รายงานการวิจัย

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

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

ภายใต้แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

Marine Microbes as the New Sources of Drug Agents and Food Supplements

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
จารุนันท์ ประทุมยศ
นารีรัตน์ ฤทธิรุตน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานการวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2557

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

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

ภายใต้แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

Marine Microbes as the New Sources of Drug Agents and Food Supplements

สุพรรณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
จารุนันท์ ประทุมยศ
นารีรัตน์ ฤทธิรุตน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2557 และได้รับการอนุเคราะห์สถานที่เลี้ยงปลาจากคณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ดร.มะลิวัลย์ คุตะโค ดร.มลฤดี สนธิ และคุณพิมพ์ปวีน์ เริงเกษตรกิจ รวมทั้งนิสิตคณะเทคโนโลยีทางทะเลทุกท่านซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2558

การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

สุพรรณี ลีโทชวลิต จันทร์จรัส วัฒนะโชติ จารุนันท์ ประทุมยศ นารีรัตน์ ฤทธิรุตน์
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี

บทคัดย่อ

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ให้กินอาหารทดลองหลายสูตรต่อการต้านทานปรสิตชนิด *Cryptocaryon irritans* โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (4 x 3 Completely Randomised Design) อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุมประกอบด้วยสูตรอาหารปลากะพง สูตรที่ 2 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย สูตรที่ 3 ประกอบด้วยอาหารปลาชุดควบคุมผสมยีตส์ *Pichia* sp. สูตรที่ 4 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม Sodium alginate อาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 49-51 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมัน12-13 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองในปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 6.21 ± 0.79 กรัมและความยาวเฉลี่ย 8.15 ± 0.58 เซนติเมตร ให้ปลากินอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวตลอดการทดลอง 4 สัปดาห์ โดยให้ปลากินอาหารทดลองแต่ละสูตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์แรกของการทดลองหลังจากนั้นเปลี่ยนให้ปลาทุกชุดการทดลองกินอาหารชุดควบคุมต่อไปอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำปลากะพงขาวจำนวน 30 ตัวต่อชุดการทดลองไปเผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 เซลล์/ปลา 1 ตัว พบว่าปลาที่กินอาหารสูตรที่ 1และ 2 มีอัตราการรอดตายร้อยละ 83 และปลาที่กินอาหารสูตร 3 และ 4 มีอัตราการรอดตายร้อยละ 93 และ 90 ตามลำดับ

ในระหว่างการทดลองทำเก็บตัวอย่างเลือดปลาเริ่มต้นการทดลอง ตัวอย่างเลือดปลากินอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ตัวอย่างเลือดปลาที่กินอาหารชุดควบคุมหลังจากกินอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ และตัวอย่างเลือดปลาหลังจากเผชิญเชื้อเป็นระยะเวลา 3 7 และ 14 วัน เพื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้น ได้แก่ กิจกรรมไลโซไซม์ในซีรั่ม ปลาที่กินอาหารสูตรที่ 2 และ 3 ที่มีปรสิตและยีสต์เป็นองค์ประกอบมีปริมาณไลโซไซม์สูงกว่าปลากินอาหารชุดควบคุม และมีปริมาณไลโซไซม์ในซีรั่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง เมื่อตรวจวัดระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวโดยเทคนิค ELISA พบว่าปลาที่กินอาหารที่มีปรสิตและยีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีแนวโน้มของระดับของแอนติบอดีสูงกว่าปลาที่กินอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มีโซเดียมอัลจิเนตเป็นองค์ประกอบ โดยที่ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิตและยีสต์มีค่าใกล้เคียงกันเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 4 สัปดาห์ ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงพบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้น โดยเฉพาะปลาที่กินอาหารสูตรที่ 2 3 และ 4 และเมื่อให้ปลาเผชิญเชื้อแล้วเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีของปลาที่กินอาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 สูงขึ้น ส่วนระดับแอนติบอดีของปลาที่กินอาหารสูตรที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แต่เมื่อปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาหลังจากเผชิญเชื้อแล้ว 7 วัน ระดับแอนติบอดีของปลาสูงขึ้นในทุกชุดการทดลองซึ่งตรงกันข้ามกับปริมาณโปรตีนในซีรั่มที่มีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่มี *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตายเป็นส่วนผสมมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มสูงกว่าในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปรสิต *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย และยีสต์ *Pichia* sp.สามารถกระตุ้นให้ปลาตอบสนองต่อแอนติเจนโดยสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

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

Supannee Leethochavalit Janjarus Watanachote Jarunan Pratoomyot Nareerat Rittirut
Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen Chonburi, 20131 Thailand

Abstract

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

During the trial, blood samples were taken at key time points from each group of fish to monitor lysozyme activity; samples were taken at the start and end of the feeding period with the experimental diets and then on days 3, 7 and 14 post-challenge with live theronts of *C. irritans*. The highest levels of lysozyme activity were seen by the end of the fourth week on the experimental diets, with the fish in groups fed diets 2 and 3 having higher levels of lysozyme than those fed the control diet. An ELISA confirmed that the levels of serum antibody in the fish fed diets 2 and 3 for two weeks had increased and were better than those fish fed on diets 1 and 4. By the end of the feeding period at the end of week 4, the fish fed diets 2 and 3 had similar levels of serum antibody. Serum protein was found to increase throughout the trial in those groups of fish fed on diets 2, 3 and 4, which had higher levels than those fed the control diet. The level

of serum antibody in the groups of fish fed diets 1-3, increased after the fish were challenged with *C. irritans,* while the levels of serum antibody in the fish given diet 4 remained unchanged throughout the trial. Seven days after the fish were challenged with the parasite, trophonts could be seen on the bodies of the fish and the levels of antibody serum rose while the levels of protein serum fell in all the experimental fish. The fish fed the diet containing the inactivated theronts of *C. irritans*, however, had higher levels of protein serum than those fed the control diet indicating that the inactivated theronts and the *Pichia* sp. were able to stimulate the *L. calcarifer* to respond to the antigens of the parasite by increasing their levels of antibody.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
สารบัญ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่
1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 2
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
ระบบภูมิคุ้มกันของปลาทะเล..... 3
ชีววิทยาปลากะพงขาว 4
ชีววิทยาของ Cryptocaryon irritans..... 7
กรดไขมันจากยีสต์ 8
การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา 9
3 วิธีการทดลอง 13
การเก็บรวบรวมปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม 13
การเตรียมปรสิต C. irritans ระยะ theront เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว..... 13
การเลี้ยงยีสต์ปริมาณมาก..... 13
การเตรียมวัตถุดิบสำหรับเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อย 14
การตรึงเซลล์ปรสิตและเซลล์ยีสต์ 14
การผลิตอาหารสำหรับปลาทะเล..... 14
การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน..... 16
4 ผลการทดลอง 20
การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้..... 20
การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน..... 22
การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรั่มปลากะพงขาว 22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	38
การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้	38
การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต C. irritans ระยะ theront	38
การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน	41
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก ก	51
ภาคคผนวก ข	53
ภาคผนวก ค	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ทรีตเมนต์ ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (เริ่มต้น N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต C. irritans ระยะ theront (เริ่มต้น N = 10) 21

4.2 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ทรีตเมนต์ (ครั้งที่ 2) ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันและเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต C. irritans ระยะ theront (เริ่มต้น N=30) 22

4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 6.5 และ 7 23

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 4.5, 5 และ 6 24

4.5 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 3 และ 6 วัน โดยเทคนิค ELISA 27

4.6 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และระหว่างการเผชิญที่เวลา 3 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค ELISA 29

4.7 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และ 6และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6.5 และ 7 31

4.8 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 4.5, 5, และ 6 33

ตารางภาคผนวกที่ ข. 1สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil ที่แสดงผลจากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ 57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะปลากะพงขาว Lates calcarifer	5
2.2	วงชีวิตของ Cryptocaryon irritans	7
3.1	แผนผังการทำ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจากในซีรัมปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย C. irritans ระยะ Theront และยีสต์	18
3.2	กราฟโปรตีนมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นโปรตีนกับค่าดูดกลืนแสงช่วง 595 นาโนเมตร ในแผ่นไมโครไตเตอร์เพลท	19
4.1	ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 ก่อนการทดลอง	24
4.2	ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทรีตเมนต์ที่ 1 (ชุดควบคุม) และ 4 ผ่านไป 2 สัปดาห์	24
4.3	ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1หลังกินอาหารทดลองทรีตเมนต์ที่ 2 และ 3 ผ่านไป 2 สัปดาห์	25
4.4	ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองทรีตเมนต์ที่ 1 และ 4 ผ่านไป 4 สัปดาห์	25
4.5	ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองทรีตเมนต์ที่ 2 และ 3 ผ่านไป 4 สัปดาห์	26
4.6	ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ทรีตเมนต์ 2)และยีสต์ (ทรีตเมนต์ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท	26
4.7	ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ทรีตเมนต์ 2)และยีสต์ (ทรีตเมนต์ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 7 และ 14 วัน (3* 7*และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท	30
4.8	ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)	32
4.9	ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน (3* 7* และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.10 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide,stacking gel 4 % acrylamide) ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA)..... 35

4.11 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide,stacking gel 4 % acrylamide) ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง 4 ไมโครกรัมต่อแถว ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA)..... 36

ภาพภาคผนวกที่ ข. 1 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ 55

ภาพภาคผนวกที่ ค. 1 โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil 60

ภาพภาคผนวกที่ ค. 2 โครมาโทรแกรมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ BS 6-2 ที่ 72 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่มีความเค็ม 25 พีพีที 60

บทที่ 1
บทนำ

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นปลาทะเลเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สามารถปรับตัวให้อยู่ในน้ำจืดหรือน้ำกร่อยได้ จัดเป็นปลาน้ำจืดหรือน้ำกร่อยขนาดใหญ่ เนื้อปลากะพงขาวมีโปรตีนสูง รสชาติอร่อยจึงได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างแพร่หลาย นอกจากจำหน่ายให้ตลาดภายในประเทศแล้วตลาดต่างประเทศก็ได้มีการนำเข้า อาทิ มาเลเซีย สิงคโปร์ ฯลฯ (ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์, 2542) อนาคตของการเลี้ยงปลากะพงขาวยังคงได้รับความสนใจเพราะเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ไม่ยุ่งยาก มีราคาที่ไม่สูงและไม่ต่ำเกินไป ภาวะการตลาดยังสามารถขยายได้ต่อไปอีก อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อขายเป็นปลาบริโภคนั้น อาจจะมีการเกิดความเครียด ทำให้สุขภาพปลาอ่อนแอลง เป็นผลให้เกิดโรคตามมา ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายจำนวนมากได้

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาทั้งต่างประเทศและประเทศไทยเอง ได้มีการนำแบคทีเรียหรือยีสต์บางชนิดมาผสมอาหารเพื่อกระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกันให้กับปลาที่เลี้ยง ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์จะพบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมทั้งในทะเล แบคทีเรียและยีสต์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ยีสต์บางชนิดมีคุณสมบัติของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory properties) บางชนิดเป็นแหล่งสารอาหารโปรตีน ไขมัน และ วิตะมิน (Kutty และ Phillip, 2008) และเนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติในด้านการเจริญเติบโตสามารถขยายพันธุ์ในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ จึงมีการใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหารกันอย่างแพร่หลาย แต่ในการนำแอคติโนมัยซีส ยีสต์ทะเลหรือสารสกัดจากแบคทีเรียทะเลมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาผลิตอาหารโดยวิธีการตรึงยังมีการศึกษาไม่มาก สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลได้ทำการวิจัยจำแนกชนิดยีสต์ทะเลมาระยะหนึ่ง (Srivibool et al, 2011) และได้ทดลองสกัดสารจากยีสต์ทะเลเหล่านี้ พบว่ามีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์น้ำ antioxidant สารสี กรดไขมันที่จำเป็นแก่ร่างกาย และสารที่ช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น เมมเบรนจากยีสต์ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยง

นอกจากนี้จากงานวิจัยของคณะผู้วิจัย (สุพรรณี ลีโทชวลิต และคณะ, 2554) พบว่าเมื่อทำการฉีดวัคซีนเชื้อตายของโปรโตซัว *Cryptocaryon irritans* เข้าสู่ปลาทดลอง พบว่าวัคซีนนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาต่อโรคจุดขาวน้ำเค็มได้มากขึ้น แต่หากต้องการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาทะเลสวยงามที่มีขนาดเล็ก การนำวัคซีนหรือยีสต์ฉีดเข้าสู่ตัวปลาอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อปลาได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่ปลาโดยวิธีการกินจึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปลาสวยงามขนาดเล็ก แต่การให้วัคซีนโดยวิธีการให้กินนั้น วัคซีนอาจจะถูกทำลายในกระเพาะอาหารก่อนจะถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์ทั้งหมดที่ลำไส้หากใช้วัสดุและเทคนิคไม่เหมาะสม ซึ่งในปัจจุบันนี้มีเทคนิควิธีการตรึงเพื่อที่จะตรึงสารที่สำคัญไว้ภายใน และไม่ให้รั่วไหลออกมาภายนอกก่อนเวลาที่ต้องการ ดังนั้นในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงได้พยายามใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูป ในรูปแบบต่างๆ เช่น microsphere diets, microencapsulated diets หรือ microparticulated diets (Lazo, 2000; Teshima, Ishikawa

และ Koshio, 2000; Koven, et al, 2001; Kolkovski, S. 2004) หรือการใช้เทคนิคการตรึงในการป้องกันรักษาโรค เช่น การพัฒนาวัคซีนรักษาโรคโดยวิธีการให้กิน แทนการแช่ หรือการใช้สารเคมีรักษาโรค (Polk et al, 1994)

ในโครงการนี้คณะผู้วิจัยได้ทดสอบการตรึงยีสต์และโปรโตซัวเมื่อทำการทดสอบการรั่วไหลของสารที่สำคัญพบว่าเทคนิคการตรึงนี้สามารถใช้ได้กับยีสต์และโปรโตซัวที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ขั้นต่อไป คณะผู้วิจัยจะทำการผลิตอาหารด้วยเทคนิคการตรึงเพื่อนำอาหารนั้นมาทดลองให้ปลากะพงขาวกิน และทำการตรวจสอบภูมิคุ้มกันระหว่างทำการเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าว และระหว่างการเผชิญเชื้อ *Cryptocaryon irritans*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ทั่วไปในการศึกษาคือการผลิตวัคซีนจากปรสิต *Cryptocaryon irritans* และจุลินทรีย์อื่นที่มีประโยชน์ โดยเทคนิคการตรึง เพื่อใช้ในการป้องกันโดยวิธีการให้กิน โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือ

