



รายงานการวิจัย

โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชาย
ฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

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

สุพรรณณี ลีโทขวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
นันทิกา คงเจริญพร
นาริรัตน์ ฤทธิรุตม์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา



รายงานการวิจัย

โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชาย
ฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย

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

สุพรรณณี ลีโทชวลิต
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
นันทิกา คงเจริญพร
นารีรัตน์ ฤทธิธรม์



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2554 ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก ขอขอบคุณเกษตรกรที่เลี้ยงหอยบริเวณอ่างศิลา และเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2555

โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

สุพรรณิ ลิโทขวลิต¹ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ¹ นันทิกา คงเจริญพร (ปานจันทร์)²
และนารีรัตน์ ฤทธิธูตม์¹

¹ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131

² สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

245661

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

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

Supanee Leethochavalit¹ Janjarus Watanachote¹ Nanthika Khongchareonporn
(Panchan)² and Nareerat Rittirut¹

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

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

245661

Abstract

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

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	
Abstract	
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
บทนำ	1
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลอง	22
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	44
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน	59
ภาคผนวก ข งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	65

สารบัญญัตินี้

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวแปรที่สัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral และ cellular ที่เปลี่ยนแปลงขณะเกิดโรค Perkinsosis จากปรสิต <i>Perkinsus olseni</i> และ <i>P. marinus</i>	13
4.1	ผลการสำรวจ <i>Perkinsus</i> sp. ในหอยลาย (<i>P. undulata</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	22
4.2	ผลการสำรวจ <i>Perkinsus</i> sp. ใน หอยนางรม (<i>Saccostrea</i> sp.) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	23
4.3	ผลการสำรวจ <i>Perkinsus</i> sp. ใน หอยแมลงภู่ (<i>P. viridis</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	24
4.4	ผลการสำรวจ <i>Perkinsus</i> sp. ใน หอยแครง (<i>A. granosa</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธี Quantitative method ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	25
4.5	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยลาย (<i>P. undulata</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	26
4.6	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยนางรม (<i>Saccostrea</i> sp.) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	27
4.7	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยแมลงภู่ (<i>P. viridis</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	28
4.8	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยแครง (<i>A. granosa</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554	29

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.9	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดในหอยตลับ (<i>M. casta</i>) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2553 ถึง เดือนตุลาคม 2554	30
4.10	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยลาย (<i>P. undulata</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ A, B และ AB เกาะกลุ่ม	
4.11	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยลาย (<i>P. undulata</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ O เกาะกลุ่ม	33
4.12	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรม (<i>Saccostrea</i> sp.) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ A, B และ AB เกาะกลุ่ม	34
4.13	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรม (<i>Saccostrea</i> sp.) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ O เกาะกลุ่ม	35
4.14	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแมลงภู่ (<i>P. viridis</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ A, B และ AB เกาะกลุ่ม	36
4.15	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแมลงภู่ (<i>P. viridis</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ O เกาะกลุ่ม	37
4.16	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครง (<i>A. granosa</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ A, B และ AB เกาะกลุ่ม	38
4.17	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครง (<i>A. granosa</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ O เกาะกลุ่ม	39
4.18	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยตลับ (<i>M. casta</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ A, B และ AB เกาะกลุ่ม	40
4.19	ความสามารถของโปรตีนในน้ำเลือดหอยตลับ (<i>M. casta</i>) ในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อ O เกาะกลุ่ม	41
4.20	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย	42
4.21	ปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย	43

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กายวิภาคพื้นฐานของหอยนางรม	4
2.2	ลักษณะภายในของหอย Green mussel (<i>Mytilus edulis</i>)	7
2.3	ลักษณะภายในของหอย quahog clam, <i>Mercenaria mercenaria</i>	8
2.4	ภาพร่างของเม็ดเลือดหอยชนิด granulocyte (A) และ hyalinocyte (B)	10
2.5	ลักษณะขบวนการป้องกันตนเองแบบ humoral และ cellular ในหอยสองฝา ระหว่างเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิต	11
2.6	การทำลายพันธะ β -1,4-glycosidic ระหว่าง N-acetyl- muramic acid (NAM) และ N-acetylglucosamine (NAG) บนผนังเซลล์แบคทีเรียโดย เอนไซม์ ไลโซไซม์	12
2.7	สมมุติฐานขบวนการการจดจำและกำจัดปรสิต <i>P. olsenii</i> ของหอย Manila clam	15
2.8	ภาพจำลองแสดงการเกิด encapsulation ของ หอย <i>Ruditapes decussatus</i> และ <i>R. philippinarum</i> ต่อปรสิต <i>P. olsenii</i>	16
3.1	ตัวอย่างการทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดในการทำให้เม็ดเลือดแดง เกาะกลุ่ม	19
4.1	ลักษณะเม็ดเลือดในหอยลาย (<i>P. undulata</i>) Scale bar = 50 μ m	27
4.2	ลักษณะเม็ดเลือดในหอยแมลงภู่ (<i>P. viridis</i>) Scale bar = 50 μ m	28
4.3	ลักษณะเม็ดเลือดหอยแครง (<i>A. granosa</i>) Scale bar = 50 μ m	29
4.4	ลักษณะเม็ดเลือดหอยตลับ (<i>M. casta</i>) Scale bar = 50 μ m	30