รายงานการวิจัย

โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

Parasites and immunity of marine shellfishes along the east coast of Thailand

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
นันทิกา คงเจริญพร
นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2554 ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก ขอขอบคุณเกษตรกรที่เลี้ยงหอยบริเวณอ่างศิลา และเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2555

โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

สุพรรณี ลีโทชวลิต[1] จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1] นันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)[2]
และนารีรัตน์ ฤทธิรุตม์[1]

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131
[2] สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจ 5 ชนิด ได้แก่ หอยลาย (undulated surf clam, *Paphia undulata*) หอยนางรมปากจีบ (oyster, *Saccostrea* sp.), หอยแมลงภู่ (green mussel, *Perna viridis*), หอยแครง (blood cockle, *Anadara granosa*) และ หอยตลับ (Venus shell, *Meretrix casta*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรีของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2554 ในการสำรวจหาปรสิต *Perkinsus* ทำโดยวิธี Ray's Fluid Thioglycollate medium (RFTM) และศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของหอยทั้ง 5 ชนิดได้แก่ ปริมาณของเม็ดเลือดหอย ปริมาณโปรตีน ปริมาณเลคติน และปริมาณไลโซไซม์ จากผลการสำรวจหาปรสิต *Perkinsus* ในหอยพบว่ามีหอยเพียง 2 ชนิดที่ติดเชื้อปรสิต โดยในหอยลายและหอยนางรม พบเซลล์ปรสิตเฉลี่ย ตั้งแต่ 72 ถึง 207,536 และ 376 ถึง 6,504 เซลล์/ตัว และเมื่อตรวจหาระบบภูมคุ้มกันในเลือดพบว่ามีความแตกต่างกันไปในหอยแต่ละชนิด โดยพบว่าหอยตลับมีปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ยสูงสุด หอยลาย หอยนางรม และหอยแมลงภู่พบปริมาณเม็ดเลือดใกล้เคียงกัน ส่วนในหอยแครงจะพบปริมาณโปรตีนและไลโซไซม์สูงสุด ในขณะที่หอยนางรมมีปริมาณเลคตินมากที่สุด

Parasites and immunity of marine shellfishes along the east coast of Thailand

Supannee Leethochavalit[1] Janjarus Watanachote[1] Nanthika Khongchareonporn (Panchan)[2] and Nareerat Rittirut[1]

[1]Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131 THAILAND

[2]The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Institute Building 3, Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330 THAILAND

Abstract

This study aimed to investigate a possible of correlation between the prevalence of parasite infection and the immune response of five bivalve: undulated surf clam (*Paphia undulata*), oyster (*Saccostrea* sp.), green mussel (*Perna viridis*), blood cockle (*Anadara granosa*) and venus shell (*Meretrix casta*). Animals were obtained from the coast of Chonburi province, Thailand, all year round during October 2010 to September 2011. The *Perkinsus* infection intensity was evaluated by Ray's Fluid Thioglycollate medium (RFTM) method. Various immunological parameters were assessed in the hemolymph of the animals: total hemocyte counts, protein concentration, hemagglutinating titer (lectin) and lysozyme. The results showed that the *Perkinsus* was detected in undulated surf clam and oyster. Average infection intensity of the undulated surf clam and oyster varied from 72 to 207,536 and 376 to 6,504 cells/individual, respectively. The defense parameters showed the different among the five bivalve. The highest heamocyte density was detected in the Venus shell. While the heamocyte density in undulated surf clam oyster and green mussel gave the same density. The highest protein concentration and lysozyme was detected in blood cockle. While, the highest lectin was shown in oyster.

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญตาราง (ต่อ)

สารบัญภาพ

บทที่ 1
บทนำ

หอยเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีผู้นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย โดยเป็นสัตว์ที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงชนิดหนึ่ง ปัจจุบันทรัพยากรหอยทะเลในธรรมชาติ เริ่มมีปริมาณลดลงและมีแนวโน้มว่าจะมีราคาสูงขึ้น ทำให้มีการหันความสนใจมาทำการเพาะเลี้ยงหอยเป็นอาชีพ เพื่อทดแทนปริมาณที่ได้จากธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ประเทศไทยจะมีทรัพยากรหอยทะเลอุดมสมบูรณ์ และการเพาะเลี้ยงหอยกันเพิ่มขึ้น แต่ผลผลิตที่ได้ก็ยังมีปริมาณไม่แน่นอน มีคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้อุตสาหกรรมนี้อยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการขาดแคลนผลผลิตป้อนเข้าสู่ตลาด (คเชนทร, 2544)

ชนิดของหอยสองฝาที่ทำการเพาะเลี้ยงตามชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ หอยนางรมปากจีบ (*Saccostea* sp.) หอยแครง (*Anadara granosa*) หอยตลับขาว (*Mererix meretrix*, *M. lusoria*) และหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) การเลี้ยงหอยทะเลนี้อาจเสี่ยงต่อภาวะเรื่องโรคปรสิตอุบัติและก่อให้เกิดความเสียหายต่อผู้เลี้ยงไม่มากก็น้อย อีกทั้งปรสิตบางชนิดยังอาศัยหอยเป็นตัวกลางที่จะถ่ายทอดโรคมาสู่คนได้อีกด้วย โรคปรสิตในหอยส่วนมากจะเป็นปรสิตเซลล์เดียวจำพวกโปรโตซัว ซึ่งโปรโตซัวนี้จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อตัวหอยเอง ทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้าลง หอยผอม การสืบพันธุ์ลดลง หรือทำให้หอยตายในที่สุด ทั้งนี้การศึกษาเรื่องโรคปรสิตในหอยทะเลชนิดต่างๆ ในประเทศไทยยังมีผู้ทำการศึกษาน้อย แต่พบว่ามีโรคปรสิตที่อาจเกิดขึ้นในหอยทะเลหลายโรคถูกจัดเข้าไว้ในบัญชี The Aquatic Animal Health Code ขององค์กร OIE (World Organization for Animal Health) เช่น โรคที่เกิดจากปรสิต *Bonamia* sp. *Marteilia sydneyi*, *Martelioides chungmuensis*, และ *Mikrocytos mackini* เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อทำการศึกษาโรคปรสิตในหอยทะเลสองฝาที่ทำการเพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก รวมถึงการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของหอยดังกล่าวต่อปรสิต การผลิต polyclonal antibody ต่อปรสิตสำหรับใช้ในการตรวจหาปรสิตได้รวดเร็วขึ้น เพื่อเป็นการหาแนวทางในการป้องกันไม่ให้เกิดความสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจ และเป็นข้อมูลพื้นฐานของโรคปรสิตในหอยทะเลต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจปรสิตในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

2. เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของหอยเศรษฐกิจ

3. เพื่อผลิต Polyclonal antibody สำหรับใช้ตรวจหาปรสิตแต่ละชนิดในหอยทะเลด้วยเทคนิค Immunohistochemistry

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยสองฝาเป็นหอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยซึ่งพบว่ามีหลายชนิด เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ หอยแครง หอยลาย และหอยตลับ หอยเหล่านี้มีการเพาะเลี้ยงในจังหวัดบริเวณอ่าวไทยตอนบน และขยายพื้นที่ไปยังภาคใต้ อย่างไรก็ตามยังมีหอยอีกหลายชนิดที่คนไทยใช้เป็นอาหารและมีคุณค่าในระดับท้องถิ่น เช่นหอยลาย และหอยตลับ ที่พบได้ในธรรมชาติบริเวณจังหวัดชลบุรี เป็นต้น (คเชนทร, 2544)

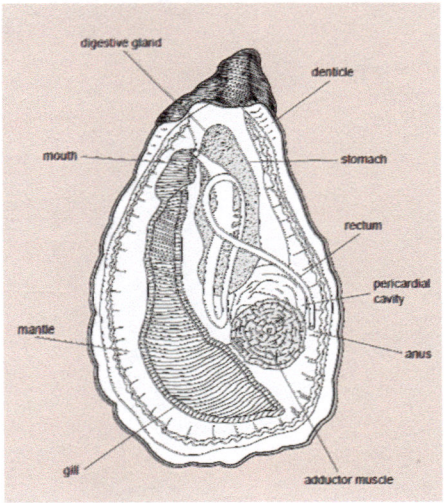
1. **หอยสองฝา** (Bivalve)

หอยนางรม (oyster)

หอยนางรม เป็นหอยสองฝาที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงมีผู้นิยมบริโภคหอยนางรมกันมาก ทำให้หอยนางรมมีราคาสูงเมื่อเทียบกับหอยชนิดอื่น ๆ สำหรับหอยนางรมที่นำมาบริโภคเกือบทั้งหมดเป็นหอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยอาศัยลูกหอยพันธุ์จากธรรมชาติ และปล่อยให้หอยที่เกิดกรองกินอาหารขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำเป็นอาหาร หอยนางรมและหอยตะโกรมที่นิยมทำการเพาะเลี้ยงจัดอยู่ใน Family Ostreidae ซึ่งมีผู้นิยมเลี้ยงกันมานานนับพันปี เช่น *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* และ *C. virginica* ที่นิยมเลี้ยงในประเทศทางทวีปยุโรปและสหรัฐอเมริกา (คเชนทร, 2544) สำหรับประเทศไทยมีพันธุ์หอยนางรมที่นิยมเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติอยู่หลายชนิด เช่น หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea* spp.) หอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) และหอยตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea iredalei*) การเลี้ยงหอยนางรมของประเทศไทยบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด พบว่ามีการเลี้ยงหอยนางรมขนาดเล็กกันมาก ส่วนภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา ปัตตานีและทะเลอันดามันจะมีการเลี้ยงหอยตะโกรมกรามดำและหอยตะโกรมกรามขาวกันมาก (นิพนธ์, 2546)

หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่เกาะอยู่กับที่โดยมีเปลือกข้างซ้ายติดอยู่กับวัสดุที่เป็นของแข็ง ดังนั้นหอยที่ลงยึดเกาะแล้วจึงไม่มีการเคลื่อนที่ตลอดชีวิตของหอย เนื่องจากหอยนางรมไม่มีเท้า (foot) ซึ่งต่างจากหอยสองฝาชนิดอื่น นอกจากนั้นหอยนางรมทุกชนิดยังมีกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) เพียง 1 อันเท่านั้น (คเชนทร, 2544) กายวิภาคพื้นฐานโดยทั่วไปของหอยนางรมแสดงในภาพที่ 2.1

ลักษณะทั่วไปของหอยนางรม



ภาพที่ 2.1 กายวิภาคพื้นฐานของหอยนางรม (McGladdery, Drinnan และ Stephenson, 1993)

หอยนางรมปากจีบ เป็นหอยสองฝาที่เปลือกทั้งสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน ฝาเปลือกล่างซึ่งเป็นด้านที่หอยใช้ยึดติดกับวัสดุมักมีขนาดใหญ่ โค้งคล้ายถ้วย ส่วนเปลือกด้านบนมีขนาดเล็กกว่าและค่อนข้างเรียบทำหน้าที่เปิดปิดให้น้ำและอาหารผ่านเข้าออก เปลือกทั้งสองข้างเชื่อมติดกันด้วยบานพับ (Hinge) ส่วนปลายสุดด้านบานพับมีลักษณะค่อนข้างแหลม ขอบเป็นรอยหยัก เมื่อเปิดฝาด้านบนออกพบเนื้อเยื่อบางๆสีขาวมีขอบสีน้ำตาล หรือสีดำปกคลุมอวัยวะภายในทั้งหมด โดยมีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางทำหน้าที่เปิดปิดฝาหอย สำหรับเหงือกสองคู่จะยาวเกือบตลอดลำตัว ทำหน้าที่กรองอาหาร ช่วยในการหายใจ และขับถ่ายของเสีย การกินอาหารของหอยนางรมส่วนใหญ่ได้จากการกรองน้ำโดยใช้เหงือก น้ำจะไหลผ่านเข้ามาในช่องว่างภายในลำตัว ผ่านเหงือกและไหลออกทางท่อน้ำออก อาหารหรือตะกอนต่างๆ ซึ่งถูกพัดมากับน้ำถูกกรองติดบนซี่เหงือก ขบวนการกรองของหอยสองฝาจะเป็นไปด้วยดีและมีประสิทธิภาพ เมื่อมีปริมาณน้ำไหลผ่านลำตัวมากพอ ดังนั้นหอยที่เลี้ยงอยู่ในน้ำตลอดเวลาจะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าหอยที่เลี้ยงในระดับน้ำขึ้นน้ำลง (สุพรรณี และคณะ, 2552)

หอยแครงเทศ (blood cockle, *Anadara granosa*)

หอยแครงเป็นอาหารทะเลที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด หอยแครงนี้จัดอยู่ในครอบครัว Arcidae ซึ่งการเลี้ยงหอยแครงในประเทศไทยมีมาเป็นเวลานานแล้ว โดยทำการรวบรวมพันธุ์หอยจากแหล่งลูกหอยในธรรมชาติ แล้วหว่านลงเลี้ยงในพื้นที่ที่เหมะสม สำหรับชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกนิยมเลี้ยงกันบริเวณจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด นอกจานี้ยังพบที่จังหวัดสมุทรสาคร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สตูล ปัตตานี ตรัง และจังหวัดระนอง (นิสราภรณ์, 2551)

ลักษณะทั่วไปของหอยแครงเทศ (*Anadara granosa*)

หอยแครงเป็นหอย 2 ฝา มีเปลือกค่อนข้างหนา กลม มีสัน และร่องในแนวตั้งเห็นชัด ทำให้ตามขอบเปลือกเป็นรอยหยัก ฝามีขนาดและลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 ฝา หัวเห็นไม่ชัด ไม่มีแผงฟัน (radula) ในช่องปาก เหงือกมีขนาดใหญ่ไว้สำหรับหายใจและกรองอาหารเป็นแบบ lamellibranch มีแมนเติลคลุมตัว ขอบของแมนเติลซ้ายและขวาไม่เชื่อมติดกัน หรืออาจเชื่อมเฉพาะจุด เปลือกมี 2 ฝา ฝาทั้งสองยึดติดกันด้วยบานพับ มีเพศผู้และเพศเมีย การผสมพันธุ์เป็นแบบภายนอกตัว และระยะที่เป็นตัวอ่อนเป็นแพลงก์ตอน เปลือกหอยครอบครัวนี้มีลักษณะเฉพาะ คือมีฟันซี่เล็กๆ เรียงเป็นแถวอยู่บนแนวบานพับ (hinge plate) ที่เป็นแนวตรง เปลือกค่อนข้างหนา มีสัน และร่องในแนวตั้ง (radial rib และ radial groove) เห็นชัด เอ็นอยู่ด้านนอกของเปลือก แมนเติลซ้ายขวาไม่เชื่อมติดกัน กล้ามเนื้อยึดเปลือกเจริญดี ไม่มีท่อน้ำ บางชนิดในเลือดมีสารฮีโมโกลบิล (Haemoglobin) ซึ่งเมื่อรวมกับอากาศจะเป็นสีแดง จึงได้ชื่อว่า blood clam หอยในครอบครัวนี้มีหลายชนิด รวมทั้งหอยแครงที่จัดเป็นหอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

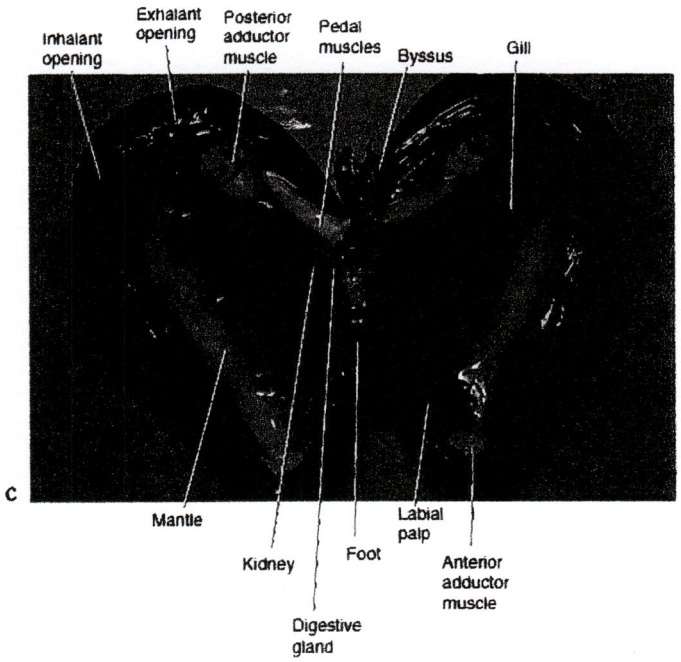
หอยแครงเป็นหอยที่มักฝังตัวอยู่ตามหาดเลนหรือโคลนละเอียดในบริเวณชายฝั่งทะเลจนถึงแนวที่อยู่ห่างจากฝั่งออกไปประมาณ 2 กิโลเมตร หอยแครงจะมีอุปนิสัยชอบฝังตัวอยู่ตามผิวดินโคลนลึกตั้งแต่ 1-12 นิ้ว โดยจะสังเกตเห็นเป็นรูจำนวน 2 รู ที่ผิวดินซึ่งเป็นช่องสำหรับทางน้ำเข้า-ออก และสามารถเห็นรอยการเคลื่อนที่ของหอยเป็นร่องๆ โดยใช้เท้าในการเคลื่อนที่เพื่อหาอาหาร หลบหลีกศัตรู และเพื่อหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม หอยแครงจะขึ้นมาที่ผิวดินเมื่อน้ำขึ้นเพื่อหาอาหาร และจะฝังตัวใต้ผิวดินเมื่อน้ำลงเพื่อป้องกันน้ำออกภายนอกตัวหอย แต่จะเปิดฝาทั้งสองเล็กน้อย โดยจะยังมีสภาวะการไหลเวียนของน้ำและการหายใจเกิดขึ้นเป็นปกติภายในเปลือก (นิสราภรณ์, 2551)

หอยแมลงภู่ (green mussel, *Perna viridis*)