1. เพื่อผลิตวัคซีนจากปรสิต *Cryptocarryon irritans* ระยะ theront และจากยีสต์ *Pichia* sp. ที่แยกได้จากน้ำทะเล
2. เพื่อเตรียมอาหารที่เสริมวัคซีนโดยเทคนิคการตรึงสารอาหารไม่ให้ละลายออกมาในน้ำ และอาหารนั้นไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ
3. เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อปรสิต *Cryptocarryon irritans* โดยใช้อาหารที่เสริมวัคซีนทดสอบในปลาเศรษฐกิจ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. งานเก็บรวบรวมปรสิต *Cryptocarryon irritans* และทำการเลี้ยงปรสิตระยะต่างๆ ให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้ผลิตวัคซีน
2. เตรียมวัคซีนจากปรสิตระยะ trophont เชื้อตาย และยีสต์ โดยใช้เทคนิคการตรึง (encapsulation)
3. งานผลิตอาหารเสริมวัคซีนสำหรับใช้ในการเลี้ยงปลา
4. งานทดสอบอาหารที่ผลิตได้ในข้อ 3 สำหรับเลี้ยงปลากะพง
5. ตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในซีรัมของปลาเมื่อได้รับอาหารที่เสริมวัคซีนในข้อ 4 ตรวจวัดปริมาณโปรตีน ปริมาณไลโซไซม์ และตรวจวัดระดับแอนติบอดี (IgM) ในซีรัม โดยเทคนิค ELISA
6. ศึกษารูปแบบของแอนติบอดีโดยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE)
7. ตรวจสอบอัตราการรอดของปลาจากการทดสอบการเผชิญเชื้อ *Cryptocaryon irritans* ระยะ theront ในปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากอาหารที่มีวัคซีน

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ระบบภูมิคุ้มกันของปลาทะเล

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune response) ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงกับสิ่งแปลกปลอม และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (acquired immune response) ซึ่งการตอบสนองที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม โดยภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดเป็นด่านแรกในการป้องกันการติดเชื้อมีความแตกต่างจากภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะทั้งเวลาในการตอบสนองซึ่งเร็วกว่า มีความจำเพาะกับโมเลกุลที่ประกอบกันเป็นตัวเชื้อโรค ไม่มีความจำ และมีความหลากหลายน้อยกว่า ความสามารถ ในการป้องกันตัวเองของปลาเริ่มจากผิวหนังและเหงือกซึ่งเป็นด่านแรกที่ปรสิต รา หรือแบคทีเรียจะเข้าสู่ตัวปลา ดังนั้นปลาต้องป้องกันตัวเองโดยโครงสร้างทางกายภาพและทางเคมี มีการหลั่งเมือกออกมาโดยเซลล์กอบเลต (goblet cells) ในเมือกปลาพบโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัว เช่น อิมมูโนโกลบูลิน ไลโซไซม์ และเลคติน (Fujita, 2002; Ewart et al., 2001; Trot et al., 2003) ส่วนในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดเกิดจากการหลั่งโปรตีนหลายๆ ชนิดจากทั้งเซลล์เม็ดเลือดและเนื้อเยื่อเข้าสู่น้ำเลือด (hemolymph) โดยโปรตีนมีความสามารถในการยับยั้ง (inhibition) เหนี่ยวนำ (act as opsonins) หรือทำลายสิ่งแปลกปลอมไม่ให้ทำอันตรายต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ transferrin , toxins, lectins, agglutinins of a nonimmunoglobulin nature, C-reactive protein, lysozyme, Interferon, Non-enzymatic lysins, Enzyme inhibitors และ Complement เป็นต้น (Pastoret et al.,1998; Trot et al., 2004; Alvarez-Pellitero, 2008) สำหรับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากระดูกแข็งไม่ซับซ้อนเท่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบอิมมูโนโกลบูลิน เพียงไม่กี่ชนิดได้แก่ IgM และ IgD ในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีถึง 5 ชนิด ได้แก่ IgG, IgM, IgE, IgA และ IgD (Anderson, 1990) ด้วยเหตุที่ระบบภูมิคุ้มกันปลามีพัฒนาการที่ไม่ดีนัก ดังนั้นปลาจึงต้องใช้ระบบภูมิคุ้มกันที่มีความหลากหลายแตกต่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่ง Trot et al. (2004) ได้สรุปไว้ว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาดูเหมือนว่าจะมีความสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อมากกว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำยังไม่มีการศึกษากันอย่างเป็นระบบแพร่หลายมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เนื่องจากสัตว์น้ำมีความหลากหลายทางวิวัฒนาการสูงมาก ปลากระดูกแข็ง (teleost) จัดเป็นสัตว์น้ำที่มีการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ซึ่งพบว่ามีลักษณะคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Anderson, 1990) เนื่องจากมีการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมด้วยการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว หรือมีการสร้างและหลั่งโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยงข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปลากระดูกแข็งที่มีระบบภูมิคุ้มกันทั้ง ๒ แบบ คือ แบบไม่จำเพาะ (non-specific หรือ innate) และแบบจำเพาะ (specific หรือ adaptive) (ประพฤติดี, 2550)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. Physical barriers ประกอบด้วย เกล็ด ผิวหนัง เมือกและเหงือก ส่วนต่างๆ เหล่านี้เป็นปราการด่านแรกที่ใช้ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าสู่ตัวปลา (Ingram, 1980;

Shepaed, 1994; Ellis, 2001) ที่เมือกของปลาจะประกอบด้วย lectins, pentraxins, The mucus of fish contains lectins, pentraxins, lysozymes, complement proteins, antibacterial peptides และ immunoglobulin M (IgM) เป็นต้น ส่วนประกอบเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อของปลา (Alexander and Ingram, 1992; Rombout et al., 1993; Aranishi and Nakane, 1997; Boshra et al., 2006; Saurabh and Sahoo, 2008) นอกจากนี้ชั้นของหนังกำพร้าสามารถตอบสนองการรุกล้ำของเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น ซึ่งความสมบูรณ์ของเซลล์มีความสำคัญต่อสมดุลออสโมติก (Hibiya, 1994)

2. Humoral components ประกอบด้วยโมเลกุลต่างๆ ได้แก่

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

2.2 Lytic enzymes เช่น lysozymes, chitinases, cathepsins มีทำหน่าที่ในการยอยทำลายผนังเซลลแบคทีเรีย

2.3 Growth inhibitors เช่น transferrin (iron binding protein), interferon (IFN) และ Mx protein ทำ หนาที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือไวรัส

2.4 Protease inhibitors เช่น a-2 macroglobulin มีหนาที่ครอบคลุมกวาง

3. Cellular components ในปลากระดูกแข็งจะมี non specific cells components เช่น phagocytic cells, granulocyte (neutrophils), monocytes (macarophages), และ nonspecific cytotoxic cells (NCC) คล้ายกับในสัตวเลี้ยงลูกดวยนม (ประพฤดิดี, 2550)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune system) ประกอบด้วย

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

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

ชีววิทยาปลากะพงขาว

1. การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

ปลากะพงขาว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Lates calcarifer* ชื่อสามัญ Giant sea perch และมีชื่อพ้องอีกหลายชื่อ เช่น Seabass, White seabass, Silver seabass, Giant perch, Plamer, Cock-up และ Two-finned seabass (Rabanal and Soesanto, 1982) พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อน และกึ่งร้อนบริเวณทวีปเอเชีย เป็นปลา 2 น้ำ โดยวัยอ่อนจะอาศัยอยู่ในน้ำจืด และจะอพยพไปในทะเลเมื่อเจริญพันธุ์และต้องการวางไข่ ปลากะพงขาวสามารถจัดลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Chordata
Sub-phylum Vertebrata
Sub-class Teleostomi
Order Percomorphi
Family Centropomidae
Genus *Lates*
Species *calcarifer*

ภาพที่ 2.1 ลักษณะปลากะพงขาว *Lates calcarifer*

2. ลักษณะทั่วไป

ปลากะพงขาวมีลักษณะลำตัวค่อนข้างยาวและหนา ลำตัวแบนด้านข้าง บริเวณไหล่จะโค้งมน ส่วนตัวจะลาดชันและเว้า ขากรรไกรล่างยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้นและตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนของปากสามารถยืดหดได้บ้าง มีฟันที่มีความละเอียดเรียงอยู่บนขากรรไกรทั้งบนและล่างถึงเพดานปาก ตามีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม แผ่นแก้มมีขนาดใหญ่ ขอบหลังมีหนาม 4 ซี่ และเรียงตามด้วยซี่เล็ก ๆ ตลอดแนวสันหลัง ด้านบนส่วนหัวและบนแผ่นเหงือกมีเกล็ดขนาดต่าง ๆ กัน เกล็ดบริเวณลำตัวมีขนาดใหญ่ ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา บริเวณท้องมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบหลัง ครีบก้น ครีบหาง มีสีเทาปนดำบาง ๆ มีครีบหลัง 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงกับครีบท้อง มีก้านครีบแข็ง 7-8 ก้าน เชื่อมต่อด้วยเยื่อบาง ๆ ส่วนตอนหลังนั้นจะแยกจากตอนแรกอย่างชัดเจน มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมี 10-11 ก้าน ครีบหูและครีบอกยาวไม่ถึงรูก้น ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 7-8 ก้าน ข้อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลม เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 52-61 เกล็ด (Blaber, Milton และ Salini, 2008)

3. การแพร่กระจาย

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ที่สุด เจริญเติบโตได้ดีในน้ำกร่อยและน้ำจืด คือในช่วงชีวิตของปลากะพงขาวจะมีการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำจืด และน้ำเค็ม ปลากะพงขาวจะผสมพันธุ์และวางไข่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 28-32 ppt ในทะเลที่มีความลึก หลังจากนั้นไข่จะถูกพัดพาเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง และฟักออกเป็นตัว ลูกปลากะพงขาวที่ฟักออกเป็นตัว จะดำรงชีวิต

ในน้ำกร่อยและในน้ำจืด จนมีอายุได้ 2-3 ปี มีขนาด 3-5 กิโลกรัม จะเคลื่อนตัวออกสู่ทะเล เพื่อทำการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไป

ปลากะพงขาวขนาดใหญ่จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากฝั่งมากนัก เป็นปลาเขตร้อนที่มีการแพร่ กระจายอยู่ในอาณาเขตที่ค่อนข้างกว้างมาก โดยพบปลากะพงขาวตามลำน้ำที่ติดต่อกับฝั่งทะเลของประเทศต่าง ๆ ในแถบตะวันออกเฉียงใต้และตะวันออกไกล ตั้งแต่บริเวณตอนใต้ของประเทศจีนจนถึงอ่าวเปอร์เซียในน่านน้ำประเทศปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา มาเลเซีย พม่า ไทย กัมพูชา เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย และแถบอื่น ๆ ของโลก ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และแพร่ขยายพันธุ์ อย่างไรก็ตามปลากะพงขาวพบมากบริเวณปากแม่น้ำลำคลองปากทะเลสาบและปากอ่าวบริเวณที่เป็นป่าชายเลนที่มีน้ำเค็มท่วมถึง โดยจะพบอยู่ทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นับตั้งแต่พม่า ไทย มาเลเซีย เวียดนาม และแถบชายฝั่งทะเลของจีน

สำหรับประเทศไทยพบปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ในแถบจังหวัดชายทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากชายฝั่งมากนัก โดยอาศัยอยู่ชุกชุมตามปากแม่น้ำ ลำคลองและปากทะเลสาบ สามารถอาศัยและเจริญเติบโตในแหล่งน้ำจืดได้อีกด้วย จัดเป็นปลาประเภทสองน้ำอย่างแท้จริงแต่เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ต้องอพยพถิ่นฐานไปสู่ปากแม่น้ำและสืบพันธุ์วางไข่ในทะเลต่อไปเช่นเดียวกับกุ้งก้ามกรามจะวางไข่ในน้ำกร่อย แหล่งที่พบปลากะพงขาวในพื้นที่จังหวัดระยอง ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสงคราม ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ชุมพร ระนอง กระบี่สุราษฎร์ธานี สงขลานครศรีธรรมราช ปัตตานี นราธิวาส พังงา ตรังและสตูล เป็นต้น (ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์, 2542)

4. อาหารปลากะพง

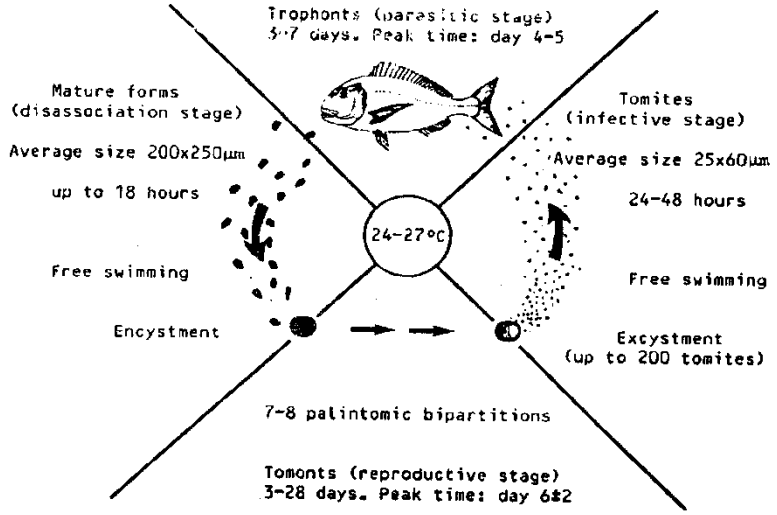
จากบทความของ Boonyaratpalin และ Williams (2002) ที่กล่าวว่าปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อที่ต้องการอาหารที่มีโปรตีนอยู่ในช่วง 40 และ 50% (NRC, 1993; Catacutan และ Coloso, 1995) และความต้องการคาร์โบไฮเดรตอยู่ที่ 20% และไขมันจะอยู่ในช่วง 6-18%

ชีววิทยาของ *Cryptocaryon irritans*

1. การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

ปรสิตที่ทำให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cryptocaryon irritans* เป็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัวซิลิเอต สามารถจัดจำแนกปรสิต *C. irritans* (Colorni, 1987; Colorni และ Burgess, 1997) ตามลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Domain Eukaryota
Kingdom Chromalveolata
Superphylum Alveolata
Phylum Ciliophora
Class Prostomatea
Genus *Cryptocaryon*
Species *irritans*



ภาพที่ 2.2 วงชีวิตของ *Cryptocaryon irritans* (Colorni, 1987)

2. ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวชนิดนี้ที่ได้จากปลาทะเลที่เก็บมาจากธรรมชาติจาก SE Queenlad, Australia เมื่อมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ทั้ง SEM และ TEM พบว่า ระยะโทรฟอนต์ มี apical cytostome และ post-oral groove circumoral cirri ของโทรฟอนต์และธีรอนต์ ประกอบด้วย dikinetids (Diggles และ Adlard, 1997)

วงจรชีวิตของพยาธิชนิดนี้ประกอบด้วยระยะต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2-2 ได้แก่ระยะที่ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า ระยะโทรฟอนต์ ระยะนี้พยาธิจะอาศัยเกาะบนตัวปลาหรือซี่เหงือก ประมาณ 3–7 วัน เมื่ออุณหภูมิอยู่ที่ 23–30 องศาเซลเซียส อาศัยกินเนื้อเยื่อ เมือกของปลา (Cheung, Nigrelli และRuggieri, 1979; Burgess และ Matthew, 1994; Colorni, 1985, 1987; Yoshinaga และ Dickerson, 1994) ต่อมาจะเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์คือระยะโทรฟอนต์ แล้วหลุดออกจากตัวปลาและเข้าสู่ระยะที่เรียกว่าโพรโทมอนต์ ระยะนี้พยาธิจะคืบคลานไปบนพื้นก้นตู้หรือวัสดุ ใช้เวลาประมาณ 2–8 ชั่วโมง หรืออาจกินเวลานานถึง 18 ชั่วโมง หลังจากหลุดออกจากตัวปลา เมื่อโพรโทมอนต์ลงเกาะกับพื้นผิววัตถุ จะเริ่มสร้างซีสต์มาหุ้มตัวเพื่อเข้าสู่ระยะโทมอนต์ ภายในโทมอนต์ ซึ่งเป็นระยะที่เป็นซีสต์ใช้เวลา 3–28 วัน ที่อุณหภูมิ 24–27 องศาเซลเซียส ภายในโทมอนต์ จะมีการแบ่งเซลล์เพื่อได้ระยะที่เรียกว่าโทไมต์ โดยที่ 1 โทมอนต์ จะได้ประมาณ 200 โทไมต์ หรือมากกว่า ต่อมาโทไมต์ จะออกจากซีสต์และเจริญเป็นระยะธีรอนต์ ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมจะเข้าเกาะที่ซี่เหงือกและผิวตัวของปลา จากการที่ซีสต์ของปรสิตชนิดนี้สามารถแบ่งเซลล์จนได้เซลล์ลูกได้ถึง 200 เซลล์ จึงทำให้การแพร่ขยายของโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว (สถาพร และจูอะดี, 2527)

