม *Bifidobacterium,* กลุ่ม *Lactobacillus,* กลุ่ม *Pediococcus,* และกลุ่ม *Sacharomyces* เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii* หรือ *Candida utilis* เป็นต้น (Lyons, 1986) ยีสต์สีแดง *Rhodotorula* spp. ให้สารสีบีตา-แคโรทีนอยด์ (β-carotenoid) ใช้ผสมในอาหารสัตว์น้ำเพื่อเพิ่มสี (Zhenming et al., 2006) นอกจากนี้ยีสต์หลายชนิดมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulatory properties)ของคนหรือสัคว์ ยีสต์บางชนิดมีกลไกการยับยั้งเชื้อโรค (Azevedo & Braga, 2012) เป็นแหล่งสารอาหารโปรตีน ไขมัน และวิตามิน (Kutty & Philip, 2008) โดยยีสต์ซึ่งจัดเป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ (Fungi) และอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (Ascomycota) มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว โดยเซลล์อาจจะมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ หรือบางทีอาจ

พบลักษณะหลายเซลล์ต่อกันสั้น ๆ หรือลักษณะคล้ายเส้นใยและมีการแตกกิ่งแขนง โดยทั่วไปแล้วยีสต์จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบของเซลล์และผนังเซลล์ ในยีสต์ทั่วไปมักมีส่วนของผนังเซลล์อยู่ประมาณร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีพอลิแซ็กคาไรด์กลูแคนและแมนแนนอยู่ถึงร้อยละ 90 ของผนังเซลล์ ส่วนปริมาณไขมันที่พบในเซลล์ยีสต์จะผันแปรตามชนิดของยีสต์

นอกจากนี้แล้วยีสต์ยังมีลิปิดในการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีลิปิดสะสมอยู่ในเซลล์มากกว่าร้อยละ 20 ของชีวมวล เช่น ยีสต์ *Rhodotorula* spp., *Lipomyces starkeyi, Crytococcus curvatus* และ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดสามารถสะสมลิปิดได้สูงถึง ร้อยละ 40-70 ของชีวมวล โดยปริมาณลิปิดที่สร้างขึ้นจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยง จากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่ายีสต์สามารถสะสมไขมันได้มาก มีการเจริญรวดเร็ว และมีส่วนของไทรเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากซึ่งคล้ายกับกรดไขมันในน้ำมันพืช (สาวิตรี, 2549) เดิมยีสต์ได้รับความสนใจน้อยแต่ในขณะนี้ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก โดยใช้ทั้งแหล่งคาร์บอนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic carbon source) และแหล่งคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophilic carbon source) อีกทั้งยีสต์ยังสามารถผลิตกรดไขมันตั้งแต่คาร์บอน 8 อะตอมจนถึงคาร์บอน 24 อะตอม ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในยีสต์จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว สำหรับไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบจะเป็น กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2), กรดไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3) ตัวอย่างเช่น *Candida, Crytococcus, Hansenula, Lipomyces* และ *Rhodotorula* (Zelles, 1997)

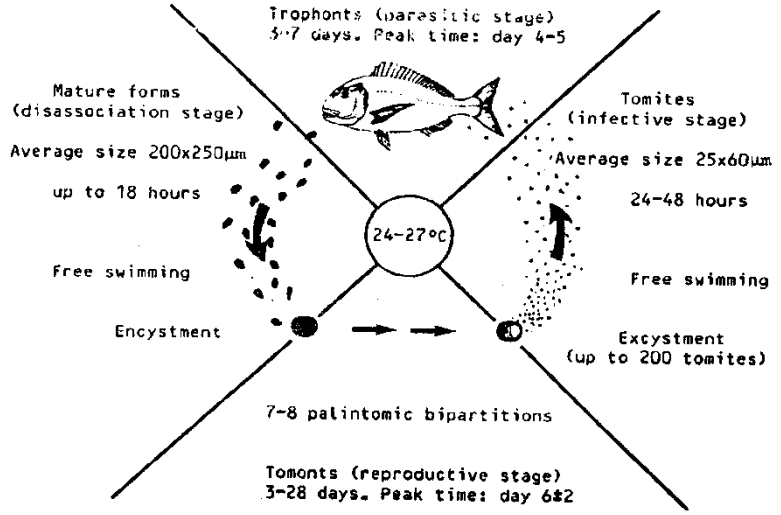
ดังนั้น ยีสต์จึงเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการนำไปใช้เป็นสารเสริมอาหาร หรือใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (Probiotic) เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนได้มากในระยะเวลาสั้น 2-3 วัน ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการเจริญเติบโต และใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย ต้นทุนในการผลิตต่ำ การนำเซลล์ยีสต์มาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงได้มีการนำเทคนิคการตรึง (Encapsulation) มาใช้ในกระบวนการการผลิตอาหารสำเร็จรูปและอาหารมีชีวิต เพื่อตรึงสารอาหารที่สำคัญไว้ภายในให้ได้มากที่สุดและให้ถูกปล่อยออกมาในระยะเวลาที่เหมาะสม เช่น การตรึง Probiotics bacteria (Vidhyalakshmi et al., 2009) เพื่อนำเซลล์ตรึงมาทำการผลิตอาหารสำเร็จรูป ในระหว่างการอนุบาลและการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิต (Lazo, 2000; Teshima et al., 2000; Xie et al., 2010) และการป้องกันโรค โดยการวิธีการให้กิน (Polk, 1994) ซึ่งสารพอลิเมอร์ธรรมชาติบางชนิดสามารถทำให้เป็นเจลได้เมื่อมีการเชื่อมไขว้เข้ากับไอออนของโลหะ การเตรียมทำได้ง่ายและเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ สารพอลิเมอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ อัลจิเนต และไคโทซาน เป็นต้น (Calinescu et al., 2012)

นอกจากนี้แล้ว ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการพัฒนาการผลิตวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคต่าง ๆ วัคซีนที่ผลิตได้และประสบผลสำเร็จในการป้องกันโรคเป็นระดับแรก ๆ มักใช้ในการป้องกันโรคแบคทีเรียที่เกิดกับปลาเป็นส่วนมาก สำหรับวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากปรสิตนั้นอยู่ในขั้นดำเนินการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันและทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน เช่น วัคซีนป้องกันโรคจุดขาวน้ำเค็ม (Marine white spot disease) วัคซีนป้องกันโรคจุดขาวน้ำจืด (White spot disease) วัคซีนป้องกันโรคสนิมเหล็ก (Amyloodinosis) เป็นต้น (Midtlying, 1997) รูปแบบการให้วัคซีนแก่สัตว์น้ำมีหลายวิธี เช่น การฉีด แช่และกิน เป็นต้น ในกรณีของปลาเศรษฐกิจที่มีขนาด

ใหญ่วิธีการฉีดอาจให้ผลดีที่สุด แต่สำหรับลูกปลาวัยอ่อนและปลาสวยงามน้ำเค็มนั้นจะมีขนาดเล็ก การนำวัคซีนมาฉีดโดยตรงอาจก่อให้เกิดความบอบช้ำได้ง่าย และการแช่จะทำให้เกิดความสิ้นเปลือง และทำให้ต้นทุนการเลี้ยงปลาสูงขึ้น ดังนั้นวิธีการให้วัคซีนจึงต้องต้องให้ผ่านทางอาหาร

ดังนั้น นักวิจัยในหลายประเทศจึงพัฒนารูปแบบของการให้วัคซีนหรือสารเสริมอาหารอื่นให้แก่สัตว์น้ำที่มีขนาดเล็กด้วยการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์ (Microencapsulation) มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ เช่น การตรึงยีสต์ชนิดต่าง ๆ สารเพิ่มสี วิตะมิน เชื้อจุลินทรีย์และยีสต์เพื่อประโยชน์ต่อสัตว์น้ำ (Yúfera et al., 2010; Dey et al., 2015) เทคนิคนี้จะสามารถควบคุมการทำงานของสารให้มีการปลดปล่อยสารที่ต้องการในบริเวณที่เหมาะสม ลดความสิ้นเปลืองและได้ประโยชน์สูงสุด (เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล, 2552) วิธีการนี้เหมาะสมกับการนำมาใช้ในลูกปลาวัยออ่นและปลาสวยงาม ซึ่งตลอดช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงต้องระมัดระวังการเกิดโรคที่จะก่อให้เกิดความเสียหาย เช่น โรคจุดขาวน้ำเค็ม ซึ่งเป็นโรคหนึ่งที่เกิดได้ในปลาทะเลเกือบทุกชนิด โรคนี้เกิดจากปรสิตโพรโทซัว *Cryptocaryon irritans* เป็นปรสิตกลุ่มซิลิเอต (Colorni, 1987; Colorni and Burgess, 1997) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวชนิดนี้ เมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ทั้ง SEM และ TEM พบว่า ระยะโทรฟอนต์ ซึ่งเป็นตัวเต็มวัยอาศัยเกาะอยู่บนตัวปลา จะมี Apical cytostome และ Post-oral groove circumoral ขนของโทรฟอนต์และธีรอนต์ ประกอบด้วย Dikinetids (Diggles and Adlard, 1997) มีลักษณะเป็นขนแข็งรอบตัว วงจรชีวิตของพยาธิชนิดนี้ประกอบด้วยระยะต่าง ๆ ได้แก่

ระยะที่ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า ระยะโทรฟอนต์ ระยะนี้ปรสิตจะอาศัยเกาะบนตัวปลาหรือซี่เหงือก ประมาณ 3-7 วัน เมื่ออุณหภูมิอยู่ที่ 23-30 องศาเซลเซียส อาศัยกินเนื้อเยื่อ เมือกของปลา (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1979; Burgess & Matthew, 1994; Colorni, 1985, 1987; Yoshinaga & Dickerson, 1994) ต่อมาเมื่อจะเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์ โทรฟอนต์ จะหลุดออกจากตัวปลา เรียกระยะนี้ว่าโพรโทมอนต์ ระยะนี้ปรสิตจะคืบคลานไปบนพื้นก้นตู้หรือวัสดุ ใช้เวลาประมาณ 2-8 ชั่วโมง หรืออาจกินเวลานานถึง 18 ชั่วโมง หลังจากหลุดออกจากตัวปลา เมื่อโพรโทมอนต์ลงเกาะกับพื้นผิววัตถุ จะเริ่มสร้างซีสต์มาหุ้มตัวเพื่อเข้าสู่ระยะโทมอนต์ เป็นระยะที่เป็นซีสต์มีเปลือกหนา ใช้เวลา 3-28 วัน ที่อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียส ภายในโทมอนต์ จะมีการแบ่งเซลล์เพื่อได้ระยะที่เรียกว่าโทไมต์ โดยที่ 1 โทมอนต์ จะได้ประมาณ 200 โทไมต์ หรือมากกว่า ต่อมาโทไมต์ จะออกจากซีสต์และเจริญเป็นระยะธีรอนต์ ซึ่งเป็นระยะตัวอ่อนที่พร้อมจะเข้าเกาะที่ซี่เหงือกและผิวหนังของปลา ดังแสดงในรูปที่ 1-1 จากการที่ซีสต์ของปรสิตชนิดนี้สามารถแบ่งเซลล์จนได้เซลล์ลูกได้ถึง 200 เซลล์ จึงทำให้การแพร่กระจายของโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว (สถาพร ดิเรกบุษราคม และจูอะดี พงศ์มณีรัตน์, 2527)



ภาพที่ 1-1 วงชีวิตของปรสิต *Cryptocaryon irritans* (Colorni, 1985)

จากการศึกษาของ Cheung และคณะ (1979) ที่ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อวงจรการสืบพันธุ์ของ *C. irritans* โดยนำระยะโทรฟอนต์ของโพรโทซัวชนิดนี้ที่ได้จากปลาสลิดหินสามจุด (Damselfish, *Dascyllus trimaculatus*) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7-37 องศาเซลเซียส เพื่อสังเกตการสร้างซีสต์และพัฒนาการของโทไมต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 30, 25 และ 20 องศาเซลเซียส ที่เวลา 16 ชั่วโมง การสร้างซีสต์ของโทฟอนต์อยู่ที่ร้อยละ 70, 77 และ 64 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการสร้างซีสต์ ร้อยละ 44 และที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส การสร้างซีสต์เหลือเพียงร้อยละ 10 เมื่ออุณหภูมิสูง 30 องศาเซลเซียส ธีรอนธ์จะฟักออกจากซีสต์ร้อยละ 50 ภายในเวลา 5 วัน และเมื่ออุณภูมิอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส ธีรอนธ์จะฟักออกเป็นตัวอ่อน ร้อยละ 100 ภายในเวลา 7 วัน ที่ ซึ่งการออกจากฟักออกจากซีสต์จะไม่เกิดขึ้นถ้าอุณหภูมิอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 7 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาถึงความเค็มที่ทำให้ซีสต์แตก โดยนำไปใส่ในน้ำทะเลที่ความเค็มต่างกัน และรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 7-37 องศาเซลเซียส จะพบว่าในน้ำที่มีความเค็มต่ำ ที่ประมาณ 16 ppt หรือต่ำกว่า 16 ppt จะทำให้ซีสต์หรือโทมอนต์แตกออก โดยโทมอนต์ร้อยละ 30 เริ่มแตกออกทันที เมื่อน้ำอยู่ที่อุณหภูมิ 30, 25 และ 7 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้นน้ำทะเลร้อยละ 50 ในขณะที่โทมอนต์ร้อยละ 25 เริ่มแตกออกทันทีที่อุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้นน้ำทะเลร้อยละ 25 อย่างไรก็ตามไม่พบพัฒนาการของซีสต์ในความเข้มข้นน้ำทะเลเหล่านี้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าร้อยละการแตกออกของโทมอนต์จะสูงขึ้นเมื่อลดความเค็มลงเรื่อย ๆ (Dan et al., 2006)

ระดับความไวในการติดเชื้อ (Host susceptibility) ของปลาชนิดต่าง ๆ นั้น มีผู้ทำการศึกษากันไว้ในหลายประเทศ เนื่องจาก *C. irritants* เป็นปรสิตที่ไม่ต้องการความจำเพาะของเจ้าบ้าน สำหรับปลาที่มีการเลี้ยง (Burgess & Matthews, 1995) แต่ปลาในธรรมชาติ Diggles และ Lester (1996) พบว่าปรสิตชนิดนี้มีความ จำเพาะของเจ้าบ้านค่อนข้างสูง ดังนั้นปรสิตจึงสามารถก่อให้เกิดโรคในปลาทะเลที่ทำการเพาะเลี้ยงได้เกือบทุกชนิด ส่วนในกลุ่มปลากระดูกอ่อน เช่น ปลาฉลามและปลากระเบนจะมีความต้านทานต่อการเกิดโรคนี้ได้ดี (Colorni & Burgess, 1997) แม้ว่า

พยาธิชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในปลาทะเลได้ทุกชนิด แต่ระดับความไวในการก่อให้เกิดโรคในปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป (Lipton, 1993) โดยพบว่าปลาในกลุ่ม, Blue regal/ Hippo tang (*Paracanthurus hepatus*) และ Surgeonfishes มีระดับความไวในการติดโรคสูงมาก รองลงมา เช่น ปลาในกลุ่มปลาปักเป้า cowfish, boxfish และ pufferfish โดยมีรายงานระดับความไวของการติดเชื้อ *C. irritans* ในพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ของปลา Gilthead seabream, *Sparus aurata*, common dentex, *Dentex dentex*, and greater amberjack, *Seriola dumerili* โดยก่อให้เกิดอัตราการตายสูง ในขณะที่ ปลา Red porgy, *Pagrus pagrus*, white sea bream, *Diplodus sargus*, sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* ไม่ติดโรค จากรายงานชิ้นนี้ยังได้ระบุว่าการใช้สารเคมีรักษาไม่ได้ผล (Rigos et al. 2001) จากการศึกษาผลกระทบของปรสิต *C. irritans* ต่อปลากะรังลายเสือ (*Sebastiscus marmoratus*) โดยการให้ปลาดังกล่าว เผชิญเชื้อ Theronts ของปรสิต จำนวน 2500, 5000, 7500, 10,000, 20,000, และ 30,000 ตัว/ปลา 1 ตัว ตามลำดับ (น้ำหนัก 45 ± 3 g.) ทำการตรวจสอบอัตรารอด การกินอาหาร อัตราการหายใจ ความเข้มข้นของ Serum ion และ กิจกรรม Na+/K+-ATPase ของเหงือก พบว่าอัตรารอดของปลาจะลดต่ำลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยปลาในกลุ่มที่เผชิญเชื้อ มากกว่า 5,000 theronts/ตัว จะหยุดกินอาหารภายใน 4 วัน อัตราการหายใจของปลากลุ่มที่เผชิญเชื้อ 2,500 และ 5000 theronts/ ตัว จะเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ในทางกลับกันกลุ่มที่เผชิญเชื้อมากกว่า 7,500 theronts/ ตัว อัตราการหายใจจะเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญภายใน 12 ชั่วโมง สำหรับกิจกรรม Na+/K+-ATPase และความเข้มข้นของ serum Na+ and Cl- จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ปลาเผชิญเชื้อจำนวนมากขึ้น จากงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสรุปว่าปลาสามารถฟื้นตัวจากโรคได้หากเผชิญเชื้อในปริมาณที่ต่ำ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อมากขึ้นปลาจะเริ่มมี อาการเครียด ดังนั้นอาการของโรคในเลื้องต้นอาจสังเกตได้จากการกินอาหารลดลงและมีการหายใจถี่ขึ้น (Yin et al., 2014)

สำหรับระบบภูมิคุ้มกันของปลาทะเล ซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มแรก ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immune response) ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับสิ่งแปลกปลอม และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Acquired immune response) ซึ่งการตอบสนองที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม สำหรับภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเป็นด่านแรกในการป้องกันการติดเชื้อจะมีความแตกต่างจากภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะทั้งเวลาในการตอบสนองซึ่งเร็วกว่า มีความจำเพาะกับโมเลกุลที่ประกอบกันเป็นตัวเชื้อโรค ไม่มีความจำ และมีความหลากหลายน้อยกว่าความสามารถ ในการป้องกันตัวเองของปลาเริ่มจากผิวหนังและเหงือกซึ่งเป็นด่านแรกที่ปรสิต รา หรือแบคทีเรียจะเข้าสู่ตัวปลา ดังนั้นปลาต้องป้องกันตัวเองโดยโครงสร้างทางกายภาพและทางเคมี มีการหลั่งเมือกออกมาโดยเซลล์กอบเลต (Goblet cells) ในเมือกปลาพบโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัว เช่น อิมมูโนโกลบูลิน ไลโซไซม์ และเลคติน (Fujita, 2002; Ewart et al., 2001; Trot et al., 2003) ส่วนในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดเกิดจากการหลั่งโปรตีนหลาย ๆ ชนิดจากทั้งเซลล์เม็ดเลือดและเนื้อเยื่อเข้าสู่น้ำเลือด (Hemolymph) โดยโปรตีนมีความสามารถในการยับยั้ง (Inhibition) เหนี่ยวนำ (Act as opsonins) หรือทำลายสิ่งแปลกปลอมไม่ให้ทำอันตรายต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ transferrin, toxins, lectins, agglutinins of a nonimmunoglobulin nature, C-reactive protein, lysozyme, Interferon, Non-enzymatic lysins, Enzyme inhibitors และ

Complement เป็นต้น (Pastoret et al.,1998; Trot et al., 2004; Alvarez-Pellitero, 2008) สำหรับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากระดูกแข็งไม่ซับซ้อนเท่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบอิมมูโนโกลบูลิน เพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ IgM และ IgD ในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีถึง 5 ชนิด ได้แก่ IgG, IgM, IgE, IgA และ IgD (Anderson, 1990) ด้วยเหตุที่ระบบภูมิคุ้มกันปลามีพัฒนาการที่ไม่ดีนัก ดังนั้นปลาจึงต้องใช้ระบบภูมิคุ้มกันที่มีความหลากหลายแตกต่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่ง Trot และคณะ (2004) ได้สรุปไว้ว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาดูเหมือนว่าจะมีความสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อมากกว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำยังไม่แพร่หลายมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอื่น เนื่องจากสัตว์น้ำมีความหลากหลายทางวิวัฒนาการสูงมาก แต่ยังนับว่าปลากระดูกแข็ง มีผู้ทำการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าระบบภูมิคุ้มกันของปลามีลักษณะคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอื่น (Anderson, 1990) เนื่องจากมีการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมด้วยการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว หรือมีการสร้างและหลั่งโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยงข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าปลากระดูกแข็งมีระบบภูมิคุ้มกันทั้ง ๒ แบบ คือ แบบไม่จำเพาะ (Non-specific หรือ Innate) และแบบจำเพาะ (Specific หรือ Adaptive) (ประพฤติดี, 2550) ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. Physical barriers ประกอบด้วย เกล็ด ผิวหนัง เมือกและเหงือก ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้เป็นปราการด่านแรกที่ใช้ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าสู่ตัวปลา (Ingram, 1980; Shepaed, 1994; Ellis, 2001) ที่เมือกของปลาจะประกอบด้วย Lectins, pentraxins, lysozymes, Complement proteins, Antibacterial peptides และ Immunoglobulin M (IgM) เป็นต้น ส่วนประกอบเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อของปลา (Alexander and Ingram, 1992; Rombout et al., 1993; Aranishi and Nakane, 1997; Boshra et al., 2006; Saurabh and Sahoo, 2008) นอกจากนี้ชั้นของหนังกำพร้าสามารถตอบสนองการรุกล้ำของเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น ซึ่งความสมบูรณ์ของเซลล์มีความสำคัญต่อสมดุลออสโมติก (Hibiya, 1994)

2. Humoral components ประกอบด้วยโมเลกุลต่าง ๆ ได้แก่

2.1 Aggutinins และ precipitin เช่น lectin like, C-type lectin และ pentraxines (C-reative protein; CRP) ก่อให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์แปลกปลอมและตกตะกอนในที่สุด

2.2 Lytic enzymes เช่น lysozymes, chitinases, cathepsins มีทำหน้าที่ในการย่อยทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย

2.3 Growth inhibitors เช่น transferrin (Iron binding protein), interferon (IFN) และ Mx protein ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือไวรัส

2.4 Protease inhibitors เช่น a-2 macroglobulin มีหน้าที่ครอบคลุมกว้าง

3. Cellular components ในปลากระดูกแข็งจะมี non specific cells components เช่น phagocytic cells, granulocyte (neutrophils), monocytes (macarophages), และ

nonspecific cytotoxic cells (NCC) คล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล, 2550)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune system) ประกอบด้วย

1. สารน้ำ ได้แก่ อิมมูโนกลอบูลินหรือแอนติบอดี ที่ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อในซีรั่มและบริเวณเยื่อบุต่าง ๆ อิมมูโนกลอบูลินในปลานั้น สร้างมาจากเซลล์ที่เรียกว่า B cells และ plasma cells อิมมูโนกลอบูลินในปลามี ๓ ประเภท คือ คือ IgM, IgD และ IgT (Fillatreau *et al.,* 2013)

2. Lymphocytes แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ B cells และ T cells (Laing and Hansen, 2011) T cells มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น (Toda et al*.,* 2011) ส่วน B cells ทำหน้าที่สำคัญต่อ humoral response (ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล, 2550)

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาที่มีผู้ศึกษาไว้ ได้แก่ Yambot และ Song (2006) มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้มทำโดยให้ปลาสัมผัสกับเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ซึ่งได้จากระยะ tomont และโดยการฉีดเชื้อตายซึ่งประกอบด้วย *C. irritans* ระยะ theront ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีนเข้าทางช่องท้อง จากการตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในเมือกโดยเทคนิค ELISA พบค่าไตเตอร์สูงในลูกปลากะรังจุดส้มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับปลากะรังจุดส้มตัวเต็มวัยหลังจากสัมผัสกับ *C. irritans* ระยะ theront เป็นเวลา 3 สัปดาห์เปรียบเทียบกับค่าไตเตอร์ก่อนการเผชิญ (กลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อปรสิต) นอกจากนี้ปรสิตระยะ tomont ที่ได้จากปลากะรังจุดส้มตัวเต็มวัยหลังจากได้รับการกระตุ้น 3 สัปดาห์จะมีจำนวนน้อยกว่า tomont หลังการกระตุ้นเพียงครั้งเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ในการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตายนั้นไม่พบการตายในปลากะรังจุดส้มที่ได้รับเชื้อตายปริมาตร 100 ไมโครกรัมต่อปลาหนึ่งตัว ในขณะที่การตายจะเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 40 ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อตายปริมาตร 10 ไมโครกรัมต่อปลาหนึ่งตัว และการตายจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 100 ในกลุ่มควบคุม (PBS) ตามลำดับ ผลจากการฉีดเชื้อตายของกลุ่มที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน การตายจะอยู่ที่ร้อยละ 37.5 (โดสของเชื้อตายที่สูงที่สุด) และร้อยละ 100 ของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้มีการตรวจพบปรสิต *C. irritans* ระยะ tomont จำนวน 1,830 เซลล์ ในกลุ่มควบคุมหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย PBS เป็นเวลา 5 วัน ในขณะที่ไม่พบปรสิตในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตาย

นอกจากนี้ตัวอย่างจากกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตายที่เวลา 5 วันและ 7 วันมีปริมาณปรสิตระยะ trophont และระยะ tomont ที่พบน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม ผลการทดลองที่ได้แสดงว่าระบบภูมคุ้มกันในปลาเกิดขึ้นได้ในปลาที่ได้รับการกระตุ้น โดยดูจากค่าไตเตอร์แอนติบอดีในเมือกของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต *C. irritans* ปลามีอัตรารอดที่สูงกว่า และจำนวนปรสิตที่เกิดขึ้นน้อยกว่าของตัวปลาที่กระตุ้นด้วยเชื้อตายเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นนี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันหรือจำกัดการลงเกาะ การรุกรานและการพัฒนาของปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ บนผิวของปลากะรังจุดส้มที่ถูกกระตุ้น

Bai และคณะ (2008) มีการศึกษาเกี่ยวกับ *C. irritans* โดยแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปรสิต *C. irritans* และการป้องกันการติดเชื้อเปรียบ เทียบการตอบสนองภูมิคุ้มกันในปลากะรัง การชักนำให้เกิดการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* จะใช้ปรสิตระยะ

theront, tomont และ trophont โดยการฉีดกระตุ้นและทดลองเพื่อคัดเลือกแอนติเจนที่ถูกตรึง ค่าไตเตอร์แอนติบอดีของซีรั่มปลาที่ได้จากภูมิคุ้มกันจะถูกกำหนดได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA และวิเคราะห์การตรึงที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ หลังถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบร้อยละการอยู่รอดของปลากะรังจุดส้มที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ theront ระดับแอนติบอดีซีรั่มที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะ theront มีค่าสูงกว่าในปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ trophont หรือระยะ tomont ระดับนัยสำคัญของภูมิคุ้มกันที่ปลาได้รับโดยการกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ theront จะมีค่าสูงกว่าแต่ไม่พบในปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ trophont หรือ tomont การวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blotting จะใช้การตรึงโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal immobilization antibodies) ที่ได้จากกระต่ายโดยการแสดงให้เห็น immunoreactive band ที่ต้านการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* ขนาดที่ได้ประมาณ 34 กิโลดาลตัน ซีรั่มจากหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ที่สูงกว่าปรสิตระยะ trophont หรือ tomont ในปลากะรังจุดส้ม จากการทดลองเพื่อคัดแยกแอนติเจนและเพื่อนำมาเตรียมการพัฒนาสร้างวัคซีนเพื่อต้านเชื้อปรสิต

Luo และคณะ (2007) มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *C. irritans* ของปลากะรัง ผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเผชิญเชื้อบนผิวหรือจากการฉีดกระตุ้น พบค่าความจำเพาะไตเตอร์แอนติเจนของซีรั่มปลาที่ถูกกระตุ้นและเมือกที่ได้จากผิวโดยการวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA และการวิเคราะห์การตรึง ความจำเพาะของแอนติบอดีสามารถตรวจสอบได้จากภูมิคุ้มกันปลาที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 และจุดสูงสุดจะอยู่ระหว่างสัปดาห์ที่ 4-6 ความจำเพาะของแอนติบอดียังพบในซีรั่มและเมือกของปลาที่ถูกกระตุ้นในสัปดาห์ที่ 8 และเตรียมการกระตุ้นเพื่อต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* มีการพบการชักนำด้วย humoral and skin mucosal immunity ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* ในปลา

Xu และคณะ (2009) ได้ทดลองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาดุกด้วยปรสิตระยะโทรฟอนท์ที่เฉื่อยชา แล้วตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีจากเมือกและซีรั่ม และการอยู่รอดของปลาหลังจากได้รับเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ในการทดลองที่ 1) กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดโทร์ฟอนท์ ที่ถูกทำให้เฉื่อยใน 1% ฟอร์มาลีนเข้าไปบริเวณเยื่อบุช่องท้องของปลา 2) โทร์ฟอนท์ที่ถูกทำให้เฉื่อยใน 3% ฟอร์มาลีน และ 3) โทร์ฟอนท์ที่ถูกแช่แข็งและทำให้ละลาย กลุ่มควบคุมที่ 1 (Positive) กระตุ้นด้วย ธีรอนธ์ ที่มีชีวิต กลุ่มควบคุมที่ 2 (negative) กระตุ้นด้วย 5 % bovine serum albumin (BSA) ที่ระยะเวลา14, 28, 50 วัน หลังได้รับการกระตุ้นไม่พบ ความแตกต่างทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ค่าไตเตอร์แอนติบอดีจากเมือกและซีรั่ม ที่กระตุ้นด้วย โทร์ฟอนท์ ที่เฉื่อยในฟอร์มาลีนหรือ โทร์ฟอนท์ ที่แช่เย็น ที่ระยะเวลา 50 วันหลังการกระตุ้น ให้ปลาดุกเผชิญ theronts แล้วดูอัตรารอดของปลา พบว่ามีปลามีอัตรารอดอยู่ที่ 33.3 % ถึง 43.3 % ธีรอนธ์ ในปลาดุกที่กระตุ้นด้วยโทร์ฟอนท์ ในฟอร์มาลีนหรือ โทร์ฟอนท์ ที่แช่เย็น อัตรารอดของปลาดุกหลังได้รับการกระตุ้นด้วยธีรอนธ์ และ BSA จะอยู่ที่ 93.3 และ 0 % ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 ฉีดปลาดุกด้วย sonicate โทร์ฟอนท์ ปริมาณต่าง ๆ ได้แก่ 1) 5 โทร์ฟอนท์ หรือโปรตีน 10.2 ไมโครกรัมต่อปลา 1 ตัว 2) 10 โทร์ฟอนท์ หรือโปรตีน 20.4 ไมโครกรัมต่อ

ปลา 1 ตัว 3) 20 โทร์ฟอนท์ หรือโปรตีน 40.8 ไมโครกรัมต่อปลา 1 ตัว และ 4) 5% BSA เป็นกลุ่มควบคุม ค่าไตเตอร์แอนติบอดีสูงสุดจากซีรั่มของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 10 หรือ 20 โทร์ฟอนท์ต่อปลา 1 ตัว คือ (1/210 ถึง 1/480) และค่าไตเตอร์แอนติบอดีจากเลือดคือ (1/48 ถึง 1/52) ตามลำดับ ที่เวลา 22 วันหลังได้รับการกระตุ้นการรอดอยู่ที่ 63.3 - 60.0 % ปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 5 โทร์ฟอนท์ ต่อปลา 1 ตัว มีค่าไตเตอร์แอนติบอดีจากซีรั่มและเมือกอยู่ที่ 1/52 และ 1/12 และอัตรารอดจะอยู่ที่ 23.3 % ปลาดุกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย BSA อัตรารอดจะอยู่ที่ 6.7 % จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ โทร์ฟอนท์ ที่ถูก sonicate และอัตรารอดของปลาดุก (ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.859 , $p < 0.01$) มีค่าแอนติบอดีที่เกิดจากการชักนำด้วย sonicate โทร์ฟอนท์ ในปริมาณต่าง ๆ แต่ไม่พบการตอบการตอบสนองของแอนติบอดีเมื่อกระตุ้นด้วย โทร์ฟอนท์ ที่ถูกทำให้อ่อนแอด้วยฟอร์มาลีนหรือแช่เย็นทั้งในซีรั่มและเมือก และพบการตายเมื่อกระตุ้นปลาด้วย โทร์ฟอนท์ ที่มีชีวิต

Wang, Xie และ Li (2010) ทำการตรวจสอบระดับความไวต่อเชื้อ *C. irritans* ในปลาทะเล 8 ชนิดที่เลี้ยงในทะเลจีนใต้ โดยให้ปลาทั้ง 8 ชนิดเผชิญเชื้อและทำการตรวจสอบโดยวิธี immobilization assay พบว่าปลา 7 ชนิดเกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม ยกเว้นปลาสลิดทะเล (*Siganus oramin*) มีความต้านทานต่อโรคมากสุด โดยระดับการติดเชื้อต่ำสุด นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ immobilization titres ในเซรั่มของปลาสลิดทะเลสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า เซรั่มของปลาสลิดทะเลยังสามารถฆ่าปรสิตนี้ได้ในการทดลองในห้องปฏิบัติการได้ โดยทำให้ผนังเซลล์ของ ธีรอนธ์ แตกเนื่องจากการบวมของ macronucleus

จากการตรวจสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงการตอบสนองทางด้านชีวเคมีและระดับของอิออนปลาจาระเม็ดไต้หวัน (*Trachinotus ovatus*) ต่อการติดโรคจุดขาวน้ำเค็ม (*C. irritans*) เพื่อทำการประเมิน infection intensities, serum immobilizing titer, กิจกรรมของเอนไซน์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ACP, AKP, LZM ปริมาณความเข้มข้นของอิออนในเซรั่ม (Na^+, Cl^-, Ca^{2+} and K^+) และชีวเคมีบางประการของเลือดปลา โดยนำปลาจาระเม็ดไต้หวัน ขนาดน้ำหนัก 450 กรัม ไปเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ ธีรอนธ์ จำนวน 70,000 ธีรอนธ์/ปลา 1 ตัว ตรวจสอบอัตราการตาย จากการทดลองนี้คณะผู้วิจัยพบว่า infection intensities ในปลากลุ่มควบคุม กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 เท่ากับ 0, 0.630±0.179 และ 0.014±0.004 ตามลำดับ ต่อมาเมื่อปลามีการเผชิญเชื้อซ้ำ ทำให้ระดับของ immobilizing titer (853±295.60) ของปลากลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่ม 2 ค่า alkaline phosphatase และ acid phoshatase activities, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase และ lactate dehydrogenase activities ของกลุ่ม 2 จะมีค่าสูงกว่ากล่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ แต่จะพบว่า lysozyme activity ของกลุ่ม 1 สูงสุด ส่วนกลุ่ม 2 ต่ำสุด สำหรับ ค่าความเข้มข้นของกลุ่มควบคุม กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 คือ 0, 0.630 และเมื่อปลามีการเผชิญเชื้อหลายรอบทำให้ imobilizing titer (853.33±295.60) ของกลุ่ม 2 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า alkaline phosphatase และ acid phosphatase activities ของกลุ่ม 2 ยังเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ

ในโครงการนี้คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการผลิตวัคซีนจากปรสิต *C. irritans* และยีสต์ *Pichia jadinii* ที่แยกจากน้ำทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลบางแสน จังหวัดชลบุรี จากโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นโดยโครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น นำปรสิตและยีสต์ที่ได้มาทดสอบวัสดุและวิธีที่ใช้ในการตรึง เพื่อทดสอบการรั่วไหลของสารที่สำคัญพบว่าเทคนิคการตรึงนี้สามารถใช้ได้กับยีสต์และโปรโตซัวที่จะใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ขั้นต่อไป คณะผู้วิจัยจะทำการผลิตอาหารด้วยเทคนิคการตรึงเพื่อนำอาหารนั้นมาทดลองให้ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) และปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion irritans*) กิน และทำการตรวจสอบระบบภูมิคุ้มกันระหว่างทำการเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว และอัตราการรอดของปลาทั้ง 2 ชนิด ระหว่างการเผชิญเชื้อ *C. irritans*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไปในการศึกษาคือการผลิตวัคซีนจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* และจุลินทรีย์อื่นที่มีประโยชน์ โดยเทคนิคการตรึง เพื่อใช้ในการป้องกันโดยวิธีการให้กิน โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือ

1. เพื่อผลิตวัคซีนจาก ปรสิต *C. irritans* ระยะ โทรฟอนต์ หรือ ธีรอนธ์ และยีสต์ แอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากน้ำ
2. เพื่อศึกษาชนิดของวัสดุ และวิธีการตรึงสารอาหารไม่ให้ละลายออกมาในน้ำและอาหารนั้นไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ
3. เพื่อทำการทดสอบอาหารที่ผลิตในปลาเศรษฐกิจและปลาสวยงามน้ำเค็ม ในระหว่างการฉีดเชื้อปรสิต *C. irritans* หรือแบคทีเรีย *Vibrio* sp.
4. เพื่อศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ เช่น การเสริมอาหารในแพลงก์ตอนสัตว์ หรือการนำไปเป็นอาหารสัตว์น้ำ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. งานเก็บรวบรวมปรสิต *C. irritans* และทำการเลี้ยงปรสิตระยะต่าง ๆ ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำผลิตวัคซีน
2. เตรียมวัคซีนจากปรสิตระยะ ธีรอนธ์ เชื้อตายโดยใช้เทคนิคการตรึง
3. ตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลาเมื่อได้รับวัคซีนหรือสารเสริมอาหาร โดยตรวจวัดระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA ตรวจหาเลคตินและไลโซไซม์ในซีรัมปลา
4. งานผลิตอาหารเสริมโดยใช้ยีสต์ที่มีประโยชน์ด้วยการตรึง (Encapsulation)
5. งานทดสอบอาหารที่ผลิตในปลาปลาสวยงามน้ำเค็ม
6 การเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ ธีรอนธ์ ในปลาสวยงามน้ำเค็มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและสารเสริมอาหาร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การจดสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร จากการนำปรสิตหรือจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยเทคนิคการตรึงไปใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันปลาทะเล

2. เทคนิคการผลิตวัคซีนนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำชนิดอื่นได้

3. องค์ความรู้จากเทคนิคการตรึง นำไปสู่การพัฒนาการผลิตวัคซีนและอาหารเสริมสัตว์น้ำเพื่อการนำไปใช้ในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม และการนำไปใช้ในระดับเชิงพาณิชย์

4. การผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่ โดยการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ปรึกษาร่วม วิทยากร

5. การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

6. นำเทคนิคและความรู้จากการวิจัยเสริมสร้างเจตคติที่ดีต่อการเรียนวิทยาศาสตร์ผ่านโครงงานวิทยาศาสตร์และค่ายวิทยาศาสตร์ทางทะเลสำหรับนักเรียนระดับมัธยมศึกษา และการฝึกงานภาคฤดูร้อนสำหรับนิสิต-นักศึกษาระดับมหาวิทยาลัย

7. การเผยแพร่ข้อมูลในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ หนังสือพิมพ์ หรือสื่อสิ่งพิมพ์รูปแบบอื่น ๆ ที่สามารถเข้าถึงกลุ่มเป้าหมายได้

วิธีดำเนินการวิจัย
(Materials & Methods)

ตอนที่ 1

2.1 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ *Pichia jadinii* เป็นชนิดที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัด ชลบุรี โดยจากโครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นโดยโครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น พบว่ามีกรดไขมันชนิดจำเป็น C18:2n6 ในปริมาณที่เหมาะสมเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารเสริมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาทะเลได้

2.2 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. โดยการเขี่ยหัวเชื้อจากอาหารแข็งลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เชื้อโต จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมวัตถุดิบ

2.3.1 กากชานอ้อย

ตัดกากชานอ้อยให้เป็นชิ้นลูกเต๋า ขนาดใกล้เคียงกันโดยใช้อัตราส่วนของกากชานอ้อย 1 กรัมต่อน้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) 10 มิลลิลิตร ที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที

2.3.2 น้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water)

องค์ประกอบและวิธีการเตรียมน้ำทะเลเทียม (แสดงในภาคผนวก ก)

2.3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อยในน้ำทะทียม (Artificial Sea Water) ที่ความเค็ม 25 พีพีที

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ กรองเอากากชานอ้อยออก 3 ครั้ง (กรองด้วยบุชเนอร์ ตามด้วยผ้าขาวบาง และสุดท้ายกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน) นำอาหารไปนึ่งในหม้อความดันอัตโนมัติ องค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (แสดงในภาคผนวก ก)

2.4 การเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที

นำหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง

2.5 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dintrosalicylic acid assay (ตามวิธีของ Miller, 1959)

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย DNS (dintrosalicylic acid reagent) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด eppendrof เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water baths) ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เชิงเดี่ยวโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ข)

2.6 การตรึง

2.6.1 การตรึงปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบลูมิน(Albumin), บลูเดกซ์แตรน (Blue Dextrane)

1) ชั่งตัวอย่าง(ปาเปน, ทริปซิน, อัลบลูมิน, บลูเดกซ์แตรน) 0.1 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิตร และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสมในข้อ 1) ฉีดสารผ่านสายยางลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลคงตัว

3) เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำเม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุชเนอร์ ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิลลิตร

4) ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

2.6.2 การตรวจวัดโปรตีนที่หลุดออกมา

1) นำเม็ดเจลใส่หลุมของแผ่นไมโครแพลทขนาด 6 หลุม หลุมละ 10 เม็ด เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ลงไป 10 มิลลิลิตร

2) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1000 ไมโครลิตร (เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง

3) นำน้ำตัวอย่างที่เก็บได้ตรวจหาปริมาณโปรตีน โดยที่เม็ดเจลที่เตรียมโดยใช้ปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบลูมิน (Albumin) วัดปริมาณโปรตีนในน้ำตัวอย่างด้วยวิธีของแบรดฟอร์ดที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สำหรับบลูเดกซ์แตรน (Blue Dextrane) วัดการหลุดของสารที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

2.6.3 การตรึงปลาป่น

ชั่งปลาป่น 0.15 กรัม ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมเม็ดเจลข้อ 4.5.1

2.6.4 การตรวจวัดโปรตีนที่หลุดออกมา

1) แบ่งเม็ดเจลใส่บีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 3 ใบ ปริมาตรเท่า ๆ กัน เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ลงไป 15 มิลลิลิตร

2) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง)

3) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

2.6.5 การเตรียมตัวอย่างและการตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ได้จากการเลี้ยง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ยีสต์จำนวน 2 ครั้ง โดยการเติมสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ Normal saline (NaCl) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งก่อนนำเซลล์ยีสต์ไปทำเซลล์ตรึงและวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร

การตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii*

ชั่งเซลล์ยีสต์ *P. Jadinii* ให้ได้เซลล์ประมาณ 2.5 x 10^5 เซลล์ (ภาคผนวก ข) เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต เตรียมเม็ดเจลตามข้อ 2.6.1

การวัดจำนวนเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*ที่หลุดออกมา

1) แบ่งเม็ดเจลใส่บีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 3 ใบ ปริมาตรเท่า ๆ กัน เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ลงไป 15 มิลลิลิตร

2) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 ชั่วโมง 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 5 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง) นับจำนวนเซลล์ที่หลุดออกมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ข) และวัดความขุ่นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