เป็นสัตว์น้ำที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว จึงเป็นสัตว์ทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศแต่ละปีเป็นเงินจำนวนมาก เป็นหอยอีกชนิดหนึ่งที่มีรสชาติอร่อย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และราคาไม่แพงมาก มีแหล่งเลี้ยงในท้องที่จังหวัดชายฝั่งทะเลทั้งในบริเวณชายฝั่งของอ่าวไทยตอนนอก ชายฝั่งภาคตะวันออก และภาคใต้ หอยแมลงภู่เป็นสัตว์น้ำที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว โดยหอยจะกรองกินอาหารพวกแพลงก์ตอนพืช และสัตว์ขนาดเล็กที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในแหล่งเลี้ยง รวมทั้งอินทรียวัตถุที่แขวนลอยในน้ำ

หอยแมลงภู่เป็นหอย 2 ฝา มีขนาดและลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 ฝา หัวเห็นไม่ชัด ไม่มีแผงฟัน (radula) ในช่องปาก เหงือกมีขนาดใหญ่ไว้สำหรับหายใจและกรองอาหารเป็นแบบ lamellibranch มีแมนเติลคลุมตัว ขอบของแมนเติลซ้ายและขวาไม่เชื่อมติดกัน หรืออาจเชื่อมเฉพาะจุด เปลือกมี 2 ฝา ฝาทั้งสองยึดติดกันด้วยบานพับ มีเพศผู้และเพศเมีย การผสมพันธุ์เป็นแบบภายนอกตัว และระยะที่เป็นตัวอ่อนเป็นแพลงก์ตอน ลักษณะทั่วไปของหอยแมลงภู่ เปลือกมีลักษณะและขนาดเท่ากันทั้ง 2 ฝา ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน ส่วนแรกคือส่วนของเปลือกซึ่งยาวรีรูปไข่ ด้านหน้าแหลม ท้ายป้าน อัมโบอยู่ปลายหน้าสุด ฟันที่บานพับมีขนาดเล็กมี 1-2 ซี่ หรือไม่มีเลย ผิวด้านนอกของเปลือกเรียบมีสีเขียวเข้ม หรือสีน้ำตาลไหม้ ด้านในเป็นสีมุก ขอบของแมนเติลซ้ายและขวาเชื่อมกันที่ตอนท้ายตัว ส่วนที่สองคือเนื้อหอย ประกอบด้วยเยื่อหุ้มลำตัว (mantle) ซึ่งอยู่ติดกับฝาทั้งสองข้าง ส่วนพุง (visceral mass) ส่วนของเท้า (foot) ซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับหอยชนิดอื่น และมีรากหรือซัง (byssus) ซึ่งเป็นเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเหนียว เกิดจากสารประกอบของควิโนนแทนโปรตีน (guinone tanned protein) เส้นใยดังกล่าวอยู่บริเวณฐานของเท้าซึ่งหอยใช้สำหรับยึดเกาะกับเสาไม้ หิน หรือวัสดุอื่นๆ ที่อยู่ในน้ำ นอกจากนี้มีเหงือกขนาดใหญ่ (นิสราภรณ์, 2551) ลักษณะภายในของหอย Green mussel แสดงในภาพที่ 2.2

ลักษณะทั่วไปของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)



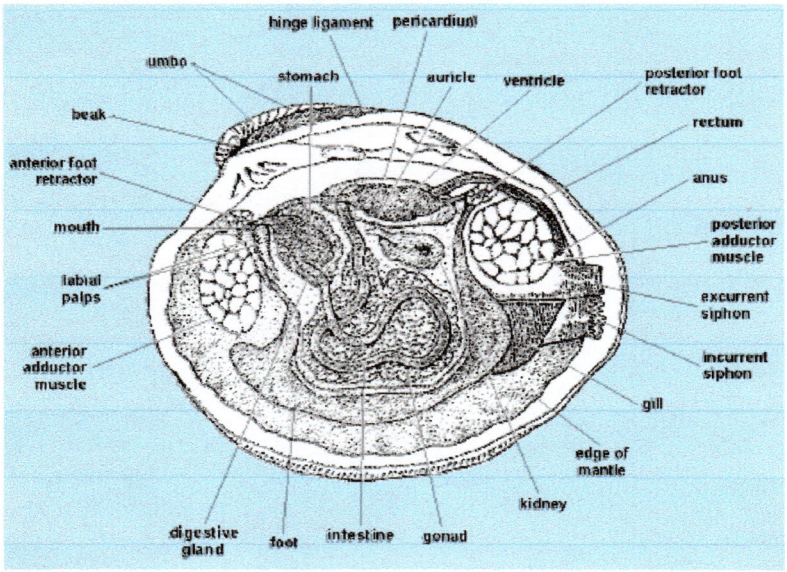
ภาพที่ 2.2 ลักษณะภายในของหอย Green mussel (*Mytilus edulis*) (Gosling, 2003)

หอยตลับขาว (hard clam, *Meretrix casta*)

หอยตลับ หรือที่มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นต่างๆ กัน เช่น หอยหวาน หอยตลับลาย หอยขาว เป็นต้น เป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่มีค่าทางเศรษฐกิจ เปลือก มีสีเปลือกและลวดลายต่างๆ กัน ตั้งแต่สีขาวเรียบ สีครีม ลายสีน้ำตาลอ่อน ไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม หอยในกลุ่มหอยตลับมีหลายชนิด พบทั้งทางฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน ที่สำคัญได้แก่ชนิด *Meretrix meretrix* พบมากทางฝั่งอ่าวไทย เช่น จังหวัดตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี และชนิด *Meretrix casta* พบมากทางฝั่งอันดามัน และแถบจังหวัดสมุทรสงคราม ชลบุรี และตราด หอยตลับสามารถนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารทะเลภายในประเทศแล้ว ยังสามารถแกะเนื้อส่งจำหน่ายไปยังต่างประเทศอีกเป็นจำนวนมาก ทำให้พันธุ์หอยในธรรมชาติมีปริมาณลดน้อยลงในทุกแหล่งการแพร่กระจาย

ลักษณะโดยทั่วไปของหอยตลับคือ มีรูปร่างรีคล้ายรูปไข่ จัดอยู่ในครอบครัว Veneridae ขนาดโตเต็มที่ประมาณ 8–10 ซม. มักฝังตัวอยู่ในโคลนหรือทรายโดยใช้เท้า (foot) เป็นอวัยวะช่วยในการขุดรูในพื้นโคลนหรือทราย พบอาศัยตามชายฝั่งทะเลในบริเวณที่เป็นทรายละเอียดปนโคลนในเขตน้ำขึ้น–ลง โดยฝังตัวอยู่ใต้พื้นทรายลึกประมาณ 5–10 ซม.หอยตลับเป็นหอยที่มีเพศแยก (คเชนทร ,2544) ลักษณะภายในของหอย quahog clam, *Mercenaria mercenaria* แสดงในภาพที่ 2.3

ลักษณะทั่วไปของหอยตลับ (*Meretrix casta*)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะภายในของหอย quahog clam, *Mercenaria mercenaria* (Encyclopedia article 'Bivalvia' : http:// accessscience.com/loadBinary.aspx?filename=08..)

หอยลาย (undulated surf clam, *Paphia undulata*)

หอยลายเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยอีกชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยเป็นจำนวนมากในแต่ละปี โดยทำเป็นหอยลายสำเร็จรูป เพื่อส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ทั้งนี้หอยลายเป็นหอยที่ไม่ต้องลงทุนเลี้ยง สามารถเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติได้ แหล่งที่พบหอยลายชุกชุมในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดตราด ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช

ชีววิทยาของหอยลาย (*Paphia undulata*)

หอยลายเป็นหอยสองฝาที่มีฝาทั้งสองเท่ากัน มีเปลือกบาง รูปร่างยาวรี มีลวดลายตาข่าย สีน้ำตาลพาดตลอดความยาวของเปลือก ขอบบนของฝาด้านในมีฟันอยู่ฝาละ 3 ซี่ จัดอยู่ใน Family Veneridae (สุนันท์, วัฒนา และปรานอม, 2528)

2. **ระบบภูมิคุ้มกันของหอยสองฝา** (Bivalve immunity)

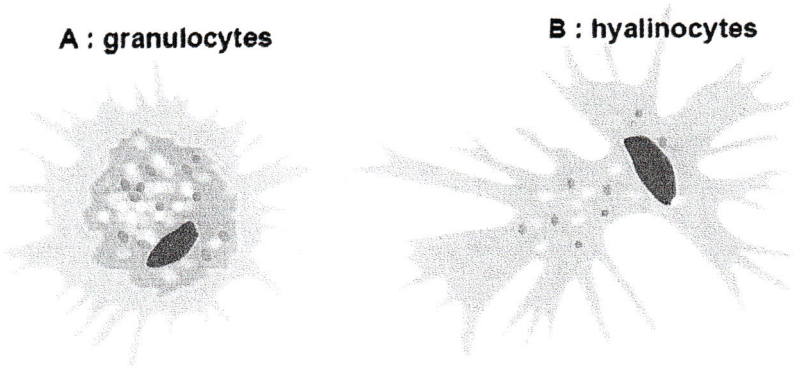
หอยสองฝาเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศทั่วโลก ชนิดที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ ได้แก่ หอยนางรม (oyster) หอยแมลงภู่ (mussel) หอยเชลล์ (scallop) และหอยตลับ (clam) เป็นต้น จากวิวัฒนาการของหอย จะพบว่าหอยสองฝาเหล่านี้มีความสามารถในการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคต่างๆ และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้เป็นอย่างดี ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากจึงได้หันมาสนใจทำการวิจัยระบบภูมิคุ้มกันและกลไกทางด้านโมเลกุลของหอย เพื่อประโยชน์ทางด้านการเพาะเลี้ยงต่อไปในอนาคต เนื่องจากหอยสองฝาเป็นสัตว์ในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นระบบภูมิคุ้มกันจึงขึ้นอยู่กับระบบ nonlymphoid เป็นส่วนใหญ่ กลไกการป้องกันภายในของหอยเป็นแบบ cellular component เช่น phagocytosis และ encapsulation ทำให้เชื้อโรคถูกทำลายโดย เอนไซม์ ระบบภูมิคุ้มกันที่พบในหอยอีกระบบได้แก่ ระบบ humoral components ซึ่งจะเกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ ของโมเลกุล

กลไกการป้องกันตัวของหอยในระบบ humoral factor จะประกอบด้วย lectin (agglutinin และ opsonin) lysosomal enzyme (phosphatase acid, lysozyme และ hydrolytic enzyme) antimicrobial peptide, protease inhibitor เป็นต้น (Cheng, 1996; Chu, 2000) ส่วนกลไกการป้องกันตัวแบบ cell-mediated เกิดในระบบไหลเวียนเลือดโดย hemocyte ซึ่งพบว่า hemocyte จะเป็นด่านแรกในการป้องกันตัวเอง เนื่องจากมันมีคุณสมบัติในการย่อยและทำลายจุลชีพต่างๆ (Hine, 1999; Canesi et al., 2002)

Hemocyte

หอยสองฝาเป็นสัตว์ที่มีระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิด โดยที่น้ำเลือด (hemolymph) จะผ่านออกทางปลายสุดของ arteries และผ่านไปยังอวัยวะต่างๆ ก่อนกลับเข้าสู่หัวใจผ่านทาง sinuses และ respiratory structures คือ เหงือก ซึ่งเซลล์ hemocyte นี้จะเป็นปราการเบื้องต้นในการต่อสู้กับเชื้อโรค โดยขบวนการที่ใช้ในการกำจัดเชื้อโรคได้แก่ กลไกที่เรียกว่า phagocytosis และ encapsulation นอกจากนี้ยังพบว่า antibacterial effectors, opsonins, nonspecific hydrolysis และ toxic oxygen intermediates ที่พบใน hemolymph จะเข้าช่วยในการกำจัดเชื้อ

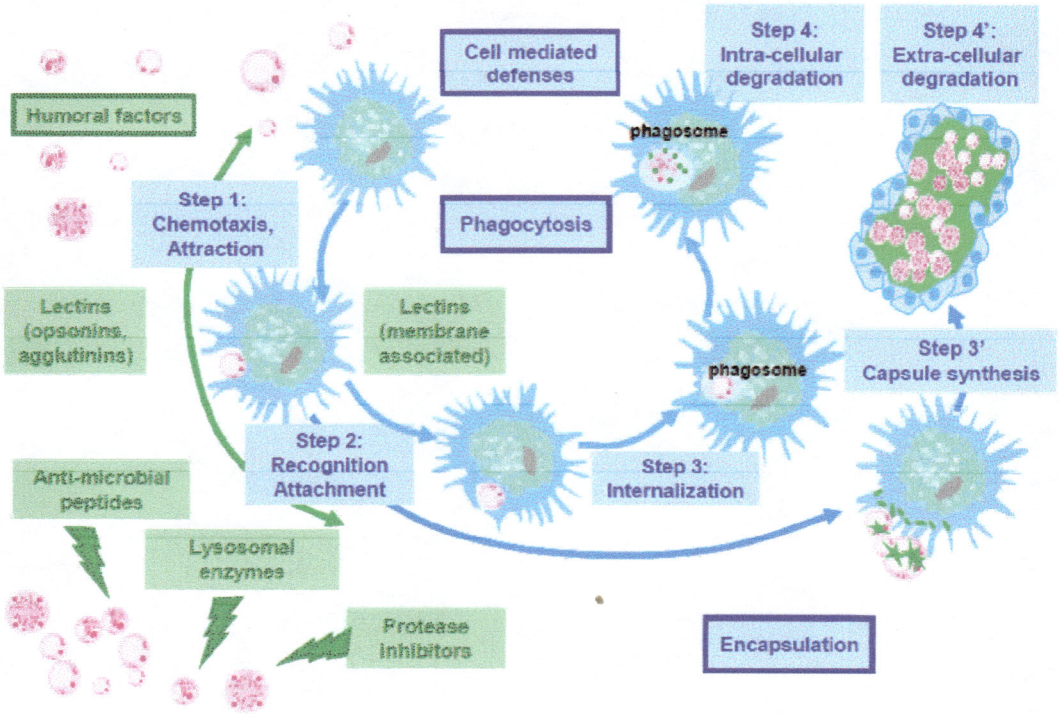
โรคอีกแรงหนึ่ง (Song et al., 2010) จากพื้นฐานการวิจัยด้านสัณฐานวิทยาและทางด้าน histochemistry จากหอยแมลงภู่ (mussels) และหอยตลับ (clams) พบว่า hemocyte ประกอบด้วย hyalinocytes และ granulocytes ซึ่ง granulocyte ยังสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ eosinophilic granular hemocytes และ basophilic granular hemocytes แต่อาจพบว่ามีเซลล์ชนิดอื่นๆ แตกต่างไปจากนี้ในหอยบางชนิด ซึ่งเซลล์ที่พบมากที่สุดในน้ำเลือดหอย คือ granular hemocytes ในเซลล์ชนิดนี้จะอุดมด้วย hydrolytic enzyme ที่จะช่วยก่อให้เกิดขบวนการ phagocytosis อย่างไรก็ตาม hyalinocyte มีความสามารถในพิเศษในการทำให้เลือดแข็งตัวและการรักษาแผลได้ดี (Ruddell, 1971; Suzuki et al, 1991)



ภาพที่ 2.4 ภาพร่างของเม็ดเลือดหอยชนิด granulocyte (A) และ hyalinocyte (B) (Soudant et al., 2008)

ขบวนการ phagocytosis เป็นขบวนการที่เกิดจากเซลล์จดจำและเข้าไปโอบล้อมเพื่อทำการย่อยสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย ยีสต์ และเซลล์อื่นๆ เป็นต้น เซลล์ phagocyte จะเข้าไปจับกับเซลล์บุกรุกก่อนจะมีการ phagocytosis ซึ่งพบว่าในเม็ดเลือดหอย การเข้าจับกับเซลล์ที่บุกรุกเข้ามานั้นอาจเกิดได้ทั้งจาก chemostatic และ chemokinetic reactions ขึ้นอยู่กับชนิดของโมเลกุล (Song et al., 2010)

การกำจัดและทำลายสิ่งแปลกปลอมแบบ cell-mediated ของหอยสองฝานั้นจะเกิดจากขบวนการ phagocytosis และการ encapsulation ของ hemocyte ขั้นตอนของทั้งสองขบวนการนี้แสดงในภาพที่ 2.5

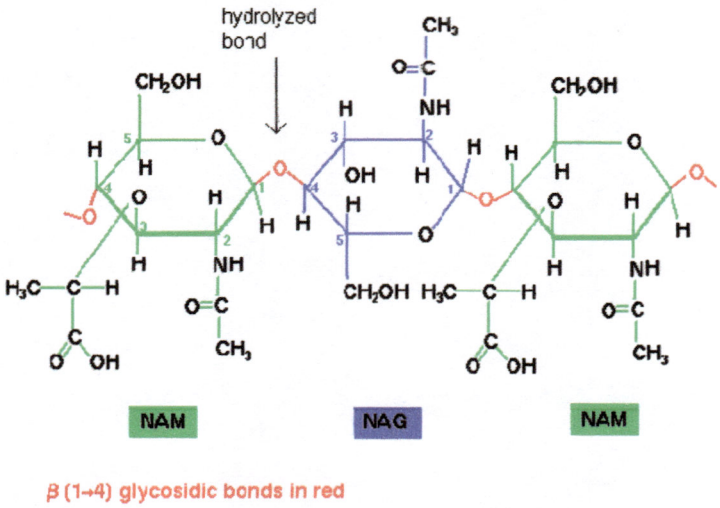


ภาพที่ 2.5 ลักษณะขบวนการป้องกันตนเองแบบ humoral และ cellular ในหอยสองฝาระหว่างเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต (Soudant et al., 2008)