จากการศึกษาของ Cheung และคณะ (1979) ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อวงจรการสืบพันธุ์ของ *C. irritans* โดยนำระยะโทรฟอนต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ที่ได้จากปลาสลิดหินสามจุด (Damselfish, *Dascyllus trimaculatus*) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7-37 องศาเซลเซียส เพื่อสังเกตการสร้างซีสต์และพัฒนาการของโทไมต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 30, 25 และ 20 องศาเซลเซียส ที่เวลา 16 ชั่วโมง การสร้างซีสต์ของโทฟอนต์อยู่ที่ร้อยละ70, 77 และ 64 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการสร้างซีสต์ร้อยละ 44 และที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส การสร้างซีสต์เหลือเพียงร้อยละ 10 สำหรับอุณหภูมิที่สูงที่สุดคือ 30 องศาเซลเซียส โปรโตซัวจะออกจากซีสต์ร้อยละ 50 ภายในเวลา

5 วัน และร้อยละ 100 ภายในเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นระยะโทไมต์เริ่มออกจากซีสต์ในวันที่ 8 และวันที่ 9 พบร้อยละ 60 และ 70 ที่อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส ระยะโทไมต์ ร้อยละ10 จะเริ่มออกจากซีสต์ในวันที่ 9 และร้อยละ 40 ในวันที่ 10 การออกจากซีสต์จะไม่เกิดขึ้นถ้าอุณหภูมิอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 7 องศาเซลเซียส ซีสต์ที่แตกออกจากโทมอนต์ใหม่ ๆ จะถูกนำไปใส่ในน้ำทะเลที่ความเค็มต่างกัน และรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 7–37 องศาเซลเซียส โดยพบว่าในน้ำที่มีความเค็มต่ำ เช่น 16 ppt หรือต่ำกว่า 16 ppt จะทำให้โทมอนต์แตกออก โดยโทมอนต์ร้อยละ 30 เริ่มแตกออกทันทีที่อุณหภูมิ 30, 25 และ 7 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้นน้ำทะเลร้อยละ 50 ในขณะที่โทมอนต์ร้อยละ 25 เริ่มแตกออกทันทีที่อุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้นน้ำทะเลร้อยละ 25 อย่างไรก็ตามไม่พบพัฒนาการของซีสต์ในความเข้มข้นน้ำทะเลเหล่านี้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าร้อยละการแตกออกของโทมอนต์จะสูงขึ้นเมื่อลดความเค็มลงเรื่อย ๆ (Dan และคณะ, 2006)

3. ระดับความไวในการติดเชื้อ (Host susceptibility)

C. irritans เป็นปรสิตที่ไม่ต้องการความจำเพาะของเจ้าบ้าน สำหรับปลาที่เลี้ยง (Burgess และ Matthews, 1995) แต่ในธรรมชาติ Diggles และ Lester (1996) พบว่าปรสิตชนิดนี้มีความจำเพาะของเจ้าบ้านค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงสามารถก่อให้เกิดโรคในปลาทะเลกระดูกแข็งได้เกือบทุกชนิด ส่วนปลากระดูกอ่อน เช่น ปลาฉลามและปลากระเบนจะมีความต้านทานต่อการเกิดโรคได้ดี (Colorni และ Burgess, 1997) แม้ว่าพยาธิชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในปลาทะเลได้ทุกชนิด แต่ระดับความไวในการก่อให้เกิดโรคในปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป (Lipton, 1993) โดยพบว่าปลาในกลุ่ม surgeonfishes, blue regal/ hippo tang (*Paracanthurus hepatus*) มีระดับความไวในการติดโรคสูงมาก ปลาทะเลที่มีระดับความไวรองลงมา เช่น ปลาที่อยู่ในกลุ่มปลาปักเป้า cowfish, boxfish และ pufferfish จากการศึกษาผลกระทบของปรสิต ***C. irritans*** ต่อปลากะรังลายเสือ (*Sebastiscus marmoratus*) โดยการให้ปลาดังกล่าว เผชิญเชื้อ theronts ของปรสิต จำนวน 2500, 5000, 7500, 10,000, 20,000, และ 30,000 ตัว/ปลา 1 ตัว ตามลำดับ (น้ำหนัก 45 ± 3 g.) ทำการตรวจสอบอัตรารอด การกินอาหาร อัตราการหายใจ ความเข้มข้นของ serum ion และกิจกรรม Na+/K+-ATPase ของเหงือก พบว่าอัตรารอดของปลาจะลดต่ำลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยปลาในกลุ่มที่เผชิญเชื้อ มากกว่า 5,000 theronts/ตัว จะหยุดกินอาหารภายใน 4 วัน อัตราการหายใจของปลากลุ่มที่เผชิญเชื้อ 2,500 และ 5000 theronts/ตัว จะเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ในทางกลับกันกลุ่มที่เผชิญเชื้อมากกว่า 7,500 theronts/ตัว อัตราการหายใจจะเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญภายใน 12 ชั่วโมง สำหรับกิจกรรม Na+/K+-ATPase และความเข้มข้นของ serum Na+ and Cl- จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ปลาเผชิญเชื้อจำนวนมากขึ้น จากงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสรุปว่าปลาสามารถฟื้นตัวจากโรคได้หากเผชิญเชื้อในปริมาณที่ต่ำ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสูงขึ้นปลาจะเริ่มมีอาการเครียด ดังนั้นอาการของโรคในเลื้องต้นอาจสังเกตได้จากการกินอาหารลดลงและมีการหายใจถี่ขึ้น (Yin et al., 2014)

กรดไขมันจากยีสต์

ยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ (fungi) และอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (Ascomycota) ยีสต์เป็นราที่มีเซลล์เดียว ซึ่งเซลล์อาจจะมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ หรือบางทีอาจพบอยู่ในลักษณะหลายเซลล์ต่อกันสั้นๆ หรือลักษณะคล้ายเส้นใยและมีการแตกกิ่งแขนง พบว่ามี

คาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบของเซลล์ ผนังเซลล์ โดยในยีสต์ทั่วไปมีส่วนของผนังเซลล์อยู่ประมาณร้อยละ 30 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมักมีพอลิแซ็กคาไรด์กลูแคนและแมนแนนอยู่ถึงร้อยละ 90 ของผนังเซลล์ ส่วนปริมาณไขมันที่พบในเซลล์ยีสต์จะผันแปรตามชนิดของยีสต์

ยีสต์มีลิปิดในการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ยีสต์ที่มีลิปิดสะสมอยู่ในเซลล์มากกว่าร้อยละ 20 ของชีวมวล เช่น *Rhodotorula* spp., *Lipomyces starkeyi, Crytococcus curvatus* และ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดสามารถสะสมลิปิดได้สูงถึงร้อยละ 40-70 ของชีวมวล โดยปริมาณลิปิดที่สร้างขึ้นจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยง จากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่ายีสต์สามารถสะสมไขมันได้มาก มีการเจริญรวดเร็ว และมีส่วนของไทรเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากซึ่งคล้ายกับกรดไขมันในน้ำมันพืช (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) เดิมยีสต์ได้รับความสนใจน้อยแต่ในขณะนี้ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก โดยใช้ทั้งแหล่งคาร์บอนที่ชอบน้ำ (hydrophilic carbon source) และแหล่งคาร์บอนทีไม่ชอบน้ำ (hydrophilic carbon source) ยีสต์ผลิตกรดไขมันตั้งแต่คาร์บอน 8 อะตอมจนถึงคาร์บอน 24 อะตอม ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในยีสต์จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว สำหรับไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบจะเป็น กรดไลโนเลอิก (linoleic acid, C18:2), กรดไลโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) ตัวอย่างเช่น *Candida, Crytococcus, Hansenula, Lipomyces* และ *Rhodotorula* (Zelles, 1997)

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา

การศึกษาของ Yambot และ Song (2006) มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) ในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรังจุดส้มทำโดยให้ปลาสัมผัสกับเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ซึ่งได้จากระยะ tomont และโดยการฉีดเชื้อตายซึ่งประกอบด้วย *C. irritans* ระยะ theront ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลีนเข้าทางช่องท้อง จากการตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในเมือกโดยเทคนิค ELISA พบค่าไตเตอร์สูงในลูกปลากะรังจุดส้มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับปลากะรังจุดส้มตัวเต็มวัยหลังจากสัมผัสกับ *C. irritans* ระยะ theront เป็นเวลา 3 สัปดาห์เปรียบเทียบกับค่าไตเตอร์ก่อนการเผชิญ (กลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อปรสิต) นอกจากนี้ปรสิตระยะ tomont ที่ได้จากปลากะรังจุดส้มตัวเต็มวัยหลังจากได้รับการกระตุ้น 3 สัปดาห์จะมีจำนวนน้อยกว่า tomont หลังการกระตุ้นเพียงครั้งเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

ในการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตายนั้นไม่พบการตายในปลากะรังจุดส้มที่ได้รับเชื้อตายปริมาตร 100 ไมโครกรัมต่อปลาหนึ่งตัว ในขณะที่การตายจะเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 40 ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อตายปริมาตร 10 ไมโครกรัมต่อปลาหนึ่งตัว และการตายจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 100 ในกลุ่มควบคุม (PBS) ตามลำดับ ผลจากการฉีดเชื้อตายของกลุ่มที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน การตายจะอยู่ที่ร้อยละ 37.5 (โดสของเชื้อตายที่สูงที่สุด) และร้อยละ 100 ของกลุ่มควบคุม นอกจากนี้มีการตรวจพบปรสิต *C. irritans* ระยะ tomont จำนวน 1,830 เซลล์ ในกลุ่มควบคุมหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วย PBS เป็นเวลา 5 วัน ในขณะที่ไม่พบปรสิตในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตาย

นอกจากนี้ตัวอย่างจากกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อตายที่เวลา 5 วันและ 7 วันมีปริมาณปรสิตระยะ trophont และระยะ tomont ที่พบน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม ผลการทดลองที่ได้แสดงว่าระบบภูมคุ้มกันในปลาเกิดขึ้นได้ในปลาที่ได้รับการกระตุ้น โดยดูจากค่าไตเตอร์แอนติบอดี

ในเมือกของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต *C. irritans* ปลามีอัตรารอดที่สูงกว่า และจำนวนปรสิตที่เกิดขึ้นน้อยกว่าของตัวปลาที่กระตุ้นด้วยเชื้อตายเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นนี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันหรือจำกัดการลงเกาะ การรุกรานและการพัฒนาของปรสิต *C. irritans* ระยะธีรอนต์ บนผิวของปลากะรังจุดส้มที่ถูกกระตุ้น

Bai at.al (2008) มีการศึกษาเกี่ยวกับ *C. irritans* โดยแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของปรสิต *C. irritans* และการป้องกันการติดเชื้อเปรียบ เทียบการตอบสนองภูมิคุ้มกันในปลากะรัง การชักนำให้เกิดการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* จะใช้ปรสิตระยะ theront, tomont และ trophont โดยการฉีดกระตุ้นและทดลองเพื่อคัดเลือกแอนติเจนที่ถูกตรึง ค่าไตเตอร์แอนติบอดีของซีรั่มปลาที่ได้จากภูมิคุ้มกันจะถูกกำหนดได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA และวิเคราะห์การตรึงที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ หลังถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบร้อยละการอยู่รอดของปลากะรังจุดส้มที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ theront ระดับแอนติบอดีซีรั่มที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะ theront มีค่าสูงกว่าในปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ trophont หรือระยะ tomont ระดับนัยสำคัญของภูมิคุ้มกันที่ปลาได้รับโดยการกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ theront จะมีค่าสูงกว่าแต่ไม่พบในปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ trophont หรือ tomont การวิเคราะห์โดยเทคนิค Western blotting จะใช้การตรึงโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal immobilization antibodies) ที่ได้จากกระต่ายโดยการแสดงให้เห็น immunoreactive band ที่ต้านการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* ขนาดที่ได้ประมาณ 34 กิโลดาลตัน ซีรั่มจากหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ที่สูงกว่าปรสิตระยะ trophont หรือ tomont ในปลากะรังจุดส้ม จากการทดลองเพื่อคัดแยกแอนติเจนและเพื่อนำมาเตรียมการพัฒนาสร้างวัคซีนเพื่อต้านเชื้อปรสิต

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

Xu at.al (2009) ได้ทดลองการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาดุกด้วยปรสิตระยะ trophonts ที่อ่อนแอ แล้วตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีจากเมือกและซีรั่ม และการอยู่รอดของปลาหลังจากได้รับเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* ในการทดลองที่ 1) กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีด trophonts ที่ถูกทำให้อ่อนแอใน 1% ฟอร์มาลีนเข้าไปบริเวณเยื่อบุช่องท้องของปลา 2) trophonts ที่ถูกทำให้อ่อนแอใน 3% ฟอร์มาลีน และ 3) trophonts ที่ถูกแช่แข็งและทำให้ละลาย กลุ่มควบคุมที่ 1 (positive) กระตุ้นด้วย theronts ที่มีชีวิต กลุ่มควบคุมที่ 2 (negative) กระตุ้นด้วย 5 % bovine serum albumin (BSA) ที่ระยะเวลา14, 28, 50 วัน หลังได้รับการกระตุ้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ค่าไตเตอร์แอนติบอดีจากเมือกและซีรั่ม ที่กระตุ้นด้วย trophonts ที่อ่อนแอในฟอร์มาลีนหรือ trophonts ที่แช่เย็น ที่ระยะเวลา 50 วันหลังการ