2.6.6 การเตรียมตัวอย่างและการตรึงเซลล์ปรสิต

การเก็บรวบรวมปรสิต *C. irritans*

ทำการตรวจปลาทะเลที่ป่วยด้วยโรคจุดขาวน้ำเค็ม นำปลาทะเลที่ป่วยมาแช่ใน SM 30 (ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก ก) เพื่อให้ปรสิตหลุดออกจากตัวปลาเป็นระยะ trophont ทำการคัดแยกปรสิต *Cryptocaryon* sp. ด้วยหลอดดูดปลายแหลม (Pasture pipette) ที่ปลอดเชื้อ ล้างด้วย SM 30 ให้สะอาด ประมาณ 3 ครั้ง นำปรสิต *Cryptocaryon* sp. ระยะ trophont จากข้อ 1.2 มาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงใน SM 30 จำนวนจานละ 50 เซลล์ ปรสิตจะเข้าสู่ระยะ tomont ตรวจดูพัฒนาการของปรสิต *Cryptocaryon* sp. ที่เลี้ยงไว้ใน SM 30 ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน เพื่อดูการแบ่งเซลล์จนกระทั่งฟักออกมาเป็นตัว ได้ปรสิตระยะ theronts

การตรึงเซลล์ปรสิต *C. irritans* ระยะ theronts

นำเซลล์ปรสิตระยะ theronts ประมาณ 25000 เซลล์ เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต เตรียมเม็ดเจลตามข้อ 2.6.1

2.7 การสกัดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

1) ชั่งตัวอย่างเม็ดเจลที่ตรึงเซลล์ยีสต์ (น้ำหนักแห้ง) โดยประมาณ 1.0 กรัม ใส่ Thimbles

2) นำ Thimbles ใส่ในชุดสกัดไขมัน (Extraction Unite) เติมสารละลายปิโตเลียมอิเทอร์ 50 มิลลิลิตร ใน Extraction cups

3) นำ Extraction cups ใส่ในชุดสกัดไขมันจากนั้นนำไปเข้าเครื่องสกัดไขมันประมาณ 1 ชั่วโมง

4) อบ Extraction cups ที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นใน desiccators ชั่งน้ำหนัก จากนั้นคำนวณหาร้อยละไขมัน (ภาคผนวก ข)

5) ละลายไขมันด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (2:1) ที่ผสม BHT 0.01 ปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปทรานเอสเทอริฟิเคชั่นต่อไป

2.8 การวิเคราะห์หาชนิดและร้อยละกรดไขมัน

ขั้นตอนการทำทรานเอสเทอริฟิเคชั่นด้วยกรด (Acid - catalysed transesterification) หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (ดัดแปลงวิธีของ Christie, 2003)

2.8.1 การทรานเอสเทอริฟิเคชั่น

1) ปิเปตไขมันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ชนิดฝาเกลียว (ไขมันที่เหลือเก็บใส่ขวด vial ที่อุณหภมิ - 20 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นเขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน คลายฝาออก นำไปสู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

2) นำสารละลายออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายใส่กรวยแยก ชะสารทีตกค้างในหลอดทดลองด้วยโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเก็บรวมกันในกรวยแยก

3) เติม เฮกเซน (Hexane AR) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และเขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น เก็บสารละลายชั้นบนไว้ (เฮกเซน) และถ่ายสารละลายชั้นล่างลงในหลอดทดลองเดิม เพื่อนำมาสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเขย่า 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น ใช้หลอดดูดสารดูดสารละลายชั้นบน ใส่รวมกับสารละลายในกรวยแยกอันเดิม

4) เติมสารละลายโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก และเขย่าเล็กน้อย 1 นาที ปล่อยไว้ให้แยกชั้น ก่อนถ่ายสารละลายชั้นล่างทิ้ง และเก็บสารละลายชั้นบนไว้ในกรวยแยก

5) เทสารละลายที่เก็บไว้ในกรวยแยกลงในฟลากส์ก้นกลมผ่านกรวยแก้วที่บรรจุโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส

6) นำฟลากส์ก้นกลมไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ และเป่าแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นละลายด้วยเฮกเซน (n- hexane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนถ่าย

ลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอที่จะนะชำไปฉีดด้วยเครื่องแก๊สโครโมโตกราฟ

7) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณกรดไขมัน ด้วยเครื่องแก๊สโครโมโตกราฟ และชนิดของอุปกรณ์ตรวจวัดเป็น Flame Ionizertion Detecter (FID) คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมม์ชนิด HP- INNOWax ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิลิตร และเคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครลิตร ปริมาณที่ฉีด 1 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้ ฉีดด้วยระบบ spit เท่ากับ 10 :1 อัตราการไหลขอแก๊สฮีเลียม(แก๊สพา) 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุด ฉีดสารเท่ากับ 230 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิที่อุปกรณ์ตรวจวัด (ดีเทคเตอร์) เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส โปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 0.50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 170 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิ 25 นาที รวมระยะเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ 49 นาที

ตอนที่ 2

2.9 การเก็บรวบรวมปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม

ทำตามขั้นตอนที่ 2.6.6

2.10 การเตรียมปรสิต *C. irritans* ระยะ theront เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว

การเตรียมปรสิตเชื้อตาย นำ *C. irritans* ระยะ ธีรอนต์ ประมาณ 10^6 เซลล์ ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแช่ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างปรสิตด้วย 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ได้ปรสิตระยะธีรอนต์เชื้อตาย เก็บที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

2.11 การเลี้ยงยีสต์ปริมาณมาก

ทำตามขั้นตอนที่ 2.6.5

2.12 การตรึงเซลล์ปรสิตและเซลล์ยีสต์

2.12.1 การตรึงเซลล์ปรสิตระยะ theront

1) นำเซลล์ปรสิตระยะ theront ประมาณ 25000 เซลล์ เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสมในข้อ 4.1.1 ฉีดสารผ่านสายยางลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลคงตัว

3) เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำเม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุชเนอร์ ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิลลิตร

4) ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

2.13 การตรึงเซลล์ยีสต์ *P. janidii*

1) ชั่งเซลล์ยีสต์ให้ได้เซลล์ประมาณ 2.5 x 10^5 เซลล์ (ภาคผนวก ข) เติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันได้เป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนต

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสมในข้อ 4.1.1 ฉีดสารผ่านสายยางลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลคงตัว

3) เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำเม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุชเนอร์ ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิลลิตร

4) ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

2.14 การผลิตอาหารสำหรับปลากะพงขาว

1) ทำการผลิตอาหารสำหรับปลาทะเลที่มีส่วนผสมของอาหารสัตว์น้ำในแต่ละชุดการทดลองมีดังนี้ อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร

อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุมประกอบด้วยสูตรอาหารปลากะพงพื้นฐาน

สูตรที่ 2 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะธีรอนต์ เชื้อตาย

สูตรที่ 3 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสมยีสต์ *P. janidii*

สูตรที่ 4 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุม Sodium alginate

โดยอาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 49-51 เปอร์เซนต์ และปริมาณไขมัน 12-13 เปอร์เซนต์

2.15 ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (Proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้

2.16 การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต

1) วางแผนการทดลองเป็นการทดลองแบบ 3x3 CRD ทดลองในปลากะพงขาวขนาดประมาณ 3 นิ้ว จำนวน 30 ตัวต่อ กระชังขนาด 90x90x80 เซนติเมตร (กxยxส) ในบ่อดินขนาด 8x7x1.8 เมตร (กxยxล)

2) ทดลองให้ปลากะพงขาวกินอาหารชุดทดลองปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

3) ทำการสุ่มปลากะพงขาวจำนวน 12 ตัว เพื่อเจาะเลือดก่อนเริ่มทดลองและเมื่อกินอาหารชุดทดลองครบ

4) ทำการให้อาหารปลากะพงขาวโดยใช้อาหารเดียวกับกลุ่มควบคุมปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลากะพงขาวจำนวน 12 ตัว เพื่อทำการเจาะเลือด

5) ทำการย้ายปลากะพงขาวจากบ่อดินใส่ในถังไฟเบอร์ปริมาตร 300 ลิตร จำนวน 30 ตัว/ถัง จำนวน 3 ถัง/ทรีตเมนต์ ปรับความเค็มปลากะพงขาวจาก 25 พีพีที เป็น 30 พีพีที โดยเลี้ยงปลาด้วยปริมาตรน้ำ 100 ลิตร

6) ใส่ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ ลงไปจำนวน 15,000 ตัวต่อปลา 1 ตัว เป็นเวลา 14 วัน สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนปลาที่รอดชีวิตในแต่ละวัน

2.17 การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

นำปลามาทำการเจาะเลือด ใช้ส่วนของซีรัมตรวจหาไลโซไซม์ วัดระดับแอนติบอดี โดยเทคนิค ELISA และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ IgM โดย วิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของLaemmli (Laemmli, 1970)

2.18 การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรัมปลากะพงขาว

ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* บนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) โดยเตรียมเชื้อ *Micrococcus luteus* วัดความเข้มข้นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสง = 0.4 เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อที่ได้ไปสวอปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ให้ทั่วทั้งเพลท ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เจาะหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร เพลทละ 4-5 หลุม ปิเปตซีรั่ม และเมือกปลา ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงในแต่ละหลุมที่เจาะไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (clear zone) นำค่าที่ได้มาเทียบกับจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรั่ม และเมือกปลากะพง

2.19 การตรวจผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การเตรียมสารเคมี (แสดงในภาคผนวก ก)

1) เคลือบเพลท (Coat plate) 96 well ELISA plate ปรสิต theront เชื้อตาย จำนวน 200 ตัวต่อหลุม ใน coating buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2) ล้างด้วย 0.01M PBS ที่มี Tween 20 ความเข้มข้น 0.05% (0.01 M PBS-T) ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3) เติม 5% blotto เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม

4) ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร

5) เติมตัวอย่างซีรั่มปลากะพงขาว/ตัวควบคุมบวก/ตัวควบคุมลบ ที่ละลายใน 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7) ล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร

8) เติม *Mouse Anti-Fish* IgM ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 1: 120,000

9) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

10) ล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตร

11) เติม Goat Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase conjugate (GAM-HRP) ความเข้มข้น 1: 5,000 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

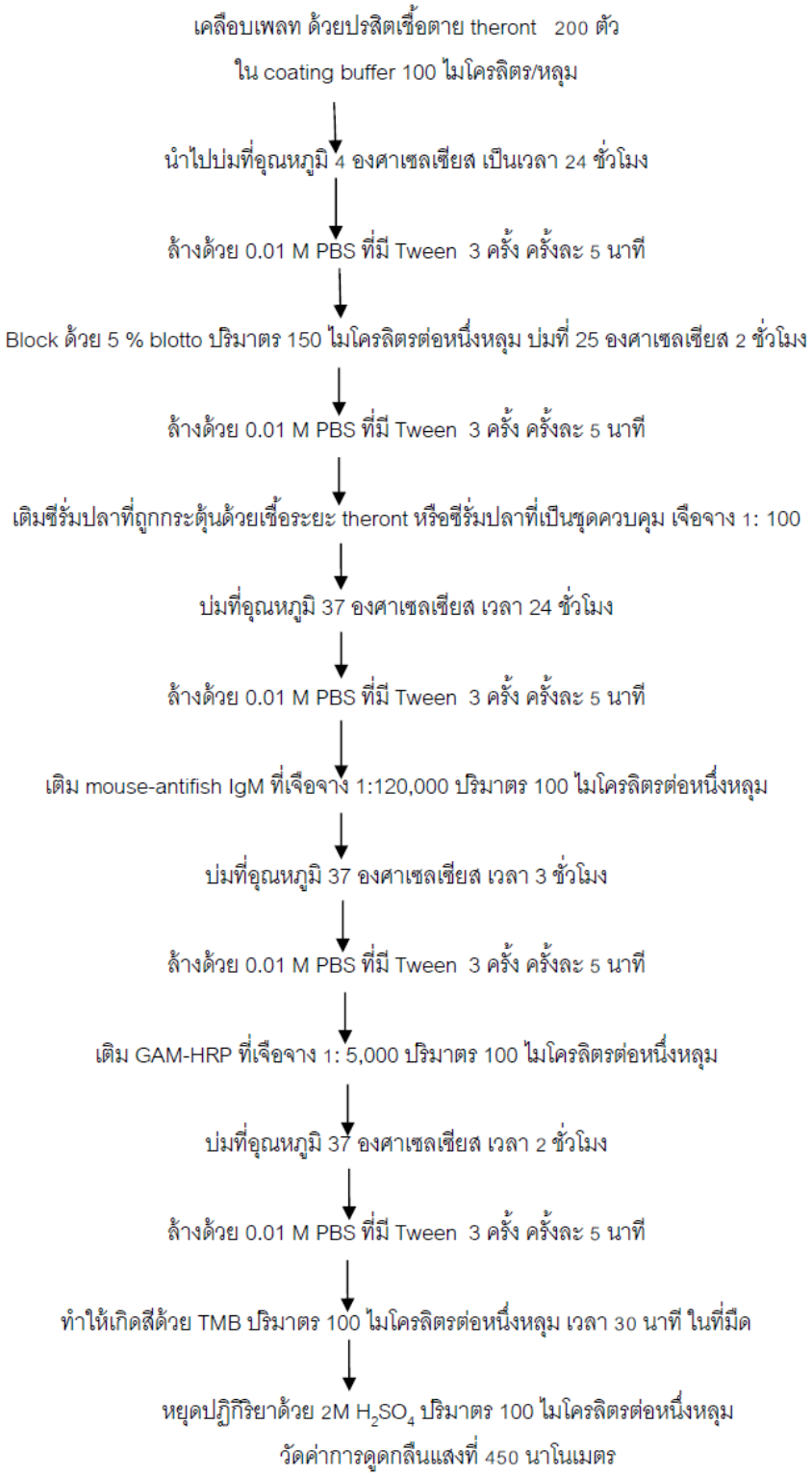
12) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

13) ล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ 150 ไมโครลิตรต่อหนึ่ง

14) เติม 3, 3', 5, 5' -tetramentylbenzidine (TMB) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

15) หยุดปฏิกิริยาด้วย 2M H_2SO_4 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

16) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



ภาพที่ 2-1 แผนผังการทำ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจากในซีรัมปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย *C. irritans* ระยะธีรอนต์และยีสต์

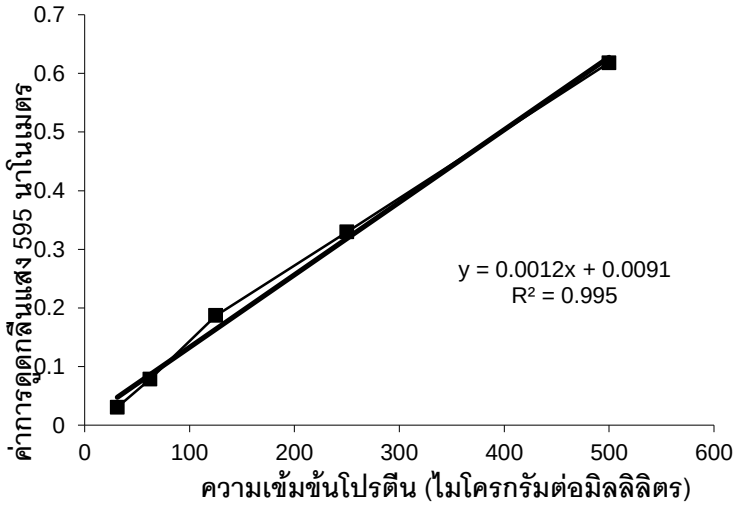
2.20 การแยกแอนติบอดีปลากะพงขาวโดยเทคนิค SDS-PAGE

การตรวจหาแถบอิมมูโนโกลบุลินเอ็ม (IgM) ใช้ 12.5% SDS-PAGE จากนั้นย้อมสีโปรตีนด้วย colloidal coomassie brilliant G-250 ประมาณหนึ่งชั่วโมง หรือจนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ล้างพื้นหลังออกด้วยน้ำ จนพื้นหลังใส แล้วจึงเก็บเจลในน้ำกลั่น แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.21 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ (การเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก ก)

- 0.03125, 0.0625, 0.1250, 0.2500, 0.5000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA
- Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent (Bio-Rad Labotatories)
- เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ก)



ภาพที่ 2-2 กราฟโปรตีนมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นโปรตีนกับค่าดูดกลืนแสงช่วง 595 นาโนเมตร ในแผ่นไมโครไตเตอร์เพลท

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพง

นำซีรั่มที่ได้มาเจือจาง 500 เท่า โดยใช้ซีรั่ม 1 ไมโครลิตร เจือจางด้วย 0.01 M PBS 499 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml จากนั้นปิเปตมา 10 ไมโครลิตร ใส่ใน Microplate 96 well ปิเปต Dye reagent (Bio-Rad protein assay, dye reagent, Bio-Rad Laboratories) ที่เจือจางอัตราส่วน 1:4 (Dye reagent : น้ำ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในทุกหลุมจากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ช่วง 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบจากกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตอนที่ 3

2.22 การเก็บรวบรวมและการเตรียมเซลล์ปรสิต

ทำตามกระบวนการข้อที่ 2.6.6 และข้อที่ 2.10

2.23 การเลี้ยงยีสต์ปริมาณมาก

ทำตามกระบวนการข้อที่ 2.6.5

2.24 การตรึงเซลล์ปรสิตและเซลล์ยีสต์

ทำตามกระบวนการข้อที่ 2.12

2.25 การผลิตอาหารสำหรับปลาการ์ตูนส้มขาว

1) ทำการผลิตอาหารสำหรับปลาทะเลที่มีส่วนผสมของอาหารสัตว์น้ำในแต่ละชุดการทดลองมีดังนี้ อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร

สูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุมประกอบด้วยสูตรอาหารปลากะพงพื้นฐาน

สูตรที่ 2 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะธีรอนต์ เชื้อตาย

สูตรที่ 3 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสมยีสต์ *P. janidii*

สูตรที่ 4 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุม Sodium alginate

โดยอาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 37-51 เปอร์เซนต์ และปริมาณไขมัน 16-19 เปอร์เซนต์

2.26 ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (Proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้

2.27 การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต

การทดลองครั้งที่ 1

1) วางแผนการทดลองเป็นการทดลองแบบ 3x3 CRD ทดลองในปลาการ์ตูนส้มขาวขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร จำนวน 40 ตัวต่อ กระชังขนาด 50x50x60 เซนติเมตร (กxยxส) ในบ่อไฟเบอร์ขนาด 2.2x2.5x1.8 เมตร (กxยxล) พร้อมระบบยังชีพสัตว์น้ำ จำนวน 12 กระชัง

2) ทดลองให้ปลาการ์ตูนกินอาหารชุดทดลองทั้ง 4 สูตร ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

3) ทำการสุ่มปลาการ์ตูนจำนวน 12 ตัว เพื่อเจาะเลือดก่อน

4) ทำการให้อาหารปลาการ์ตูนโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 ด้วยปริมาณที่ 3% ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลาการ์ตูนจำนวน 12 ตัว เพื่อทำการเจาะเลือด

5) ทำการย้ายปลาการ์ตูนจากกระชังที่เลี้ยง ใส่ในตู้ขนาด 40 ลิตร จำนวน 30 ตัว/ตู้ โดยแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

6) ใส่ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ ลงไปจำนวน 1,500 ตัวต่อปลา 1 ตัว สังเกตและบันทึกผลการทดลองเพื่อหาอัตรารอดเป็นเวลานาน 14 วัน

การทดลองครั้งที่ 2

1) วางแผนการทดลองเป็นแบบ 3x3 CRD โดยใช้ปลาการ์ตูนส้มขาวขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร จำนวน 40 ตัวต่อ ในบ่อไฟเบอร์เดียวกับการทดลองครั้งที่ 1 จำนวน 12 กระชัง

2) ทดลองให้ปลาการ์ตูนกินอาหารชุดทดลองทั้ง 4 สูตรสลับกับอาหารสูตรที่ 1 ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์/ 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์

3) ระหว่างการกินอาหารนี้ ทำการสุ่มปลาการ์ตูนจำนวน 12 ตัว เพื่อเจาะเลือดทุก 2 สัปดาห์

4) เมื่อครบกำหนด 8 สัปดาห์ ทำการย้ายปลาการ์ตูนจากกระชังที่เลี้ยง ใส่ในตู้ขนาด 40 ลิตร จำนวน 30 ตัว/ตู้ โดยแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

5) ใส่ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ ลงไปจำนวน 1,500 ตัวต่อปลา 1 ตัว สังเกตและบันทึกผลการทดลองเพื่อหาอัตรารอดเป็นเวลานาน 21 วัน

2.28 การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

นำเลือดที่เก็บได้ระหว่างการกินอาหารและการเผชิญเชื้อ โดยใช้ส่วนของซีรัม วัดระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ IgM โดย วิธี Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของLaemmli (Laemmli, 1970)

1) การตรวจผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาการ์ตูนโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ทำตามกระบวนการข้อ 2.19-2.20

2) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) ทำตามกระบวนการข้อ 2.21

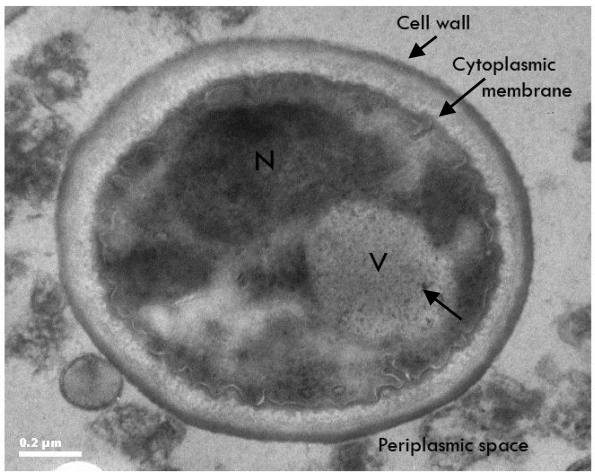
ผลการวิจัย
Results

<u>ตอนที่ 1</u> (การทดลองปี 1)

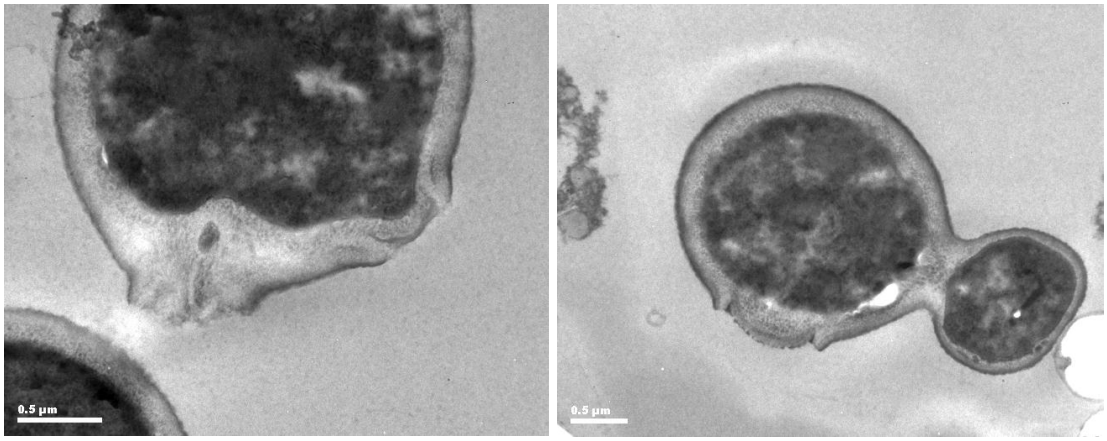
3.1 รูปร่างและโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ *Pichia jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย

ยีสต์ *Pichia jadinii* เป็นราที่แยกได้จากน้ำทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลบางแสน จังหวัดชลบุรี ที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (oval, ovoidal) ดังแสดงในภาพที่ 3-1 มีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร ภายในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) เพอริพลาสซึม (Periplasm) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าช่องว่างเพอริพลาสมิก (Periplasmic space) ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) นิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แวคิวโอล (vacuole) และเอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัม (Endoplasmic reticulum) ดังแสดงในภาพที่ 3-2 การเจริญของยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดที่ใหญ่ที่สุด (critical size) หลังจากนั้นจึงจะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งการแบ่งเซลล์ของยีสต์ *P. jadinii* เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อของยีสต์ *P. jadinii* เป็นการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) โดยการแตกหน่อเกิดขึ้นได้โดยรอบเซลล์ทุก ๆ ด้าน ดังแสดงในภาพที่ 3-3

ภาพที่ 3-1 รูปร่างของยีสต์ *Pichia jadinii*



ภาพที่ 3-2 โครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ *Pichia jadinii* เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (N= นิวเคลียส, V = แวคิวโอล)

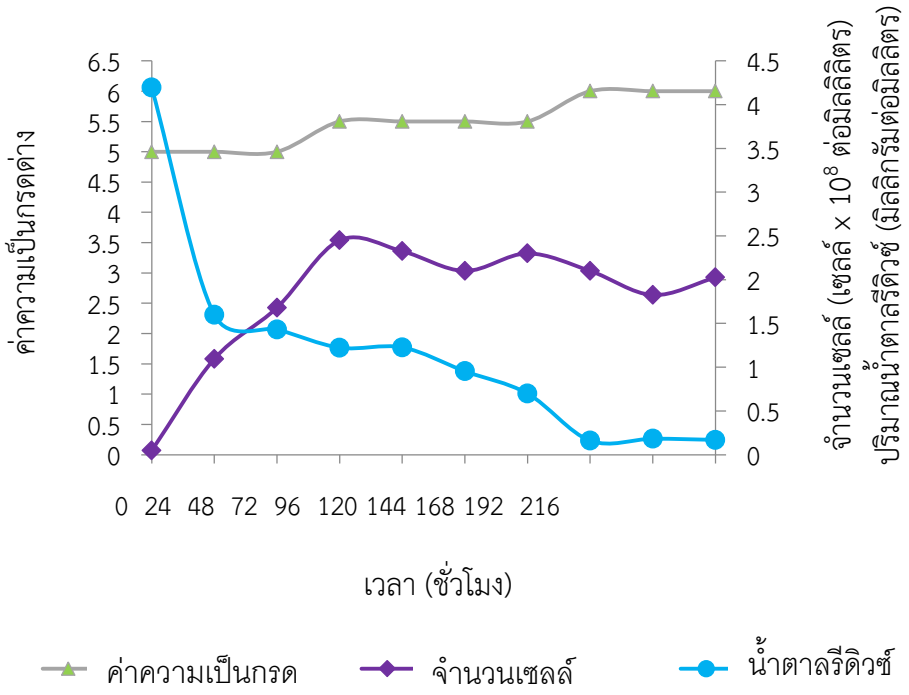


ภาพที่ 3-3 การแตกหน่อของยีสต์ *Pichia jadinii*

3.2 การเจริญของยีสต์ *P. jadinii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที

การศึกษาการเจริญของยีสต์ *P. jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ระหว่างเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ยีสต์ใช้เพื่อการเจริญเติบโตโดยวิธี Dinitrosalicylic acid assay วัดค่าความหวาน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย Hemocytometer ผลการทดลองพบว่าค่าความหวานตลอดการทดลองมีค่าระหว่าง 3 - 4 บริกซ์ ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของยีสต์เป็นแบบผกผัน โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างมากภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง และลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่จำนวนเซลล์ยีสต์ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง และมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เท่ากับ

2.45 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ค่อย ๆ ลดลง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มีจำนวนเซลล์ 2.02 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3-4



ภาพที่ 3-4 การเจริญของยีสต์ *Pichia jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที

3.3 การตรึง (Immobilization)

3.3.1 การทดสอบความคงตัวของเม็ดเจลที่ตรึงสารพอลิเมอร์ในน้ำทะเลเทียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน

การวิเคราะห์การตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน (Papain), ทริปซิน(trypsin), อัลบูมิน (Albumin) และบลูเดกซ์แตรน (Blue Dextrane) ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตระหว่างการเกิดปฏิกิริยาร้อยละ 1.2 (ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมตั้งต้น คือ ร้อยละ 1.5) พบว่าโปรตีน ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แล้วนำเม็ดเจลที่เตรียมได้แช่ในน้ำทะเลเทียมที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.4 และอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.0 เก็บตัวอย่างบัฟเฟอร์ในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง พบการหลุดของโปรตีนออกมาในปริมาณเล็กน้อย ส่วนบลูเดกซ์แตรนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าไม่พบการหลุดของสารภายในเวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3-1, 3-2 และ 3-3 ดังนั้นแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 จึงมีประสิทธิภาพและความเหมาะสมสำหรับใช้การตรึงสารที่เป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนและพอลิเมอร์ของแอนไฮโดรกลูโคส (Anhydroglucose)

ตารางที่ 3-1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำทะเลเทียมที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในน้ำทะเลเทียมที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	595			280
	ปาเปน (มวลโมเลกุล~ 23,000 ดัลตัน)	ทริปซิน (มวลโมเลกุล~ 23,300ดัลตัน)	อัลบูมิน (มวลโมเลกุล~ 67,000 ดัลตัน)	บลูเดกซ์แตรน (มวลโมเลกุล~ 2,000,000 ดัลตัน)
0 นาที	0	0	0.016	0
10 นาที	0.011	0.009	0.004	0
20 นาที	0	0	0.033	0
30 นาที	0.014	0.010	0.048	0
1 ชั่วโมง	0.052	0.013	0.050	0
24 ชั่วโมง	0.010	0.011	0.074	0.003
48 ชั่วโมง	0.005	0.070	0.005	0.002

ตารางที่ 3-2 ค่าการดูดกลืนแสงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffered saline, PBS) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	595			280
	ปาเปน (มวลโมเลกุล~ 23,000 ดัลตัน)	ทริปซิน (มวลโมเลกุล~ 23,300 ดัลตัน)	อัลบูมิน (มวลโมเลกุล~ 67,000 ดัลตัน)	บลูเดกซ์แตรน (มวลโมเลกุล~ 2,000,000 ดัลตัน)
0 นาที	0.006	0.004	0.021	0
10 นาที	0.002	0.019	0.050	0.013
20 นาที	0.017	0.018	0.006	0.122
30 นาที	0.030	0.025	0.078	0.284
1 ชั่วโมง	0.024	0.023	0.087	0.592
24 ชั่วโมง	0.054	0.024	0.099	0.800
48 ชั่วโมง	0.022	0.013	0.018	0.860

ตารางที่ 3-3 ค่าการดูดกลืนแสงของอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่ได้จากการแช่เม็ดเจลตรึงสารพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ ปาเปน, ทริปซิน, อัลบูมิน และบลูเดกซ์แตรนด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.0

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			
	595			280
	ปาเปน (มวลโมเลกุล~ 23,000 ดัลตัน)	ทริปซิน (มวลโมเลกุล~ 23,300 ดัลตัน)	อัลบูมิน (มวลโมเลกุล~ 67,000 ดัลตัน)	บลูเดกซ์แตรน (มวลโมเลกุล~ 2,000,000 ดัลตัน)
0 ชั่วโมง	0	0	0.009	0
10 นาที	0.013	0.014	0.034	0
20 นาที	0.006	0.012	0.049	0.0035
30 นาที	0.022	0.006	0.038	0.0026
1 ชั่วโมง	0.009	0.008	0.023	0.007
24 ชั่วโมง	0.011	0.018	0.012	0.011
48 ชั่วโมง	0.034	0.033	0.013	0

3.3.2 การทดสอบความคงตัวของเม็ดเจลที่ตรึงปลาป่นด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

การศึกษาความคงตัวของเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงปลาป่นโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5 และ 2 สำหรับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตขณะเกิดปฏิกิริยาคือ ร้อยละ 0.8, 1.2 และ 1.6 (โซเดียมอัลจิเนตที่เตรียมตั้งต้นมีความเข้มข้นร้อยละ 1.0 1.5 และ 2 ตามลำดับ) นำเม็ดเจลที่เตรียมได้แช่ในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเกลือวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเพื่อตรวจหาการหลุดของโปรตีนออกจากเม็ดเจล ผลการทดลองพบว่าโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ขณะเกิดปฏิกิริยาเข้มข้นร้อยละ 0.8, 1.2 และ 1.6 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2 สามารถทำให้เม็ดเจลมีความคงตัว และกักปลาป่นไว้ในตาข่ายพอลิเมอร์ของแคลเซียมอัลจิเนตได้ในเวลา 2 ชั่วโมง และเริ่มมีโปรตีนจากปลาป่นหลุดออกมามากขึ้นที่เวลา 3 ชั่วโมง จนถึง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 3-4

จากผลการทดสอบความคงตัวของเม็ดเจลที่ตรึงโปรตีน บลูเดกซ์แตรน และปลาป่น พบว่าไม่มีการหลุดของสาร ดังนั้นการตรึงเซลล์จะได้ทดลองใช้โซเดียมอัลจิเนตขณะเกิดปฏิกิริยาร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ในการทดลองตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิต

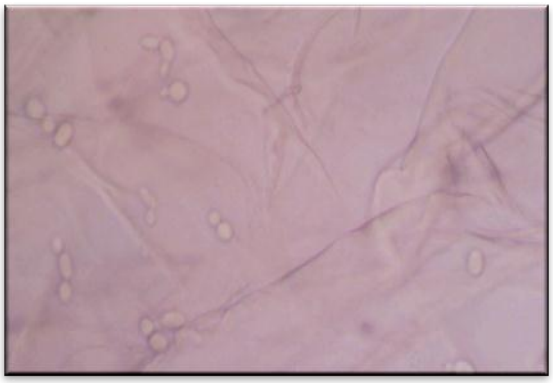
ตารางที่ 3-4 ปริมาณโปรตีนจากปลาป่นที่หลุดออกมาเมื่อตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต	ร้อยละความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์	ปริมาณโปรตีน (ปลาปน) ที่หลุดจากการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.8	1	0.88 ± 0.00
1.2	1	0.80 ± 0.00
1.6	1	0.78 ± 0.00
0.8	1.5	0.77 ± 0.05
1.2	1.5	0.02 ± 0.00
1.6	1.5	0.01 ± 0.00
0.8	2	0.04 ± 0.00
1.2	2	0.01 ± 0.00
1.6	2	0.00 ± 0.00

3.4 การตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

3.4.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ตรวจสอบเซลล์ตรึงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 3-5 ยีสต์ *P. jadinii* ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์ถูกกักอยู่ในเส้นพอลิเมอร์ของแคลเซียมอัลจิเนต



ภาพที่ 3-5 ภาพตัดขวางเม็ดเจลที่ตรึงยีสต์ *Pichia jadinii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X

จากข้อมูลการตรวจหาการหลุดของเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* จากการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำเกลือที่ได้จากการแช่เม็ดเจล ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง ไม่พบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ดังแสดงในตารางที่ 3-5 ดังนั้นโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ตรึงเซลล์ยีสต์

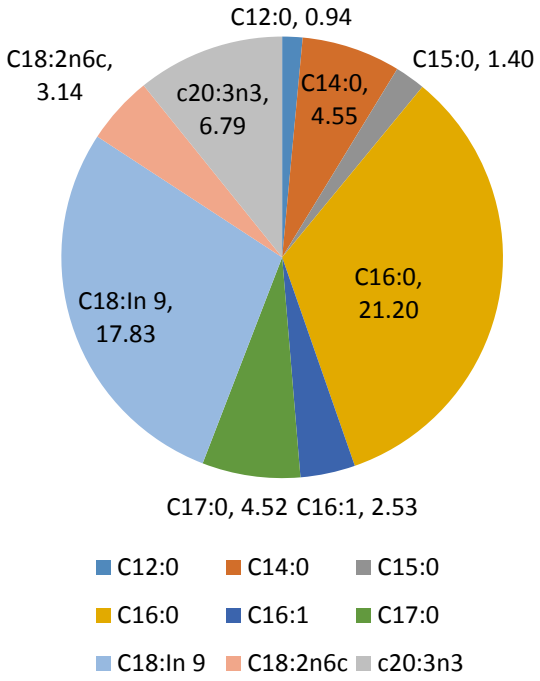
ตารางที่ 3-5 ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* จากแคลเซียมอัลจิเนตในน้ำตัวอย่าง

เวลา	ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร			ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ย
0 ชั่วโมง	0	0	0	0
10 นาที	0.001	0.003	0.001	0.002
20 นาที	0.007	0.003	0.006	0.005
30 นาที	0.007	0.005	0.004	0.005
1 ชั่วโมง	0.020	0.015	0.017	0.017
2 ชั่วโมง	0.009	0.016	0.020	0.015
24 ชั่วโมง	0.021	0.013	0.028	0.020
48 ชั่วโมง	0.037	0.025	0.019	0.027

3.4.2 ชนิดและร้อยละกรดไขมันชนิดทรานส์ (trans fatty acids, TFA) ในยีสต์ *P. jadinii* ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในเชื้อยีสต์ *P. jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ยีสต์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สกัดไขมันจากเม็ดเจล และวิเคราะห์กรดไขมันเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมัน 35 ชนิด ผลการทดลองพบกรดไขมัน 9 ชนิด ได้แก่ กรดลอริก (Lauric acid, C12:0), กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดเพนตะเดคาโนอิก (Pentadecanoic acid, C15:0), กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มิโอเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1), กรดเฮปาโทเดคาโนอิก (Hepatodecaenoic acid, C17:0), กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c), กรดซีส 11, 14, 17- ไอโคซาไตรอีโนอิค (cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid, C20:3n3) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมดสูงสุด (saturated fattyacid: SFA) ร้อยละ 32.61 มีกรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุดประมาณร้อยละ 21.20 ± 0.57 ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด (Monounsaturated fatty

acid) ร้อยละ 20.36 ของกรดไขมันทั้งหมดและมีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 17.83±0.58 นอกจากนี้ยังพบ กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) ร้อยละ 3.14 ± 0.10 และกรดซีส 11, 14, 17- ไอโคซาไตรอีโนอิค (cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid, C20:3n3) ร้อยละ 6.79 ± 0.21 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 3-6

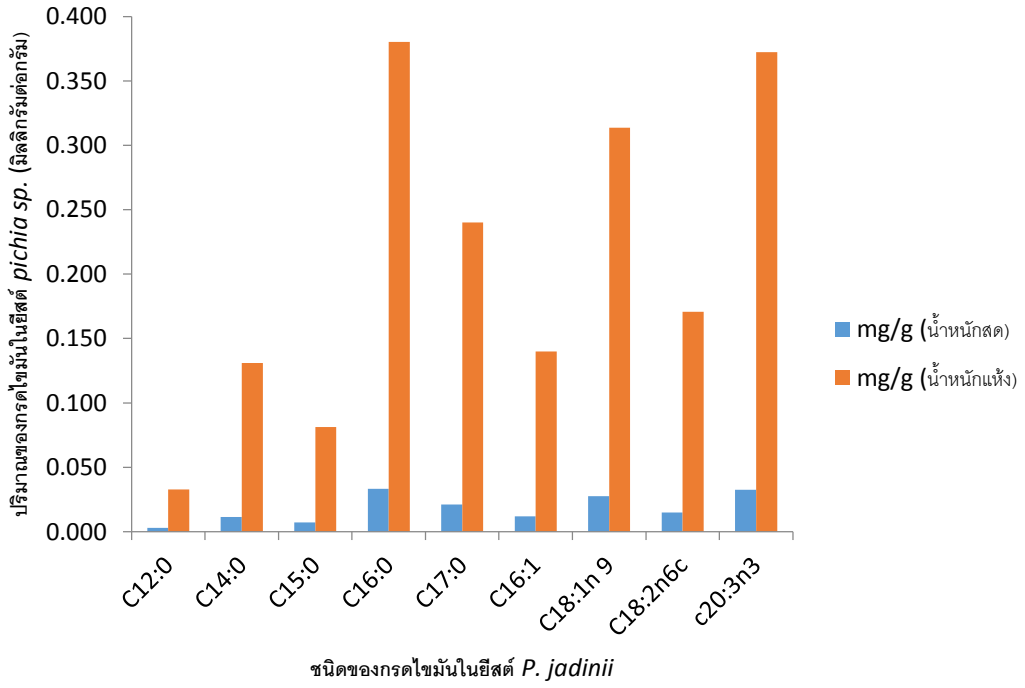


ภาพที่ 3-6 ชนิดและร้อยละของกรดไขมันแต่ละชนิดในกรดไขมันทั้งหมดที่สกัดได้จากเซลล์ตรึงยีสต์ *Pichia jadinii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

3.4.3 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในยีสต์ *P. jadinii*

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบกรดไขมันที่สกัดจากเม็ดเจลตรึงเซลล์ยีสต์กับสารมาตรฐานกรดไขมัน 35 ชนิด น้ำหนักเม็ดเจลตรึงเซลล์ยีสต์แห้งที่ใช้ในการสกัดคือ 1.0260 กรัม ผลการทดลองพบกรดไขมัน 9 ชนิด ได้แก่กรดลอริก (Lauric acid, C12:0), กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0), กรดเพนตะเดคาโนอิก (Penta- decanoic acid, C15:0), กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มิโอเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1), กรดเฮปาโทเดคาโนอิก (Hepatodecaenoic acid, C17:0), กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9), กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c), กรดซีส 11, 14, 17- ไอโคซาไตรอีโนอิค (cis-11, 14, 17Eicosatrienoic acid, C20:3n3) โดยพบกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด (saturated fatty acid: SFA) สูงสุด 0.08 mg/g (น้ำหนักสด), 0.87 mg/g (น้ำหนักแห้ง) มีกรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0)

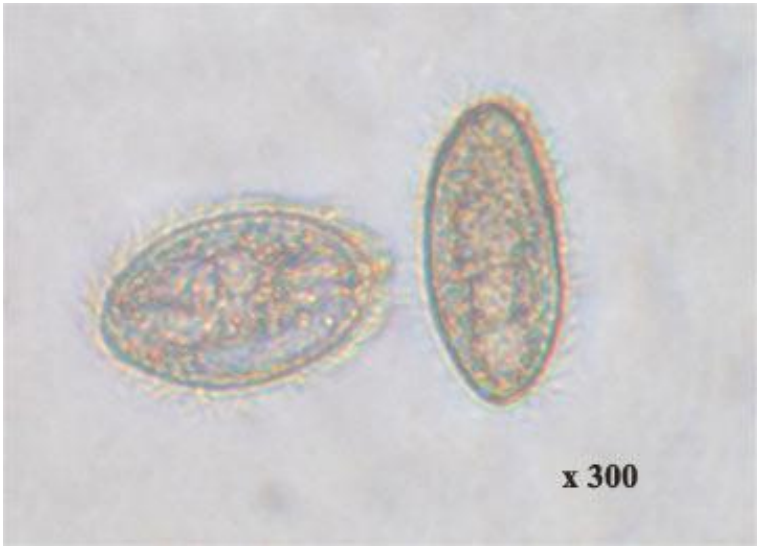
เป็นองค์ประกอบมากที่สุด 0.033 mg/g (น้ำหนักสด), 0.38 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) 0.05 mg/g (น้ำหนักสด), 0.54 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมดและมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 0.015 mg/g (น้ำหนักสด), 0.17 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 0.027 mg/g (น้ำหนักสด), 0.31 mg/g (น้ำหนักแห้ง) ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 3-7



ภาพที่ 3-7 ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที ที่เวลา 72 ชั่วโมง

3.5 การตรึงเซลล์ปรสิต *Cryptocaryon irritans* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ปรสิตที่ทำให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *C. irritans* เป็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัวซิลิเอต *C. irritans* ระยะ theront เป็นระยะที่พร้อมจะเข้าเกาะที่ซี่เหงือกและผิวตัวของปลา theront เป็นระยะตัวอ่อนที่ว่ายน้ำเป็นอิสระ มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย ด้านบนแหลมด้านล่างมน มีขนาดประมาณ 23.88 - 40.59 µm. มีขนรอบตัวเช่นเดียวกับตัวเต็มวัย ระยะนี้สามารถว่ายน้ำเป็นอิสระได้ ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะลงเกาะกับปลาที่เป็นเจ้าบ้าน เพื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 3-8 เซลล์ปรสิต theront มีขนาด 23.88 X 40.59 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึงสามารถตรึงเซลล์ปรสิตระยะ theront ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5