Soudant และคณะ (2008) อธิบายขบวนการ phagocytosis ว่ามี 4 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 เกิดจาก chemotaxis หมายถึงการถูกดึงดูดเข้าหาเซลล์แปลกปลอมหรือเชื้อโรคโดยสารเคมีที่เซลล์แปลกปลอมหรือเชื้อโรคนั้นๆ ปล่อยออกมา ขั้นตอนที่ 2 เกิดการจดจำเซลล์แปลกปลอมหรือเชื้อโรคและเข้าไปเกาะติดโดย hemocyte ของหอย ขั้นตอนนี้เข้าใจว่าเกิดจากสาร lectin ที่พบในน้ำเลือดของหอยสองฝา ต่อจากนั้นขั้นตอนที่ 3 hemocyte จะมีการโอบล้อมและดูดกลืนเซลล์เหล่านั้นเข้าไปไว้ภายในเซลล์ โดยขบวนการที่เรียกว่า endocytosis ภายในเซลล์นี้จะสร้างเป็นถุง phagosome ขึ้นซึ่งขบวนการย่อยสลายจะเกิดภายในถุงนี้ ขั้นตอนที่ 4 เซลล์แปลกปลอมหรือเชื้อโรคจะถูกย่อยสลายไป โดย lysosomal granule จะเคลื่อนที่ไปยัง phagosome และหลอมเข้ากับผนังของ phagosome หลังจากนั้น hemocyte จะหลั่ง hydrolytic enzyme เข้าสู่ vacuole เพื่อย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่อไป

เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ (1,4-β-N-acetylmuramidases (EC 3.2.1.17)) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดและขบวนการ phagocytosis ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแบคทีเรีย ไลไซไซม์สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสลายพันธะ β-1,4-glycosidic ระหว่าง N-acetyl-muramic acid และ N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ส่งผลให้ชั้น peptidoglycan ถูกทำลายและเซลล์แตกออก ไลโซไซม์สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ชนิด ได้แก่ชนิด phage, bacteria, plant, chicken (c), goose (g) และ invertebrate (i) ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ ลำดับกรดอะมิโน, น้ำหนักโมเลกุล และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ (Yue et al., 2011)



ภาพที่ 2.6 การทำลายพันธะ β-1,4-glycosidic ระหว่าง N-acetyl- muramic acid (NAM) และ N-acetylglucosamine (NAG) บนผนังเซลล์แบคทีเรียโดยเอนไซม์ไลโซไซม์

ในปัจจุบันนี้ได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยถึง การเปลี่ยนแปลงของตัวแปรที่สัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral และ cellular ในขณะที่หอยสองฝาเกิดโรค Perkinsosis ในหลายประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวแปรที่สัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral และ cellular ที่เปลี่ยนแปลงขณะเกิดโรค Perkinsosis จากปรสิต *Perkinsus olseni* และ *P. marinus* (Soudant และคณะ, 2008)

Immune parameters	Oysters (*C. virginica*)	Clams (*R. philippinarum* or *R. decussatus*)
Total hemocyte count (cells/mL)	↑ (Anderson et al. 1992; Anderson et al. 1995; Chu & La Peyre 1993a / Field) ↑ (La Peyre et al. 1995b / Lab.)	↓ (Ordás et al. 2000, Casas 2002 / Field) ↑ (Flye Sainte Marie 2007 / Field)
Granulocyte count (cells/mL)	↑ (Chu 2000 / Field)	↑ (Flye Sainte Marie 2007 / Field)
% of phagocytic cells	↓ (La Peyre et al. 1995b; Goedken et al. 2005 / Lab.)	↓ (Ordás et al. 2000 ; Flye Sainte Marie 2007 / Field) → (Hégaret et al. 2007 ; da Silva et al. in press / Lab.)
ROS production (*in vivo*) ROS production (*in vitro*)	↑ (Anderson et al. 1992 ; La Peyre 1993 / Field) → (La Peyre et al. 1995b, Goedken et al. 2005 / Lab.) ↓ (La Peyre et al. 1995a ; Volety & Chu 1995 ; Anderson et al. 1995; Anderson 1999b ; Schott et al. 2003a / Lab.)	→ (Hégaret et al. 2007 ; da Silva et al. in press / Lab.)
RNI production	↑ (Villamil et al. 2007 / Lab.)	
Apoptosis	↓ (Sunila & LaBanca 2003 / Field)	→ (Hégaret et al. 2007, da Silva et al. in press / Lab.)
Phenoloxidase activity	↓ (Jordan & Deaton 2005 / Lab.)	↑ (Muñoz et al. 2006 / Field) → (Flye Sainte Marie 2007/ Field)
Lysozyme	→ (Chu & La Peyre 1989 / Field; Chu & La Peyre 1993b; Chu et al. 1993 / Lab.) ↑ Chu & La Peyre 1993a / Field) ↓ (La Peyre et al. 1995b / Lab.)	→ (Ordás et al. 2000 / Field)
Agglutination titer (*in vivo*) Agglutination titer (*in vitro*)	→ (Chu & La Peyre 1993a / Field) → (Chintala et al. 1994 / Field) ↑ (La Peyre et al. 1995b / Lab.) → (Fisher et al. 1992 / Lab.)	↑ (Ordás et al. 2000 ; Bulgakov et al. 2004 Kim et al. 2006 / Field) → (Hégaret et al. 2007, da Silva et al. in press / Lab.)
Protein content	↑ (La Peyre et al. 1995b / Lab.)	↑ (Ordás et al. 2000 / Field)

Field=Field study; Lab.=Laboratory study; ROS=Reactive oxygen species; RNI=Reactive nitrogen species; Arrows "↑", "↓", and "→" indicate the trend of changes: increase, decrease, and unchanged, respectively.

จากการวิจัยเหล่านี้จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางด้าน humoral และ cellular จะแตกต่างกันออกไปในหอยแต่ละชนิด ผลกระทบต่อค่าการเปลี่ยนแปลงนี้มักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อสรีระและระบบภูมิคุ้มกันของตัวหอยเอง ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของ

granulocyte concentration ของหอยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิมากกว่าเชื้อปรสิต (Flye Sainte Marie, 2007)

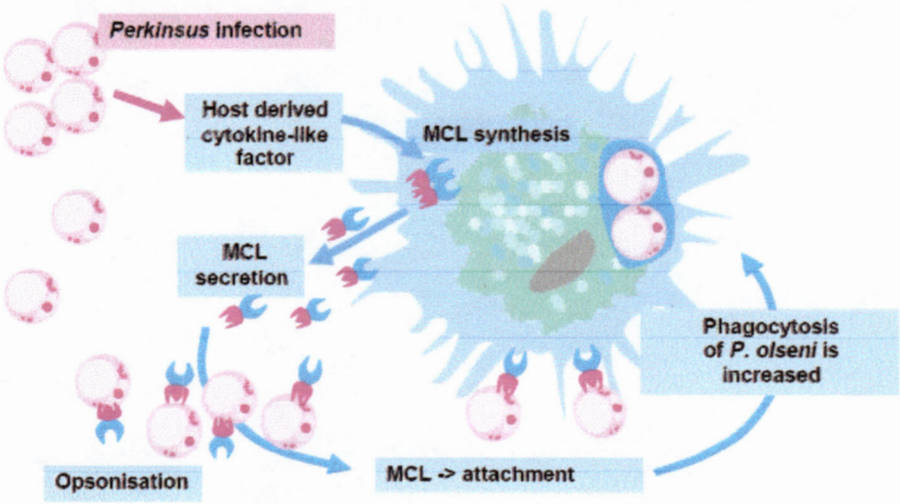
Specific immune response ของหอยต่อปรสิต *Perkinsus*

ในปัจจุบันการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของหอยต่อปรสิตชนิดนี้มักมุ่งความสนใจต่อการก่อให้เกิดโรคของปรสิตที่พบภายในหอย แต่มีบ้างที่มุ่งความสนใจไปยังผลกระทบของปรสิตต่อหอยเจ้าบ้าน เช่น ปรสิต *P. olseni* กับหอยชนิด *Ruditapes phillippinarum* และ *R. decussatus* หรือ ระหว่างปรสิต *P. marinus* กับหอยนางรมชนิด *Crassostrea viginica*

3. **เลคตินกับการติดเชื้อปรสิต *Perkinsus*** (Lectin and *Perkinsus* infection)

เลคติน (lectin) เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีบริเวณที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างน้อย 2 บริเวณ ดังนั้นจึงสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดหรือเซลล์แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มได้ หน้าที่ของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทะเลไม่กระดูกสันหลังหลายชนิดมีการศึกษาพบว่าสามารถเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดให้เกิดกระบวนการ phagocytosis เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวสัตว์ (Cooper and Lemmi, 1981) เลคตินจึงเป็นสารที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง เพราะทำหน้าที่คล้ายแอนติบอดีในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ต่างกันตรงที่เลคตินไม่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม

รายงานการศึกษาเลคตินของหอย Manila clam ที่พบระหว่างการติดเชื้อ *P. olseni* แสดงให้เห็นว่า ระหว่างการติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ หอย Manila clam จะสังเคราะห์ C-type lectin ที่เรียกว่า Manila clam lectin (MCL) เลคตินชนิดนี้สามารถจับบริเวณผิวเซลล์ของ *Perkinsus* ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเลคตินที่สร้างขึ้นมาไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นของเซลล์ปรสิต แต่เกิดจาก cytokine-like factor ของหอย ซึ่ง MCL จะถูกหลั่งเข้าสู่ hemolymph และเข้าไปเคลือบกับปรสิต *P. olseni* เพื่อให้เซลล์ของหอยจดจำได้และก่อให้เกิดการ phagocytosis เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2.7

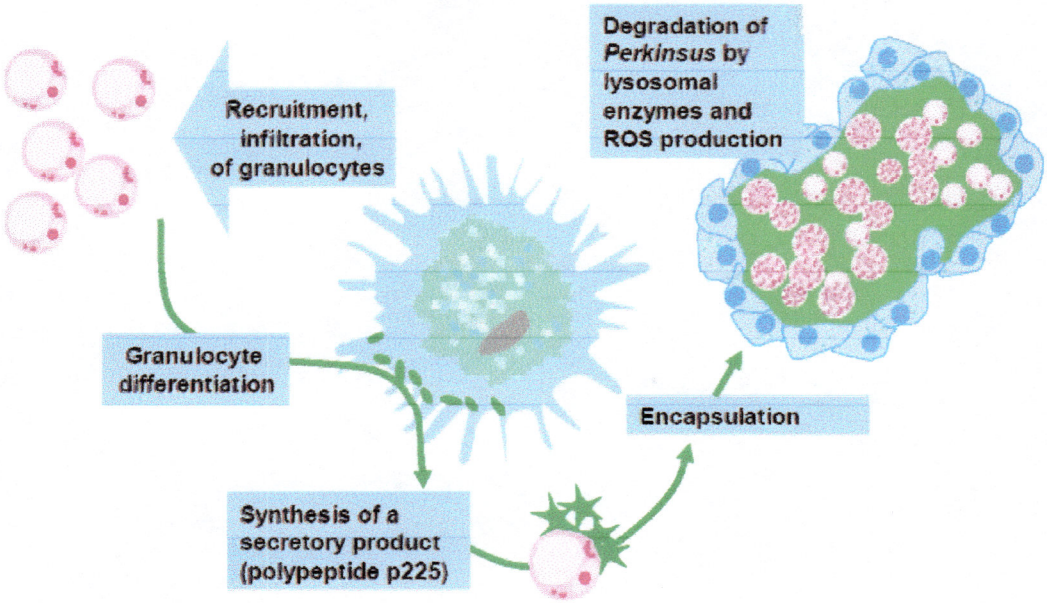


ภาพที่ 2.7 สมมุติฐานขบวนการการจดจำและกำจัดปรสิต *P. olseni* ของหอย Manila clam (Soudant และคณะ, 2008)

Tasumi และ Vasta (2007) รายงานไว้ว่า cell-bound lectin , galactin (CvGal) ที่พบในเม็ดเลือดของหอยนางรม *C. virginica* จะสามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตของปรสิต *P. marinus* นอกจากนี้ยังกล่าวว่า การเคลือบจับสิ่งแปลกปลอมและแพร่กระจายของเม็ดเลือดขณะติดเชื้อ จะชักนำการหลั่ง CvGal ไปยังเซลล์รอบๆ ได้ ซึ่งพบว่า hemocyte surface-associated CvGal จะแสดงลักษณะคล้ายเป็น receptor สำหรับ *P. marinus* และจะก่อให้เกิดการนำเข้าสู่เซลล์ของ host เพื่อนำไปกำจัดได้ง่ายขึ้น

4. เซลล์เม็ดเลือดกับการติดเชื้อปรสิต Perkinsus (Hemocyte encapsulation and *Perkinsus* infection)

ขบวนการเกิด encapsulation ต่อเซลล์ปรสิต จะพบได้ง่ายในสไลด์ทางด้านพยาธิสภาพ (Chagot et al. 1987; Navas et al. 1992; Montes et al., 1995b; Sagristá et al. 1995; Montes et al. 1996; Ordás et al. 2001; Park & Choi 2001; Casas 2002; Choi et al. 2002) ซึ่งขบวนการนี้ Cheng และ Rifkin (1970) กล่าวไว้ว่าเป็นวิธีการที่เซลล์เม็ดเลือดพยายามที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดย phagocytosis ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 ภาพจำลองแสดงการเกิด encapsulation ของ หอย *Ruditapes decussatus* และ *R. phillippinarum* ต่อปรสิต *P. olseni* (Saudant และคณะ, 2008)

บทที่ 3
วิธีทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างหอยลาย (*Paphia undulata*) หอยนางรม (*Saccostrea* sp.) หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) หอยแครง (*Anadara granosa*) และหอยตลับขาว (*Meretrix casta*) จาก จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนกันยายน พ.ศ.2554 ชนิดละ 40 ตัว

1.2 นำหอยตัวอย่างมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนักพร้อมเปลือกและน้ำหนักตัว เพื่อจดบันทึก

2. การตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธี Quantitative method (Wilson-Ormond, Powell, Choi & Song, 1993)

2.1 แกะหอยลาย หอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยแครงทั้งตัวจำนวน 30 ตัว/ชนิด มาบ่ม

ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM) พร้อม Streptomycin 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Penicillin 500 ยูนิต/มิลลิลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2.2 นำหอยทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการบ่มในอาหาร RFTM แล้ว มาย่อยด้วย 2 M NaOH ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3 นำตัวอย่างหอยทั้ง 4 ชนิด ที่ย่อยแล้วมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 x g เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม เพื่อล้าง NaOH ออกให้หมด ทำซ้ำจำนวน 3 รอบ

2.4 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อทำการนับต่อไป

2.5 สุ่มตัวอย่างที่ได้ 100 ไมโครลิตร ย้อมด้วย Lugol's iodine 100 ไมโครลิตร เพื่อนับจำนวน hypnospore ของ *Perkinsus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ครั้ง จดบันทึก แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (Wilson-Ormond et al., 1993; Almeida et al., 1999)

3. การเจาะเลือดหอย

3.1 ทำการเจาะเลือดหอยทั้ง 5 ชนิด ตัวที่ 1- 15 โดยเจาะผ่านกล้ามเนื้อยึดเปลือกไปที่หัวใจเพื่อทำการดูดเลือด (hemolymph) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2 นับเม็ดเลือดหอย (hemocyte) ทั้ง 5 ชนิด ตัวที่ 1-5 ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (hematocytometer) ตัวละ 3 ครั้ง หลังจากดูดเลือดแล้วทันที จดบันทึก เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.3 นำเลือดที่เหลือ ตัวที่ 6-15 ไปทดสอบระบบภูมิคุ้มกันแบบอื่นๆ ได้แก่เลคตินในน้ำเลือดและตรวจหาปริมาณไลโซไซม์

4. การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในน้ำเลือดหอยโดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Haemagglutination test)

4.1 การเตรียม 2% เม็ดเลือดแดง

นำเลือดใส่ลงในหลอดเหวี่ยงที่มีขีดบอกปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ถ่วง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำเลือดส่วนบนทิ้ง ล้างเม็ดเลือดโดยเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 30 มิลลิลิตร ลงในตะกอน คน และหมุนเหวี่ยง ล้างเม็ดเลือดดังนี้ 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายอ่านปริมาตรของเม็ดเลือดที่ได้ เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 3 เปอร์เซ็นต์

อ่านปริมาตรเม็ดเลือดแดงหลังการล้างครั้งสุดท้ายได้ปริมาตรเป็น 3.0 มิลลิลิตร ต้องเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์จนได้ปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร

4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

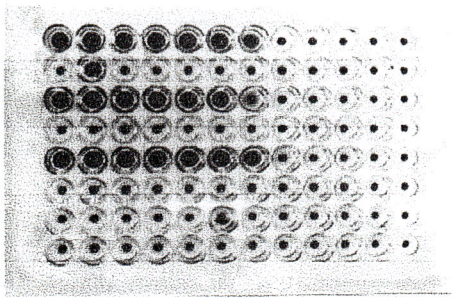
ทำการวิเคราะห์ในแผ่นไมโครไตเตอร์ (microtiter plate) ชนิด 8X12 หลุม ลักษณะก้น

หลุมเป็นรูปตัวยู มีความจุหลุมละ 300 ไมโครลิตร โดยเติมสารละลาย 0.85% NaCl ลงไปทุกหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิเปตน้ำเลือดหอยปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่หนึ่ง ปิเปตสารละลายจากหลุมที่หนึ่งมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สอง ปิเปตสารละลายในหลุมที่สองขึ้นมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สาม ทำดังนี้เป็นลำดับตั้งแต่หลุมบนซ้ายไปขวา (A1 ถึง B12) และจากบนลงล่าง สรุปขณะนี้ทุกหลุมมีเลคตินที่เจือจางต่างกันในปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 24 หลุม จากนั้นเติม 3% เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดสอบดังนี้ 3 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงสังเกตการณ์เกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และบันทึกผล หลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็น สีแดงกองรวมเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่กลางก้นหลุม และนับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน

4.3 การคำนวณปริมาณเลคติน

ทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มหาปริมาณเลคติน อย่างคร่าวๆ ได้จากค่าการเจือจางมากที่สุดที่เลคตินยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มมีค่าเป็น 2^n เมื่อ n คือ จำนวนหลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ตัวอย่างเช่น จากรูป 3.1 สารตัวอย่างสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มถึงหลุมที่ 7 จึงมีปริมาณเลคตินเท่ากับ 2^7 หรือเท่ากับ 128 ไตเตอร์ต่อปริมาตรสิ่งสกัด 50 ไมโครลิตร หรือ 2,560 ไตเตอร์/มิลลิลิตร และคำนวณหาค่า specific activity ของเลคตินได้จากสมการ

