สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษาภูมิคุ้มกัน และการประยุกต์ใช้บีต้ากลูแคนในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link 1807

The Immune System and Application of β-1,3 glucan in *Babylonia areolata* Link 1807

ชลี ไพบูลย์กิจกุล มลฤดี สนธิ
เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล และ บัญชา นิลเกิด

16 มี.ค. 2554
284360
เริ่มบริการ
21 เม.ย. 2554

Chalee Paibulkichakul, Molruedee Sonthi,
Benjamas Paibulkichakul and Bancha Nilkerd

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

การศึกษาภูมิคุ้มกัน และการประยุกต์ใช้บีต้ากลูแคนในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link 1807

The Immune System and Application of β-1,3 glucan in *Babylonia areolata* Link 1807

โดย

ชลี ไพบูลย์กิจกุล

มลฤดี สนธิ

เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล

บัญชา นิลเกิด

คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเม็ดเลือดหอยหวานโดยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเม็ดเลือด 2 ชนิด คือ เซลล์ไฮยาลิโนไซต์ และแกรนูลโลไซต์ (1) เซลล์ไฮยาลิโนไซต์ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลในปริมาณที่น้อยมาก หรือไม่มีเลย (2) เซลล์แกรนูลโลไซต์ ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีทั้งแกรนูลขนาดเล็ก และแกรนูลขนาดใหญ่มากมาย เซลล์ชนิดนี้พบในปริมาณมากกว่าไฮยาลิโนไซต์ และน่าจะเป็นเซลล์หลัก ที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านการติดเชื้อโรคของหอยหวาน สำหรับการทดลอง การยอมรับเชื้อของหอยหวาน เมื่ออยู่ในสภาวะความเครียด อันเนื่องมาจากคุณภาพน้ำ พบว่าการยอมรับเชื้อของหอยหวานจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อปริมาณไนไตร์ทเพิ่มขึ้น และอุณหภูมิสูงขึ้นที่ 32 องศาเซลเซียส และจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ปัจจัยคุณภาพน้ำต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไป มีผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหอยหวาน นอกจากนี้ยังพบว่า เบต้า-กลูแคน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหอยหวานได้ดีที่สุด เมื่อแช่หอยหวาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงที่ภาวะปกติ รวมทั้ง เบต้า-กลูแคน มีผลส่งเสริม bactericidal activity ในน้ำเลือดของหอยหวาน ด้วยเช่นกัน

คำสำคัญ: เม็ดเลือด การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน คุณภาพน้ำ เบต้า-กลูแคน และ หอยหวาน

Abstract

Hemocytes of Babylon (*Babylonia areolata*) were studied under electron microscopy. Two types of hemocytes were described: hyalinocyte cells and granulocyte cells. (1) Hyalinocyte cells contained a large nucleus with a few small granules (SG) in cytoplasm. (2) Granulocyte cells whose cytoplasm showed the abundant of 2 types of granules; small granules (SG) and large granules (LG). Hyalinocyte cells were less abundant than granulocyte, hence the granulocyte cells were the main cell type in against pathogens. The susceptibility of Babylon against *V. alginolyticus* increased directly with nitrite concentration and high temperature (32°C). From our research, changes in ammonia, nitrite concentration, salinity and temperature have effected the immune response of Babylon. Our results also indicate the ability of beta-glucans to increase immune response parameters in Babylon after 24 h of immersion and suggest the effect of beta-glucans in bactericidal activity in Babylon hemolymph.

Key words: Hemocytes, Immune response, Water quality, Bata-glucan and Babylon (*Babylonia areolata*)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมทีมวิจัย คณาจารย์คณะเทคโนโลยีทางทะเลทุกท่านที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือทุก ๆ ด้าน ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณศศิพา ฉิมพลี และ คุณศรีภาพรรณ ตรีเจตน์ พนักงานวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีทางทะเล ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือสำหรับการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงอย่างดี

ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีทางทะเล ที่อนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมทั้งท่านอื่น ๆ ที่มิได้เอ่ยนามในที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยฉบับนี้ให้สำเร็จ และดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

หากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน ที่มีส่วนช่วยในการเพิ่มผลผลิตของหอยหวาน คณะผู้จัดทำจักยินดีเป็นอย่างยิ่ง และผู้จัดทำขอน้อมรับคำแนะนำต่าง ๆ และพร้อมที่จะแลกเปลี่ยนความรู้ เพื่อพัฒนางานวิจัย ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มมากขึ้น และสามารถใช้ประโยชน์ได้จริง

คณะผู้จัดทำ

ตุลาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
กลไกการป้องกันตัวเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	4
กลไกการป้องกันตัวเองของหอย	5
ผลของคุณภาพน้ำต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ	9
การประยุกต์ใช้เบต้า-กลูแคนในสัตว์น้ำ	10
3 วิธีดำเนินการทดลอง	13
การทดลองที่ 1: การศึกษาลักษณะเม็ดเลือดของหอยหวาน	13
การทดลองที่ 2: ผลของคุณภาพน้ำบางประการต่อการการเปลี่ยนแปลง ระดับภูมิคุ้มกัน และ การยอมรับเชื้อวิบริโอ ของหอยหวาน	14
การทดลองที่ 3: การประยุกต์ใช้บีต้า-กลูแคน ในหอยหวาน	19
4 ผลการทดลอง	21
ผลการทดลองที่ 1: การศึกษาลักษณะเม็ดเลือดของหอยหวาน	21
ผลการทดลองที่ 2: ผลของคุณภาพน้ำบางประการต่อการการเปลี่ยนแปลง ระดับภูมิคุ้มกัน และ การยอมรับเชื้อวิบริโอ ของหอยหวาน	23
ผลการทดลองที่ 3: การประยุกต์ใช้บีต้า-กลูแคน ในหอยหวาน	39

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	43
อภิปรายผลการทดลอง	43
สรุปผลการทดลอง	49
ข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	50

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 4-1 อัตราการเกิดโรคงวงบวมในหอยหวาน ภายหลังการได้รับเชื้อแบคทีเรีย และอยู่ในระดับไนไตร์ทที่แตกต่างกัน.. 27

ตารางที่ 4-2 อัตราการเกิดโรคงวงบวมในหอยหวาน ภายหลังการได้รับเชื้อแบคทีเรีย และอยู่ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน.. 35

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 2-1 เปรียบเทียบระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) และภูมิคุ้มกันที่สร้างเองได้ (adaptive immune system).. 4

ภาพที่ 2-2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ และแบบสารน้ำของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง.. 5

ภาพที่ 2-3 ระบบการป้องกันตัวเอง (immune defense system) ของหอย........................ 6

ภาพที่ 2-4 การทำลายจุลชีพ โดย respiratory burst activity ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) ของเม็ดเลือด.. 8

ภาพที่ 2-5 กลไกการเกิดกระบวนการโปรฟีนอลลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade)... 9

ภาพที่ 2-6 ไดอะแกรมแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง เชื้อโรค และสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลต่อระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน.. 10

ภาพที่ 4-1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดหอยหวาน โดยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (TEM): A และ B คือ ไฮยาลิโนไซต์ หรือ ไฮยาลิน เซลล์ (Hyalinocytes or Hyaline cells) : C และ D คือ แกรนูโลไซต์เซลล์ (Granulocyte cells)........ 22

ภาพที่ 4-2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง.. 24

ภาพที่ 4-3 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง.. 25

ภาพที่ 4-4 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง... 26

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 4-5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง... 28

ภาพที่ 4-6 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 29

ภาพที่ 4-7 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 30

ภาพที่ 4-8 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 31

ภาพที่ 4-9 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 33

ภาพที่ 4-10 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 34

ภาพที่ 4-11 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในอุณหภูมิระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 36

ภาพที่ 4-12 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในอุณหภูมิระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 37

ภาพที่ 4-13 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในอุณหภูมิระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง........ 38

ภาพที่ 4-14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการแช่ด้วย เบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน........ 39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 4-15 ปริมาณเม็ดโปรตีนรวม (Total protein) ในน้ำเลือดของหอยหวาน ภายหลังการแช่ด้วยเบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน... 40

ภาพที่ 4-16 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ของหอยหวาน ภายหลังการแช่ด้วย เบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน.......... 41

ภาพที่ 4-17 กิจกรรมการต่อต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ในน้ำเลือด (hemolymph) ของหอยหวานภายหลังการแช่ด้วยเบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน... 42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

หอยหวานหรือที่บางท้องถิ่น เรียกว่า หอยตุ๊กแก หอยเทพรส จัดเป็นหอยทะเลอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำไปใช้เป็นอาหารและมีรสชาติดี หอยหวานที่พบในประเทศไทยมีอยู่ 2 ชนิด คือ หอยหวานที่มีชื่อสามัญว่า spotted babylon มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Babylonia areolata* Link, 1807 มีแหล่งแพร่กระจายตัวอยู่ทางฝั่งอ่าวไทย เช่น ตราด ระยอง จันทบุรี ชลบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช เป็นต้น และอีกชนิดหนึ่งที่พบคือ spiral babylon มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Babylonia spirata* Linnaeus, 1758 มีแหล่งแพร่กระจายตัวอยู่อยู่ทางฝั่งทะเลอันดามันที่พบมากคือ จ.ระนอง (จรัญและคณะ, 2547)

หอยหวานเป็นสินค้าที่มีความต้องการสูง มีกำลังการซื้อสูง จึงส่งผลต่อประชากรหอยหวานในธรรมชาติที่นับวันจะยิ่งน้อยลง อันเนื่องมาจากการถูกจับขึ้นมาเป็นอาหารแก่มนุษย์มากเกินนั่นเอง ด้วยเหตุนี้ จึงมีหลายหน่วยงานที่นำหอยหวานมาเพาะเลี้ยง เพื่อทดแทนผลผลิตจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงหอยหวานก็ยังประสบกับปัญหาหลายด้านด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัญหาเกี่ยวกับการระบาดของเชื้อก่อโรค รวมทั้งโรค หรือความผิดปกติที่เกิดจากสภาพแวดล้อม เช่น คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตมากในระหว่างการเลี้ยง

การพัฒนาการเลี้ยงในอดีตมักจะมุ่งศึกษาที่ ระบบการเลี้ยง คุณภาพน้ำ ส่วนการจัดการสุขภาพสัตว์ น้ำ โดยการศึกษาถึงการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกัน ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในหอยชนิดนี้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ มีรายงานว่ามีผลต่อภูมิคุ้มกันของหอย ได้แก่ ปริมาณรวมของฮีโมไซต์ในเลือด, โปรตีนรวมในเลือด, ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอกออกซิเดส, respiratory burst, ฟาโกไซโตซีส, ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และ ประสิทธิภาพของความต้านทานแบคทีเรีย (Pipe, 1995) รวมทั้งการเกิดโรคในหอยหวาน เช่น โรคงวงบวม ก็ยังไม่สามารถหาสาเหตุของการเกิดที่แท้จริงได้ แต่เป็นที่ทราบอย่างแน่นอนแล้วว่าความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรค และเจ้าบ้าน ถูกควบคุมด้วยสิ่งแวดล้อม (Harvell et al., 2004) การระบาดของเชื้อโรคอาจเกิดขึ้นเนื่องมาจากตัวเชื้อโดยตรง หรือการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ความต้านทานของเจ้าบ้านจะเป็นด่านแรกของการป้องกัน ดังนั้น สมมติฐานที่เกิดขึ้น คือ การเปลี่ยนแปลงปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อเจ้าบ้าน อาจจะทำให้มีการระบาดของเชื้อโรคเกิดขึ้นได้ จึงมีการประเมินกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ เมื่ออยู่ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ทำ

ให้เกิดความเครียด หรือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภูมิคุ้มกัน และสิ่งแวดล้อมที่มากระตุ้น

การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับงานวิจัยนี้ว่า "การสะสมของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และความเค็ม ในระบบของการเลี้ยง อาจจะนำไปสู่การลดความความต้านทานของภูมิคุ้มกันของหอยหวาน และนำไปสู่การยอมรับเชื้อก่อโรคในที่สุด" และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางภูมิคุ้มกันกับคุณภาพน้ำ จะนำไปสู่กลวิธีในการควบคุมการระบาดของโรค และการปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงหอยหวาน เพื่อให้หอยหวานเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากเปลี่ยนแหปลงคุณภาพน้ำ น้อยที่สุด

การศึกษาในชุดวิจัยนี้ได้นำเบต้า-กลูแคน มาประยุกต์ใช้ เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหอยหวาน ซึ่งเบต้า-กลูแคน ถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากได้รับมาจากผนังเซลล์ยีสต์ ที่พบว่าไม่ก่อให้เกิดอันตรายในสัตว์น้ำ และตกค้างในสิ่งแวดล้อม และสามารถผลิตได้ง่าย รวดเร็ว ไม่แพง เพราะยีสต์มีการผลิต เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอยู่แล้ว และที่สำคัญ ในเลือดของหอยมีรีเซ็ปเตอร์ที่สามารถจับกับเบต้า-กลูแคนได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Tafalla et al., 2003; Jayaraj et al., 2008) ดังนั้น เบต้า-กลูแคน จึงถูกนำมาทดลองใช้ ในหอยหวาน ซึ่งถ้าการใช้เบต้า-กลูแคนนี้มีผลช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดอัตราการป่วย การตายอันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อ และโรคไม่ติดเชื้อได้ ก็น่าจะเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในอีกทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถนำมาใช้เพื่อให้การเลี้ยงหอยหวานประสบผลสำเร็จ และต้นทุนไม่สูงจนเกินไปนัก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1). เพื่อศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของหอยหวาน

2). เพื่อศึกษาผลของแอมโมเนีย ไนไตร์ท อุณหภูมิ และความเค็ม ต่อการยอมรับเชื้อของหอยที่มีต่อเชื้อวิบริโอ (*Vibrio alginolyticus*)

3). เพื่อศึกษาผลของแอมโมเนีย ไนไตร์ท อุณหภูมิ และความเค็มที่มีต่อพารามิเตอร์บางประการของภูมิคุ้มกันในหอยหวาน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนรวม และระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

4). เพื่อประยุกต์ใช้บีต้ากลูแคนในหอยหวาน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1). เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางด้านภูมิคุ้มกันหรือการป้องกันตัวเองของหอยฝาเดียว ซึ่งมีข้อมูลอยู่น้อยมาก ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างศักยภาพในการผลิตหอยหวานต่อไป

2). สามารถนำสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพ ลดอัตราการตายอันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อและปัจจัยทางคุณภาพน้ำ ส่งผลให้สามารถเพิ่มผลผลิตของหอยหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อีกทั้งยังเป็นการลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะด้วย

3). เป็นข้อมูลพื้นฐาน ที่นำไปสู่การจัดการสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง สามารถจัดการกับปัจจัยที่ส่งผลต่อความเครียดได้ และสามารถจัดการกับสุขภาพของหอยหวานได้

4). เกษตรกรสามารถนำความรู้ที่ได้นี้ไป ประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ หรือเป็นทางเลือกให้เกษตรกรในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แทนสารเคมีและยาปฏิชีวนะ ทำให้เกิดการเพาะเลี้ยงอย่างยั่งยืน ลดต้นทุนการผลิต เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น นำไปสู่มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น รวมทั้งช่วยเสริมสร้างความแข็งแรง และมั่นคงของเศรษฐกิจของชุมชนอีกด้วย

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาเซลล์เม็ดเลือดที่เกี่ยวข้องในระบบการป้องกันตัวเองของหอยหวาน และศึกษาภูมิคุ้มกันภายหลังการได้รับความเครียดอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำบางประการรวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรีย และศึกษาผลของบีต้า-กลูแคน ต่อภูมิคุ้มกัน การต้านทานโรค และการเปลี่ยนแปลงต่อสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กลไกการป้องกันตัวเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Defense mechanisms of invertebrate)

กลไกการป้องกันตัวเอง หรือระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีกระบวนการเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific) และมีกลไกแบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune mechanisms) **(ภาพที่ 2-1)** สัตว์กลุ่มนี้ขาดความสามารถในการจดจำเชื้อต่าง ๆ ที่เข้ามาในครั้งแรก สิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้สามารถรับรู้ (recognize) การรุกรานของสิ่งแปลกปลอมโดยรูปแบบที่เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) การรับรู้นี้จะสำเร็จได้ จะต้องผ่านรีเซ็ปเตอร์ “pattern recognition receptors, PRR” จึงจะเกิดกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Medzhitov and Janeway, 1997)

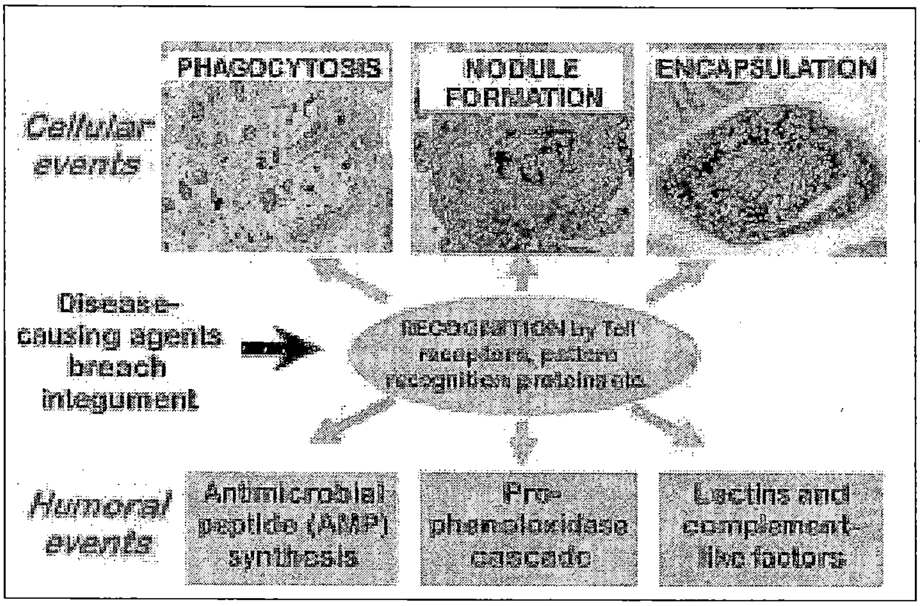
	Inate immune system		Adaptive immune system
Evolutionary history	Ancient (plants, insects, mammals) Billions of years old		Modern (jawed vertebrates) 400 million years old
Recognition	PAMPs (commonly carbohydrate and lipids)	Co-stimulation Education Cooperation ←→	Specific detail of molecular structure
Receptors	Fixed in genome (invariant) Rearrangement not necessary Non-clonal Diverse cellular distribution		Encoded in gene segments (variability) Rearrangement neccesary Clonal Lymphocytes
Self–nonself discrimination	Perfect		Imperfect; hence, autoimmune disease, allergy and allograft rejection
Time to onset	Immediate		Delayed
Memory	No		Yes