ภาพที่ 3-8 Theront ของ *Cryptocaryon irritans* ภายใต้กล้อง

ตอนที่ 2 (การทดลองปี 2)

3.6 การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (Proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้

นำอาหารที่ผลิตได้ทั้ง 4 สูตรมาทำการวิเคราะห์คุณค่าอาหารก่อนนำไปใช้เลี้ยงปลากะพงขาว จากการวิเคราะห์องค์ประกอบคุณค่าทางอาหารทั้ง 4 สูตร พบว่ามีความชื้นร้อยละ 6-7 เถ้าร้อยละ 13-15 โปรตีนร้อยละ 49-51 ไขมันร้อยละ 12-13 คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ ร้อยละ 15-17 ซึ่งค่าของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายเป็นค่าประมาณการจาก Nitrogen free extract (NFE) ไนโตรเจนฟรีแอกซ์แทรกเป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ง่ายได้แก่ แป้ง น้ำตาล เป็นต้น แต่ในการวิเคราะห์อาหารสัตว์ตามระบบของวีนเด ปรากฏว่ามีสารพวกเฮมิเซลลูโลส ลิกนินบางส่วน และวิตามินที่ละลายน้ำรวมอยู่ด้วย จึงไม่ใช่ค่าของแป้งและน้ำตาลที่แท้จริง อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่ยังคงเป็นสารพวกแป้งและน้ำตาล

3.7 การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

ครั้งที่ 1 นำปลากะพงขาวจำนวน 480 ตัว ที่มีขนาดเฉลี่ย 7.12 ± 0.48 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 5.21 ± 1.00 ก. มาพักและกักกันโรคก่อนนำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เพื่อนำไปเลี้ยงในกระชัง กระชังละ 40 ตัว จำนวน 12 กระชัง ในบ่อดินที่ทำการเตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 กะชัง ให้กินอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 ผสมปรสิต *C. irritans* ชุดการทดลองที่ 3 ผสมยีตส์ *P. jadinii* ชุดการทดลองที่ 4 ผสม Calcium alginate โดยแต่ละชุดให้กินอาหารทดลองเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้ว สุ่มปลากะพงขาวจำนวนกระชังละ 4 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดและทำการเจาะเลือด นำปลากะพงขาวไปเลี้ยงในกระชังเดิมอีก 6 สัปดาห์ โดยให้อาหารสูตรเดียวกับ ชุดการทดลองควบคุม อาหารที่ให้คิดเป็น 3% ของน้ำหนักเฉลี่ยที่ชั่ง จากนั้นสุ่มปลาจำนวนเท่าเดิมมาเจาะเลือดทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงปลาจนครบ 6 สัปดาห์ นำปลาที่

เหลือทั้งหมดในกระชังจากบ่อดินมาใส่ในถังไฟเบอร์ความจุ 300 ลิตร โดยใส่ถังละ 10 ตัว ให้เผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 theront/ปลา 1 ตัว จดบันทึกจำนวนปลาตายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อหาอัตรารอดของปลากะพงขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront และหาค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (Relative percent survival: RPS) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-6 และ 3-7

ตารางที่ 3-6 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (เริ่มต้น N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront (เริ่มต้น N = 10)

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**ความยาว (ซ.ม.) ($\bar{X}$ ± SD)**	**น้ำหนัก (กรัม) ($\bar{X}$ ± SD)**	**จำนวนปลาที่รอด (ตัว) (N = 10)**	**อัตรารอด (%) (N = 10)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	6.89 ± 0.51	4.70 ± 1.08	0	0
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	7.58 ± 0.08	5.73 ± 0.09	9	90
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	7.33 ± 0.04	5.73 ± 0.09	9	90
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate aaalalginate	7.18 ± 0.52	5.23 ± 1.22	0	0

ตารางที่ 3-7 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 10) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**อัตรารอด (%)**	**ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	0	0
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	90	90
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	90	90
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate aaalalginate	0	0

ครั้งที่ 2 นำปลากะพงขาวจำนวน 480 ตัวที่มีขนาดเฉลี่ย 8.15 ± 0.58 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 6.21 ± 0.79 ก. มาพักและกักกันโรคก่อนนำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เพื่อนำไปเลี้ยงในกระชัง กระชังละ 40 ตัว จำนวน 12 กระชัง ในบ่อดินที่ทำการเตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 กระชัง ให้กินอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 ผสม *C. irritans* ชุดการทดลองที่ 3 ผสมยีตส์ *P. jadinii* และชุดการทดลองที่ 4 ผสม Calcium alginate โดยให้กินเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้ว สุ่มปลากะพงขาวจำนวนกระชังละ 4 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดและทำการเจาะเลือด นำปลากะพงขาวไปเลี้ยงในกระชังเดิม ให้อาหารสูตรเดียวกับชุดการทดลองควบคุม โดยให้เป็น 3% ของน้ำหนักเฉลี่ยที่ชั่ง ทำการเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มปลามากระชังละ 4 ตัว ชั่งน้ำหนัก วัดขนาด และดูดเลือดทุก 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลากะพงขาวจำนวน 30 ตัว จากแต่ละชุดการทดลองใส่ในถังไฟเบอร์ที่ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร เพื่อทำการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 theront/ปลา 1 ตัว จดบันทึกจำนวนปลาตายเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อหาอัตรารอดของปลากะพงขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront และหาค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (Relative percent survival: RPS) โดยมีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-8 และ 3-9

ตารางที่ 3-8 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง (ครั้งที่ 2) ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันและเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront (เริ่มต้น N=30)

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**ความยาว (ซ.ม.) ($\bar{X}$ ± SD)**	**น้ำหนัก (กรัม) ($\bar{X}$ ± SD)**	**จำนวนปลาที่รอด (ตัว)**	**อัตรารอด (%)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	8.37 ± 0.07	6.52 ± 0.04	25	83
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	8.30 ± 0.09	6.38 ± 0.09	25	83
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	8.40 ± 0.17	6.61 ± 0.24	28	93
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate	7.52 ± 1.11	5.35 ± 1.50	27	90

ตารางที่ 3-9 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลากะพงขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**อัตรารอด (%)**	**ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	83	0
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	83	0
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	93	59
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate	90	0

3.8 การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

สุ่มปลากะพงชุดการทดลองละ 12 ตัว มาทำการเจาะเลือดโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. และเข็มฉีดยาเบอร์ 26 G. เคลือบสารป้องกันเลือดแข็งตัว ทำการเจาะเลือดปลาบริเวณโคนหางที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 5 และ 6 ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. ตั้งไว้ให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ส่วนของซีรั่ม นำส่วนของซีรั่มไปตรวจหาไลโซไซม์ วัดระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ Ig โดย วิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970)

3.8.1 การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรั่มปลากะพงขาว

จากการตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ (Lysozyme) ในน้ำเลือดของปลากะพงขาวที่สุ่มมาทำการเจาะเลือดที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 เมื่อให้อาหารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้วและสัปดาห์ที่ 4.5, 5 และ 6 ที่อยู่ระหว่างการเผชิญเชื้อ *C. irritans* ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-10 ถึง 3-11 และภาพที่ 3-9 ถึง 4-5

ตารางที่ 3-10 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวจากการทดลองครั้งที่ 1 ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 6, 6.5 และ 7

สัปดาห์ที่	**ขนาดของ clear zone (ซม.) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาว (ชุดที่ 1)**			
	ทรีตเมนต์ 1 (ชุดควบคุม)	**ทรีตเมนต์ 2 *(Cryptocaryon* +Calcium alginate)**	**ทรีตเมนต์ 3 (Yeast+Calcium alginate)**	**ทรีตเมนต์ 4 (Calcium alginate)**
0	+	+	+	+
2	+	+	0.43	0.30
4	+	0.56	0.70	+
6	-	+	+	-
6.5	-	-	-	-
7	-	-	-	-

หมายเหตุ + พบ clear zone

- ไม่พบ

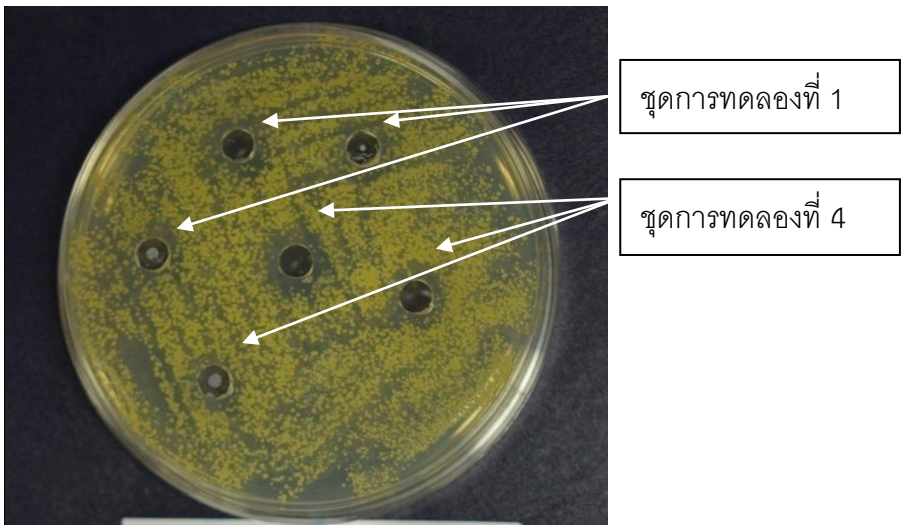
ตารางที่ 3-11 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวจากการทดลองครั้งที่ 2 ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 4.5, 5 และ 6

สัปดาห์ที่	**ขนาดของ clear zone (ซม.) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาว (ชุดที่ 2)**			
	ทรีตเมนต์ 1 (ชุดควบคุม)	**ทรีตเมนต์ 2 *(Cryptocaryon* +Calcium alginate)**	**ทรีตเมนต์ 3 (Yeast+Calcium alginate)**	**ทรีตเมนต์ 4 (Calcium alginate)**
0	-	-	-	-
2	+	+	+	+
4	+	+	+	+
4.5	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-

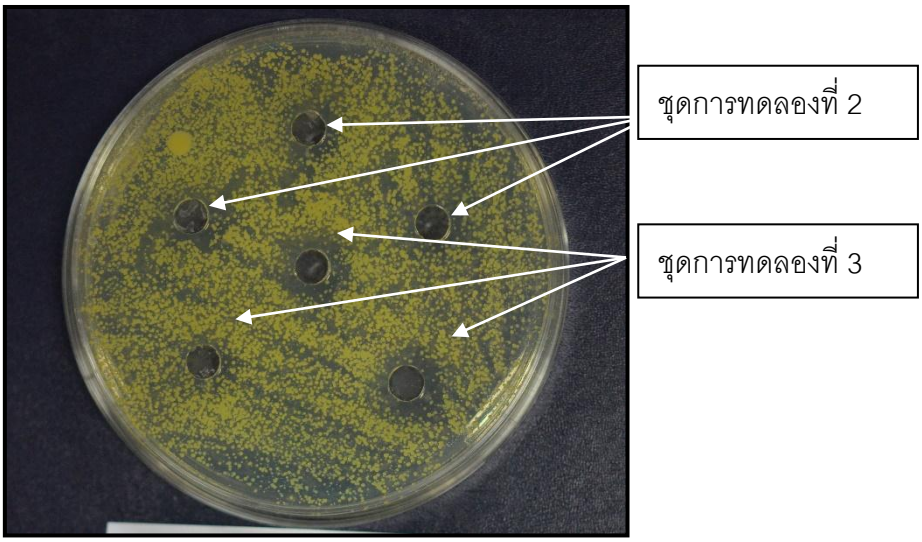
หมายเหตุ + พบ clear zone

- ไม่พบ

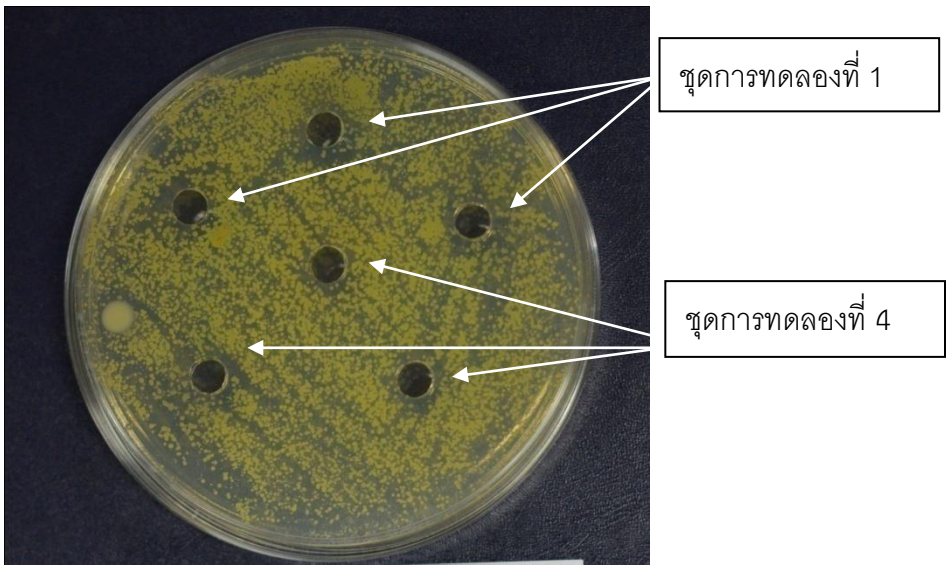
ภาพที่ 3-9 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 ก่อนการทดลอง



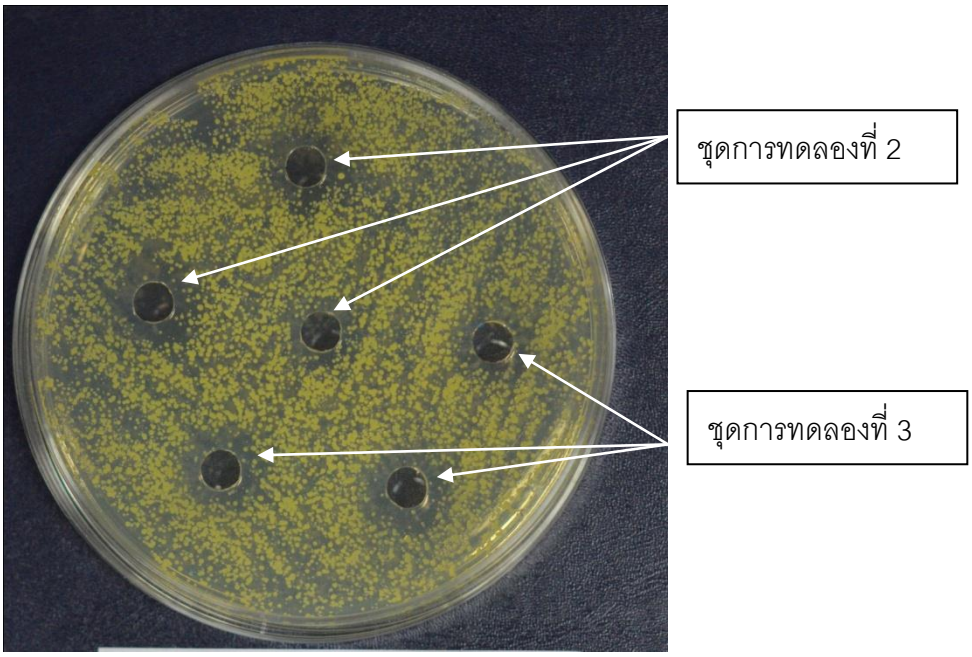
ภาพที่ 3-10 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) และ 4 ผ่านไป 2 สัปดาห์



ภาพที่ 3-11 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ผ่านไป 2 สัปดาห์



ภาพที่ 3-12 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองชุดการทดลองที่ 1 และ 4 ผ่านไป 4 สัปดาห์



ภาพที่ 3-13 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ผ่านไป 4 สัปดาห์

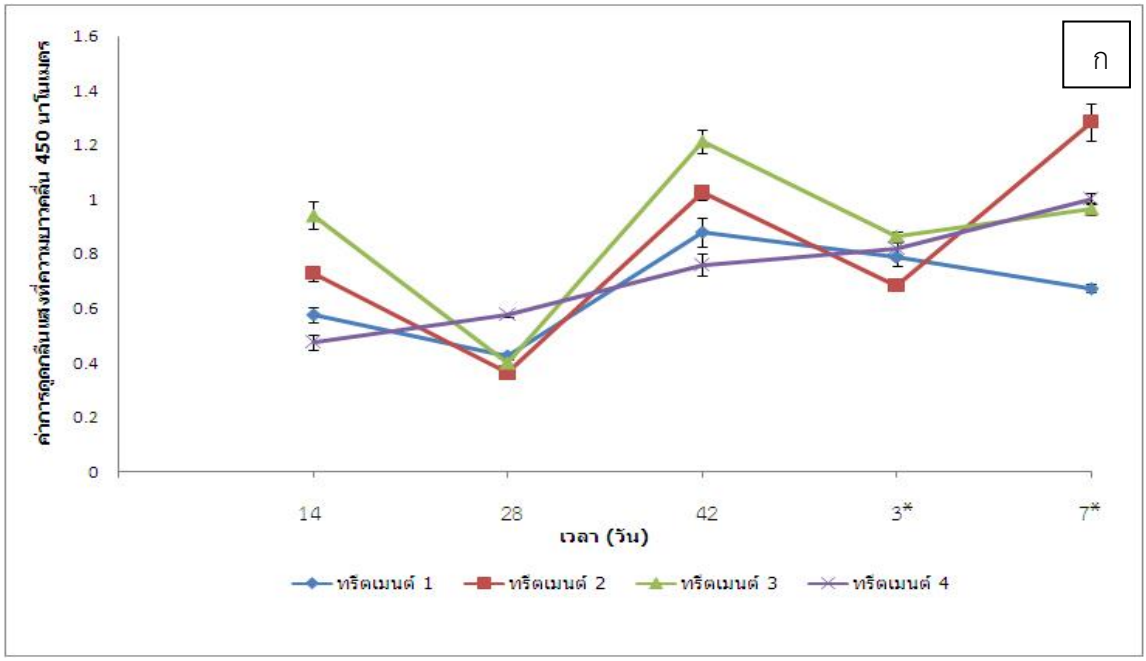
3.8.2 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritan* ระยะ theront และยีสต์ โดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

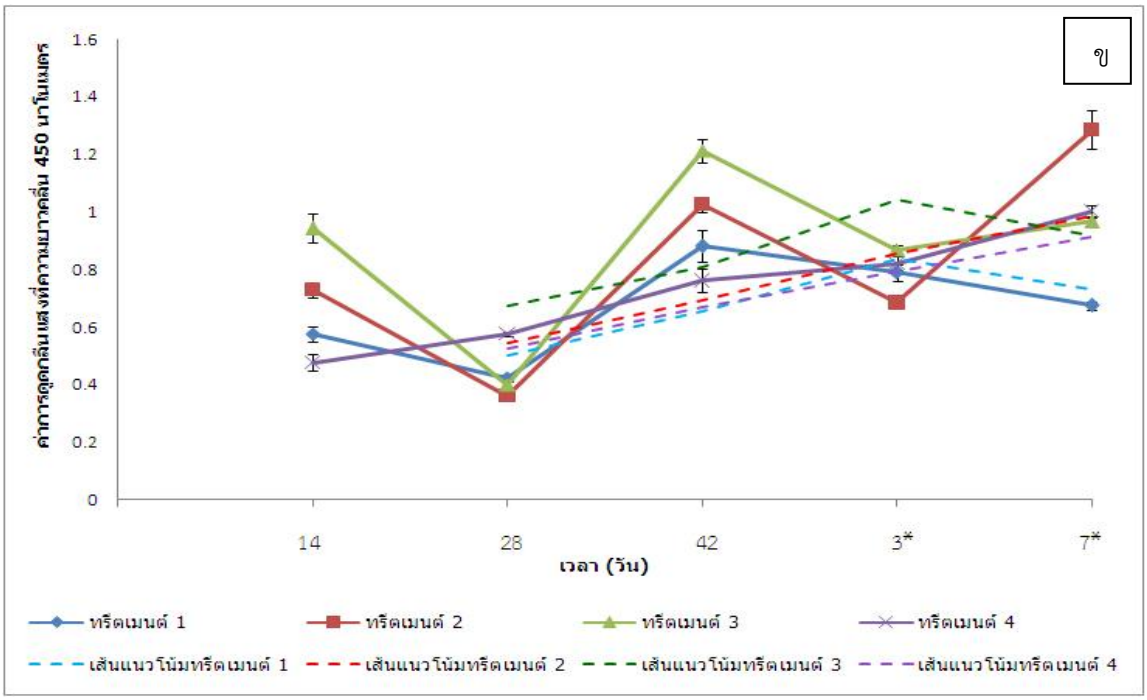
จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวครั้งที่ 1 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว โดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร โดยสูตรที่ 2 มีปรสิต *C. irritan* ระยะ theront สูตรที่ 3 มียีสต์เป็นองค์ประกอบ สำหรับสูตรที่ 1 และ 4 เป็นชุดควบคุม ให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อได้ 3 และ 7 วัน เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-12 เมื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ให้อาหาร และระยะเวลาที่ให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 2 และ 3 ที่มีปรสิต *Cryptocarryon* และยีสต์ เป็นองค์ประกอบตามลำดับ มีระดับที่สูงกว่าชุดควบคุมที่เวลา 14 วัน และลดลงในวันที่ 28 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 42 เมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตมีชีวิตเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารที่มีปรสิตสูงกว่าอาหารที่มียีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 3-14 เมื่อพิจารณาจากเส้นแนวโน้มพบว่าชุดการทดลองที่ 3 ที่ปลาได้รับอาหารที่มียีสต์มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าอาหารที่มีปรสิตและสูงกว่าชุดควบคุมดังแสดงในภาพที่ 3-14-ข

การที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งปลาได้รับอาหารที่มีปรสิตเป็นองค์ประกอบที่เวลา 7 วัน ซึ่งเป็นรอบวงชีวิตของปรสิตที่ปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน เมื่อพิจารณาเส้นแนวโน้มพบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกชุดการทดลองที่เวลา 42 วัน หรือ 6 สัปดาห์ และเมื่อปลาได้เผชิญกับเชื้อปรสิตก็มีแนวโน้มที่ระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นอีกครั้ง

ตารางที่ 3-12 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 3 และ 6 วัน โดยเทคนิค ELISA

ระยะเวลา (สัปดาห์)	**ระยะเวลา (วัน)**	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ($\overline{X}$ ± SD)**			
		เคลือบเพลทด้วยเชื้อตายระยะ Theronts 200 ตัวต่อหลุม MAF 1:12000, GAM-HRP 1:5000, test sera 1:1000			
		ชุดการทดลอง 1 (ชุดควบคุม)	**ชุดการทดลอง 2 (*Cryptocaryon* + Calcium alginate)**	**ชุดการทดลอง 3 (Yeast + Calcium alginate)**	**ชุดการทดลอง 4 (Calcium alginate)**
2	14	0.576±0.027	0.729±0.027	0.943±0.051	0.476±0.028
4	28	0.424±0.007	0.363±0.001	0.401±0.010	0.576±0.005
6	42	0.881±0.054	1.025±0.027	1.213±0.041	0.761±0.041
การเผชิญเชื้อ	การเผชิญเชื้อ				
6.5	3	0.789±0.030	0.684±0.016	0.867±0.016	0.821±0.023
7	6	0.674±0.016	1.286±0.069	0.966±0.021	1.003±0.020





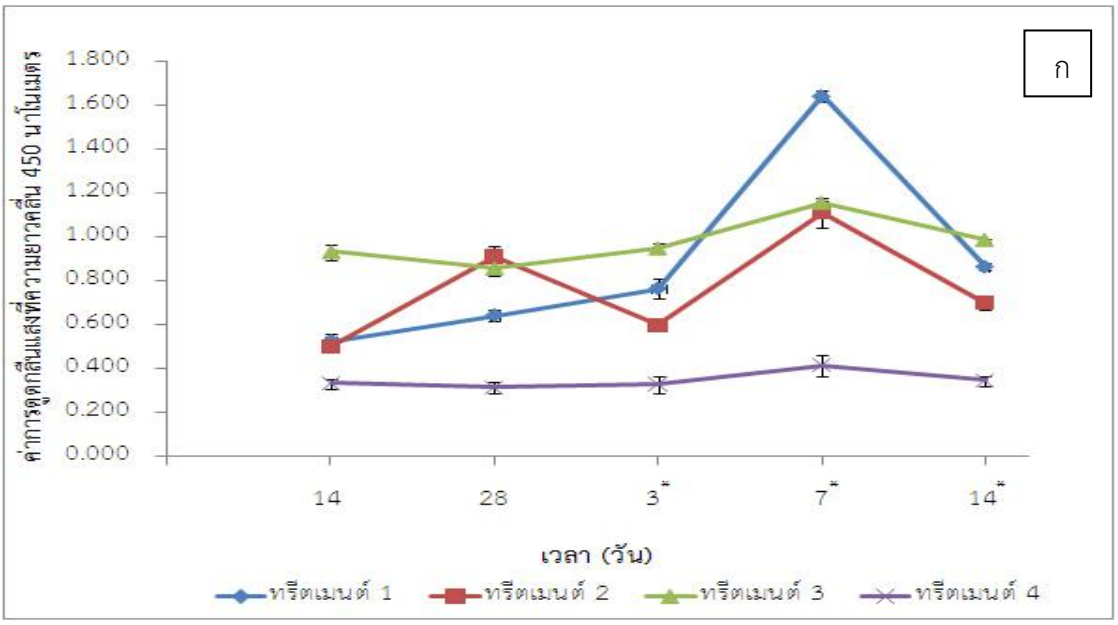
ภาพที่ 3-14 ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ทรีตเมนต์ 2) และยีสต์ (ทรีตเมนต์ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท ข) เส้นแนวโน้มของระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพง

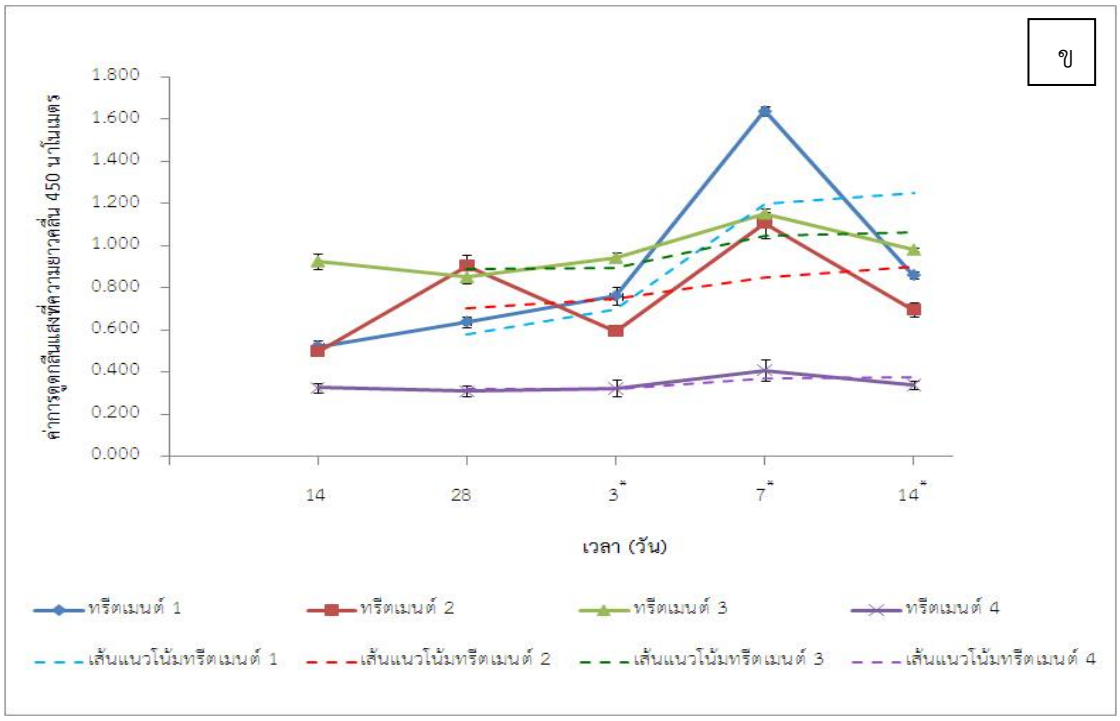
จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวครั้งที่ 2 ได้ทดลองให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อได้ 3 7 และ 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวโดยเทคนิค ELISA เมื่อเจือจางซีรั่ม 1000 เท่า ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-13 และการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีเมื่อใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนแสดงในภาพที่ 3-15 ในการทดลองครั้งที่ 2 นี้พบว่าเมื่อปลาได้รับอาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 14 วัน ระดับของแอนติบอดีสูงกว่าในชุดควบคุมและอาหารที่มีแคลเซียมอัลจิเนต รวมทั้งเมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 3 และ 14 วัน

การที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีสูงขึ้นชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ส่วนชุดการทดลองที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แต่เมื่อปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกชุดการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3-15-ข

ตารางที่ 3-13 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวจากการทดลองครั้งที่ 2 ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และระหว่างการเผชิญที่เวลา 3, 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค ELISA

ระยะเวลา (สัปดาห์)	**ระยะเวลา (วัน)**	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ($\overline{X}$ ± SD)**			
		เคลือบเพลทด้วยเชื้อตายระยะ Theronts 200 ตัวต่อหลุม MAF 1:12000 , GAM-HRP 1:5000 , test sera 1:1000			
		ชุดการทดลอง ที่ 1 (ชุดควบคุม)	**ชุดการทดลอง ที่ 2 (*Cryptocaryon* +Calcium alginate)**	**ชุดการทดลอง ที่ 3 (Yeast+Calcium alginate)**	**ชุดการทดลอง ที่ 4 (Calcium alginate)**
2	14	0.524±0.031	0.502±0.021*	0.929±0.036	0.545±0.022
4	25	0.641±0.024	0.907±0.051	0.854±0.031	0.619±0.025
	เผชิญเชื้อ				
4.5	3	0.764±0.043	0.598±0.009	0.946±0.022	1.113±0.038
5	7	1.642±0.024	1.108±0.070	1.153±0.011	0.783±0.050
6	14	0.863±0.016	0.698±0.034	0.984±0.008	0.826±0.021





ภาพที่ 3-15 ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ชุดการทดลองที่ 2) และยีสต์ (ชุดการทดลองที่ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 7 และ 14 วัน (3* 7*และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท ข) เส้นแนวโน้มของระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพง

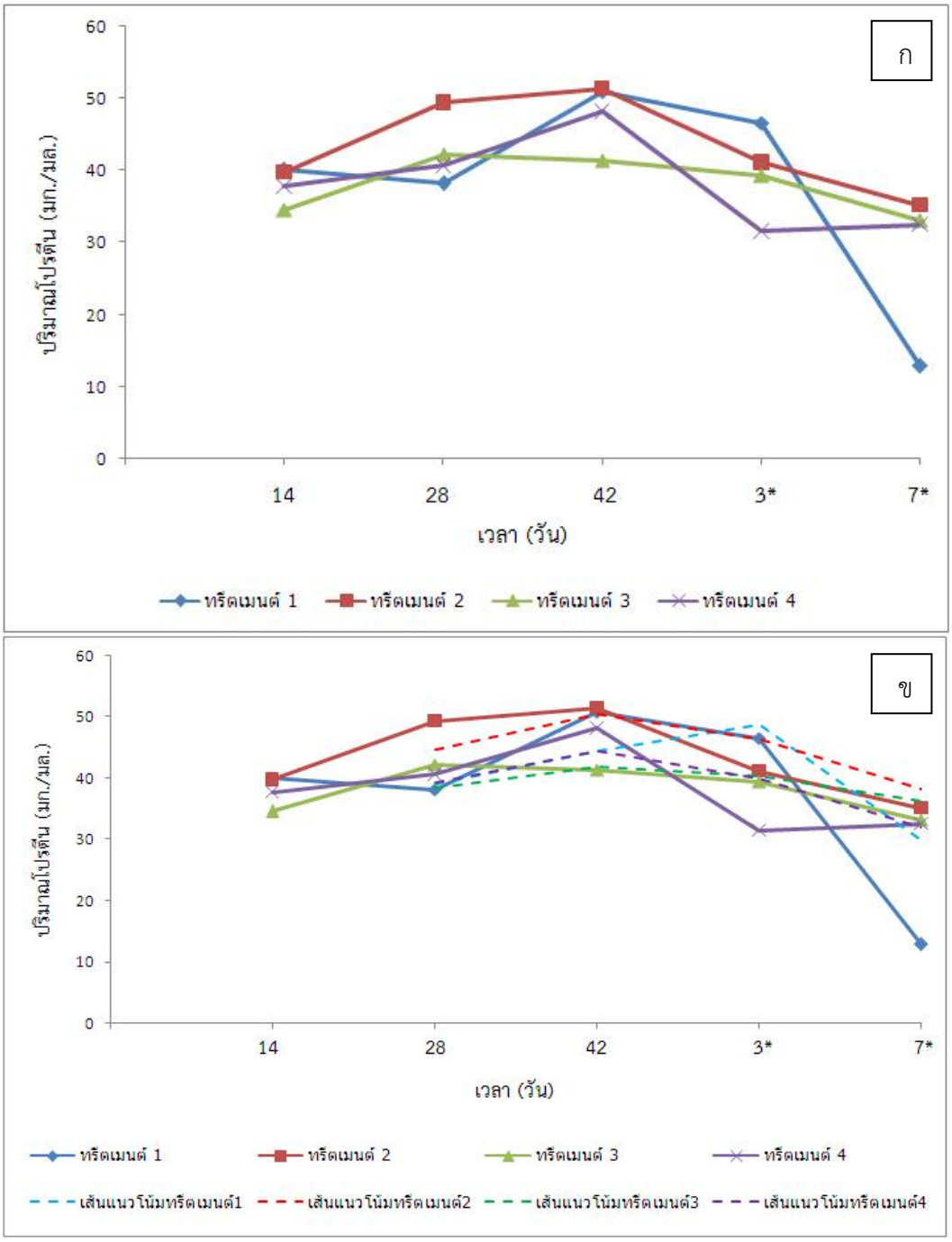
3.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford

จากการตรวจหาปริมาณโปรตีนในซีรั่มของปลากะพงขาวชุดที่ 1 และชุดที่ 2 โดยชุดที่ 1 ทำการเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้กินอาหารเดียวกับชุดควบคุมอีก 4 สัปดาห์ ก่อนนำขึ้นมาเผชิญเชื้อ *C. irritans* ในถังทดลองขนาดปริมาตร 300 ลิตร ทำการบันทึกอัตรารอดของปลากะพงขาวทุกวัน ในระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวนี้ ได้ทำการสุ่มมาทำการเจาะเลือดที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และ 6 และระหว่างการเผชิญเชื้อ *C. irritans* ที่สัปดาห์ที่ 6, 5 และ 7 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-14 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการให้อาหารโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง และมีแนวโน้มที่ลดลงหลังจากที่ปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตดังแสดงในภาพที่ 3-16-ข โดยปริมาณโปรตีนได้ลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงมากที่สุดต่ำกว่าในวันที่ 14ในซีรั่มปลาที่ได้รับอาหารสูตร1 ซึ่งเป็นชุดควบคุม สำหรับชุดทดสอบทรีตเมนต์ 2 และ 3 โปรตีนมีปริมาณลดลงมาใกล้เคียงกับที่ 14 วัน

ตารางที่ 3-14 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และ 6และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6.5 และ 7

ระยะเวลา		**ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**			
(สัปดาห์)	**(วัน)**	**ชุดการทดลอง 1**	**ชุดการทดลอง 2**	**ชุดการทดลอง 3**	**ชุดการทดลอง 4**
0	0	39.32	31.08	31.08	31.08
2	14	40.08	39.78	34.55	37.76
4	28	38.17	49.40	42.24	40.64
6	42	50.89	51.416	41.42	48.17
การเผชิญเชื้อปรสิต					
6.5	3*	46.60	41.10	39.39	31.51
7	4*	12.86	35.15	33.12	32.51

หมายเหตุ 3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ

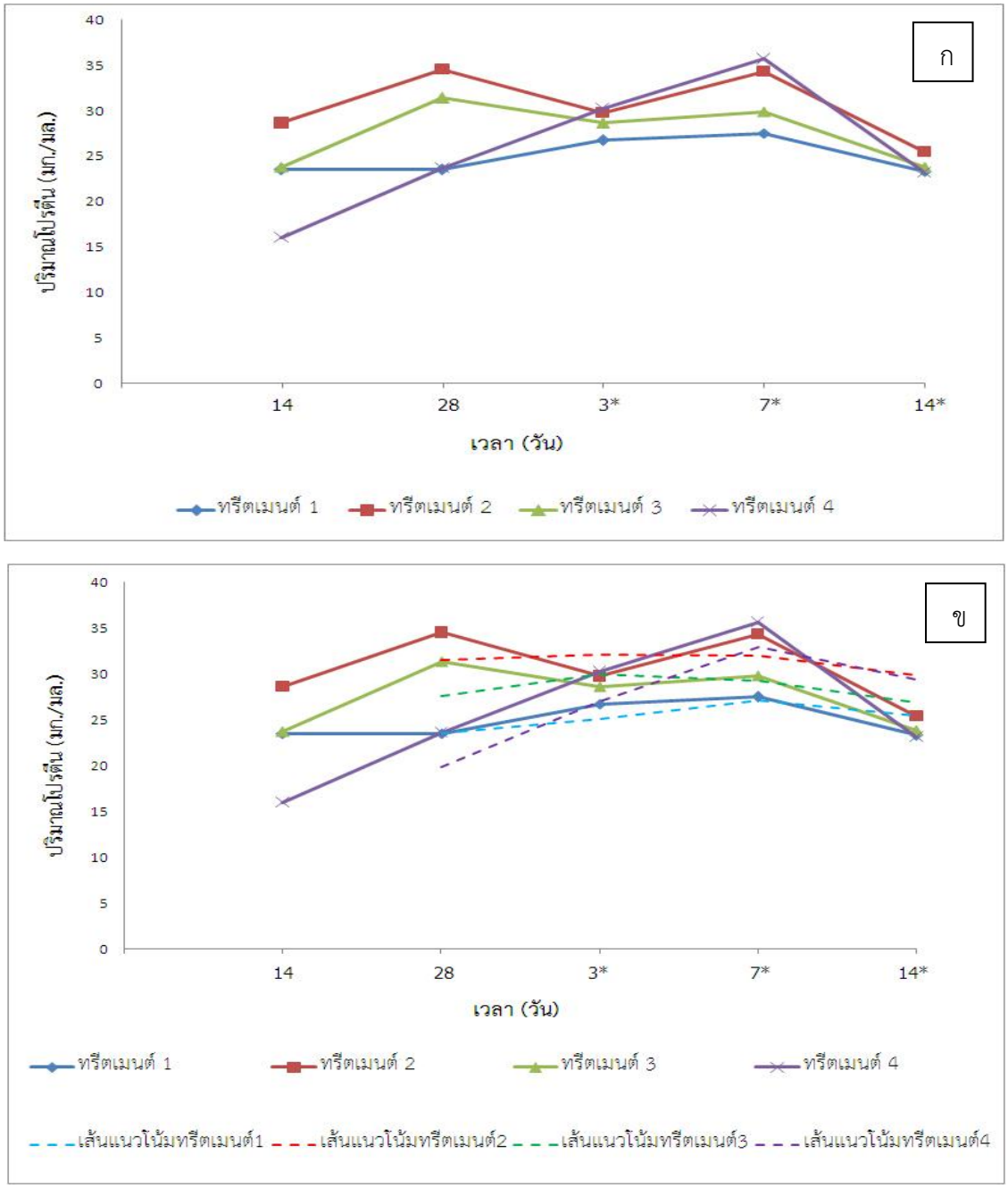


ภาพที่ 3-16 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)

สำหรับการเลี้ยงปลากะพงชุดที่ 2 พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตร 2 3 และ 4 และเมื่อให้ปลาให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตที่เวลา 3 7 และ 14 พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตร 2 ที่มีปรสิตปริมาณโปรตีนในซีรั่มยังคงสูงกว่าในชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 3-15 และภาพที่ 3-17

ตารางที่ 3-15 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 4.5, 5, และ 6

ระยะเวลา		**ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**			
(สัปดาห์)	**(วัน)**	**ชุดการทดลอง 1**	**ชุดการทดลอง 2**	**ชุดการทดลอง 3**	**ชุดการทดลอง 4**
0	0	31.08	31.08	31.08	31.08
2	14	23.498	28.631	23.769	16.011
4	28	23.500	34.537	31.389	23.652
การเผชิญเชื้อ					
4.5	3	26.722	29.790	28.640	30.244
5	7	27.524	34.319	29.860	35.683
6	14	23.333	25.458	23.833	23.167



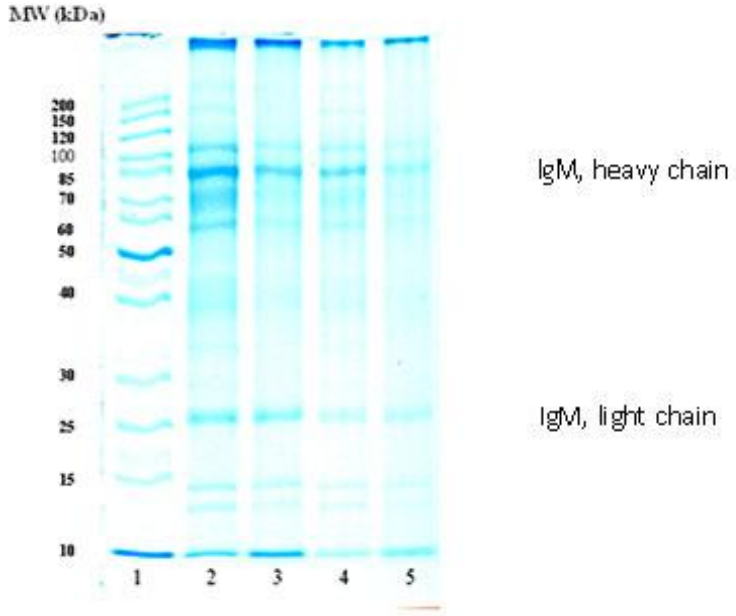
ภาพที่ 3-17 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน (3* 7* และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)

3.8.4 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดปรสิตระยะ theront เชื้อตายโดยเทคนิค SDS-PAGE

แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่เก็บตัวอย่างเลือดปลากะพงหลังจากปลาได้รับการฉีดเชื้อปรสิตระยะ theronts โดยฉีดกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ theront เชื้อตาย 15,000 ตัว ใน PBS ความ

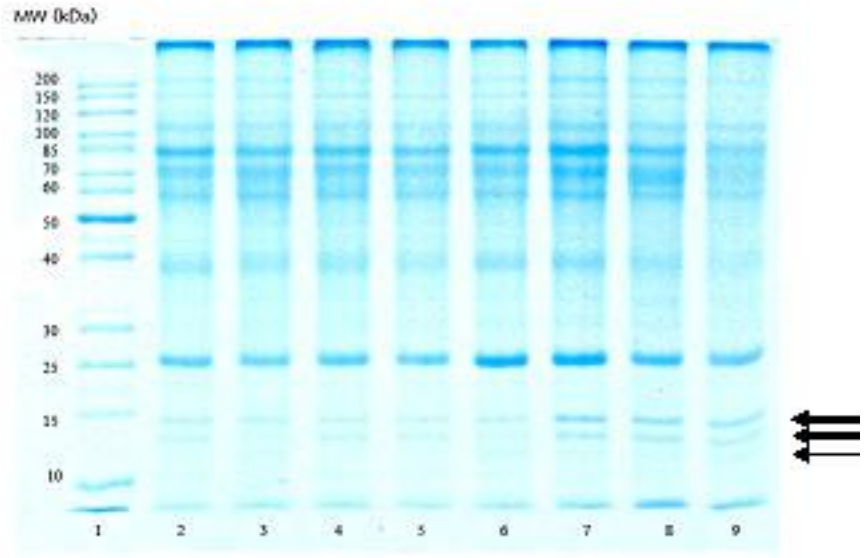
เข้มข้น 0.01 M pH 7.4 ที่กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของปลากะพงขาวน้ำหนัก 15 กรัม (ปรสิตระยะ theront เชื้อตาย 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว) แล้วเก็บเลือดวันที่ 9 ส่วนตัวควบคุมฉีดด้วย PBS ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.4 ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อปลากะพงขาวหนึ่งตัว (ปลาน้ำหนัก 15 กรัม) ได้แถบโปรตีนดังแสดงในภาพที่ 3-17 พบแถบของหน่วยย่อยของอิมูโนกลอบูลิน 2 แถบหลักคือ heavy chain ของ IgM และ light chain ของ IgM ที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณคือ 85 และ 25 kDa ตามลำดับ การเปรียบเทียบความหนาแน่นของ heavy chain ของ IgM เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์เท่ากัน พบว่ามีความหนาแน่นของโปรตีนไม่เท่ากันในปลาแต่ละตัว