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{ปริมาณเลคติน (ไตเตอร์/มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างการทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม การทดสอบทำ 3 ชุด ชุดละ 24 หลุม (1A-12B, 1C-12D และ1E-12F) และชุดควบคุม ได้แก่ 1G-12H

โดยหลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงรวมกันเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่ตรงกลางก้นหลุม และนับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน

5. การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย

5.1 อุปรกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ lysozyme

Lysozyme from Hen egg white (EC.3.2.1.17), Sigma USA

Micrococcus luteus

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)

5.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ lysozyme

- เตรียม 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Hen egg white lysozyme (HEWL) ซึ่ง Hen egg white lysozyme 0.001 กรัม ละลายใน 0.05 M PBS pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- เตรียม 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 990 ไมโครลิตร

- เตรียม 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 980 ไมโครลิตร

- เตรียม 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 970 ไมโครลิตร

- เตรียม 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 960 ไมโครลิตร

- เตรียม 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 950 ไมโครลิตร

- เตรียม 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 920 ไมโครลิตร

- เตรียม 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 900 ไมโครลิตร

- เตรียม 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 850 ไมโครลิตร

- เตรียม 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรHEW ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 800 ไมโครลิตร

5.3 การวัดปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลาย (Determination of lysozyme actiity)

- เตรียมเชื้อ *M. luteus* วัดความเข้มข้นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตรได้ค่าการดูดกลืนแสง = 0.04 เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

- นำเชื้อที่ได้ swop ลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทิ้งไว้ 15 นาที

- เจาะหลุมขนาด 5 มิลลิเมตร plate ละ 4 หลุม

- ปิเปต lysozyme จาก hen white egg ที่เตรียมได้ความเข้มข้นแตกต่างกันในข้อ 5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ ในแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (clear zone) เป็นมิลลิเมตรหรือเซนติเมตร นำข้อมูล inhibition zone เขียนกราฟระหว่างปริมาณของไลโซไซม์กับเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก

- การตรวจหาไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยใช้น้ำเลือดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารแข็ง TSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดขนาด inhibition zone เป็นเซนติเมตร หาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานได้เป็นปริมาณของไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลาย

6. การตรวจหาเชื้อ Perkinsus โดยวิธี immunohistochemistry

1. ขั้นตอนการเตรียม Perkinsus
2. ขั้นตอนการเตรียมแอนติบอดีต่อ เชื้อ Perkinsus
3. ทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี dot-ELISA
   แล้วตรวจผลการทดสอบโดยบริเวณที่แอนติบอดีจับกับเชื้อ perkinsus บนเกระดาษจะมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การสำรวจปรสิต *Perkinsus* sp. ด้วยวิธี Quantitative method

1.1 จากการสำรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp.ในหอย 4 ชนิด ได้แก่ หอยลาย (*Paphia undulate*)หอยนางรม (*Saccostrea* .sp.) หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) หอยแครง (*Anadara granosa*) ชนิดละ 30 ตัว จากบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนตุลาคม พ.ศ.2554 ตามวิธี Quantitative method (Wilson-Ormond, Powell, Choi & Song, 1993) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 – 4.4

ตารางที่ 4.1 ผลการสำรวจ *Perkinsus* sp. ในหอยลาย *(P. undulata)* ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

วัน/เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย± SE (พร้อมเปลือก= กรัม)	น้ำหนักตัว± SE (กรัม)	No. of *Perkinsus* cell/clam±SE
ต.ค. 2553	30	4.90 ± 0.05	12.41±0.43	3.14 ± 0.14	63,196±41,318
พ.ย. 2553	30	4.39 ± 0.04	8.56±0.24	2.02 ± 0.06	104,210±18,975
ธ.ค. 2553	30	4.23 ± 0.07	8.46±0.37	1.90 ± 0.09	7,684±2,003
ม.ค. 2554	30	4.67 ± 0.05	12.00 ± 0.37	3.22 ± 0.09	151,133±29,186
ก.พ. 2554	30	4.79 ± 0.04	12.42 ± 0.04	3.63 ± 0.12	42,774±7,030
มี.ค. 2554	30	4.35±0.03	8.49±0.19	2.67±0.05	72±40
เม.ย. 2554	30	4.64±0.04	12.53±0.23	3.32±0.08	47,682±6,850
พ.ค. 2554	30	4.75±0.04	13.06±0.40	3.71±0.11	182,352±26,763
มิ.ย. 2554	30	4.52 ± 0.03	10.18±0.17	3.20 ± 0.07	0
ก.ค. 2554	30	4.41 ± 0.04	9.78±0.27	2.90 ± 0.08	0
ส.ค. 2554	30	4.45 ± 0.03	10.07±0.22	2.42 ± 0.08	0
ก.ย. 2554	30	4.30 ± 0.04	10.08 ± 0.30	2.46 ± 0.07	207,536±28,969

ตารางที่ 4.2 ผลการสำรวจ *Perkinsus* sp. ใน หอยนางรม (*Saccostrea* .sp.) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนกันยายน 2554

วัน/เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก=กรัม)	น้ำหนักตัว± SE (กรัม)	No. of *Perkinsus* cell/clam±SE
พ.ย. 2553	30	3.74±0.06	25.66±0.87	3.74±0.12	4894±984
ธ.ค. 2553	30	4.01±0.07	30.14±1.12	4.85±0.19	563±451
ม.ค. 2554	30	3.94±0.08	32.71±1.09	6.27±0.28	613±376
ก.พ. 2554	30	4.28±0.09	36.48±1.33	7.10±0.28	438±157
มี.ค. 2554	30	4.06±0.08	40.15±1.33	7.19±0.29	3089±731
เม.ย. 2554	30	4.60±0.09	43.01±1.37	7.07±0.25	927±503
พ.ค. 2554	30	4.11±0.08	29.33±1.07	4.48±0.17	1,192±430
มิ.ย. 2554	30	3.95±0.08	30.97±1.47	5.54±0.23	1,092±773
ก.ค. 2554	30	4.03±0.08	38.03±1.38	7.27±0.26	376±251
ส.ค. 2554	30	4.04±0.07	36.24±1.21	5.62±0.23	976±611
ก.ย. 2554	30	3.88±0.08	32.51±1.20	5.55±0.20	6,504±6,479

ตารางที่ 4.3 ผลการสำรวจ *Perkinsus* sp. ใน หอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

วัน/เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก=กรัม)	น้ำหนักตัว± SE (กรัม)	No. of *Perkinsus* cell/clam±SE
ต.ค. 2553	30	3.11±0.04	20.55±0.75	5.02±0.18	0
พ.ย. 2553	30	7.24±0.19	24.12±1.83	8.07±0.47	0
ธ.ค. 2553	30	3.07±0.07	21.40±1.37	4.23±0.28	0
ม.ค. 2554	30	7.38±0.09	25.56±1.12	7.16±0.27	0
ก.พ. 2554	30	2.83±0.03	13.45±0.48	4.30±0.13	0
มี.ค. 2554	30	2.75±0.02	16.06±0.57	4.85±0.14	0
เม.ย. 2554	30	2.94±0.10	13.19±0.63	4.66±0.18	0
พ.ค. 2554	30	2.88±0.07	20.26±2.01	4.92±0.28	0
มิ.ย. 2554	30	3.04±0.05	22.44±1.13	7.11±0.25	0
ก.ค. 2554	30	3.21±0.06	24.97±1.34	9.09±0.57	0
ส.ค. 2554	30	3.24±0.06	27.51±1.43	6.02±0.30	0
ก.ย. 2554	30	3.05±0.05	18.84±1.04	4.37±0.24	0

ตารางที่ 4.4 ผลการสำรวจ *Perkinsus* sp. ใน หอยแครง (*A. granosa*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

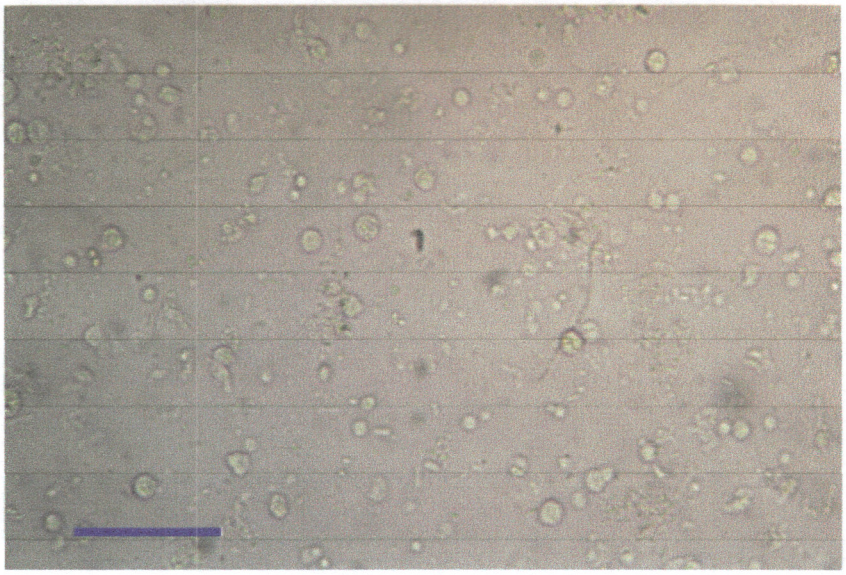
วัน/เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย± SE (พร้อมเปลือก=กรัม)	น้ำหนักตัว± SE (กรัม)	No. of *Perkinsus* cell/clam±SE
ต.ค. 2553	30	3.09±0.05	10.60±0.27	2.39±0.09	0
พ.ย. 2553	30	3.24±0.04	10.31±0.37	2.20±0.09	0
ธ.ค. 2553	30	3.27±0.04	10.67±0.33	2.60±0.11	0
ม.ค. 2554	30	3.42±0.05	13.47±0.58	2.68±0.17	0
ก.พ. 2554	30	3.88±0.04	19.41±0.60	4.80±0.15	0
มี.ค. 2554	30	3.87±0.04	18.33±0.57	4.05±0.13	0
เม.ย. 2554	30	3.63±0.06	14.07±0.54	2.93±0.10	0
พ.ค. 2554	30	3.92±0.04	18.92±0.58	3.91±0.15	0
มิ.ย. 2554	30	3.51±0.04	14.95±0.40	2.97±0.09	0
ก.ค. 2554	30	3.65±0.05	16.69±0.72	3.66±0.15	0
ส.ค. 2554	30	4.15±0.03	20.54±0.43	4.15±0.11	0
ก.ย. 2554	30	3.20±0.03	10.78±0.32	2.06±0.06	0

2. การตรวจนับเม็ดเลือดหอย

จากการตรวจนับเม็ดเลือด (hemocyte) ของหอยทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ หอยลาย (*P. undulata*หอยนางรม (*Saccostrea* .sp.) หอยแมลงภู่ (*P. viridis*) หอยแครง (*A. granosa*) และหอยตลับ (*M. casta*) จากบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2554 โดยทำการเจาะเลือดผ่านกล้ามเนื้อยึดเปลือกเข้าไปที่หัวใจ ชนิดละ 5 ตัว ทำการสุ่มนับเม็ดเลือด จากหอยแต่ละตัว จำนวน 3 ครั้ง จากสไลด์นับเม็ดเลือด จดบันทึกไว้เพื่อหาค่าเฉลี่ย พบว่าจำนวนเม็ดเลือดหอยแต่ชนิดมีค่าเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 4.5 – 4.9 และ ภาพที่ 4.1-4.3

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยลาย *(P. undulata)* ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก=กรัม)	น้ำหนักตัว± SE (กรัม)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (เซลล์/มิลลิลิตร±SE)
ต.ค. 2553	5	11.91±0.63	5.18±0.04	3.65±0.13	$0.59 \times 10^{10} \pm 0.13 \times 10^{10}$
พ.ย. 2553	5	4.26±0.11	7.98±0.74	1.94±0.19	$0.31 \times 10^{10} \pm 0.09 \times 10^{10}$
ธ.ค. 2553	5	4.68±0.13	11.48±1.17	2.42±0.23	$0.73 \times 10^{10} \pm 0.08 \times 10^{10}$
ม.ค. 2554	5	4.71±0.19	13.15±1.44	3.30±0.34	$0.34 \times 10^{10} \pm 0.03 \times 10^{10}$
ก.พ. 2554	5	4.76±0.11	11.95±1.42	3.86±0.40	$0.45 \times 10^{10} \pm 0.02 \times 10^{10}$
มี.ค. 2554	5	4.36±0.04	8.84±0.43	2.68±0.07	$0.71 \times 10^{10} \pm 0.05 \times 10^{10}$
เม.ย. 2554	5	4.66±0.08	12.88±0.62	3.44±0.20	$0.83 \times 10^{10} \pm 0.09 \times 10^{10}$
พ.ค. 2554	5	4.62±0.04	12.60±0.18	3.52±0.25	$1.75 \times 10^{10} \pm 0.22 \times 10^{10}$
มิ.ย. 2554	5	4.47±0.12	10.25±0.16	3.08±0.02	$0.89 \times 10^{10} \pm 0.0021 \times 10^{10}$
ก.ค. 2554	5	4.44±0.02	10.51±0.67	2.87±0.19	$0.52 \times 10^{10} \pm 0.0036 \times 10^{10}$
ส.ค. 2554	5	4.41±0.08	10.16±0.30	2.66±0.16	$0.32 \times 10^{10} \pm 0.0023 \times 10^{10}$
ก.ย. 2554	5	4.32±0.09	10.16±0.36	2.49±0.03	$0.66 \times 10^{10} \pm 0.09 \times 10^{10}$



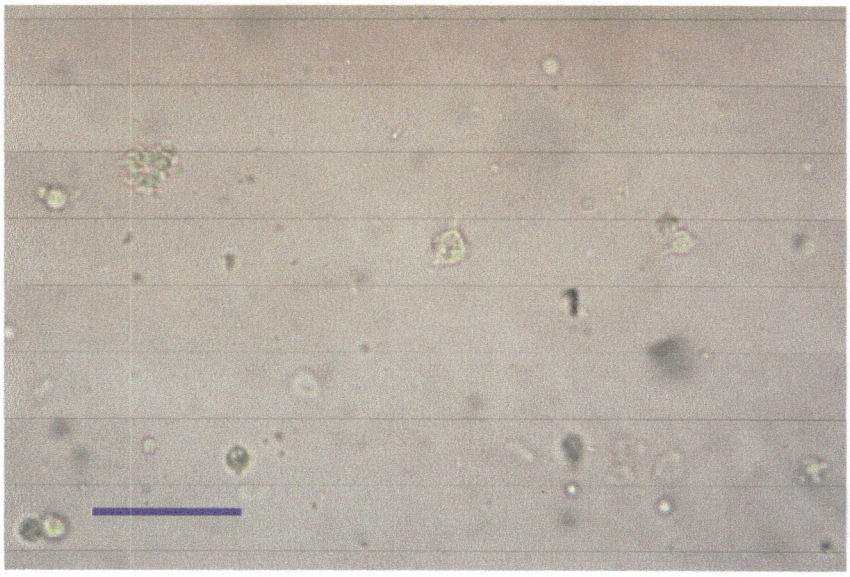
ภาพที่ 4.1 ลักษณะเม็ดเลือดในหอยลาย (*P. undulata*) Scalbar = 50 μm

ตารางที่ 4. 6 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยนางรม (*Saccostrea* .sp.) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก= กรัม)	น้ำหนักตัว ± SE (กรัม)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (เซลล์/มิลลิลิตร±SE)
พ.ย. 2553	5	3.74±0.21	23.86±1.86	3.65±0.20	$0.53x10^{10} \pm 0.13 x10^{10}$
ธ.ค. 2553	5	3.71±0.21	29.41±3.26	5.03±0.49	$0.74x10^{10} \pm 0.10 x10^{10}$
ม.ค. 2554	5	4.30±0.23	34.435±3.42	7.10±1.11	$0.54x10^{10} \pm 0.03 x10^{10}$
ก.พ. 2554	5	4.40±0.22	40.05±1.94	7.21±0.30	$0.63x10^{10} \pm 0.07x10^{10}$
มี.ค. 2554	5	4.16±0.17	36.31±1.40	7.50±0.38	$0.61x10^{10} \pm 0.09x10^{10}$
เม.ย. 2554	5	4.55±0.06	42.30±3.32	6.91±0.04	$1.21x10^{10} \pm 0.14 x10^{10}$
พ.ค. 2554	5	4.30±0.26	33.01±2.26	4.36±0.68	$1.20x10^{10} \pm 0.23 x10^{10}$
มิ.ย. 2554	5	4.33±0.08	33.96±3.69	5.13±0.29	$0.58x10^{10} \pm 0.10x10^{10}$
ก.ค. 2554	5	3.97±0.20	39.47±2.55	7.26±0.49	$0.39x10^{10} \pm 0.05 x10^{10}$
ส.ค. 2554	5	3.95±0.15	37.18±3.51	6.09±0.64	$0.50x10^{10} \pm 0.04 x10^{10}$
ก.ย. 2554	5	3.83±0.15	34.35±1.91	5.94±0.50	$0.25x10^{10} \pm 0.03x10^{10}$