TRENDS in Parasitology

ภาพที่ 2-1 เปรียบเทียบระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) และภูมิคุ้มกันที่สร้างเองได้ (adaptive immune system) (McGuinness et al., 2003)

สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ สามารถรับรู้ (recognition) ได้ว่า มีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกายของมัน ด้วยรีเซ็ปเตอร์ (receptor) โมเลกุล (pattern recognition molecules, PRMs) หรือ โปรตีน (pattern recognition proteins, PRPs) ต่าง ๆ ที่อยู่อิสระในเลือด หรือเซลล์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง จากนั้น

ในเซลล์เม็ดเลือดจะเกิดกระบวนการฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) โดยเซลล์ที่สามารถฟาโกไซต์ได้ ในขณะที่กระบวนการโนดูลฟอร์เมชั่น (nodule formation) จะช่วยเคลื่อนย้ายจุลชีพที่มีปริมาณมาก ซึ่งจุลชีพจะถูกล้อมรอบ โดยการห่อหุ้มของเซลล์ ส่วนกระบวนการเอนแคปซูเลชั่น (encapsulation) จะเกิดขึ้น เมื่อจุลชีพขนาดใหญ่เข้ามา หรือเนื้อเยื่อถูกทำลาย เซลล์จุลชีพ จะถูกล้อม โดยการเกิด multilayer ของเม็ดเลือด สำหรับแบคทีเรีย และเชื้อราสามารถถูกทำลายด้วย antimicrobial peptides หรือโดยผ่านกระบวนการโปรฟีนอลลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade) **ภาพที่ 2- 5** ส่วนเลคติน (lectins) และ สารประกอบอื่น ๆ อาจจะเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ การรับรู้ และช่วยในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้ามาในร่างกาย **(ภาพที่ 2-2)**



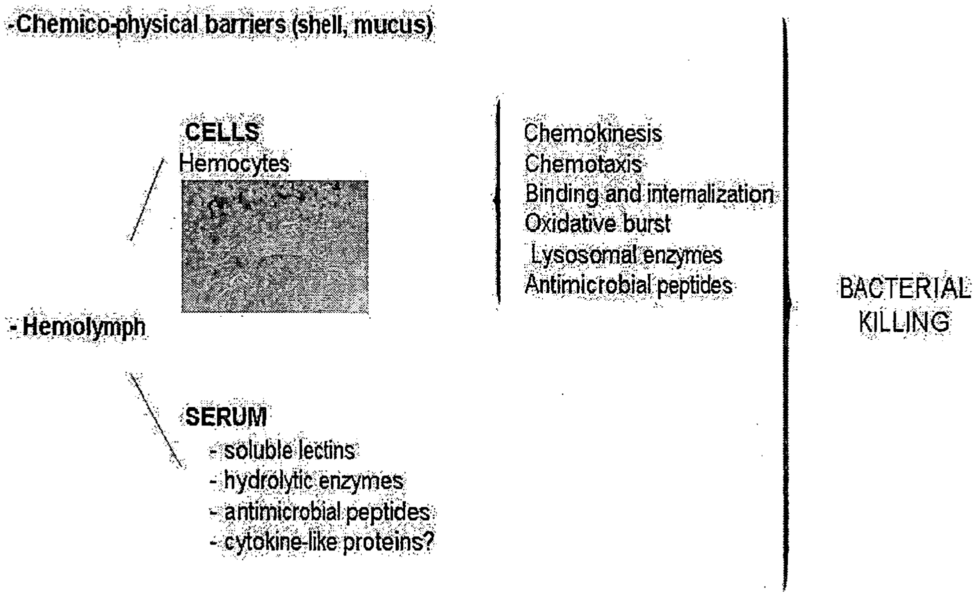
ภาพที่ 2-2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ และแบบสารน้ำของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Rowley and Powell, 2007)

2.2 กลไกการป้องกันตัวเองของหอย (Defense mechanisms of mollusk)

การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตัวเองของหอย ได้มีความสนใจเพิ่มมากขึ้น ทั้งเพื่อศึกษาเชิงนิเวศวิทยา และการติดเชื้อจากจุลชีพ (Arzul et al., 2001) นอกจากนี้ระบบการป้องกันตัวเองของหอยและดับของการเปลี่ยนแปลงยังสามารถใช้เป็นตังชี้วัดทางชีววิทยา (biomarker) เพื่อที่จะเฝ้าระวังแหล่งที่มีการปนเปื้อนสารพิษได้ เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของโลหะหนักในแถบชายฝั่ง พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างอัตราการเกิดฟาโกไซโตซีส กับระดับการปนเปื้อนของโลหะหนัก (Pipe et al., 1995)

2.2.1 ระบบการป้องกันแบบสารน้ำ (Humoral defense system)

ภูมิคุ้มกันของหอย ประกอบด้วยภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ และแบบเซลล์ (humoral and cellular immunity) ระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ ประกอบด้วย กลุ่ม lysosomal enzymes, agglutinins, lectins และ antimicrobial peptide แต่อย่างไรก็ตามภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ก็มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการป้องกันตัวเองของหอยเช่นกัน (Roch, 1999) **ดังภาพที่ 2-3**



ภาพที่ 2-3 ระบบการป้องกันตัวเอง (immune defense system) ของหอย (Canesi et al., 2002)

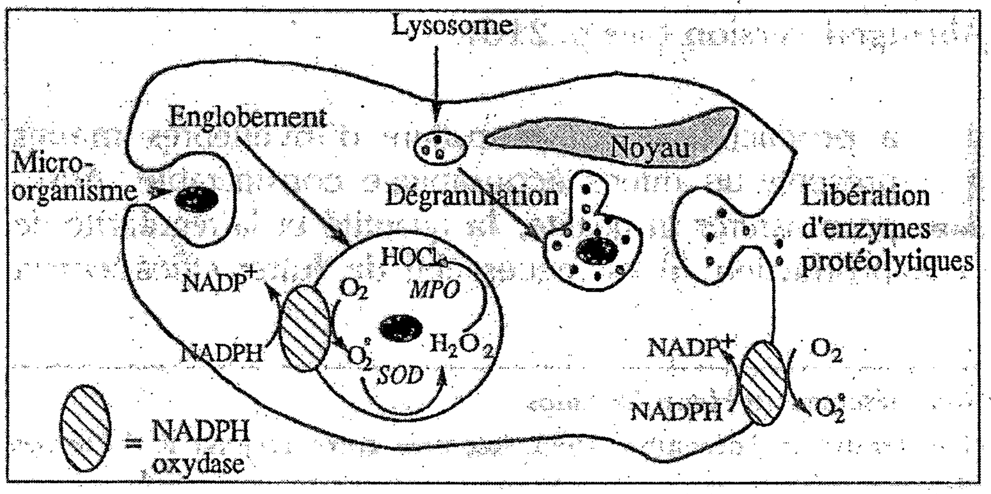
เอนไซม์ในกลุ่ม lysosomal ได้แก่ beta-glucuronidase, acid and alkaline phosphatase, lipase, aminopeptidase และ lysozime) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดชนิดแกรนูลโลไซต์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะถูกหลั่งออกมาในซีรัม เมื่อมีการแตกของแกรนูล ในระหว่างการฟาโกไซโตซีส (Pipe, 1990) การเกิด agglutinin พบในเนื้อเยื่อของหอย ซึ่ง glycoprotein นี้แสดงหน้าที่คล้ายกับ opsonin เพื่อทำลายแบคทีเรีย หรือโปรโตซัว ที่เข้าสู่หอย (Chu, 1988) สำหรับ lectin เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่คล้ายกับ agglutinin และพบในซีรัมของหอย และเมมเบรนของเม็ดเลือดหอย มีหน้าที่ทำให้เกิดการ opsonization เช่น ทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดเกิดขึ้น และเกิด agglutination ของสิ่งแปลกปลอม lectin มีความจำเพาะ และจับกับคาร์โบเดรตของแบคทีเรีย ซึ่งจะสนับสนุนให้มีการจับทำลายที่แปลกปลอมเข้ามาได้ (Tunkijjanukij et al., 1998) และ antibacterial peptide พบทั้งในเม็ดเลือดและซีรัมของหอยสองฝากลุ่มหอยแมลงภู่ ซึ่งถูกจำแนกได้

เป็น defensins, mytilins, mytcins และ mytimycin สารประกอบเหล่านี้ออกฤทธิ์ในช่วงกว้างกับจุลชีพชนิดต่าง ๆ (Mitta et al., 2000)

2.2.2 ระบบการป้องกันแบบเซลล์ (Cell defense system)

กระบวนการฟาโกไซโทซีสของเม็ดเลือดเป็นกระบวนการหลักของระบบป้องกันแบบเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน ได้แก่ การจดจำ (recognition) การเข้าเกาะ (adhesion) การย่อย (ingestion) การทำลาย (destruction) และการกำจัด (elimination) เซลล์ของสิ่งแปลกปลอม เม็ดเลือด (hemocyte) ของหอยมีหน้าที่ที่สำคัญต่อการขนส่งสารอาหาร การรักษาบาดแผล และการเข้าออกของสารที่ได้จาก catabolism หรือสารพิษ (Feng, 1988) โดยทั่ว ๆ ไปแล้วเม็ดเลือดหอยสามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ (1) ไฮยาลิโนไซต์ (hyalinocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดเล็ก ไซโทพลาสซึมน้อย ในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลเพียงเล็กน้อย หรือไม่มีเลย และ (2) แกรนูลโลไซต์ (granulocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ มีแกรนูลมากมายในไซโตพลาสซึม และมีหน้าที่หลักที่ตอบสนองต่อการฟาโกไซโตซีส และสามารถถูกจัดจำแนกไว้ในกลุ่ม acidophilic cell, basophilic cell และ neutrophilic cell อีกด้วย การศึกษาชนิดของเม็ดเลือดในหอยได้มีการศึกษาในหอยหลายชนิด เช่น *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *Crassostrea virginica*, *C. gigas* เป็นต้น (Hine, 1999)

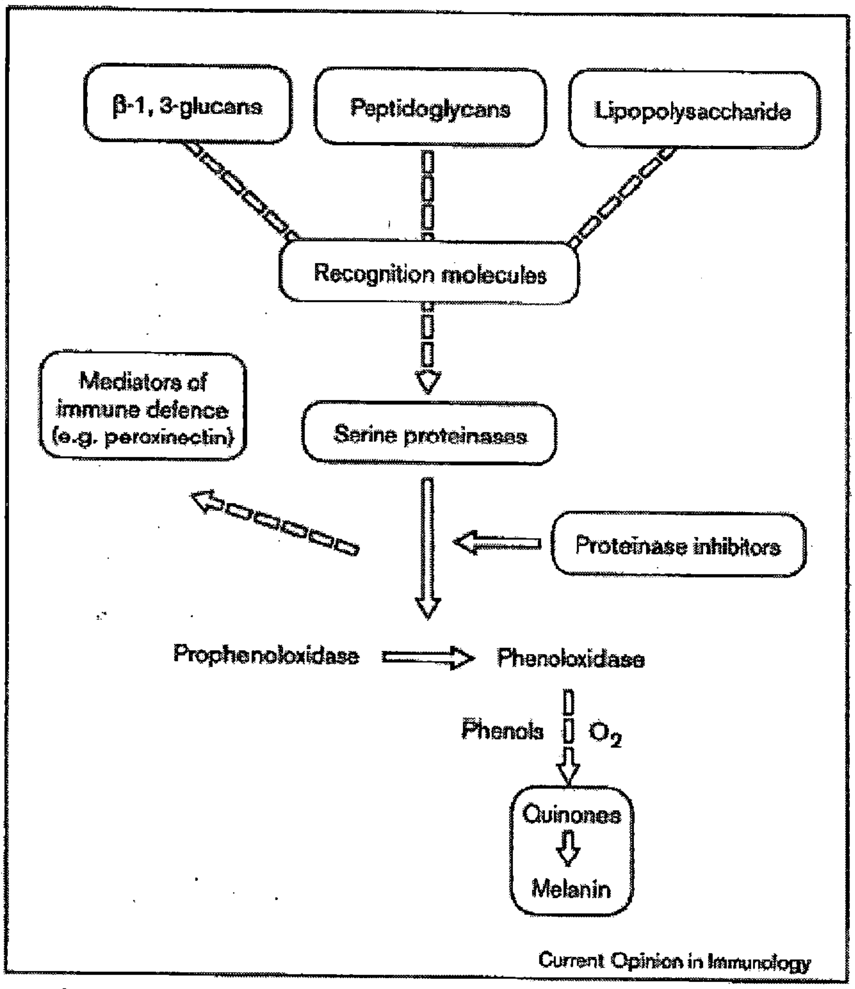
กระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดของหอย เกิดจากการฟาโกไซโตซีส โดยจะทำให้เกิด เอนไซม์ในกลุ่ม lysosomal และกิจกรรมของ respiratory burst ซึ่งการเกิดกิจกรรมนี้จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ROS ซึ่งได้แก่ superoxide anion, hydroxyl radical anion, singlet oxygen anion, hydrogen peroxide anion, hypohalides anion, halidamines anion, nitric oxide anion และ peroxynitrite anion การเกิด ROS จะเกิดในระหว่างที่มีการฟาโกไซโตซีสสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือด (Roch, 1999) แสดงดัง **ภาพที่ 2-4**



ภาพที่ 2-4 การทำลายจุลชีพ โดย respiratory burst activity ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) ของเม็ดเลือด (Torreilles et al., 1996)

ระบบการป้องกันภายในของหอยฝาเดียว (Snail) ประกอบด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (Ratcliffe, 1985, Van der Knaap & Loker, 1990) เม็ดเลือด (hemocytes) ของหอยหมุนเวียนเป็นอิสระอยู่ภายในเลือด (hemolymph) และในเนื้อเยื่อต่างๆ และช่วยในการป้องกันร่างกายของหอย และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ (Shiff, 1994) เม็ดเลือด สามารถเคลื่อนที่อย่างเป็นอิสระ และสามารถเข้าออกไปในเนื้อเยื่อของหอยได้ เมื่อหอยมีการเปิดระบบหมุนเวียนเลือด (open vascular system) (Loker & Bayne, 1988, Van dert Knaap &Loker 1990) เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มมอลลัสกา (Molluska) มีหน้าที่หลายอย่าง ได้แก่ รักษาบาดแผล เนื้อเยื่อ (Armstrong et al, 1971) การขนส่ง การย่อยสารอาหาร และการป้องกันภายใน (Cheng, 1981, 1984, Fisher, 1986) นอกจากนี้ฮีโมไซต์ ยังเป็นเซลล์ตัวกลางของระบบการป้องกันภายในร่างกายของหอยโดยผ่านการสะสม และการขับออกของสารเคมีที่เป็นพิษ (Matozzo et al, 2001; Fisher, 2004) ฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) และก่อให้เกิด phenoloxidase **(ภาพที่ 2-5)** และ respiratory burst activity **(ภาพที่ 2-4)** (Tripp, 1961; Canesi et al., 2002) และการล้อมจับสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) (Harris, 1975; Montes et al., 1995) จากการศึกษาลักษณะเม็ดเลือดของหอย โดยทั่ว ๆ ไป แบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ไม่มีแกรนูล (hyalinocytes) และกลุ่มที่มีแกรนูล (granulocytes) รูปร่างและหน้าที่ของเม็ดเลือดหอยไม่ได้ศึกษามากนัก จนกระทั่งปัจจุบันนี้ การศึกษาเกี่ยวกับเม็ดเลือดหอยส่วนใหญ่มักมุ้งเน้นศึกษา หอยสองฝา อาจเนื่องมาจากมีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า อย่างไรก็ตาม การศึกษาลักษณะแหละหน้าที่ของเม็ดเลือดของหอยกลุ่มแกสโตรพอดก็ยังมีการศึกษาอยู่เช่นกัน

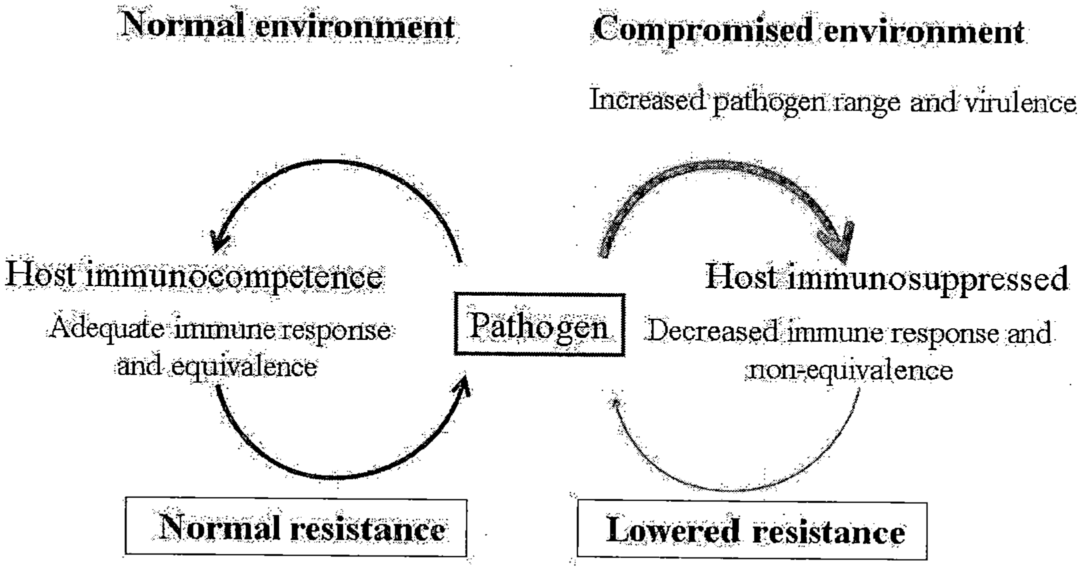
ได้แก่ *Biomphalaria glabrata* (Matricon-Gondran & Letocart, 1999), *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom et al., 1985), *Haliotis diversicolor* (Chen et al. 1996), *Haliotis asinina* (Sahaphong et al., 2001), *Haliotis rufescens*, *Haliotis cracherodii* (Martello et al., 2000) and *Haliotis tuberculata* (Travers et al., 2008)



ภาพที่ 2-5 กลไกการเกิดกระบวนการโปรฟีนอลลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade) (Söderhäll and Cerenius, 1998)

2.3 ผลของคุณภาพน้ำต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

สิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม จะมีผลกระทบต่อกิจกรรมของเซลล์ และสารน้ำ และในเวลาเดียวกัน อาจเพิ่มกิจกรรมการเกิดเมตาบอลิซึมของจุลชีพ



ภาพที่ 2-6 ไดอะแกรมแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง เชื้อโรค และสิ่งแวดล้อม ที่ส่งผลต่อระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน

จากภาพที่ 2-6 ได้แสดงให้เห็นถึงความสาเหตุของการติดเชื้อโรค เมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อเจ้าบ้านอยู่ในส่งแวดล้อมที่ปกติด ระบบภูมิคุ้มกันก็มีการทำงานตามปกติ และพอเพียงที่จะทำลายเชื้อแบคทีเรีย ที่มีอยู่ในระบบ ในช่วงเวลานั้น ๆ ในทางตรงกันข้ามถ้าสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป เจ้าบ้านอาจเกิดความเครียด ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อลดลง ประกอบกับเชื้อที่เพิ่มปริมาณมากขึ้น และรุนแรงมากขึ้น จะทำให้เจ้าบ้านไม่สามารถทำลายเชื้อเหล่านี้ได้ทัน เนื่องจากภูมิคุ้มกันถูกกดการตอบสนอง ส่งผลให้เจ้าบ้านติดเชื้อ และตายในที่สุด

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ ที่มีผลต่อสรีระของสัตว์น้ำ ได้แก่อุณหภูมิ ความเค็ม และสารพิษต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมได้รายงานไว้ว่ามีผลกระทบต่อระบบหมุนเวียนของเม็ดเลือด และกระบวนการฟาโกไซโตซีส ในหอยหลาย ๆ ชนิด เช่น หอยเป๋าฮื้อ *Haliotis rufescens, H. cracherodii* และ *H.diversicolor supertexta* (Fisher, et al., 1987; Cheng, 1988; Pipe and Coles, 1995; Martello et al., 2000; Cheng et al., 2004)

2.4 การประยุกต์ใช้เบต้ากลูแคนในสัตว์น้ำ

โรคติดเชื้อ ที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำ ยังคงก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อยู่เสมอ เนื่องมาจากว่าการระบาด ในแต่ละครั้งไม่สามารถทำนายได้ เพราะอาจเกิดจากเชื้อก่อโรค หรือเชื้อฉวยโอกาส ที่อยู่ในระบบเลี้ยง ซึ่งเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงบางอย่าง เกิดขึ้นในระบบ อาจทำให้เกิด

การระบาดของเชื้อก่อโรคเหล่านี้ ซึ่งหลาย ๆ วิธีถูกนำมาใช้ แก้ไข ป้องกัน โรคที่เกิดขึ้นในระบบการเลี้ยง

มีหลายวิธีการ ที่ถูกนำมาใช้แก้ไขปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ ได้แก่ การใช้สารเคมี การใช้ยาปฏิชีวนะ และสารประกอบอื่น ๆ ผสมลงในอาหาร หรือในน้ำ เพื่อจัดการกับปัญหาเหล่านี้ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีหรือ ยาปฏิชีวนะ อาจทำให้เกิด การตกค้างในสิ่งแวดล้อม และอาจเกิดการต้านยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในปัจจุบันนี้ จึงมีการปรับเปลี่ยน ให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และหาวิธีป้องกัน แทนการรักษา เพื่อที่จะควบคุมระดับระดับเชื้อโรค และสิ่งแวดล้อม ให้มีความสมดุลซึ่งกันและกัน ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำ คือ การใช้วัคซีน (vaccines) หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) แต่เนื่องมาจากว่าสัตว์น้ำกลุ่มไม่มีกระดูกสันหลัง มีระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง หรือภูมิคุ้มกันที่มีมา แต่กำเนิด (innate immune responses) (Kurtz and Franz, 2003; Little and Kraaijeveld, 2004) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปแล้ว เป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มความต้านทานของเจ้าบ้าน (Bricknell and Dalmo, 2005) โดยสารประกอบในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ จะมีการหมุนเวียนในระบบเลือดในระดับหนึ่ง ที่พร้อม ที่จะต่อสู้กับเชื้อโรค เมื่อสัตว์น้ำต้องอยู่ภายใต้สภาวะความเครียด สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ได้แก่ beta-glucan, chitin, mannoproteins, peptidoglycans, alginate และ bacterial components (เช่น lipopolysaccharides) สารเหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดการป้องกันโรคในสัตว์น้ำ ในช่วงกว้าง

เบต้า-กลูแคน ถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก ได้รับมาจากผนังเซลล์ยีสต์ ซึ่งพบว่าไม่ก่อให้เกิดอันตรายในสัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อม และสามารถผลิตได้ง่าย รวดเร็ว ไม่แพง เพราะยีสต์มีการผลิต เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอยู่แล้ว

โปรตีนที่ใช้ในการจับกับเบต้ากลูแคน (glucan binding proteins, GBPs) ได้ถูกพบ และจำแนกในสัตว์กลุ่มอาร์โทรพอด (Vetvicka and Sima, 2004) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว กิจกรรมของมันจะเกี่ยวข้องต่อการกระตุ้น PPO activation cascade โปรตีนที่จับกับกลูแคน อาจเรียกว่า glucan-receptor ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตกลุ่มแมลง silkworm, Bombyx mori (Yoshida et al., 1986) ด้วยเช่นกัน และพบ glucan binding lipoprotein ในกุ้งขาว *L. vannamei* และ crayfish ด้วย (Romo-Figueroa et al., 2004) ดังนั้น GBP มี 2 โดเมนหลัก ที่เอาไว้จับกับโมเลกุลอื่น ๆ โดย โดเมนหนึ่งจะจับกับกลูแคน และโดเมนที่สอง จะจับเพื่อให้เกิด PPO cascade (Fabrick et al., 2004) GBPs ที่พบในกลุ่มครัสเตเชียน จะมีขนาดประมาณ 100 kDa และจะจับกับกลูแคน แบคทีเรีย และฮีโมไซต์ นอกจากนี้ยังสามารถทำหน้าที่เช่นเดียวกับออฟโซนิน (opsonin)

การประยุกต์ใช้เบต้า-กลูแคนในสัตว์น้ำ พบว่ามีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ในปลา ตัวอย่างการศึกษาในปลา ได้แก่ ปลาแซลมอน ที่พบว่ากลูแคนสามารถชักนำให้ปลามีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น จากการทำงานของแมคโครฟาจที่เพิ่มขึ้นในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas salmonicida* (Engstad and Robertsen; 1993) เช่นเดียวกับรายงานของ Misra et al. (2006) ที่พบว่าเบต้ากลูแคนสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาคาร์พโดยทำให้ปลามีอัตราการรอดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุมหลังจากปลาได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 250 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในระยะเวลา 42 วัน โดยมีค่า phagocytic index, superoxide anion production และ complement activity เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับชุดควบคุม และ การทดลองของ Couso et al. (2003) พบว่าปลาซีบรีมที่ได้รับเบต้ากลูแคน 10 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สามารถเพิ่มการทำงานของแมคโครฟาจ โดยมีค่า phagocytic index และ superoxide anion production เพิ่มขึ้นอีกทั้งยังสามารถต้านทานการเกิดโรค pasteurellosis ได้อีกด้วย และจากการที่พบว่าเบต้ากลูแคนสามารถเพิ่มปริมาณแมคโครฟาจได้ ก็เนื่องมาจากแมคโครฟาจมีที่รับ (receptors) ที่จำเพาะกับเบต้ากลูแคนจึงสามารถจับกับเบต้ากลูแคนได้

เพราะเหตุใดจึงมีการใช้บีต้ากลูแคนในหอยหวาน

การประยุกต์ใช้เบต้ากลูแคนยังเกิดขึ้นไม่มากนักในหอย แต่จะพบการใช้เบต้ากลูแคนกันอย่างแพร่หลาย ในกุ้ง และปลา อย่างไรก็ตามจากการศึกษาถึงภูมิคุ้มกันของหอยหวาน ก็คล้าย ๆ กับหอยสองฝา ที่เคยมีการศึกษา มาก่อนหน้านี้แล้ว ที่พบว่า ในเลือดหอยจะมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และเป็นแบบภูมิที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่ง ผนังเซลล์ของยีสต์ถูกจัดว่าเป็น PAMPs (pathogen-associated molecule patterns) และในน้ำเลือดของหอยก็มี pattern recognition receptors ที่สามารถจับได้กับกลูแคน ที่เรียกว่า glucan binding protein ที่อยู่เป็นอิสระในน้ำเลือด จากนั้นจะก่อให้เกิดการผลิตสารประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันออกมาในเลือดของหอย (Medzhitov and Janeway, 1997)

เบต้า-กลูแคนสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกับแบบไม่จำเพาะเจาะจงนี้ได้ เช่น การกระตุ้นให้ nitric oxide, reactive oxygen species และ phenoloxidase มีการผลิตเพิ่มขึ้น (Tafalla et al., 2003; Jayaraj et al., 2008) ดังนั้น เบต้า-กลูแคน จึงถูกนำมาทดลองใช้ ในหอยหวาน ซึ่งถ้าการใช้เบต้า-กลูแคนนี้มีผลช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดอัตราการป่วย การตายอันเนื่องมาจากโรคติดเชื้อ และโรคไม่ติดเชื้อได้ ก็น่าจะเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในอีกทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถนำมาใช้ เพื่อให้การเลี้ยงหอยหวานประสบผลสำเร็จ และต้นทุนไม่สูงจนเกินไปนัก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ แบ่งออกเป็นสามกลุ่มการทดลองใหญ่ ๆ คือ

กลุ่มการทดลองที่ 1: การศึกษาลักษณะเม็ดเลือดของหอยหวาน

(Studies on hemocyte cell types of Babylon, *Babylonia areolata*)

<u>วิธีการทดลอง</u>

ก. สัตว์ทดลอง

หอยหวานธรรมชาติซื้อจากชาวประมง จังหวัดระยอง (ขนาด 60 ตัว ต่อกิโลกรัม) เลี้ยงไว้ที่โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ให้อากาศตลอดเวลา ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน เลี้ยงไว้ก่อนเริ่มการทดลอง เป็นเวลา 7 วัน ในช่วงของการเลี้ยงให้อาหารเป็นปลาข้างเหลืองวันละมื้อ ดูดตะกอน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทุกวัน

ข. การศึกษาเม็ดเลือดของหอยหวานโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้อง TEM

Fixed ด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M PBS ที่ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้น ล้างด้วย 0.1 M PBS (pH7.4) ที่ 4 °C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที Fixed ด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS ที่ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS (pH 7.4) ที่ 4 °C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ Dehydrated ด้วย ethyl alcohol (70%, 80%, 90% และ 95% 2 ครั้ง และ Absolute ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ) จากนั้น infiltrated ด้วย propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที (PO : Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 ชั่วโมง และ (1:2) นาน 12–14 ชั่วโมง ฝังตัวอย่างใน pure Araldite 502 resin และ polymerized ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ที่ 45 °C และ 60 °C เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

หมายเหตุ: ขั้นตอนจากการ fixd ด้วย glutaraldehyde จนถึงแช่ใน Absolute ethanol ครั้งที่ 2 ทำภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

กลุ่มการทดลองที่ 2: ผลของคุณภาพน้ำบางประการต่อการการเปลี่ยนแปลงระดับภูมิคุ้มกัน และการยอมรับเชื้อวิบริโอ ของหอยหวาน

(Effect of water quality on the immune response of *Babylonia areolata* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*)

<u>วิธีการทดลอง</u>

ก. การเตรียมน้ำทะเล

เนื่องจากน้ำที่นำมาทดลองเป็นน้ำที่ยังไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการเลี้ยง จึงต้องทนำมา ผ่านการกรองตะกอนออก และปรับความเค็มให้ได้ 30 ppt จากนั้นเติม คลอรีนในอัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำทะเล 1,000 ลิตร และ EDTA ในอัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 1,000 ลิตรใส่ลงไปในน้ำทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วัน เพื่อกำจัดเชื้อโรคและโปรโตซัว ที่อาจมีปนเปื้อนมากับน้ำ เมื่อทิ้งไว้ได้เวลาแล้วจึงนำน้ำมาตรวจดูคุณภาพ เช่น ความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรต์ความขุ่น ใส ระดับความเค็ม ความเป็นกรด- ด่าง รวมถึงการตรวจเช็คปริมาณคลอรีนและ EDTA ในน้ำที่อาจ ตกค้างได้

ข. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้คือ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งแยกได้จากหอยหวานที่เป็นโรคงวงบวม และถูกส่งไปจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ที่กรมวิทยาศาสตร์สุขภาพ นนทบุรี

ค. สัตว์ทดลอง

หอยหวาน *(Babylonia areolata)* ซื้อมาจากชาวประมง จ. ระยอง น้ำหนักเฉลี่ย 14.4 ±2.75 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงด้วยเนื้อปลาข้างเหลืองวันละ 1 มื้อ และเลี้ยงในน้ำระบบปิด ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 48 ชั่วโมง

ก. การแบ่งชุดการทดลอง

ก-1 ชุดการทดลองการยอมรับเชื้อของหอยหวาน

Control	*(3 replicates)*				
Ammonia treatment	Control + bacteria	Ammonia conc. 1 + Bacteria *(4 replicates)*	Ammonia conc.2 +Bacteria *(4 replicates)*	Ammonia conc.3 + Bacteria *(4 replicates)*	Ammonia conc. 4 + Bacteria *(4 replicates)*
Nitrite treatment	Control + bacteria	Nitrite conc. 1 + Bacteria *(4 replicates)*	Nitrite conc.2 + Bacteria *(4 replicates)*	Nitrite conc.3 + Bacteria *(4 replicates)*	Nitrite conc. 4 + Bacteria *(4replicates)*
Salinity	Control + bacteria	Salinity 25 ppt + bacteria *(4 replicates)*	Salinity 30 ppt + bacteria *(4 replicates)*	Salinity 35 ppt + bacteria *(4 replicates)*	-
Temperature	Control + bacteria	Temp. 25 °C + bacteria *(4 replicates)*	Temp. 30 °C + bacteria *(4 replicates)*	Temp. 32 °C + bacteria *(4 replicates)*	-

ก-2 ชุดการทดลองภูมิคุ้มกันของหอยหวาน

ชุดการทดลอง	การทดลอง	จำนวนซ้ำ (แต่ละความเข้มข้น)	การให้อากาศ
ชุดการทดลองควบคุม	< 0.00 nd.*	4	/
ชุดการทดลองแอมโมเนีย	1, 3 ,5, 7 และ 10 mg/L-N	4	/
ชุดการทดลองแอมโมเนีย	1, 3 ,5, 7 และ 10 mg/L-N	4	/
ชุดการทดลองความเค็ม	25, 30 และ 35 ppt	4	/
ชุดการทดลองอุณหภูมิ	25, 30 และ 32 °C	4	/

ข. รายละเอียดระบบการทดลอง

ระบบการทดลอง	รายละเอียด
1.ระบบน้ำ	ระบบปิด เปลี่ยนถ่ายทุก 48 ชั่วโมง
2.การให้อากาศ	ให้อากาศ
3.อุณหภูมิ	28.6 ± 0.3 องศาเซลเซียส
4.อาหาร	ให้อาหารวันละครั้ง
5.จำนวนสัตว์ทดลอง	ถังละ 10 ตัว จำนวน 4 ถัง (แต่ละความเข้มข้น)
6.ปริมาตรน้ำ	ใช้น้ำ 20 ลิตรต่อถัง
7.ลักษณะตู้เลี้ยง	ถังพลาสติกขนาด 40 ลิตร
8.วัสดุรองพื้น	ทรายละเอียด หนา 3 ซม.
9.ความเค็มน้ำ	ใช้ความเค็ม 30 พีพีที

ค. การศึกษาการยอมรับเชื้อของหอยหวาน

ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาการยอมรับเชื้อแบคทีเรีย อยู่ที่ 1×10^{7} cfu/ml การยอมรับเชื้อของหอยหวาน สังเกตได้จากการการเกิดงวงบวมของหอยหวาน

ง. การทดสอบด้านภูมิคุ้มกัน

ง-1 การศึกษาระดับเม็ดเลือดรวม

1). การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากบริเวณช่องว่างของหัวใจ ด้วยเข็มขนาด 24G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร โดยหอย 10 ตัว คิดเป็น 1 ตัวอย่าง จากนั้นศึกษาภูมิคุ้มกันของหอย ได้แก่

2). ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocytes counted)

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดตามวิธีการของกิจการ และสิทธิ (2538) โดยนำเลือดที่เจาะได้จากกุ้งกุลาดำแต่ตัวมาเจือจางกับ น้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (MAS) ในอัตราส่วน 1:10 นับจำนวนเม็ดเลือดด้วย hemocytometer ในช่อง R ทั้ง 2 ข้าง และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็น ปริมาณเซลล์/ลบ.มม.