จากการฉีดปรสิตระยะ theront เชื้อตาย 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว โดยฉีดกระตุ้น 2 ครั้ง ห่างกัน 14 วัน เมื่อครบ 9 และ 22 วัน เก็บเลือดปลานำซีรั่มปลามาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของหน่วยย่อยของโปรตีนได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.18 พบว่าในซีรั่มปลาที่เวลา 22 วัน พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12, 13 และ 14 kDa มีความหนาแน่นของปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนในปลาทุกตัว แสดงว่าแถบของโปรตีนดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เพราะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากปลาได้รับการกระตุ้นจากเชื้อปรสิตเป็นครั้งที่ 2



ภาพที่ 3-18 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide, stacking gel 4 % acrylamide) ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA)

แถวที่	ตัวอย่าง	จำนวนวันหลังฉีดปรสิตและเก็บตัวอย่างเลือด	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)
1	Marker 2.5 ไมโครลิตร	-	
2	ฉีดปลาตัวที่ 1 ด้วย Theront	9 วัน	4
3	ฉีดปลาตัวที่ 2 ด้วย Theront	9 วัน	4
4	ฉีดปลาตัวที่ 3 ด้วย Theront	9 วัน	2
5	ฉีดปลาตัวที่ 4 ด้วย Theront	9 วัน	2



ภาพที่ 3-19 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide, stacking gel 4 % acrylamide) ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง 4 ไมโครกรัมต่อแถว ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA) แถวที่ 2-6 คือซีรั่มจากปลากะพงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต 1 ครั้ง และแถวที่ 7-9 คือซีรั่มจากปลากะพงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต 2 ครั้ง

แถวที่	ตัวอย่าง	จำนวนวันหลังฉีดปรสิตครั้งแรก และเก็บตัวอย่างเลือด
1	Marker 2.5 ไมโครลิตร	-
2	ฉีดปลาตัวที่ 1 ด้วย theront	9 วัน
3	ฉีดปลาตัวที่ 2 ด้วย theront	9 วัน
4	ฉีดปลาตัวที่ 3 ด้วย theront	9 วัน
5	ฉีดปลาตัวที่ 4 ด้วย theront	9 วัน
6	ฉีดปลาตัวที่ 5 ด้วย theront	9 วัน
7	ฉีดปลาตัวที่ 6 ด้วย theront	22 วัน
8	ฉีดปลาตัวที่ 7 ด้วย theront	22 วัน
9	ฉีดปลาตัวที่ 8 ด้วย theront	22 วัน

ตอนที่ 3 (ผลการทดลอง ปี 3)

3.9 การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

ครั้งที่ 1 นำปลาการ์ตูนส้มขาวทั้งหมด 480 ตัว ที่มีขนาดเฉลี่ย 3.79 ± 0.27 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 1.18 ± 0.22 ก. มาพักและกักกันโรคก่อนนำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เพื่อนำไปเลี้ยงในกระชังขนาด 50 x 50 x 60 ซม. ในถังไฟเบอร์ขนาด 2.2 x 2.5 x 1.8 ม. พร้อมระบบกรองแบบปิด กระชังละ 40 ตัว จำนวน 12 กระชัง ในถังไฟเบอร์ที่ทำการเตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า โดยแบ่งออกเป็น 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 กระชัง ให้กินอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ทรีตเมนต์ที่ 1 เป็นชุดควบคุม ทรีตเมนต์ 2 ผสมปรสิต *C. irritans* ทรีตเมนต์ 3 ผสมยีตส์ *P. jadinii* และทรีตเมนต์ 4 ผสม Calcium alginate โดยให้กินเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้ว สุ่มปลาการ์ตูน จำนวนกระชังละ 4 ตัว นำมาทำการเจาะเลือด นำปลาการ์ตูนไปเลี้ยงในกระชังเดิมอีก 2 สัปดาห์ โดยให้อาหารสูตรเดียวกับ ทรีตเมนต์ควบคุม อาหารที่ให้คิดเป็น 3% ของน้ำหนักเฉลี่ยที่ชั่ง จากนั้นสุ่มปลาจำนวนเท่าเดิมมาเจาะเลือดทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงปลาจนครบ 4 สัปดาห์ สุ่มปลาจากกระชังมาใส่ในตู้กระจกความจุ 40 ลิตร โดยใส่ตู้ละ 30 ตัว ให้เผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 1,500 theront/ปลา 1 ตัว จดบันทึกจำนวนปลาตายเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อหาอัตรารอดของปลาการ์ตูน ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (Relative percent survival: RPS) ของปลาที่ให้กินอาหารเซลล์ตรึงปรสิต และปลาที่ให้กินอาหารเซลล์ตรึงยีสต์ พบว่าปลาชุดการทดลองที่ 2 มีอัตราการรอดสูงสุด 100% รองลงมาได้แก่ปลาชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีอัตราการรอด 97% ทั้งสองชุดการทดลอง ส่วนปลาชุดการทดลองที่ 1 มีอัตราการรอดต่ำสุดที่ 93% ดังแสดงในตารางที่ 3-16 และเมื่อวิเคราะห์ค่าอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) พบว่า ปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับวัคซีนเชื้อ *C. irritans* มีค่า RPS สูงถึง 100 เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ 3 ที่มีค่า RPS อยู่ที่ 57 ดังแสดงในตารางที่ 3-17

ตารางที่ 3-16 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลาการ์ตูนส้มขาวทั้ง 4 ทรีตเมนต์ ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**ความยาว (ซ.ม.) ($\overline{X}$ ± SD)**	**น้ำหนัก (กรัม) ($\overline{X}$ ± SD)**	**จำนวนปลาที่รอด (ตัว) (N = 10)**	**อัตรารอด (%)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	3.57 ± 0.51	1.03 ± 0.41	28	93
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	3.76 ± 0.14	1.13± 0.13	30	100
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	3.96 ± 0.02	1.32 ± 0.01	29	97
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate aaalalginate	7.18 ± 0.52	5.23 ± 1.22	29	97

ตารางที่ 3-17 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**อัตรารอด (%)**	**ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	93	0
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	100	100
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	97	57
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate aaalalginate	97	0

ครั้งที่ 2 นำปลาการ์ตูนส้มขาว จำนวน 480 ตัว ที่มีขนาดเฉลี่ย 3.38 ± 0.14 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 0.97 ± 0.11 ก. มาพักและกักกันโรค ก่อนนำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เพื่อนำไปเลี้ยงในกระชังขนาด 50 x 50 x 60 ซม. ในถังไฟเบอร์ขนาด 2.2 x 2.5 x 1.8 ม. พร้อมระบบกรองแบบปิด กระชังละ 40 ตัว จำนวน 12 กระชัง ในถังไฟเบอร์ที่ทำการเตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า โดยแบ่งออกเป็น 4

ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 กระชัง ให้กินอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 ผสมปรสิต *C. irritans* ชุดการทดลองที่ 3 ผสมยีตส์ *P. jadinii* และชุดการทดลองที่ 4 ผสม Calcium alginate โดยให้กินเป็นเวลานาน 1สัปดาห์ สลับกับอาหารชุดการทดลองที่ 1 ต่ออีก 1 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้วสุ่มปลาการ์ตูน จำนวนกระชังละ 4 ตัว นำมาทำการเจาะเลือด ให้กินอาหารชุดทดลองและชุดควบคุม สัปดาห์เว้นสัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ รวมถึงสุ่มเจาะเลือดปลาแต่ละชุดการทดลองทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงปลาจนครบ 8 สัปดาห์ สุ่มปลาจากกระชังมาใส่ในตู้กระจกความจุ 40 ลิตร โดยใส่ตู้ละ 30 ตัว ให้เผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 1,500 theront/ปลา 1 ตัว จดบันทึกจำนวนปลาตายเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อหาอัตรารอดของปลาการ์ตูน ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (Relative percent survival: RPS) ของปลาที่ให้กินอาหารเซลล์ตรึงปรสิต และปลาที่ให้กินอาหารเซลล์ตรึงยีสต์ พบว่าอัตราการรอดตายของปลาการ์ตูนชุดการทดลองที่ 4 ให้อัตราการรอดตายสูงสุดที่ 68.89% รองลงมาได้แก่ ปลาชุดการทดลองที่ 2, 1 และ 3 โดยมีอัตราการรอดตายที่ 55.56%, 28.89% และ 23.33% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-18 เมื่อนำมาหาค่า RPS พบว่า ค่า RPS ของชุดการทดลองที่ 2 มีค่า 38 ดังแสดงในตารางที่ 3-19

ตารางที่ 3-18 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลาการ์ตูนส้มขาวทั้ง 4 ชุดการทดลอง (ครั้งที่ 2) ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันและเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront (เริ่มต้น N=30)

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**ความยาว (ซ.ม.) ($\overline{X}$ ± SD)**	**น้ำหนัก (กรัม) ($\overline{X}$ ± SD)**	**จำนวนปลาที่รอด (ตัว) (N = 10)**	**อัตรารอด (%)**
ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม	3.36 ± 0.15	0.90 ± 0.09	9	28.89
ชุดการทดลองที่ 2 ผสม *C. irritans*	3.36 ± 0.03	1.03 ± 0.72	17	55.56
ชุดการทดลองที่ 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	3.45 ± 0.15	0.99 ± 0.10	7	23.33
ชุดการทดลองที่ 4 ผสม Sodium alginate	3.35 ± 0.24	0.97 ± 0.07	21	68.89

ตารางที่ 3-19 อัตรารอด (%) และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ของปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 2) ทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

กลุ่มทดลอง (N = 30 ตัว)	**อัตรารอด (%)**	**ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS)**
ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม	28.89	0
ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans*	55.56	38
ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp	23.33	-8
ชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate	68.89	0

3.10 การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

สุ่มปลาการ์ตูนส้มขาวชุดการทดลองละ 12 ตัว มาทำการเจาะเลือดโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. และเข็มฉีดยาเบอร์ 26 G. เคลือบสารป้องกันเลือดแข็งตัว ทำการเจาะเลือดปลาบริเวณโคนหาง ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 5 และ 6 (ครั้งที่ 1) และที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6, 8, และ 11 (ครั้งที่ 2) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. ตั้งไว้ให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ส่วนของซีรั่ม นำส่วนของซีรั่มไป วัดระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ Ig โดยวิธี Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970)

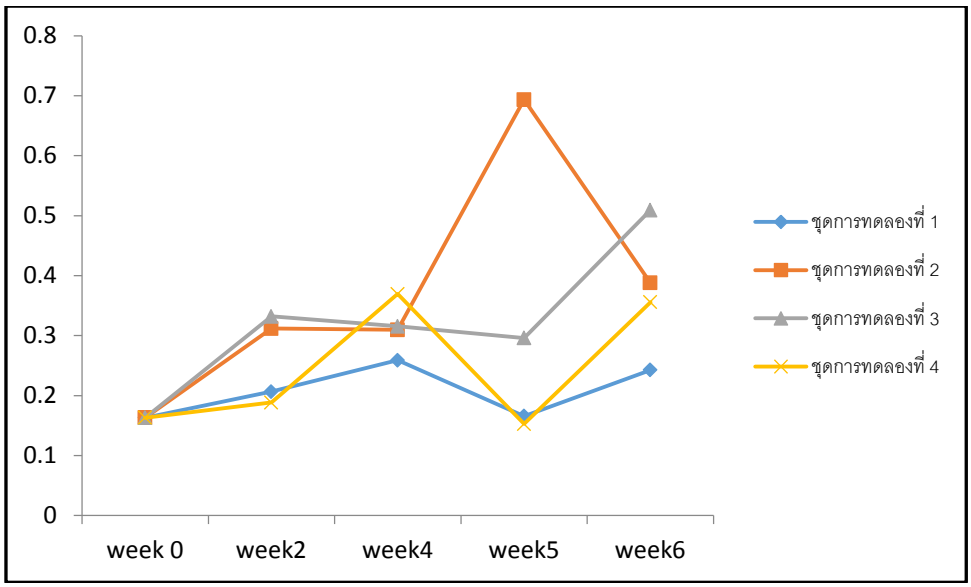
3.10.1 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritan* ระยะ theront และยีสต์ โดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

จากการทดลองเลี้ยงปลาการ์ตูนส้มขาวครั้งที่ 1 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาการ์ตูนส้มขาวโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร โดยสูตรที่ 2 มีปรสิต *C. irritan* ระยะ theront สูตรที่ 3 มียีสต์เป็นองค์ประกอบ สำหรับสูตรที่ 1 และ 4 เป็นชุดควบคุม ให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อครบ 1 และ 2 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาวโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบว่าค่าแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดการทดลองที่ 1 จะขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ชุดการทดลองที่ 2 ค่าแอนติบอดีจะเริ่มขึ้นเมื่อสัปดาห์ที่ 2

และคงที่ต่อไปอีกสองสัปดาห์ แต่จะสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 5 หรือเมื่อปลาเผชิญเชื้อครบ 1 สัปดาห์ และจะเริ่มลดลงที่สัปดาห์ที่ 6 เมื่อปลาเผชิญเชื้อครบ 2 สัปดาห์ สำหรับชุดการทดลองที่ 3 ค่าแอนติบอดีในซีรั่มจะขึ้นสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 6 เมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อครบ 2 สัปดาห์ และปลาชุดการทดลองที่ 4 ค่าแอนติบอดีซีรั่มจะขึ้นสูงสุดสัปดาห์ที่ 4 ดังแสดงในตารางที่ 3-20 และภาพที่ 3-20

ตารางที่ 3-20 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 1) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 2, 4 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA

ระยะเวลา (สัปดาห์)	**ระยะเวลา (วัน)**	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ($\overline{X}$ ± SD)**			
		เคลือบเพลทด้วยเชื้อตายระยะ Theronts 200 ตัวต่อหลุม MAF 1:12000, GAM-HRP 1:5000, test sera 1:1000			
		ชุดการทดลอง 1 (ชุดควบคุม)	**ชุดการทดลอง 2 (*Cryptocaryon* + Calcium alginate)**	**ชุดการทดลอง 3 (Yeast + Calcium alginate)**	**ชุดการทดลอง 4 (Calcium alginate)**
2	14	0.207±0.009	0.312±0.019*	0.332±0.031*	0.188±0.018
4	28	0.259±0.022	0.310±0.043	0.315±0.032	0.369±0.029*
การเผชิญเชื้อ	การเผชิญเชื้อ				
5	35	0.166 ±0.016	0.693±0.210*	0.296±0.005	0.153±0.001
6	42	0.243±0.014	0.388±0.012*	0.509±0.021*	0.356±0.009*

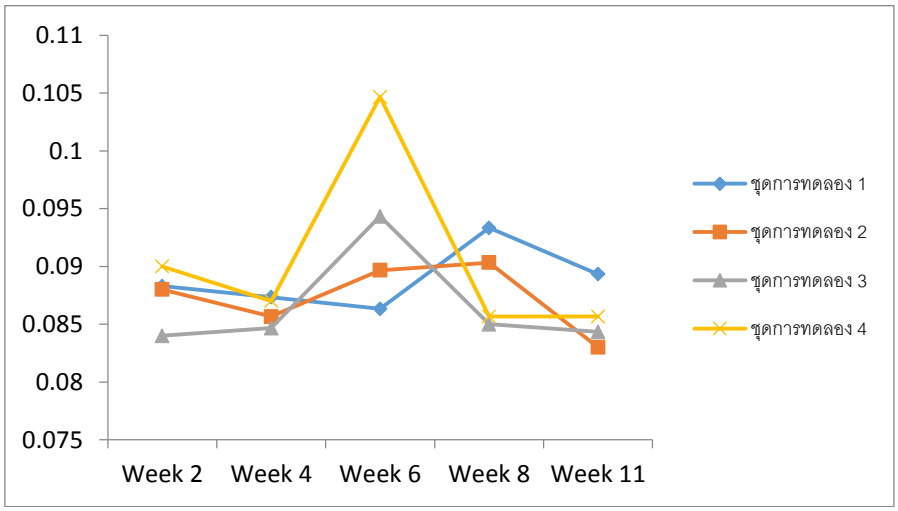


ภาพที่ 3-20 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 1) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 2, 4 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA

จากการทดลองเลี้ยงปลาการ์ตูนส้มขาวครั้งที่ 2 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาการ์ตูนส้มขาวโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร โดยสูตรที่ 2 มีปรสิต *C. irritan* ระยะ theront สูตรที่ 3 มียีสต์เป็นองค์ประกอบ สำหรับสูตรที่ 1 และ 4 เป็นชุดควบคุม ให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1 สัปดาห์สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด 8 สัปดาห์ สุ่มปลาจากกระชังให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาวโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบว่าระดับของแอนติบอดีในซีรั่มปลาเมื่อขึ้นมาระยะหนึ่งจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนักในทุก ๆ สัปดาห์ ยกเว้นในชุดการทดลองที่ 4 จะสูงขึ้นมากเมื่อสัปดาห์ที่ 6 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-21 และภาพที่ 3-21

ตารางที่ 3-21 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 2) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยอาหาร 4 สูตร 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ แล้วนำไปเผชิญเชื้อ 3 สัปดาห์ ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อครบ 3 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ระยะเวลา (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ($\overline{X}$ ± SD) เคลือบเพลทด้วยเชื้อตายระยะ Theronts 200 ตัวต่อหลุม MAF 1:12000, GAM-HRP 1:5000, test sera 1:1000			
		ชุดการทดลอง 1 (ชุดควบคุม)	ชุดการทดลอง 2 (*Cryptocaryon* + Calcium alginate)	ชุดการทดลอง 3 (Yeast + Calcium alginate)	ชุดการทดลอง 4 (Calcium alginate)
2	14	0.088±0.004	0.088±0.007	0.084±0.006	0.090±0.007
4	28	0.087±0.009	0.086±0.006	0.085±0.006	0.087±0.008
6	42	0.086 ±0.004	0.090±0.008	0.094±0.008	0.105±0.006
8	56	0.093±0.003	0.090±0.007	0.085±0.003	0.086±0.004
การเผชิญเชื้อ	การเผชิญเชื้อ				
11	77	0.089±0.004	0.083±0.006	0.084±0.001	0.086±0.003



ภาพที่ 3-21 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (ครั้งที่ 2) ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยอาหาร 4 สูตร 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ แล้วนำไปเผชิญเชื้อ 3 สัปดาห์ ตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อครบ 3 สัปดาห์ โดยเทคนิค ELISA

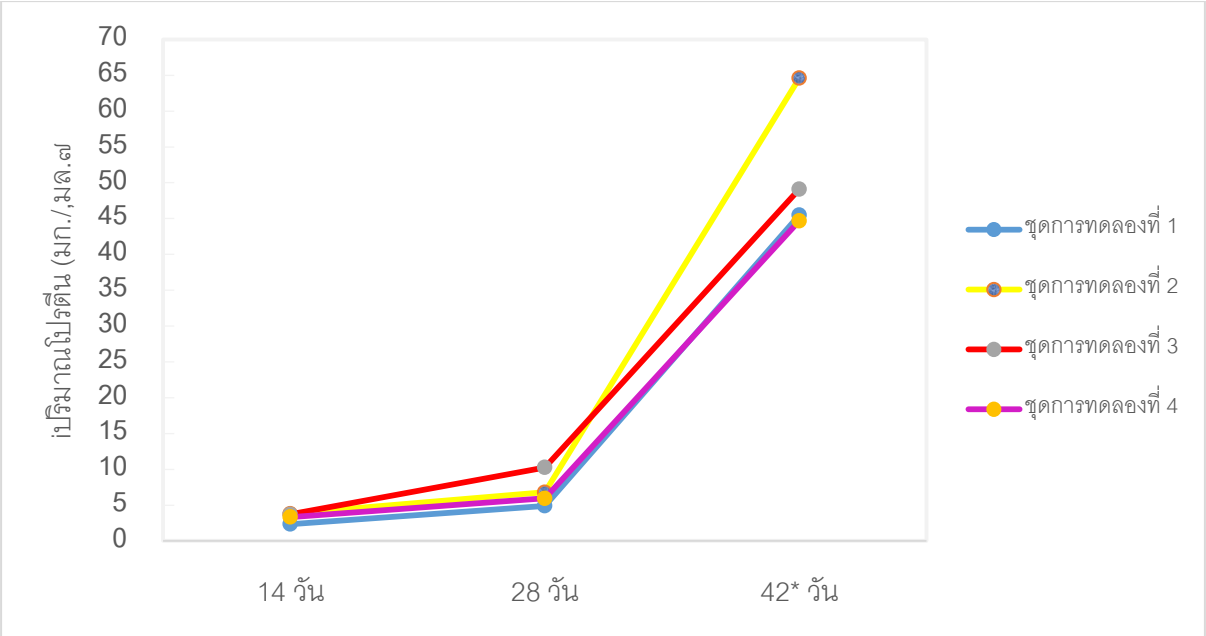
3.10.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford

จากการตรวจหาปริมาณโปรตีนในซีรั่มของปลาการ์ตูน ครั้งที่ 1 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาการ์ตูนส้มขาวโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร โดยสูตรที่ 2 มีปรสิต *C. irritan* ระยะ theront สูตรที่ 3 มียีสต์เป็นองค์ประกอบ สำหรับสูตรที่ 1 และ 4 เป็นชุดควบคุม ให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อได้ 2 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 2 มีค่าสูงสุดที่ 64.62 รองลงมาได้แก่ ชุดการทดลองที่ 3, 1 และ 4 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-22 และภาพที่ 3-22

ตารางที่ 3-22 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร 2 สัปดาห์และอาหารสูตรควบคุม 2 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือด ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6

ระยะเวลา		**ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**			
(สัปดาห์)	**(วัน)**	**ชุดการทดลอง 1**	**ชุดการทดลอง 2**	**ชุดการทดลอง 3**	**ชุดการทดลอง 4**
2	14	2.36	3.80	3.71	3.35
4	28	38.17	49.40	42.24	40.64
การเผชิญเชื้อปรสิต					
6	14*	45.49	64.62	49.17	44.70

หมายเหตุ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ

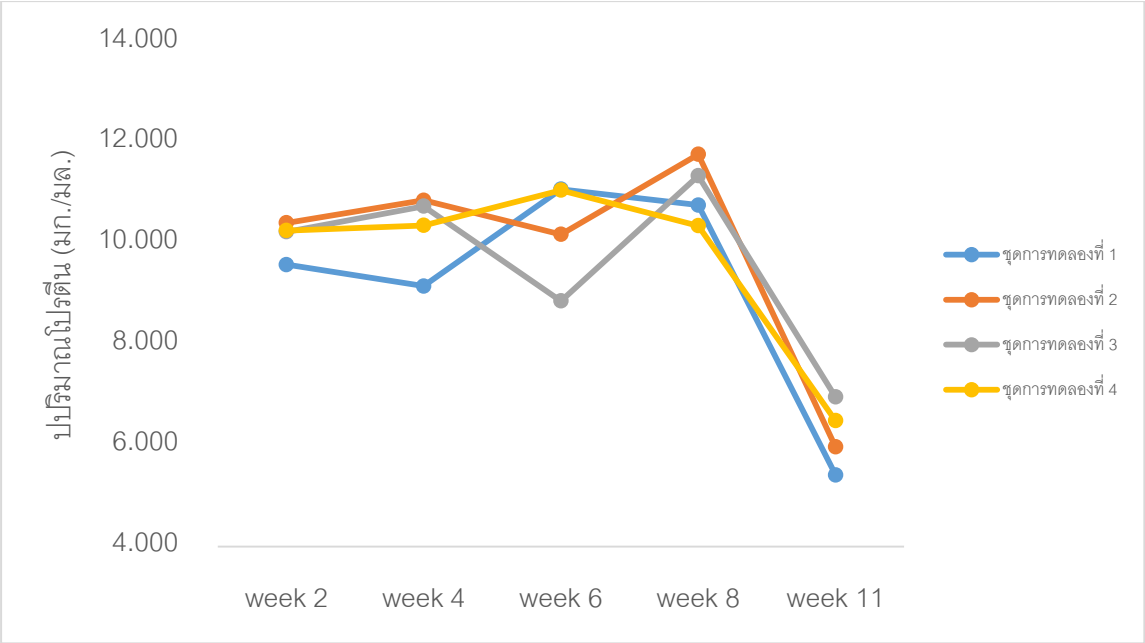


ภาพที่ 3-22 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6

ปริมาณโปรตีนในซีรั่มของปลาการ์ตูน ครั้งที่ 2 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาการ์ตูนส้มขาวโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร 1 สัปดาห์ สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ และให้ปลาเผชิญ เชื้อ 3 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนมากในทุกชุดการทดลอง แต่เมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อ ค่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มจะลดต่ำลงในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3-23 และภาพที่ 3-23

ตารางที่ 3-23 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรสลับกับอาหารสูตรควบคุม สัปดาห์เว้นสัปดาห์ ทำการเจาะเลือด ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 11

ระยะเวลา		ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
(สัปดาห์)	(วัน)	ชุดการทดลอง 1	ชุดการทดลอง 2	ชุดการทดลอง 3	ชุดการทดลอง 4
2	14	9.59	10.42	10.24	10.27
4	28	9.17	10.87	10.75	10.37
6	42	11.09	10.19	8.87	11.07
8	56	10.77	11.78	11.35	10.36
การเผชิญเชื้อปรสิต					
11	77	5.42	5.98	6.97	6.50



ภาพที่ 3-23 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรสลับกับอาหารสูตรควบคุม สัปดาห์เว้นสัปดาห์ ทำการเจาะเลือด ที่สัปดาห์ที่ 2, 4, 6, 8 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 1

อภิปราย/วิจารณ์
(Discussion)

4.1 การเจริญของยีสต์ *P. jadinii*

จากการศึกษาการเจริญพบว่าเชื้อยีสต์ *P. jadinii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะการหมักที่เหมาะสมที่สุดในการหมักยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้ระยะเวลาการหมักเพียง 72 ชั่วโมง ที่ความเค็ม 25 พีพีที เนื่องจากยีสต์ *P. jadinii* เป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำทะเลบางแสน จังหวัดชลบุรี จากข้อมูลความเค็มของน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสนพบว่ามีความเค็มตลอดปีประมาณ 23-33 พีพีที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาล (งานวิจัยสิ่งแวดล้อมทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, 2555, นนทวิทย์ และคณะ, 2546) ที่สภาวะการเลี้ยงดังกล่าวยีสต์ *P. jadinii* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 4.52×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ลดลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 4.25×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การเพิ่มขึ้นของจำนวนยีสต์แปรผกผันกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งลดลงอย่างมากภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมากที่ 96 ชั่วโมง การศึกษาของอัญชัญ พบว่ายีสต์ *P. jadinii* สามารถเจริญได้ดีที่ความเค็ม 25 และ 30 พีพีที (อัญชัญ และอมรรัตน์, 2555) ข้อดีของการใช้กากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ลดต้นทุนในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ และยังพบว่าเชื้อยีสต์นั้นสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลือใช้ทางการเกษตร อาทิเช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย กากน้ำตาล () หรือแม้กระทั่งเอทานอล (Evans and Ratledge, 1992; Gutierrez et al., 1993)

4.2 การตรึงเซลล์ (Encapsulation)

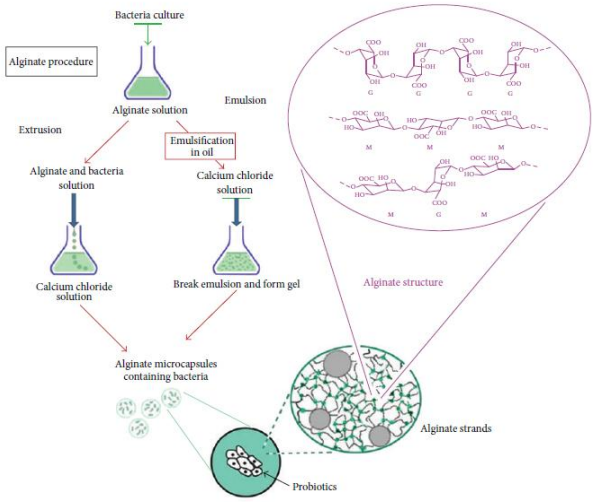
เป็นเวลากว่าสองทศวรรษที่มีนักวิทยาศาสตร์จากหลายประเทศพยายามที่จะพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อทดแทนอาหารมีชีวิตที่มีราคาสูง และต้องเสี่ยงกับการปนเปื้อนเชื้อโรคต่าง ๆ ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายพยายามออกแบบสารอาหารที่มีลักษณะเฉพาะเจาะจงและเหมาะสมต่อการการเลี้ยงสัตว์น้ำต่าง ๆ โดยพัฒนาอาหารสำเร็จรูปให้อยู่ในรูปของไมโครแคปซูล (Luzardo-Alvarez et al, 2010)

สารพาหะที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์คือโซเดียมอัลจิเนตและทำให้เกิดเป็นเม็ดเจลด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เนื่องมาจากอัลจิเนตเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติจากสาหร่ายสีน้ำตาล มีคุณสมบัติในการดูดซับสารที่มีประจุได้ และสามารถใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำอัลจิเนตมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหารและยาโดยใช้เป็นสารพาหะในการตรึงยา โมเลกุลขนาดใหญ่หรือเซลล์ชีวภาพต่าง ๆ (Bajpai and Sharma, 2004; Chan et. al., 2002; Chiou and Li, 2002) ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการขึ้นรูปเจลมีความหลากหลายขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน จากการสรุปของ Mutoloki และคณะ (2015) พบว่ามีการทดลองใช้อัลจีเนตในวงการอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวาง ดังแสดงใน

ตารางที่ 4-1 จากการทดลองเตรียมเม็ดเจลโดยใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.0 1.5 และ 2 โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 1.2 และ 1.6 เม็ดเจลที่ได้มีลักษณะเป็นเจล มีสีขาวขุ่น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3.5 - 4.8 มิลลิเมตร ซึ่งการขึ้นรูปเป็นเม็ดเจลนี้เกิดขึ้นจากการบรรจุสารเนื้อผสมโซเดียมอัลจิเนตใส่ในหลอดฉีดยา แล้วฉีดสารให้หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Syringe method) Zhou และคณะ (2010) ได้อธิบายว่าเนื่องจากสารละลายอัลจิเนตมีโครงสร้างที่เป็นประจุลบที่เกิดจากหมู่คาร์บอกซิลของอัลจิเนต คือ α-L-guluronic acid และ β-D-mannuronic acid เมื่ออยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ของ α-L-guluronic acid และ Ca^{2+} ไอออนของ $CaCl_2$ วิธีการนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mitropoulou และคณะ (2013) ที่อธิบายขั้นตอนตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ โซเดียมอัลจิเนต เพื่อใช้ในการผลิตอาหารเสริมโปรไบโอติค (ภาพที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตอาหารวัคซีนที่ใช้กินโดยใช้อัลจีเนตเป็นสารตรึงเซลล์ (Mutoloki et. al., 2015)

Target	Fish species	Result	Reference
Commercial *Vibrio anguillarum* vaccine in two types of alginate microspheres	Carp and rainbow trout	Antibodies produced by carp only; protection not assessed	(38)
Plasmid DNA expressing major capsid protein of lymphocystis disease virus	Japanese flounder	Antigens detected in various tissues between 10 and 90 days post immunization	(64)
Aeromonas salmonicida recombinant A layer proteins in alginate beads	Goldfish	Antibodies produced but no difference in disease susceptibility between the control and treatment groups after challenge	(24)
Lactococcus garvieae bacterin	Rainbow trout	RPS of 50 achieved	(65)
L. garvieae bacterin	Rainbow trout	Achieved RPS of 53 after 30 days following challenge; after a boost at 61 days, RPS increased to 61 at 120 days	Altun et al. (66)
Flavobacterium columnare bacterium in alginate microparticles; compared oral and parenteral deliveries	Nile tilapia	No protection or significant antibody production in oral group	(67)
Infectious pancreatic necrosis virus VP2 plasmid DNA in alginate microspheres; administered by intubation	Brown trout and rainbow trout	RPS of 84 (brown trout) and between 67 and 83 (rainbow trout) after 30 days	(68)
IPNV VP2 plasmid DNA in feed pellets	Rainbow trout	Induction of transcriptional responses; RPS of 78–85	(25, 69, 70)
Inactivated IPNV virus encapsulated in alginate beads; feed pellets	Atlantic salmon	Induced antibody response; no protection measured	(32)



ภาพที่ 4-1 กระบวนการทำเซลล์ตรึงและโครงสร้างทางเคมีของโซเดียมอัลจิเนตพร้อมแผนภาพของจุลินทรีย์และไฮโดรเจล (Mitropoulou et al., 2013)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 หรือ 1.6 แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2 ตรึงสาร 4 ชนิด คือ ปาเปน ทริปซิน อัลบลูมิน บลูเดกซ์แตรน และปลาป่น พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1.2 และ 1.6 สารที่นำมาตรึงดังกล่าวไม่มีการหลุดออกจากเม็ดเจล ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบเซลล์ตรึงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์ถูกกักอยู่ในเส้นพอลิเมอร์ของแคลเซียมอัลจิเนต การทดสอบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* จากการตรึงในเวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบการหลุดของเซลล์ยีสต์ (สวพัศ มุ่งแฝงกลาง และสรารัศมิ์ วสุชัยวัส, 2556) แต่เมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 1.6 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 เม็ดเจลที่ได้มีลักษณะแข็งไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารปลา ในกระบวนการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์น้ำได้มีการใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กสำหรับเป็นอาหารในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เพื่อให้สารอาหารคงสภาพเมื่ออยู่ในน้ำเป็นระยะเวลานานขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิตวัยอ่อนได้ ซึ่งขนาดและชนิดของอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตได้แตกต่างกันขึ้นกับเทคนิคการผลิต เช่น microsphere diets, microencapsulated diets หรือ microparticulated diets (Teshima et al., 2000; Koven et al., 2001; Kolkovski, 2004) ในการป้องกันและรักษาโรคได้มีการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์หรือสารในการพัฒนาวัคซีนโดยวิธีให้กินซึ่งทำได้ง่ายกว่าการฉีดสารเข้าตัวปลา (Luzardo-Alvarez et al., 2010) วัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนตรึงสาร เช่น คาราจีแนน เซอีน (Baskerville-Bridges and Kling, 2000) โซเดียมอัลจิเนต (Lopez et al., 1994) สารผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและไคโตแซน (Polk et al., 1994) แสดงว่าแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรึงสารพอลิเมอร์ และปลาป่น ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้ทดลองจึงได้ทำการตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิตโดยใช้อัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เพราะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เจลไม่เสียสภาพเพราะไม่มีการหลุดของสาร

ออกมา การศึกษาโดยทั่วไปใช้อัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1-2 และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.05 - 1.5 (Krasaekoopt et al, 2003) จากการตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ซึ่งการตรึงสารโดยการใช้โซเดียมอัลจิเนต หรือของผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและไคโตแซนเป็นเทคนิคการผลิตที่ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง นอกจากนี้เม็ดเจลที่ได้สามารถนำไปทำแห้ง บดให้ละเอียดและผสมกับอาหารซึ่งมีความสะดวกในการนำไปใช้ต่อไป

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากยีสต์ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่ามีกรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด (unsaturated fatty acid : USFA) ร้อยละ 30.29 ของกรดไขมันทั้งหมด เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid: MUFA) ร้อยละ 20.26 ของกรดไขมันทั้งหมด มีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 17.83 ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) ร้อยละ 9.93 ของกรดไขมันทั้งหมดและมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 3.14 ของกรดไขมันทั้งหมด ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบจะมีความแตกต่างกันตามปัจจัยการเลี้ยง ส่วนปริมาณมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์ (อัจฉราวรรณ ทองมี, 2555) Evans และ Ratledge (1992) ได้ศึกษาอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์และองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Candida curvata* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลไซโลส และเอทานอล ซึ่งพบว่ากรดไขมันจากเชื้อยีสต์ *C. curvata* ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส ให้กรดไขมันอิ่มตัวชนิด กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) และกรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0) สูงที่สุด แต่กลับให้กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยที่สุด ตรงกันข้ามกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นเอทานอล เพราะกรดไขมันจากยีสต์ *C. curvata* ในเอทานอลให้กรดไขมันอิ่มตัวจำพวกกรดปาล์มิติกน้อยที่สุด แต่กลับให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวจำพวกกรดไลโนเลอิกสูงที่สุด

4.4 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดหรือเซลล์สิ่งมีชีวิตในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

ยีสต์ซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (Single cell protein) เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในยุโรปและอเมริกา เนื่องจากสามารถผลิตได้มากในระยะเวลาสั้นและใช้พื้นที่การผลิตน้อย (Matcles & Steren,1968) ในปัจจุบันพบว่ามีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวมากกว่าล้านตันต่อปีในประเทศรัสเซีย (จรูญ, 2534) สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์และในอุตสาหกรรมอาหาร (North & Bell, 1990) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายประเทศที่ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวในเชิงอุตสาหกรรม ได้แก่ สวีเดน ญี่ปุ่น อังกฤษ เยอรมันตะวันตก และ ฟินแลนด์ เป็นต้น (Austic & Neshcim, 1990) หรือการใช้ยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติค (Probiotic) ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีประโยชน์ในการช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของ

สัตว์ กระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทาน ช่วยให้ร่างกายสัตว์แข็งแรง ย่อยและใช้ประโยชน์จากอาหารได้ดีขึ้น (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์, 2539) จึงสามารถนำยีสต์มาใช้ในอาหารสัตว์ เพื่อส่งเสริมสุขภาพและสนับสนุนการเจริญเติบโตของสัตว์ อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากสามารถลดปริมาณการใช้ยาและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพและการเจริญเติบโต ทำให้มียาและสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์ (Cheeke, 1999; Dolye, 2007) การนำยีสต์ไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารหรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้ยีสต์ต้องคำนึงถึงความบริสุทธิ์ปลอดภัยและไม่มีสารพิษจึงจะสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ส่วนการใช้ยีสต์เสริมในอาหารสัตว์สามารถใช้ได้ทั้งในลักษณะเชื้อเป็นและเชื้อตาย (พันทิพา, 2539)

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำมีรายงานการใช้สารประกอบที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตมาเป็นระยะเวลานานกว่า 10 ปี เช่น ไคติน เบต้ากลูแคน สารสกัดกลุ่มพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย (Sakai, 1999) โซเดียมอัลจิเนต และ k-คาราจีแนน (Fujiki et al., 1994; Fujiki and Yano, 1997; Cheng et al., 2007; 2008) ในปลาชนิดต่าง ๆ เช่น การใช้เบต้ากลูแคน (β-glucan) การใช้เซลล์ยีสต์เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Ortuño et al., 2002) ปลา channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Chen and Ainsworth, 1992) ปลา Atlantic salmon, *Salmo sarlar* (Engstadt et al., 1992) ปลา rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Verlhac et al, 1996) ปลา gilthead seabream, *Sparus auratus* (Castro et al., 1999) และปลา European seabass, *Dicentracuhs labrax* (Bagni et al., 2005)

การใช้โซเดียมอัลจิเนต และ k-คาราจีแนน ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) (Fujiki et al., 1994; Fujiki and Yano, 1997) และปลาเก๋า (Cheng et al., 2007; 2008)

การใช้ Ergosan, สารสกัดจากสาหร่ายที่มี alginic acid เป็นองค์ประกอบ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific immune) ของปลา striped snakehead, *Channa striata* (Miles et al., 2001) ปลา rainbow trout, *O. mykiss* (Peddie et al., 2002) และปลา Eurpoean seabass, *D. labrax* (Bagni et al., 2005) วิธีใช้ประโยชน์จากสารประกอบดังกล่าวทั้งวิธีการผสมในอาหารหรือการฉีดเข้าสู่ร่างกายของสัตว์น้ำ พบว่าสารประกอบเหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลาและเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคของปลา เช่น การศึกษาภูมิคุ้มกันชนิดไม่เฉพาะเจาะจง(non-specific disease resistance) ในการต้านทานโรคแอตแลนติกแซลมอนโดยวิธีการฉีด glucan เข้าสู่กล้ามเนื้อซึ่งพบว่าปลาแอตแลนติกแซลมอนต้านทานโรคดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ต้องคำนึงถึงระดับของความเข้มข้นของ glucan เพราะปริมาณ glucan ที่มากเกินไปมีผลต่อการทำงานของ macrophage (Robertsen et al., 1990)

การศึกษาการฉีดคาราจีแนนซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสาหร่ายสีแดงเข้าในปลาปลาคาร์พ (*Cyprinus capio*) พบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage (macrophage phagocytic activity) และปลาคาร์พสามารถต้านทานโรคได้ดีขึ้น (Fujiki and Yano, 1997)

การศึกษาการใช้ k-คาราจีแนน หรือโซเดียมอัลจีเนตที่สกัดจากสาหร่ายทะเลผสมในอาหารปลาเก๋า brawn-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* ในอัตราส่วน 5 10 และ 25 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหารเป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงเผชิญเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* ที่มีอัตราส่วน 5.0 $\times 10^9$ colony-forming units (cfu) ต่อปลา 1 ตัว พบว่าปลาเก๋าที่กินอาหารที่มีส่วนผสมของโซเดียมอัลจิเนตในอัตราส่วน 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารหรือน้อยกว่า 10 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร และปลาเก๋าที่กินอาหารที่มีส่วนผสมของ k-คาราจีแนนมีการรอดตายสูง และปลาเหล่านี้มีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นและสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ดีขึ้น (Cheng et al., 2008)

นอกจากนี้ Chiu และคณะ (2008) รายงานว่าการใช้โซเดียมอัลจิเนตผสมในอาหารปลากะรังระยะวัยรุ่น *E. fuscoguttatus* ในปริมาณมากกว่า 1 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหารและให้ปลากินอาหารเป็นระยะ เวลา 9 วัน พบว่าปลากะรังที่กินอาหารเหล่านี้มีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นและการต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. ได้ดีขึ้น

Cordero และคณะ (2015) ทำการทดลองกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพง (Gilthead seabream, *Sparus aurata* L) ด้วยวัคซีนแบบกินที่ตรึงเซลล์ *Shewanella putrefaciens* Pdp11 กับอัลจิเนต โดยแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ไม่ให้วัคซีนเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าวัคซีนที่ให้กินสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งแอนติบอดี้ (Humoral parameters) ในกลุ่มปลาที่ได้รับวัคซีนได้

สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาโดยใช้ปรสิตนั้นได้มีรายงานของ Yambot และ Song (2006) ศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้มทำโดยให้ปลาสัมผัสกับเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ซึ่งได้จากระยะ tomont และโดยการฉีดเชื้อตายซึ่งประกอบด้วย *C. irritans* ระยะ theront ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีนเข้าทางช่องท้อง นอกจากนี้ Bai และคณะ (2008) ศึกษาเกี่ยวกับ *C. irritans* โดยแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปลาต่อปรสิต *C. irritans* และการป้องกันการติดเชื้อ เปรียบเทียบการตอบสนองภูมิคุ้มกันในปลากะรัง จากการชักนำให้เกิดการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* โดยใช้ปรสิตระยะ theront, tomont และ trophont นอกจากนี้ Xu และคณะ (2010) ได้ทดลองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาดุกด้วยปรสิตระยะ trophonts ที่อ่อนแอ

โครงการวิจัยการพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรียในปีที่ 1 นั้นสามารถตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สำหรับนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลากะพงขาวและทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* ที่ทำให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็มต่อปลากะพงขาวและปลาการ์ตูนในปีที่ 2 และ 3 ต่อไป

4.5 การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (Proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบคุณค่าทางอาหารที่ทำการทดลองในครั้งนี้ทั้ง 4 สูตร ประกอบด้วย สูตรที่ 1 เป็นอาหารชุดควบคุม สูตรที่ 2 เป็นอาหารชุดควบคุมผสมด้วยธีรอนธ์

C. irritans สูตรที่ 3 เป็นอาหารชุดควบคุมผสมด้วยยีสต์ *P. jadinii* และสูตรที่ 4 เป็นอาหารชุดควบคุมผสม Sodium alginate พบว่ามีความชื้นร้อยละ 6-7 เถ้าร้อยละ 13-15 โปรตีนร้อยละ 49-51 ไขมันร้อยละ 12-13 คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ ร้อยละ 15-17 ทั้งนี้จากการรายงานของ Catacutan และ Colosso (1995) ที่ทำการทดลองอาหารสำเร็จรูปกับลูกปลากะพงขาวขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 1.34 + 0.01 กรัม พบว่าอาหารที่มีระดับของโปรตีน 50% และระดับไขมัน 15% ปลากะพงขาวจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและให้น้ำหนักที่มากสุด จากทดลองของ William และคณะ (2003) ทำการทดลองให้อาหารสำเร็จรูปกับปลากะพงขาวที่เลี้ยงในน้ำจืด โดยทำการทดสอบอาหารที่มีระดับของโปรตีน 38-%, 42.5%, 47.3% and 52% และไขมัน 7.0%, 12.8% and 18.3% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่มีระดับของโปรตีนและไขมันสูงจะให้อัตราการรอดและการเจริญเติบโตที่ดีกว่าอาหารที่มีโปรตีนและไขมันต่ำ

จากการศึกษาของ Alvarez-Gonzalez และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองปริมาณโปรตีนในอาหารต่อการเจริญเติบโตของลูกปลากะพง spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) ขนาด 9.5 กรัม โดยทำการเลี้ยงปลากะพงด้วยอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีน 40, 45 และ 50% พบว่า ปลากะพงจะมีอัตราการเจริญเติบโตดีอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน ที่ 45 และ 50% ซึ่งคระผู้วิจัยได้สรุปว่าอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากะพงขาวชนิดนี้ควรมีระดับโปรตีนอย่างน้อย 45%

López at.al (2009) ทำการศึกษาระดับของไขมันในอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากะพงขาว white seabass (*Atractoscion nobilis*) ด้วยอาหารที่มีระดับของไขมันที่ 2.6, 7.4, 11.6, 15.3 and 19.4% ร่วมกับอาหารที่มีระดับคาร์โบไฮเดรต 49.9% โปรตีน 14.7% และไขมัน 19.4% ทำการตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลากะพงเมื่อทำการเลี้ยงไปได้ 50 วัน พบว่าอัตราการรอดของปลาจะต่ำสุดเมื่ออาหารที่ให้มีไขมันอยู่ที่ระดับ 2.6%

สำหรับในประเทศไทย วิเชียรและคณะ (2531, 2532) และจารุรัตน์และคณะ (2532) รายงานว่าปลากะพงขาวต้องการอาหารที่มีโปรตีน 45-47% ไขมัน 10-15%

จากการทดลองในปลาการ์ตูนส้มขาวอาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 37-51 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมัน 16-19 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Gordon และคณะ (2000) รายงานว่าปริมาณอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงลูกปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) ต้องมีโปรตีน 43.8% ไขมัน 8.4% เถ้า 10.8% นอกจากนี้ Varghese (2004) ได้ทำการทดลองให้อาหารที่สูตรมีปริมาณโปรตีนและไขมันต่างกันในปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง พบว่า ปลาที่ได้รับโปรตีน 46.2% และไขมัน 10.96% จะทำให้ปลามีน้ำหนักมากขึ้น และจากรายงานของ Lupatsch และคณะ (2013) ที่กล่าวว่า ปริมาณโปรตีนในอาหารที่ลูกปลาการ์ตูนส้ม (*A. percula*) ต้องการ เพื่อการเจริญเติบโตจะต้องมีปริมาณสูง 40%

4.6 การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) และปลาการ์ตูนส้มขาวต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

จากการทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 theronts/ปลา 1 ตัว หลังจากให้กินอาหารสูตรต่าง ๆ

ทั้ง 4 สูตร ด้วยเทคนิคการตรึง โดยครั้งแรกให้กินอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ และกินอาหารชุดควบคุมต่ออีก 4 สัปดาห์ หลังการเผชิญเชื้อ *C. irritans* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบอัตราการรอด และเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS)ในปลากะพงขาวที่ทำการทดลองครั้งที่ 1 ดังนี้ ชุดการทดลอง 1 ชุดควบคุม ชุดการทดลอง 2 ผสม *C. irritans* ชุดการทดลอง 3 ผสมยีตส์ *P. jadinii* และชุดการทดลอง 4 ผสม Sodium alginate ที่ 0%, 90%, 90% และ 0% ตามลำดับ (N = 10) และมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) ในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 คือ 90 และ 90 ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีอัตราการรอดและเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์แตกต่างกับชุดการทดลองที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในการทดลองครั้งที่ 2 ทำการเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ และเลี้ยงด้วยอาหารควบคุม 2 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดของปลากะพงชุดการทดลอง 1 ถึง 4 เป็น 83%, 83%, 93% และ 90% ตามลำดับ (N = 30) จะเห็นว่าปลากะพงในกลุ่มที่ให้อาหารชุดการทดลองที่ 3 ที่ผสม *P. jadinii* ให้อัตราการรอดสูงสุดและให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพัทธ์ เท่ากับ 59

การทดลองในปีที่ 3 นำอาหารที่ผลิตได้ทั้ง 4 สูตร นำมาปรับสูตรปริมาณโปรตีนและไขมันสำหรับใช้กับปลาสวยงาม นำอาหารทั้ง 4 สูตร มาเลี้ยงปลาเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาสวยงามที่ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กและมีความไวต่อการติดเชื้อโรคจุดขาวน้ำเค็มสูง สำหรับการทดลองนี้ได้ใช้ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ซึ่งเป็นปลาที่มีผู้นิยมเลี้ยงเป็นปลาตู้ และมีการส่งเสริมการทำฟาร์มผลิตเป็นปลาเศรษฐกิจ และปัญหาที่นักเพาะเลี้ยงมักประสบในระหว่างการเพาะเลี้ยงคือ โรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากเชื้อ *C. irritans* ปลาชนิดนี้มักมีขนาดเล็กไม่สามารถใช้วัคซีนเชื้อตายนำมาฉีดเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นวิธีการให้สารเสริมอาหารและวัคซีนวิธีที่ดีที่สุดคือให้โดยการผสมในอาหารและให้ปลากิน

คณะผู้วิจัยได้นำปลาการ์ตูนส้มขาวที่ใช้ในการทดลองนี้จากฟาร์มของสถานีประมง กรมประมง เพื่อให้มาจากครอกเดียวกันหรือมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยวางแผนการทดลองสองแบบ คือ ชุดที่ 1 ให้ปลาการ์ตูนกินอาหารสูตรทดลอง 4 สูตร 2 สัปดาห์ และให้กินอาหารชุดควบคุม 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลาการ์ตูนที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้มาเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront ปริมาณ 1,500 ตัว/1 ตัว พบว่า ปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารที่ผสม *C. irritans* ให้อัตราการรอดสูงสุด 100% รองลงมาได้แก่ปลาชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีอัตราการรอด 97% ทั้งสองชุดการทดลอง ส่วนปลาชุดการทดลองที่ 1 มีอัตราการรอดต่ำสุดที่ 93% ดังแสดงในตารางที่ 3-20 และเมื่อวิเคราะห์ค่าอัตราการรอดตายสัมพัทธ์ (RPS) พบว่า ปลาชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับวัคซีนเชื้อ *C. irritans* มีค่า RPS สูงถึง 100 เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ 3 ที่มีค่า RPS อยู่ที่ 57 ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Avella และคณะ (2010) ที่ทำการทดลองให้โปรไบโอติกแบคทีเรีย (*Lactobacillus rhamnosus* IMC 501)ในปลาการ์ตูนส้มขาว (*A.ocellaris*) ตั้งแต่แรกฟัก พบว่าปลาชุดที่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียมีอัตราการรอดที่สูงกว่าปลาชุดควบคุม และเมื่อทดลองปรับวิธีการให้อาหารโดยให้สลับอาหารสูตรทดลอง/สูตรควบคุม เป็น สัปดาห์/สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลามาเผชิญเชื้อ *C. irritans* 1,500 ตัว/ปลา 1 ตัว เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดตายของปลาการ์ตูนชุดการทดลองที่ 4 ให้อัตราการรอดตายสูงสุดที่ 68.89% รองลงมาได้แก่ ปลาชุดการทดลองที่ 2, 1 และ 3 โดยมีอัตราการรอดตายที่ 55.56%, 28.89% และ 23.33% ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่า RPS พบว่า ค่า RPS ของชุดการทดลองที่ 2 มีค่า 38 สอดคล้องกับรายงานของ Jørgensen และคณะ

(2012) ที่ทำการทดลองฉีดวัคซีนชนิดพลาสมิด Iag52B หรือ Iag52B+A พบว่าปลาจะมีอัตราการตายสูงหลังจากการได้รับการเผชิญเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* เป็นเวลา 3 วัน โดยจะพบอัตราการตายในทุกชุดการทดลอง

ปัจจุบันในทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบยั่งยืนในปัจจุบันมีการนำยีสต์ แบคทีเรียและสารสกัดจากพืชที่มีประโยชน์บางชนิดมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเพื่อให้มีความต้านทานโรคชนิดต่าง ๆ (Gatesoupe, 1999; Jeney et al., 2009; Lauridsen and Buchmann, 2010; Navarrete and Tovar-Ramírez, 2014; Wang et al., 2008) โดยเฉพาะยีสต์ในสกุล Saccharomyces ที่มีการใช้เป็นประโยชน์เป็นโปรไบโอติกในมนุษย์และสัตว์ทั่วโลก (Jakobsen และ and Narvhus 1996; Lourens and Viljoen 2001; Buchl et al. 2010; Moslehi-Jenabian et al., 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ แยกเชื้อ *P. jadinii* มาจากน้ำทะเลบางแสน โดยเชื้อมีคุณสมบัติในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่ากรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด (unsaturated fatty acid : USFA) ร้อยละ 30.29 ของกรดไขมันทั้งหมด เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid: MUFA) ร้อยละ 20.26 ของกรดไขมันทั้งหมด มีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 17.83 ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) ร้อยละ 9.93 ของกรดไขมันทั้งหมดและมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 3.14 ของกรดไขมันทั้งหมด (สุพรรณี และคณะ, 2557) เมื่อนำมาประกอบในสูตรอาหารพบว่ามีปริมาณโปรตีนมากกว่าร้อยละ 50 และไขมันมากกว่าร้อยละ 11 ซึ่งเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงปลากะพงขาว (เวียง เชื้อโพธิ์หัก, 2543)

สำหรับแนวคิดในการแยกเชื้อจากธรรมชาติมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นมีผู้ทำการวิจัยจำนวนมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ โดยในประเทศไทย วรวุฒิ เกิดปราง และ ชาคริยา ฉลาด (2558) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ท้องถิ่นในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามหลักเกษตรธรรมชาติ โดยทำการเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของคณะวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง จำนวน 6 จุดโดยใช้ข้าวเหนียวนึ่งสุกประมาณ 100 กรัมใส่ในภาชนะปิดด้วยกระดาษเนื้อหยาบที่อากาศสามารถ ผ่านเข้าออกได้วางบริเวณที่มีวัชพืชหรือใบไม้ในแต่ละจุดใช้เวลาประมาณ 5 วัน จุลินทรีย์จะเจริญเต็มผิวหน้าของข้าวเหนียว เมื่อทำการ จำแนกชนิดของจุลินทรีย์พบ แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *Bacillus* sp. 2 สายพันธุ์และ *Enterobactor* sp. รา 6 สายพันธุ์คือ *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. และ *Neurospora crassa* และยีสต์ *Pichia* sp. ซึ่งผู้วิจัยกล่าวว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่อาจก่อให้เกิดประโยชน์ซึ่งอาจนำมาใช้ในทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การควบคุมคุณภาพน้ำ การปรับปรุงคุณภาพวัตถุดิบอาหารการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคแก่สัตว์น้ำและอื่น ๆ

ณัฐพงษ์ จูพัฒนกุล และคณะ (2553) ได้นำรีคอมบิแนนท์ PmRab7 ในระบบยีสต์ *P. pastoris* ไปใช้ในการป้องกันโรคดวงขาวในกุ้ง ในการทดลองในระดับฟาร์มพบว่า เมื่อใช้อาหารที่

ผสมโปรตีน PmRab7 ใน ปริมาณ 1 มิลลิกรัมและ 2 มิลลิกรัม PmRab7/ กิโลกรัมของอาหารกุ้ง พบว่าสามารถช่วยชะลอการตายของกุ้งจากเชื้อไวรัสดวงขาวได้ โดยในวันที่สี่อัตราการตายของกุ้งในกลุ่มควบคุมอยู่ที่ 65-80% แต่ในกลุ่มที่ให้อาหารผสม PmRab7 มีอัตราการตาย ลดลงอยู่ที่ประมาณ 20-40% เมื่อหยุดให้อาหารผสม PmRab7 และให้อาหารปกติต่อไปอีก 3 วัน จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

การใช้ยีสต์กลุ่ม *Pichia* ในต่างประเทศมีรายงานในประเทศจีน โดย Li และคณะ (2008) ทำการเก็บรวบรวมยีสต์จำนวน 328 สายพันธุ์ จากน้ำทะเล ดินตะกอน โคลน จากกระเพาะอาหารของปลา และสาหร่าย พบยีสต์ 5 สายพันธุ์ในสกุล *Pichia* spp. ได้แก่ *P. guilliermondii* 1uv-small, *P. ohmeri* YF04d, *P. fermentans* YF12b, *P. burtonii* YF11A และ *P. anomala*YF07b. เป็นต้น เมื่อทำการศึกษาขั้นตอนต่อไป พบว่า *P. anomala* YF07b สามารถผลิตสารพิษที่ใช้ในการต่อต้านเชื้อโรคในปูได้ นอกจากนี้ Chen และคณะ (2010) ใช้เทคนิค quorum quenching ที่เป็นการรวมตัวของ AHL-lactonase expressed จาก *Bacillus* sp. B546 ในเซลล์ยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อนำไปฉีดร่วมกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาคราฟ พบว่าทำให้อัตราการตายเมื่อติดเชื้อ *A. hydrophila* ลดลง และ Moa และคณะ (2011) ได้นำยีนส์ ompK ของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ไปตัดต่อกับยีสต์ *P. pastoris* เพื่อนำไปใช้เป็นวัคซีนและนำไปเพิ่มจำนวนในอาหาร หลังจากนั้นนำไปวัคซีนที่ได้ไปใส่ในปลาและให้เผชิญกับเชื้อ *V. harveyi* zj2008 พบว่าวัคซีนที่ได้สามารถก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันโรควิบริโอซิสได้

สำหรับการนำเชื้อ *C. irritans* ระยะธีรอนท์ ไปตรึงกับอาหารเมื่อนำไปให้ปลากะพงขาวกินและนำไปเผชิญเชื้อ *C. iriitans* พบอัตรารอดจากการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 เท่ากับ 90% และ 83% ตามลำดับ และมีค่า RPS จากการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 เท่ากับ 90 และ 0 ตามลำดับ เมื่อเทียบการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* โดยฉีดปรสิตระยะธีรอนท์เชื้อตายที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีน และเมมเบรนโปรตีนที่สกัดจากธีรอนท์เชื้อตายเข้าบริเวณช่องท้องของปลาและให้ปลากะพงขาวเผชิญกับเชื้อปรสิตระยะธีรอนท์มีชีวิต จากการตรวจสอบระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนชุดตัวอย่างต่อชุดควบคุม พบว่าระดับแอนติบอดีจากปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยธีรอนท์เชื้อตายและเมมเบรนโปรตีนมีระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ตามลำดับ ปลากะพงขาวที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อนำมาเผชิญต่อปรสิตระยะธีรอนท์ จำนวน 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว (น้ำหนัก 15 กรัม) เป็นเวลา 9 วัน พบอัตราการรอดของปลากะพงขาวที่ได้รับวัคซีนอยู่ที่ร้อยละ 100 ในขณะที่การรอดของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมจะอยู่ที่ร้อยละ 0 (สุพรรณี ลีโทชวลิต และคณะ, 2554) และจากการศึกษาในปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sarcocentrum rubrum*) โดยการฉีดปรสิตระยะธีรอนต์เชื้อตายที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีนเข้าบริเวณช่องท้องของปลาที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ แล้วดูดเลือดปลาที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 สัปดาห์ จากการตรวจสอบระดับแอนติบอดีโดยเทคนิค ELISA เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของชุดทดสอบต่อชุดควบคุม พบว่าระดับแอนติบอดีจากปลาข้าวเม่าน้ำลึกที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 ปลาข้าวเม่าน้ำลึกที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันและนำมาเหนี่ยวนำด้วยปรสิตระยะธีรอนต์จำนวน 70,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว (น้ำหนัก 60 กรัม) เป็นเวลา 7

วัน พบว่าอัตรารอดของปลาข้าวเม่าน้ำลึกที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุมอยู่ที่ร้อยละ 100 (สุพรรณี ลีโทชวลิต และคณะ, 2553)

จากการทดลองให้อาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลากะพง แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวโดยเทคนิค ELISA พบว่าปลามีการตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดี โดยที่เวลา 14 วัน อัตราส่วนของปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลาที่ได้รับอาหารสูตร 3 ต่อปริมาณแอนติบอดีของกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสูตร 1 และสูตร 2 เป็น 1.8 และ 1.7 ตามลำดับ ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) หลังจากที่ให้อาหารปลาครบตามการทดลองแล้ว เมื่อให้ปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตและตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีในซีรัมที่เวลา 3 7 และ 14 วัน พบว่าปลาที่ได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน ซึ่งมีระดับแอนติบอดีสูงสุดในทรีตเมนต์ 1 และ 3 และปริมาณแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารที่มียีสต์เมื่อเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นภูมิคุ้ม กันปลากะพงด้วยการฉีดสารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ (จันทร์จรัส และคณะ, 2559) หรือการฉีดปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์เข้าในช่องท้องปลาโดยตรง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ปลาผลิตแอนติบอดีเพิ่มขึ้นในอัตราส่วน 1.5 และ 1.2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 30 วัน (สุพรรณี และคณะ, 2554) ตามลำดับ แต่การใช้ยีสต์สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลาที่เวลา 14 วัน ในอัตราส่วนที่สูงกว่า นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติที่ดีของยีสต์ทะเล *P. jadinii* ด้านคุณค่าอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงร้อยละ 42 และไขมันร้อยละ 0.22 (สวพัศ และสรารัศมิ์, 2556) รวมทั้งประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (mono-unsaturated fatty acids (MUFAs)) ร้อยละ 47-52 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)) ประมาณร้อยละ 17 ของกรดไขมันรวม (Siranonthana et al., 2015) การเลี้ยงยีสต์ใช้ต้นทุนต่ำกว่าการเลี้ยงปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ และยังสามารถเพิ่มปริมาณยีสต์ให้เพียงพอต่อการนำไปผสมในอาหารได้ตามต้องการซึ่งไม่สามารถทำได้เมื่อต้องใช้ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ อีกทั้งผนังเซลล์ของยีสต์มีโครงสร้างของบีตา-กลูแคน (β-glucans) (Bzducha-WrÓbel et al., 2015) ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน อัจฉรี และนงนุช (2551) ได้ทดลองเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารพบว่าการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารสามารถช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาโรซี่บาร์บ ดังนั้นยีสต์ทะเล *P. jadinii* จึงสามารถนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์น้ำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเสริมความต้านทานต่อเชื้อปรสิต *C. irritans* ของปลากะพงได้

ผลการเสริมปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ด้วยเทคนิคการตรึงกับแคลเซียมแอลจีเนตเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาการ์ตูนส้มขาว ซึ่งเทคนิคนี้มีนักวิจัยนำมาใช้เพื่อลำเลียงสารหรือวัคซีนที่ต้องการสู่สัตว์น้ำไปยังเป้าหมายที่ต้องการเพื่อให้ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพ (Skjermo et. al., 1995; Harikrishnan et. al., 2012; Ruyra et. al., 2014) โดย Ballesteros et. al. (2015) สรุปว่าผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค haematopoietic necrosis virus (IHNV)ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปลากินอาหารเซลล์ตรึง DNA (PIRF1A-G) กับแคลเซียมอัลจิเนต จากผลการวิจัยการตรึงปรสิตระยะธีรอนต์ร่วมกับอาหารพื้นฐานเพื่อตรวจสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา ผลการทดลองพบว่าอาหารที่มีเซลล์ตรึง *C. irritans* สามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อปรสิตสูงขึ้นได้เมื่อเทียบ

กับชุดการทดลองควบคุมและชุดการทดลองที่ 1 เมื่อปลากินอาหารครบ 2 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hatanaka et.al. (2007) ที่พบระดับของแอนติบอดีในซีรั่มปลาปักเป้าเสือ (*Takifigu ruburipes*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และระดับของแอนติบอดีของปลาจะคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่กินอาหารชุดควบคุมต่อจนครบสัปดาห์ที่ 4 และในระหว่างเผชิญเชื้อระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาชุดการทดลอง 3 เพิ่มขึ้นสูงสุด ที่ 0.693 ± 0.21 แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้นสัปดาห์ที่ 6 ระดับแอนติบอดีของปลาการ์ตูนชุดการทดลองนี้ เริ่มลดลงจนไม่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Lou et al. (2007) ที่กล่าวว่าแอนติบอดีของปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ที่ได้รับการฉีดวัคซีน *C. irritans* มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1, 2 และจะเพิ่มสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 4 - 6 และแอนติบอดีไตเตอร์จะยังคงที่อยู่จนถึง สัปดาห์ที่ 8 ซึ่งกลไกการจดจำต่อสิ่งแปลกปลอมนี้ก่อให้เกิดการป้องกันการติดโรคจุดขาวน้ำเค็มได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังขัดแย้งกับรายงานของสุพรรณี ลีโทชวลิต และคณะ (2553) พบว่าปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sargocentron rubrum*) ที่ได้รับการฉีดเชื้อตาย *C. irritans* มีระดับแอนติบอดีสูงสุดสัปดาห์ที่ 7 จากรายงานของจันทร์จรัส และคณะ (2559) ที่รายงานการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวด้วยวิธี ELISA พบว่าปลามีการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเมมเบรนโปรตีนของปรสิต *C. irritans* มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 8 และจากรายงานของ Bai et. al. (2008) ได้ศึกษาระดับของแอนติบอดีและกลไกการต้านทานโรคของปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ต่อโรคจุดขาวน้ำเค็ม ที่ได้รับการฉีดปรสิต *C. irritans* พบว่าปลาสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองครั้งนี้เป็นการให้วัคซีนแบบเซลล์ตรึงผ่านการกิน ทำให้ระดับของแอนติเจนไม่เพิ่มสูงมาก จากรายงานของ Borgogna et. al. (2011) กล่าวว่าวัคซีนแบบให้กินนั้นจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้น้อยกว่าการฉีด แต่มีข้อดีคือไม่ก่อให้เกิดความเครียด ไม่มีผลข้างเคียงและสามารถใช้ได้กับปลาทุกขนาด

ในปีค.ศ. 2008 Kumar และคณะ ทำการทดลองใช้ไคโตซานตรึง DNA วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio (Listonella) anguillarum* ในปลากะพงขาว พบว่าสามารถใช้ไคโตซานเป็นสารตรึงวัคซีนและนำไปผสมอาหารได้ หลังจากการทดลองให้ปลากินอาหารเซลล์ตรึงนี้แล้วเมื่อนำปลาไปฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. anguillarum* พบค่า RPS อยู่ที่ 46%

จากรายงานการศึกษาของ Bai และคณะ (2008) พบว่าความจำเพาะของแอนติบอดีซีรัมที่เกิดขึ้นหลังได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดปรสิตระยะธีรอนต์, ระยะโทรฟอนต์และระยะโทมอนต์ เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากนั้นลดลงในสัปดาห์ 6 และ 8 สัปดาห์ การกระตุ้นด้วยระยะธีรอนต์ ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดคือ 426 ไตเตอร์ ในสัปดาห์ที่ 4 และพบว่าความจำเพาะของแอนติบอดีซีรัมที่เกิดขึ้นหลังได้รับการกระตุ้นเวลา 2 เดือน จะมีผลต่ออัตรารอดของปลาอีกด้วย สำหรับจากการศึกษาของ Yambot and Song (2006) ที่พบว่าปลากะรังจุดส้มที่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยปรสิตที่มีชีวิตต่อ *C. irritans* หรือการฉีดกระตุ้นด้วย *C. irritans* ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีนนั้นสามารถทำให้ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีสูงขึ้นในเมือกปลากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นและมีจำนวนปลารอดชีวิตมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

จากการทดลองของ Vimal และคณะ (2014) ที่ทดสอบผลของอาหารที่ผสมด้วยเซลล์ตรึง DNA วัคซีนกับไคโตซาน-ไตรโพลีฟอสเฟต (CS/TPP) เพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัส nodavirus ในปลากะพงขาว ซึ่งหลังจากนำอาหารที่ผสมวัคซีนดังกล่าวไปให้ปลากินแล้วนำปลาไปเผชิญเชื้อ nodavirus ด้วยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง พบว่าปลากะพงขาวจะมีค่าการรอดตายสัมพัทธ์อยู่ที่ 60% และยังสรุปว่า ไคโตซาน-ไตรโพลีฟอสเฟต (CS/TPP) สามารถนำมาใช้ในการตรึง DNA วัคซีนเพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงปลาได้

การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 พบ clear zone ชัดเจนในอาหารทดลองชุดการทดลอง ที่ 2, 3 และ 4 ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เท่านั้น ส่วนในปลากะพงชุดที่ 2 ไม่สามารถวัด clear zone ได้ ทั้งในช่วงก่อนและหลังการเผชิญเชื้อ ซึ่งต่างจากการทดลองของ Yin และคณะ (2014) ที่ทำการวิเคราะห์ไลโซไซม์ในขณะที่ปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) มีการเผชิญเชื้อ *C. irritans* โดยผู้วิจัยกล่าวว่ากิจกรรมไลโซไซม์จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ปลาเผชิญเชื้อ และจากการทดลองของ Yin et.al (2015) ได้ทดลองในปลาจาระเม็ดไต้หวัน (*Trachinotus ovatus*) โดยปลาทดลองแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกได้รับการเผชิญเชื้อ 1 ครั้งที่สัปดาห์ที่ 10 ด้วยธีรอนท์ จำนวน 40,000 ธีรอนท์/ตัว กลุ่ม 2 ทำการเผชิญเชื้ออีกทุกสัปดาห์ 10 ครั้ง กลุ่มควบคุมไม่ต้องเผชิญเชื้อ ทำการตรวจสอบอัตราการตายและตรวจวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ากิจกรรมไลโซไซม์ของกลุ่ม 2 ต่ำสุด

ในการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritan* ระยะ theront และยีสต์ โดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ผลการทดลองในปลากะพงขาวชุดที่ 1 แสดงให้เห็นว่าระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 2 และ 3 ที่มีปรสิต *Cryptocarryon* และยีสต์ เป็นองค์ประกอบตามลำดับ มีระดับที่สูงกว่าชุดควบคุมที่เวลา 14 วัน และลดลงในวันที่ 28 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 42 เมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตมีชีวิตเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารที่มีปรสิตสูงกว่าอาหารที่มียีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 3-6 เมื่อพิจารณาจากเส้นแนวโน้มพบว่าชุดการทดลองที่ 3 ที่ปลาได้รับอาหารที่มียีสต์มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าอาหารที่มีปรสิตและสูงกว่าชุดควบคุม การที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งปลาได้รับอาหารที่มีปรสิตเป็นองค์ประกอบที่เวลา 7 วัน ซึ่งเป็นรอบวงชีวิตของปรสิตที่ปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน เมื่อพิจารณาเส้นแนวโน้มพบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกชุดการทดลองที่เวลา 42 วัน หรือ 6 สัปดาห์ และเมื่อปลาได้เผชิญกับเชื้อปรสิตก็มีแนวโน้มที่ระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นอีกครั้ง ส่วนในชุดที่ 2 พบว่าเมื่อปลาได้รับอาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 14 วัน ระดับของแอนติบอดีสูงกว่าในชุดควบคุมและอาหารที่มีแคลเซียมอัลจิเนต รวมทั้งเมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 3 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในชุดการทดลองที่ 1 2 และ 3 ส่วนชุดการทดลองที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แต่เมื่อปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง

สำหรับการทดลองเลี้ยงปลาการ์ตูนส้มขาวครั้งที่ 1 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาการ์ตูนส้มขาวโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร โดยให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต

เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาวโดยเทคนิค ELISA พบว่าค่าแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนที่ให้อาหารสูตร 2 และสูตร 3 จะสูงกว่าสูตร 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อปลาได้รับอาหารสูตรทดลอง 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสูตร 1 แต่ในปลาการ์ตูนที่ได้รับอาหารสูตร 4 ภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารสูตร 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ให้ ($P < 0.05$) เมื่อปลาเผชิญเชื้อครบ 1 สัปดาห์ ค่าแอนติบอดีในซีรั่มปลาชุดกาทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสม *C. irritans* จะขึ้นสูงสุดและแตกต่างจากชุดการทดลองที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ให้ ($P < 0.05$) อีกครั้ง จนกระทั่งเมื่อทำการทดลองครบกำหนด 6 สัปดาห์ แอนติบอดีในซีรั่มปลาชุดการทดลองที่ 3 จะสูงสุด ทั้งนี้ ปลาชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ยังมีค่าแอนติบอดีในซีรั่มสูงกว่าปลาชุดควบคุม แตกต่างจากชุดการทดลองที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ให้ ($P < 0.05$)

การทดลองในปลาการ์ตูนครั้งที่ 2 เมื่อมีการปรับวิธีให้อาหารสูตรทดลอง เพื่อหาวิธีการให้อาหารและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาให้เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งการทดลองนี้ทำโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร 1 สัปดาห์สลับกับอาหารสูตรควบคุม 1 สัปดาห์ จนครบกำหนด 8 สัปดาห์ นำปลามาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนส้มขาวโดยเทคนิค ELISA พบว่าระดับของแอนติบอดีในซีรั่มปลาจะค่อนข้างคงที่ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jørgensen และคณะ (2012) ที่ทดลองฉีดวัคซีน Plasmid encoding ของ lag52B และ membrane bound จาก ICP2 ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าระดับของแอนติบอดีซีรั่มของปลาทุกกลุ่มที่ฉีดวัคซีนต่างชนิดกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นที่สัปดาห์ที่ 6 พบว่าปลาการ์ตูนที่ได้รับอาหารสูตร 4 แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารสูตร 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Behera และ Swain (2013) ที่กล่าวว่าศักยภาพของ alginate-coated chitosan microspheres สามารถใช้เป็นสารพาหะในการนำวัคซีนชนิดกินเข้าสู่ตัวปลาได้ ทั้งนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะเจาะจงและแบบทั่วไป (Adaptive and innate immune response) ได้หลังจากปลาได้รับวัคซีนแล้ว 6 สัปดาห์

จากการศึกษาของ Bryant และคณะ (1999) ที่ระบุว่าการฉีดกระตุ้นด้วย bovine serum albumin (BSA) ในปลากะพงขาว 4 ตัว พบว่ามีปลากะพงเพียง 1 ตัวที่มีระบบภูมิคุ้มกันตอบสนอง ที่เวลา 8 สัปดาห์ และยังได้ระบุอีกว่าเมื่อเปรียบเทียบการฉีดด้วย BSA และ ธีรอนท์ของ *C. irritans* พบว่าระบบภูมิคุ้มกันของปลาทั้ง 2 กลุ่มจะตอบสนองสูงสุดที่ 8 สัปดาห์ และต่อจากนั้นจะเริ่มลดลง

Delamare-Deboutteville และคณะ (2006) พบว่าการให้วัคซีน *Streptococcus iniae* ในปลากะพงขาวด้วยวิธีการแช่และฉีด ปลากะพงทั้ง 2 ชุดจะเริ่มมีการตอบสนองที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค ELISA ที่วันที่ 21 หลังจากได้รับวัคซีน

จากการศึกษาของ Luo at.al (2007) มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* ของปลากะรัง ผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเผชิญเชื้อบนผิวหรือจากการฉีดกระตุ้น พบค่าความจำเพาะไตเตอร์แอนติเจนของซีรัมปลาที่ถูกกระตุ้นและเมือกที่ได้จากผิวโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA และการวิเคราะห์การตรึง พบว่าความจำเพาะของแอนติบอดีสามารถตรวจสอบได้จากภูมิคุ้มกันปลาที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 และพีคมีค่าไตเตอร์

สูงระหว่างสัปดาห์ที่ 4-6 ความจำเพาะของแอนติบอดียังพบในซีรัมและเมือกของปลาที่ถูกกระตุ้นในสัปดาห์ที่ 8 และเตรียมการกระตุ้นเพื่อต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* มีการพบการชักนำด้วย humoral and skin mucosal immunity ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* ในปลา

จากการศึกษาของ Bai at.al (2008) ที่ทำการเปรียบเทียบ protective immunity ในปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ต่อเชื้อ *C. irritans* ด้วยปรสิตระยะ theronts, trophonts และ tomonts ด้วยการฉีดเข้าช่องท้อง ทำการตรวจกา specific antibody titres ในซีรั่ม ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay และ immobilization assays ที่สัปดาห์ที่ 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 หลังจากนั้นให้ปลากะรังเผชิญเชื้อเพื่อตรวจสอบอัตราการรอด จากการทดลองนี้ พบว่าปลาที่ได้รับการฉีดด้วยปรสิตระยะธีรอนท์ จะมีระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าปลาที่ฉีดปรสิตระยะ โทรฟอนท์และโทรมอนท์แบบมีนัยสำคัญ

การศึกษาของ Yambot and Song (2006) ได้ทำการศึกษา titres ของเมือกปลากะรัง *(Epinephelus coioides)* ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า ระดับของ titres ในลูกปลาวัยอ่อนและปลาโตเต็มวัยที่เผชิญเชื้อ *C. irritans* จำนวนน้อยจะสูงกว่ากลุ่มที่เผชิญเชื้อจำนวนอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford ในปลากะพงขาวชุดที่ 1 พบว่า ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการให้อาหารโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง และมีแนวโน้มที่ลดลงหลังจากที่ปลาได้เผชิญเชื้อปรสิต โดยปริมาณโปรตีนได้ลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงมากที่สุดต่ำกว่าในวันที่ 14ในซีรั่มปลาที่ได้รับอาหารสูตร1 ซึ่งเป็นชุดควบคุม สำหรับชุดทดสอบชุดการทดลองที่ 2 และ 3 โปรตีนมีปริมาณลดลงมาใกล้เคียงกับที่ 14 วัน ส่วนในปลาทดลองชุดที่ 2 พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตร 2 3 และ 4 และเมื่อให้ปลาให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตที่เวลา 3, 7 และ 14 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มมีแนวโน้มลดลง

จากการศึกษาของ สุพรรณี ลีโทชวลิต และคณะ (2554) ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford ในปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sarcocentrum rubrum*) ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย *C. irritans* ในช่องท้อง ที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ จึงทำการดูดเลือดปลาที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 สัปดาห์ นำซีรั่มที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนพบว่า กลุ่มควบคุมสัปดาห์ที่ 1, 3, 5 และ 7 มีปริมาณโปรตีน 28.6, 15.42, 32.72, และ 45.84 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างสัปดาห์ที่ 1, 3, 5 และ 7 มีปริมาณโปรตีน 40.0, 50.44, 49.2, 46.24 มก./มล.ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Mizumi และคณะ (2102) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันโรคที่เกิดจาก *C. irritans* ในปลาหมอเทศ (Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*) โดยให้ปลาเผชิญเชื้อระยะธีรอนท์ จำนวน 300 theronts/ปลา 1 ตัว พบว่าปลาจะสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น โดยพบโปรตีนที่ 28 KD

ปี ค.ศ. 2015 Dhayanithi และคณะ ทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรค *V. alginolyticus* ในปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) ด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculate*) ปริมาณ 1% 5% และ 10% ในอาหารตามลำดับ พบว่าปลาที่ได้รับสารสกัดจากใบโกงกางใบเล็กที่ปริมาณ 5% และ 10% มีค่าไลโซไซม์ และ phagocytic

activities เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากกินอาหารได้ 3 และ 4 สัปดาห์ โดยมีอัตราการรอดที่ 85% และ 80% ตามลำดับ

Yin และคณะ (2015) ทำการศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ *C. irritans* ต่อความเครียด ความต้านอนุมูลอิสระและเยื่อเมือกของระบบภูมิคุ้มกันการตอบสนองในปลาจวดเหลือง (*Pseudosciaena crocea*) โดยแบ่งปลาออกเป็น 3 กลุ่ม และให้เผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะธีรอนธ์ที่จำนวนต่างกัน โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อเลย ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า อัตราการรอดของปลา ที่ได้รับการเผชิญเชื้อจำนวน 0 theronts/fish เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่ม I (12,000 theronts/fish) กลุ่ม II (24,000 theronts/fish), และกลุ่ม III (36,000 theronts/fish) เป็น 100, 100, 96.67 ± 5.77 และ 48.33 ± 7.64 เมื่อตรวจสอบระบบภูมิคุ้มกันอื่นพบว่าปลาจวดเหลืองมีระดับการตอบสนองในระบบต่าง ๆ สูงขึ้นเมื่อได้รับปริมาณเชื้อสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

งานวิจัยสิ่งแวดล้อมทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. (2555). *รายงานคุณภาพน้ำชายฝั่งชลบุรี.* เข้าถึงได้จาก http://www.bims.buu.ac.th/DocLib4/Forms/AllItems.aspx

จรูญ พุทธจรรยา. (2534). *การพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ขนมปังในประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุรัตน์ วรรณโกวัฒน์, มะลิ บุณยรัตนผลิน, เยาวนิตย์ ดนยดล, มาวิทย์ อัศวอารีย์ และ สังวาลย์ ปะกิรณะ. (2532). ระดับที่เหมาะสมของวิตามิน บี 6 ในอาหารปลากะพงขาว Lates calcarifer. ใน *เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 1/2532 สถาบันวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา.*

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, สุพรรณี ลีโทชวลิต**,** จารุนันท์ ประทุมยศ, มลฤดี สนธิ และ มะลิวัลย์ คุตะโค. (2559). การใช้เซลล์ตรึงยีสต์ทะเล *Pichia jadinii* เป็นสารเสริมอาหารในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว. *แก่นเกษตร, 44* (Suppl. 2): 788-792.

ณัฐพงษ์ จูพัฒนกุล, Timothy W. Flegel, บุญเสริม วิทยชำนาญกุล และกัลยาณ์ ศรีธัญญลักษณา. (2553). การเตรียมและการนำโปรตีน PmRab7 ไปใช้เพื่อป้องกันโรคดวงขาวในระดับฟาร์มกุ้ง. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 3-5 ก.พ. 2553. หน้า 21-28.*

นนทวิทย์ อารีย์ชน ดวงใจ กิตติปรีชากุล และชุมพล ศรีทอง. (2546). การใช้แอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* กับกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 กรุงเทพฯ หน้า 137-145.*

บัณฑิต พรหมรักษา, จุรีรัตน์ ดาดวง, เตือนจิต คำพิทักษ์, ประณิธิ หงสประภาส และพัชรี บุญศิริ. (2557). เทคนิคไมโครแคปซูเลชั่นและบทบาททางการแพทย์. *ศรีนครินทร์เวชสาร, 29*, 90-97.

ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล. (2550). แนวคิดและการประยุกต์ทางวิทยาภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ. ใน *การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 13 โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทารา กรุงเทพฯใ 13 ตุลาคม - 2 พฤศจิกายน 2550.*

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. (2539). *หลักอาหารสัตว์ เล่ม 2: หลักโภชนาศาสตร์และการประยุกต์.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร.

วรวุฒิ เกิดปราง และ ชาคริยา ฉลาด. (2558). จุลินทรีย์ท้องถิ่นในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามหลักเกษตรธรรมชาติ กรณีศึกษา: ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง. *วารสารวิจัย, 8*(1).

วิเชียร สาคเรศ, มะลิ บุณยรัตผลิน, นันทิยา อุ่นประเสริฐ และพรชัย ขำแป้ง. (2531). ระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาว. ใน *เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2531. สถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง.*

วิเชียร สาคเรศ, มะลิ บุญยรัตผลิน และนันทิยา อุ่นประเสริฐ. (2532). ระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาว. ใน *เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 8/2532. สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดระยอง กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง.*

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. (2543). *โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาพร ดิเรกบุษราคม และ จูอะดี พงศ์มณีรัตน์. (2527). โรคจุดขาวในปลาน้ำกร่อย. ใน *เอกสารประกอบการอบรมและส่งเสริมเผยแพร่. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา.*

สวพัศ มุ่งแฝงกลาง และสรารัศมิ์ วสุชัยวัส. (2556). *การศึกษาคุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบกรดไขมันในยีสต์ Pichia sp*. รายงานปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์, วีลยา แก่นจันทร์ และนันทิกา คงเจริญพร. (2554). *การศึกษาโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากโปรโตซัว Cryptocaryon sp. ในปลาทะเลในประเทศไทย.* รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, วีลยา แก่นจันทร์ และอัญชลี ป้องเมือง. (2553). การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sargocentron rubrum*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิตจุดขาวน้ำเค็ม *Cryptocaryon irritans*. ใน *ประมวลผลงานวิจัยการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล ณ โรงแรมรอยัลภูเก็ตซิตี้ จังหวัดภูเก็ต. หน้า 351-357.*

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, จารุนันท์ ประทุมยศ, ศรันยู คำเมือง และรักฤดี สารธิมา. (2557). การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย. ใน *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน.*

เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. (2552). Microencapsulation : เทคโนโลยีจิ๋ว แต่แจ๋ว. *วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี, 36*, 39-42.

อัจฉราวรรณ ทองมี. (2530). *การสกัดกรดไขมันจากยีสต์ Rhodotorula gracilis*. ดุษฎีนิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อัญชัญ ธนบุญรุ่งเรือง และอมรรัตน์ อุตรไชย. (2555). *การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันใน ยีสต์ BS 6-2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ.* บัณฑิตวิทยาลัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity andparasite infections: from innate immunity to immunoprophylacticprospects. *Veterinary Immunology* and *Immunopathology,* 126, 171-198.

Alvarez-Gonzalez, C. A, Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J. L., Dumas, S., Moreno-Legorreta M., & Grayeb-Del Alamo, T. (2001). Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture, 194*, 151-159.

Alexander, J. B. & Ingram, G. A. (1992). Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease, 2*, 249-279.

Anderson, D. P. (1990). Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *American Fisheries Society Symposium, 8*, 38-50.