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

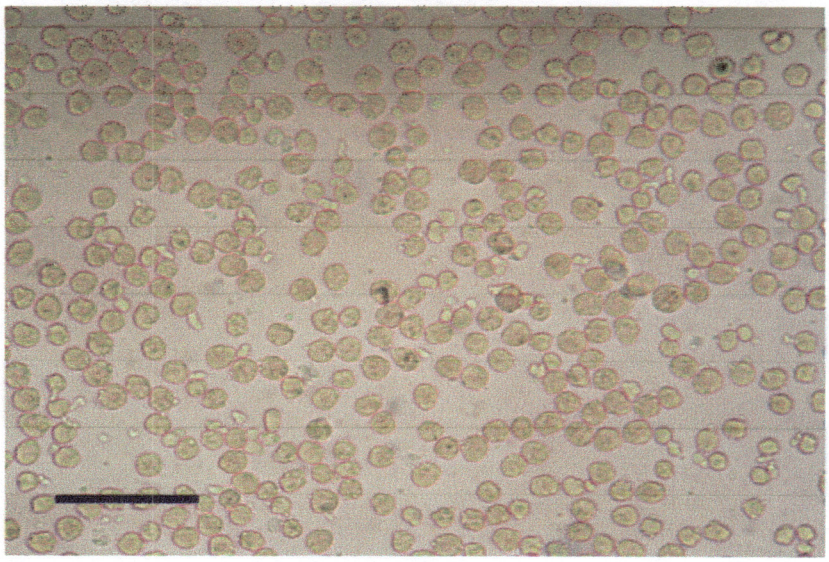
เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก= กรัม)	น้ำหนักตัว ± SE (กรัม)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (เซลล์/มิลลิลิตร±SE)
ต.ค. 2553	2	3.19±0.09	21.08±0.15	5.85±0.68	$3.62 \times 10^{10} \pm 0.76 \times 10^{10}$
พ.ย. 2553	5	8.15±0.36	32.86±5.22	9.89±0.79	$0.24 \times 10^{10} \pm 0.03 \times 10^{10}$
ธ.ค. 2553	5	3.16±0.14	26.75±2.74	5.22±0.52	$0.31 \times 10^{10} \pm 0.03 \times 10^{10}$
ม.ค. 2554	5	7.61±0.27	30.13±3.52	8.40±0.63	$0.20 \times 10^{10} \pm 0.02 \times 10^{10}$
ก.พ. 2554	5	2.89±0.11	13.64±1.52	3.99±0.44	$0.20 \times 10^{10} \pm 0.03 \times 10^{10}$
มี.ค. 2554	5	2.69±0.07	14.66±0.61	4.31±0.19	$0.30 \times 10^{10} \pm 0.07 \times 10^{10}$
เม.ย. 2554	5	2.66±0.09	12.28±0.57	4.70±0.43	$0.77 \times 10^{10} \pm 0.06 \times 10^{10}$
พ.ค. 2554	5	3.51±0.19	40.56±6.84	7.74±0.92	$0.24 \times 10^{10} \pm 0.05 \times 10^{10}$
มิ.ย. 2554	5	3.20±0.14	23.88±3.34	7.33±0.52	$0.90 \times 10^{10} \pm 0.13 \times 10^{10}$
ก.ค. 2554	5	3.58±0.06	36.28±1.86	13.54±0.74	$0.77 \times 10^{10} \pm 0.27 \times 10^{10}$
ส.ค. 2554	5	3.11±0.12	25.00±2.01	5.29±0.53	$0.45 \times 10^{10} \pm 0.04 \times 10^{10}$
ก.ย. 2554	5	3.09±0.11	20.64±2.67	4.97±0.59	$0.19 \times 10^{10} \pm 0.04 \times 10^{10}$



ภาพที่ 4.2 ลักษณะเม็ดเลือดในหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) *Scale* bar = 50 μm

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยแครง (*A. granosa*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

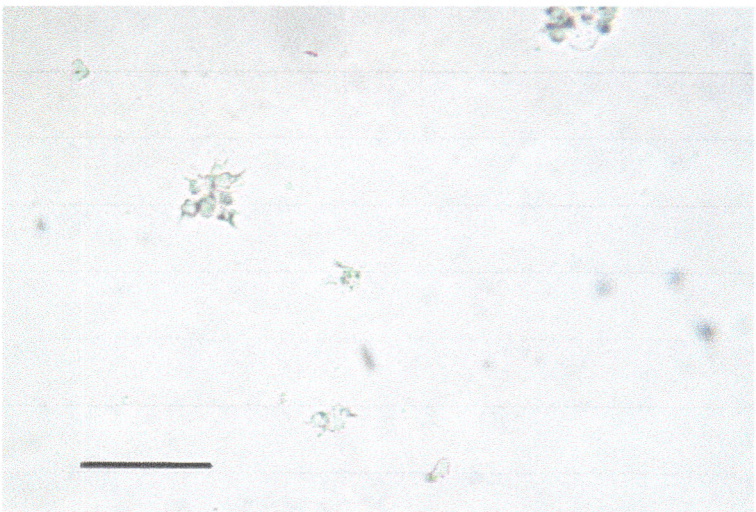
เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก= กรัม)	น้ำหนักตัว ± SE (กรัม)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (เซลล์/มิลลิลิตร±SE)
ต.ค. 2553	5	3.23±0.07	10.66±0.36	2.66±0.18	$192.08 \times 10^{10} \pm 117.8 \times 10^{10}$
พ.ย. 2553	5	3.38±0.05	10.84±0.46	2.32±0.11	$243.80 \times 10^{10} \pm 31.96 \times 10^{10}$
ธ.ค. 2553	5	3.19±0.05	10.84±0.30	2.24±0.08	$233.53 \times 10^{10} \pm 10.56 \times 10^{10}$
ม.ค. 2554	5	3.69±0.12	17.44±2.27	3.50±0.63	$233.53 \times 10^{10} \pm 27.34 \times 10^{10}$
ก.พ. 2554	5	3.86±0.08	20.29±1.51	4.58±0.29	$246.47 \times 10^{10} \pm 32.48 \times 10^{10}$
มี.ค. 2554	5	3.77±0.13	17.65±0.70	4.05±0.10	$323.80 \times 10^{10} \pm 70.40 \times 10^{10}$
เม.ย. 2554	5	3.80±0.28	15.08±1.40	2.94±0.28	$192.00 \times 10^{10} \pm 28.17 \times 10^{10}$
พ.ค. 2554	5	3.89±0.06	18.69±0.88	3.94±0.22	$210.00 \times 10^{10} \pm 35.75 \times 10^{10}$
มิ.ย. 2554	5	3.70±0.08	16.43±1.61	3.10±0.13	$2.01 \times 10^{10} \pm 0.51 \times 10^{10}$
ก.ค. 2554	5	4.06±0.06	20.80±1.38	4.61±0.33	$2.46 \times 10^{10} \pm 0.59 \times 10^{10}$
ส.ค. 2554	5	4.19±0.05	21.32±1.08	4.10±0.25	$1.91 \times 10^{10} \pm 6.21 \times 10^{10}$
ก.ย. 2554	5	3.31±0.05	11.16±0.24	2.06±0.11	$1.39 \times 10^{10} \pm 0.25 \times 10^{10}$



ภาพที่ 4.3 ลักษณะเม็ดเลือดหอยแครง (*A. granosa*) Scale bar = 50 μm

ตารางที่ 4.9 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยตลับ (*M. casta*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554

เดือน/ปี	จำนวนตัว	ขนาดเปลือก ±SE (กว้าง=ซ.ม.)	น้ำหนักหอย ± SE (พร้อมเปลือก= กรัม)	น้ำหนักตัว± SE (กรัม)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือด (เซลล์/มิลลิลิตร±SE)
พ.ย. 2553	5	4.82±0.15	33.61±4.90	4.86±0.54	$0.76x10^{10}$± $0.06 x10^{10}$
ธ.ค. 2553	5	4.80±0.24	33.05±4.46	4.49±0.35	$1.08x10^{10}$± $0.24x10^{10}$
ม.ค. 2554	5	4.98±0.12	37.24±2.52	5.62±0.54	$0.99x10^{10}$± $0.22 x10^{10}$
ก.พ. 2554	5	5.41±0.16	46.03±4.19	7.33±0.56	$1.06x10^{10}$±$0.11x10^{10}$
มี.ค. 2554	5	5.30±0.05	45.00±1.76	7.39±0.40	$0.83x10^{10}$± $0.15 x10^{10}$
เม.ย. 2554	5	3.60±0.04	14.04±0.75	1.96±0.10	$0.89x10^{10}$± $0.08x10^{10}$
พ.ค. 2554	5	4.06±0.08	18.90±1.37	3.07±0.30	$0.77x10^{10}$± $0.08 x10^{10}$
มิ.ย. 2554	5	4.33±0.05	23.81±0.81	3.68±0.07	$0.78x10^{10}$± $0.21 x10^{10}$
ก.ค. 2554	5	4.31±0.05	24.52±0.60	4.05±0.19	$0.77x10^{10}$± $0.19x10^{10}$
ส.ค. 2554	5	4.17±0.09	21.97±1.57	3.15±0.24	$0.44x10^{10}$± $0.11 x10^{10}$
ก.ย. 2554	5	4.17±0.04	21.80±0.66	3.69±0.23	$0.26x10^{10}$±$0.03x10^{10}$



ภาพที่ 4.4 ลักษณะเม็ดเลือดหอยตลับ (*M. casta*) Scale bar = 50 µm

3. การตรวจหาปริมาณเลคติน

จากการตรวจหาปริมาณเลคตินในน้ำเลือดหอยทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ หอยลาย (*P. undulate*) หอยนางรม (*Saccostrea* .sp.) หอยแมลงภู่ (*P. viridis*) หอยแครง (*A. granosa*) และหอยตลับ (*M. casta*) จากบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2554 ที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี โดยการทดสอบความสามารถโปรตีนในน้ำเลือดหอยดังกล่าวในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่ม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10 – 4.15

ตารางที่ 4.10 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยลาย (*P. undulata*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ A				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ B				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ AB			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก. โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก. โปรตีน)
ต.ค.2553	2	40	0.53	75.47	2	40	0.53	75.47	2	40	0.53	75.47
พ.ย.	8	160	0.51	313.72	8	160	0.51	313.73	0	0	0.51	0
ธ.ค.	8	160	2.11	75.83	8	160	2.11	75.83	16	320	2.11	151.65
ม.ค. 2554	16	320	0.95	336.84	64	1280	0.95	1347.36	8	160	0.95	168.42
ก.พ.	2	40	0.17	235.29	-	-	0.17	-	8	160	0.17	941.18
มี.ค.	*	*	0.20	*	*	*	0.20	*	*	*	0.20	*
เม.ย.	8	160	0.25	640.0	-	-	0.25	-	8	160	0.25	640
พ.ค.	16	320	0.87	367.82	-	-	0.87	-	8	160	0.87	183.91
มิ.ย.	64	1280	1.34	955.22	64	1280	1.34	955.22	128	2560	1.34	1910.45
ก.ค.	32	640	0.55	1163.64	32	640	0.55	1163.64	128	2560	0.55	4654.55
ส.ค.	32	640	0.09	7111.11	-	-	0.09	-	128	2560	0.09	28444.44
ก.ย.	16	320	0.65	492.31	-	-	0.65	-	64	1280	0.65	1969.23

หมายเหตุ - ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากไม่มีเลือดหมู่ดังกล่าวในเดือนนั้น

* ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 4.11 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยลาย (*P. undulata*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ O			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
มิ.ย. 2554	64	1280	1.34	955.22
ก.ค.	128	2560	0.55	4654.55
ส.ค.	32	640	0.09	7111.11
ก.ย.	32	640	0.65	984.26

ตารางที่ 4.12 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ A				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ B				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ AB			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก. โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก. โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
พ.ย. 2553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ธ.ค.	1024	20480	-	-	512	10240	-	-	256	5120	-	-
ม.ค. 2554	512	10240	4.11	2491.48	32	640	4.11	155.72	64	1280	4.11	311.43
ก.พ.	128	2560	4.13	619.85	64	1280	4.13	309.93	64	1280	4.13	309.93
มี.ค.	512	10240	2.52	4063.49	128	2560	2.52	1015.87	256	5120	2.52	2031.75
เม.ย.	256	5120	3.42	1497.08	128	2560	3.42	748.54	128	2560	3.42	748.54
พ.ค.	256	5120	3.81	1343.83	128	2560	3.81	671.92	128	2560	3.81	671.92
มิ.ย.	2048	40960	4.77	8587.00	1024	20480	4.77	4293.50	2048	40960	4.77	8587.00
ก.ค.	1024	20480	3.94	5197.97	512	10240	3.94	2598.98	1024	20480	3.94	5197.97
ส.ค.	256	5120	0.84	6095.24	-	-	0.84	-	256	5120	0.84	6095.24
ก.ย.	128	2560	0.70	3657.14	-	-	0.70	-	64	1280	0.70	1828.57

ตารางที่ 4.13 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรม (*Saccostrea* sp.) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ O			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
มิ.ย. 2554	512	10240	4.77	2146.75
ก.ค.	1024	20480	3.94	5197.97
ส.ค.	128	2560	0.84	3047.62
ก.ย.	512	10240	0.70	14628.57

ตารางที่ 4.14 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ A				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ B				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ AB			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก. โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก. โปรตีน)
ต.ค.2553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
พ.ย.	4	80	0.69	115.94	16	320	0.69	463.77	16	320	0.69	463.77
ธ.ค.	8	160	1.409	113.56	16	320	1.41	227.11	8	160	1.409	113.56
ม.ค. 2554	16	320	0.181	1769.0	-	-	0.18	-	8	160	0.18	884.96
ก.พ.	2	40	0.409	97.78	-	-	0.41	-	2	40	0.41	97.78
มี.ค.	16	320	0.379	843.44	-	-	0.38	-	8	160	0.38	421.72
เม.ย.	8	160	0.898	179.78	-	-	0.89	-	8	160	0.89	179.78
พ.ค.	4	80	0.96	83.33	-	-	0.96	-	8	160	0.96	166.67
มิ.ย.	64	1280	1.05	1219.05	32	640	1.05	609.52	64	1280	1.05	1219.05
ก.ค.	2	40	0.91	43.96	2	40	0.91	43.96	4	80	0.91	87.91
ส.ค.	8	160	0.13	1230.77	-	-	0.13	-	8	160	0.13	1230.77
ก.ย.	32	640	0.76	842.11	-	-	0.76	-	32	640	0.76	842.11

ตารางที่ 4.15 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ O			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
มิ.ย. 2554	32	640	1.05	609.52
ก.ค.	2	40	0.91	43.96
ส.ค.	16	320	0.13	2461.54
ก.ย.	64	1280	0.76	1684.21

ตารางที่ 4.16 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครง (*A. granosa*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ A				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ B				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ AB			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
ต.ค.2553	2	40	1.90	21.05	8	160	1.90	84.21	8	160	1.90	84.21
พ.ย.	4	80	20.57	3.89	4	80	20.57	3.89	2	40	20.57	1.94
ธ.ค.	16	320	22.98	13.93	16	320	22.98	13.93	8	160	22.98	6.96
ม.ค. 2554	8	160	28.37	5.64	8	160	28.37	5.64	8	160	28.37	5.64
ก.พ.	16	320	28.37	11.28	-	-	28.37	-	16	320	28.37	11.28
มี.ค.	16	320	17.81	17.97	-	-	17.81	-	16	320	17.81	17.97
เม.ย.	8	160	5.45	29.36	-	-	5.45	-	8	160	5.45	29.36
พ.ค.	4	80	9.14	8.75	-	-	9.14	-	8	160	9.14	17.50
มิ.ย.	8	160	8.31	19.25	16	320	8.31	38.51	16	320	8.31	38.51
ก.ค.	2	40	9.91	4.04	8	160	9.91	16.15	2	40	9.91	4.04
ส.ค.	2	40	1.30	30.77	-	-	1.30	-	2	40	1.30	30.77
ก.ย.	0	0	2.07	0	-	-	2.07	-	0	0	2.07	0

ตารางที่ 4.17 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครง (*A. granosa*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ O			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
มิ.ย. 2554	8	160	8.31	19.25
ก.ค.	8	160	9.91	16.15
ส.ค.	4	80	1.30	61.54
ก.ย.	0	0	2.07	0

ตารางที่ 4. 18 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยตลับ (*M. casta*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ A				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ B				ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ AB			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มล.)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
พ.ย. 2553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ธ.ค. 2553	8	160	1.94	82.29	4	80	1.94	41.14	4	80	1.94	82.29
ม.ค. 2554	2	40	1.62	24.68	-	-	1.62	-	4	80	1.62	49.37
ก.พ.	0	0	0.39	0	-	-	0.39	-	0	0	0.39	0
มี.ค.	8	160	0.37	436.09	-	-	0.37	-	2	40	0.37	109.02
เม.ย.	16	320	0.37	864.86	-	-	0.37	-	16	320	0.37	864.86
พ.ค.	16	320	1.72	184.97	-	-	1.72	-	16	320	1.72	184.97
มิ.ย.	4	80	0.92	86.96	16	320	0.92	347.83	16	320	0.92	347.83
ก.ค.	8	160	0.74	216.22	2	40	0.74	54.05	8	160	0.74	216.22
ส.ค.	8	160	0.11	1454.55	-	-	0.11	-	16	320	0.11	2909.09
ก.ย.	16	320	0.77	415.58	-	-	0.77	-	16	320	0.77	415.58

ตารางที่ 4. 19 ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยตลับ (*M. casta*) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O เกาะกลุ่ม

เดือน/ปี	ความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหมู่ O			
	ไตเตอร์	ไตเตอร์/มล.	โปรตีน (มก./มก. โปรตีน)	การเกาะกลุ่ม/โปรตีน (ไตเตอร์/มก.โปรตีน)
มิ.ย. 2554	4	80	0.92	86.96
ก.ค.	4	80	0.74	108.11
ส.ค.	16	320	0.11	2909.09
ก.ย.	16	320	0.77	415.58

4. การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในเลือดหอย

การวิเคราะห์หาปริมาณ ไลโซไซม์ ในน้ำเลือดของหอยลาย หอยแมลงภู่ หอยแครง หอยนางรม และหอยตลับ โดยทำการสุ่มหอยชนิดละ 5 ตัว จากหอย 30 ตัว แล้วนำเลือดมารวมกัน ได้ผลขนาดของ inhibition zone ดังแสดงในตาราง 4.20 และปริมาณ ไลโซไซม์ ดังแสดงในตารางรางที่ 4.21 จากผลการทดลองตรวจพบไลโซไซม์ในหอยแครงและหอยนางรม โดยในน้ำเลือดหอยแครงมีปริมาณไลโซไซม์ 0.5 – 5.8 ไมโครกรัม/ 50 ไมโครลิตร หรือ 10 – 116 ไมโครกรัม / มล. (0.0005-0.0058 มิลลิกรัม/ 50 ไมโครลิตร) และหอยนางรมมีปริมาณไลโซไซม์ 2.7-9.6 ไมโครกรัม/ 50 ไมโครลิตร หรือ 54 – 192 ไมโครกรัม / มล. (0.0027-0.0096 มิลลิกรัม/ 50 ไมโครลิตร) เมื่อพิจารณา inhibition zone ตรวจไม่พบ inhibition zone เมื่อใช้น้ำเลือดจากหอยลาย หอยแมลงภู่ และหอยตลับ จึงสรุปว่าไม่พบไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลาย หอยแมลงภู่ และหอยตลับ หรือหอยบางตัวมีไลโซไซม์แต่มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับขนาดของ inhibition zone ของไลโซไซม์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน

ตารางรางที่ 4.20 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย

เดือน / ปี	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone (ซม.)				
	หอยลาย	หอยแมลงภู่	หอยแครง	หอยนางรม	หอยตลับ
ตุลาคม 2553	0.6	-	-	-	-
พฤศจิกายน 2553	0.6	-	1.6	-	-
ธันวาคม 2553	0.6	-	1.8	0.9	0.9
มกราคม 2554	0.6	0.7	1.24	1.40	0.6
กุมภาพันธ์ 2554	0.6	0.6	1.29	-	0.6
มีนาคม 2554	0.6	0.6	1.3	1.45	0.6
เมษายน 2554	0.6	0.6	1.0	0.6	0.6
พฤษภาคม 2554	0.6	0.6	1.6	0.6	0.6
มิถุนายน 2554	0.6	0.6	1.1	1.55	0.6
กรกฎาคม 2554	0.6	0.6	0.95	1.75	0.6
สิงหาคม 2554	0.6	0.6	1.25	2.3	0.6
กันยายน 2554	0.6	0.6	0.6	1.65	0.6

หมายเหตุ : ข้อมูลในตารางยังไม่ได้ลบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมที่เจาะ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง = 0.6 ซม.