การคำนวณหาปริมาณเม็ดเลือดด้วย hemocytometer

$$\text{Total haemocytes/ml of blood} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้ทั้งหมด}}{10} \times \text{dilution} \times 10{,}000$$

ง-2 การศึกษาระดับปริมาณโปรตีนรวม (Bio-Rad) ในเม็ดเลือด

1). นำตัวอย่างใส่ใน microplate 20 ไมโครลิตร ใน well plate หลุมแรกของแต่ละความเข้มข้น

2). ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง 2 เท่า ในหลุมถัดไป (2-fold dilution) ด้วย PBS จนครบแถว

3). นำสารละลายโปรตีนมารตรฐานของ bio-rad มาทำเช่นเดียวกับสารตัวอย่างให้มี 3-5 ความเข้มข้น

4). เติม dry reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในทุกหลุม incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

5). ครบเวลานำ microplate ที่มีทั้งตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโปรตีนของ bio-rad มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

6). นำค่าการดูดกลืนแสง O.D. (Optical Density) ที่เครื่องอ่านได้ มาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานจากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) กับค่าความเข้มข้นต่างๆของโปรตีนมาตรฐานด้วยโปรแกรม excel เพื่อให้ได้ค่า Correlation (R) เช่น ได้ค่า R= 0.9662 และได้สมการ $y = 0.5677x + 0.5885$ นำค่าที่อ่านได้ของตัวอย่างมาแทนค่า y จะทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง

ง-3 การศึกษาระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) (Smith and Soderhall, 1991)

การเก็บตัวอย่างเลือดและการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก (Hemocyte Lysate: HLS) (Smith and Soderhall, 1991) เก็บตัวอย่างโดยใช้สารละลาย MAS เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวที่บรรจุในกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และใช้เข็มเบอร์ 24G นำไปเจาะเลือดกุ้งที่ตำแหน่งโคนขาเดินคู่ที่ 4 โดยใช้ อัตราส่วนของเลือดกุ้งต่อสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัวเท่ากับ 1 ต่อ 1 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาละลายในสารละลายคาโคดีเลทบัพเฟอร์ (cacodylate buffer ,

CAC buffer) pH 7.4 (ส่วนใสนำไปวิเคราะห์โปรตีนต่อไป) แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก โดยนำไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายทันทีเป็นจำนวน 1 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วแยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS นำมาวิเคราะห์ระดับแอคติวิตีของฟีนอลออกซิเดส

การวิเคราะห์ระดับแอคติวิตีของฟีนอลออกซิเดส (Smith and Sodwehall, 1991 อ้างถึงใน ชัยชาญ ไตรตรีศิลป์, 2545) นำตัวอย่างน้ำเลือดในกุ้งกุลาดำ 10 ตัวของแต่ละกลุ่มการทดลองไปวิเคราะห์หาระดับแอคติวิตีของฟีนอลออกซิเดส โดยวัดสีของโดพาโครม (Dopachrome) ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา มีรายละเอียดดังนี้ นำสารละลาย HLS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตรในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม จากนั้น เติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย CAC buffer ปริมาตร 130ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยางคลื่น 490 นาโนเมตรทุกช่วง 3 นาที เป็นจำนวน 10 ครั้ง

แอคติวิตีของฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย เท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 ต่อนาที

ง-4 การวิเคราะห์ผลการทดลองเชิงสถิติ

ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนรวม และระดับกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ของการทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กลุ่มการทดลองที่ 3: การประยุกต์ใช้บีต้า-กลูแคนในหอยหวาน

(Application of beta-glucans as immunostimulant in *Babylonia areolata*)

วิธีการทดลอง

ก. การแช่เบต้า-กลูแคน

นำหอยหวานมาแช่เบต้า-กลูแคน ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ตามเวลาที่ 12, 24, และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษา เวลาที่เหมาะสมที่จะใช้เบต้ากลูแคนในหอยหวาน

ข. การแบ่งชุดทดลอง

การทดลอง	จำนวนซ้ำ	พารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกันที่ทำการวัด
1. กลุ่มควบคุม (ไม่แช่ เบต้า-กลูแคน)	4	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนรวม และระดับกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส
2. แช่เบต้ากลูแคน 12 ชั่วโมง	4	
3. แช่เบต้ากลูแคน 24 ชั่วโมง	4	
4. แช่เบต้ากลูแคน 48 ชั่วโมง	4	

ค. รายละเอียดระบบการทดลอง

ระบบการทดลอง	
1.ระบบน้ำ	ระบบปิด เปลี่ยนถ่ายทุก 48 ชั่วโมง
2.การให้อากาศ	ให้อากาศ
3.อุณหภูมิ	28.6 ± 0.3 องศาเซลเซียส
4.อาหาร	ให้อาหารวันละครั้ง
5.จำนวนสัตว์ทดลอง	ถังละ 10 ตัว จำนวน 4 ถัง (แต่ละความเข้มข้น)
6.ปริมาตรน้ำ	ใช้น้ำ 20 ลิตรต่อถัง
7.ลักษณะตู้เลี้ยง	ถังพลาสติกขนาด 40 ลิตร
8.วัสดุรองพื้น	ทรายละเอียด หนา 3 ซม.
9.ความเค็มน้ำ	ใช้ความเค็ม 30 พีพีที

ง. การศึกษากิจกรรมการต่อต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ในน้ำเลือด (hemolymph) ของหอยหวาน

เพื่อที่จะศึกษาประสิทธิภาพของเบต้า-กลูแคน ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด ของหอยหวาน โดยเติม 100 ไมโครลิตร ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ลงในทุกหลุมของ 96 well-plate จากนั้นเติม 100 ไมโครลิตร ของน้ำเลือดของหอยหวานที่ถูกแช่ในแต่ละช่วงเวลา คือ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับตัวเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียเติม PBS และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด tryptone soy broth (TSB) อย่างละ 100 ไมโครลิตร ในหลุมที่มีเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร และบ่มไว้ที่ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง เพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และนำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) ของเชื้อแบคทีเรีย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการทดลองที่ 1: การศึกษาลักษณะเม็ดเลือดของหอยหวาน

(Studies on hemocyte cell types of Babylon, *Babylonia areolata*)

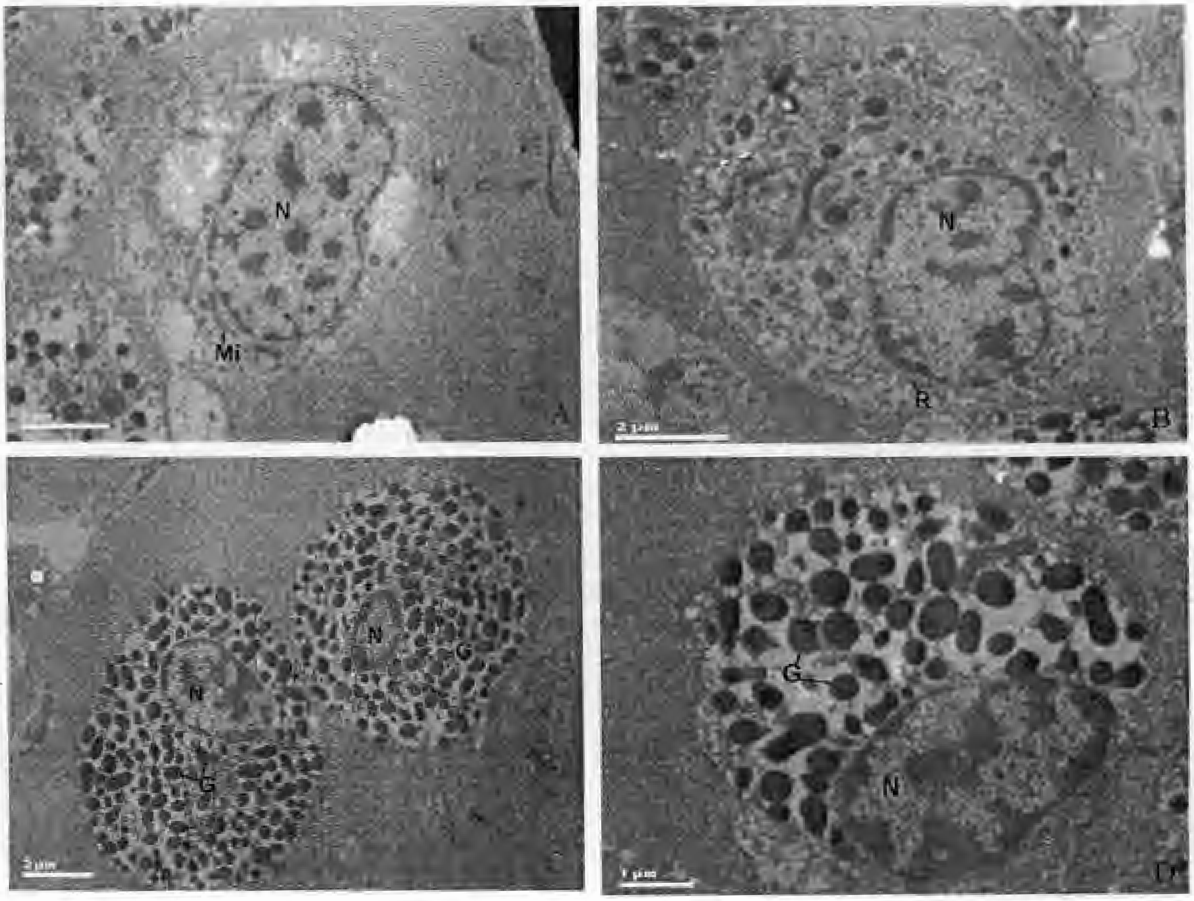
โครงสร้างของเม็ดเลือดหอยหวาน โดยการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ผู้วิจัยสามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดได้ 2 แบบ ตามปริมาณของแกรนูลที่พบ คือ

1. ไฮยาลิโนไซต์ หรือ ไฮยาลิน เซลล์ (Hyalinocytes or Hyaline cells) เซลล์นี้มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (oval shape) ขนาดของเซลล์ (กxย) ประมาณ 7.5x9.5 ไมครอน เซลล์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เป็นรูปไข่ (3.5x6.5 ไมครอน) อัตราส่วนระหว่างไซโตพลาสซึมต่อนิวเคลียสน้อย ในไซโตพลาสซึม พบ ไรโบโซม และไมโตคอนเดรีย นอกจากนี้ยังพบแกรนูลปริมาณเล็กน้อย และเป็นแบบ small granules (sG) (ภาพที่ 4-1 A,B) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบเซลล์ชนิดนี้ในปริมาณที่น้อยมาก โดยพบประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

2. แกรนูโลไซต์เซลล์ (Granulocyte cells) พบเม็ดเลือดชนิดนี้เป็นจำนวนมาก ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีขนาดประมาณ 6.5x9.5 ไมครอน นิวเคลียสของเม็ดเลือดชนิดนี้จะมีขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 2.5x4.0 ไมครอน ไซโตพลาสซึมของเซลล์ถูกบรรจุไปด้วยแกรนูลเป็นจำนวนมาก ซึ่งประกอบด้วยแกรนูลทั้งสองแบบ คือ large granules (LG) และ small granules (SG) (ภาพที่ 4-1 C,D) การศึกษาครั้งนี้พบเซลล์ชนิดนี้ในปริมาณมาก โดยพบประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์

เม็ดเลือดหอยแต่ละแบบมีหน้าที่แตกต่างกันออกไป Cheng (1981) ได้รายงานไว้ว่า granulocyte มีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ เพราะมีแกรนูล เมื่อเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้แตก แกรนูลจะสามารถหลั่งออกมา และเอนไซม์ที่อยู่ในแกรนูลจะเข้าล้อมรอบ ทำลาย และขับสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ออกไปจากตัวของหอย จากการศึกษาในครั้งนี้ พบเซลล์แกรนูลโลไซต์มากกว่าไฮยาลิโนไซต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ที่มีบทบาทอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันของหอยหวาน คือ เซลล์แกรนูลโลไซต์ โดยการศึกษาในก่อนหน้านี้ พบว่าแกรนูลที่อยู่ในเม็ดเลือดจะถูกบรรจุไปด้วยเอนไซม์ โปรตีนต่าง ๆ และ degrading factors อื่น ๆ (Pipe, 1990; Cajaraville et al., 1995;

Carballal et al., 1997; Pipe et a., 1997) Serrano et al (2002) ได้ศึกษาลักษณะของเม็ดเลือดหอย *Biomphalaria glabrata* ซึ่งพบว่าในฮีโมลิมป์ ประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดหลัก ๆ 2 กลุ่ม คือ ไฮยาลิโนไซต์ และแกรนูโลไซต์ ซึ่งแกรนูลโลไซต์จะมีซูโดโพเดีย (pseudopodia) ยื่นออกมาคล้าย ๆ กับเซลล์ประสาท และทำหน้าที่ในการฟาโกไซโตซีส และเอนแคปซูเลชั่น พาราไซต์ และ Pan (1996) ได้เสนอไว้ว่าเม็ดเลือดของ *B. glabrata* ชนิดฮยาลิโนไซต์สามารถกลายเป็นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลโลไซต์ได้ โดยเมื่อหอยได้รับสิ่งแปลกปลอมจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับขั้นตอน ของเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในกระแสเลือด โดยเริ่มจากไฮยาลิโนซต์กลายเป็นแกรนูลโลไซต์เซลล์ และเซลล์แตก เพื่อให้สารต่าง ๆ ในแกรนูลหลั่งออกมาเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม ดังนั้น จึงพบปริมาณเม็ดเลือดชนิดแกรนูโลไซต์มากกว่าไฮยาลิโนไซต์



ภาพที่ 4-1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดหอยหวาน โดยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (TEM): A และ B คือ ไฮยาลิโนไซต์ หรือ ไฮยาลิน เซลล์ (Hyalinocytes or Hyaline cells) : C และ D คือ แกรนูโลไซต์เซลล์ (Granulocyte cells) (Bar =2 µm)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ผลการทดลองที่ 2: ผลของคุณภาพน้ำบางประการ ต่อการการเปลี่ยนแปลงระดับภูมิคุ้มกัน และการยอมรับเชื้อวิบริโอของหอยหวาน

(Effect of ammonia on the immune response of *Babylonia areolata* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*)

---

1. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตามช่วงเวลาต่าง ๆ

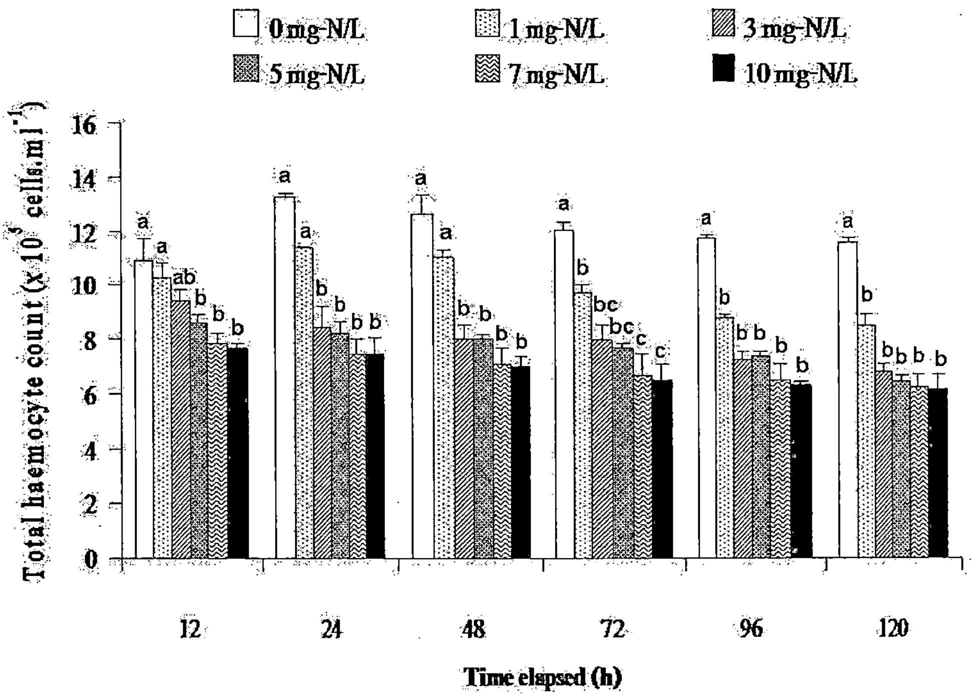
1.1 การยอมรับเชื้อแบคทีเรียของหอยหวานภายหลังการได้รับปริมาณแอมโมเนีย ในระดับที่แตกต่างกัน

ไม่พบอัตราการตายของหอยหวานภายหลังการได้รับแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน แต่จากการสังเกตพบว่า หอยหวานที่ได้รับแอมโมเนียชุดความเข้มข้น 3 mg-N/L ขึ้นไป ในทุกช่วงเวลา หอยหวานมีลักษณะตัวนิ่ม เท้าเป็นสีเทา และมีเมือกมาก

1.2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ในน้ำเลือดของหอยหวาน

จากการทดลองพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของ ชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 0 mg-N/L และชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากที่สุด ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง แต่ในช่วงเวลาที่ 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L เริ่มลดลง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 0 mg-N/L ส่วนการทดลองในชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 3, 5, 7 และ 10 mg-N/L ในแต่ละช่วงเวลา ปริมาณของเม็ดเลือดรวมไม่มีความแตกต่างกัน **(ภาพที่ 4-2)**

639.4
ก522
ล.2
284360

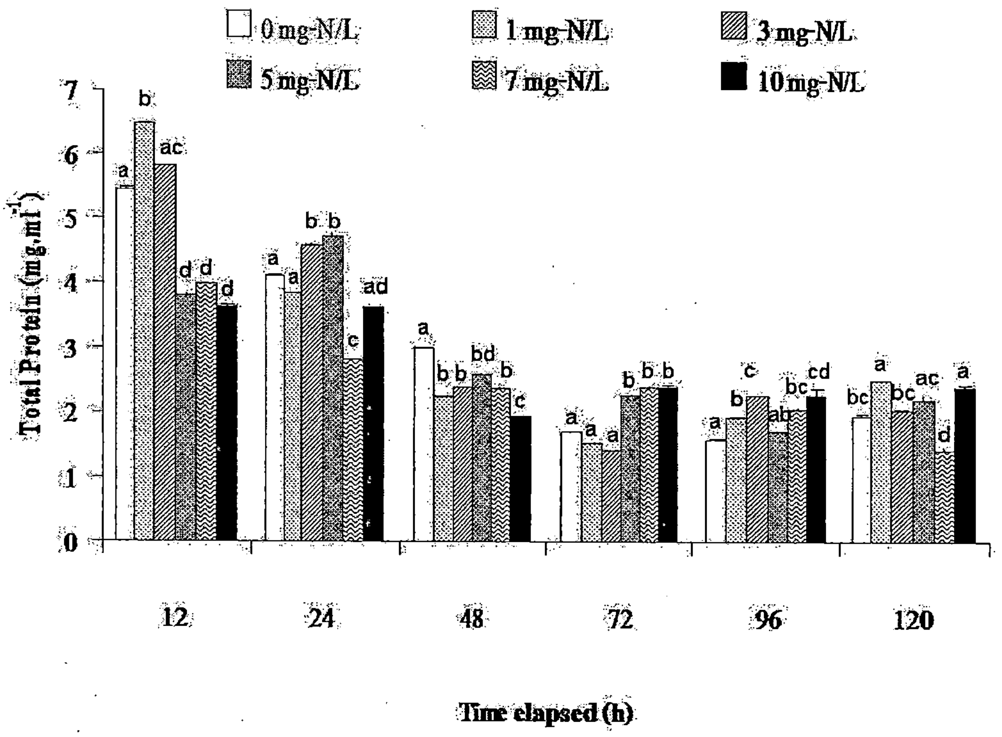


ภาพที่ 4-2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

1.3 ปริมาณโปรตีนรวมในเม็ดเลือดของหอยหวาน

ปริมาณโปรตีนรวมในเม็ดเลือดของหอยหวานในชั่วโมงที่ 12 พบสูงที่สุด ในชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 1 mg-N/L รองลงมาคือ ชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 3 mg-N/L และ ชุดความเข้มข้นแอมโมเนีย 0 mg-N/L ตามลำดับ ส่วนชุดความเข้มข้น 5, 7 และ 10 mg-N/L มีปริมาณโปรตีนรวม ไม่แตกต่างกัน ปริมาณโปรตีนรวมเริ่มลดลงในช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง ถึง 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง แสดงดัง **ภาพที่ 4-3**