กระตุ้น ให้ปลาดุกเผชิญ theronts แล้วดูอัตรารอดของปลา พบว่ามีปลามีอัตรารอดอยู่ที่ 33.3 % ถึง 43.3 % theronts ในปลาดุกที่กระตุ้นด้วย trophonts ที่อ่อนแอในฟอร์มาลีนหรือ trophonts ที่แช่เย็น อัตรารอดของปลาดุกหลังได้รับการกระตุ้นด้วย theronts และ BSA จะอยู่ที่ 93.3 และ 0 % ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 ฉีดปลาดุกด้วย sonicate trophonts ปริมาณต่าง ๆ ได้แก่ 1.) 5 trophonts หรือโปรตีน 10.2 ไมโครกรัมต่อปลา 1 ตัว 2.) 10 trophonts หรือโปรตีน 20.4 ไมโครกรัมต่อปลา 1 ตัว 3.) 20 trophonts หรือโปรตีน 40.8 ไมโครกรัมต่อปลา 1 ตัว และ 4.) 5% BSA เป็นกลุ่มควบคุม ค่าไตเตอร์แอนติบอดีสูงสุดจากซีรั่มของปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 10 หรือ 20 trophonts ต่อปลา1 ตัว คือ (1/210 ถึง 1/480) และค่าไตเตอร์แอนติบอดีจากเลือดคือ (1/48 ถึง 1/52 ตามลำดับ ที่เวลา 22 วันหลังได้รับการกระตุ้นการรอดอยู่ที่ 63.3 – 60.0 % ปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 5 trophonts ต่อปลา 1 ตัว มีค่าไตเตอร์แอนติบอดีจากซีรั่มและเมือกอยู่ที่ 1/52 และ 1/12 และอัตรารอดจะอยู่ที่ 23.3% ปลาดุกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย BSA อัตรารอดจะอยู่ที่ 6.7 % จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ trophonts ที่ถูก sonicate และอัตรารอดของปลาดุก (ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.859, $p < 0.0$) มีค่าแอนติบอดีที่เกิดจากการชักนำด้วย sonicate trophonts ในปริมาณต่างๆ แต่ไม่พบการตอบการตอบสนองของแอนติบอดีเมื่อกระตุ้นด้วย trophonts ที่ถูกทำให้อ่อนแอด้วยฟอร์มาลีนหรือแช่เย็นทั้งในซีรั่มและเมือก และพบการตายเมื่อกระตุ้นปลาด้วย trophonts ที่มีชีวิต

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

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

ควบคุม กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 คือ 0, 0.630 และเมื่อปลามีการเผชิญเชื้อหลายรอบทำให้ imobilizing titer (853.33±295.60) ของกลุ่ม 2 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า alkaline phosphatase และ acid phosphatase activities ของกลุ่ม 2 ยังเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การเก็บรวบรวมปรสิตที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็ม

1. นำปลากะพงที่ติดเชื้อโรคจุดขาวน้ำเค็ม *C. irritans* แช่ในน้ำทะเล (Oestmann และ Lewis, 1995) เพื่อให้ปรสิตระยะ trophont หลุดออกจากตัวปลา

2. เก็บปรสิต *C. irritans* ระยะ trophont ที่หลุดอยู่ก้นถังด้วยหลอดดูดปลายแหลม (Pasture pipette) ล้างปรสิตด้วยน้ำทะเล (SM 30, ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอร์ริโอกำลังขยาย 40 ให้สะอาด ประมาณ 3 ครั้ง

3. นำ *C. irritans* ระยะ trophont ที่ล้างสะอาด ใส่ในจานเพาะเลี้ยง (petri dish) ที่มีน้ำทะเล (SM 30) เพื่อให้ปรสิต *C. irritans* เข้าสู่ระยะ tomont ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง

4. นำจานเพาะเลี้ยงที่มี *C. irritans* ระยะ tomont ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 และเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเล (SM 30) ทุกวัน เมื่อปรสิตเข้าสู่ระยะ theront ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน ให้เก็บ theront ไว้ในน้ำทะเลเพื่อใช้ในการทดลอง

5. นำปรสิตระยะ theront ที่เก็บในน้ำทะเลปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนของตะกอนที่เป็นปรสิตระยะ theront ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส หรือแช่ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน

การเตรียมปรสิต *C. irritans* ระยะ theront เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว

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

การเลี้ยงยีสต์ปริมาณมาก

1. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ *Pichia* sp. เป็นชนิดที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัด ชลบุรี ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณ รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

2. การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. โดยการเขี่ยหัวเชื้อจากอาหารแข็งลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เชื้อโต จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร

การเตรียมวัตถุดิบสำหรับเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อย

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

2. น้ำทะเลเทียม (Artificial Sea Water) องค์ประกอบและวิธีการเตรียมน้ำทะเลเทียม (แสดงในภาคผนวก ก)

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อยในน้ำทะเลทียม (Artificial Sea Water) ที่ความเค็ม 25 พีพีที

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ กรองเอากากชานอ้อยออก 3 ครั้ง (กรองด้วยบุชเนอร์ ตามด้วยผ้าขาวบาง และสุดท้ายกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1) นำอาหารไปนึ่งในหม้อความดันอัตโนมัติ องค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (แสดงในภาคผนวก ก)

4. การเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ระดับความเค็ม 25 พีพีที นำหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง

การตรึงเซลล์ปรสิตและเซลล์ยีสต์

1. การตรึงเซลล์ปรสิตระยะ theront

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

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

1.3 เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำเม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุชเนอร์ ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิลลิตร

1.4 ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

2. การตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.*

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

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

2.3 เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ออกจากเม็ดเจล นำเม็ดเจลที่ได้ใส่กรวยบุชเนอร์ ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 200 มิลลิลิตร

2.4 ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

การผลิตอาหารสำหรับปลาทะเล

1. ทำการผลิตอาหารสำหรับปลาทะเลที่มี ส่วนผสมของอาหารสัตว์น้ำในแต่ละทรีตเมนต์มีดังนี้ อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุมประกอบด้วยสูตรอาหารปลากะพง สูตรที่ 2 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย สูตรที่ 3 ประกอบด้วยอาหารปลาชุดควบคุมผสมยีตส์ *Pichia* sp. สูตรที่ 4 ประกอบด้วยอาหารชุดควบคุมผสม Sodium alginate อาหารทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 49-51 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมัน12-13 เปอร์เซ็นต์
2. การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้
3. การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต

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

3.2 ทดลองให้ปลากะพงขาวกินอาหารชุดทดลองปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

3.3 ทำการสุ่มปลากะพงขาวจำนวน 12 ตัว เพื่อเจาะเลือดก่อนเริ่มทดลองและเมื่อกินอาหารชุดทดลองครบ

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

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

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

การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

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

1. การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรัมปลากะพงขาว

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

2. การตรวจผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การเตรียมสารเคมี (แสดงในภาคผนวก ก)

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

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

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

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

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

6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ150 ไมโครลิตร

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

9. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

10. ล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M PBS-T ปริมาตรหลุมละ150 ไมโครลิตร

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

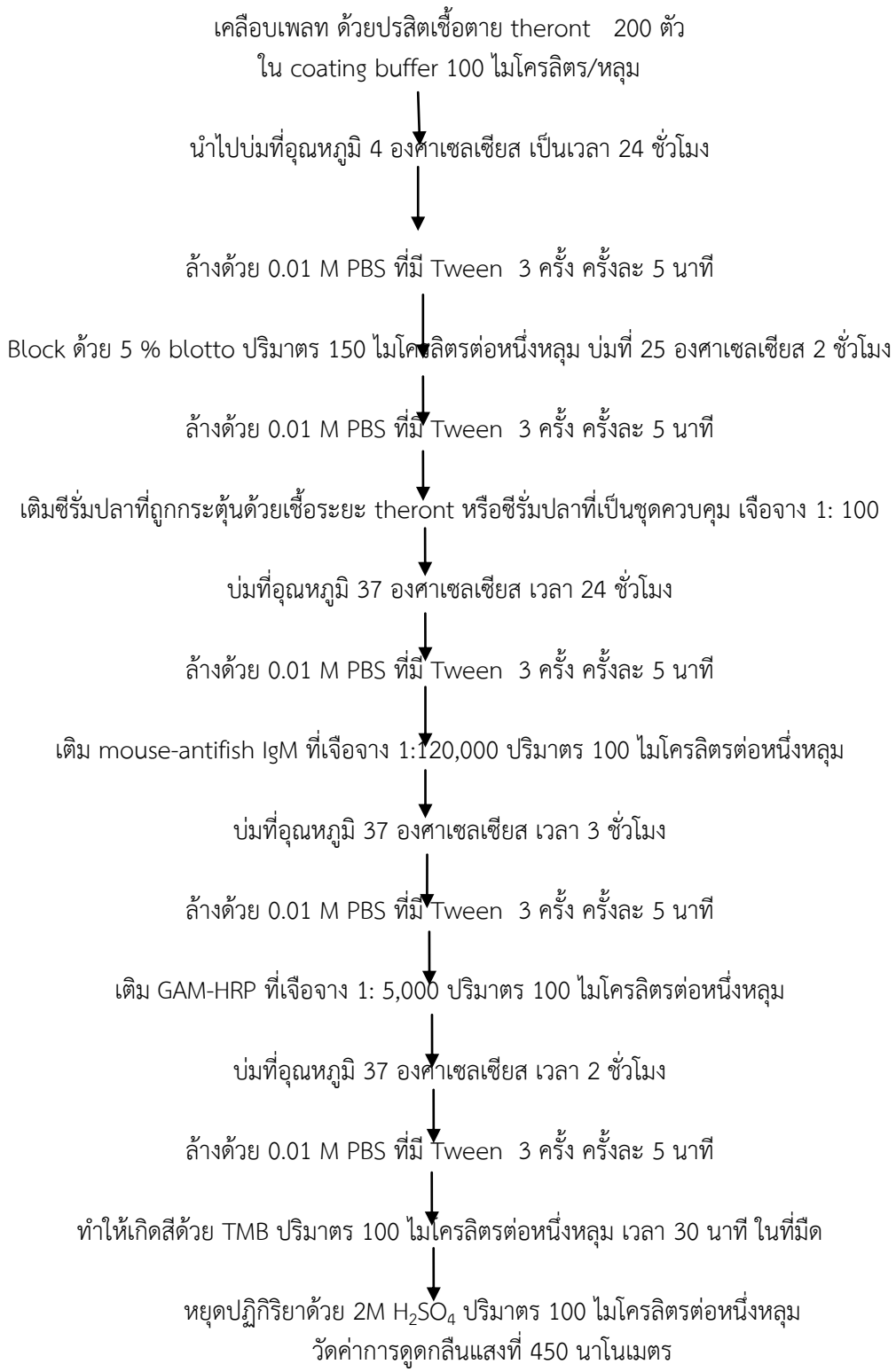
12. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

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

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

15. หยุดปฏิกิริยาด้วย 2M H_2SO_4 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

16. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.1 แผนผังการทำ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจากในซีรัมปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย *C. irritans* ระยะ Theront และยีสต์

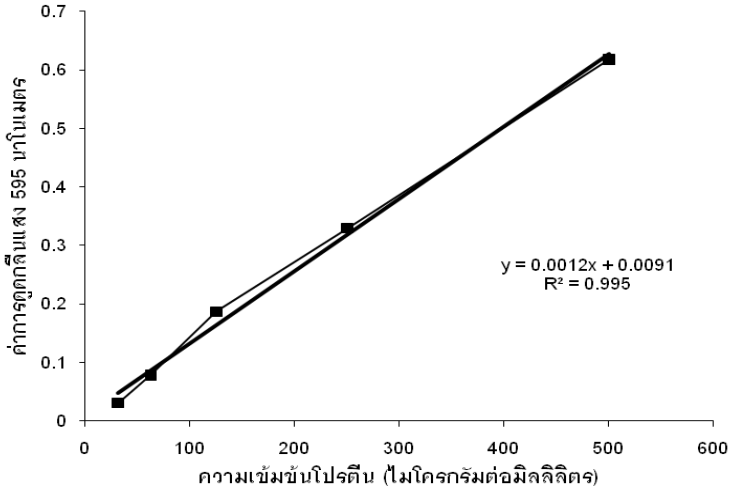
การแยกแอนติบอดีปลากะพงขาวโดยเทคนิค SDS-PAGE

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

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ (การเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก ก)

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



ภาพที่ 3.2 กราฟโปรตีนมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นโปรตีนกับค่าดูดกลืนแสงช่วง 595 นาโนเมตร ในแผ่นไมโครไตเตอร์เพลท

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพง

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

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้

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

การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

ครั้งที่ 1 นำปลากะพงขาวขนาดเฉลี่ย 7.12±0.48 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 5.21±1.00 ก. มาพักและกักกันโรคก่อนนำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เพื่อนำไปเลี้ยงในกะชัง กะชังละ 40 ตัว จำนวน 12 กะชัง ในบ่อดินที่ทำการเตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า โดยแบ่งออกเป็น 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 กะชัง ให้กินอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ทรีตเมนต์ที่ 1 เป็นชุดควบคุม ทรีตเมนต์ 2 ผสมปรสิต *C. irritans* ทรีตเมนต์ 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp. และทรีตเมนต์ 4 ผสม Calcium alginate โดยให้กินเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้ว สุ่มปลากะพงขาวจำนวนกะชังละ 4 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดและทำการเจาะเลือด นำปลากะพงขาวไปเลี้ยงในกะชังเดิมอีก 6 สัปดาห์ โดยให้อาหารสูตรเดียวกับ ทรีตเมนต์ควบคุม อาหารที่ให้คิดเป็น 3% ของน้ำหนักเฉลี่ยที่ชั่ง จากนั้นสุ่มปลาจำนวนเท่าเดิมมาเจาะเลือดทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงปลาจนครบ 6 สัปดาห์ นำปลาที่เหลือทั้งหมดในกระชังจากบ่อดินมาใส่ในถังไฟเบอร์ความจุ 300 ลิตร โดยใส่ถังละ 10 ตัว ให้เผชิญเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 theront/ปลา 1 ตัว จดบันทึกจำนวนปลาตายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อหาอัตรารอดของปลากะพงขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ทรีตเมนต์ ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (เริ่มต้น N = 30) และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront (เริ่มต้น N = 10)

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

การทดลองครั้งที่ 2 นำปลากะพงขาวขนาดเฉลี่ย 8.15±0.58 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 6.21±0.79 ก. มาพักและกักกันโรคก่อนนำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาด เพื่อนำไปเลี้ยงในกะชัง กะชังละ 40 ตัว จำนวน 12 กะชัง ในบ่อดินที่ทำการเตรียมน้ำไว้ล่วงหน้า โดยแบ่งออกเป็น 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 กะชัง ให้กินอาหารที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ทรีตเมนต์ควบคุม ทรีตเมนต์ผสม *C. irritans* ทรีตเมนต์ผสมยีตส์ *Pichia* sp. และทรีตเมนต์ผสม Calcium alginate โดยให้กินเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ที่ปริมาณ 3% ของน้ำหนักเฉลี่ย หลังจากครบ 2 สัปดาห์แล้ว สุ่มปลากะพงขาวจำนวนกะชังละ 4 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดและทำการเจาะเลือด นำปลากะพงขาวไปเลี้ยงในกะชังเดิม ให้อาหารสูตรเดียวกับทรีตเมนต์ควบคุม โดยให้เป็น 3% ของน้ำหนักเฉลี่ยที่ชั่ง ทำการเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มปลามากะชังละ 4 ตัว ชั่งน้ำหนัก วัดขนาด และดูดเลือดทุก 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำปลากะพงขาวจำนวน 30 ตัว จากแต่ละทรีตเมนต์ใส่ในถังไฟเบอร์ที่ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร เพื่อทำการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 theront/ปลา 1 ตัว จดบันทึกจำนวนปลาตายเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อหาอัตรารอดของปลากะพงขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *C. irritans* ระยะ theront โดยมีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 น้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดของปลากะพงขาวทั้ง 4 ทรีตเมนต์ (ครั้งที่ 2) ที่นำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันและเหนี่ยวนำด้วยเชื้อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront (เริ่มต้น N=30)

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

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

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

การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรั่มปลากะพงขาว

จากการตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ (Lysozyme) ในน้ำเลือดของปลากะพงขาวที่สุ่มมาทำการเจาะเลือดที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 เมื่อให้อาหารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้วและสัปดาห์ที่ 4.5, 5 และ 6 ที่อยู่ระหว่างการเผชิญเชื้อ *C. irritans* ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 – 4.4 และภาพที่ 4.1 – 4.5