- = ไม่ได้ทดสอบ

ตารางรางที่ 4.21 ปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย

เดือน / ปี	ปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย (มก./50 ไมโครลิตร)				
	หอยลาย	หอยแมลงภู่	หอยแครง	หอยนางรม	หอยตลับ
ตุลาคม 2553	0	-	-	-	-
พฤศจิกายน 2553	0	-	0.0043	-	-
ธันวาคม 2553	0	-	0.0058	0	0
มกราคม 2554	0	0	0.0015	0.0027	0
กุมภาพันธ์ 2554	0	0	0.0019	-	0
มีนาคม 2554	0	0	0.0020	0.0031	0
เมษายน 2554	0	0	0	0	0
พฤษภาคม 2554	0	0	0.0043	0	0
มิถุนายน 2554	0	0	0.0005	0.0039	0
กรกฎาคม 2554	0	0	0	0.0054	0
สิงหาคม 2554	0	0	0.0016	0.0096	0
กันยายน 2554	0	0	0	0.0046	0

5. การเตรียมแอนติบอดีต่อเชื้อ Perkinsus

ได้แอนติซีรัมหรือโพลีโคลนอลแอนติบอดี สำหรับใช้ในการตรวจหาโปรโตซัว Perkinsus โดยวิธี Immunohistochemistry ต่อไป

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการสำรวจปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยเศรษฐกิจ ที่พบในจังหวัดชลบุรีทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ หอยลาย (*Paphia undulata*) หอยนางรม (*Saccostrea* .sp.) หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) หอยแครง (*Anadara granosa*) ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนกันยายน พ.ศ.2554 ตามวิธี Quantitative method พบว่าหอยลายและหอยนางรมมีปรสิต *Perkinsus* sp. โดยในหอยลายพบปริมาณมาก ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2554 จำนวนเซลล์อยู่ที่ 207,536±28,969 ต่อหอย 1 ตัว แต่จะไม่พบปรสิตทุกเดือน ส่วนในหอยนางรมพบปริมาณของปรสิตน้อยกว่าหอยลาย ในหอยนางรมเดือนที่พบมากที่สุดได้แก่เดือน กันยายน พ.ศ. 2554 เช่นเดียวกับหอยลาย ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝน และพบปรสิตในหอยทุกเดือนที่เก็บตัวอย่าง ในหอยแมลงภู่และหอยแครงตรวจไม่พบปรสิต

สำหรับหอยตลับนั้นคณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการสำรวจปริมาณ Perkinsus อีก เนื่องจากได้เคยทำการสำรวจปรสิต Perkinsus ในหอยตลับขาว *Meretrix casta* ที่เก็บจากแหล่งเพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 – เดือนกุมภาพันธ์ 2553 โดยใช้ตัวอย่างหอย 30 ตัว/ เดือน ผลการศึกษาตรวจพบปรสิตร้อยละ 7 ของจำนวนหอยทั้งหมด และคิดเป็นจำนวนปรสิตที่ตรวจพบร้อยละ 17 โดยพบปรสิต 5 เซลล์ต่อหอย 2 ตัว และไม่พบปรสิตในหอยในเดือนธันวาคมและมกราคม ข้อมูลโดยสรุปแสดงไว้ในภาคผนวก ข (ดวงธิดา, 2552) ทั้งนี้จากการศึกษาที่ผ่านมา Leethochavalit (2004) ได้รายงานว่าพบปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลายที่เก็บจากฝั่งทะเลอ่าวไทยเกือบทุกเดือนยกเว้นเดือนกันยายน พ.ศ. 2544 แต่จากการทดลองนี้ ไม่พบปรสิตในหอยลายในเดือน มิถุนายน กรกฎาคม และสิงหาคม พ.ศ.2554 จากรายงานของ Taveekijakarn และคณะ (2008) ได้รายงานว่าพบปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยนางรม (*Saccostrea forskali*) จากฝั่งอ่าวไทยตอนบน ที่ทำการเก็บตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน นอกจากนี้แล้วยังพบปรสิตอื่นๆ อีก ได้แก่ *Marteilia* sp. พบที่ digestive gland ปรสิตตัวแบนระยะ metacercaria พบที่ gonad เป็นต้น ส่วนในหอยชนิดอื่น ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับปรสิต *Perkinsus* sp.

ในต่างประเทศเช่นประเทศเวียตนาม Thao (2008) รายงานการพบปรสิต *Perkinsus* sp. ในหอยลาย surf clam *(Paphia undulata)* ที่เก็บตัวอย่างจาก Ha Tien, Kien Giang และ Ba Ria,

Ba Ria-Vung Tau ตั้งแต่เดือน มีนาคม ถึงเดือนพฤษภาคม ปี 2007 พบปรสิตในหอยทั้งหมด 67.5 – 100% โดยมี intensity อยู่ที่ 10,957-956,996 spores/g tissue ที่บริเวณ Ha Tien และพบปรสิตในหอย 100 % โดยมี intensity อยู่ที่ 98,082-204,309 spores/g tissue ที่บริเวณ Ba Ria After Trophozoites ของ *Perkinsus* มีขนาดประมาณ 3-6 μm เท่ากับที่รายงานว่าพบในประเทศไทย (Leethochavalit และคณะ, 2004)

สำหรับปรสิตอื่นที่มีรายงานการพบในประเทศไทย เช่น *Nematopsis* sp. (Tuntiwaranuruk, 2004) พบปรสิต *Nematopsis* sp. ในหอย 4 ชนิด ที่จังหวัดชลบุรี ในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน ปี 2000 ถึงเดือนพฤศจิกายน ปี 2001 ได้แก่ *Arcuatula arcuatula, Anadara granosa*, *Perna viridis* และ *Paphia undulata* ความชุกชุมสูงสุดพบในหอย *A. arcuatula* (91.8%; n = 110) ต่ำสุดในหอยแครง *A. granosa* (59.2%; n = 130) ปรสิตชนิดนี้มีขนาดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของหอยเจ้าบ้าน โดยในหอย *A. arcuatula* มีขนาดประมาณ 16.28 +/- 0.64/12.01 +/- 0.35 micron (n = 50) ในหอย *A. granosa* มีขนาดประมาณ 16.90 +/- 0.71/12.69 +/- 0.33 micron ในหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) มีขนาด 17.61 +/- 0.69/12.72 +/- 0.36 micron และในหอยลาย (*P. undulata*) มีขนาด 11.21 +/- 0.62/8.55 +/- 0.52 micron จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน พบลักษณะของเซลล์ *Nematopsis* sp ที่รวบรวมได้จากหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) จากจังหวัดชลบุรี จะมีรูปร่างเป็นรูปไข่ มี oocyte อยู่ภายใน parasitophorous vacuole ที่มีขนาดประมาณ 22–30 μm oocyst ของปรสิตจะมีผนังหนา มีขนาดประมาณ 0.5 และ 0.7 μm parasitophorous vacuole จะถูกห่อหุ้มด้วย phagocyte sac ของหอยที่สร้างขึ้นมา (Tuntiwaranuruk และคณะ, 2008)

ในปี 2011 Uddin และคณะ ทำการศึกษาปรสิตในหอยแครง (*A. granosa*) ที่เก็บจากชายฝั่งตะวันตกของ Palua Aman ประเทศมาเลเซีย และทางฝั่งตะวันออก ของ Banda Acheh และ ตะวันออกของ Lhokseumawe ของประเทศอินโดนีเซีย พบปรสิต *Nematopsis* sp. ใน connective tissue, gills, gonad, mantle, digestive glands, และ foot นอกจากนี้ยังพบ sporocysts ของปรสิตตัวแบนในgonads, stomach epithelium, mantle, digestive glands, และ foot

ทั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปรสิตที่พบและระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้น เช่น ปริมาณ hemocyte, lectin และ lysozyme ในตัวอย่างหอยทั้ง 5 ชนิด พบว่าในหอยลายปริมาณ

hemocyte ต่ำสุดเดือนพฤศจิกายน 2553 รองลงมาคือเดือนสิงหาคม 2554 และเดือน มกราคม 2554 ส่วนหอยนางรมมีปริมาณ hemocyte ต่ำสุดในเดือนกันยายน กรกฎาคม และสิงหาคม 2554 ตามลำดับ หอยแมลงภู่ต่ำสุดอยู่ที่เดือนกันยายน มกราคม กุมภาพันธ์ 2554 ในหอยแครงพบ hemocyte มากที่สุด แต่ปริมาณ hemocyte จะต่ำสุดในช่วงเดือน กันยายน สิงหาคมและมิถุนายน 2554 สำหรับหอยตลับพบ hemocyte ต่ำสุดเดือนกันยายน สิงหาคม และมกราคม 2554 ตามลำดับ ทั้งนี้จากข้อมูลพื้นที่การเลี้ยงหอยทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ หอยนางรม หอยแครง หอยแมลงภู่ และหอยตลับ บริเวณจังหวัดชลบุรี จะพบว่าหอยเหล่านี้จะได้รับอิทธิพลของน้ำจืดจากแม่น้ำบางปะกง เนื่องจากแหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างหอยทั้ง 4 ชนิด อยู่บริเวณอ่าวชลบุรี ซึ่งในช่วงระหว่าง มิถุนายน – กันยายน 2554 ความเค็มของน้ำอยู่ระหว่าง 17, 12, 5 และ 3 ppt. ตามลำดับ (สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล: http://www.bims.buu.ac.th/j3/index.php/2011-01-18-02-12-02) จึงอาจเป็นสาเหตุให้จำนวน hemocyte ของหอยทั้ง 4 ชนิดมีจำนวนน้อย สอดคล้องกับรายงานของ Ittoop และคณะ (2005) ที่ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อ hemocyte profile และขบวนการ phagocytosis ในหอยนางรม Indian edible oysters (*Crassostrea madrasensis*) ขนาด 6.6 + 1.5 cm x 4.2 + 0.2 ซ.ม. ที่เลี้ยงด้วยความเค็มต่างๆ ได้แก่ 6, 12, 25 และ 35 ppt เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อทำการเจาะเลือดหอยมานับจำนวน hemocyte และตรวจสอบหน้าที่ในขบวนการ phagocytosis ปรากฏว่าจำนวนของ Hemocyte ในหอยที่เลี้ยงที่ความเค็ม 35 ppt มีจำนวนสูงที่สุด แต่ในความเค็มอื่นๆ ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนขบวนการ phagocytic index ในหอยที่เลี้ยงที่ความเค็ม 6 และ 35 ppt จะมีค่าต่ำเมื่อเทียบกับความเค็มอื่น สอดคล้องกับรายงานของ Chu และ La Peyre (1991); Reid และคณะ (2003); Matozzo และคณะ (2007) ที่กล่าวถึงผลของความเค็มต่ำสุดและความเค็มสูงสุดจะชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวน hemocyte ในหอยหลายชนิด ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Flye–Sainte–Mari และคณะ (2009) ที่กล่าวว่าจำนวน granulocyte และ total hemocyte ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ ส่วนอิทธิพลอื่นของสภาพแวดล้อมจะไม่มีผลต่อ granulocyte และ total hemocyte แต่อย่างใด ขณะเดียวกัน Adema และคณะ (1991) กล่าวว่าจำนวนของ hemocyte ในหอยจะแตกต่างกันไปในหอยแต่ละชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุและอัตราการเต้นของหัวใจของหอย

สำหรับในหอยลายจำนวนของ hemocyte จะแตกต่างไปจากหอยอื่นๆ ที่ทำการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหอยลายที่ทำการศึกษาเป็นหอยลายจากธรรมชาติ ซึ่งธรรมชาติของหอยลายดำรงชีพโดยฝังตัวอยู่ลึกประมาณ 2.5 – 10 ซ.ม. บริเวณที่เป็นโคลนปนทราย ในทะเลที่น้ำทะเลท่วมถึงตลอดเวลา ที่ความลึกประมาณ 1-25 เมตร ระยะห่างจากฝั่ง 1-10 ก.ม. (รุ่งทิวา, 2550)

ดังนั้นความเค็มต่ำอาจจะไม่มีผลต่อปริมาณของ hemocyte ของหอยลายมากนัก แต่จะส่งผลกระทบถึงปริมาณของปรสิต *Perkinsus* sp. ที่ทำการศึกษาโดยในช่วงเดือนมิถุนายน – เดือนสิงหาคม 2554 ที่ความเค็มอยู่ที่ 17, 12 และ 5 ppt ตามลำดับ ทั้งนี้จากการรายงานของงานวิจัยต่างๆ พบว่าความชุกชุมของปรสิต *Perkinsus* ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ตัวหอยเอง แหล่งที่อยู่อาศัยของหอย อุณหภูมิ ความเค็ม กลศาสตร์การเกิดโรค (Villalba และคณะ, 2004) กรณีของหอยนางรม *C. virginica* ที่ติดเชื้อ *P. marinus* ที่ทำการสำรวจในหลายพื้นที่ของสหรัฐอเมริกา พบว่าความชุกชุมและความหนาแน่นของปรสิต จะขึ้นกับความเค็มของน้ำทะเล และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และพบว่า การติดเชื้อ *P. marinus* ในหอยนางรมดังกล่าวจะลดลงเมื่อความเค็มของน้ำต่ำกว่า 12-15 ppt. (Quick และ Mackin 1971; Soniat 1985; Andrews 1988; Craig et al. 1989; Soniat และ Gauthier 1989; Crosby และ Roberts 1990; Soniat 1996) จากการทดลองแบบ in vitro ของ Burreson และคณะ (1994); Dungan และ Hamilton (1995) ; Gauthier และ Vasta (1995); O'Farrell และคณะ (2000) พบว่า การเคลื่อนไหวและความอยู่รอดของเซลล์ *P. marinus* ยังขึ้นอยู่กับความเค็มอีกด้วย

จากผลการตรวจปรสิต Perkinsus ในหอยลาย หอยนางรม และปริมาณ hemocyte ในครั้งนี้พบว่าในเดือนที่มีปรสิตมากที่สุด จำนวน hemocyte กลับมีปริมาณน้อยกว่าเดือนที่มีปรสิตน้อย ในขณะที่หอยแครงและหอยตลับตรวจไม่พบ Perkinsus แต่มีปริมาณ hemocyte มากกว่าหอยลายและหอยนางรม ดังนั้นความสัมพันธ์ของปริมาณ Perkinsus กับจำนวน hemocyte ของหอยลายและหอยนางรมจากบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี จึงสอดกับรายงานของ Thompson และคณะ (1978) ที่ได้สรุปว่าเป็นการยากที่จะประเมินถึงผลกระทบของการเกิดโรค Perkinsosis ต่อปริมาณของ hemocyte ของหอยแต่ละชนิด เนื่องจากหอยบางชนิด เช่น หอยนางรม (*C. virginica*) เมื่อติดเชื้อ *P. marinus* จะพบปริมาณของ hemocyte ในน้ำเลือดเพิ่มขึ้น (Anderson และคณะ, 1992, 1995; Chu และ La Peyre 1993b; La Peyre และคณะ, 1995a,b) ในขณะที่หอยจำพวกหอยลาย หอยตลับ (clam) เมื่อติดโรคปริมาณ hemocyte มีแนวโน้มลดลง (Ordás และคณะ, 2000)

การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระบบภูมิคุ้มกันในหอยเมื่อติดโรค Perkinsosis นั้นมีนักวิทยาศาสตร์หลายรายได้พยายามศึกษาและอธิบายไว้ในหอยแต่ละชนิด เช่น Casas (2002) กล่าวว่าเชื้อ *P. olseni*, *P. atlanticus* ในหอย Tapes decussatus จะเข้าสู่หอยทางเหงือกหรือทาง labial pulp และจะกระตุ้นให้เกิดความรุนแรงของการอักเสบในเนื้อเยื่อของหอยแตกต่างกัน

ออกไป รวมถึงปฏิกิริยาการเกิดขบวนการ encapsulation ของ hemocyte cell ในกรณีการติดเชื้อที่รุนแรงของหอยแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันออกไป เช่นในหอย venerid clams (*T. decussatus*, *T. phillippinarum, Venerupis pullastra* และ *Paphia aurea* (Chagot et al. 1987; Navas et al. 1992; Montes et al. 1995; Sagristà et al. 1995; Montes et al. 1996; Ordás et al. 2001; Park และ Choi 2001; Choi et al. 2002), abalone species, *Haliotis* spp. (Goggin และ Lester 1995), Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis* (Bower , Blackbourn, และ Meyer, 1998) and gaper clams, *Mya arenaria* (McLaughlin และ Faisal 1998) หากอาการรุนแรงจะพบเนื้อเยื่อหอยถูกทำลาย มีการหลั่ง polypeptide จาก hemocyte ที่อยู่รอบๆ (Montes และคณะ, 1995b)