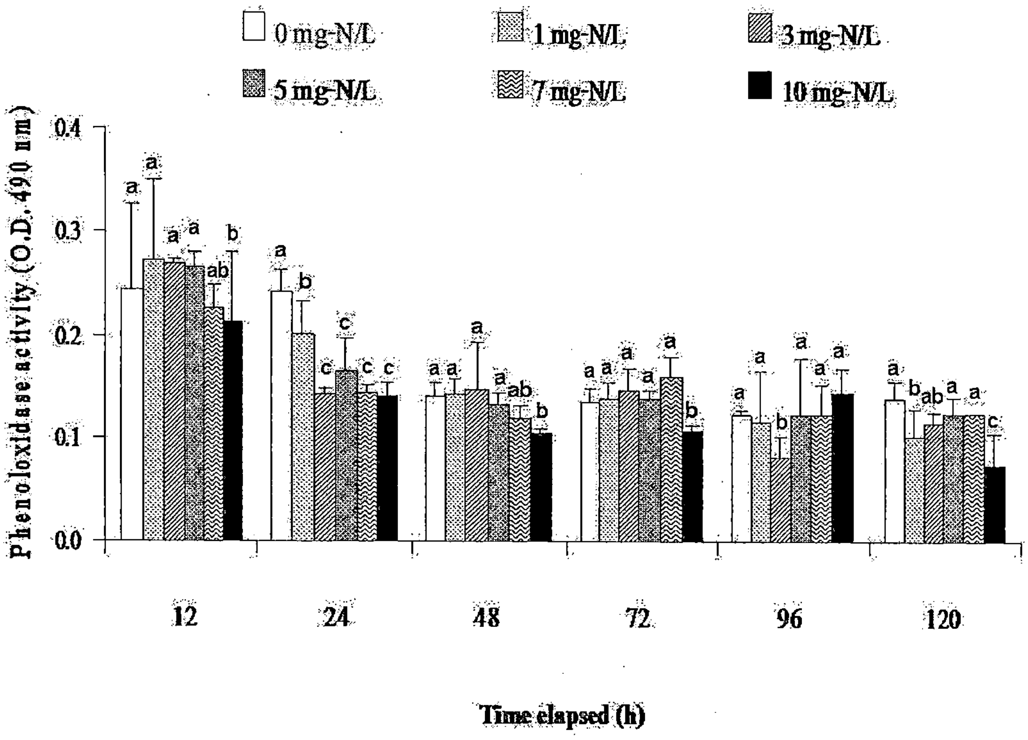


ภาพที่ 4-3 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

1.4 การเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในเม็ดเลือดของหอยหวาน

ระดับกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดหอยหวาน เกิดขึ้นสูงสุดในช่วงเวลาที่ 12 ชั่วโมงในทุกความเข้มข้น แต่เมื่อเวลาผ่านไปที่ 24 ชั่วโมงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อย่างเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะในชุดความเข้มข้น 3, 5, 7 และ 10 mg-N/L อย่างไรก็ตาม ชุดความเข้มข้น 0 และ 1 mg-N/L ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ยังมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เมื่อเวลาผ่านไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชั่วโมง พบว่าระดับกิจกรรมของเอนไซม์นี้ลดลง แต่ไม่แตกต่างกันมากแต่ละชุดความเข้มข้น **(ภาพที่ 4-4)**



ภาพที่ 4-4 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของแอมโมเนียในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตามช่วงเวลาต่าง ๆ

2.1 การยอมรับเชื้อแบคทีเรียของหอยหวานภายหลังการได้รับไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ 4-1 พบว่าการยอมรับเชื้อแบคทีเรีย และเกิดภาวะงวงบวม เริ่มเกิดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของไนไตรท์ 3 mg-N/L ในชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 120 การเกิดงวงบวมของหอยหวาน จะเกิดขึ้นมากในชุดความเข้มข้นของไนไตร์ท ตั้งแต่ 10 mg-N/L รองลงมาคือ 7 mg-N/L และ 10 mg-N/L ตามลำดับ

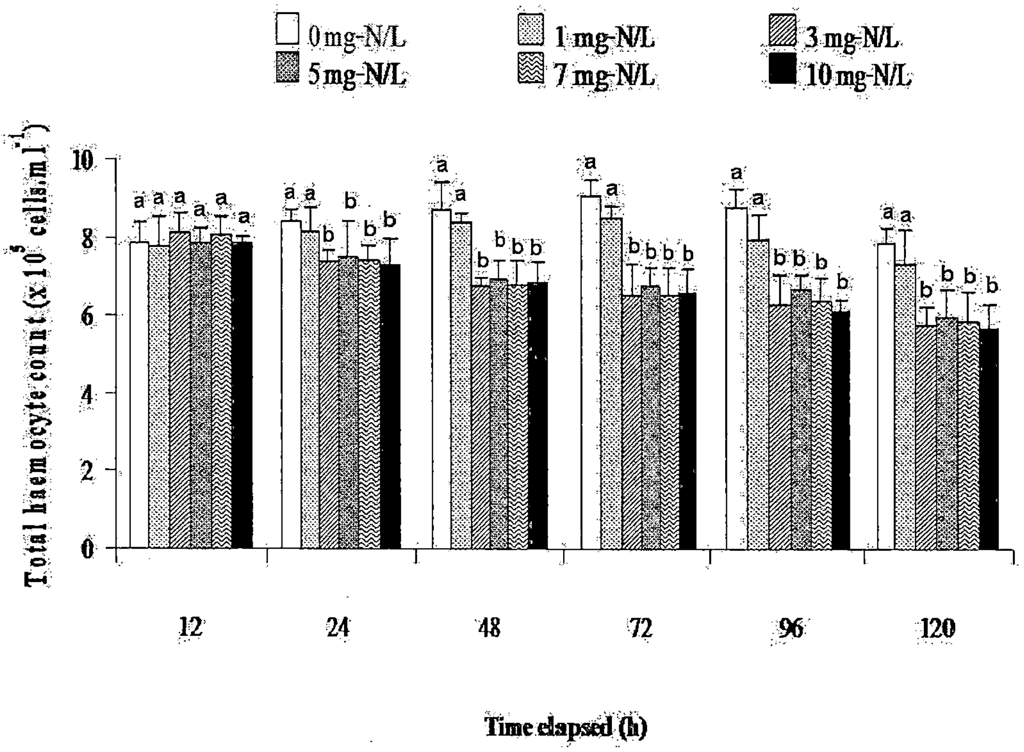
ตารางที่ 4-1 อัตราการเกิดโรคงวงบวมในหอยหวาน ภายหลังการได้รับเชื้อแบคทีเรีย และอยู่ในระดับไนไตร์ทที่แตกต่างกัน

Nitrite conc.	Abnormal of proboscis (animal)								
(mg N/L)	Time elapses (h)								
	1	3	6	12	24	48	72	96	120
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	1	-	-	-	5
5	-	-	-	-	4	6	6	3	4
7	-	-	-	3	4	4	6	5	5
10	-	-	2	3	3	7	9	7	7

- หมายถึง ไม่มีการเกิดโรคงวงบวม (N=40)

2.2 ปริมาณเม็ดเลือดรวมในน้ำเลือดของหอยหวาน

ปริมาณเม็ดเลือดรวมองหอยหวานภายหลังจากการได้รับไนไตร์ทที่ระดับที่แตกต่างกัน พบว่า ในช่วงเวลาที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง แต่เมื่อเวลาที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ชั่วโมง พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานในชุดความเข้มข้น 0 และ 1 mg-N/L สูงกว่าหอยหวานในชุดความเข้นข้น 3, 5, 7 และ 10 mg-N/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) **(ภาพที่ 4-5)**



ภาพที่ 4-5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

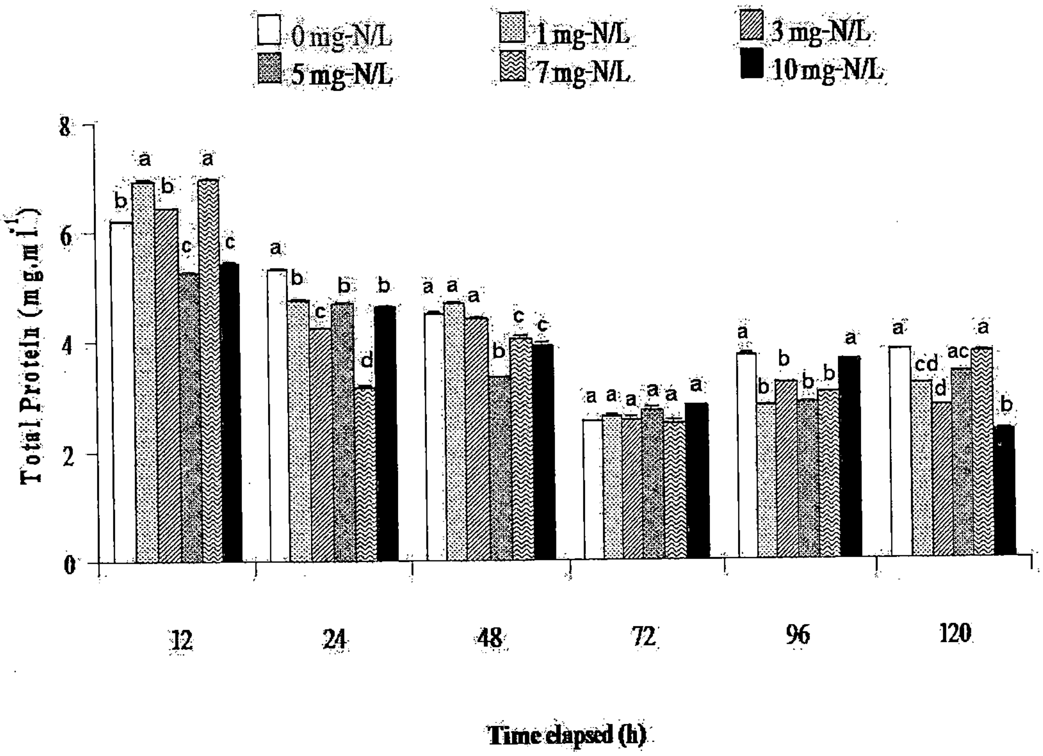
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.3 ปริมาณโปรตีนรวมในเม็ดเลือดของหอยหวาน

ปริมาณโปรตีนรวมในเม็ดเลือดของหอยหวานในพบมากที่สุด เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง ในทุกชุดความเข้มข้นของไนไตร์ท และมีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แต่ในช่วงเวลาที่ 72 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนรวมในทุกชุดความเข้มข้นลดลงมากที่สุด และมีแนวโน้ม เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนรวมของหอยหวานในชุดความเข้มข้นของไนไตร์ท 0 mg-N/L มีค่าสูงกว่าทุกชุดความเข้มข้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับ ในขณะที่ช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง หอยหวานชุดความเข้มข้นที่ 0, 1 และ 3 mg-N/L มีปริมาณโปรตีนรวมมากกว่าชุดความเข้มข้นที่ 5, 7 และ 10 mg-N/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนช่วงเวลาที่ 72 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนรวมของหอยหวานมีปริมาณน้อยที่สุด และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในแต่ละชุดความเข้มข้น ช่วงเวลาที่ 96 ชั่วโมง หอยหวานชุดความเข้มข้น 0 และ 10 mg-N/L

มีปริมาณโปรตีนรวมมากกว่าชุดความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7 mg-N/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และ ช่วงเวลาที่ 120 ชั่วโมง หอยหวานชุดความเข้มข้น 0, 5 และ 7 mg-N/L มีปริมาณโปรตีนรวมมากกว่าชุดความเข้มข้น 3 และ 10 mg-N/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (**ภาพที่ 4-6**)



ภาพที่ 4-6 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

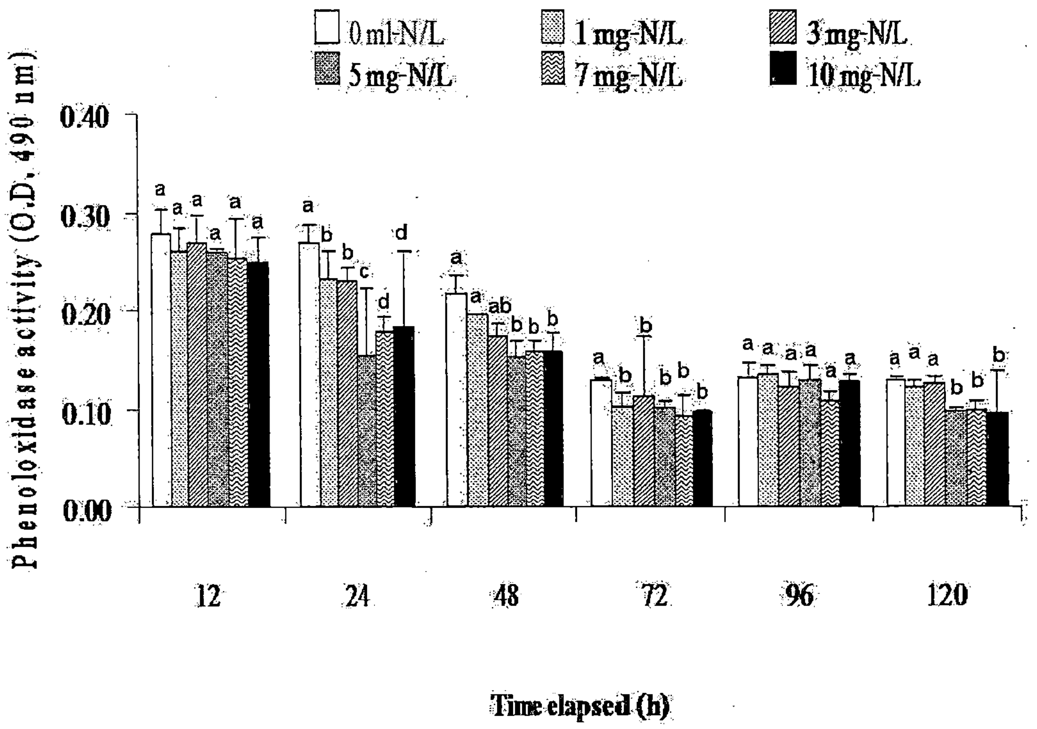
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.4 การเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในเม็ดเลือดของหอยหวาน

ระดับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในหอยหวานชุดความเข้มข้นของไนไตร์ท มีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แต่ในช่วงเวลาที่ 72 ชั่วโมงระดับเอนไซม์นี้ในทุกชุดความเข้มข้นลดลงมากที่สุด และมีแนวโน้มเล็กน้อย เพิ่มขึ้น จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

ที่เวลา 12 ชั่วโมง ระดับกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นมากที่สุดในทุกชุดความเข้มข้น และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง หอยหวานชุดความเข้มข้น 0 mg-N/L มีระดับเอนไซม์มากที่สุด และแตกต่างจากทุกชุดความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p<0.05$) เวลาที่ 24 ชั่วโมง ระดับเอนไซม์ของหอยหวานในชุดความเข้มข้น 0 mg-N/L มีค่าสูงสุด และแตกต่างจากทุกชุดความเข้มข้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในชุดความเข้มข้น 0 และ 1 mg-N/L มีค่าสูงกว่าชุดความเข้มข้น 5, 7 และ 10 mg-N/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับในช่วงเวลาที่ 72 ชั่วโมงระดับกิจกรรมของเอนไซม์นี้ลดลงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกช่วงเวลา แต่อย่างไรก็ตามชุดความเข้มข้นที่ 0 mg-N/L ยังคงมีระดับของเอนไซม์มากที่สุดในช่วงเวลานี้ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดความเข้มข้น สำหรับช่วงเวลาที่ 96 ชั่วโมง ระดับกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากในช่วงเวลาเดิม เพียงเล็กน้อย ซึ่งในช่วงเวลานี้ทุกชุดความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และช่วงเวลาสุดท้าย ที่ 120 ชั่วโมง พบว่าหอยหวานในชุดความเข้มข้น 0, 1 และ 3 mg-N/L มีระดับกิจกรมของเอนไซม์สูงกว่า ชุดความเข้มข้น 5, 7 และ 10 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) **(ภาพที่ 4-7)**



ภาพที่ 4-7 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการได้รับความเข้มข้นของไนไตรท์ในระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

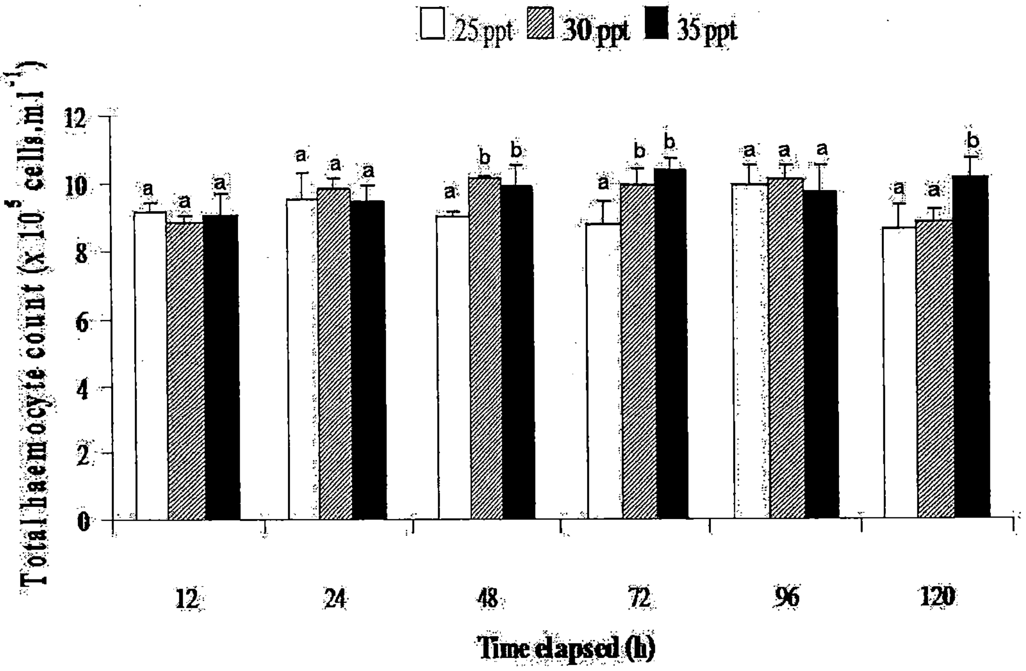
3. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในระดับความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ตามช่วงเวลาต่าง ๆ

3.1 การยอมรับเชื้อแบคทีเรียของหอยหวานภายหลังการอยู่ในระดับความเค็มที่แตกต่างกัน

ไม่พบการเกิดภาวะงวงบวม ของหอยหวานภายหลังการอยู่ในระดับความเค็มที่แตกต่างกัน และสุขภาพโดยรวม ยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ

3.2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ในน้ำเลือดของหอยหวาน

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานที่อยู่ในความเค็มที่แตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง **(ภาพที่ 4-8)**