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 6.5 และ 7

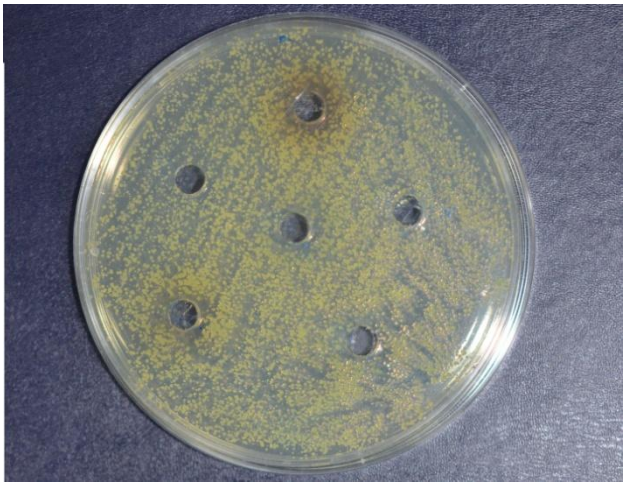
สัปดาห์ที่	ขนาดของ clear zone (ซม.) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาว (ชุดที่ 2)			
	ทรีตเมนต์ 1 (ชุดควบคุม)	**ทรีตเมนต์ 2 *(Cryptocaryon* +Calcium alginate)**	**ทรีตเมนต์ 3 (Yeast+Calcium alginate)**	**ทรีตเมนต์ 4 (Calcium alginate)**
0	+	+	+	+
2	+	+	0.43	0.30
4	+	0.56	0.70	+
4.5	-	+	+	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-

หมายเหตุ **+** พบ clear zone
- ไม่พบ

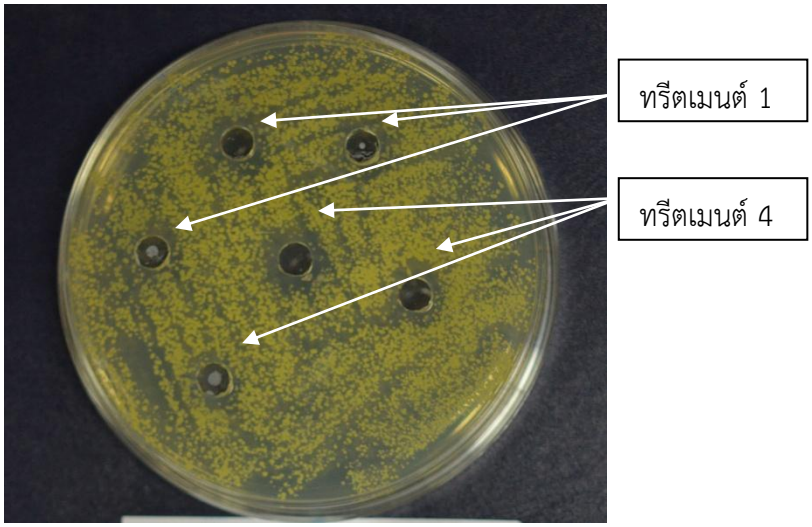
ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารสูตรต่างกัน 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และหลังจากเผชิญเชื้อสัปดาห์ที่ 4.5, 5 และ 6

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

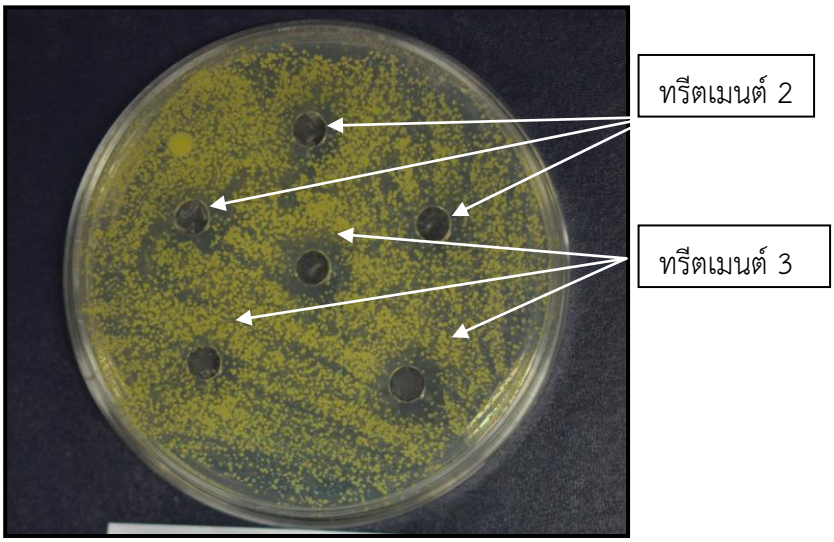
หมายเหตุ **+** พบ clear zone
- ไม่พบ



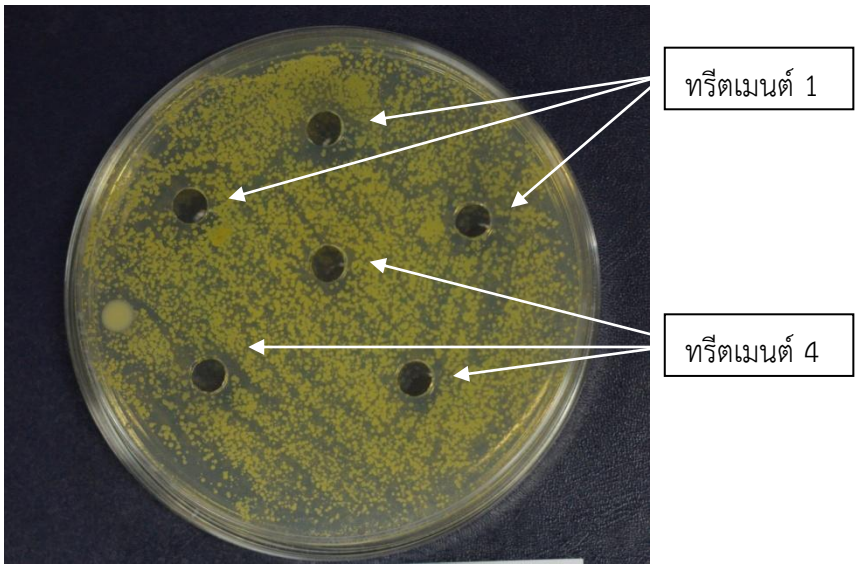
ภาพที่ 4.1 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 ก่อนการทดลอง



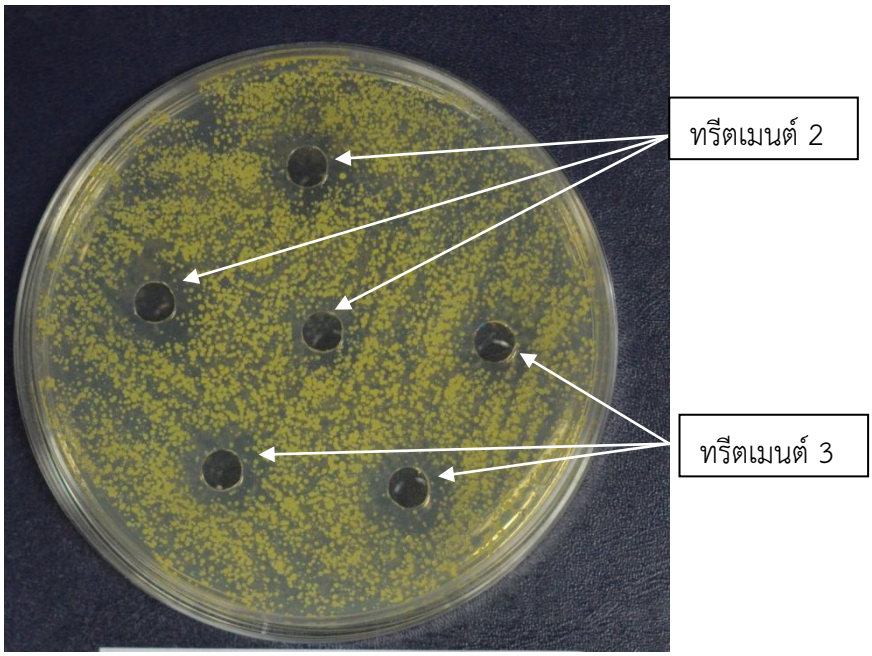
ภาพที่ 4.2 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทรีตเมนต์ที่ 1 (ชุดควบคุม) และ 4 ผ่านไป 2 สัปดาห์



ภาพที่ 4.3 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1หลังกินอาหารทดลองทรีตเมนต์ที่ 2 และ 3 ผ่านไป 2 สัปดาห์



ภาพที่ 4.4 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองทรีตเมนต์ที่ 1 และ 4 ผ่านไป 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.5 ผลของกิจกรรมไลโซไซม์ในน้ำเลือดปลากะพงขาวชุดที่ 1 หลังกินอาหารทดลองทรีตเมนต์ที่ 2 และ 3 ผ่านไป 4 สัปดาห์

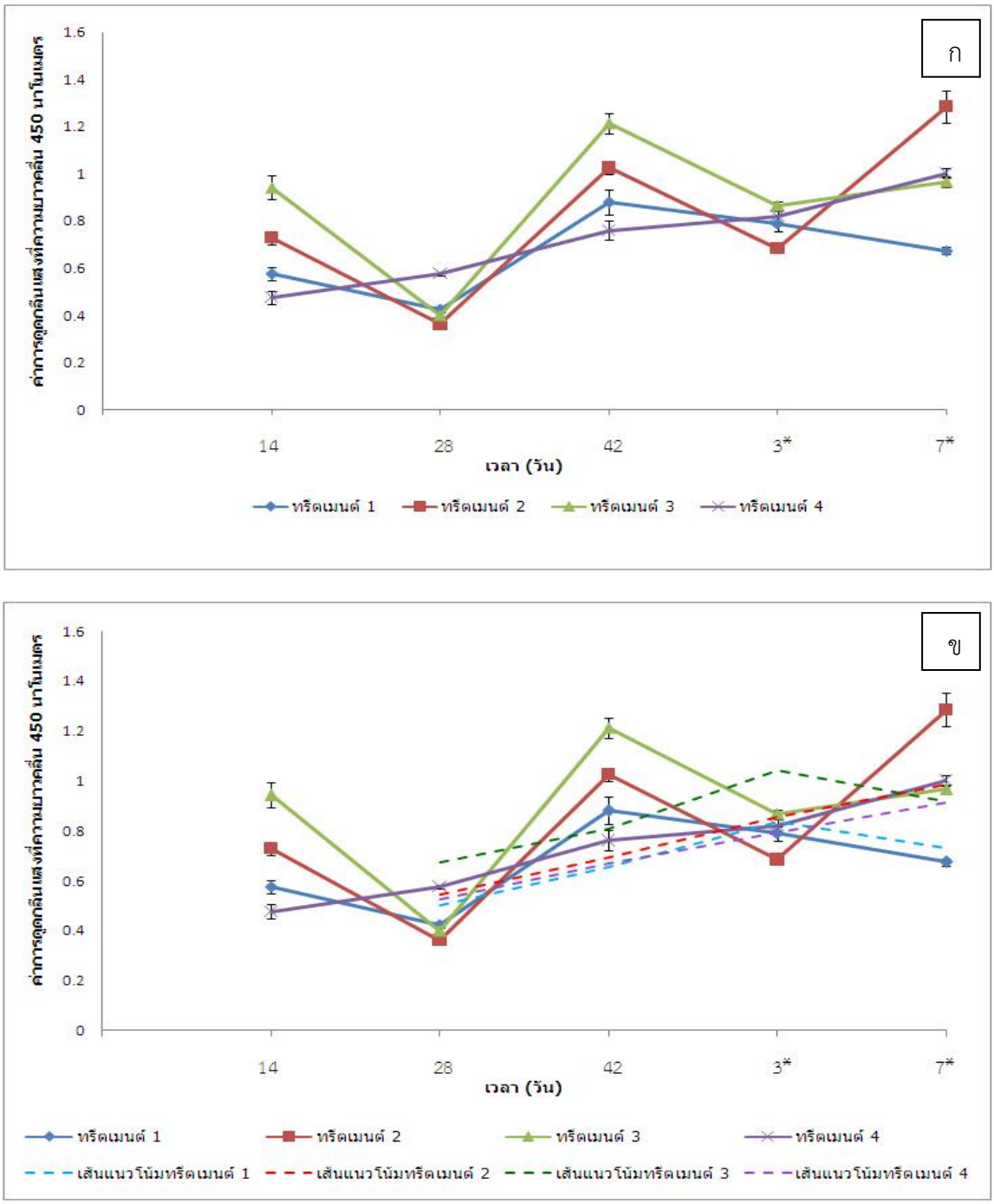
ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritan* ระยะ theront และยีสต์ โดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวครั้งที่ 1 ซึ่งมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวโดยให้อาหารทดลอง 4 สูตร โดยสูตรที่ 2 มีปรสิต *C. irritan* ระยะ theront สูตรที่ 3 มียีสต์เป็นองค์ประกอบ สำหรับสูตรที่ 1 และ 4 เป็นชุดควบคุม ให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิต เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อได้ 3 และ 7 วัน เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวโดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5 เมื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่ให้อาหาร และระยะเวลาที่ให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 2 และ 3 ที่มีปรสิต Cryptocarryon และยีสต์ เป็นองค์ประกอบตามลำดับ มีระดับที่สูงกว่าชุดควบคุมที่เวลา 14 วัน และลดลงในวันที่ 28 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 42 เมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตมีชีวิตเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารที่มีปรสิตสูงกว่าอาหารที่มียีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 เมื่อพิจารณาจากเส้นแนวโน้มพบว่าทรีตเมนต์ที่ 3 ที่ปลาได้รับอาหารที่มียีสต์มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าอาหารที่มีปรสิตและสูงกว่าชุดควบคุมดังแสดงในภาพที่ 4.6-ข

การที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทรีตเมนต์ที่ 2 ซึ่งปลาได้รับอาหารที่มีปรสิตเป็นองค์ประกอบที่เวลา 7 วัน ซึ่งเป็นรอบวงชีวิตของปรสิตที่ปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน เมื่อพิจารณาเส้นแนวโน้มพบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกทรีตเมนต์ที่เวลา 42 วัน หรือ 6 สัปดาห์ และเมื่อปลาได้เผชิญกับเชื้อปรสิตก็มีแนวโน้มที่ระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นอีกครั้ง

ตารางที่ 4.5 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4, 6 และระหว่างการเผชิญเชื้อที่เวลา 3 และ 6 วัน โดยเทคนิค ELISA

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



ภาพที่ 4.6 ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ทรีตเมนต์ 2)และยีสต์ (ทรีตเมนต์ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท

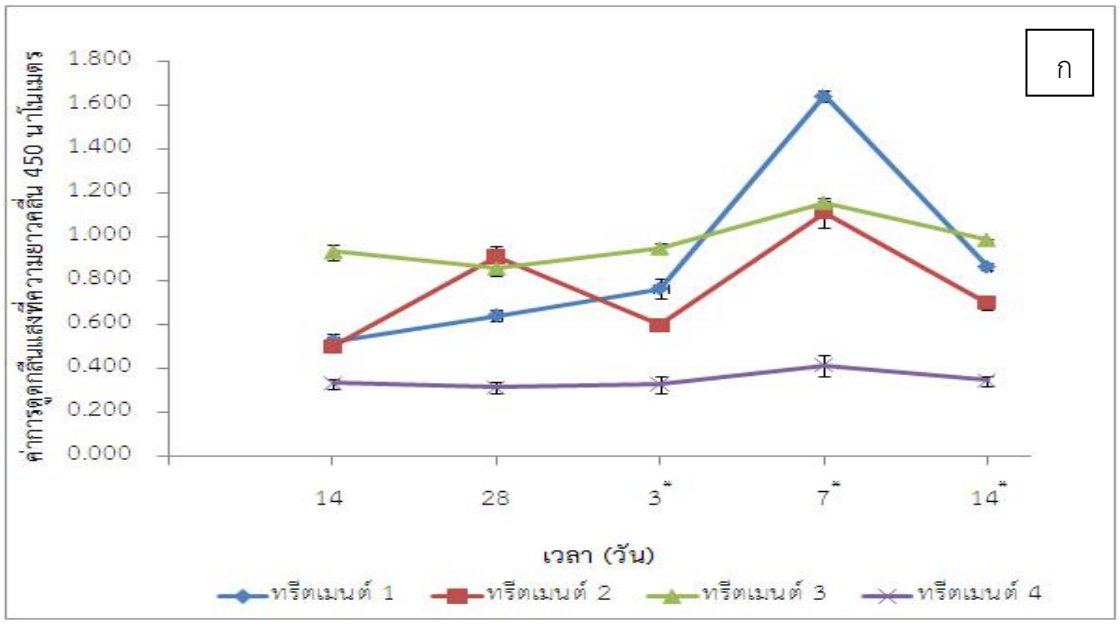
ข) เส้นแนวโน้มของระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพง

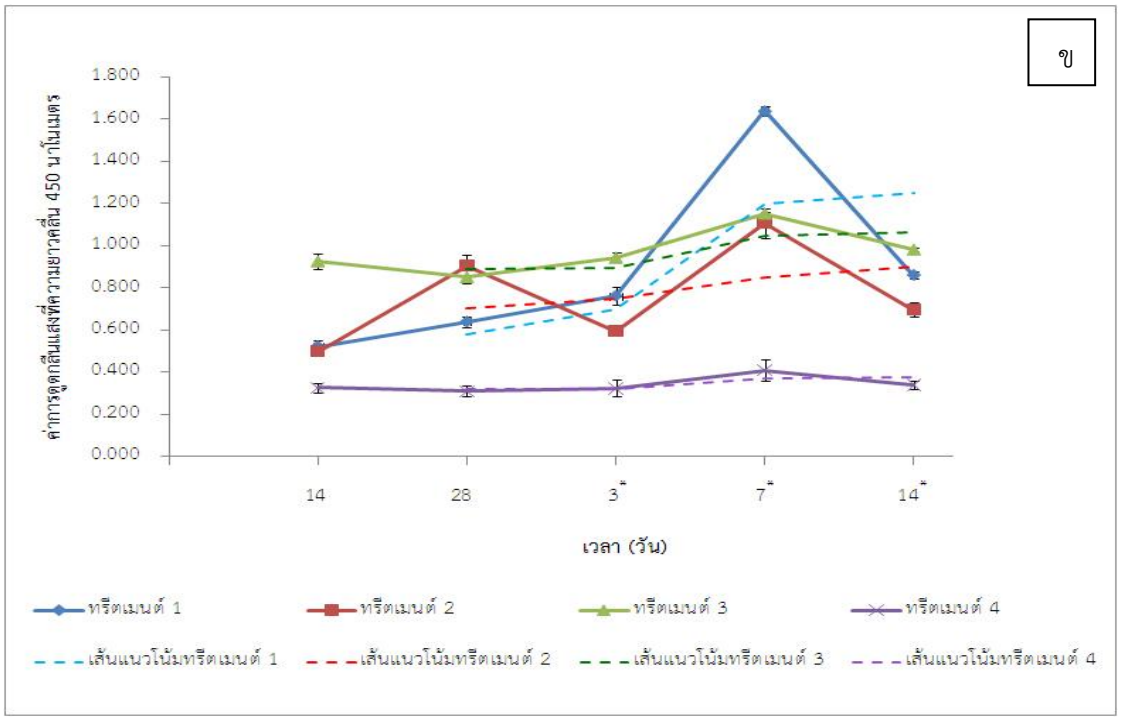
จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวครั้งที่ 2 ได้ทดลองให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารสูตร 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตระยะ theront ที่มีชีวิตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากเผชิญเชื้อได้ 3 7 และ 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวโดยเทคนิค ELISA เมื่อเจือจางซีรั่ม 1000 เท่า ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 และการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีเมื่อใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนแสดงในภาพที่ 4.7 ในการทดลองครั้งที่ 2 นี้พบว่าเมื่อปลาได้รับอาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 14 วัน ระดับของแอนติบอดีสูงกว่าในชุดควบคุมและอาหารที่มีแคลเซียมอัลจิเนต รวมทั้งเมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 3 และ 14 วัน

การที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทรีตเมนต์ที่ 1 2 และ 3 ส่วนทรีตเมนต์ที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แต่เมื่อปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกทรีตเมนต์ดังแสดงในภาพที่ 4.7-ข

ตารางที่ 4.6 ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตรวจวัดสัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และระหว่างการเผชิญที่เวลา 3 7 และ 14 วัน โดยเทคนิค ELISA

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





ภาพที่ 4.7 ก) ค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต (ทรีตเมนต์ 2)และยีสต์ (ทรีตเมนต์ 3) ที่เวลา 14 28 และ 42 วัน และระดับแอนติบอดีเมื่อปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตที่ 3 7 และ 14 วัน (3* 7*และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ) โดยเทคนิค ELISA ใช้ปรสิตระยะ theront เป็นแอนติเจนในการเคลือบเพลท

ข) เส้นแนวโน้มของระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพง

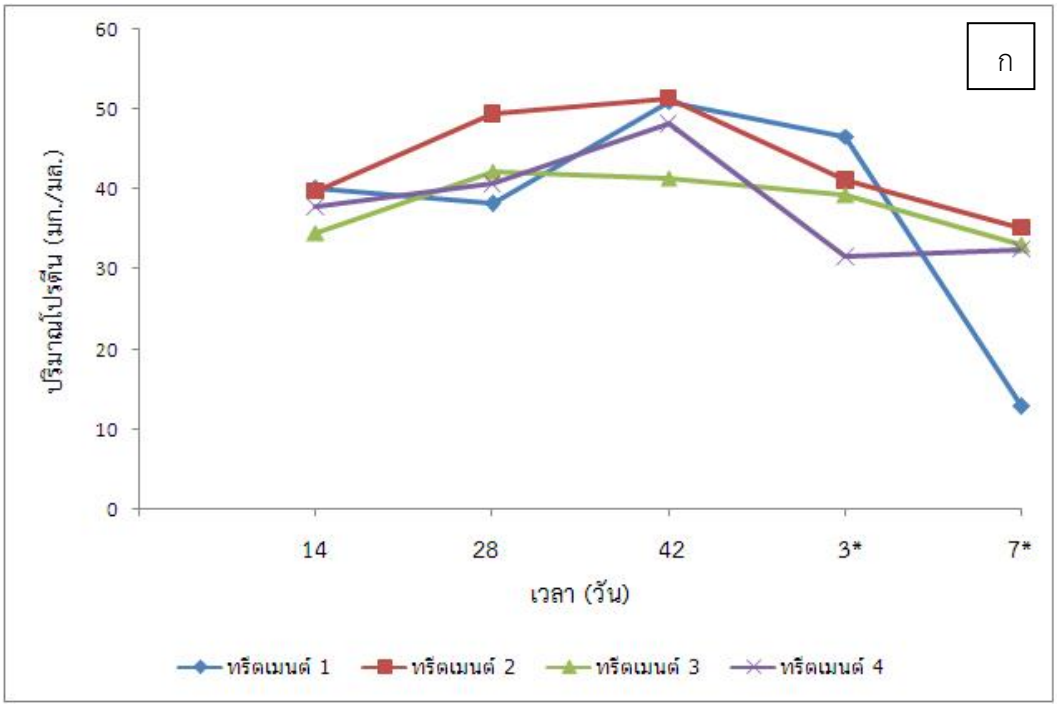
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford

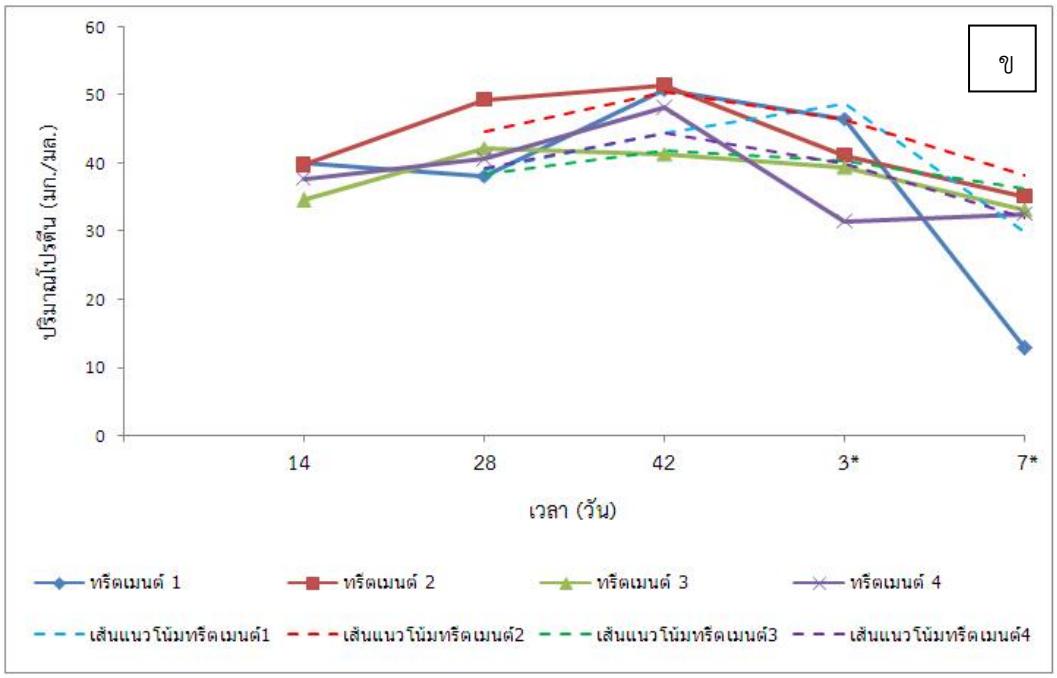
จากการตรวจหาปริมาณโปรตีนในซีรั่มของปลากะพงขาวชุดที่ 1 และชุดที่ 2 โดยชุดที่ 1 ทำการเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้กินอาหารเดียวกับชุดควบคุมอีก 4 สัปดาห์ ก่อนนำขึ้นมาเผชิญเชื้อ *C. irritans* ในถังทดลองขนาดปริมาตร 300 ลิตร ทำการบันทึกอัตรารอดของปลากะพงขาวทุกวัน ในระหว่างการเลี้ยงปลากะพงขาวนี้ ได้ทำการสุ่มมาทำการเจาะเลือดที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 และ 6 และระหว่างการเผชิญเชื้อ *C. irritans* ที่สัปดาห์ที่ 6.5 และ 7 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการให้อาหารโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง และมีแนวโน้มที่ลดลงหลังจากที่ปลาได้เผชิญเชื้อปรสิตดังแสดงในภาพที่ 4.8-ข โดยปริมาณโปรตีนได้ลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงมากที่สุดต่ำกว่าในวันที่ 14ในซีรั่มปลาที่ได้รับอาหารสูตร1 ซึ่งเป็นชุดควบคุม สำหรับชุดทดสอบทรีตเมนต์2 และ 3 โปรตีนมีปริมาณลดลงมาใกล้เคียงกับที่ 14 วัน

ตารางที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และ 6และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 6.5 และ 7

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

หมายเหตุ 3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ



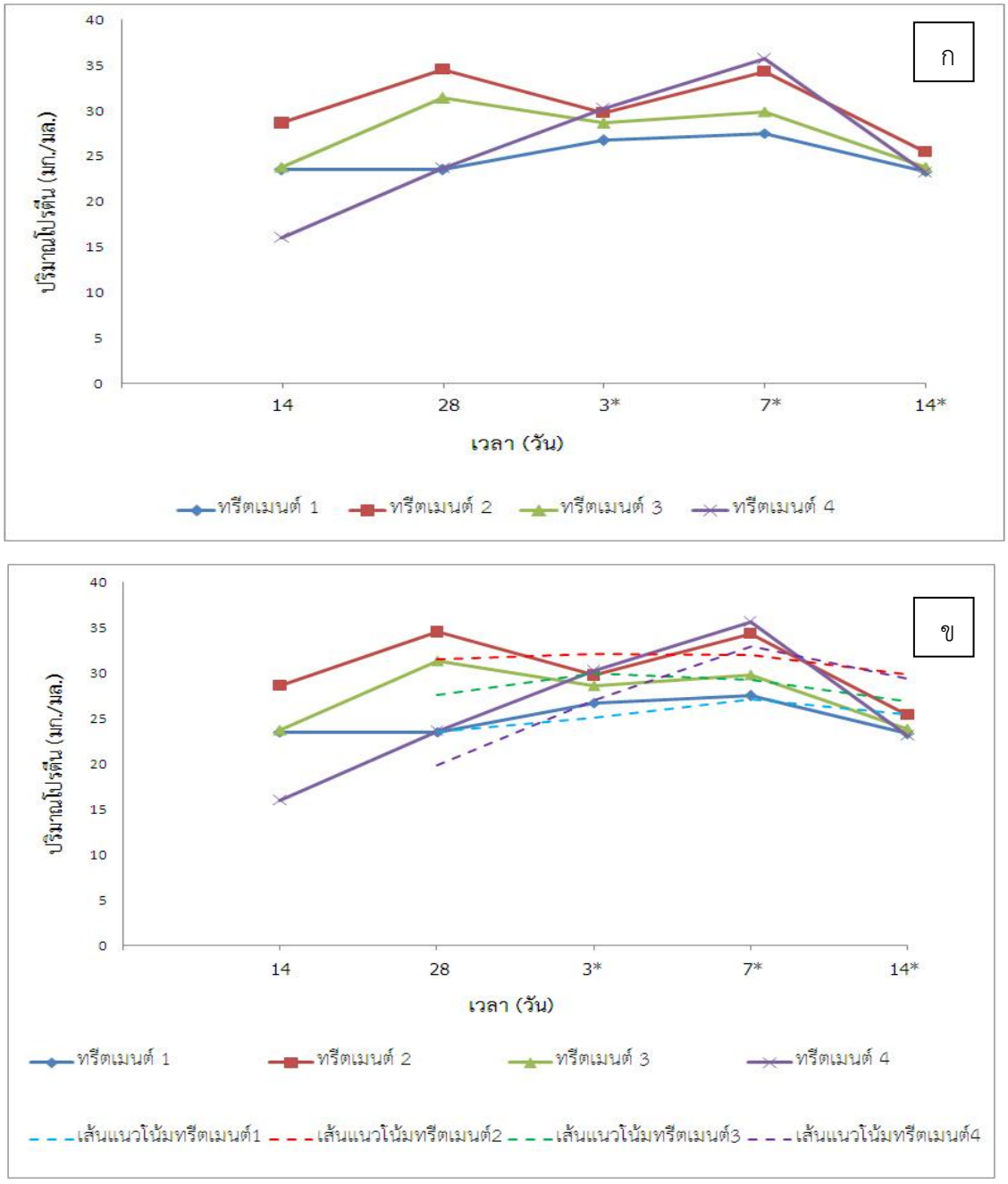


ภาพที่ 4.8 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 1 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน (3* และ 7* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)