การตรวจหาปริมาณ lysozyme ในน้ำเลือดหอยโดยการตรวจสอบ inhibition zone ในตัวอย่างหอยที่เก็บชายแหล่งเพาะเลี้ยงชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนกันยายน พ.ศ.2554 พบ lysozyme ในน้ำเลือดหอยแครงและหอยนางรม แต่ไม่พบในน้ำเลือดหอยลาย หอยแมลงภู่ และหอยตลับ เมื่อนำข้อมูลนี้ไปเปรียบเทียบกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus luteus* โดยวิธีการนับจำนวนโคโลนีของ *M. luteus* ในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่น้ำเลือดหอย จากการศึกษาของกนกภรณ์ พบว่าโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครงสามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ร้อยละ 49-73 แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ และยังตรวจพบปริมาณ lysozyme มากที่สุดในเดือนธันวาคม 2553 ซึ่งในการทดสอบนี้ใช้น้ำเลือดหอยชุดเดียวกัน ผลการทดลองโดยสรุปแสดงไว้ในภาคผนวก ข (กนกภรณ์, 2553) สำหรับในหอยลายนั้นมีข้อที่น่าสังเกตคือการตรวจไม่พบไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลาย แต่น้ำเลือดหอยลายสามารถยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* โดยวิธีการนับจำนวนโคโลนีของ *M. luteus* ได้ร้อยละ 49-73 (นงคราญ, 2553) ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีข้อแตกต่างกันที่ปริมาณโปรตีนที่ใช้ โดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำเลือด 80 ไมโครลิตร ส่วนการตรวจสอบ inhibition zone ใช้ปริมาณน้ำเลือด 50 ไมโครลิตร อย่างไรก็ตามการทดสอบโดยวัดขนาดของ inhibition zone เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ lysozyme ในหอยแต่ละชนิดมีความเหมาะสมสำหรับงานวิจัยที่ใช้จำนวนตัวอย่างจำนวนมากและต้องเก็บข้อมูลทุกเดือน

จากการศึกษาผลกระทบของการเกิดโรค Perkinsosis ต่อความเข้มข้นของ lysozyme ในน้ำเลือดหอยนั้นยังไม่แน่นอน นักวิจัยบางคณะกล่าวว่าไม่พบความแตกต่างในหอยนางรมและหอย carpet clam ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *P. marinus* และ *P. olseni*/atlanticus (Chu และ La

Peyre 1989, 1993a, b; Chu และคณะ, 1993; Ordás และคณะ, 2000) อย่างไรก็ตาม La Peyre และคณะ (1995b) พบว่า lysozyme activity ในหอยนางรมที่ติดเชื้อจะลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ level of serum lysozyme จะเพิ่มขึ้น (Chu และ La Peyre, 1993a) ซึ่ง Fisher และ Newell (1986) มีการสรุปว่า องค์ประกอบของน้ำเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นและปฏิกิริยาของ lysozyme มักจะขึ้นกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมากที่สุด (Steinert และ Pickwell 1985; Chu 1988) และจากการทดสอบแบบ in vitro ในหอยแมลงภู่ (mussel) พบว่า serum lysozyme สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของปรสิต *P. marinus* ได้ เมื่อเติม plasma ของหอยดังกล่าวลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจสอบปริมาณเลคตินซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่าในน้ำเลือดหอยลาย หอยนางรมปากจีบ หอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยตลับมีเลคติน โดยหอยนางรมปากจีบมีปริมาณเลคตินมากที่สุด รองลงมาคือหอยลาย เมื่อเปรียบเทียบกันโดยใช้ค่า Specific activity ปรีชญา และคณะ (2552) ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเลคตินในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบ พบว่าเลคตินจากอ่างศิลาและเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 4 – 50 องศาเซลเซียส และการทำงานเริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยหอยนางรมปากจีบจากเมืองใหม่มีการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสซึ่งสูงกว่าหอยนางรมปากจีบจากอ่างศิลาที่มีการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เลคตินต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อช่วยให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ดีขึ้น มีความคงตัวที่ช่วง pH 5.6 - 8 และสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้มากที่สุดที่ pH 7.5 ข้อมูลโดยสรุปแสดงไว้ในภาคผนวก ข ข้อมูลผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากในสภาวะปัจจุบันที่มีการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ

การศึกษาเลคตินในหอยสองฝา Wootton และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในหอยสองฝาและภูมิคุ้มกันสารพิษในหอยทะเล 3 ชนิด คือ หอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis)* หอยแครง *(Cerastoderma edule*) และหอยหลอด *(Ensis siliqua*) มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์และหน้าที่ต่างๆของระบบภูมิคุ้มกันในหอย 3 ชนิดนี้ โดยได้ทดสอบความสามารถของเลคตินในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายเกิดการเกาะกลุ่ม ผลการทดสอบพบว่าฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) ของ *C. edule* และ *M. edulis* สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดง

ของกระต่ายและสัตว์อื่นๆเกาะกลุ่ม แต่ฮีโมลิมฟ์ของ *E. siliqua* ไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกาะกลุ่มได้

สำหรับปริมาณโปรตีนพบว่าหอยลายและหอยนางรมที่ตรวจพบปรสิต Perkinsus ปริมาณโปรตีนน้อยกว่าหอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยตลับที่ตรวจไม่พบปรสิต ในรายงานการวิจัยสำหรับ protein concentration ในน้ำเลือดหอยที่ติดเชื้อ *P. marinus* จะต่ำกว่าหอยที่มีสุขภาพดี แต่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (Chu และคณะ, 1993a; La Peyre และคณะ, 1995b) ในขณะที่ Ordás และคณะ (2000) รายงานว่าในหอยที่ติดเชื้อ *P. olseni, P. atlanticus* จะมี protein concentration ในน้ำเลือดมากกว่าในหอยที่ไม่ติดเชื้อ

Ordas และคณะ (2000) ศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในหอยทั่วไปเมื่อได้รับเชื้อ *P. atlanticus* โดยทำการทดลองในหอยสองฝา *Ruditapes decussatus* เปรียบเทียบระหว่างหอยที่ได้รับเชื้อปรสิตและไม่ได้รับเชื้อ ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ (hemocyte density และ phagocytosis activity) และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (lysozyme, antibacterial activities, agglutination titre และ protein concentration) พบว่าความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (agglutination titre) และการยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial activities) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยหอยที่ได้รับเชื้อมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวสูงกว่าหอยที่ไม่ได้รับเชื้อ แต่อัตราการจับกินเซลล์แปลกปลอม (phagocytosis) และความหนาแน่นของฮีโมไซท์ (hemocyte density) ความเข้มข้นของไลโซไซม์ (Lysozyme) และความเข้มข้นของโปรตีน (protein concentration) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหอยที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนมีแนวโน้มในการต่อต้านเชื้อโรคสูงกว่าหอยที่ยังไม่ได้รับเชื้อโรค

จากข้อมูลของการวิจัยโรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันของหอยสองฝาที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจที่เพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี ในเบื้องต้นนี้ตรวจพบปรสิต Perkinsus ในหอยลายและหอยนางรม ซึ่งจะต้องมีการติดตามเพื่อระวังการระบาดของโรค การตรวจพบเลคติน และ lysozyme ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ phagocytosis มีส่วนช่วยในการป้องกันตัวเองของหอยจากปรสิตและแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลของสารในระบบภูมิคุ้มกันบางประการที่แตกต่างกันในหอยแต่ละชนิดทั้งข้อมูลในประเทศไทยและต่างประเทศ

เอกสารอ้างอิง

กนกภรณ์ ทะกัน. 2553. การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นของหอยแครง Bloody cockle (*Anadara granosa*, Linnaeus) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี. รายงานสหกิจ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 57 หน้า.

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2544. การเพาะเลี้ยงหอย. สำนักพิมพ์รั้วเขียว กรุงเทพฯ. 253 หน้า.

ดวงธิดา เทียมคีรี. 2552. การติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของหอยตลับขาว (*Meretrix casta*, GMELIN, 1791) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี. รายงานสหกิจ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 52 หน้า.

นงคราญ ก้อมชัยภูมิ. 2553. ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของหอยลาย (*Paphia undulate*) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี. รายงานสหกิจ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 45 หน้า.

นิสราภรณ์ เพ็ชร์สุทธิ์. 2551. การผลิตสัตว์น้ำ : การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ. 189 หน้า.

ปรีชญา ต. ไชยสุวรรณ วรดร นวลศิริภัค และผกามาศ แย้มสกุล. 2552. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี. โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 83 หน้า.

รุ่งทิวา ตันติชรา. 2550. ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างฉับพลันต่อการพัฒนาและการอยู่รอดของลูกหอยลาย *Paphia undulata*, Born, 1778. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

สุนันท์ ทวยเจริญ, วัฒนา ภู่เจริญ และปรานอม เบ็ญจมาลย์. 2528. ชีววิทยาบางประการของหอยลายที่ปลายแหลมศอก บ้านอ่าวช่อ ต.อ่าวใหญ่ จ.ตราด. เอกสารรายงาน/วิชาการ ฉบับที่ 41 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 40 หน้า.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุฒน์ และวีลยา แก่นจันทร์. 2552. การปนเปื้อนของ *Cryptosporidium* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในหอยนางรมบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน. 99 หน้า.

Adema C.M., Van der Knaap W.P.W., Sminia T.. 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. Rev. Aquat. Sci. 4: 201-223.

Anderson R.S., Paynter K.T., Burreson E.M.. 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. Biol. Bull. 183: 476-481.

Anderson R.S., Burreson E.M., Paynter K.T.. 1995. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. J. Invertebr. Pathol. 66: 82-89.

Andrews J.D.. 1988. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. Amer. Fish. Soc. Spec. Publ. 18: 47-63.

Bower S.M., Blackbourn J., Meyer G.R.. 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Can. J. Zool. 76: 954-959.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and senditive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein bye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Burreson E.M., Ragone Calvo L.M., La Peyre J.F., Counts F., Paynter K.T.. 1994. Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsida). Comp. Biochem. Physiol. 109A: 575-582.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microsc. Res. Tech. 57: 469-476.

Chagot D., Comps M., Boulo V., Ruano F., Grizel H.. 1987.. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. Aquaculture 67: 260-261.

Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: Forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, pp. 299-333.

Choi K.S., Park K.I., Lee K.W., Matsuoka K.. 2002. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. J. Shellfish Res. 21: 119-125.

Chu F.L.E.. 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. Am. Fish Soc. Spec. Publ. 18: 178-188.

Chu, F.-L.E.. 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology. Science publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, pp. 1-42.

Chu F.L.E., La Peyre J.F.. 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). J. Invertebr. Pathol. 54:224-232.

Chu, F.-L. E., La Peyre, J. F.. 1991. Effect of salinity on *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish. Res. 10: 294.

Chu F.L.E., La Peyre J.F.. 1993a. Perkinsus marinus susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. Dis. Aquat. Org. 16: 223-234.

Chu F.L.E., La Peyre J.F.. 1993b. Development of disease caused by the parasite *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. J. Shellfish Res. 12: 21-27.

Cooper, E.L. and Lemmi, C.A.E. 1981. Invertebrate humoral immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 5: 3-21.

Craig A., Powell E.N., Fay R.R., Brooks. J.M.. 1989. Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. Estuaries 12: 82-91.

Crosby M.P., Roberts C.F.. 1990. Seasonal infection intensity cycle of the parasite *Perkinsus marinus* (and absence of *Haplosporidium* spp.) in oysters from a South Carolina salt marsh. Dis. Aquat. Org. 9: 149-155.

Dungan C.F., Hamilton R.M.. 1995. Use of the tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of in vitro conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. J. Eukaryot. Microbiol. 42: 379-388.

Fisher W.S., Newell R.I.E.. 1986. Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). Comp. Biochem. Physiol. A 85: 365-372.

Flye–Sainte–Marie. J., Soudant, P., Lambert, C., Goïc, N.L., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F.. 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 377: 1-11.

Gauthier J., Vasta G.. 1995. In vitro culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus:* optimisation of the methodology. J. Invertebr. Pathol. 66: 156-168.

Goggin C.L., Lester R.J.G.. 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. Mar. Freshwater Res. 46, 639-646.

Gosling, E.. 2004. Bivalve mollusks. MPG Books Ltd, Cornwall Great Britain. 443 p.

Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 9, 367-385.

Ittoop, G., eorge, K.C., George, R.M., Sobhana, K.S., Sanil, N.K., Nisha, P.C.. 2005. Effect of salinity on the hemocyte profile and phagocytosis in the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). J. Mar. Biol. Ass. India, 47: 31 – 35.

La Peyre J.F., Chu F.E., Meyers J.M.. 1995a. Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. Fish Shellfish Immunol. 5: 179-190.

La Peyre J.F., Chu F.L.E., Vogelbein W.K.. 1995b. In vitro interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster haemocytes. Dev. Comp. Immunol. 19: 291-304.

Leethochavalit S, Chalermwat K, Upatham ES, Choi KS, Sawangwong P, Kruatrachue M. 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. Dis. Aquat. Org. 60:165-71.

McLaughlin S.M., Faisal M.. 1998. In vitro propagation of two *Perkinsus* species from the softshell clam *Mya arenaria*. Parasite 5: 341-348.

Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazanetti, G. P., Cattani, O., Marin, M. G., 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. Mar. Biol. 151: 1051–1058.

McGladdery, S.E., Drinnan, R.E. and Stephenson, M.F. 1993. A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves. Fisheries and Oceans Canada. 242 p.

Montes J.F., Durfort M., Garcia Valero J.. 1995a. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. Cell Tissue Res. 279: 529-538.

Montes J.F., Durfort M., Garcia Valero J.. 1995b. Characterization and localization of a Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam Tapes semidecussatus. Cell Tissue Res. 280: 27-37.

Montes J.F., Durfort M., Garcia Valero J.. 1996. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. Dis. Aquat. Org. 26, 149-157.

Navas J.I., Castillo M.C., Vera P., Ruiz-Rico M.. 1992. Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). Aquaculture 107: 193-199.

O'Farrell C., La Peyre J.F., Paynter K.T., Burreson E.M.. 2000. Osmotic tolerance and volume regulation in in vitro cultures of the oyster pathogen Perkinsus marinus. J. Shellfish Res. 19:139-145.

Ordás M.C., Gómez-León J., Figueras A., 2001, Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus, R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). J. Shellfish Res. 20: 1019-1024.

Ordás M.C., Ordás A., Beloso, C., Figueras A.. 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunol. 10: 597-609.

Park K.I., Choi K.S. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture 203: 9-22.

Quick J.A., Mackin J.G., 1971. Oyster parasitism by *Labyrinthomyxa marina* in Florida. Florida Dep. Nat. Resour. Prof. Paper Ser. 13: 1-55.

Reid, H. I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, T. H.. 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Org.. 56: 249–258.

Ruddell, C., 1971. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. Histochem. Cell Biology. 26: 98-112.

Sagristà E., Durfort M., Azevedo C.. 1995. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediteranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. Aquaculture 132. 153-160.

Song, L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H.. 2010 Bivalve Immunity. Invertebrate Immunity, ed. K. Söderhäll. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.: Austin. 1-22.

Soniat T.M., 1985. Changes in levels of infection of oysters by *Perkinsus marinus*, with special reference to the interaction of temperature and salinity upon parasitism. Northwest Gulf. Sci. 7: 171-174.

Soniat T.M., 1996, Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. J. Shellfish Res. 15, 35-43.

Soniat T.M., Gauthier J.D.. 1989. The prevalence and intensity of *Perkinsus marinus* from the mid northern Gulf of Mexico, with comments on the relationship of the oyster parasite to temperature and salinity. Tulane Stud. Zool. Bot. 27: 21-27.

Soudant, P., Leite, R., Chu, F-L., Villalba, A., Cancela, L.. 2008. http : www.univ-brest.fr/IUEM/UMR6539/.../Soudant2008.p...

Steinert S.A., Pickwell G.V.. 1985. Multiple forms of lysozyme in copper stressed mussels (*Mytilus edulis*). Mar. Environ. Res. 17: 211-214.

Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., Wada, K., 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster Pinctada fucata. Cell Tissue Research. 266: 75-82.

Taveekijakarn, P., Somsiri, T., Puttinaowarat, S., Tundavanitj, S., Chinabut., Nash, G.. 2008. Parasitic fauna of rock oyster (Saccostrea forskali) cultured in Thailand, pp. 335-342. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 pp.

Tasumi, S. & Vasta, G.R.. 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. J. Immunol. 179: 3086-3098.

Thao, N.T.T. (2008). Infection of parasite *Perkinsus* sp. in soft clam *Paphia undulata* at Kiengiang & Baria-Vungtau provinces. Scientific Journal of Can Tho University, Specific Issue on Aquaculture and Fisheries 1: 222-230. (Full paper in Vietnamese)

Tuntiwaranuruk C, Chalermwat K, Upatham ES, Kruatrachue M, Azevedo C. 2004. Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of bivalves from Chonburi province, Gulf of Thailand. Dis. Aquat. Org. 58:47-53.

Tuntiwaranuruk, C, Chalermwa, K., Pongsakchat, V., Meepool, A., Upatham, E.S., Kruatrachue, M.. 2008. Infection of *Nematopsis* oocysts in different size classes of the farmed mussel *Perna viridis* in Thailand. Aquaculture 281: 12-16.

Uddin, M.J., Yasin, Z., Khallil, M., Shau-Hwai, A.T. 2011. Parasites of blood cockle (*Anadara granosa* Linnaeus, 1958) from the Straits of Malacca. Journal of Shellfish Research. 30: 875–880.

Wilson-Ormond, E.A., Powell, E.N., Choi ,K-S., Song, J. 1993. *Perkinsus marinus* assay In: Lauenstein GG and Cantillo AY (eds), Comprehensive descriptions of complementary measurements. Sampling and analytical methods of the national status and trends program national benthic surveillance and mussel watch projects vol II. NOAA technical memorandum NOS ORCA 71 p II.79 - II.84

Yue, X., Liu, B. and Xue, Q. 2011. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam Meretrix meretrix potentially functioning in host immunity. Fish & Shellfish Immunology. 30: 550-558.