ภาพที่ 4-8 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

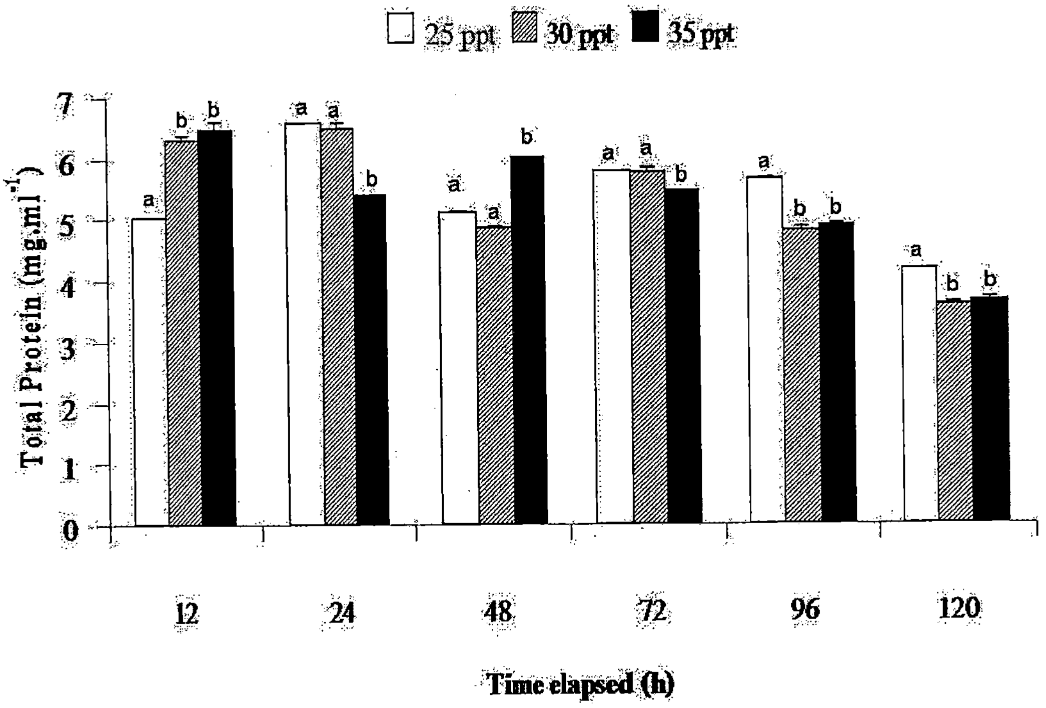
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในช่วงเวลาที่ 12, 24 และ 96 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละระดับของความเค็ม ในขณะที่ชั่วโมงที่ 48 และ 72 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 30 และ 35 พีพีที มีค่าสูงกว่าหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสิติ (p<0.05) และที่ 120 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 35 พีพีที มีค่าสูงที่สุด และมีความแตกต่างกับปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 25 และ 30 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<005)

3.3 ปริมาณโปรตีนรวม ในเม็ดเลือดของหอยหวาน

ปริมาณโปรตีนรวมมีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ในช่วงเวลาที่ 12 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 30 และ 35 พีพีที มีปริมาณโปรตีนรวมใกล้เคียงกัน และสูงกว่าหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 25 และ 30 พีพีที มีปริมาณโปรตีนรวมใกล้เคียงกัน และสูงกว่าหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 35 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) **(ดังภาพที่ 4-9)**

ช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 25 และ 30 พีพีที มีปริมาณโปรตีนรวมใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณโปรตีนรวมน้อยกว่าหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 35 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สำหรับช่วงเวลาที่ 72 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนรวมไม่มีความแตกต่างกัน และช่วงเวลาที่ 96 และ 120 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 30 และ 35 พีพีที มีปริมาณโปรตีนรวมใกล้เคียงกัน และต่ำกว่าหอยหวานที่อยู่ในความเค็ม 25 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

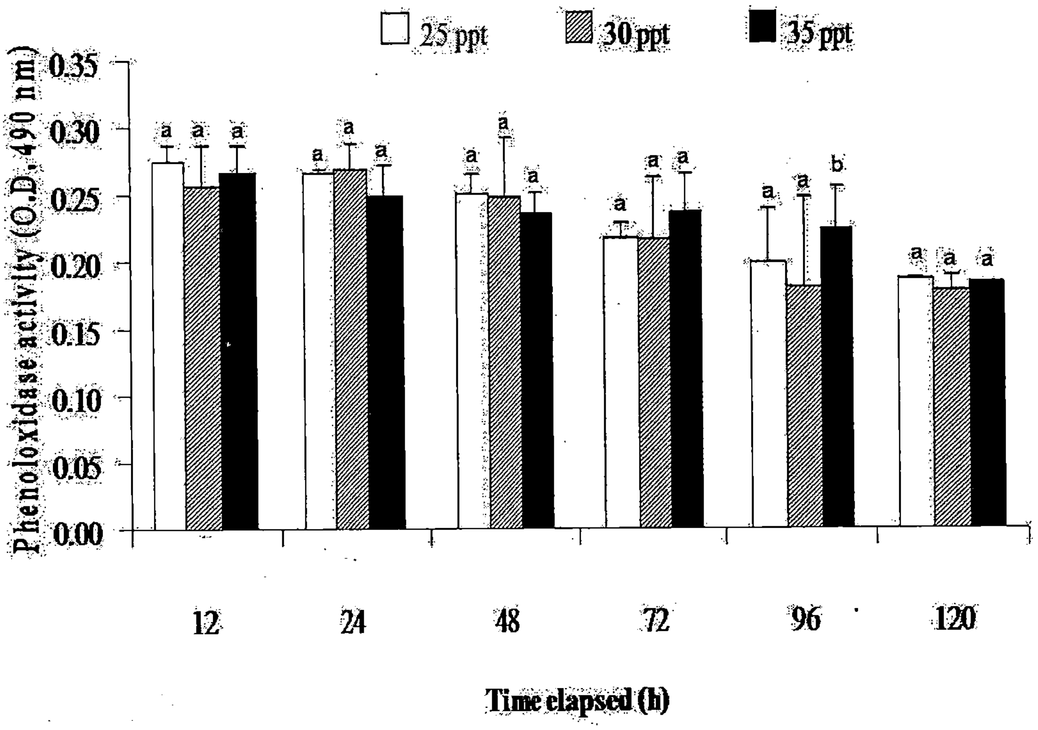


ภาพที่ 4-9 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในเม็ดเลือดของหอยหวาน

การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของหอยหวาน ที่อยู่ในความเค็มแต่ละระดับ มีแนวโน้มลดลงตามช่วงเวลา จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง **(ภาพที่ 4-10)** โดยในช่วงเวลาที่ 12, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของหอยหวาน ที่อยู่ในความเค็มแต่ละระดับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 4-10 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. **ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตามช่วงเวลาต่าง ๆ**

4.1 การยอมรับเชื้อแบคทีเรียของหอยหวานเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ 4-2 พบว่าที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส หอยหวานเป็นโรคงวงบวมมากที่สุดโดยเริ่มพบที่ 48 ชั่วโมง (10 ตัว) และในชั่วโมงที่ 72 หอยหวานเป็นโรคงวงบวม 27 ตัว ในขณะที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เกิดโรคงวงบวมในหอยหวานเพียงเล็กน้อย (3 ตัว) ที่ 120 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบหอยหวานที่เป็นโรคงวงบวม

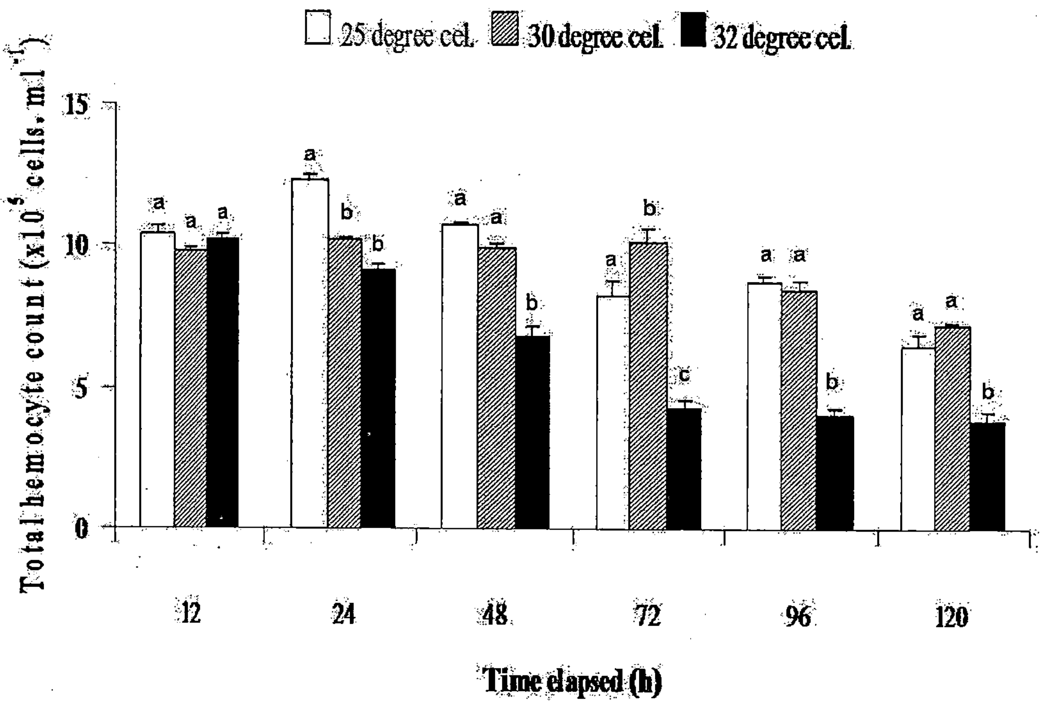
ตารางที่ 4-2 อัตราการเกิดโรคงวงบวมในหอยหวาน ภายหลังการได้รับเชื้อแบคทีเรีย และอยู่ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

Temperature (°C)	Abnormal of proboscis (animal) (N=40)								
	Time elapses (h)								
	1	3	6	12	24	48	72	96	120
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	3
32	-	-	-	-	-	10	27	-	-

- หมายถึง ไม่มีการเกิดโรคงวงบวม

4.2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ในน้ำเลือดของหอยหวาน

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่ใกล้เคียงกัน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง **(ภาพที่ 4-11)**



ภาพที่ 4-11 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในอุณหภูมิระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

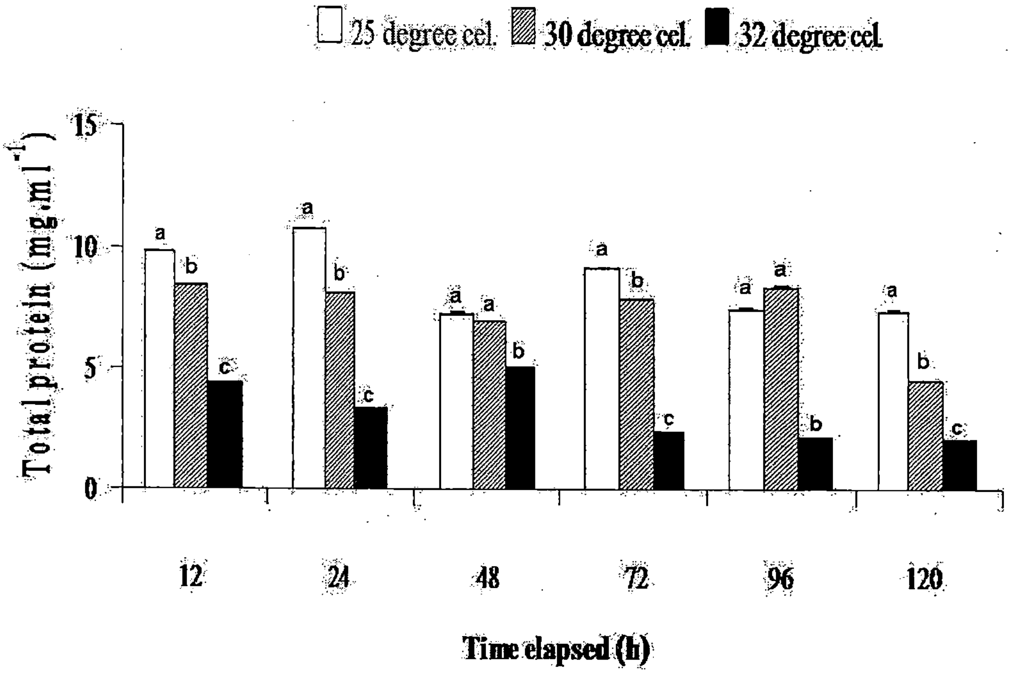
ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ช่วงเวลาที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างกันในในแต่ละชุดการทดลอง แต่เมื่อเวลาผ่านไปที่ 24 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด และแตกต่างจากอุณหภูมิ 30 และ 32 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ในขณะที่ช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าสูงกว่าหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ส่วนช่วงเวลาที่ 72 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หอยหวานมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และกลุ่มหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีปริมาณเม็ดเลือดรวมน้อยที่สุด และในช่วงเวลาที่ 96 และ 120 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่าหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.3 ปริมาณโปรตีนรวมในเม็ดเลือดของหอยหวาน

ปริมาณโปรตีนรวมในเลือดของหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มไม่แตกต่างกันมากนัก ในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง ในขณะที่ อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส สามารถส่งผลให้โปรตีนรวมในเลือดของหอยหวานมีค่าน้อย ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง **(ภาพที่ 4-12)**

ในช่วงเวลาที่ 12 และ 24 ชั่วโมง หอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณโปรตีนรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ 30 และ 32 องศาเซลเซียส และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ต่อมาในช่วงเวลาที่ 48 และ 96 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนรวมของหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าสูงกว่าหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และในช่วงเวลาที่ 72 และ 120 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนรวมของหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

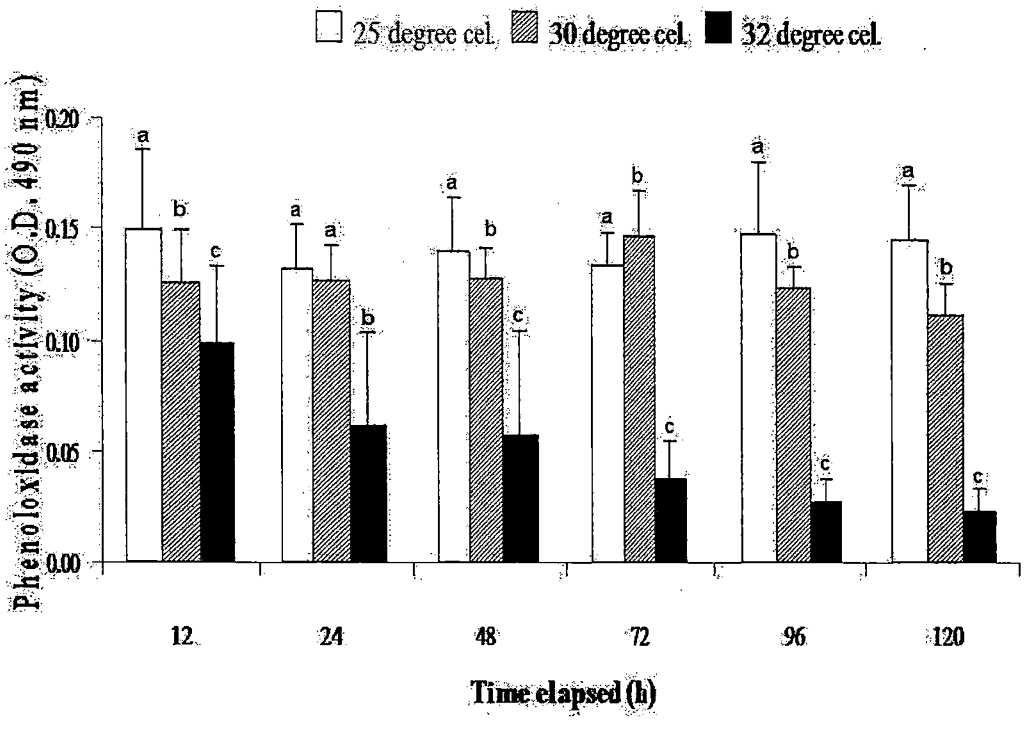


ภาพที่ 4-12 ปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในอุณหภูมิระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.4 การเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของหอยหวาน

การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของหอยหวานที่อยู่ในอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ในแต่ละช่วงเวลา มีแนวโน้มไม่แตกต่างกันมากนัก ตลอดช่วงเวลาของการทดลองในขณะที่ อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส สามารถส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดของหอยหวาน มีค่าลดลงไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง **(ภาพที่ 4-13)**



ภาพที่ 4-13 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ในเม็ดเลือดของหอยหวาน ภายหลังการอยู่ในอุณหภูมิระดับที่แตกต่างกัน ที่เวลา 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของหอยหวานในแต่ละช่วงเวลา พบว่า การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ในหอยหวาน เกิดขึ้นมากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 30 และ 32 ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

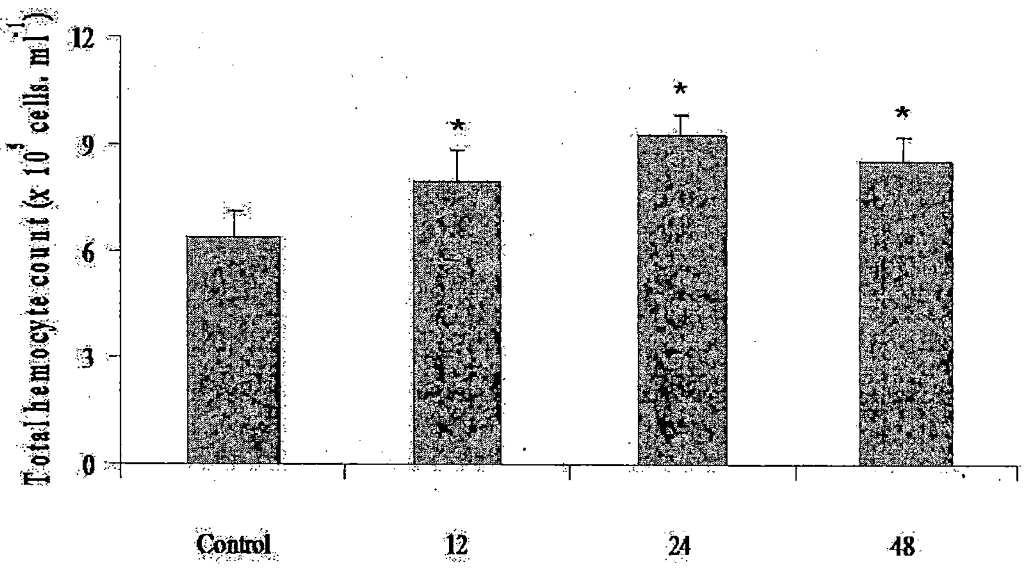
ผลการทดลองที่ 3: การประยุกต์ใช้เบต้ากลูแคน กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหอยหวาน

(Application of beta-glucans as immunostimulant in *Babylonia areolata*)

การประยุกต์ใช้เบต้า-กลูแคน ในหอยหวาน โดยการแช่หอยหวานที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อให้รู้ว่าช่วงเวลาใด ที่เบต้า-กลูแคนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด ซึ่งจากการทดลองได้ผลดังต่อไปนี้