Aranishi, F., & Nakane, M. (1997). Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry, 16*, 471-478.

Austic, R. E., & Nesheim, M. C. (1990). *Poultry Production* (13th ed.). Lea and Febiger Publishing. Philadelphia, U.S.A.

Avella, M.A., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2007). The role of Fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture, 273*, 87-95.

Azevedo, R.F., & Braga, L.G.T. (2012). *Use of probiotic in aquaculture*. In Rigobelo, E.C. eds. Probiotic in Animals. 103-118. Intech. Rijeka, Croatia.

Bai, J. S., Xie, M. Q., Li, A. X., Zhu, X. Q., & Dan X. M. (2008). Comparative studies on the immunogenicity of theronts, tomonts and trophonts of *Cryptocaryon irritans* in grouper. *Parasitology Research, 102*, 307-313.

Bagni, M., Romano, N., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., Sarti, M., Marino, G. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast β-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology, 18,* 311-325.

Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling degradation behavior of alginate beads crosslinked with Ca2+ and Ba2+ ions. *Reactive and Functional Polymers, 59*, 129-140.

Ballesteros, N. A., Alonso, M., Saint-Jean, S. R., & Perez-Prieto, S. I. (2015). An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorrhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology, 45*, 877-888.

Baskerville-Bridge, B., & Kling, L. (2000). Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture Nutrition, 6*, 171-182.

Behera, T., & Swain, P. (2013). Antigen encapsulated alginate-coated chitosan Microspheres stimulate both innate and adaptive immune responses in fish through oral immunization. *Aquaculture International. DOI 10.1007/s10499-013-9696-8*.

Borgogna, M., Bellich, B., & Cesaro, A. (2011). Marine polysaccharides in Microencapsulation and application to aquaculture: “from sea to sea”. *Marine. Drugs, 9*, 2572-2604

Boshra. H, Li. J, & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology, 20*, 239-262.

Bryant, M.S., Lee, R.P., Lester, R.J. & Whittington, R.J. (1999). Anti-immunoglobulin Antisera used in an ELISA to detect antibodies in barramundi Lates calcarifer to *Cryptocaryon irritans*. *Diseases of Aquatic Organisms, 36*, 21-28.

Buchl, N. R., Hutzler, M., Mietke-Hofmann, H., Wenning, M., & Scherer, S. (2010). Differentiation of probiotic and environmental Saccharomyces cerevisiae strains in animal feed. *Journal of Applied Microbiology*, *109*, 783-791.

Burgess, P. J., & Matthews, R. A. (1994). A standardized method for the *in vivo* Maintenance *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as An experimental host. *Journal of* Parasitology, *80*, 288-292.

Bzducha-WrÓbel, A., Bla**Ź**ejak, S., Molenda, M., & Reczek, L. (2015). Biosynthesis of β(1,3)/(1,6)- glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. *The Journal* European Food Research *and* Technology, *240*, 1023-1034

Calinescu, I., Chipurici, P., Trifan, A., & Badoiu, C. (2012). Immobilisation of *Saccharomyces cerevisiase* for the production of bioethanaol. *U.P.B. Sci. Bull., Series B, 74*, 33-40.

Carmen, S. (2007). New techonolgies to synthesize. Extract and encapsulate natural food colorants. *Bulletin USAMV-CN, 64*, 63 - 64.

Castro, R., Couso, N., Obach, A., & Lamas, J., (1999). Effect of different betaglucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish and Shellfish Immunology, 9*, 529-541.

Catacutan, M.R, & Coloso, R.M. (1995). Effect of dietary protein to energy ratios on growth, survival, and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture, 131*, 125-133.

Chan L.W., Lee H.Y. & Heng P.W.S. (2002). Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics, 242*, 259-262.

Cheeke, P.R. (1999). *Applied Animal Nutrition, Feeds and Feeding* (2nd ed.). USA.: Prentice-Hall.

Chen, D., & Ainsworth, A.J. (1992). Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque. *Journal of Fish Diseases, 15*, 295-304.

Chen, R,. Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., & Yao. B. (2010). High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce Aeromoasn hydrophila mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factorial, 9*, 39. Retrieved from http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1475-2859-9-39.pdf

Cheng, A.C.,Tu, C.W., Chen, Y.Y. Nan, F.H. & Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology, 22,* 197-205.

Cheng, A.C., Chen, Y.Y, & Chen, J.C. 2008. Dietary administration od sodium alginate and k-carrageenan enhances the innate immune response of brawn-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Veterinary immunology and immunopathology, 121*, 206-215.

Cheung, P. J., Nigrelli, R. F., & Ruggieri G. D. (1979). Studies on cryptocaryoniasis in marine fish: effect of temperature and salinity on the reproductive cycle of *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951. *Journal of Fish Diseases, 2*, 93-97.

Chiou, M.S., & Li, H.Y. (2002). Equilibrium and Kinetic Modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads. *Journal of Hazardous Materials, 93*, 233-248.

Chiu, S.T., Tsai, R.T., Hsu, J.P., Liu, C.H. & Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune response, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Aquaculture, 277*, 66-72.

Christie, W.W. (2003). *Lipid Analysis*. Bridgwater, UK.: The Oily Press,

Colorni, A. (1985). Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms, 1,* 19-22

Colorni, A. (1987). Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control. *Aquaculture, 67*, 236-237.

Colorni, A., & Burgess, P. J. (1997). *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of 'white spot disease' in marine fish: an update. *Aquarium Sciences Conservation, 1*, 217-238.

Cordero, H., Guardiola, F.A., Tapia-Paniagua, S.T., Cuesta, A., Meseguer, J., Carmen Balebona, M.C. & Morinigo, M.A. (2015). M. Angeles Esteban. 2015. Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology, 45*, 608-618.

Delamare-Deboutteville, J., Wood, D. & Barnes, A.C. (2006). Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi *(Lates calcarifer)* acclimated in seawater and freshwater. *Fish & Shellfish Immunology, 21*, 92-101.

Desai, K.G.H. & Park, H.J. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology, 23*, 1361-1394.

Dey, A., Ghosh, K. & Hazra, N. (2015). An overview on bioencapsulation of live food organisms with probiotics for better growth and survival of freshwater fish juveniles. *International Journal of Research Fisheries Aquaculture, 5*, 74-83.

Dhayanithi, N.B., Ajithkumar, T.T., Arockiaraj, J., Balasundaram, C., & Ramasamy, H. (2015). Immune protection by Rhizophora apiculata in clownfish against *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture, 446*, 1-6.

Diggles, B. J., & Adlard, R. D. (1997). Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. *Journal of Eukaryotic Microbiology, 44*, 25-32.

Doyle, E. (2007). *Alternative to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry*. University of Wisconsin-Madison, Madison

Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, *25*, 827-839.

Engstad, R., Robertsen, B., & Frivold, E. (1992). Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology, 2*, 287-297.

Evans, C.T. & Ratledge, C. (1992). A Comparison of Oleaginous Yeast, *Condida curvata*, Grown on Different Carbon Sources in Continuous and Batch Culture. *Lipids, 18*, 623 - 629**.**

Ewart, K. V., Johnson, S. C, & Ross, N. W. (2001). Lectins of the innate immune system and their relebvance to fish health. *Marine Science, 58*, 380-385.

Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O. & Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers Immunology, 4*, 28.

Fujiki, K. & Yano, T. (1997). Effects of sodium alginate on the non-specific defence system of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology, 7*, 319-330.

Fukiji, K., Matsuyama, H. & Yano, T. (1994). Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fish Diseases, 17*, 349-355.

Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology, 2*, 346-353.

Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture, 180*, 147-165.

Gordon, A.K., Kaiser, H., Britz, P.J. & Hecht, T. (2000). Effect of Feed Type and Age-at-weaning on Growth and Survival of Clownfish Amphiprion percula (Pomacentridae). *Aquarium Science and Conservation, 2, 215-226.*

Gutierrez, L.E. & Da Silva, R.C.M. (1993). Fatty acid composion of cane molasses and yeasts. *Science agriculture, 50*, 473 - 477.

Harikrishnan, R., C. Balasundaram, & M.-S. Heo. (2012). Poly D, L-lactide-co-glycolic acid(PLGA)-encapsulated vaccine on immune system in *Epinephelus bruneus* against *Uronema marinum. Experimental Parasitology, 131*, 325-332.

Hatanaka, A., Umeda, N., Yamashita, S. & Hirazawa, N. (2007). Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology, 134*, 1163-1174.

Hibiya, T. (Ed.) (1994). *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 5-125.

Ingram, G. A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection a review. *Journal of Fish Biology, 16,* 23-60.

Jakobsen, M. & Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative Effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal, 6*, 755-768.

Jeney, G., Yin, G., Ardó, L. & Jeney, Z. (2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry, 35*, 669-676.

Jørgensen, L.G., Sigh, J., Kania, P.W., Holten-Andersen, L.. Buchmann, K., Clark, T., Rasmussen, J.S., Einer-Jensen, K. & Lorenzen, N. (2012). *Approaches towards DNA vaccination against a skin ciliate parasite in Fish*. PLOS ONE: www.plosone.org. 7: e48129.

Kolkovski, S. (2004). *Marine fish larvae diets - current status and future directions*. 11th international symposium on nutrition and feeding in fish, Phuket, Thailand. pp112.

Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K. & Tandler, A. (2001). Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: A review. *Aquaculture, 194*, 107-121.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2003). The influence of coating materials on someproperties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Biological Chemistry, 14*, 737-743.

Kuang S.S., Oliveira, J.C. & Crean, A.M. (2010). Microencapsulation as a tool for Incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science* and *Nutrition,* 50, 951-968.

Kumar, S.R., Ishaq Ahmed, V.P., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Sarath Babu, V. & Sahul Hameed, A.S. (2008). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass *(Lates calcarifer)* to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology, 25*, 47-56

Kutty, S. N. & Philip, R. (2008). Marine yeasts - a review. *Yeast, 25*, 465-483.

Laing, K. J. & Hansen, J. D. (2011). Fish T cells: recent advances through genomics. Dev. *Developmental and Comparative Immunology, 35*, 1282-1295.

Lauridsen, J.H. & Buchmann, K. (2010). Effects of short- and long-term glucan feeding of rainbow trout (Salmonidae) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis* infections. Acta *Ichthyologica* Et *Piscatoria, 40*, 61-66.

Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C., & Arnold, C.R. (2000). Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture, 188*, 339-351.

Li, J., Chi, Z., Wang, Z., Wang, L., Sheng, J. & Gong, F. (2008). Occurrence and diversity of *Pichia* spp. in marine environments. *Journal of Ocean University China, 7*, 281-288.

Lopez Alvarado, J., Langdon, C.J., Teshima, S.I. & Kanazawa, A. (1994). Effect of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. *Aquaculture, 122*, 335-346.

López, L.M., Durazo, E., Viana, M.T., Drawbridge, M. & Bureau, D.P. (2009). Effect of dietary lipid levels on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture, 289*, 101-105.

Lourens, A. & Viljoen, B.C. (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International, 34*, 791-796.

Luo, X. C., Xie M. Q., Zhu X. Q., & Li A. X. (2007). Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 427-432.

Luzardo-Alvarez, A., Otero-Espinar, F.J. & Blanco-Méndez, J. (2010). Microencapsulation of diets and vaccines for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. *The Journal of Drug Delivery Science and Technology, 20*, 277-288.

Lupatsch, I., Floyd, R.J., Shields, R.J. & Snellgrove, D.L. (2013). *Feed Requirements for Maintenance and Growth of Anemone Clownfish Amphiprion percula*. The Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgeh, IJA_65.2013.917, 8 p.

Lyons, P. (1986). Yeast: out of the black box. *Feed Manangement, 37*, 8-14.

Matcles, l. & Steren, R.T. (1968). *Single cell Protein*. Massachuseths, USA. 349 P.

MIdtyling, P.J. (1997). Novel vaccines & new vaccination strategies for fish. *Bulletin-European Association of* Fish *Pathologists, 17*, 239-244.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry, 31*, 426-428.

Miles, D.C., Polchana, J., Lilley, J.H., Kanchnankhan, S., Thompson, K.D., & Adams, A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture, 195*, 1-15.

Misumi, I, Leong, J. A., Takemura, A. & Lewis, T. D. (2012). Immune protection of Mozambique tilapia *(Oreochromis mossambicus*) exposed to different infectious dose of ectoparasite (*Cryptocaryon irritans*). *Parasitology Research, 110*, 363-372.

Mitropoulou, M., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization Technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition* and *Metabolism*, 716861: 15 p.

Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L.L. & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients, 2*, 449-473.

Mutoloki, S., Munang'andu, H.M. & Evensen, Ø. (2015). Oral Vaccination of Fish - Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction. *Frontiers in Immunology, 6*, 1-10.

Navarrete, P. & Tovar-Ramírez, D. (2014). *Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In Sustainable Aquaculture Techniques*. PhD. Martha Hernandez-Vergara (Ed.), ISBN: 978-953-51-1224-2, InTech, DOI: 10.5772/57196. Retrieved from http://www.intechopen.com/books/sustainable-aquaculture-techniques/use-of-yeasts-as-probiotics-in-fish-aquaculture.

North, M.O., & Bell, D.D. (1990). *Commercial Chicken Production Manual* (4th ed.). Van Nostrand Reinhold, New York. 913 p.

Ortuño,J., Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., & Mesequer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Veterinary immunology and immunopathology, 85*, 41-50.

Pastoret, P., Griebel, P., Bazin, H. & Govaerts, A. (1998). *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press Limited, USA. 673 p.

Peddie, S., Zou, J., & Secombes, C.J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Verterinary and* Immunopathology, *86*, 101-113.

Polk, A.E., Amsden, B., Scarratt, D., Gonzal, A., Okhamafe, A.O. & Goosen, M.F.A. (1994). Oral delivery in aquaculture: controlled release of proteins from chitosan-alginate microcapsules. *Aquaculture Engineering, 13*, 311-323.

Robertsen, N. (1999). Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunology, 9*, 269-290.

Rombout, J.H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G. & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology, 31*, 616-626.

Ruyra, A, M. Cano-Sarabia, P. García-Valtanen, D. Yero, I. Gibert, S. Mackenzie, Estepa A, D. Maspoch, & N. Roher. (2014). Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. *Vaccine, 32*, 3955-3962.

Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture, 172*, 63-92.

Saurabh, S. & Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research, 39*, 223-239.

Shephard, K. L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology Fisheries, 4*, 401-429.

Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevikt, T., Olsen, Y., Skjak-Braaeks, G. & Sogerloos, P. V. O. (1995). Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L*.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism artemia. *Fish & Shellfish Immunology, 5,* 521-534.

Siranonthana, N., Watanachote, J. Srivibool, R. & Pratoomyot, J. (2015). Effect of salinity on the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media. P. 712-718. In *Proceeding of the Burapha University International Conference 2015. Burapha University, Chonburi.*

Teshima, S. Ishikawa, M. & Koshio, S. (2000). Nutritional assessment and intake of microparticulate diets in crustaceans and fish. *Aquaculture research, 31*, 691-702.

Toda, H., et al. (2011). Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology, 35*, 650-660.

Trichet, V.V. (2010). Nutrition and immunity: and update. *Aquaculture Research, 41*, 356-372.

Trot, L., Balasch, J.C. & MacKenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia, 22*, 277-286.

Trot, L., Balasch, J. C. & MacKenzie, S. (2004). Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science, 2*, 443-454.

Vaghese, B. (1893). *Nutritional studies on sebae anemonefish*, *Amphiprion sebae* Bleeker 1893, with special reference to protein and lipid requirements. Thesis of Doctor of Philosophy, Central Institute of Fisheries Education, Deemed University, Mumbai, India. 192 p.

Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., & Hole, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, 143*, 123-133.

Vimal, S., Abdul Majeed, S, Nambi, K.S.N., Madan, N.,Farook, M.A., Venkatesan, C.Taju, G., Venu, S., Subburaj, R., Thirunavukkarasu, A.R. & Sahul Hameed, A.S. (2014). Delivery of DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. *Aquaculture, 420-421*: 240-248.

Vidhyalakshmi, R., R. Bhakyaraj, & R. S. Subhasree. (2009). Encapsulation “The Future of Probiotics”. *A Review Advanced Biological Research, 3*, 96-103

Wang, Y.-B., Li, J.-R. & Lin, L. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture, 281*, 1-4.

Wang, F.-H., Xie, M.-Q. & and Li, A.-X. (2010). A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to C*ryptocaryon irritans*. *Fish and Shellfish Immunology, 29*, 32-41.

Williams, K.C., Barlowb, C.G., Rodgersb, L., IHockingsb, I., Agcoprab, C. & Ruscoe, I. (2003). Asian seabass *Lates calcarifer* perform well when fed pelleted diets high in protein and lipid. *Aquaculture, 225*, 191-206.

Xie, Z., F. Wang, H. Liu, S. Guo, A. Zhu, & H. Niu. (2010). Gelatin-walled microencapsulated diet for larval shrimp (*Penaeus japonicus* Bate) manufactured using the fluidized bed coating process. *Aquaculture Research, 42*, 65-73.

Xu, H., Al, Q., Mai, K., Wang, W. X., Wang, J., Ma, H. & Zhang, W. 2010. Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissues fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture, 307*, 75-82.

Yambot, A. V. & Song, Y-L. (2006). Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture, 260*, 1-9.

Yin, F. et al. (2014). Growth, feed intake and immune responses of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) exposed to low infectious doses of ectoparasite (*Cryptocaryon Irritans*). *Fish & Shellfish Immunology, 36*, 291-294.

Yin, F., Sun, P., Tang, B., Dan, X. & Li, A. (2015). Immunological, ionic and biochemical responses in blood serum of the marine fish *Trachinotus ovatus* to poly-infection by *Cryptocaryon irritans*. *Experimental Parasitology, 154*, 113-117.

Yoshinaga, T., & Dickerson, H. W. (1994). Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* on a saltwater adapted Poecilia hybrid, the Black Molly. *Journal of Aquatic Animal Health, 6*, 197-201.

Yúfera, M., C. Fernández-Díaz, & E. Pascual. (2010). Food microparticles for larval fish Prepared by internal gelation. *Aquaculture, 248*, 253-262.

Zelles, L. (1997). Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere, 35*, 275-294.

Zhenming, C., L. Zhiqiang, G. Lingmei, G. Fang, M. Chunling, W. Xianghong, & L. Haifeng. (2006). Marine yeasts and their applications in mariculture. *Journal of Ocean University China, 5*, 251-256.

Zhou, Z.D, Li, G.Y. & Li, Y.J. (2010). Immobilization of Saccharomyces cerevisiae alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *International Journal of Biological of Biological Macromolecules, 47*, 21-26.

ภาคผนวก

(ภาคผนวก ก)

วิธีเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว ประกอบด้วย

yeast extract	0.6	กรัม
malt extract	0.6	กรัม
peptone	1.0	กรัม
glucose	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ นำเข้าเครื่องความดันอัตโนมัติ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบแข็ง ประกอบด้วย

yeast extract	0.9	กรัม
malt extract	0.9	กรัม
peptone	1.5	กรัม
glucose	3.0	กรัม
Agar	4.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ นำเข้าเครื่องความดันอัตโนมัติ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. **การเตรียมน้ำทะเลเทียมที่ความเค็ม 25 พีพีที (SM 25) ประกอบด้วย**

NaCl	20.24	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	4.04	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	2.91	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.98	กรัม
KCl	0.64	กรัม
$NaHCO_3$	0.32	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.06	กรัม
KH_2PO_4	0.04	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และปรับที่ pH7.4

4. อาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย (สูตรกากชานอ้อยต่อ SM 25 1:10)

ชั่งกากชานอ้อย 100 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 3000 มิลลิลิตร เติมน้ำทะเลเทียม 1000 มิลลิลิตร กวนและบีบกากชานอ้อยเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองกากชานอ้อยออกเก็บส่วนใสใส่ในขวดฝาเกลียว ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดปากขวดฝาเกลียว จากนั้นนำเข้าหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
การคำนวณ การวิเคราะห์และการนับจำนวนเซลล์ยีสต์

การคำนวณ การวิเคราะห์และการนับจำนวนเซลล์ยีสต์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid assay (Miller, 1959)

1.1 การเตรียมสารละลาย 0.1 % Dinitrosalicylic acid

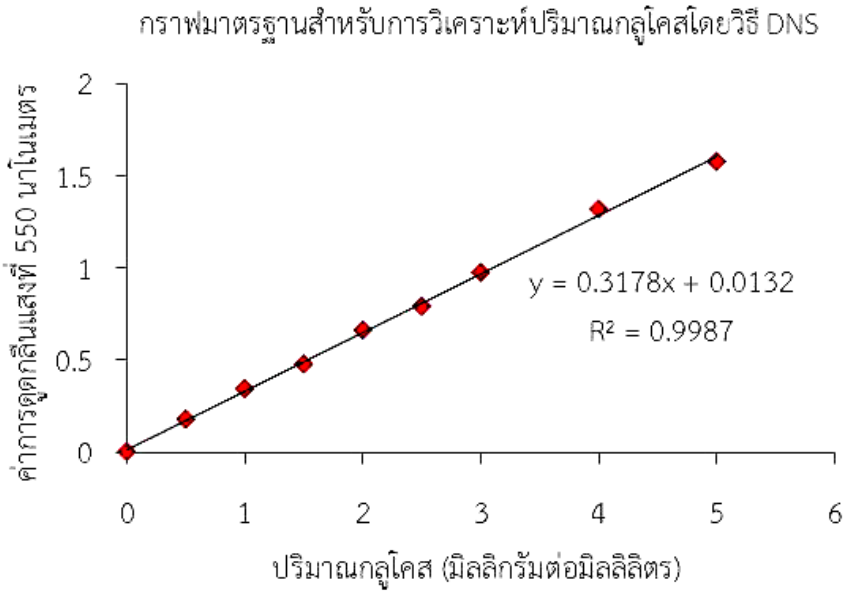
- การเตรียม 2M Sodium hydroxide: NaOH ชั่ง NaOH 20 กรัม ละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร
- ชั่ง 3, 5 - dinitrosalicylic acid: $C_7H_4N_2O_7$ 0.25 กรัม ละลายใน 2M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด
- ชั่ง Sodium potassium tartate: $KNaC_4H_4O_6$ $4H_2O$ .75 กรัม ละลายใน 2M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด

นำสารละลาย 3, 5 - dinitrosalicylic acid และ Sodium potassium tartate เทลงในขวดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 2M NaOH จนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.2 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

ปิเปตสารละลายกลูโคส (ตารางภาคผนวกที่ ข.1) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Dinitrosalicylic acid reagent 1 มิลลิลิตรลงในหลอด eppendorf ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ผลของกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS



ภาพภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.3 การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.) จากสมการ $y = 0.3178x + 0.0132$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง

x = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.) โดยนำค่า x ที่ได้คูณด้วยอัตราการเจือจางได้เป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารตัวอย่างในหน่วย (มก./มล.)

2. การคำนวณการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer

การคำนวณ ปริมาตร 1 ช่อง = 0.2 มม. x 0.2 มม. x 0.1 มม.

= 0.04 ตร.ม.

= 4×10^{-3} ลบ.ม.

ปริมาตร 1 ซีซี = 1 ลบ.ซม. = 10^{-3} ลบ.มม.

ปริมาตร 10^{-3} ลบ.มม. = 1 มล.

ปริมาตร 4×10^{-3} ลบ.มม. = $\frac{1 \times 4 \times 10^{-3}}{10^{3}}$

= 4×10^{-6} มล.

ปริมาตร 1 ช่อง = 4×10^{-6} มล.

เช่น ถ้านับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด 5 ช่องได้ 80 เซลล์

1 ช่อง = 80/5 = 16 เซลล์

1 ช่อง หรือ 4×10^{-6} มล. นับได้ 16 เซลล์

1 ช่อง หรือ 1 มล. นับได้ = $\frac{16 \times 1}{4 \times 10^{-6}} = 4 \times 10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น มีเซลล์จุลินทรีย์เท่ากับ 4×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. การคำนวณหาปริมาณความชื้น (Moisture)

ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง $D = (C - A) \times 100$

ร้อยละของน้ำหนักน้ำในตัวอย่างเปียก $E = (B \times 100) - D$

โดย A คือ น้ำหนัก Crucible เปล่า (ก่อนอบ)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างเปียก

C คือ น้ำหนักตัวอย่าง + น้ำหนัก Crucible เปล่า (หลังอบ)

D คือ ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง

E คือ ร้อยละของน้ำหนักน้ำในตัวอย่าง

ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = $100 - \frac{\{(\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}) \times 100\}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเปียก}}$

4. การคำนวณหาปริมาณไขมันรวม (Crude fat)

น้ำหนักไขมัน = (น้ำหนักไขมัน + น้ำหนัก flask) - น้ำหนัก flask เปล่า

ปริมาณไขมันทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = $\frac{\text{น้ำหนักไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(แห้ง)}} \times 100$

5. การจำแนกชนิดกรดไขมันและการคำนวณร้อยละกรดไขมัน

1) นำ Ret time ของกรดไขมันแต่ละชนิดของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ BS 6-2 ที่แสดงผลจากเครื่อง GC มาเปรียบเทียบกับ Ret time ของสารมาตรฐานที่เวลาเดียวกัน (ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ข. 3)

การคำนวนร้อยละกรดไขมัน = ASIN(SQRT(CELL/100))*180/PI()

หมายเหตุ : การคำนวณใช้ใน Microsoft Excel โดยกำหนดให้ CELL คือ Area ในกราฟโครมาโทแกรม

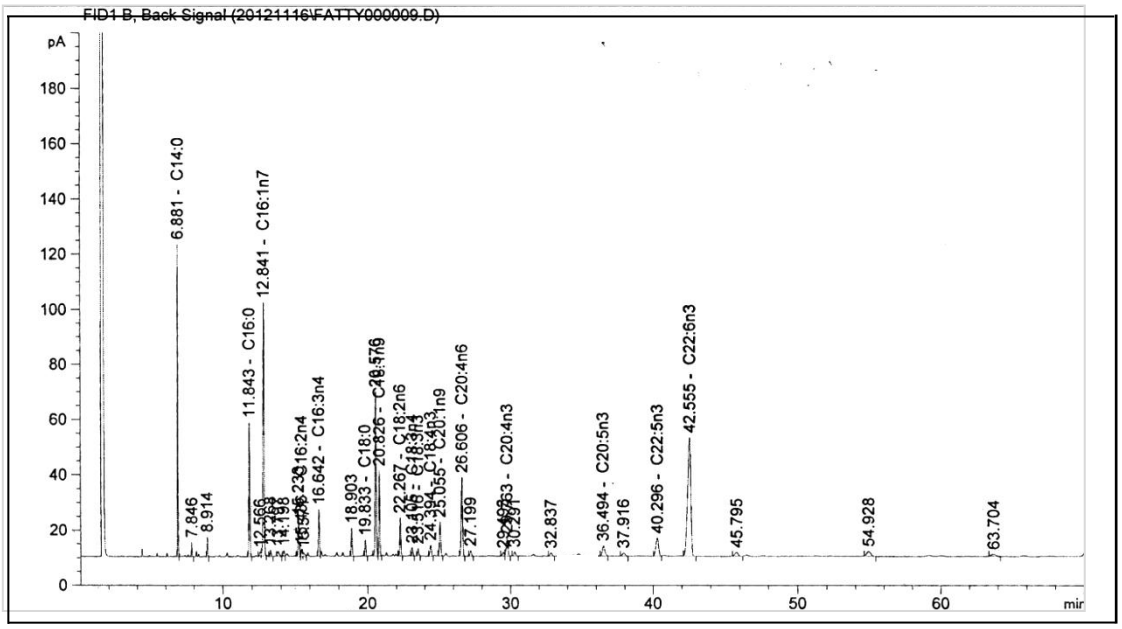
ที่มา : (Sokal and Rohlf, 1995)

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil ที่แสดงผลจากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

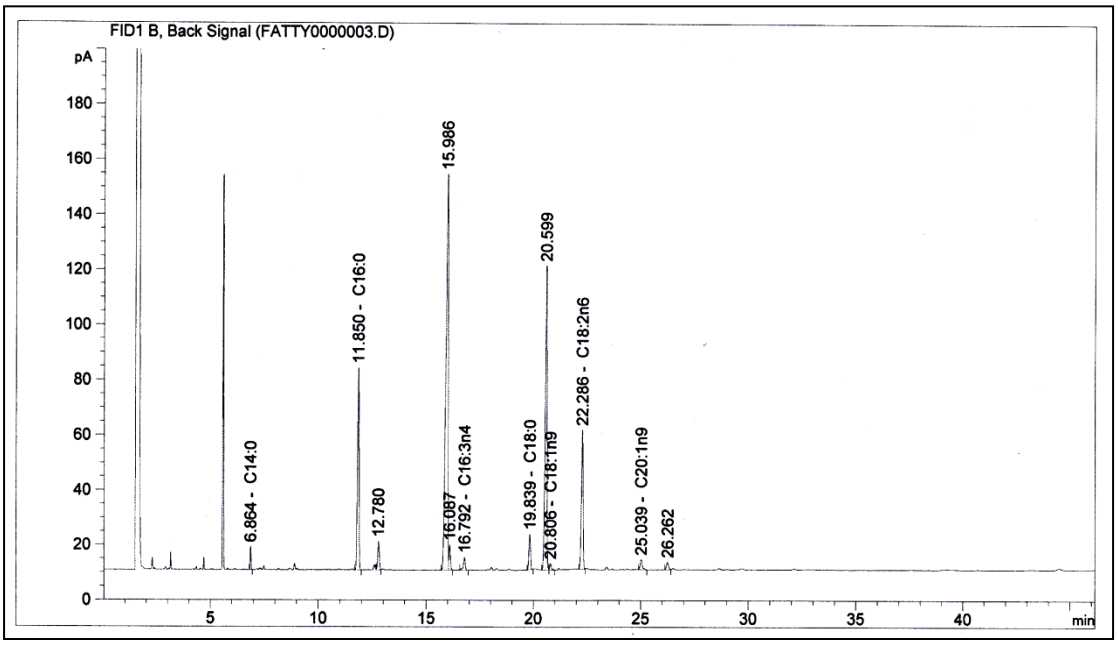
Ret Time	Area	Type	Width	Ret#	Amount%	Name
6.8	10.173	BV	0.042	1-R	0	C14:0
11.8	9.465	BB	0.072	1-R	0	C16:0
12.7	19.696	VB	0.073	1-R	0	C16:1n7
15.3	2.562	VV	0.087	1-R	0	C16:2n4
16.7	2.738	BV	0.075	1-R	0	C16:3n4
19.8	1.228	BB	0.072	1-R	0	C18:0
20.5	12.867	VV	0.078	1-R	0	C18:1n9
20.8	0.000	-	0.000	1-R	0	C18:1n7
22.2	2.645	BB	0.074	1-R	0	C18:2n6
23.1	0.522	BB	0.000	1-R	0	C18:3n4
23.6	0.459	BB	0.000	1-R	0	C18:3n3
24.5	0.863	BV	0.000	1-R	0	C18:4n3
25.0	2.757	BB	0.093	1-R	0	C20:1n9
26.5	5.246	BB	0.087	1-R	0	C20:4n6
29.7	2.336	VB	0.106	1-R	0	C20:4n3
36.5	1.286	BB	0.149	1-R	0	C20:5n3
40.3	2.185	BB	0.156	1-R	0	C22:5n3

ภาคผนวก ค
ตัวอย่างภาพโครมาโทรแกรมกรดไขมัน

ตัวอย่างภาพโครมาโทรแกรมกรดไขมัน



ภาพภาคผนวกที่ ค-1 โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil



ภาพภาคผนวกที่ ค-2 โครมาโทรแกรมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ BS 6-2 ที่ 72 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที

ภาคผนวก ง
ประวัติผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1.1 ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ~~นาย นาง~~ นางสาว สุพรรณี ลีโทชวลิต

(ภาษาอังกฤษ) ~~Mr, Mrs,~~ Miss Supannee Leethochavalit

1.2 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1020-01176-95-7

1.3 ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

1.4 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวกพร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail)

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี 20131

โทรศัพท์ 0-3839-1671-3 โทรสาร 0-3839-1674

E-mail: supannee@buu.ac.th; sp0217@yahoo.com; supannee17@hotmail.com

1.5 ประวัติการศึกษา ปร.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2547

1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

1.6.1 พาราสิตในปลาทะเลและหอย

1.6.2 การวินิจฉัยโรคพาราสิตและการรักษาโรคปลาทะเล

ประหยัด มะหมัด, **สุพรรณี ลีโทชวลิต** และสันติ เอี่ยนเหล็ง. (2538). การศึกษาชีววิทยาบางประการของเม่นทะเลหนามยาวบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา (ผู้ร่วมโครงการวิจัย)

วรรณภา กสิฤกษ์ และ**สุพรรณี ลีโทชวลิต.** (2533). การศึกษาโรคและพยาธิของปลาทะเลในบ่อเพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก. การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 กรุงเทพฯ น. 542-543. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

สุพรรณี ลีโทชวลิต (2533). การสำรวจพาราสิตในปลาเศรษฐกิจบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการ เพื่อเสนอผลงานวิจัยประจำปี 2533 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, กรุงเทพฯ น. 229-236. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

สุพรรณี ลีโทชวลิต, พรทิพย์ ศรีศร และทวี หอมชง. (2533). การศึกษาปรสิตในปลาเศรษฐกิจบางชนิดเก็บจากท่าเทียบเรือบ้านเพ จังหวัดระยอง. การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 กรุงเทพฯ. น. 540-541. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

สุพรรณี ลีโทชวลิต, วรรณภา กสิฤกษ์ และอดิสรณ์ มนต์วิเศษ. (มปป). การสำรวจพาราสิตในปลาเศรษฐกิจบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของไทย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน ชลบุรี. 232 น. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์ และ วีลยา แก่นจันทร์. (มปป). การปนเปื้อนของ *Cryptosporidium* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในหอยนางรมบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี. 99 หน้า.

สุพรรณี ลีโทชวลิต จันทร์จรัส วัฒนะโชติ วีลยา แก่นจันทร์ และอัญชลี ป้องเมือง. (2553). การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sargocentron rubrum*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิตจุดขาวน้ำเค็ม *Cryptocaryon irritans*. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล 2553. 28-30 มิถุนายน 2553. โรงแรมรอยัลภูเก็ตซิตี้ ภูเก็ต หน้า 351-357.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นันทิกา คงเจริญพร และนารีรัตน์ ฤทธิรุตม์. (2556). โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี. 124 หน้า.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, จารุนันท์ ประทุมยศ, ศรันยู คำเมือง และรักฤดี สารธิมา. (2557). การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี. 61 หน้า.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะ, จารุนันท์ ประทุมยศ และ**นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์**. (2558). การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี.60 หน้า.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ และ จารุนันท์ ประทุมยศ. (2559). การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยเซลล์ตรึงปรสิตโพรโทซัว (*Cryptocaryon irritans*). แก่นเกษตร. 44 (Suppl. 2): 779-787.

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, สุ**พรรณี ลีโทชวลิต**, นันทิกา คงเจริญพร และ นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์. (2559). การใช้สารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต Cryptocaryonirritans กระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว. แก่นเกษตร. 44 (Suppl.1) :662-668.

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, **สุพรรณี ลีโทชวลิต,** จารุนันท์ ประทุมยศ, มลฤดี สนธิ และ มะลิวัลย์ คุตะโค. การใช้เซลล์ตรึงยีสต์ทะเล *Pichia jadinii* เป็นสารเสริมอาหารในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว. แก่นเกษตร. 44 (Suppl. 2): 788-792.

จารุนันท์ ประทุมยศ, สุพรรณี ลีโทชวลิต, ณิษา ศิรนนท์ธนา, และ ศิริวรรณ ชูศรี. (2559). การศึกษาเบื้องต้นของคุณค่าทางอาหารของอาร์ทีเมียที่เสริมด้วยแพลงก์ตอนพืชและผลต่อการสืบพันธุ์ของปลาแมนดารินเขียว. (*Synchiropus splendidus* Herre, 1927). วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 21(2): 152-165.

Hormchong, T., Tangtongpairoj, J**., leethochavalit, S.,** Thongra-ar, W., and Dechsakulwatana, C. (1989). A study on marinepathogenic microbial organisms and parasites in the Thai Waters. The Fifth International Symposium on Microbial Ecology. Aug. 27 - Sept. 1, 1989. p.163 (ผู้ร่วมโครงการวิจัย)

Leethochavalit, S., Srivibool, R., Watanachote, J. and Mamat, P. (1997). A Collection of Pure Living Microorganism Cultures from the East Coast and the Upper Part of the Gulf of Thailand. Full research paper proposed to Burapha University. 72 p.

Leethochavalit, S. et al. (2003). Ribosomal RNA characterization of non-transcribed spacer and two internal transcribed spacers with 5.8S rRNA of *Perkinsus* sp. found in undulated surf clams (*Paphia undulata*) from Thailand. Journal of Shellfish Research 22: 431-434. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Leethochavalit, S. et al. (2004). Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clam *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. Diseases of Aquatic Organisms 60:165-171. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Leethochavalit, S. et al. (2004). The occurrence of *Perkinsus olseni* in undulated surf clam *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. 1st Korea-USA Workshop on Trend of Research on Shellfish: Diseases, Genetics, Physiology and Ecology. Oct. 3-6, 2004. p. 23. (หัวหน้าโครงการวิจัย)

Watanachote, **J., Leethochavalit,** S., Torchaisuwan, P. and Yamsakun, P. (2010). Antibacterial Proteins and Lectin in the Hemolymph of Oyster *(Saccostrea forskali*) which Culture Along the East Coast of Chonburi Rayong and Chanthaburi Provinces. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living. October 20-22 , 2010. Trang, Thailand.

Leethochaovalit, S.,Watanachote, J., Rittirut, N. and Kaenjan, W. (2010). Contamination of Parasitic*, Cryptosporidium* sp. in oyster along the east coast of Thailand. In Proceeding of the 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living. 20-22 October 2010, Trang, Thailand.

Leethochaovalit, S.,Watanachote, J. and Rittirut, N. (2011). Characterization of *Cryptocaryon s*p. isolated from marine fish in Thailand and in vitro treatment. In INOC-XI International Symposium 2011. 25-27 October 2011, Bogor Indonesia.

Watanachote, **J., Leethochavalit,** S. and Rittirut, N. (2011). Antibacterial proteins and agglutinin of the innate immune system from skin mucus of marine fishes in Thailand. In INOC-XI International Symposium 2011. 25-27 October 2011, Bogor Indonesia.

Kaewsalabnil, S. **Leethochavalit, S**., Watanachote, J., Komolpis, K., and Khongchareonporn, N. (2015). Production and characterization of monoclonal antibody against *Perkinsus olseni* in undulated surf clams *Paphia undulata*. Food and Applied Bioscience Journal, 2015, 3: 231-238.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ~~นาย นางสาว~~ นางจันทร์จรัส วัฒนะโชติ
(ภาษาอังกฤษ) ~~Mr, M~~iss Mrs. Janjarus Watanachote
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1005-02721-23-9
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (E-mail)

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 0-3839-1671-3 โทรสาร 0-3839-1674
E-mail : janjarus@bims.buu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

Ph.D. (Marine Science) Kasetsart University, February, 2008. Thesis title is antibacterial Activity of Lectins from Hemolymph of Banana Prawn (*Penaeus merguiensis* De Man).

M.S. (Chemistry) Chiang Mai University, October 18, 1993. Thesis title is enzymatic synthesis of oligosaccharides in aqueous two-phase system.

B.Ed. (Science-Chemistry) Srinakharinwirot University, March 3,1990

Training:

- Purification of Lectin from Cyanobacteria and Microalgae from Algal Bloom in Bangpakong Estuarine Area: August, 1 - September, 29, 1999. At Department of Marine Biochemistry School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Japan.
- A training workshop of the Ministry of Science and Technology (MOST) : International training workshop for marine biotechnology. September,8-24, 2008. At Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Qingdao, China.

6 . สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ ชีวเคมี, เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล

การจดอนุสิทธิบัตร

ได้รับอนุสิทธิบัตร “กรรมวิธีการเตรียมเลคติน (Lectin) จากปะการังอ่อน (*Sinularia erecta*) อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5990 เมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2554

การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์และ Proceeding

Panayong,J. and Tongkao, D. (1992). Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides in Different Types of Aqueous Two-Phase Systems. In Proceeding of the 8th NRCT, NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology, Bangkok, Thailand.

Tongkao, D. and **Panayong, J.** (1999). Oligosaccharide Synthesis by Transmannosidation in Aqueous Two-Phase Systems. In Proceeding of the 6th Federation of Asian and Oceanian Biochemists, Shanghai, China.

Panayong, J. and Tongkao, D. (1994). α-Mannosidase from Jack Beans and *Petriellidium* sp. AD-3S as a Catalyst in Oligosaccharide Synthesis. In Proceeding of the 11th Federation of Asian and Oceanian Biochemists, Bangkok, Thailand.

Watanachote, J. and Tongkao, D. (1995). Prospects of Concanavalin A Binding to Oligosaccharide Synthesis. in Proceeding of the 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Biochemis and Molecular Biologists, Sydney, Australia.

Srivilas, P. and **Watanachote, J.** (1997). Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Marine Animals from Chon Buri Province. In Proceeding of the 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, ChiangMai, Thailand.

Leethochavalit, S., Srivibool, R., **Watanachote, J.** and Mamat, P. (1997). A Collection of Pure Living Microorganism Cultures from the East Coast and the Upper Part of the Gulf of Thailand. Full research paper proposed to Burapha University. 72 p.

Srivilas, P. and **Watanachote, J.** (1998). Organochlorine Pesticide Residues in Some Economic Marine Molluses from the East Coast. Full research paper proposed to Burapha University. 49 p.

Watanachote, J. and Kamiya, H. (2000). Partial Purification of Lectin from Symbiotic Dinoflagellates in the Soft Coral *Sinularia lochmodes* by Affinty Chromatography. In Proceeding of the 26th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand.

Watanachote, J., Tunkijjanukij, S. and Dechsakulwatana, C. (2006). Biochemical properties of Lectin from Hemolymph of Banana Prawn (*Penaeus merguiensis*). In Proceeding of the 44th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand.

Watanachote, J., Dechsakulwatana, C. and Tunkijjanukij, S. (2008). Biological Properties of Lectins in Marine Sponge *Hytrios erecta.* The 8th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, November12-15, 2008, Bexco, Korea.

Watanachote, J., Dechsakulwatana, C. (2010). Agglutinating and Antibacterial Activities from Thai Marine Sponges *Callyspongia (Euplacella) jubini* and Its Associated Bacteria. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, October 12-15, 2010. Qingdao, China.

Watanachote, J., Leethochawalit, S., Torchaisuwan, P. and Yamsakun, P. (2010). Antibacterial Proteins and Lectin in the Hemolymph of Oyster *(Saccostrea forskali*) which Culture Along the East Coast of Chonburi Rayong and Chanthaburi Provinces. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living. October 20-22, 2010. Trang, Thailand.

Leethochawalit, S., **Watanachote, J.,** Rittirut, N. and Kaenjan, W. (2010). Contamination of Parasitic Protozoa*, Cryptosporidium* sp. in oyster along the east coast of Thailand. In Proceeding of the 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living. October 20-22 , 2010. Trang, Thailand.

Watanadilok, R., Srivilas, P., **Watanachote, J.** and Putchakarn, S. (2010). Bioactive substances and food supplements from marine sponges. The 13th International Symposium on Marine Natural Products. October, 17-22, 2010. Phuket, Thailand.

งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

Watanachote, J. and Noiraksa, T. (2001). Hemagglutinating Properties of Aqueous Extract from Phytoplakton *Oscillatoria* sp. Thaksin University J. 4: 64-70.

Watanachote, J., Noiraksa, T. and Tunkijjanukij, S. (2004) Characterization of Lectins from Marine Red Algae Genus *Gracilaria*. J.of Sci. Res. Chula. Univ. Section T: 324-331.