สำหรับการเลี้ยงปลากะพงชุดที่ 2 พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตร 2 3 และ 4 และเมื่อให้ปลาให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตที่เวลา 3 7 และ 14 พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตร 2 ที่มีปรสิตปริมาณโปรตีนในซีรั่มยังคงสูงกว่าในชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตร ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4, และระหว่างการเผชิญเชื้อที่สัปดาห์ที่ 4.5, 5, และ 6

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

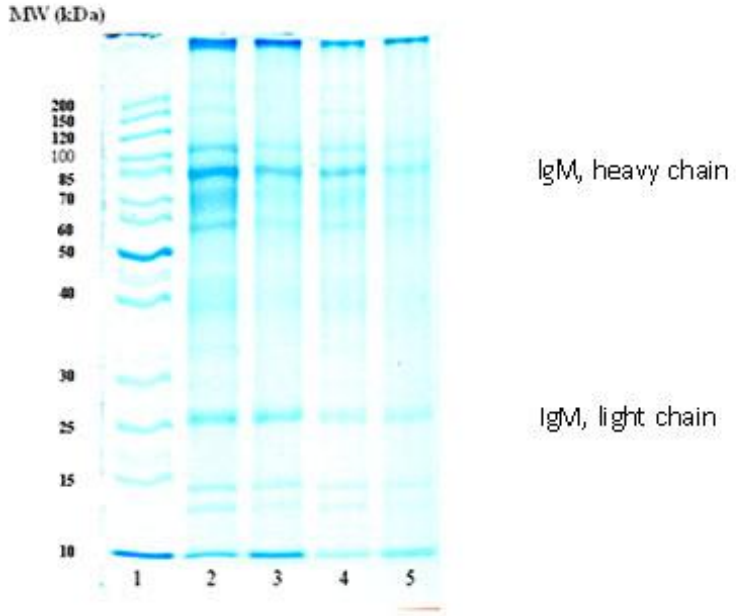


ภาพที่ 4.9 ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวชุดที่ 2 ที่ให้อาหารทั้ง 4 สูตรเป็นเวลา 14 วัน และให้ปลาเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 7 และ 14 วัน (3* 7* และ 14* หมายถึงจำนวนวันที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อ)

การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดปรสิตระยะ theront เชื้อตายโดยเทคนิค SDS-PAGE

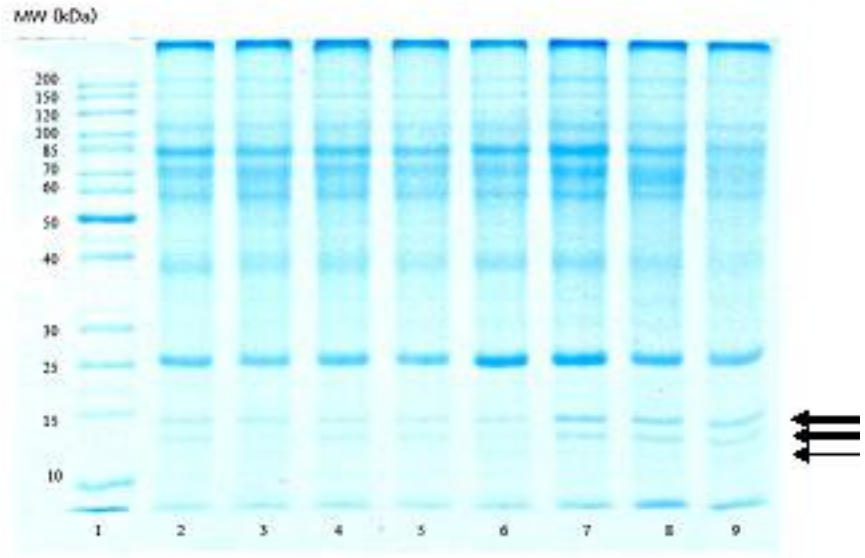
แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่เก็บตัวอย่างเลือดปลากะพงหลังจากปลาได้รับการฉีดเชื้อปรสิตระยะ theronts โดยฉีดกระตุ้นด้วยปรสิตระยะ theront เชื้อตาย 15,000 ตัว ใน PBS ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.4 ที่กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องของปลากะพงขาวน้ำหนัก 15 กรัม (ปรสิตระยะ theront เชื้อตาย 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว) แล้วเก็บเลือดวันที่ 9 ส่วนตัวควบคุมฉีดด้วย PBS ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.4 ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อปลากะพงขาวหนึ่งตัว (ปลาน้ำหนัก 15 กรัม) ได้แถบโปรตีนดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบแถบของหน่วยย่อยของอิมูโนกลอบูลิน 2 แถบหลักคือ heavy chain ของ IgM และ light chain ของ IgM ที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณคือ 85 และ 25 kDa ตามลำดับ การเปรียบเทียบความหนาแน่นของ heavy chain ของ IgM เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์เท่ากัน พบว่ามีความหนาแน่นของโปรตีนไม่เท่ากันในปลาแต่ละตัว

จากการฉีดปรสิตระยะ theront เชื้อตาย 15,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว โดยฉีดกระตุ้น 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน เมื่อครบ 9 และ 22 วัน เก็บเลือดปลานำซีรั่มปลามาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของหน่วยย่อยของโปรตีนได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าในซีรั่มปลาที่เวลา 22 วัน พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12 13 และ 14 kDa มีความหนาแน่นของปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนในปลาทุกตัว แสดงว่าแถบของโปรตีนดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เพราะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากปลาได้รับการกระตุ้นจากเชื้อปรสิตเป็นครั้งที่ 2



ภาพที่ 4.10 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide,stacking gel 4 % acrylamide) ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA)

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



ภาพที่ 4.11 แถบโปรตีนจากซีรั่มปลากะพงที่ฉีดด้วยเชื้อปรสิตระยะ Theront ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE (Separating gel 12.5% acrylamide,stacking gel 4 % acrylamide) ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง 4 ไมโครกรัมต่อแถว ย้อมเจลด้วย colloidal Coomassie brilliant G-250 (Fermentas, USA) โปรตีนที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีน้ำหนักโมเลกุล 10-200 kDa (Fermentas, USA) แถวที่ 2-6 คือซีรั่มจากปลากะพงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต 1 ครั้ง และแถวที่ 7-9 คือซีรั่มจากปลากะพงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรสิต 2 ครั้ง

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

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร (proximate analysis) ในอาหารที่เตรียมได้

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบคุณค่าทางอาหารที่ทำการทดลองในครั้งนี้ทั้ง 4 สูตร พบว่ามีความชื้นร้อยละ 6–7 เถ้าร้อยละ 13-15 โปรตีนร้อยละ 49-51 ไขมันร้อยละ 12-13 คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ ร้อยละ 15-17 ทั้งนี้จากการรายงานของ Catacutan และ Colosso (1995) ที่ทำการทดลองอาหารสำเร็จรูปกับลูกปลากะพงขาวขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 1.34 + 0.01 กรัม พบว่าอาหารที่มีระดับของโปรตีน 50% และระดับไขมัน 15% ปลากะพงขาวจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดและให้น้ำหนักที่มากสุด จากทดลองของ William และคณะ (2003) ทำการทดลองให้อาหารสำเร็จรูปกับปลากะพงขาวที่เลี้ยงในน้ำจืด โดยทำการทดสอบอาหารที่มีระดับของโปรตีน 38-%, 42.5%, 47.3% and 52% และไขมัน 7.0%, 12.8% and 18.3% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่มีระดับของโปรตีนและไขมันสูงจะให้อัตราการรอดและการเจริญเติบโตที่ดีกว่าระดับต่ำ

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

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

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

การทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront

จากการทดสอบการต้านเชื้อและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาวต่อปรสิต *C. irritans* ระยะ theront จำนวน 15,000 theronts/ปลา 1 ตัว หลังจากให้กินอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 4 สูตร ด้วยเทคนิคการตรึง โดยครั้งแรกให้กินอาหารทดลอง 2 สัปดาห์ และกินอาหารชุดควบคุมต่ออีก 4 สัปดาห์ พบอัตราการรอด หลังการเผชิญเชื้อ *C. irritans* ของทรีตเมนต์ 1ชุดควบคุม ทรีตเมนต์ 2 ผสม *C. irritans* ทรีตเมนต์ 3 ผสมยีตส์ *Pichia* sp. และทรีตเมนต์ 4 ผสม Sodium alginate ที่ 0%, 90%, 90% และ 0% ตามลำดับ (N = 10) ส่วนในการทดลองครั้งที่ 2 ทำการเลี้ยงด้วยอาหาร

ทดลอง 2 สัปดาห์ และเลี้ยงด้วยอาหารควบคุม 2 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดของปลากะพงทรีตเมนต์ที่ 1 ถึง 4 เป็น 83%, 83%, 93% และ 90% ตามลำดับ (N = 30) จะเห็นว่าปลากะพงในกลุ่มที่ให้อาหารทรีตเมนต์ที่ 3 ที่ผสม *Pichia* sp. ให้อัตราการรอดสูงสุดในครั้งที่ 2 และเท่ากับทรีตเมนต์ที่ 2 ซึ่งผสมด้วย *C. irritans* ในการทดลองครั้งที่ 1 ซึ่งในทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบยั่งยืนในปัจจุบันมีการนำยีสต์แบคทีเรียและสารสกัดจากพืชที่มีประโยชน์บางชนิดมาใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเพื่อให้มีความต้านทานโรคชนิดต่างๆ (Gatesoupe, 1999; Jeney et al., 2009; Lauridsen และ Buchmann, 2010; Navarrete และ Tovar-Ramírez, 2014; Wang, Li และ Lin, 2008) โดยเฉพาะยีสต์ในสกุล Saccharomyces ที่มีการใช้เป็นประโยชน์เป็นโปรไบโอติกในมนุษย์และสัตว์ทั่วโลก (Jakobsen และ Narvhus 1996; Lourens และ Viljoen 2001; Buchl et al. 2010; Moslehi-Jenabian, Pedersenและ Jespersen, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ แยกเชื้อ *Pichia* sp. มาจากน้ำทะเลบางแสน โดยเชื้อมีคุณสมบัติในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ *Pichia sp.* ที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่ากรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) ตามลำดับ โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมด (unsaturated fatty acid : USFA) ร้อยละ 30.29 ของกรดไขมันทั้งหมด เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated Fatty Acid: MUFA) ร้อยละ 20.26 ของกรดไขมันทั้งหมด มีกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 17.83 ของกรดไขมันทั้งหมด กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) ร้อยละ 9.93 ของกรดไขมันทั้งหมดและมีกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6c) เป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 3.14 ของกรดไขมันทั้งหมด (สุพรรณี ลิโทชวลิต และคณะ, 2557) เมื่อนำมาประกอบในสูตรอาหารพบว่ามีปริมาณโปรตีนมากกว่าร้อยละ 50 และไขมันมากกว่าร้อยละ 11 ซึ่งเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงปลากะพงขาว (เวียง, 2543)

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

ณัฐพงษ์ จูพัฒนกุล (2553) ได้นำรีคอมบิแนนท PmRab7 ในระบบยีสต *Pichia pastoris* ไปใชในการปองกันโรคดวงขาวในกุง ในการทดลองในระดับฟารมพบวา เมื่อใชอาหารที่ผสมโปรตีน PmRab7 ใน ปริมาณ 1 มิลลิกรัมและ 2 มิลลิกรัม PmRab7/ กิโลกรัมของอาหารกุงพบวาสามารถชวยชะลอการตายของกุ้งจากเชื้อไวรัสดวงขาวไดโดยในวันที่สี่อัตราการตายของกุงในกลุ่มควบคุมอยู่ที่ 65-80% สวนในกล่มที่ใหอาหารผสม PmRab7 มีอัตราการตาย ลดลงอยูที่ประมาณ 20-40% แต หลังจากหยุดให้อาหารผสม PmRab7 และใหอาหารปกติตอเปนเวลา 3 วันพบวาไมพบความ แตกตางอยางมีนัยสำคัญ (P>0.05)

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

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

ภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 ปลาข้าวเม่าน้ำลึกที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันและนำมาเหนี่ยวนำด้วยปรสิตระยะธีรอนต์จำนวน 70,000 ตัวต่อปลาหนึ่งตัว (น้ำหนัก 60 กรัม) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตรารอดของปลาข้าวเม่าน้ำลึกที่ได้รับวัคซีนและกลุ่มควบคุมอยู่ที่ร้อยละ 100 (สุพรรณี ลีโทชวลิตและคณะ, 2553)

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

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารในระบบภูมิคุ้มกัน

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

ในการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยปรสิต *C. irritan* ระยะ theront และยีสต์ โดยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ผลการทดลองในปลากะพงขาวชุดที่ 1แสดงให้เห็นว่าระดับแอนติบอดีในซีรั่มปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 2 และ 3 ที่มีปรสิต Cryptocarryon และยีสต์ เป็นองค์ประกอบตามลำดับ มีระดับที่สูงกว่าชุดควบคุมที่เวลา 14 วัน และลดลงในวันที่ 28 แล้วเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 42 เมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตมีชีวิตเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีของปลาที่ได้รับอาหารที่มีปรสิตสูงกว่าอาหารที่มียีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.6 เมื่อพิจารณาจากเส้นแนวโน้มพบว่าทรีตเมนต์ที่ 3 ที่ปลา

ได้รับอาหารที่มียีสต์มีระดับแอนติบอดีสูงกว่าอาหารที่มีปรสิตและสูงกว่าชุดควบคุม การที่ปลาได้รับการเผชิญเชื้อเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทรีตเมนต์ที่ 2 ซึ่งปลาได้รับอาหารที่มีปรสิตเป็นองค์ประกอบที่เวลา 7 วัน ซึ่งเป็นรอบวงชีวิตของปรสิตที่ปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน เมื่อพิจารณาเส้นแนวโน้มพบว่าระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกทรีตเมนต์ที่เวลา 42 วัน หรือ 6 สัปดาห์ และเมื่อปลาได้เผชิญกับเชื้อปรสิตก็มีแนวโน้มที่ระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นอีกครั้ง ส่วนในชุดที่ 2 พบว่าเมื่อปลาได้รับอาหารที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 14 วัน ระดับของแอนติบอดีสูงกว่าในชุดควบคุมและอาหารที่มีแคลเซียมอัลจิเนต รวมทั้งเมื่อปลาได้รับการเผชิญเชื้อปรสิตเป็นเวลา 3 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทรีตเมนต์ที่ 1 2 และ 3 ส่วนทรีตเมนต์ที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง แต่เมื่อปรากฏจุดขาวขึ้นที่ตัวปลาที่เวลา 7 วัน ระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในทุกทรีตเมนต์

ซึ่งจากการศึกษาของ Luo at.al (2007) มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการติดเชื้อปรสิต *C. irritans* ของปลากะรัง ผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเผชิญเชื้อบนผิวหรือจากการฉีดกระตุ้น พบค่าความจำเพาะไตเตอร์แอนติเจนของซีรัมปลาที่ถูกกระตุ้นและเมือกที่ได้จากผิวโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA และการวิเคราะห์การตรึง พบว่าความจำเพาะของแอนติบอดีสามารถตรวจสอบได้จากภูมิคุ้มกันปลาที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 และพีคมีค่าไตเตอร์สูงระหว่างสัปดาห์ที่ 4-6 ความจำเพาะของแอนติบอดียังพบในซีรัมและเมือกของปลาที่ถูกกระตุ้นในสัปดาห์ที่ 8 และเตรียมการกระตุ้นเพื่อต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* มีการพบการชักนำด้วย humoral and skin mucosal immunity ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* ในปลา

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

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

เมื่อทำการการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรั่มโดยวิธีของ Bradford ในปลากะพงขาวชุดที่ 1 พบว่า ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการให้อาหารโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง และมีแนวโน้มที่ลดลงหลังจากที่ปลาได้เผชิญเชื้อปรสิต โดยปริมาณโปรตีนได้ลดลงอย่างรวดเร็วและลดลงมากที่สุดต่ำกว่าในวันที่ 14ในซีรั่มปลาที่ได้รับอาหารสูตร1 ซึ่งเป็นชุดควบคุม สำหรับชุดทดสอบทรีตเมนต์2 และ 3 โปรตีนมีปริมาณลดลงมาใกล้เคียงกับที่ 14 วัน ส่วนในปลาทดลองชุดที่ 2 พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้น

โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตร 2 3 และ 4 และเมื่อให้ปลาให้ปลาเผชิญเชื้อปรสิตที่เวลา 3, 7 และ 14 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนในซีรั่มมีแนวโน้มลดลง

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

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

เอกสารอ้างอิง

ณัฐพงษ จูพัฒนกุล, Timothy W. Flegel, บุญเสริม วิทยชำนาญกุล และกัลยาณ ศรีธัญญลักษณา. (2553). *การเตรียมและการนำโปรตีน PmRab7 ไปใช้เพื่อป้องกันโรคดวงขาวในระดับฟาร์มกุ้ง. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 21-28.