1. ปริมาณเม็ดเลือดรวม ในน้ำเลือดของหอยหวาน

จากการทดลองพบว่า หอยหวานที่แช่เบต้า-กลูแคนที่ เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณเม็ดเลือดรวม แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้แช่เบต้า-กลูแคน (ควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และที่เวลา 24 ชั่วโมง เบต้า-กลูแคน สามารถกระตุ้นให้หอยหวานมีการผลิตเม็ดเลือดรวมออกมามากที่สุด **ดังภาพที่ 4-14**

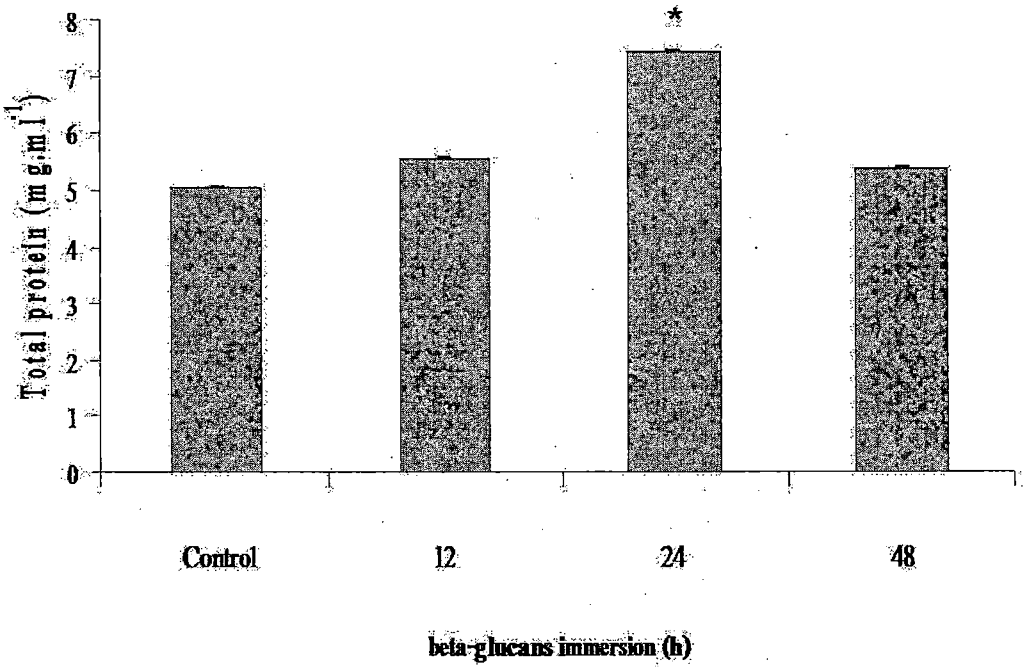


ภาพที่ 4-14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) ของหอยหวาน ภายหลังการแช่ด้วยเบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

เครื่องหมาย * หมายถึงมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ปริมาณโปรตีนรวม ในน้ำเลือดของหอยหวาน

จากการทดลองพบว่า หอยหวานที่แช่ เบต้า-กลูแคนที่ เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้แช่เบต้า-กลูแคน (ควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) **ดังภาพที่ 4-15**

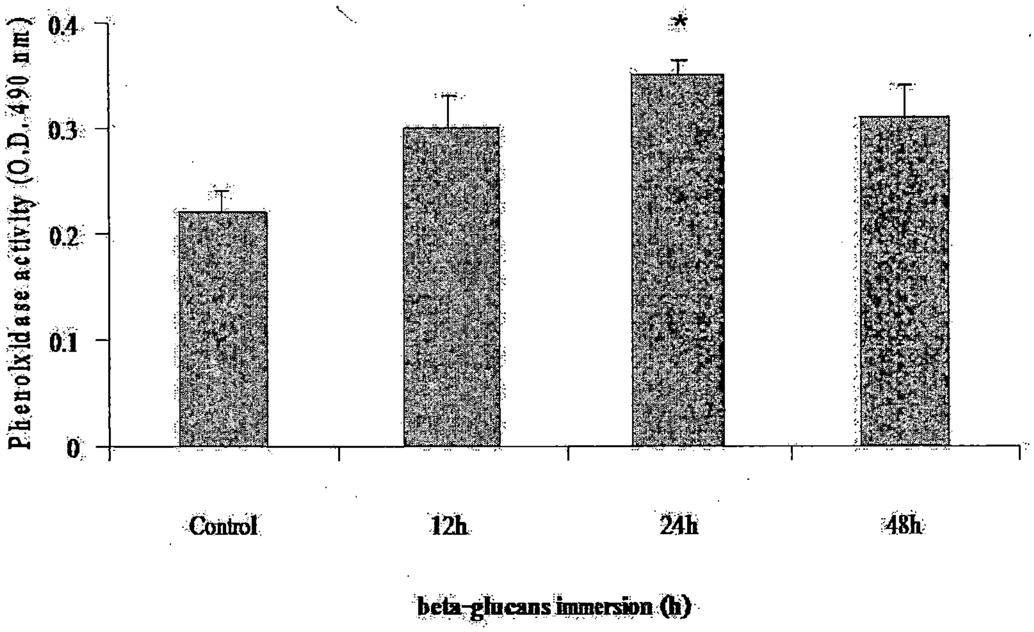


ภาพที่ 4-15 ปริมาณเม็ดโปรตีนรวม (Total protein) ในน้ำเลือดของหอยหวาน ภายหลังการแช่ด้วยเบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

เครื่องหมาย * หมายถึงมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดของหอยหวาน

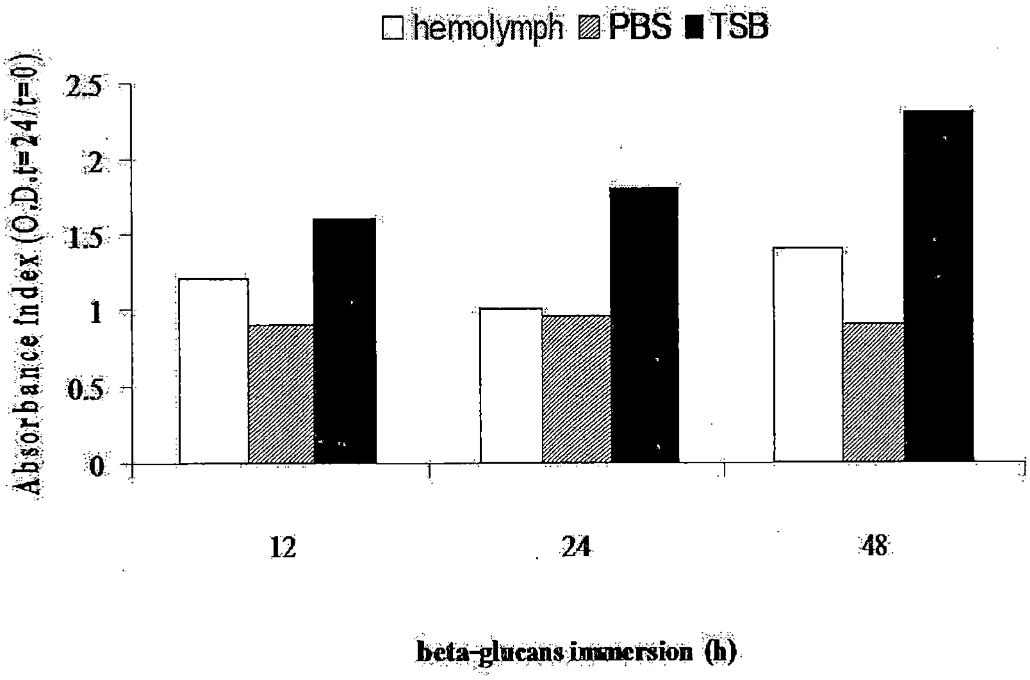
จากการทดลองพบว่า หอยหวานที่แช่เบต้า-กลูแคนที่ เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุด และแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้แช่เบต้า-กลูแคน (ควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) **ดังภาพที่ 4-16**



ภาพที่ 4-16 การเปลี่ยนแปลงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ของหอยหวาน ภายหลังการแช่ด้วย เบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

4. การศึกษากิจกรรมการต่อต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ในน้ำเลือด (hemolymph) ของหอยหวาน

จากการทดลองพบว่า เลือดของหอยหวานที่ได้รับกลูแคนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* โดยหอยหวานที่แช่ที่ 24 ชั่วโมง มีแนวโน้มยับยั้งได้ดีที่สุด ดัง**ภาพที่ 4-17**



ภาพที่ 4-17 กิจกรรมการต่อต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ในน้ำเลือด (hemolymph) ของหอยหวานภายหลังการแช่ด้วยเบตา-กลูแคนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1: การศึกษาลักษณะเม็ดเลือดของหอยหวาน

หอยหวานเป็นสัตว์เศรษฐกิจตัวหนึ่งของประเทศไทย ที่ยังคงมีความจำเป็นในการพัฒนาการเลี้ยง การศึกษาถึงการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกัน ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในหอยชนิดนี้ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้น เกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาชนิดของเม็ดเลือด เป็นอันดับแรก การศึกษาการป้องกันตัวเองของหอยในปัจจุบันนี้ มักมุ่งเน้นไปที่ บทบาทและหน้าที่ของเม็ดเลือดหอย (hemocytes) เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (Cellular immune response) และนำไปสู่ความเข้าใจในการศึกษาถึงภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (Humoral immune response) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดหอยหวานในครั้งนี้ได้ แสดงให้เห็นถึงการปรากฏของเม็ดเลือด 2 แบบ คือ ไฮยาลิโนไซต์เซลล์ (hyalinocyte cells) และแกรนูลโลไซต์เซลล์ (granulocyte cells) โดยพบเซลล์เม็ดเลือดชนิด แกรนูโลไซต์ (granulocyte hemocytes) เป็นองค์ประกอบหลักใน ฮีโมลิมป์ (hemolymph) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเม็ดเลือดของหอยแมลงภู่ (*Mytilus* sp.) แสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้ น่าจะมีหน้าที่หลัก ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในหอยหวาน

เม็ดเลือดหอยแต่ละแบบมีหน้าที่แตกต่างกันออกไป Cheng (1981) ได้รายงานไว้ว่า เม็ดเลือดชนิดแกรนูลโลไซต์ (granulocyte) มีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ เพราะมีแกรนูล เมื่อเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้แตก แกรนูลจะสามารถหลั่งออกมา และเอนไซม์ที่อยู่ในแกรนูลจะเข้าล้อมรอบ ทำลาย และขับสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ออกไปจากตัวของหอย จากการศึกษาในครั้งนี้ พบเซลล์แกรนูลโลไซต์มากกว่า ไฮยาลิโนไซต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ที่มีบทบาทอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันของหอยหวาน คือ เซลล์แกรนูลโลไซต์ มีการศึกษาในหอยชนิดต่าง พบว่าแกรนูลที่อยู่ในเม็ดเลือดจะถูกบรรจุไปด้วยเอนไซม์ โปรตีนต่าง ๆ และ degrading factors อื่น ๆ ๆ (Pipe, 1990; Cajaraville et al., 1995; Carballal et al., 1997; Pipe et a., 1997) Serrano et al (2002) ได้ศึกษาลักษณะของเม็ดเลือดหอย *Biomphalaria glabrata* ซึ่งพบว่าในฮีโมลิมป์ ประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดหลัก ๆ 2 กลุ่ม คือ ไฮยาลิโนไซต์ และแกรนูโลไซต์ ซึ่งแกรนูลโลไซต์จะมีซูโดโพเดีย (pseudopodia) ยื่นออกมาคล้าย ๆ กับเซลล์ประสาท และทำหน้าที่ในการฟาโกไซโตซีส และเอนแคปซูเลชั่น พาราไซต์ นอกจากนี้ Pan (1996) ได้เสนอไว้ว่าเม็ดเลือดของ *B. glabrata* ชนิดไฮยาลิ

โนไซต์สามารถกลายเป็นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลโลไซต์ได้ โดยเมื่อหอยได้รับสิ่งแปลกปลอมจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับขั้นตอน ของเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในกระแสเลือด โดยเริ่มจากไฮยาลิโนไซต์กลายเป็นแกรนูลโลไซต์เซลล์ และเซลล์แตก เพื่อให้สารต่าง ๆ ในแกรนูลหลั่งออกมาเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม ดังนั้น จึงพบปริมาณเม็ดเลือดชนิดแกรนูโลไซต์มากกว่าไฮยาลิโนไซต์

อย่างไรก็ตาม การศึกษาเม็ดเลือดของหอยหวานในครั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาถึง sub-type population ของเม็ดเลือด ซึ่งต้องมีการศึกษากันต่อไป

ผลการทดลองที่ 2: ผลของคุณภาพน้ำบางประการ ต่อการการเปลี่ยนแปลงระดับภูมิคุ้มกัน และการยอมรับเชื้อวิบริโอของหอยหวาน

1. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับแอมโมเนีย ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตามช่วงเวลาต่าง ๆ

การยอมรับเชื้อของกุ้งน้ำจืด *Macrobranchium rosenbergii* ที่ได้รับเชื้อ *Enterococcus* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อกุ้งอยู่ในแอมโมเนียที่ (ambient ammonia-N) 1.01 mg-N/L และมากกว่า (Cheng and Chen, 2002) และจากการศึกษาในหอยเป๋าฮื้อ Taiwan abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* พบว่าการยอมรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของหอยแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้น (Cheng et al., 2004) จากการทดลองในครั้งนี้ ไม่พบการตายของหอยหวาน แต่จากการสังเกตสุขภาพ พบว่าหอยหวานที่ได้รับแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 3, 5, 7 และ 10 mg-N/L ในช่วงชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป หอยหวานเริ่มขับเมือกออกมามาก เท้าเปลี่ยนจากสีครีมเป็นสีเทา ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยของแอมโมเนียในน้ำเลี้ยง ก็สามารถเป็น สาเหตุหนึ่ง ที่นำไปสู่การลดความต้านทานทางภูมิคุ้มกัน ของหอยหวาน ในการต่อต้านเชื้อก่อโรคได้

จากการศึกษาผลของแอมโมเนียที่มีต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมของหอยเป๋าฮื้อ Taiwan abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งการทดลองในครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ 0 mg-N/L และ 1.0 mg-N/L ยังไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมในทุกช่วงเวลา ในขณะที่หอยหวานที่ได้รับแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 3, 5, 7 และ 10 mg-N/L ปริมาณเม็ดเลือดรวมมีแนวโน้มลดลง ตามช่วงเวลา การระบบการเลี้ยงหอยหวานเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งปิด กึ่งเปิด (Semi-circular system) ซึ่งในบางครั้งอาจจะมีการสะสมแอมโมเนียในระดับที่สูง เนื่องมาจากการย่อยสลายของสารออร์แกนิกต่าง ๆ เช่น อาหาร สิ่งขับถ่าย และการหลั่งแอมโมเนียของหอยเอง ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นนี้ เคยมีรายงานว่าสามารถเพิ่มการบริโภคของออกซิเจนของหอย *Haliotis laevigata* (Harris et al., 1998) และ

ลดอัตราการกินอาหาร และอัตราการเจริญเติบโตของหอย *Haliotis discus hannai* และ *H. laevigata* (Harris et al., 1998; Sano & Maniwa, 1962) นอกจากนี้ ผลของแอมโมเนียยังมีรายงานว่ามีผลต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งฟ้า *Litopenaeus stylirostris* (Le Moullac & Haffner, 2000) กุ้งขาว (*L. vannamei*) (Liu & Chen, 2004) และ กุ้งแม่น้ำ (*Macrobrachium rosenbergii*) (Cheng & Chen, 2002) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในหอยฝาเดียว ยังมีรายงานอยู่น้อยมาก ซึ่งอาจเกิดจากหอยสองฝา และกุ้ง มีคุณค่าทางเศรษฐกิจแพร่หลายมากกว่า

ความเข้มข้นของแอมโมเนียส่งผลให้ปริมาณโปรตีนรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลง เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ เกิดความแปรปรวนสูงมาก เพราะการตอบสนองของหอยหวานเห็นชัดในช่วงเวลาที่ 12 และ 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยพบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ 0 mg-N/L และ 1.0 mg-N/L ยังไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนรวม แต่ในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่าในทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียส่งผลให้ ปริมาณโปรตีนรวมลดลง อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นของแอมโมเนีย ซึ่งจากการทดลองในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 36,% 37% และ 47% หลังจากการได้รับแอมโมเนียที่ระดับ 0.55, 1.68, และ 3.18 mg-N/L (Cheng and Chen, 2004) และการทดลองในหอยเป๋าฮื้อ *H. diversicolor supertexta* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เมื่อได้รับแอมโมเนียที่ระดับ 1.08, 5.37, และ 10.34 mg-N/L หลังจากเวลาที่ 24 และ 72 ชั่วโมง (Cheng et al., 2004)

การทดลองในครั้งนี้พบความสอดคล้องกันระหว่าง ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนรวม และระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส แต่ไม่ชัดเจน ซึ่งการทดลองของ Cheng et al. (2004) พบว่าระดับกิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของหอย *H. diversicolor supertexta* มีความสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดรวมอย่างชัดเจน กล่าวคือปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง จะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ Le Moullac and Haffner (2000) ได้รายงานไว้ว่าการลอกรหัสของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลง 60% และ 50% เมื่อกุ้ง *L. stylirostris* ได้รับแอมโมเนียที่ระดับ 1.5 และ 3.0 mg-N/L ตามลำดับ และสัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดรวมที่ลดลงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกัน

2. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับไนไตรท์ ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตามช่วงเวลาต่าง ๆ

ความสามารถในการยอมรับเชื้อของหอยหวาน ภายหลังการได้รับระดับไนไตรท์ที่แตกต่างกัน พบว่าไนไตรต์เข้มข้น 3 mg -N/L และมากกว่า สามารถส่งเสริมให้หอยหวานยอมรับเชื้อ

แบคทีเรีย และเป็นโรคงวงบวมเพิ่มมากขึ้น และการทดลองของ Basuyaux and Mathieu (1999) ซึ่งทำการศึกษาผลของอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis tuberculata*) โดยใช้ไนไตรต์เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 mg NO_2-N/L และพบว่าไนไตรต์ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อ และมีระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยอยู่ที่ความเข้มข้นมากกว่า 5.0 mg -N/L จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนรวม และระดับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลง เมื่อปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนรวมและกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ยังให้ผลที่ไม่ชัดเจนนัก ในการทดลองในครั้งนี้

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกัน 3 ชนิดในกุ้งกุลาดำ คือ เอนไซม์ไลโซไซม์ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และ เลคติน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม ชุดที่ 2 เป็นชุดที่เติมไนไตรต์ 10 พีพีเอ็ม และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7, 14 และ 21 ผลการทดลองพบว่า กุ้ง มีเอนไซม์ไลโซไซม์ สูงสุดในวันที่ 0 และมีแนวโน้มลดต่ำลงในวันที่ 14 ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0035 ± 0.0010 และ 0.0032 ± 0.0012 หน่วยต่อนาที และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p> 0.05) ส่วนปริมาณ เลคติน มีค่าสูงสุดในวันที่ 7 และลดลงต่ำสุดในวันที่ 14 (ทศพร เสียงแจ้ว, 2546)

การศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ไนไตรท์ มีผลต่อความเครียดของหอยหวาน และสามารถชักนำให้หอยหวานเป็นโรคงวงบวมได้ เมื่ออยู่ในน้ำเลี้ยงที่มีปริมาณไนไตรท์สูง ๆ และ ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดรวมอย่างชัดเจน เมื่อไนไตรท์ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในน้ำเลี้ยง แต่ปริมาณโปรตีนรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ยังมีผลที่ไม่ชัดเจนมากนัก

3. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในระดับความเค็มระดับที่แตกต่างกัน ตามช่วงเวลาต่าง ๆ

การเปลี่ยนแปลงความเค็มมีผลต่อการยอมรับเชื้อของสัตว์น้ำ จากการศึกษาในกุ้ง ขาว *L. vannamei* พบว่า ที่ความเค็ม 5 และ 15 พีพีที สามารถยอมรับเชื้อได้มากกว่ากุ้งที่อยู่ในความเค็ม 35 พีพีที (Wang and Chen, 2005) และการศึกษาในหอยเป๋าฮื้อ โดย Chen (1984) ที่ได้เสนอไว้ว่า ช่วงความเค็มที่ 30-35 พีพีที มีความเหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงหอยชนิดนี้ ซึ่งการทดลองในครั้งนี้พบว่าความเค็มทั้งสามระดับ ที่ใช้ในการทดลอง ไม่สามารถชักนำให้เกิดโรคงวงบวมได้ อีกทั้ง สุขภาพของหอยหวาน โดยรวม อยู่ในสภาวะปกติ

ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนรวม และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ของหอยหวาน อยู่ในระดับที่ปกติ และไม่แตกต่างกัน เมื่ออยู่ในความเค็มทั้งสามระดับ แต่จากการทดลองในหอยเป๋าฮื้อ พบว่าที่ความเค็ม 35 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้มีกิจกรรมการตอบสนองทาง

ภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นมากกว่าหอยกลุ่มที่เลี้ยงในความเค็มต่ำ (Cheng et al., 2004) รวมทั้งจากการทดลองในกุ้ง *Farfantepenaeus paulensis* ที่พบว่า ความเค็มที่ 35 พีพีที มีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลลอออกซิเดส เพิ่มสูงขึ้นกว่ากุ้งในกลุ่มที่อยู่ในความเค็ม 20 พีพีที (Le Moullac and Haffner, 2000) และจากการทดลองในกุ้งก้ามกราม M. rosenbergii พบว่าที่ความเค็ม 15 พีพีที สามารถชักนำให้พารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกันเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น มากกว่าการเลี้ยงกุ้งในน้ำจืด (Cheng and Chen, 2000) และจากการทดลองของ Wang and Cheng (2005) พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในความเค็ม 35 พีพีที จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากที่สุด

จากการทดลองการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหอยหวาน เมื่ออยู่ในระดับความเค็มที่แตกต่างกันในครั้งนี้ พบว่า แทบจะไม่มีความแตกต่างกันในทั้งสามระดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหอยหวานสามารถทนความเค็มได้ในช่วงกว้าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเค็มของน้ำอาจไม่ได้มีผลมากนักต่อสุขภาพของหอยชนิดนี้ อย่างไรก็ตามอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกครั้ง

4. ผลการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตามช่วงเวลาต่าง ๆ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลให้เกิดการเพิ่มความสามารถในการยอมรับเชื้อ *Lactococcus garvieae* ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ซึ่งกุ้งชนิดนี้จะไวต่อการติดเชื้อเมื่ออยู่ในอุณหภูมิน้ำที่ 33 องศาเซลเซียส มากกว่า 27 และ 30 องศาเซลเซียส (Cheng and Chen, 1998) และการศึกษาในหอยเป๋าฮื้อ *H. diversicolor supertexta* สามารถยอมรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ง่าย เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 32 องศา มากกว่า 12 ชั่วโมง (Cheng et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่าอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส หลังจาก 48 ชั่วโมง ส่งผลให้หอยหวานรับเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยเป็นโรคงวงบวมมากที่สุด

การศึกษาการยอมรับเชื้อในครั้งนี้ พบว่าอุณหภูมิมีผลทำให้เกิดโรคงวงบวมในหอยหวานมากที่สุด ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย สามารถก่อให้เกิดความเครียด และส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของหอยได้โดยตรงเช่นกัน เนื่องจากอุณหภูมิสูงในระดับนี้ เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี และ ผลิตสารพิษออกมาได้มากกว่าปกติ

การทดลองครั้งนี้ พบว่าหอยหวานที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ลดลงตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng et al. (2004) ที่พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของหอย *H. diversicolor supertexta* ลดลง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการศึกษาในหอยจะตรงกันข้ามกับในกุ้ง ที่พบว่า อุณหภูมิต่ำ

ประมาณ 18 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้กุ้งมีความเครียดมากกว่าอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และส่งผลให้มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสต่ำกว่าปกติ (Le Moullac and Haffner, 2000) หรือจากการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมในปู *Carcinus maenas* ก็พบผลที่สอดคล้องกับในกุ้ง (Truscott and White, 1990) แต่อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงไป มีผลต่อความเครียดของสัตว์น้ำ ทุกชนิด และส่งผลในระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่ง ควร ศึกษาในสัตว์น้ำแต่ละชนิด เพราะสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีความไวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนไป แตกต่างกัน เพื่อจะได้มีการออกแบบอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงให้มากที่สุด ส่งผลให้สัตว์น้ำ สามารถรักษาสมดุลทางด้านภูมิคุ้มกันให้อยู่ในระดับปกติ

ผลการทดลองที่ 3: การประยุกต์ใช้เบต้ากลูแคน กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหอยหวาน

จากการทดลองใช้เบต้ากลูแคนในหอยแมลงภู่ Mediteranean mussle (*Mytilus galloprovincialis*) พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหอย เพิ่มมากขึ้น โดยการใช้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 0.5 mg/ml จะช่วยเพิ่มการผลิต nitric oxide ในเม็ดเลือด และน้ำเลือด ของหอย และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (Costa et al., 2008) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าภายหลังจากการแช่ด้วยเบต้า-กลูแคนที่ 24 ชั่วโมง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการต้านเชื้อแบคทีเรีย เกิดขึ้นมากที่สุด ซึ่งจากการทดลองนี้ อาจสามารถแนะนำให้มีการแช่หอยหวานด้วยเบต้า-กลูแคน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำหอยหวานไปเลี้ยงในสภาวะปกติ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่ได้ติดตามว่า ระดับการตองสนองทางภูมิคุ้มกันของหอยหวานจะอยู่ในระบบเลือดได้นาน เท่าใด จึงจะมีการแช่ด้วยเบต้า-กลูแคนอีกครั้ง ซึ่งจะได้มีการศึกษากันต่อไป

มีการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เบต้า-กลูแคน ในกุ้งขาว โดย ฉัทชนัน ศิริไพศาล และคณะ (2548) เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของเบต้ากลูแคนที่ใช้ผสมอาหาร เพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยประเมินจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ total haemocyte count, phenoloxidase, bactericidal activity และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่า เบต้ากลูแคนที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผล ในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ดี และการทดลองเพื่อศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยประเมินจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และให้อาหารสำเร็จรูปปกติเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมนาน 4 สัปดาห์ ซึ่งในช่วงนี้กุ้งขาวยังคงมีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อให้เบต้ากลูแคนอีกครั้งพบว่ากุ้งขาวมีระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ดังนั้นการให้กุ้งขาวได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1

กิโลกรัม เป็นเวลา 1 เดือน หยุดให้ 1 เดือน จากนั้นจึงให้อีกครั้งที่ความเข้มข้นและระยะเวลาเท่าเดิม จะมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวให้สูงขึ้นในช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดหอยหวานในครั้งนี้ได้ แสดงให้เห็นถึงการปรากฏของเม็ดเลือด 2 แบบ คือ ไฮยาลิโนไซต์เซลล์ (hyalinocyte cells) และแกรนูลโลไซต์เซลล์ (granulocyte cells) โดยพบเซลล์เม็ดเลือดชนิด แกรนูโลไซต์ มีปริมาณมากกว่า ไฮยาลิโนไซต์เซลล์

2. ปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อสุขภาพของหอย ซึ่งอาจส่งผลต่อการยอมรับเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น และแอมโมเนียมีผลกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหอยหวาน โดยระดับแอมโมเนียที่มีในน้ำเลี้ยงไม่ควรเกิน 3 mg-N/L (สูงสุด) และไม่เกิน 24 ชั่วโมง

3. ปริมาณไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อสุขภาพของหอย ซึ่งอาจส่งผลต่อการยอมรับเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น และไนไตรท์มีผลกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหอยหวาน โดยระดับไนไตรท์ที่มีในน้ำเลี้ยงไม่ควรเกิน 3 mg-N/L

4. จากการทดลองครั้งนี้ ความเค็มทั้งสามระดับที่ทดลอง ไม่มีผลต่อการส่งเสริมการยอมรับเชื้อแบคทีเรีย ในหอยหวาน และความเค็มสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหอยได้ แต่ไม่ชัดเจน

5. อุณหภูมิน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้หอยหวานยอมรับเชื้อแบคทีเรียและเกิดโรคงวงบวมมากที่สุด รวมทั้งส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณโปรตีนรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงด้วยเช่นกัน

6. เบต้า-กลูแคนที่ระดับ 0.5 mg/ml สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหอยหวานได้ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียจะเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อแช่หอยหวาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงที่ภาวะปกติ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหอยหวาน ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป มีความแปรปรวนสูงมาก ซึ่งจะดีที่สุด เมื่อมีการทดลองซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันผล และ เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ตรงกับการตอบสนองทางสรีรวิทยาในช่วงเวลานั้น ๆ ของหอยหวานมากที่สุด รวมทั้งควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับการใช้เบต้า-กลูแคนในหอยหวาน เพื่อขยายผลการใช้ประโยชน์ในวงกว้างต่อไป

บรรณานุกรม

จรัญ วงษ์วิวัฒนาวุฒิ, วัลลภ ทิมดี และ สมพิศ พรรณนา. (2547). *ชีววิทยาบางประการและหอยหวาน*. (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://www.nicaonline.com/articles3/site/view_article.asp?idarticle=123 (วันที่ค้นข้อมูล : 5 มีนาคม 2550).

ฉัทชนัน ศิริไพศาล นนทวิทย์ อารีย์ชน เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ และนิติ ชูเชิด, 2548. การใช้เบต้า-กลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei Boone*). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาประมง, หน้า 279-290.

ทศพร เสียงแจ้ว (2546). *ผลของไนไตรต์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน และ คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง*. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

Anderson, R.S. (1995). Defense responses of haemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *J Invertebrates Pathol 66*, 82-89.

Armstrong, D.A., Amstrong, J.L., Krassner, S.M. and Pauley, G.B. (1971). Experimental wound repair in the black abalone, *Haliotis cracherodii. J Invertebr Pathol 17*, 216-227.

Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., and Davison, A. J. (2001). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J Gen Virol 82*, 865-70.

Auffret, M. (1988). Bivalve hemocyte morphology. *In American Fisheries Society Special Publication 18*, 169–177.

Basuyaux, O. and Mathieu, M. (1999). Inorganic nitrogen and its effect on growth of abalone *Haliotis tuberculata* Linnaeus and the sea urchin *Pracentrotus lividus* Lamarck. *Aquacul174*, 95-107.

Bayne, C. J. (1990). Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience 40*, 723-731.

Bricknell, I., and Damo, R.A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol 19,* 457-472.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., and Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech 57*, 469-76.

Chen, J.C. and Kou, Y.Z. (1992). Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquacul 104*, 249–60.

Cheng, T. C. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Am N J Acad Sci 266*, 343–379.

Cheng, T.C. (1981). Bivalves. In Invertebrate Blood Cells (Ratcliffe, N.A. and Rowley, A.F., eds.). Acad. Press, London, pp. 233-300.

Cheng, T.C. (1984). A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. In: Cheng TC (ed) Comparative pathobiologyV, ol 6. Invertebrate blood cells and serum factors. Plenum, New York, p 111-146.

Cheng, T. C., and Foley, D. A. (1975). Hemolymph cells of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria:* An electron microscopical study. *J. Invertebr. Pathol.* ***26***, 341–351.

Cheng, W. and Chen, J.C. (2002). Effects of environmental factors on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and other decapod crustaceans. *J Fisheries Society of Taiwan 29*, 1–19.

Cheng, W. and Wang, C. H. (2001). The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* and its resistance under copper sulfate. *Dis Aquat Org 47*, 137–144.

Cheng, W., Hsiao, I.S. and Chen, J.C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaem*olyticus. *Fish and shellfish immunol 17*, 193-202.

Cheng, W., Hsiao, I.S., Shu, C.H. and Chen, J.C. (2004). Chang in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaem*olyticus. *Fish and shellfish immunol 17*, 235-243.

Cheng, W., Juang, F.M. and Chen, J.C. (2004). The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaem*olyticus at different salinity levels. *Fish and shellfish immunol 16*, 295-306.

Cheng, W.,Wang, L.U. and Chen, J.C. (2005). Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquacul 250*, 592-601.

Chu, F.-L.E. (1988). Humoral defense factors in marine bivalves. In W. S. Fisher (ed.), Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. American Fish Society Special publication 18, Bethesda, Maryland, 178-188.

Costa, M.M., Novoa, B. and Figueras, A. (2008). Influence of beta-glucans on immune response of carpet shell clam (*Ruditapes decussates*) and Mediteranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish and shellfish immunol 24*, 498-505.

Couso, N., Castro, R., Magarinos, B., Obach, A. and Lamas, J. (2003). Effect of oral administration of glucan on the resistance of gilthead seabream pasteurellosis. *Aquacul. 219*, 99-109.

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

Fabrick, J.A., Baker, J.E., and Kanost, M.R. (2004). Innate immunity in a pyralid moth: functional evaluation of domains from a beta-1,3-glucan recognition protein. *J Biol Chem 279*, 26605- 26611.

Feng, S. Y. (1988). Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am Fish Soc Spec Publ 18*, 153–168.

Fisher, W.S. (1986). Structures and functions of oyster hemocytes. In Immunity in Invertebrates (Brehelin, M., ed.). Springer, Berlin Heidelberg, pp. 25-35.

Harris, J. O., Maguire, G.B., Edwards, S. and Hindrum, S.M. (1998). Effect of ammonia on the growth rate and oxygen consumption of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. *Aquacul 160*, 259-272.

Hine, P. M. (1994). Interaction of phagocytosed Bonamia sp. With hemocytes of oysters Tiostrea chilensis. *Dis Aquat Org 20*, 219-229.

Hoffmann, J.A. (1995). Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol 7*, 4–10.

Hsu, S. W. and Chen, J. C. (2007). The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquacul 271*, 61-69.

Kurtz, J., and Franz, K. (2003). Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature 425*, 37-38.

Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquacop (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the molt cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol 7*, 27–34.

Le Moullac, G. . and Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquacul 191*, 121-131.

Lin, Y. C. and Chen, J.C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquacul 224*, 193-201.

Liu, C. H. and Chen, J. C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunol 16*, 321-334.

Loker, E.S. and Bayne, C.J. 1(988). Immune mechanisms in trematode-snail interactions. In A Lackie, Immune mechanisms in invertebrate Vectors, Clarendon Press, Oxford, p. 199-220.

Harvell, D., Aronson, R. Baron, N., Connell, J., Dobson, A., Ellner, A., Gerber, L., Kim, K., Kuris, A., McCallum, H., Lafferty, K., McKay, B., Porter, J. Pascual, M., Smith, G., Sutherland, K. and Ward, J. (2004). The rising tide of ocean diseases: unsolved problems and research priorities. *Ecol Environ 2(7),* 375–382.

McGuinness, D. H., Dehal, P. K., and Pleass, R. J. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol 19*, 312-9.

Medzhitov, R and Janeway, C.A. Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. *Cell 91(3)*, 295-298.

Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C. and Pattnaik. (2006) Effect of multiple injection of beta-glucans on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & Shellfish Immunol 2*0, 305-319.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., and Roch, P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett 486*, 185-90.

Monari, M. (2006). Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina. Fish & Shellfish Immunol 22*, 98-114.

Pipe, R. K. (1990). Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res 261*, 261–268.

Pipe, R.K. (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J. 22*, 595–603.

Pipe, R.K., (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol 16*, 111–122.

Pipe, R. K. and Coles, J.A. (1995). Environmental cantaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks. *Fish & Shellfish Immunol 5*, 581-595.

Ratcliffe, N.A. (1985). Invertebrate immunity-A primerfor the now specialist (review). *Immuno Lett 10*, 253-270.

Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates, *Aquacul 172*, 125–145.

Rowley, A. F., and Powell, A. (2007). Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol 179*, 7209-7214.

Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P., Wu, P. C., and So, M. (1997). The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *Apmis 105*, 875-883.

Sano, T. and Maniwa, R. (1962). Studies on the environmental factors having an influence on the growth of *Haliotis discus hannai*. *Bull Tohoku Region Fish Res Lab 21*, 79-86.

Shiff, C. J. (1994). Molluscan defence mechanisms: immunity or population biology? *Parasitol Today 10*, 188-190.

Soderhall, K. and Cerenius, L. (1998). Role of prophenoloxidase-activity system in invertebrate immunity. *Immunol 10*, 23-28.

Tafalla, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B., and Figueras, A. (2003). Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev Comp Immunol 27*, 197-205.

Torreilles, J., and Guérin, M. (1999). Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunol 9*, 509-18.

Tripp, M. R. (1966). Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. *J Invertebr Pathol 8*, 478-484.

Truscott, R. and White, K.N. (1990). The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Funct Ecol 4*, 455-461.

Tseng I.T. and Chen J.C. (2004). The immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunol 9*, 325-333.

Tunkijjanukij, S., Giaever, H., Chin, C. C., and Olafsen, J. A. (1998). Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 119*, 705-713.

Van der Knaap W.P.W., & Loker, E.S. (1990). Immune mechanism in trematode-snail interactions. *Parsitol Today 6*, 175-182.

Vetvicka V. and Sima P. (2004). β-glucan in invertebrates. *ISJ 1,* 60-65.

Wang, L.U. and Chen, J.C. (2005). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginoloticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunol 18*, 269-278.

Winston, G.W., Moore, M.N., Kirchin, M.A., Soverchia, C. (1996). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp Biochem Physiol 113C*, 221–229.

Yoshida, H., Ochiai, M., and Ashida, M. (1986). β-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system. *Biochem Biophys Res Comm **141***, 1177-1184.