Watanachote, J., Ratanapo, S., Dechsakulwatana, C., Poompuang, S. and Tunkijjanukij, S. (2007). Partial purification of lectin from hemolymph of *Penaeus merguiensis* with antibacterial activity and bacterial clearance activity.

Journal of Science Technology and Humanities. Journal of Science, Technology, and Humanities. 5: 3-16.

Watanachote, J., Tunkijjanukij, S. and Dechsakulwatana, C. (2008). Antibacterial proteins in the serum hemolymph and hemocyte lysate of the banana prawn *Penaeus merguiensis*. Journal of Science Technology and Humanities. 6: 5-17.

Watanachote, J., Maywarin Chaichareon and Tunkijjanukij, S. (2008). Biological properties of lectins in marine sponges from Chonburi province. Thailand. Journal of Science, Technology, and Humanities. 6: 99-107.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ~~นาย นาง~~ นางสาวจารุนันท์ ประทุมยศ
   (ภาษาอังกฤษ) ~~Mr, Mrs,~~ Miss Jarunan Pratoomyo
2. เลขที่บัตรประชาชน 3100900916170
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์เล็กทรอนิกส์

   สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี 20131
   โทรศัพท์ 0-3839-1671-3 โทรสาร 0-3839-1674
   E-mail address: jarunan@bims.buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
   - ว.ทบ.(เทคโนโลยีการผลิตสัตว์) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง 2533
   - M.Sc. (Aquaculture) Asian Institute of Technology 2541
   - Ph.D. (Fish nutrition) University of Stirling, Scotland, 2553
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   - การเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเล

ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

จารุนันท์ ประทุมยศ ธิดารัตน์ น้อยรักษา จิตรา ตีระเมธี และ ประพันธ์ สุวรรณเรือง. (2543). การอนุบาลกุ้งมดแดง (*Rhynchocinestes uritei*) เบื้องต้น. วารสารมหาวิทยาทักษิณ 3 (2) ก.ค - ธ.ค 22-27

จารุนันท์ ประทุมยศ ธิดารัตน์ น้อยรักษา จิตรา ตีระเมธี และ ประพันธ์ สุวรรณเรือง. (2544). การอนุบาลลูกกุ้งมดแดง (*Rhynchocinesstes uritei*) ด้วยโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) และแพลงก์ตอนพืช 3 ชนิด. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 4 (1-2) ม.ค-ธ.ค 23-29

จิตรา ตีระเมธี พัฒนา ภูลเปี่ยม ธิดารัตน์ น้อยรักษา และ **จารุนันท์ ประทุมยศ.** (2544). ผลการอนุบาลม้าน้ำวัยอ่อนสายพันธุ์ *Hippocampus kuda* ด้วยแพลงก์ตอนพืชแตกต่างกัน 3 ชนิด. วารสารการประมง 54 (5) ก.ย-ต.ค 395-399

จารุนันท์ ประทุมยศ และ ปิยะวรรณ ศรีวิลาศ. (2549). ประสิทธิภาพการย่อยอาหารของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*). วารสารการประมง 59(1) มกราคม-กุมภาพันธ์ 67-74

Muthuwan, V., Sawatpeera, S., kuandee, P., Supapanyapong, C., **Pratoomyot, J.,** Pinkaew, K. and Chaladkid, S. (2000). Intensive Culture of Seabass (*Lates calcalifer*) in a Recirculation System Integrated with Extensive Culture of Biofiltration Organisms. Proceedings of the 5th international Symposium, Marine Environmental Study on the East China Sea and Yellow Sea, Cheju National University, Korea. Nov. 89-110.

Pratoomyot, J., Srivilas, P. And Noiraksar, T. (2005). Fatty acid composition of 10 microalgal species. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 27 (6) Nov-Dec. 1179-1187

Pratoomyot, J., Bendiksen, E. Å., Bell, J. G. And Tocher, D. R. (2008). Comparison of effects of vegetable oils blended with southern hemisphere fish oil and decontaminated northern hemisphere fish oil on growth performance, composition and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 280, 170-178.

Bell, J. G., Sprague, M., Bendiksen, E. Å, Dick, J. R., Strachan, F., **Pratoomyot, J.,** Berntssen, M. H. G. and Tocher, D. R. (2008). Using decontaminanted fish oil or a vegetable/ fish oil blend to reduce organic contaminant concentrations in diets and flesh of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Organohalogen Compounds, 70, 894-897.

Sprague, M., Bendiksen, E. Å, Dick, J. R., Strachan, F., **Pratoomyot, J.,** Berntssen, M. H. G. Tocher, D.R. and Bell. J. G. (2010). Effects of decontaminated fish oil or a fish and vegetable oil blend on persistent organic pollutant and fatty acid compositions in diet and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*). British Journal of Nutrition, 103, 1442-1451.

Pratoomyot, J., Bendiksen, E. Å., Bell, J. G. And Tocher, D. R. (2010). Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 305, 124-132

Bell, J. G., **Pratoomyot, J.,** Strachan, F. Henderson, J. R., Fontanillas, R., hebard, A., Guy, D. R., Hunter, D. and Tocher, D. R. (2010). Influence of genotype/phenotype on effects of replacement of dietary fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*) families/strains selected on the basis of flesh adiposity: growth, flesh proximate and fatty acid compositions. Aquaculture, 306, 225-232

Pratoomyot, J., Bendiksen, E. Å., Bell, J. G. And Tocher, D. R. (2011). Effects of different blends of alternative protein sources as alternatives to dietary fishmeal on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. 316, 44-52.

Morais, S., **Pratoomyot, J.,** Torstensen, B., Taggart, J., Guy, D., Bell, J. G. and Tocher, D.R. (2011). Diet× genotype interactions in hepatic cholesterol and lipoprotein metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to rreplacement of dietary fish oil with vegetable oil. British Journal of Nutrition. Published on line 03 June 2011.

ภาคผนวก จ

Out put

Output

การถ่ายทอดองค์ความรู้และการนำผลงานไปเผยแพร่

ทางโครงการได้ถ่ายทอดองค์ความรู้แก่นิสิตนักศึกษาที่สนใจ และได้ใช้องค์ความรู้จากการศึกษา ครั้งนี้ในการทำปัญหาพิเศษ ได้ผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่ และบุคลากรที่อยู่ในโครงการได้เป็นที่ ดังนี้

สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) ปีการศึกษา 2556

53030671 นางสาวสวพัศ มุ่งแฝงกลาง; 53031306 นางสาวสรารัศมิ์ วสุชัยวัส

เรื่อง การศึกษาคุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Pichia* sp.

A study on gross nutritive content and fatty acid composition of the yeast *Pichia* sp.

อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ;

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อาจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

จำนวน 56 หน้า

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่ายีสต์มีการเจริญสูงสุดในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 4.52×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารพบว่ายีสต์มีปริมาณความชื้นร้อยละ 66 ± 0.22 ปริมาณโปรตีนหยาบร้อยละ 41.69 ± 0.61 เถ้าร้อยละ 2.29 ± 0.04 และไขมันร้อยละ 0.22 เมื่อวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันในยีสต์ พบกรดปาล์มิติกสูงที่สุดร้อยละ 24.48±1.10 รองลงมาคือกรดไลโนเลอิกร้อยละ 18.13±1.00 และกรดโอเลอิกร้อยละ 17.97±0.93 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในตัวอย่างยีสต์ พบปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด 6.91 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยมีกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบมากที่สุด 4.62 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนมีปริมาณ 12.75 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยมีกรดไลโนเลอิกเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 10.19 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวพบกรดไขมันโอเลอิกเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด 3.35 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ในการตรึงเซลล์ยีสต์พบว่าโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 มีความเหมาะสมมากที่สุด

สาขาวิชา: เทคโนโลยีทางทะเล; วท.บ. (เทคโนโลยีชีทางทะเล) ปีการศึกษา 2558
55330112: นางสาวภัคพร รุ่งเรือง
เรื่อง การตอบสนองของสารในระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างกัน 3 สูตร
The immune response of sea bass fed three difference formulas.
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ;
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อาจารย์ ดร. มลฤดี สนธิ และ ผ.ศ. ดร. มะลิวัลย์ คุตะโค
จำนวน 84 หน้า

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของอาหารสูตรยีสต์ผสมแคลเซียมอัลจิเนตต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อปรสิตของปลา ทำการทดลองโดยเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังด้วยอาหาร 3 สูตรคือ สูตรควบคุม สูตรแคลเซียมอัลจิเนต และสูตรยีสต์ผสมแคลเซียมอัลจิเนต โดยปลาจะได้รับอาหาร 0.6 กรัมอาหาร/ 1 กรัมของน้ำหนักตัว ให้อาหารปลาวันละ 1 มื้อ ตามกลุ่มการทดลอง และให้อาหารปลาต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการย้ายปลาจากกระชังในแต่ละกลุ่มทดลองลงในถัง เพื่อให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิต *Cryptocaryon irritans* ระยะธีรอนต์จำนวน 15,000 ตัวต่อปลา 1 ตัว จากผลการทดลองพบว่าระดับแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารสูตรยีสต์ผสมแคลเซียมอัลจิเนตเพิ่มขึ้น และมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนปริมาณไลโซไซม์ของปลาที่ได้รับอาหารสูตรยีสต์ผสมแคลเซียมอัลจิเนตมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรแคลเซียมอัลจิเนต และจากการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือดปลาด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าปลาที่ได้รับอาหารทุกสูตรทดลองปรากฏแถบโปรตีนของ Immunoglobulin M ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 76 kDa (IgM, heavy chain) และ 24 kDa (IgM, light chain) รวมทั้งพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 13 และ 12 kDa นอกจากนี้ปลาที่ได้รับอาหารสูตรยีสต์ผสมแคลเซียมอัลจิเนตมีอัตรารอด สูงที่สุด (90%) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาสูตรควบคุม (0%) และสูตรแคลเซียมอัลจิเนต (0%) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารปลาสูตรยีสต์ผสมแคลเซียมอัลจิเนต สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา และส่งผลให้ปลามีความต้านทานต่อเชื้อปรสิต *C. irritans* ได้

การนำเสนอผลงานในรูปแบบการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (ฐานข้อมูล TCI)

ในการประชุม การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5 เรื่อง การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยเซลล์ตรึงปรสิตโพรโทซัว (*Cryptocaryon irritans*)
โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น ราชา ออคิด หน้า 779-786

KHON KAEN AGR. J. 44 SUPPL. 2 : (2016) 779

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยเซลล์ตรึงปรสิตโพรโทซัว (*Cryptocaryon irritans*)

Use of encapsulated immobilized parasitic protozoa (*Cryptocaryon irritans*) to induce immune response in clownfish (*Amphiprion ocellaris*)

สุพรรณี ลีโทชวลิต[1*], จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1], และ จารุนันท์ ประทุมยศ[1],

Supannee Leethochavalit[1*], Janjarus Watanachote[1], and Jarunan Pratoomyot[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของอาหารเซลล์ตรึงปรสิต *Cryptocaryon irritans* ระยะธีรอนต์ต่อระบบภูมิคุ้มกันและอัตรารอดของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) ต่อโรคจุดขาวน้ำเค็ม (Marine white spot disease) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมและอาหารชุดควบคุมที่ผสมแคลเซียมอัลจิเนต โดยให้ปลากินอาหารแต่ละสูตร 2 สัปดาห์ และกินอาหารสูตรควบคุม ต่อไปอีก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดนำปลาแต่ละสูตรมาแผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะธีรอนต์ จำนวน 1,500 เซลล์ต่อปลา 1 ตัว จากการศึกษาระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาด้วยเทคนิค ELISA ระหว่างการทดลองและการเผชิญเชื้อ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเซลล์ตรึงปรสิตมีระดับแอนติบอดีในซีรั่มสูงกว่าอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่อัตราการรอดตายไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ชุดการทดลอง

คำสำคัญ: โพรโทซัวโรคจุดขาวน้ำเค็ม, การตรึงเซลล์, ภูมิคุ้มกัน, ปลาการ์ตูนส้มขาว

ABSTRACT: This study was to compare the effect of encapsulated immobilized *Cryptocaryon irritans* at theront stage, with control diet and a mixture of the control diet and calcium alginate on immune response and survival rate of clownfish (*Amphiprion ocellaris*) against marine white spot disease. Each group of the fish was fed on their specified experimental diet for two weeks and switched to the control diet for another two weeks. At the end of the experiment, the fish from each treatment group were moved to the tank and challenged with live theronts of *C. irritans* at a dose of 1,500 theronts $fish^{-1}$. We determined specific antibody levels of the immunized fish serum by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the levels of serum antibody in the fish fed with the immobilized parasite diet were significantly

1 [1]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี

[1] Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, Thailand

* Corresponding author: supannee@buu.ac.th

higher than those in the fish fed with the control ($P < 0.05$). Survival rate of vaccinated treatment were not significantly different from other treatments.

Keywords: *Cryptocaryon irritans*, encapsulation, immune response, *Amphiprion irritans*

บทนำ

โรคจุดขาวน้ำเค็มเกิดจากปรสิตโพรโทซัว *Cryptocaryon irritans* พบได้ในปลาทะเลทุกชนิดทั้งในธรรมชาติและปลาเลี้ยง (Diggles and Lester, 1996) ก่อให้เกิดความเสียหายทางธุรกิจได้อย่างมาก ปัจจุบันมีหลายประเทศที่พยายามผลิตวัคซีนป้องกันโรคนี้ ได้แก่ ประเทศจีน ไต้หวันและสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (Yambot and Song, 2006; Luo et al., 2007; Misumi et al., 2011; Dan et al., 2013; Josepriya et al., 2015) ประเทศที่กล่าวมานี้มีการเลี้ยงปลาเศรษฐกิจเพื่อนำไปบริโภคเป็นส่วนมาก ดังนั้นการใช้สารเคมีเพื่อรักษาโรคอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันโรคจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะนำมาใช้เพื่อความปลอดภัยและลดความเสี่ยงในการเกิดโรคนี้ รูปแบบการให้วัคซีนแก่ปลานั้นมีหลายวิธีที่ได้ผลดี เช่น การฉีด แช่และกิน เป็นต้น แต่สำหรับปลาสวยงามน้ำเค็มนั้นมีขนาดเล็ก การนำวัคซีนมาฉีดหรือหยอดโดยตรงอาจก่อให้เกิดความบอบช้ำได้ง่าย ดังนั้นวิธีการให้วัคซีนจึงต้องแตกต่างไป ซึ่งปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีการตรึงเซลล์ (Microencapsulation) มาใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การตรึงจุลินทรีย์ต่างๆ สารเพิ่มสี วิตะมิน และเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น (Yúfera et al., 2010; Dey et al., 2015) เทคนิคนี้สามารถควบคุมการทำงานของสารให้มีการปลดปล่อยสารที่ต้องการในบริเวณที่เหมาะสมเพื่อลดความสิ้นเปลืองและได้ประโยชน์สูงสุด (เอกลักษณ์, 2552) วิธีการนี้เหมาะสมกับการนำมาใช้ในลูกปลาและปลาสวยงามที่มีขนาดเล็กซึ่งตลอดช่วงระยะเวลาในการเลี้ยงต้องระมัดระวังการเกิดโรคจุดขาวน้ำเค็มที่จะก่อให้เกิดอัตราการตายสูง จึงจำเป็นที่จะต้องมีการเสริมภูมิคุ้มกันขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบอาหารที่มีเซลล์ตรึงปรสิตโพรโทซัว *C. irritans* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และอาหารชุดอื่นที่ไม่มีการเสริมด้วยปรสิตโพรโทซัว ต่อระบบภูมิคุ้มกันและอัตราการรอดของปลาการ์ตูนส้มขาว

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างปรสิตโพรโทซัว *C. irritans* จากปลากะพงขาวที่เป็นโรคจุดขาวน้ำเค็ม แล้วทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมปลอดเชื้อ SM 30 (Oestman and Lewis, 1995) ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งปรสิตฟักออกเป็นตัวอ่อนระยะธีรอนต์ (theront) แช่ธีรอนต์ใน 10 % บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างปรสิตให้สะอาดด้วย 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการปั่นเหวี่ยง จำนวน 3 ครั้ง นำปรสิตที่ได้เก็บที่

อุณหภูมิ – 40 °C ก่อนนำมาใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ต่อไป

การวิเคราะห์หาโปรตีนรวมทำโดยวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนใช้วิธีของเจลดาลห์ (Kjeldahi method, AOAC, 2000. American Society of Analytical Chemistry and Preparation Methods. 999.10) วิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยเทคนิค Soxhlet extraction (AOAC, 2000) วิเคราะห์หาความชื้นและเถ้า (AOAC, 2000) เพื่อคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

การเตรียมอาหารเสริมสำหรับปลาการ์ตูนโดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ปรสิตโพรโทซัวด้วยแคลเซียมอัลจิเนต นำเซลล์ปรสิตระยะธีรอนต์ประมาณ 25,000 เซลล์ ผสมกับโซเดียมอัลจิเนต เพื่อเตรียมเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อให้เม็ดเจลคงตัว นำเม็ดเจลมาเตรียมอาหารเสริมสำหรับปลาการ์ตูน โดยผสมกับวัตถุดิบของอาหารปลาพื้นฐาน โดยให้มีโปรตีนประมาณ 49 - 51 % ไขมัน 12 - 13% คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ 15 - 17 % และมีความชื้น 6 - 7% ทำการเตรียมอาหารเป็น 3 สูตร โดยมีส่วนผสมในแต่ละชุดการทดลองดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 วัตถุดิบอาหารพื้นฐานเป็นชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 วัตถุดิบอาหารพื้นฐานเหมือนชุดควบคุมเสริมด้วยจิเนต และชุดการทดลองที่ 3 วัตถุดิบอาหารพื้นฐานเสริมด้วยเซลล์ปรสิต ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแล้ว เป็นชุดทดสอบ

การทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยใช้ปลาการ์ตูนส้มขาว น้ำหนักเฉลี่ย 1.18 ± 0.22 ก. แบ่งปลาลงเลี้ยงในกระชังขนาด 50 x 50 x 60 ซ.ม. ในถังไฟเบอร์ขนาด 2.2 x 2.5 x 1.8 ม. พร้อมระบบกรองแบบปิด กระชังละ 40 ตัว ทั้งหมด 9 กระชัง ทดลองให้ปลาการ์ตูนกินอาหารทั้ง 3 ชุดการทดลอง ทุกวัน วันละ 3 % ต่อน้ำหนักตัว เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และให้ปลากินอาหารชุดควบคุมอีก 2 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลาการ์ตูน จำนวน 4 ตัว/กระชัง เพื่อเจาะเลือดทั้งก่อนเริ่มให้กินอาหารที่สัปดาห์ที่ 2 และ 4 ระหว่างการทดลองทำการตรวจวิเคราะห์น้ำทุกสัปดาห์

การตรวจวัดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากปลาในแต่ละชุดการทดลองกระชังละ 4 ตัว ทั้งก่อนให้อาหารทดลอง และหลังจากให้อาหารที่มีเซลล์ตรึงปรสิตแล้ว 2 สัปดาห์ หลังจากให้อาหารชุดควบคุมจนครบสัปดาห์ที่ 4 เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *C. irritans* ด้วยเทคนิค ELISA โดยเคลือบเพลทด้วยปรสิตระยะธีรอนต์เชื้อตาย จำนวน 200 ตัวต่อหลุม ใช้แอนติบอดีตัวที่ 1 เป็นซีรัมของปลาการ์ตูนที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร อัตราส่วน 1:100 แอนติบอดีตัวที่ 2 เป็นแอนติบอดีของหนูเมาส์ที่จำเพาะต่อ IgM ปลาในอัตราส่วน 1:12,000 (Mouse anti fished 1:12,000) แอนติบอดีตัวที่ 3 เป็นแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อหนูเมาส์ในเอนไซม์ฮอสราดิสเปอร์ออกซิเดส อัตราส่วน 1:5,000 (Goat anti mouse horse-radish peroxidase conjugated 1:5,000) วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (สุพรรณี และคณะ, 2554)

การทดสอบความต้านทานโรค (Challenge Test) เมื่อครบ 4 สัปดาห์ สุ่มปลาการ์ตูนแต่ละกระชัง ขึ้นมาเลี้ยงในตู้กระจกความจุปริมาตร 40 ลิตร จำนวน 30 ตัว/ตู้ ทำการใส่ปรสิต *C. irritans* มีชีวิตระยะธีรอนต์ ปริมาณ 1,500 เซลล์/ตัว สังเกตอาการของโรค เป็นเวลา 14 วัน ตรวจนับจำนวนปลาที่ตายระหว่างการทดลองเผชิญเชื้อ เพื่อหาอัตราการรอด (%) ในแต่ละตู้ สุ่มปลาเพื่อทำการเจาะเลือดขณะเผชิญเชื้อครบ 1 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ตรวจนับจำนวนปลาที่ตายระหว่างการทดลองเผชิญเชื้อ เพื่อหาอัตราการรอด (%) ในแต่ละชุดการทดลองจนครบ 2 สัปดาห์ เพื่อนำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในการทดสอบความต้านทานโรคมาหาค่า Relative Percent Survival (RPS) ตามวิธีของ Amend (1981) นำข้อมูลแอนติบอดีไตเตอร์และอัตราการรอด ของแต่ละชุดการทดลองมาเปรียบเทียบหาความแตกต่างด้วยวิธีวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

ผลของแอนติบอดี้ไตเตอร์ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้จากการตรวจวัดที่สัปดาห์ต่างๆ พบว่าปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มปลาการ์ตูนที่กินอาหารเซลล์ตรึงปรสิต *C. irritans* เป็นองค์ประกอบครบ 14 วัน สามารถตรวจวัดระดับของแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าปริมาณแอนติบอดีในซีรั่มปลาการ์ตูนชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยของแอนติบอดีไตเตอร์เป็น 0.312 ± 0.02 หลังจากนั้นปลาทุกชุดการทดลองจะได้กินอาหารชุดควบคุมต่อจนครบสัปดาห์ที่ 4 ค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มของปลาการ์ตูนทุกชุดจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำปลาทุกชุดการทดลองมาเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะธีรอนต์ จำนวน 1,500 เซลล์/ตัว พบว่าหลังการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ปลาชุดการทดลองที่ 3 มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าเฉลี่ย 0.693 ± 0.21 เมื่อเผชิญเชื้อต่อไปจนครบ 14 วัน ปลาชุดการทดลองที่ 3 ยังมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุด และมีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.388 ± 0.01 ดังแสดงใน **Table 1**

ผลของอาหารเซลล์ตรึงปรสิตต่ออัตราการรอดตายของปลาการ์ตูนส้มขาวหลังจากสิ้นสุดการทดลอง จากการทดลองอาหารทั้ง 3 ชุดการทดลอง พบว่าอัตราการรอดของปลาการ์ตูนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะพบว่าค่า Relative percent survival ของปลาชุดการทดลองที่ 3 ที่ให้กินอาหารเซลล์ตรึงปรสิต มี ค่า RPS 100 % (**Table 2**)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ค่าพารามิเตอร์ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ตลอดการเลี้ยงปลาในกระชัง พบว่าอุณหภูมิน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 28 – 30 °C ค่าความเค็มน้ำอยู่ในช่วง 30

- 34 ppt. ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าอยู่ในช่วง 7.7 - 7.9 ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำอยู่ในช่วง 5.5 - 6 มก./ล. ค่าความเป็นด่างของน้ำอยู่ในช่วง 91 - 100 มก./ล. ปริมาณแอมโมเนียรวมมีค่า 0.004 - 0.067 มก./ล. และปริมาณไนไตรท์มีค่า 0.004 - 0.104 มก./ล.

Table 1 Mean antibody titer in serum of clownfish vaccinated with *Cryptocaryon irritans* vaccine administered by feed additive inclusion via encapsulation technique (± S.D.).

Time	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Week 0	0*	0*	0*
Week 2	0.207 ± 0.01	0.188 ± 0.02	0.312 ± 0.02*
Week 4	0.259 ± 0.02	0.370 ± 0.03*	0.310 ± 0.04
Week 5	0.166 ± 0.02	0.153 ± 0.00	0.693 ± 0.21*
Week 6	0.243 ± 0.01	0.356 ± 0.01	0.388 ± 0.01*

Note: Significant difference is indicated by star superscript letter in the same row

Treatment 1: Fish immunized by basic diet

Treatment 2: Fish immunized by control diet + calcium alginate

Treatment 3: Fish immunized by control diet + *C. irritans* theront

Table 2 Survival rate (%) and RPS of clownfish after challenged with *Cryptocaryon irritans*

Treatment	Survival rate (%)	Relative Percent Survival (RPS)
Treatment 1	93 ± 6.67	0
Treatment 2	97 ± 3.33	0
Treatment 3	100 ± 0.00	100

วิจารณ์

ผลการเสริมปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ด้วยเทคนิคการตรึงกับแคลเซียมแอลจีเนต เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาการ์ตูนส้มขาว ซึ่งเทคนิคนี้มีนักวิจัยนำมาใช้เพื่อลำเลียงสารหรือวัคซีนที่ต้องการสู่สัตว์น้ำไปยังเป้าหมายที่ต้องการเพื่อให้ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพ (Skjermo et. al., 1995; Harikrishnan et. al., 2012; Ruyra et. al., 2014) โดย Ballesteros et. al. (2015) สรุปว่าผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรค haematopoietic necrosis virus (IHNV)ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) จะ

เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปลากินอาหารเซลล์ตรึง DNA (pIRF1A-G) กับแคลเซียมอัลจิเนต จากผลการวิจัยการตรึงปรสิตระยะธีรอนต์ร่วมกับอาหารพื้นฐานเพื่อตรวจสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา ผลการทดลองพบว่าอาหารที่มีเซลล์ตรึง *C. irritans* สามารถกระตุ้นให้ปลาสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อปรสิตสูงขึ้นได้เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุมและชุดการทดลองที่ 1 เมื่อปลากินอาหารครบ 2 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hatanaka et.al. (2007) ที่พบระดับของแอนติบอดีในซีรั่มปลาปักเป้าเสือ (*Takifigu ruburipes*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และระดับของแอนติบอดีของปลาจะคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่กินอาหารชุดควบคุมต่อจนครบสัปดาห์ที่ 4 และในระหว่างเผชิญเชื้อระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของปลาชุดการทดลอง 3 เพิ่มขึ้นสูงสุด ที่ 0.693 ± 0.21 แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้นสัปดาห์ที่ 6 ระดับแอนติบอดีของปลาการ์ตูนชุดการทดลองนี้ เริ่มลดลงจนไม่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Lou et al. (2007) ที่กล่าวว่าแอนติบอดีของปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ที่ได้รับการฉีดวัคซีน *C. irritans* มีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1, 2 และจะเพิ่มสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 4 - 6 และแอนติบอดีไตเตอร์จะยังคงที่อยู่จนถึง สัปดาห์ที่ 8 ซึ่งกลไกการจดจำต่อสิ่งแปลกปลอมนี้ก่อให้เกิดการป้องกันการติดโรคจุดขาวน้ำเค็มได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังขัดแย้งกับรายงานของสุพรรณี และคณะ (2553) พบว่าปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sargocentron rubrum*) ที่ได้รับการฉีดเชื้อตาย *C. irritans* มีระดับแอนติบอดีสูงสุดสัปดาห์ที่ 7 จากรายงานของจันทร์จรัส และคณะ (2559) ที่รายงานการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวด้วยวิธี ELISA พบว่าปลามีการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเมมเบรนโปรตีนของปรสิต *C. irritans* มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 8 และจากรายงานของ Bai et. al. (2008) ได้ศึกษาระดับของแอนติบอดีและกลไกการต้านทานโรคของปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ต่อโรคจุดขาวน้ำเค็มที่ได้รับการฉีดปรสิต *C. irritans* พบว่าปลาสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองครั้งนี้เป็นการให้วัคซีนแบบเซลล์ตรึงผ่านการกิน ทำให้ระดับของแอนติเจนไม่เพิ่มสูงมาก จากรายงานของ Borgogna et. al. (2011) กล่าวว่าวัคซีนแบบให้กินนั้นจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้น้อยกว่าการฉีด แต่มีข้อดีคือไม่ก่อให้เกิดความเครียด ไม่มีผลข้างเคียงและสามารถใช้ได้กับปลาทุกขนาด

สำหรับอัตราการรอดของปลาแต่ละชุดการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่ง Dan et. al. (2013) กล่าวว่าความสามารถในการป้องกันโรคของปลาขึ้นอยู่กับปริมาณของวัคซีนที่ได้รับ เมื่อประเมินค่า RPS ของชุดการทดลองที่ 3 พบว่ามีค่าสูงถึง 100 % สอดคล้องกับรายงานของสุพรรณี และคณะ (2553) พบว่าปลาข้าวเม่าน้ำลึกที่ฉีดด้วยธีรอนต์เชื้อตายมีอัตราการรอดสูง

100 % จากการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่าอาหารที่มีเซลล์ตรึง *C. irritans* นี้มีประสิทธิภาพสูง สอดคล้องกับรายงานของ Eillis (1988) ที่กล่าวว่าประสิทธิภาพของวัคซีนต่อการป้องกันโรคต่างๆ ควรมีค่าสูงกว่า 60 % ขึ้นไป

สรุป

การให้วัคซีนเซลล์ตรึงปรสิต *C. irritans* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันปลาการ์ตูนได้ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ได้ตั้งแต่ 2 สัปดาห์ที่เริ่มการให้กินและมีค่าเฉลี่ยสูงสุดสัปดาห์ที่ 5 ขณะเผชิญเชื้อได้ 7 วัน แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ผลการทดลองการเผชิญเชื้อ *C. irritans* ไม่พบว่าอัตราการรอดของปลาการ์ตูนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจต้องมีการเพิ่มระยะเวลาหรือปรับวิธีการให้อาหารที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้เพิ่มมากขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2558 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, สุพรรณี ลีโทชวลิต, นันทิกา คงเจริญพร, และนารีรัตน์ ฤทธิรุตม์. 2559. การใช้สารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* กระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว. แก่นเกษตร. 44 (ฉบับพิเศษ 1): 662-668.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, วีลยา แก่นจันทร์, และอัญชลี ป้องเมือง. 2553. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาข้าวเม่าน้ำลึก (*Sargocentron rubrum*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิตจุดขาวน้ำเค็ม *Cryptocaryon irritans*. น. 351-357. ใน: การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล 2553 เรื่องความหลากหลายทางชีวภาพทะเลไทย: อุปสรรคและโอกาส 28-30 มิถุนายน 2553. โรงแรมรอยัลภูเก็ตซิตี้ จังหวัดภูเก็ต.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์, วีลยา แก่นจันทร์, และนันทิกา คงเจริญพร. 2554. การศึกษาโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากโปรโตซัว *Cryptocaryon* sp. ในปลาทะเลในประเทศไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. 2552. Microencapsulation: เทคโนโลยีจิ๋ว แต่แจ๋ว. Tech. Prom. Mag. 36: 39-42.

Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. Dev. Biol. Stand. 49: 447 – 454.

Bai, J.-S., M.-Q. Xie, X.-Q. Zhu, X.-M. Dan, and A.-X. Li. 2008. Comparative studies on the immunogenicity of theronts, tomonts

and trophonts of Cryptocaryon irritans in grouper. Parasitol. Res. 102: 307–313.

Ballesteros, N. A., M. Alonso, S. R. Saint-Jean, and S. I. Perez-Prieto. 2015. An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorrhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 45: 877-888.

Borgogna, M., B. Bellich, and A. Cesaro. 2011. Marine polysaccharides in microencapsulation and application to aquaculture: "from sea to sea". Mar. Drugs. 9: 2572–2604.

Dan, X.- M., T.- W. Zhang, Y.- W. Li, and A.–X. Li. 2013. Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine. Fish Shellfish Immunol. 34: 885-891.

Dey, A., K. Ghosh, and N. Hazra. 2015. An Overview on bioencapsulation of live food organisms with probiotics for better growth and survival of freshwater fish juveniles. Int. J. Res. Fish. Aquac. 5: 74-83.

Diggles, B.J., and J.G. Lester. 1996. Influence of temperature and host species on the development of *Cryptocaryon irritans*. J. Parasitol. 82: 45-51.

Ellis, A.E. 1988. Fish Vaccination. Academic Press. London.

Harikrishnan, R., C. Balasundaram, and M.-S. Heo. 2012. Poly D, L-lactide-co-glycolic acid(PLGA)-encapsulated vaccine on immune system in *Epinephelus bruneus* against *Uronema marinum*. Exp. Parasitol. 131: 325-332.

Hatanaka, A., N. Umeda, S. Yamashita, and N. Hirazawa. 2007. Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*. Parasitol. 134: 1163-1174.

Josepriya, T.A., K.- H. Chien, H.-Y. Lin, H.-N. Huang, C.-J. Wu, and Y.-L. Song. 2015. Immobilization antigen vaccine adjuvanted by parasitic heat shock protein 70C confers high protection in fish against cryptocaryonosis. Fish Shellfish Immunol. 45: 517-527.

Luo, X.C., M.Q. Xie, X.Q. Zhu, and A.X. Li. 2007. Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or injection with *Cryptocaryon irritans*. Fish Shellfish Immunol. 22: 427–432.

Misumi, I., D. T. Lewis, A. Takemura, and J.- A. C. Leong. 2011. Elicited cross-protection and specific antibodies in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against two different immobilization serotypes of *Cryptocaryon irritans* isolated in Hawaii. Fish Shellfish Immunol. 30: 1152-1158.

Oestman, D.J., and D.H. Lewis. 1995. A methos for producing microb-free

Amyloodinium Ocellatum (Brown) with Percoll . Vet. Parasitol. 59: 169-175.

Ruyra, A, M. Cano-Sarabia, P. García-Valtanen, D. Yero, I. Gibert, S. Mackenzie, Estepa A, D. Maspoch, and N. Roher. 2014. Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. Vaccine. 32: 3955–62.

Skjermo, J., T. Defoort, M. Dehasque, T. Espevikt, Y. Olsen, G. Skjak-Braaeks, and P.V.O. Sogerloos. 1995. Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism artemia. Fish Shellfish Immunol. 5: 521–534.

Yúfera, M., C. Fernández-Díaz, and E. Pascual. 2010. Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. Aquaculture. 248: 253-262.

การนำเสนอผลงานในรูปแบบการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (ฐานข้อมูล TCI)

ในการประชุม การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5 เรื่อง การใช้เซลล์ตรึงยีสต์ทะเล *Pichia jadinii* เป็นสารเสริมอาหารในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว
โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น ราชา ออคิด หน้า 779-786

788 แก่นเกษตร 44 ฉบับพิเศษ 2 : (2559)

การใช้เซลล์ตรึงยีสต์ทะเล *Pichia jadinii* เป็นสารเสริมอาหารในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว

Encapsulation of the marine yeast *Pichia jadinii* as a feed additive for the stimulation of the immune response in white sea bass (*Lates calcarifer*)

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1*], สุพรรณี ลีโทชวลิต[1], จารุนันท์ ประทุมยศ[1], มลฤดี สนธิ[2] และ มะลิวัลย์ คุตะโค[2]

Janjarus Watanachote[1*], Supannee Leethochavalit[1], Jarunan Pratoomyot[1], Molruedee Sonthi[2] and Maliwan Kutako[2]

บทคัดย่อ: การศึกษาการใช้อาหารเสริมที่มีเซลล์ตรึงยีสต์เป็นองค์ประกอบเพื่อกระตุ้นระดับแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวและความต้านทานต่อเชื้อปรสิต โดยทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังด้วยอาหาร 3 สูตร คือ 1) สูตรควบคุมเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะพง 2) สูตรอาหารควบคุมที่ผสมแคลเซียมอัลจิเนต และ3) สูตรอาหารควบคุมที่ผสมเซลล์ตรึงยีสต์ *Pichia jadinii* ในแคลเซียมอัลจิเนต เป็นอาหารชุดทดสอบ ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวันตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์ โดยให้ปลากินอาหารทดลองแต่ละสูตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วเปลี่ยนให้ปลาทุกชุดการทดลองกินอาหารควบคุมสูตรที่ 1 ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดนำปลากะพงขาวเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะธีรอนต์จำนวน 15,000 เซลล์ต่อปลา 1 ตัว จากการตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรัมปลาด้วยเทคนิค ELISA พบว่าอาหารที่มีเซลล์ยีสต์เป็นองค์ประกอบสามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดี โดยที่ระดับแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวที่เวลา 14 วันเพิ่มขึ้นเป็น 1.8 และ 1.7 เท่าของอาหารสูตร 1 และ 2 ($P<0.05$) และเมื่อให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 14 วัน พบว่าปริมาณแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

คำสำคัญ: ยีสต์ทะเล, การตรึงเซลล์, ภูมิคุ้มกัน, ปลากะพงขาว

[1] [1]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี

[2]คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี, จันทบุรี

[1]Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, Thailand

[2]Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus, Chanthaburi, Thailand

* Corresponding author: janjarus@buu.ac.t

KHON KAEN AGR. J. 44 SUPPL. 2 : (2016) 789

ABSTRACT: This study aims to investigate the utilization of marine yeast encapsulation as dietary supplement to enhance fish antibody and parasite resistance. The three experimental diets were: 1) the control diet, i.e. a sea bass basal feed; 2) a mixture of the control diet and calcium alginate and 3) a mixture of the control diet and the yeast *Pichia jadinii*. Throughout the 4-weeks long feeding trial, the fish were fed at 3% body weight day^{-1}. Each group of fish were fed on their specified experimental diet for two weeks and then were switched to the control diet for two weeks afterward. At the end of the feeding period, fish were taken and challenged with live theronts of *C. irritans* at a dose of 15,000 theronts fish^{-1}, 15g. After fish were immunized with those diets, an ELISA confirmed that the levels of serum antibody in the fish fed with diets 3 significantly higher more than those in the fish fed with diet 1 and 2 ($P<0.05$). The fourteen days of challenge test shown that the levels of serum antibody in the fish fed with yeast supplement higher than the control groups ($P<0.05$).

Keywords: marine yeast, encapsulation, immune response, *Lates calcarifer*

บทนำ

สารอาหารที่ผสมในอาหารมีผลอย่างมากต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลา มีการวิจัยถึงชนิดและปริมาณสารอาหารต่อการต้านทานโรคของสัตว์น้ำมาเป็นระยะเวลานาน สารอาหารหลักประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน กรดไขมัน และสารอาหารปริมาณน้อย เช่น วิตามินซี วิตามินบี6 วิตามินอี วิตามินเอ และแร่ธาตุ เช่น ธาตุเหล็กและฟลูโอไรด์ ซึ่งบทบาทของวิตามินและแร่ธาตุไม่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยตรง แต่ช่วยเสริมการป้องกันโรคโดยให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้เหมาะสมดียิ่งขึ้นไป (Trichet, 2010) ปัจจุบันพบว่าในวงการอาหารสัตว์น้ำมีการใช้จุลินทรีย์และยีสต์หลายชนิดเป็นวัตถุดิบอาหารในรูปแบบของโปรตีนเซลล์เดี่ยว เช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Candida utilis* ยีสต์สีแดง *Rhodotorula* spp. ให้สารสีบีตา-แคโรทีนอยด์ (β-carotenoid) ใช้ผสมในอาหารสัตว์น้ำเพื่อเพิ่มสี(Zhenming et al., 2006) นอกจากนี้ยีสต์หลายชนิดมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory properties) เป็นแหล่งสารอาหารโปรตีน ไขมัน และวิตามิน (Kutty and Philip, 2008) ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการนำไปใช้เป็นสารเสริมอาหาร หรือใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (probiotic) เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนได้มากในระยะเวลาสั้น 2-3 วัน ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการเจริญเติบโต และใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย ต้นทุนในการผลิตต่ำ การนำเซลล์จุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้มีการใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อที่จะตรึงสารอาหารไว้ภายในให้ได้มากที่สุดและให้ถูกปล่อยออกมาในระยะเวลาที่เหมาะสม เช่น การตรึง probiotics bacteria (Vidhyalakshmi et al., 2009) หรือในการเพาะเลี้ยงใช้เซลล์ตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปเพื่อลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิตเพื่ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน (Lazo, 2000; Teshima et al., 2000; Xie et al., 2010) และการป้องกันโรคโดยการวิธีการให้ทางปาก (Polk, 1994) พอลิเมอร์ธรรมชาติบางชนิดสามารถทำ

ให้เป็นเจลได้เมื่อมีการเชื่อมไขว้เข้ากับไอออนของโลหะ การเตรียมทำได้ง่ายและสารที่ใช้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ได้แก่ อัลจิเนต และไคโทซาน(Calinescu et al., 2012) ในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงเมื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยอาหารที่มีเซลล์ตรึงยีสต์ทะเล *Pichia jadinii* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แล้วให้ปลาที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเผชิญเชื้อปรสิต *Cryptocaryon irritans* มีชีวิตระยะธีรอนต์ (theront) เนื่องจากปรสิตชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในปลากระดูกแข็งได้เกือบทุกชนิดและแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว (Diggles and Lester, 1996)

วิธีการศึกษา

ยีสต์ *P. jadinii* แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลบางแสน จังหวัดชลบุรี (Watanachote et al., 2012) การเลี้ยงยีสต์ *P. jadinii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที เตรียมได้โดยนำกากชานอ้อยมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่น้ำทะเลเทียม (Oestmann and Lewis,1995) ในอัตราส่วน 1:10 นำยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำเร็จรูป (Yeast Malt Extract Medium,YM) แบบเหลว ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้เซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรึงเซลล์ยีสต์ (Siranonthana et al., 2015)

การเตรียมเซลล์ตรึงยีสต์ใช้โซเดียมอัลจิเนต (เกรดการค้า, บริษัท Brightmoon ประเทศจีน) เข้มข้นสุทธิร้อยละ 1.2 และให้มีเซลล์ยีสต์ประมาณ 50,000 เซลล์ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 100 มล. ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการเตรียมเม็ดเจลคือร้อยละ 1.5 โดยนำสารแขวนลอยที่มีเซลล์ยีสต์ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตใส่ลงในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มล. สารจะค่อยๆ หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1000 มล. ได้เม็ดเจลเป็นเซลล์ตรึงยีสต์ในแคลเซียมอัลจิเนต ตั้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำสะอาด ทำให้แห้งและปั่นให้เป็นผง ผสมผงเซลล์ตรึงยีสต์ในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะพง (สุพรรณี และคณะ, 2557) ได้เป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงปลากะพง อาหารที่ต้องเตรียมเพื่อใช้ในการทดลองมี 3 สูตร โดยในสูตรอาหารมีโปรตีนประมาณร้อยละ 50 ไขมันร้อยละ 12 คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำร้อยละ 15 และมีความชื้นร้อยละ 6 ส่วนผสมของอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะพงในแต่ละสูตรมีดังนี้

อาหารสูตรที่ 1 วัตถุดิบอาหารพื้นฐานที่เป็นแหล่งโปรตีน และพลังงาน เป็นชุดควบคุม (ทรีตเมนต์ที่ 1)

อาหารสูตรที่ 2 วัตถุดิบอาหารพื้นฐานที่เป็นแหล่งโปรตีน และพลังงาน เป็นชุดควบคุมที่มีแคลเซียมอัลจิเนต (ทรีตเมนต์ที่ 2)

อาหารสูตรที่ 3 วัตถุดิบอาหารพื้นฐานที่เป็นแหล่งโปรตีน และพลังงาน และเซลล์ยีสต์

ทะเล *P. jadinii* ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแล้ว เป็นชุดทดสอบ (ทรีตเมนต์ที่ 3)

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว โดยใช้อาหารเสริม วางแผนการทดลองเป็นแบบ 3×3 CRD ทดลองในปลากะพงขาวขนาดเฉลี่ย 8.15±0.58 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 6.21±0.79 กรัม จำนวน 50 ตัวต่อกระชังขนาด 90x90x80 เซนติเมตร (กxยxส) ในบ่อดินขนาด 8x7x1.8 เมตร (กxยxล) อุณหภูมิน้ำตลอดการทดลองประมาณ 30.4±0.7 องศาเซลเซียส ความเค็ม 23±2 พีพีที พีเอช 7.2±0.2 ทดลองให้ปลากะพงขาวกินอาหารสูตร 1 2 (ชุดควบคุม) และ 3 ซึ่งเป็นชุดทดสอบ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทุกชุดการทดลองให้ปลากินอาหารชุดควบคุมสูตรที่ 1 อีก 4 สัปดาห์ ต่อเนื่องกันทุกวัน ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวันตลอดการทดลอง ทำการสุ่มปลากะพงขาวจำนวน 12 ตัว ทุก 2 สัปดาห์ เพื่อเจาะเลือดเก็บส่วนซีรัมใช้ในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยเทคนิคอีไลซาจนสิ้นสุดการทดลอง

การให้ปลากะพงขาวเผชิญเชื้อ *C. irritans* มีชีวิตระยะธีรอนต์ ทำย้ายปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารครบแล้วจากบ่อดินใส่ในถังไฟเบอร์ปริมาตร 300 ลิตร จำนวน 10 ตัวต่อถัง และ 3 ถังต่อสูตรอาหาร ความเค็มน้ำ 30 พีพีที โดยเลี้ยงปลาด้วยปริมาตรน้ำ 100 ลิตร จากนั้นใส่ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์มีชีวิตลงไปจำนวน 15,000 ตัว ต่อน้ำหนักปลากะพงขาวประมาณ 15 กรัมต่อปลา 1 ตัว เป็นเวลา 14 วัน และเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อได้ 3 7 และ 14 วัน เพื่อวัดปริมาณแอนติบอดีด้วยเทคนิคอีไลซา

การตรวจวัดระดับแอนติบิดีในซีรัมปลากะพงใช้เทคนิคเอ็นไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบ็นท์ แอสเสย์หรืออีไลซา (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) จากการตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธีอีไลซา โดยเคลือบเพลทด้วยปรสิต *C. irritants* ระยะธีรอนต์เชื้อตาย จำนวน 200 ตัวต่อหลุม ใช้แอนติบอดีตัวที่ 1 เป็นซีรัมปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร อัตราส่วน 1:100 แอนติบอดีตัวที่ 2 เป็นแอนติบอดีของหนูเมาส์ที่จำเพาะต่อ IgM ปลาในอัตราส่วน 1:12000 (Mouse anti fished 1:12000) แอนติบอดีตัวที่ 3 เป็นแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อหนูเมาส์ ในเอนไซม์ฮอสราดิสเปอร์ออกซิเดส อัตราส่วน 1:5000 (Goat anti mouse horse-radish peroxidase conjugated 1:5000)

การวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงที่ได้รับอาหารเสริมเซลล์ยีสต์เทียบกับปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงที่ได้รับอาหารชุดควบคุมทรีตเมนต์ 1 และ 2 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Tukey HSD *post-hoc* tests ด้วยโปรแกรม SPSS 17

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ยีสต์ *P. jadinii* เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างเป็นรูปไข่

(oval, ovoidal) ขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร (**Figure 1A**) การเจริญของยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาดจนถึงขนาดที่ใหญ่ที่สุด (critical size) หลังจากนั้นจึงจะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งการแบ่งเซลล์ของยีสต์ *P. jadinii* เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) เป็นการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) โดยการแตกหน่อเกิดขึ้นได้โดยรอบเซลล์ทุกๆ ด้าน (**Figure 1B**) ยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *P. jadinii* type strain CBS 1600T ที่ความเหมือนร้อยละ 99.13 (Watanachote et al., 2012)

จากการตรึงเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ตรวจสอบเซลล์ตรึงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ยีสต์ถูกกักอยู่ในเส้นพอลิเมอร์ของแคลเซียมอัลจิเนต)

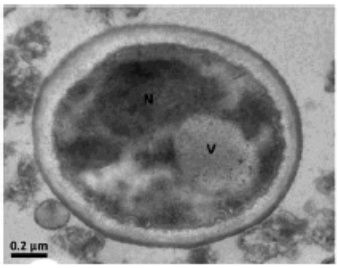


Figure 1 Electron micrograph of *P. jadinii* A) normal cell (N= nucleus, V = vacuole), Scale bar = 0.2 µm. B) budding yeast cell, Scale bar = 0.5 µm.