ประพฤติดี ปิยะวิริยะกุล. (2550). แนวคิดและการประยุกต์ทางวิทยาภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 13 โรงแรมโซฟิเทลเซ็นทารา. กรุงเทพฯ.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์. (2542). ปลากะพงขาวสัตว์น้ำเศรษฐกิจของตลาด. *กสิกร. 72*, 149-163.

วรวุฒิ เกิดปราง และ ชาคริยา ฉลาด. (2558). จุลินทรีย์ท้องถิ่นในพื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตวน้ำตามหลักเกษตรธรรมชาติ กรณีศึกษา : ฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง. *วารสารวิจัย, 8*(1). 17-25.

วิเชียร สาคเรศ, มะลิ บุณยรัตผลิน, นันทิยา อุ่นประเสริฐ และพรชัย ขำแป้ง. (2531). *ระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมในอาหารปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7/2531. สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดระยอง กองประมงน้ำกร่อย.* กรุงเทพฯ: กรมประมง.

วิเชียร สาคเรศ, มะลิ บุญยรัตผลิน และนันทิยา อุ่นประเสริฐ. (2532). *ระดับโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสม ในอาหารปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 8/2532. สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดระยอง กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง.* กรุงเทพฯ: กรมประมง.

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

สถาพร ดิเรกบุษราคม และ จูอะดี พงศ์มณีรัตน์. (2527). โรคจุดขาวในปลาน้ำกร่อย. เอกสาประกอบการอบรมและส่งเสริมเผยแพร่. สงขลา: สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุตม์, วีลยา แก่นจันทร์ และนันทิกา คงเจริญพร. (2554). *การศึกษาโรคจุดขาวน้ำเค็มที่เกิดจากโปรโตซัว Cryptocaryon sp. ในปลาทะเลในประเทศไทย.* รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน. 226 หน้า.

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

สุพรรณี ลิโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, จารุนันท์ ประทุมยศ, ศรันยู คำเมือง และรักฤดี สารธิมา. (2557). *การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย.* รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน. 61 หน้า.

Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity andparasite infections: from innate immunity to immunoprophylacticprospects.Vet. *Immuno. Immunop*, 126, 171-198.

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

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

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

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

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

Blaber, S. J. M., Milton, D. A. & Salini, J. P. (2008). Chapter 11 The Biology of Barramundi(Lates calcarifer) in the Fly River System. *Developments in Earth and Environmental Sciences, 9*, 411-426.

Boonyaratpalin, M. and Williams, K. (2002). *Asian Sea Bass, Lates calcarifer, in Webster, C. D. and Lim, C. E (eds), Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*, New York, CABI, 40–50.

Boonyaratpalin, M., & Williams, K. (2002). Asian Sea Bass, *Lates calcarifer*, in Webster, C. D. and Lim, C. E (eds), Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture, New York, CABI, 40–50.

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

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.

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

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

Burgess, P. J., & Matthews, R. A. (1995). *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora): acquired protective immunity in the thick-lipped mullet, Chelon labrosus. *Fish & Shellfish Immunology. 5,* 459–468.

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

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

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

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

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

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

Dan, X. M., Li A. X., Lin, X. T., and Zhu, X. Q. (2006). A standardized method to propagate Cryptocaryon irritans on a susceptible host pompano Trachinotus ovatus. *Aquaculture.* 258: 127–133.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Laemmli, U. K. (1970). Clevage of the head of Bacteriophage T4**.** *Nature. 227*, 680-685.

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

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

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

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

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

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

Mao, Z., He, C., Qiu, Y. and Chen, J. (2011X. Expression of Vibrio harveyi ompK in the yeast *Pichia pastoris*: The first step in developing an oral vaccine against vibriosis?. *Aquaculture, 318,* 268-272.

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

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

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

NRC. (1993). National Research Council – *Nutrient Requirements of Fish*, Washington, National Academy Press. 124 p.

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

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

RabanaJ, H. R., & Soesanto. V. (1982). Introduction to the taxonomy, biology and fishery of the giant seaperch or sea-bass Lates calcarifer. In: Report of Training Course on Seabass

Spawning, &Larval Rearing, Songkhla, Thailand June 1982. FAO SCS/GEN/82/39. 105 p,

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

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

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

Srivibool, R., Watanachote, J. & Teramoto, Y. (2011). Isolation, identification of marine yeasts and their amylase activity. The 4th International Conference FerVAAP 2011 on Fermentation Technology for value added agricultural products. August 29th-31st, 2011. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.

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

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

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

Trot, L., Balasch, J. C. and MacKenzie, S. (2004). Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science. 2*(4), 443–454.

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

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

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

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

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

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

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

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

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบเหลว ประกอบด้วย

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

เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ นำเข้าเครื่องความดันอัตโนมัติ121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium แบบแข็ง ประกอบด้วย

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

เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ นำเข้าเครื่องความดันอัตโนมัติ121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

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

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

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และปรับที่ pH7.4

4. อาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อย (สูตรกากชานอ้อยต่อ SM 25 1:10)

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

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

การคำนวณ การวิเคราะห์และการนับจำนวนเซลล์ยีสต์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid assay (Miller, 1959)

1.1 การเตรียมสารละลาย 0.1 % Dinitrosalicylic acid

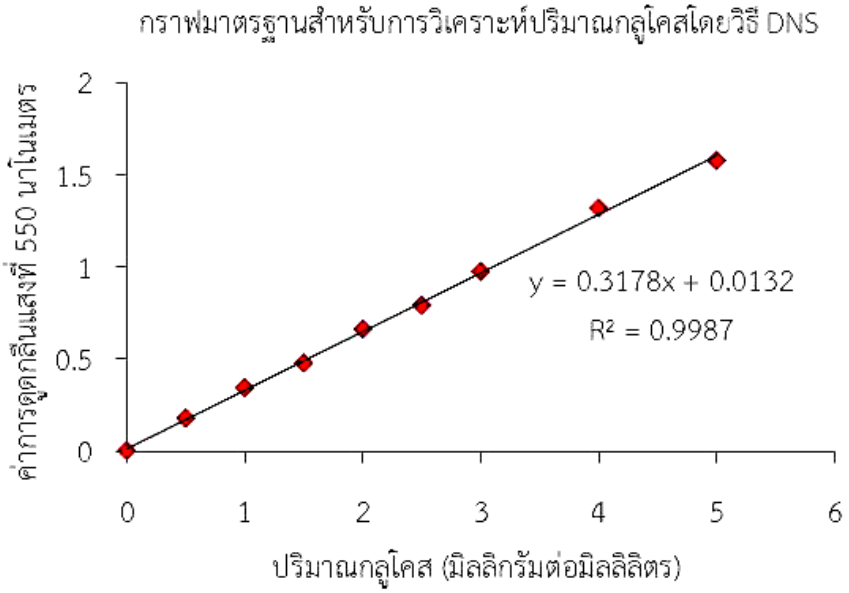
- การเตรียม 2M Sodium hydroxide: NaOH ชั่ง NaOH 20 กรัม ละลายน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร
- ชั่ง 3, 5 - dinitrosalicylic acid: $C_7H_4N_2O_7$ 0.25 กรัม ละลายใน 2M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด
- ชั่ง Sodium potassium tartate: $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ 75 กรัม ละลายใน 2M NaOH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

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

1.2 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

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

ผลของกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS



ภาพภาคผนวกที่ ข. 1 กราฟมาตรฐานกลูโคสและการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1.3 การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

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

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง

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

2. การคำนวณการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer

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

= 0.04 ตร.ม.

= 4×10^{-3} ลบ.ม.

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

ปริมาตร 10^{-3} ลบ.มม. = 1 มล.

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

$= 4 \times 10^{-6}$ มล.

ปริมาตร 1 ช่อง $= 4 \times 10^{-6}$ มล.

เช่น ถ้านับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด 5 ช่องได้ 80 เซลล์

1 ช่อง = 80/5 = 16 เซลล์

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

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

ดังนั้น มีเซลล์จุลินทรีย์เท่ากับ 4×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. การคำนวณหาปริมาณความชื้น (Moisture)

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

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

โดย A คือ น้ำหนัก Crucible เปล่า (ก่อนอบ)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างเปียก

C คือ น้ำหนักตัวอย่าง + น้ำหนัก Crucible เปล่า (หลังอบ)

D คือ ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง

E คือ ร้อยละของน้ำหนักน้ำในตัวอย่าง

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

4. การคำนวณหาปริมาณไขมันรวม (Crude fat)

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

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

5. การจำแนกชนิดกรดไขมันและการคำนวณร้อยละกรดไขมัน

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

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

หมายเหตุ : การคำนวณใช้ใน Microsoft Excel โดยกำหนดให้ CELL คือ Area ในกราฟโครมาโทแกรม

ที่มา : (Sokal and Rohlf, 1995)

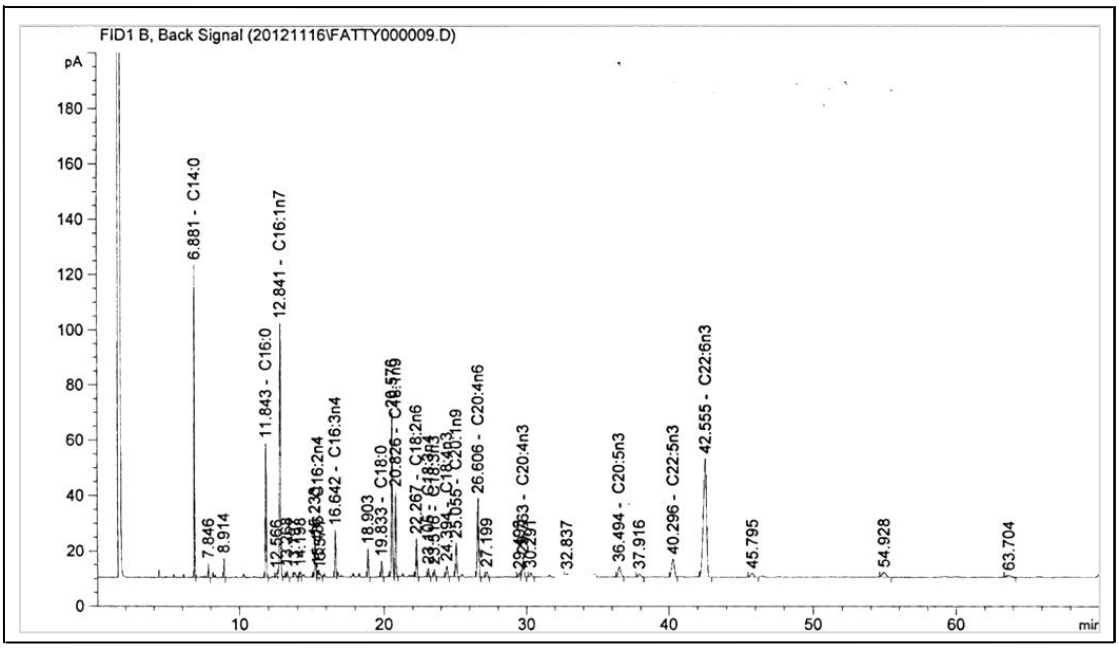
ตารางภาคผนวกที่ ข. 1 สารมาตรฐานกรดไขมัน (PUFA) NO. 3 Menhaden oil ที่แสดงผลจากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

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

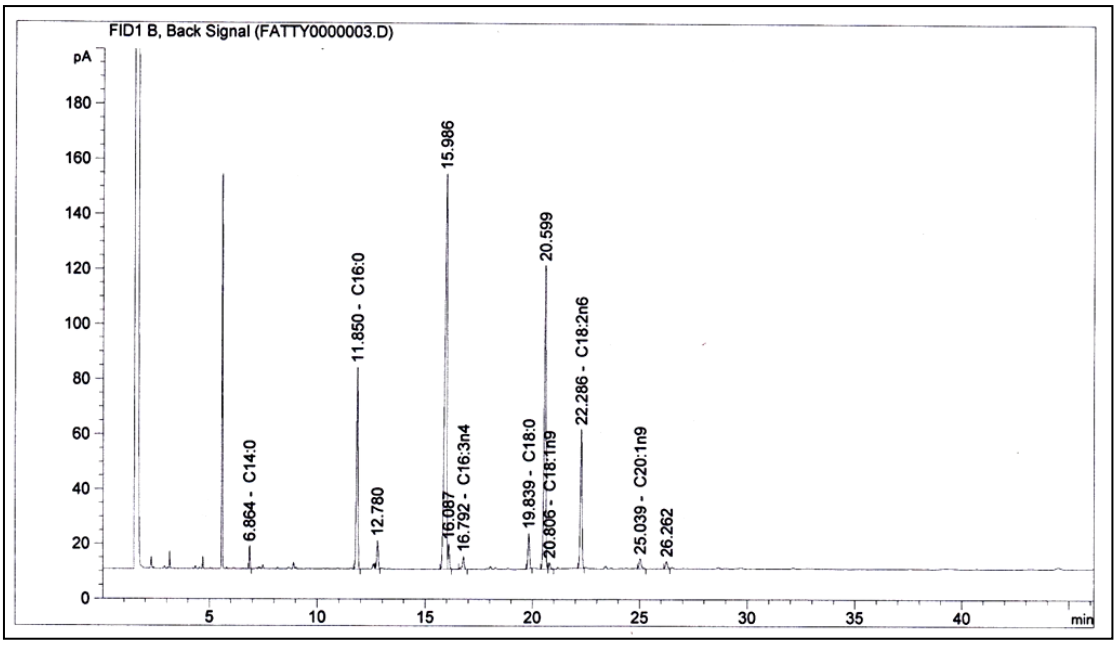
ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างภาพโครมาโทรแกรมกรดไขมัน



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



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