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน

1. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรสิต *Perkinsus* sp.**

Fluid Thioglycollate medium	8.94	กรัม
Sodium Chloride	6	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน นำไปต้มจนได้เป็นสีเหลืองอำพัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. **การเตรียม SM 30**

Sodium Chloride (NaCl); BDH PROLABO^{R}	24.29	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); MERCK ,Germany		
4.85 กรัม		
Magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ; BDH Anala R^{R} ,England	3.49	กรัม
Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$); MERCK, Germany	1.17	กรัม
Potassium Chloride (KCl); J.T.Baker ,Mexico	0.77	กรัม
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$); Carlo erba reagent s.r.l.	0.38	กรัม
Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) ;	0.07	กรัม
Panreac quimica sa		
Potassium hypophosphite (KH_2PO_2) ; J.T.Baker ,Mexico	0.045	กรัม
Penicillin (IU ml^{-1}); SIGMA, Germany	0.031	กรัม
Streptomycin (ug ml^{-1}) ; Fluka BioChemika,China	0.1	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร pH 7.4 กรองด้วยเมมเบรน 0.2 ไมครอน

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนปริมาณน้อยด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

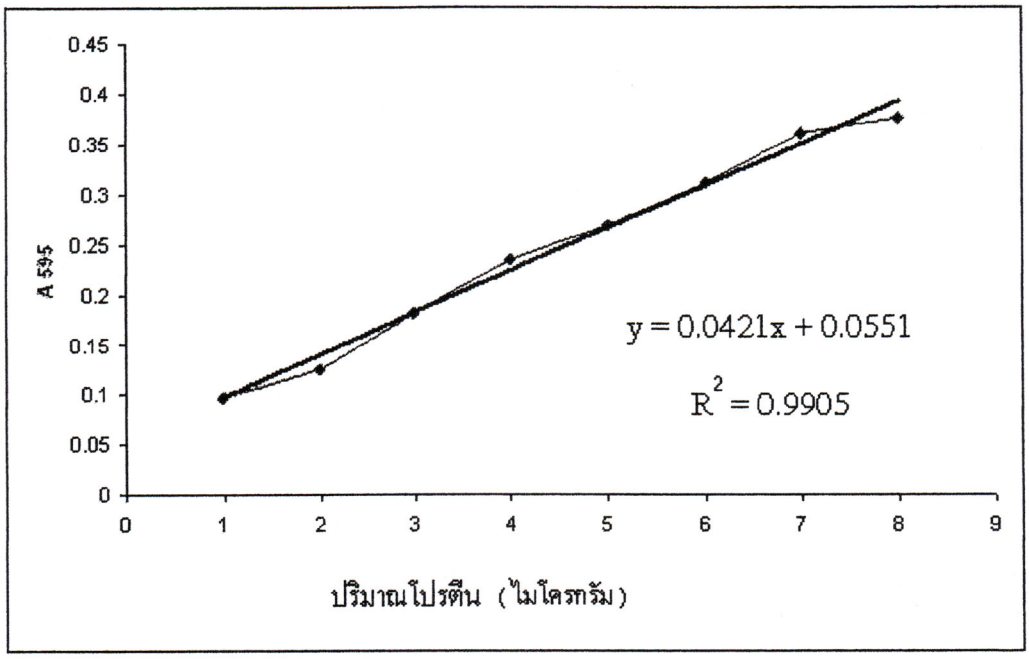
การเตรียม 10 ug/ml

1. เตรียม 1.0 mg/ml ชั่ง Bovine serum albumin (BSA) 0.0250 g ละลายใน 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) เติม PBS จนได้ปริมาตร 25 ml

2. เตรียม 10 ug/ml BSA ปิเปต 1.0 mg/ml 100 ul เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตรเป็น 10 ml

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนปริมาณน้อย

หลอดที่	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)	10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร BSA (ไมโครลิตร)	0.01 โมลาร์ Tris-HCl, pH 7.6 (ไมโครลิตร)	Biorad Dye Reagent (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร
1 (Blank)	0	0	800	200	0.000
2	1	100	700	200	0.099
3	2	200	600	200	0.125
4	3	300	500	200	0.181
5	4	400	400	200	0.235
6	5	500	300	200	0.268
7	6	600	200	200	0.312
8	7	700	100	200	0.360
9	8	800	0	200	0.376
ตัวอย่าง	-	800	-	200	0.314



กราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรและปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)

การคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยแทนค่าในสูตร

ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) = (ค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 595 นาโนเมตร-0.0551) / 0.0421

<u>ตัวอย่างเช่น</u>

ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) = (0.314 – 0.0551) / 0.0421

ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) = $\frac{\text{(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) X ความเข้มข้นที่เจือจาง X 1000}}{800}$

= $\frac{6.149 \times 400 \times 1000}{800}$ ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

= 3074.82 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม / มิลลิลิตร) = $\frac{3074.82}{1000}$ ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

= 30.74 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณ Lysozyme

Tryptic Soy Agar (TSA)

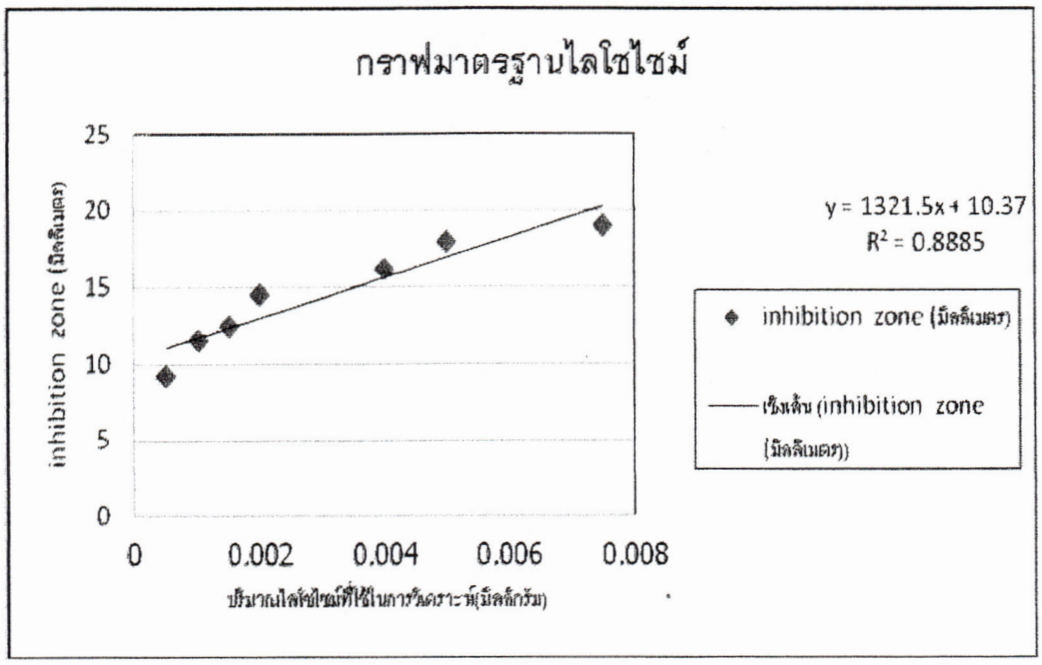
Tryptic Soy Agar	14	กรัม
น้ำกลั่น	350	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

5. การวิเคราะห์ปริมาณ Lysozyme

ตารางภาคผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของไลโซไซม์ใช้สำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน

ปริมาณไลโซไซม์ ไมโครกรัม/ มิลลิกรัม	ปริมาณไลโซไซม์ (ไมโครกรัม)	ปริมาณไลโซไซม์ ที่ใช้ในการ วิเคราะห์ (มิลลิกรัม)	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของ inhibition zone (mm.)	ค่าเฉลี่ยของ เส้นผ่าศูนย์กลาง ของ inhibition zone (mm.)
10	0.5	0.0005	9.5,9	9.25
20	1.0	0.0010	11.5,11	11.50
30	1.5	0.0015	13,12	12.50
40	2.0	0.0020	15,14	14.50
50	2.5	0.0025	15,13.5	14.25
80	4.0	0.0040	16.5,16	16.25
100	5.0	0.0050	18.5,17.5	18.00
150	7.5	0.0075	19,19	19.00
200	20	0.0100	18.5,20	19.25



การคำนวณหาปริมาณของไลโซไซม์ ใช้สมการ

$$y = 1321.5x + 10.37$$

ดังนั้นปริมาณของไลโซไซม์ $= \dfrac{(\text{inhibition zone (mm)}) - 10.37)}{1321.5}$

ปริมาณไลโซไซม์ (มิลลิกรัม) $= \dfrac{(15 - 10.37)}{1321.5}$

= 0.0035 มิลลิกรัม หรือ 3.50 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ข
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สหกิจศึกษา

เรื่อง

การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นของหอยแครง Bloody cockle (*Anadara granosa* ,Linnaeus) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

Basic studies Defense mechanisms of Bloody cockle (*Anadara granosa)* on Moungmai coast of Chonburi province

โดย

นางสาวกนกภรณ์ ทะกัน

รหัส 5010101301

สาขาการประมง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษารายวิชาสหกิจศึกษา (ทป 497)

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2553

ชื่อเรื่อง : การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นของหอยแครง Bloody cockle (*Anadara granosa*, Linnaeus.) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

ชื่อผู้เขียน : นางสาวกนกภรณ์ ทะกัน

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.สุพรรณี ลีโทชวลิต

ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

อาจารย์ ดร.กระสินธุ์ หังสพฤกษ์

บทคัดย่อ

การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นในน้ำเลือดหอยแครง พบว่าปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5148 - 4.2290 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หอยแครงสามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ร้อยละ 49 – 73 แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio และเชื้อ *E. coli* ได้ และความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่มอยู่ในช่วง 3.89 – 21.05, 3.89 – 84.21 และ 1.94 – 84.21 ไตเตอร์ / มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ผลการทดสอบพบปริมาณไลโซไซม์ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2554 คือ 0.0030, 0.0050 และ 0.0025 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยพบปริมาณไลโซโซม์ในน้ำเลือดหอยแครงมากที่สุดในเดือนธันวาคม และในน้ำเลือดหอยแครงมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดเฉลี่ย 192 x10^6±8.59,243.8 x 10^6±31.89, 251.4 x 10^6±10.61 และ233.6x 10^6±27.48 เซลล์/มิลลิลิตร

คำสำคัญ : หอยแครง, กลไกการป้องกันตัวเอง, เลคติน, ไลโซไซม์, การยับยั้งแบคทีเรีย

สหกิจศึกษา

เรื่อง

การติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของหอยตลับขาว (*Meretrix casta*, GMELIN, 1791) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

***Perkinsus* sp. infection *Vibrio* spp. and lectin in immune system of *Meretrix casta* on Moungmai coast of Chonburi province**

โดย

นางสาวดวงธิดา เทียมคีรี

รหัส 4910101330

สาขาการประมง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษารายวิชาสหกิจศึกษา (ทป 497)

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2552

ชื่อเรื่อง : การติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และระบบภูมิคุ้มกันของหอยตลับจากแหล่งเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ ชลบุรี

ชื่อผู้เขียน : นางสาวดวงธิดา เทียมดีรี

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.สุพรรณี ลีโทชวลิต

ดร.จันทร์จรัส วัฒนะไชติ

ผศ.ชนกันต์ จิตมนัส

บทคัดย่อ

จากการศึกษา *Perkinsus* sp. และเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในหอยตลับขาว *Meretrix casta* บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยตลับอ่างศิลา และชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 สถานีละ 30 ตัว ของทุกๆ เดือน โดยวิธี Quantitative Method พบการปนเปื้อนปรสิตชนิดนี้ในเดือนพฤศจิกายนเท่านั้นคิดเป็นร้อยละ 6.67 จากจำนวนหอยที่นำมาศึกษาทั้งหมด และการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในน้ำเลือดหอยตลับ 10 ตัว พบเชื้อในเดือนพฤศจิกายน ธันวาคม 2552 และมกราคม 2553 เฉลี่ยจำนวน 814 CFU/มิลลิลิตร, 1507 CFU/มิลลิลิตร และ 227 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และในแหล่งน้ำที่เพาะเลี้ยงหอยตลับ 3 แหล่ง คือ แหลมแท่น, อ่างศิลา และเมืองใหม่ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ที่แหลมแท่นพบ158-1251 CFU/มิลลิลิตร, อ่างศิลา 770-1644 CFU/มิลลิลิตร และเมืองใหม่ 300-1632 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการตรวจสอบชนิดเชื้อวิบริโอพบว่าน่าจะเป็น *V . alginolyticus* นอกจากนี้ยังตรวจพบเลคตินในน้ำเลือดหอยตลับขาวจากแหล่งเพาะเลี้ยงหอยตลับในบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี เมื่อทดสอบการเกาะกลุ่มโดยใช้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอในสภาพปกติและเม็ดเลือดแดงคนหมู่เอที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินได้ปริมาณ 4-256 ไตเตอร์ และ 8-1024 ไตเตอร์ตามลำดับ

คำสำคัญ : เชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. , แบคทีเรีย *Vibrio* spp. , เลคติน , หอยตลับขาว

สหกิจศึกษา

เรื่อง

ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของหอยลาย (*Paphia undulata*) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

Non – specific immunity in Baby clam (*Paphia undulata*) on Moungmai coast of Chonburi province

โดย

นางสาวนงคราญ ก้อมชัยภูมิ

รหัส 5010101333

สาขาการประมง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษารายวิชาสหกิจศึกษา(ทป 497)

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีการศึกษา 2553

ชื่อเรื่อง : ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของหอยลาย (*Paphia undulata*) บริเวณชายฝั่งทะเล เมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

ชื่อผู้เขียน : นางสาวนงคราญ ก้อมชัยภูมิ

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.สุพรรณี ลีโทชวลิต

ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

ดร.กระสินธุ์ หังสพฤกษ์

บทคัดย่อ

ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ (Non – specific immunity) ของหอยลาย พบว่าปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลายทั้ง 4 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 – เดือนมกราคม 2554 พบว่าปริมาณไลโซไซม์ คือ -95.47, -83.52, -20.19 และ-44.84ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณไลโซไซม์ในหอยที่นำมาทำการศึกษามีน้อยมากจึงไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ จากวิธีการทดลองที่ 3.1 และพบว่าในเดือนตุลาคม 2553 ปริมาณไลโซไซม์จะมีน้อยที่สุด ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดหอยมีค่าระหว่าง 0.53-2.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนหมู่ A,B,AB อยู่ระหว่าง 75.47-366.84, 75.47-1,347.36 และ 0-168.4 ตามลำดับ การยับยั้งแบคทีเรียของโปรตีนในน้ำเลือดหอยพบว่า หอยลายสามารถยับยั้งเชื้อ v. *parahaemolyticus* ได้ร้อยละ 65 , E.*coli* ได้ร้อยละ 14-67 และ M. *luteus* ได้ร้อยละ 49-73 ส่วนเชื้อ v.*harveyi* และ v. *cholera* ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ สำหรับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดจากกรศึกษาในครั้งนี้พบว่าปริมาณเม็ดเลือดหอยลายพบมากที่สุดในเดือนธันวาคม 2553 และน้อยที่สุดในเดือนพฤศจิกายน 2553 คือ $0.79 \times 10^6 \pm 0.13 \times 10^6$ และ $0.33 \times 10^6 \pm 0.23 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร จากการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของหอยลาย จะพบว่าหอยลายมีระบบภูมิคุ้มกันค่อนข้างต่ำ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันเหล่านี้เป็นกลไกการป้องกันตัวเองต่อโรคต่างๆที่จะเข้าสู่ตัวหอย

คำสำคัญ : หอยลาย, ระบบภูมิคุ้มกัน, ไลโซไซม์, เลคติน, การยับยั้งแบคทีเรีย

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

Antibacterial proteins in the hemolymph of oyster *(Saccostrea forskali)* which culture along the east coast of Chonburi Rayong and Chanthaburi Provinces

นางสาวปรีชญา ต.ไชยสุวรรณ
นายวรดร นวลศิริภัค
นางสาวผกามาศ แย้มสกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2552

หัวข้อโครงงานพิเศษ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

ชื่อนักศึกษา นางสาว ปรีชญา ต.ไชยสุวรรณ
นาย วรดร นวลศิริภัค
นางสาว ผกามาศ แย้มสกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2552

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาปริมาณเลคตินในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรีโดยใช้เม็ดเลือดแดงคนหมู่โอ พบว่าในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบ จากจังหวัดชลบุรีมีปริมาณเลคตินอยู่ในช่วง 1,280-10,240 ไตเตอร์/มล. ในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบจากระยอง และจันทบุรีมีปริมาณเลคตินอยู่ในช่วง160-20,480ไตเตอร์/มล.โดยเลคตินทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 4–50 องศาเซลเซียส ต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อช่วยในการเกาะกลุ่ม และมีความจำเพาะกับ N-acetyl-D-glucosamine นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบสามารถยับยั้งเชื้อ *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *E. coli* , *M. luteus* และ *P. aeruginosa* โดยพบว่าหอยนางรมปากจีบจากจังหวัดระยอง อ่างศิลา และเมืองใหม่ยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดีที่สุดร้อยละ 89, 48 และ27 ตามลำดับ หอยนางรมปากจีบจากจังหวัดจันทบุรียับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus* และ*V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดร้อยละ 56 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบจากอ่างศิลาและเมืองใหม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 4-60 องศาเซลเซียส การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Gel Filtration Chromatography สามารถแยกโปรตีนได้ 1 กลุ่ม มีน้ำหนักโมเลกุล 68.6 กิโลดาลตัน และได้แถบของโปรตีน 4 แถบหลักใน SDS-PAGE สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 8 ไตเตอร์ และปริมาณโปรตีน 25 ไมโครกรัม สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ร้อยละ 69

คำสำคัญ : โปรตีนต้านแบคทีเรีย, เลคติน, หอยนางรมปากจีบ