การทดสอบการหลุดของเซลล์ยีสต์ *P. jadinii* จากการตรึงในเวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบการหลุดของเซลล์ยีสต์ (สวพัศ และสรารัศมิ์, 2556) ในกระบวนการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์น้ำได้มีการใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กสำหรับเป็นอาหารในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เพื่อให้สารอาหารคงสภาพเมื่ออยู่ในน้ำเป็นระยะเวลานานขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิตวัยอ่อนได้ ซึ่งขนาดและชนิดของอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตได้แตกต่างกันขึ้นกับเทคนิคการผลิต เช่น microsphere diets, microencapsulated diets หรือ microparticulated diets (Teshima et al., 2000; Koven et al., 2001; Kolkovski, 2004) ในการป้องกันและรักษาโรคได้มีการใช้เทคนิคการตรึงเซลล์หรือสารในการพัฒนาวัคซีนโดยวิธีให้กินซึ่งทำได้ง่ายกว่าการฉีดสารเข้าตัวปลา (Luzardo-Alvarez et al., 2010) วัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนตรึงสาร เช่น คาราจีแนน เซอีน (Baskerville-Bridges and Kling, 2000) โซเดียมอัลจิเนต (Lopez et al., 1994) สารผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและไคโตแซน (Polk et al., 1994) ซึ่งการตรึงสารโดยการใช้โซเดียมอัลจิเนต หรือของผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและไคโตแซนเป็นเทคนิคการผลิตที่ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง นอกจากนี้เม็ดเจลที่ได้สามารถ

นำไปทำแห้ง บดให้ละเอียดและผสมกับอาหาร ซึ่งมีความสะดวกในการนำไปใช้ต่อไป

จากการทดลองให้อาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลากะพง แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลากะพงขาวโดยเทคนิค ELISA พบว่าปลามีการตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดี โดยที่เวลา 14 วัน อัตราส่วนของปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลาที่ได้รับอาหารสูตร 3 ต่อปริมาณแอนติบอดีของกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสูตร 1 และสูตร 2 เป็น 1.8 และ 1.7 ตามลำดับ ระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (**Table 1**) หลังจากที่ให้อาหารปลาครบตามการทดลองแล้ว เมื่อให้ปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตและตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีในซีรัมที่เวลา 3 7 และ 14 วัน พบว่าปลาที่ได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน ซึ่งมีระดับแอนติบอดีสูงสุดในทรีตเมนต์ 1 และ 3 และปริมาณแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารที่มียีสต์เมื่อเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (**Table 1**) เมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นภูมิคุ้ม กันปลากะพงด้วยการฉีดสารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ (จันทร์จรัส และคณะ, 2559) หรือการฉีดปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์เข้าในช่องท้องปลาโดยตรง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ปลาผลิตแอนติบอดีเพิ่มขึ้นในอัตราส่วน 1.5 และ 1.2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 30 วัน (สุพรรณี และคณะ, 2554) ตามลำดับ แต่การใช้ยีสต์สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนติบอดีในซีรัมปลาที่เวลา 14 วัน ในอัตราส่วนที่สูงกว่า นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติที่ดีของยีสต์ทะเล *P. jadinii* ด้านคุณค่าอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงร้อยละ 42 และไขมันร้อยละ 0.22 (สวพัศ และสรารัศมิ์, 2556) รวมทั้งประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (mono- unsaturated fatty acids (MUFAs)) ร้อยละ 47-52 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids (PUFAs)) ประมาณร้อยละ 17 ของกรดไขมันรวม (Siranonthana et al., 2015) การเลี้ยงยีสต์ใช้ต้นทุนต่ำกว่าการเลี้ยงปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ และยังสามารถเพิ่มปริมาณยีสต์ให้เพียงพอต่อการนำไปผสมในอาหารได้ตามต้องการซึ่งไม่สามารถทำได้เมื่อต้องใช้ปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ อีกทั้งผนังเซลล์ของยีสต์มีโครงสร้างของบีตา-กลูแคน (β-glucans) (Bzducha-WrÓbel et al., 2015) ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน อัจฉรี และนงนุช (2551) ได้ทดลองเสริมเบต้ากลูแคนในอาหาร พบว่าการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารสามารถช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาโรซี่บาร์บ ดังนั้นยีสต์ทะเล *P. jadinii* จึงสามารถนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์น้ำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันและเสริมความต้านทานต่อเชื้อปรสิต *C. irritans* ของปลากะพงได้

Table 1 Antibody levels in fish serum determined by ELISA

Time (Days)	Absorbance at 450 nm (Average±SD)		
	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
14	0.524±0.031	0.545±0.022	0.929±0.036*
25	0.641±0.024	0.619±0.025	0.854±0.031*
	Challenged with live theronts		
3	0.764±0.043	1.113±0.038	0.946±0.022
7	1.642±0.024	0.783±0.050	1.153±0.011
14	0.863±0.016	0.826±0.021	0.984±0.008*

* Significant difference ($P<0.05$)

สรุปและข้อเสนอแนะ

ยีสต์ได้ถูกนำมาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เรียกว่าโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) หรือใช้เป็นสารเสริมชีวนะเพื่อช่วยเสริมสุขภาพให้กับสัตว์เลี้ยง ทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ใช้อาหารที่มีเซลล์ตรึงยีสต์เป็นองค์ประกอบกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีของปลากะพงเพื่อทดแทนการกระตุ้นด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ เมื่อปลากะพงกินอาหารนี้ทำให้ปลามีระดับของแอนติบอดีในซีรัมเพิ่มขึ้น และมีความต้านทานต่อการติดเชื้อ หรือลดความรุนแรงของการติดเชื้อ ปลามีสุขภาพดี สามารถเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานาน หรือใช้เสริมเมื่อปลามีความเครียด การใช้อาหารเสริมก่อนและหลังการขนย้ายปลา ทำให้ลดปริมาณการใช้ยาหรือสารเคมีที่ใช้ในการรักษาโรค

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, สุพรรณี ลีโทชวลิต, นันทิกา คงเจริญพร, และนารีรัตน์ ฤทธิ์รุตม์. 2559. การใช้สารสกัดเมมเบรนโปรตีนจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* กระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว. แก่นเกษตร. 44 (ฉบับพิเศษ 1) : 662-668.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, จารุนันท์ ประทุมยศ และนารีรัตน์ ฤทธิรุตม์. 2557. การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย. รายงาน

การวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์, วีลยา แก่นจันทร์, และนันทิกา คงเจริญพร. 2554. การศึกษาโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากโปรโตซัว *Cryptocaryon sp.* ในปลาทะเลในประเทศไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

สวพัศ มุ่งแฝงกลาง, และสรารัศมิ์ วสุชัยวัส. 2556. การศึกษาคุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบกรดไขมันในยีสต์ *Pichia* sp. รายงานปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

อัจฉรี เรืองเดช, และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2551. การเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตปลาโรซี่บาร์บ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

Baskerville-Bridge, B., and L.J. Kling. 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. Aquacult. Nutr. 6: 171-182.

Bzducha-WrÓbel, A., S. Bla**Ź**ejak, M. Molenda, and L. Reczek. 2015. Biosynthesis of β(1,3)/(1,6)-glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. Eur. Food Res. Technol. 240: 1023-1034.

Calinescu, I., P. Chipurici, A. Trifan, and C. Badoiu, 2012. Immobilisation of *Saccharomyces cerevisiase* for the production of bioethanaol. U.P.B. Sci. Bull., Series B. 74:33-40.

Diggles, B. J., and J. G. Lester. 1996b. Variation in the development of two isolates of *Cryptocaryon irritans*. J. Parasitol. 82: 384–388.

Kolkovski, S. 2004. Marine fish larvae diets – current status and future directions. In Proceeding of 11th international symposium on nutrition and feeding in fish, Phuket, Thailand.

Koven, W., S. Kolkovski, E. Hadas, K. Gamsiz, and A. Tandler. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: A review. Aquaculture. 194: 107-121.

Kutty, S. N., and R. Philip. 2008. Marine yeasts - a review. Yeast. 25: 465-483.

Lazo, J. P., M.T. Dinis, G.J. Holt, C. Faulk, and C.R. Arnold. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture. 188: 339-351.

Lopez Alvarado, J., C.J. Langdon, S. I. Teshima, and A. Kanazawa. 1994. Effect of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. Aquaculture. 122: 335-346.

Luzardo-Alvarez, A., F.J. Otero-Espinar, and J. Blanco-Méndez. 2010. Microencapsulation of diets and vaccines

for cultured fishes, crustaceans and bivalve mollusks. J. Drug Del. Sci. Tech. 20: 277-288.

Oestmann, D. J., and D.H. Lewis. 1995. A method for producing microbe-free *Amyloodinium ocellatum* (Brown) with Percoll. Vet. Parasitol. 59: 169-175.

Polk, A.E., B. Amsden, D. Scarratt, A. Gonzal, A.O. Okhamafe, and M.F. A. Goosen. 1994. Oral delivery in aquaculture: controlled release of proteins from chitosan-alginate microcapsules. Aquacult. Eng. 13:311-323.

Siranonthana, N., J. Watanachote, R. Srivibool, and J. Pratoomyot. 2015. Effect of salinity on the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media. P. 712-718. In Proceeding of the Burapha University International Conference 2015. Burapha University, Chonburi.

Teshima, S., M. Ishikawa, and S. Koshio, 2000. Nutritional assessment and intake of microparticulate diets in crustaceans and fish. Aquacult. Res. 31: 691-702.

Trichet, V.V. 2010. Nutrition and immunity: and update. Aquacult. Res. 41:356-372.

Vidhyalakshmi, R., R. Bhakyaraj, and R.S. Subhasree. 2009. Encapsulation "The Future of Probiotics" A Review. Adv. Biol. Res. 3(3-4): 96-103

Watanachote, J., N. Siranonthana, R. Watanadilok, and R. Srivibool. 2012. PUFAs in Marine Yeasts Isolated from Coastal Water, Thailand. In Proceeding of International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. Khon Kaen, Thailand.

Xie, Z., F. Wang, H. Liu, S. Guo, A. Zhu, and H. Niu. 2010. Gelatin-walled microencapsulated diet for larval shrimp (Penaeus japonicus Bate) manufactured using the fluidized bed coating process. Aquacult. Res. 42: 65-73.

Zhenming, C., L. Zhiqiang, G. Lingmei, G. Fang, M. Chunling, W. Xianghong, and L. Haifeng. 2006. Marine yeasts and their applications in mariculture. J. Ocean U China. 5: 251-256.

นำเสนอผลงานวิชาการแบบ Poster ในการประชุมวิชาการ

ในการประชุม 2016 6th International Conference on Asia agriculture and Animal (2016 APCBEES) เรื่อง The Immobilized Parasitic Protozoa *Cryptocaryon irritans* Induced Immune Response in Clownfish (*Amphiprion ocellaris*)

Jeju National University International Center, Jeju University, Jeju, Korea

May 23-24, 2016

D0012

The Immobilized Parasitic Protozoa *Cryptocaryon irritans* Induced Immune Response in Clownfish (*Amphiprion ocellaris*)

Supannee Leethochavalit[1] Janjarus Watanachote[1] Jarunan Pratoomyot[1]
Nanthika Khongchareonporn[2] and Nareerat Rittirut[1]

[1]Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand

[2] Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Thailand

We examined the protective immunity of Clownfish (*Amphiprion ocellaris*) against the Cryptocaryon irritans. We divided the fish into three groups and fed them with three formular diets: 1) the control diet, i.e. a clownfish basal feed; 2) a mixture of the control diet and the immobilized parasite, theront stage and 3) a mixture of the control diet and calcium alginate. Each group of the fish was fed on their specified experimental diet for two weeks and switched to the control diet for another two weeks. At the end of the experiment, 30 fish from each treatment group were moved to the tank and challenged with live theronts of *C. irritans* at a dose of 15,000 theronts fish^{-1}. Their blood samples were taken on the seventh and the fourteenth day after the challenge. We determined specific antibody levels of the immunized fish serum by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the levels of serum antibody in the fish fed with the immobilized parasite diet were significantly higher than those in the fish fed with the control ($P<0.05$).

Presenting author details

Supannee Leethochavalit, Ph.D.

e-mail: supannee@buu.ac.th

Category: Poster presentation

นำเสนอผลงานวิชาการแบบ Poster ในการประชุมวิชาการ

ในการประชุม 2016 6th International Conference on Asia agriculture and Animal (2016 APCBEES) เรื่อง The Efficiency of Yeast Encapsulation as Dietary Supplement to Enhance Antibody in White Sea bass (*Lates calcarifer*)
Jeju National University International Center, Jeju University, Jeju, Korea
May 23-24, 2016

D0011

The Efficiency of Yeast Encapsulation as Dietary Supplement to Enhance Antibody in White Sea bass (*Lates calcarifer*)

Janjarus Watanachote[1] Supannee Leethochavalit[1] Jarunan Pratoomyot[1]
Molruedee Sonthi[2] Maliwan Kutako[2] and Nareerat Rittirut[1]
[1]Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen Chonburi, 20131 Thailand
[2]Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus, Chanthaburi, 22170 Thailand

This study aims to investigate the efficiency of yeast encapsulation by using calcium alginate as dietary supplement to enhance fish antibody and parasite resistance. We grouped sea bass into three samples in a cage-cultured environment according to thier experimental diets The three experimental diets were: 1) the control diet, i.e. a sea bass basal feed; 2) a mixture of the control diet and the yeast *Pichia* sp. and 3) a mixture of the control diet and calcium alginate. All the experimental diets contained between 49-51% protein and 12-13% lipid. We subsequently challenged them with different/varying infective stages of the ciliate *Cryptocaryon irritans*. The initial weight and length of the fish were 6.21 ± 0.79 g and 8.15 ± 0.58 cm respectively. Throughout the 4-week long feeding trial, the fish were fed at 3% body weight day^{-1}. Each group of fish were fed on their specified experimental diet for two weeks and then were switched to the control diet for two weeks afterward. At the end of the feeding period, 30 fish from each treatment group were taken and challenged with live theronts of *C. irritans* at a dose of 15,000 theronts fish^{-1}. Eighty-three percent of the fish fed with diets 1 survived the challenge, while 93% and 90% of those fed with diets 2 and 3 respectively survived. An ELISA confirmed that the levels of serum antibody in the fish fed with diets 2 and 3 significantly increased more than those in the fish fed with diets 1 ($P<0.05$).

Presenting author details
Janjarus Watanachote, Ph.D.
e-mail: janjarus@buu.ac.th
Category: Poster presentation

การยื่นขออนุสิทธิบัตร

ทางโครงการได้ยื่นขอจดอนุสิทธิบัตร 2 เรื่อง ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการแก้ไขเอกสารดังรายละเอียดดังนี้

สำเนา

แบบสป / อผ / อสป / 001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 2 หน้า

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ อนุสิทธิบัตร

ยื่นทางไปรษณีย์ ส.ก. 30/10/54

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ 2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 5 พ.ย 2550
วันยื่นคำขอ 30 ต.ค 2550
เลขที่คำขอ 1503001890

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์
ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1.ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
การใช้อาหารเสริมอาหารโดยการประยุกต์ใช้พลบนิคการหมักแอลลิปิลค์ทะเล *Pichia sp.* เพื่อการเจริญเติบโตของปลาทะเลขาว

2.คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในเวลาเดียวกัน

3.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (แยกที่ ถนน ประเทศ)
มหาวิทยาลัยบูรพา
169 อ.ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

3.1 สัญชาติ	ไทย
3.2 โทรศัพท์	
3.3 โทรสาร	
3.4 อีเมล์	

ยกเว้นค่าธรรมเนียม

4.สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☑ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☐ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5.ตัวแทนเจ้าของ/ที่อยู่ (แยกที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)

5.1 ตัวแทนเลขที่	-
5.2 โทรศัพท์	-
5.3 โทรสาร	-
5.4 อีเมล์	-

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (แยกที่ ถนน ประเทศ)
ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ ดร. ดุพรวณี สีโหราฮิต พร. จารุนันท์ ประทุมยศ นางสาวิตา จิรนนท์ธนา และ นางสาวัลนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
ที่อยู่ คณะวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา 169 อ. ลงหาดบางแสน อ. เมือง จ.ชลบุรี 20131

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้มีถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในการมีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8.การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9.การแสดงการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ

12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้
หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเชี่ยนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 4 หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ 1 หน้า
ง. รูปเชี่ยน รูป หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์
☐ รูปเชี่ยน รูป หน้า
☐ ภาพถ่าย รูป หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14.เอกสารประกอบคำขอ
☑ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☐ เอกสารอื่น ๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/ อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....

16.ลายมือชื่อ (☑ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/ อนุสิทธิบัตร; ☐ ตัวแทน)

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล พงศ์ไทย)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

สำเนา

แบบสป / สผ / อสป / 001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 2 หน้า

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ อนุสิทธิบัตร ยื่นทางไปรษณีย์

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ 2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่	
วันรับคำขอ 2 พ.ย. 2558	เลขที่คำขอ 1503001861
วันยื่นคำขอ 2 1 ต.ค. 2558	
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1.ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ปรสิต *Cryptocaryon irritans* ระยะอีรอนต์ (theront) เชื้อตายในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาการ์ตูนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากปรสิต *C. irritans*

2.คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)	
มหาวิทยาลัยบูรพา **169 ถ.ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131**	3.1 สัญชาติ ไทย 3.2 โทรศัพท์ 3.3 โทรสาร 3.4 อีเมล์

4.สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☑ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☐ ผู้รับ.อน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5.ตัวแทน(ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)	
	5.1 ตัวแทนเลขที่ - 5.2 โทรศัพท์ - 5.3 โทรสาร - 5.4 อีเมล์ -

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)
ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ ดร. จารุนันท์ ประทุมยศ และ นางณิษา สิรนนท์
ที่อยู่ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถ. ลงหาดบางแสน อ. เมือง จ.ชลบุรี 20131

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้มีอว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

ยกเว้นคาธรรมเนียม
ตามกฎกระทรวง ฉบับที่ ๒ ว่าด้วยอัตราค่าธรรมเนียมและการยกเว้นค่าธรรมเนียม
สำหรับสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร และประกาศคณะกรรมการสิทธิบัตร

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่ต้องรายละเอียด เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

แบบสป / สผ / อสป / 001-ก
หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า

8.การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9.การแสดงการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ

12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ยับยั้งประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้
หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ 2 หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 4 หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ 1 หน้า
ง. รูปเขียน รูป 1 หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์
☐ รูปเขียน รูป หน้า
☐ ภาพถ่าย รูป หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14.เอกสารประกอบคำขอ
☑ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☐ เอกสารอื่น ๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/ อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....

16.ลายมือชื่อ (☑ ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; ☐ ตัวแทน)

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล พงศ์ไทย)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิชาการ ภาคโปสเตอร์
ในการประชุมวิชาการ สัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5

ระดับดีมาก

การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5

ประกาศนียบัตรนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิชาการ ภาคโปสเตอร์*"ระดับดีมาก"*

สาขาประมง

ในงานประชุมวิชาการสัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 28-30 มิถุนายน พ.ศ. 2559

จัดโดย ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับภาคีเครือข่ายสัตวศาสตร์
และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทยในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
ณ โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น ราชา ออคิด จังหวัดขอนแก่น

นายสุเทพ วงศ์ริ่น
นายกสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย

รองศาสตราจารย์ ดร.กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย
อธิการบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระดับชมเชย

การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5

ประกาศนียบัตรนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต

มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานวิชาการ ภาคโปสเตอร์*"ระดับชมเชย"*

สาขาประมง

ในงานประชุมวิชาการสัตวศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 28-30 มิถุนายน พ.ศ. 2559

จัดโดย ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับภาคีเครือข่ายสัตวศาสตร์
และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทยในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
ณ โรงแรมพูลแมน ขอนแก่น ราชา ออคิด จังหวัดขอนแก่น

นายสุเทพ วงศ์ริ่น
นายกสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย

รองศาสตราจารย์ ดร.กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย
อธิการบดีมหาวิทยาลัยขอนแก่น

การจัดฝึกอบรมในโครงการ

โครงการฝึกอบรมตามแผนงานวิจัยจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

๑. ชื่อโครงการ "การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม R สำหรับงานวิจัยทางด้านชีววิทยา" (กรณีศึกษา: การวิเคราะห์ข้อมูลจากโครงการวิจัยการพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย)

๒. ลักษณะโครงการ

☐ โครงการต่อเนื่อง

☑ โครงการใหม่

๓. ความสอดคล้อง

๓.๑ ความสอดคล้องต่อพันธกิจมหาวิทยาลัยบูรพา

☐ ๑. ดำเนินการจัดการศึกษาอย่างเสมอภาคเท่าเทียม ควบคู่กับการเสริมสร้างเสรีภาพ ทางวิชาการและการใฝ่เรียนรู้ตลอดชีวิต บนพื้นฐานของหลักคุณธรรม จริยธรรม และจรรยาบรรณวิชาชีพ ☑ ๒. ดำเนินการพัฒนาคุณภาพงานวิจัย เพื่อสร้างและพัฒนาองค์ความรู้ ในศาสตร์แขนงต่าง ๆ และดำเนินการให้บริการทางวิชาการและการถ่ายทอดองค์ความรู้ เพื่อการพัฒนาศักยภาพของหน่วยงาน ภาครัฐและภาคเอกชน ตลอดจนสังคมชุมชน ให้สามารถรองรับต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนา ทางด้านการเมือง เศรษฐกิจและสังคมที่มีความเป็นพลวัตสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

☐ ๓. ดำเนินการส่งเสริมและสนับสนุนกิจกรรมสาธารณะในรูปแบบต่าง ๆ โดยครอบคลุม การทำนุบำรุงศิลปะ วัฒนธรรม ศาสนา และการกีฬา รวมทั้งแสดงบทบาทนำในการพัฒนาสังคมชุมชนและสิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง

๓.๒ ความสอดคล้องต่อยุทธศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา

☐ ยุทธศาสตร์ที่ ๑ การพัฒนาคุณภาพบัณฑิต

☑ ยุทธศาสตร์ที่ ๒ การพัฒนาคุณภาพการวิจัยและการบริการวิชาการ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ ๓ การพัฒนาศักยภาพบุคลากร

☐ ยุทธศาสตร์ที่ ๔ การมีส่วนร่วมและการรับผิดชอบต่อสังคม

☐ ยุทธศาสตร์ที่ ๕ การพัฒนาประสิทธิภาพการบริหารจัดการภายใน

๓.๓ ความสอดคล้องต่อกลยุทธ์สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

๓.๓.๑ ด้านการวิจัย

☐ กลยุทธ์ที่ ๑ พัฒนาการผลิตผลงานวิจัยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

☐ กลยุทธ์ที่ ๒ พัฒนาโครงสร้างพื้นฐาน เครื่องมืออุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยให้กับนักวิทยาศาสตร์อย่างเพียงพอ

☑ กลยุทธ์ที่ ๓ พัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์

๓.๓.๒ ด้านการบริการวิชาการ

☐ กลยุทธ์ที่ ๔ พัฒนาและปรับปรุงสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำเค็มและพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์ทางทะเลให้เป็นแหล่งเรียนรู้ด้านวิทยาศาสตร์ทางทะเล และเป็นแหล่งท่องเที่ยวนันทนาการเพื่อการเรียนรู้ ที่ได้มาตรฐาน

☑ กลยุทธ์ที่ ๕ การพัฒนาศักยภาพบุคลากรด้านบริการวิชาการตามภารกิจและสายวิชาชีพ

☐ กลยุทธ์ที่ ๖ บูรณาการองค์ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์ทางทะเลของสถาบันฯ มาใช้ในการให้บริการสังคม (University Social Responses,USR) ที่ตอบสนองต่อความต้องการของสังคมในรูปแบบต่าง ๆ

☐ กลยุทธ์ที่ ๗ สร้างรายได้จากความเชี่ยวชาญ ทรัพยากรและการบริการวิชาการที่มีประสิทธิภาพสูงที่สามารถตอบสนองความต้องการด้านความรู้ของสังคม เพื่อเสริมสร้างองค์กรให้มีความเข้มแข็งและสามารถพึ่งตนเองได้ด้วยองค์ความรู้ขององค์กร

☐ กลยุทธ์ที่ ๘ สร้างเครือข่ายความร่วมมือในการให้บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์ทางทะเลกับหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภายในละภายนอกสถาบันฯ ทั้งภาครัฐและเอกชน

๓.๓.๓ ด้านการบริหารจัดการ

☐ กลยุทธ์ที่ ๙ พัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างพื้นฐานและเครื่องมือ อุปกรณ์เพื่อรองรับการเติบโตของส่วนงาน

☑ กลยุทธ์ที่ ๑๐ พัฒนาบุคลากรให้มีศักยภาพสูงและมีความพร้อมในการปฏิบัติงาน

☐กลยุทธ์ที่ ๑๑ พัฒนาการบริหารจัดการทรัพยากรให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่าและเอื้อต่อการดำเนินงานของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ตามระบบมาตรฐาน

☐ กลยุทธ์ที่ ๑๒ พัฒนาระบบเทคโนโลยีสารสนเทศเพื่อการบริหารจัดการ ให้มีความทันสมัยเพื่อพัฒนาไปสู่องค์กรแห่งการเรียนรู้

๔. ผู้รับผิดชอบ โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย” ภายใต้แผนงานวิจัยจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

คณะผู้ดำเนินงานโครงการ

นางสาวสุพรรณี ลิโทชวลิต	ประธานโครงการฝึกอบรมฯ
นางสาวจารุนันท์ ประทุมยศ	กรรมการ
นางรวิวรรณ วัฒนดิลก	กรรมการ
นางณิษา สิรนนท์ธนา	กรรมการ

นางสาวชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา	กรรมการ
นางจันทร์จรัส วัฒนะโชติ	เลขานุการโครงการฝึกอบรมฯ

๕. หลักการและเหตุผล

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล เป็นหน่วยงานเทียบเท่าคณะ สังกัดมหาวิทยาลัยบูรพา มีภารกิจหลักในการค้นคว้าวิจัย และให้บริการวิชาการในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ในการทำวิจัยที่มีการใช้สัตว์ทดลองเพื่อศึกษาค้นคว้าด้านวิทยาศาสตร์ทางทะเลนั้น มีการใช้สัตว์ทดลองที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง

ซึ่งผู้วิจัยมักประสบปัญหาในการวางแผนการทดลอง เนื่องจากสัตว์ที่นำมาใช้ศึกษานั้นมีความหลากหลายมาก โดยมีความแตกต่างด้านสายพันธุ์ ขนาด ปริมาณ สัตว์ทะเลที่อยู่ในความคุ้มครองและหายาก เป็นต้น ดังเช่นโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย” ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวัคซีนและสารเสริมอาหารเพื่อใช้สำหรับปลาเศรษฐกิจและปลาสวยงาม เพื่อให้การทดลองประสบผลสำเร็จเป็นที่น่าเชื่อถือ การนำปลามาใช้ทดลองจำเป็นที่จะต้องใช้ปลาที่มาจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งปลาสวยงามน้ำเค็มนั้น การผลิตลูกปลาเพื่อให้ได้จำนวนมากพอที่จะนำมาใช้ในการทดลองนั้นเป็นไปได้ยาก หากสามารถลดจำนวนปลาหรือสัตว์น้ำลงโดยที่ยังสามารถนำมาคำนวณผลทางสถิติได้อย่างถูกต้อง และเพื่อให้การดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์สอดคล้องกับหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ หลักการ 3Rs และเป็นไปตามบทบัญญัติในพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. ๒๕๕๘ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล โดยโครงการวิจัย “การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย” ภายใต้แผนงานวิจัยจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งได้รับการสนันสนุนให้ทำวิจัยต่อเนื่องเป็นเวลา ๓ ปี ด้วยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. ๒๕๕๖-๒๕๕๘ จึงจะได้จัดให้มีการอบรมเชิงปฏิบัติการเกี่ยวกับการใช้สถิติสำหรับงานวิจัยซึ่งเป็นการอบรมที่สำคัญและจำเป็นเพื่อให้นักวิจัยสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการเขียนโครงร่างวิจัย การกำหนดขนาดตัวอย่าง การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง โดยเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในด้านชีววิทยา ซึ่งมีความจำเป็นที่ต้องใช้สถิติระดับพื้นฐานจนถึงระดับสูงเพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัยและเพื่อให้ได้ผลงานที่มีคุณภาพได้รับการยอมรับทางด้านวิชาการอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโปรแกรมวิเคราะห์สถิติที่เป็น open source และเป็น Free software ที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ โปรแกรม R ซึ่งโครงการวิจัยเรื่องนี้จะได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากแต่ผู้ใช้จำเป็นที่จะต้องรู้คำสั่งต่าง ๆ ให้ครอบคลุมการวิเคราะห์สถิติขั้นพื้นฐานจนถึง สถิติขั้นสูง

ดังนั้น เพื่อประโยชน์ของโครงการวิจัยจะได้นำโปรแกรม R มาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าน่าจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยอื่น ๆ ในสถาบันฯ ต่อไปในอนาคต จึงจะได้นำวิทยากรที่ทรงความรู้ในเรื่องการใช้โปรแกรม R มาอบรมให้แก่นักวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลโดยทั่วกัน เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการทดลอง การวิเคราะห์ข้อมูลได้

อย่างมีประสิทธิภาพ และการตีพิมพ์ผลงานวิจัยลงในวารสารต่าง ๆ ที่มีชื่อเสียงในฐานข้อมูล Scopus และ ISI ต่อไป

๖. วัตถุประสงค์ของโครงการ

๑. เพื่อให้นักวิจัย นักวิชาการ มีความรู้ความเข้าใจในการใช้สถิติอย่างเหมาะสมสำหรับงานทางด้านชีววิทยาและการแพทย์

๒. เพื่อให้นักวิจัย นักวิชาการ สามารถใช้โปรแกรม R ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

๗. ระยะเวลาในการจัดโครงการ ระหว่างวันที่ ๒๔-๒๖ สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๙

๘. สถานที่ในการจัดโครงการ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

๙. ผู้เข้าร่วมโครงการ

๑. หัวหน้าโครงการวิจัย นักวิจัย อาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ จำนวน ๒๘ คน

๒. นิสิตที่ฝึกงาน ทำปัญหาพิเศษ จำนวน ๓ คน

๑๐. วิธีดำเนินการและรายละเอียดประกอบ

๑. การบรรยาย

๒. แบ่งกลุ่มฝึกปฏิบัติ (กรณีศึกษา) และนำเสนอผล

<u>วิทยากร</u>

ผศ. น.สพ. ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา (DVM, MSc, PhD)
ศูนย์ความเป็นเลิศทางสัตวแพทย์สาธารณสุข มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นางสาว ชลัชวรรณ แสนเสมอ (DVM, MSc.)
นักศึกษาปริญญาเอก สาขา วิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หัวข้อการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

24 สิงหาคม	**หัวข้อ**	**ผู้บรรยาย**
8:30 - 10:30	แผนการทดลองแบบต่าง ๆ : Completely randomized design, Randomized complete block design, Factorial design and Nested design - การเลือกใช้แผนการทดลอง - ข้อดี ข้อจำกัดของแผนการทดลอง - การหาขนาดตัวอย่าง	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา
10:30-11:00	พักรับประทานอาหารว่าง	
11:00-12:00	- แนะนำและติดตั้งโปรแกรม R , โปรแกรม R studio และ package ต่าง ๆ - การดึงข้อมูลจาก excel file เข้าสู่โปรแกรม	ชลัชวรรณ แสนเสมอ

	- การเขียน script คำสั่งเบื้องต้น - การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา	
12:00-13:00	พักรับประทานอาหารกลางวัน	
13:00- 15.00	การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับแผนการทดลองแบบสุ่มสมบุรณ์ ด้วย One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม R - การวิเคราะห์และการแปรผล ANOVA - การทดสอบข้อตกลงของ ANOVA - การทำ Multiple comparisons ระหว่างกลุ่ม - การสร้างตารางและกราฟเพื่อแสดงผล	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา
15:00-15:30	พักรับประทานอาหารว่าง	
15:30-16:30	การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับแผนการทดลองแบบสุ่มสมบุรณ์ ด้วย One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม R (ต่อ)	ชลัชวรรณ แสนเสมอ
25 สิงหาคม	**หัวข้อ**	**ผู้บรรยาย**
8:30 - 9:30	การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ด้วยโปรแกรม R	ชลัชวรรณ แสนเสมอ
9:30-10:30	การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับแผนการทดลองที่มีการจัดทรีตเมนต์แบบแฟคตอเรียลด้วยโปรแกรม R	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา
10:30-11:00	พักรับประทานอาหารว่าง	
11:00-12:00	การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับแผนการทดลองที่มีการจัดทรีตเมนต์แบบสุ่มซ้อน ด้วยโปรแกรม R	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา
12:00-13:00	พักรับประทานอาหารกลางวัน	
13:00- 15:00	การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการสร้างสมการถดถอย (regression) - การสร้างสมการถดถอย - การตรวจสอบข้อกำหนดการสร้างสมการถดถอย - การคัดเลือกตัวแปร - การทดสอบความเหมาะสมของโมเดลและการแปลผล	ชลัชวรรณ แสนเสมอ
15:00-15:30	พักรับประทานอาหารว่าง	
15:30-16:30	การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการสร้างสมการถดถอย (regression) ด้วยโปรแกรม R	ชลัชวรรณ แสนเสมอ
26 สิงหาคม	**หัวข้อ**	**ผู้บรรยาย**
8:30 - 10:30	การวิเคราะห์ข้อมูลที่มีการวัดซ้ำ (repeated measure data) - การจัดเตรียมข้อมูล - การวิเคราะห์ด้วย Generalized linear mixed model - โครงสร้างความแปรปรวนร่วม (covariance structure) - การทำ Multiple comparisons for longitudinal data - การสร้างกราฟ หรือ ตารางเพื่อการนำเสนอข้อมูล	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา
10:30-11:00	พักรับประทานอาหารว่าง	
11:00-12:00	การใช้โปรแกรม R วิเคราะห์ข้อมูลที่มีการวัดซ้ำ	ชลัชวรรณ แสนเสมอ
12:00-13:00	พักรับประทานอาหารกลางวัน	

13:00-15:00	การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับงานวิจัยเชิงสำรวจ ด้วยโปรแกรม R -ข้อมูลที่กระจายตัวแบบปกติ -ข้อมูลที่กระจายตัวแบบอื่น ๆ เช่น Poisson, Binomail, Negative Binary .. etc	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา
15:00-15:30	พักรับประทานอาหารว่าง	
15:30-16:30	งานกลุ่ม / ถาม-ตอบ กรณีศึกษา : การวิเคราะห์ข้อมูลจากโครงการวิจัย “การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย” สรุปและปิดการอบรม	ผศ.ดร. วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา

๑๑. การประเมินผลโครงการ

๑. จำนวนผู้เข้าร่วมอบรมที่สามารถเข้าร่วมการอบรมเป็นเวลาร้อยละ ๘๐ ของเวลาทั้งหมด

๒. ผลสำรวจความพึงพอใจของผู้เข้าร่วมโครงการ

๑๒. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

๑. ผู้เข้าร่วมอบรมมีความรู้ความเข้าใจในการใช้สถิติอย่างเหมาะสมสำหรับงานทางด้านชีววิทยาและการแพทย์มากขึ้น

๒. ผู้เข้าร่วมอบรมสามารถออกแบบการทดลองที่มีการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ได้อย่างถูกต้อง

๓. ผู้เข้าร่วมอบรมสามารถใช้โปรแกรม R ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

รายงานสรุปผล
โครงการฝึกอบรมตามแผนงานวิจัยจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การประเมินผลความพึงพอใจการจัดโครงการ “การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม R สำหรับงานวิจัยทางด้านชีววิทยา” (กรณีศึกษา: การวิเคราะห์ข้อมูลจากโครงการวิจัยการพัฒนาการผลิตวัคซีนและ สารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย)” ในปีงบประมาณ 2559 ณ ห้องประชุม สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผล การจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการในครั้งนี้ โดยสำรวจจากผู้เข้าอบรมจานวน 24 คน

ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้าร่วมอบรม พอสรุปได้ ดังนี้

1. สภาพทั่วไป

พบว่าผู้เข้าร่วมอบรมทั้งหมด 24 คน เป็นเพศชาย จำนวน 4 คน (16.67%) เพศหญิง จำนวน 17 คน (70.83%) ไม่ตอบแบบสอบถาม จำนวน 3 คน (12.5%) ผู้เข้าอบรมที่ตอบแบบสอบถามจำนวน 21 คนประกอบด้วยพนักงานมหาวิทยาลัยบูรพา ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ จำนวน 11 คน (52.38%) ข้าราชการ ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ จำนวน 8 คน (38.10%) และอื่น ๆ จำนวน 2 คน (9.52%)

2. ความพึงพอใจต่อการจัดอบรม

ผลการประเมินความพึงพอใจโดยภาพรวมในการเข้าร่วมอบรม อยู่ในระดับมากที่สุด ($\bar{x}$ = 4.62) สรุปผลระดับความพึงพอใจในการอบรมมีดังนี้

ตารางที่ 1 สรุปผลประเมินความพึงพอใจของผู้เข้ารับการฝึกอบรม

ลำดับ	รายการประเมิน	5 มากที่สุด	4 มาก	3 ปานกลาง	2 น้อย	1 น้อยที่สุด	เฉลี่ย	ร้อยละ
ด้านการบริหารจัดการ								
1	การประชาสัมพันธ์ในการชักชวนให้เข้าร่วมอบรม	7	10	4	0	0	4.14	82.86
2	ความพร้อมในการจัดการอบรม	7	13	1	0	0	4.29	85.71.
3	ลำดับขั้นตอนและความต่อเนื่องของการจัดอบรม	12	9	0	0	0	4.57	91.43
4	ความเหมาะสมและระยะเวลาในการจัดอบรม	13	7	0	0	0	4.52	90.48
ด้านความรู้และการนำไปใช้ประโยชน์								
5	ความรู้ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายก่อนเข้าร่วมอบรม	2	1	7	5	6	2.43	48.57
6	ความรู้ความเข้าใจในหัวข้อบรรยาย/กิจกรรมหลังเข้าร่วมอบรม	3	17	1	0	0	4.10	81.90
7	ความรู้ที่ได้รับจากการอบรมที่ได้รับสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในการปฏิบัติงาน	12	8	1	0	0	4.52	90.48
8	ความรู้ที่ได้รับจากการอบรมสามารถนำไปบูรณาการกับงานด้านอื่น ๆ ได้	9	11	1	0	0	4.38	87.62
9	ความรู้ ประสบการณ์ ความสามารถในการถ่ายทอดความรู้และการตอบคำถามของวิทยากร	15	6	0	0	0	4.71	94.29
10	ความพึงพอใจโดยภาพรวมในการเข้าร่วมอบรม	13	8	0	0	0	4.62	92.38

หมายเหตุ ผลการประเมินคิดจากแบบสอบถามความพึงพอใจ 21 ใบ จากจำนวนผู้เข้าอบรม 24 คน

แผนการดำเนินงานโครงการฝึกอบรม

ตัวชี้วัด ความพึงพอใจผู้รับบริการ

เป้าหมาย เชิงคุณภาพ ผู้เข้ารับการอบรมมีระดับความพึงพอใจอย่างน้อยร้อยละ 80

งบประมาณ 60,433 บาท

ระยะเวลา 24-26 สิงหาคม 2559