



รายงานการวิจัย

การพัฒนาปลานิลคุณภาพในระบบอุตสาหกรรม

Improvement of Tilapia Quality Produced by Thai Aquaculture

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9412

2. ผศ. ภก. ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-8314

3. สพ.ญ. หทัยรัตน์ ไม้สัก

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9591

4. สพ.ญ. นีอร วินารักษ์วงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9591

5. สพ.ญ. ศศิภา จันทร์ขจร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9591



รายงานการวิจัย

การพัฒนาปลานิลคุณภาพในระบบอุตสาหกรรม

Improvement of Tilapia Quality Produced by Thai Aquaculture

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. เจนนุช ว่องวิชัยชัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9412

2. ผศ. ภก. ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-8314

3. สพ.ญ. หทัยรัตน์ ไม้สัก

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9591

4. สพ.ญ. นีอร วินารักษ์วงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9591

5. สพ.ญ. ศศิภา จันทร์ขจร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์: 02-218-9591



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปี พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

การวิจัยเรื่อง การพัฒนาปลานิลคุณภาพในระบบบ่ออุตสาหกรรม (Improvement of Tilapia Quality Produced by Thai Aquaculture) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ และ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำการศึกษา และบริษัทฟาร์มานูวา จำกัด สำหรับการพัฒนาวีธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในตัวอย่างปลา

การพัฒนาปลานิลคุณภาพในระบบอุตสาหกรรม

Improvement of Tilapia Quality Produced by Thai Aquaculture

บทคัดย่อ

246416

ปลานิลจัดเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทย การเลี้ยงปลานิลได้รับการพัฒนาเป็นระบบอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพ โดยอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลในประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลปริมาณ 200,000 ตันต่อปี เพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ การใช้ฮอร์โมนและยาต้านจุลชีพระหว่างการเลี้ยงปลานิลเป็นการปฏิบัติที่พบควบคู่ไปกับการพัฒนาการเลี้ยงปลานิลเป็นระบบอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงปลานิลในลักษณะอุตสาหกรรมเป็นการเลี้ยงเพศเป็นเพศผู้เพศเดียว เนื่องจากปลานิลเพศผู้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าและไม่พบปัญหาการผสมพันธุ์กันเองภายในบ่อ การเลี้ยงปลานิลในระบบอุตสาหกรรมจึงมีการเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิล ด้วยการใช้ฮอร์โมนเพศผู้ เช่น 17-อัลฟ่าเมทิลเทสโทสเตอโรน (alpha-methyltestosterone) เมสทาโนโลน (mestanolone) โดยการผสมฮอร์โมนขนาด 80 mg/kg อาหาร ให้ลูกปลานิล (ระยะอนุบาลคือระยะหลังจากไข่แดงยุบ) กินติดต่อกันเป็นระยะเวลา 21-23 วัน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่นิยมอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกในทางปฏิบัติ เกษตรกรสามารถทำได้เองในระดับฟาร์ม และให้ผลสำเร็จเป็นลูกปลานิลเพศผู้ถึง 100 % อย่างไรก็ตามวิธีการนี้อาจทำให้มีการตกค้างของฮอร์โมนในเนื้อปลานิล การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนตกค้างในเนื้อปลานิล โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS) วิเคราะห์ที่พัฒนาจากการศึกษานี้แสดง recovery ของเมสทาโนโลน 82.30-112.44 % โดยมี Coefficient of Variation (CV) 2.15-11.88 % ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่แท้จริงและความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ พบว่าเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0.5-10.0 ng/g ($r^2 > 0.99$) Limit of quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 0.5 ng/g และวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อสารเมสทาโนโลนโดยไม่พบพิกัดใดๆ รบกวน ปริมาณของเมสทาโนโลนที่น้อยที่สุดที่วิธีนี้สามารถตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง (LOQ) คือ 0.5 ppb โดยพบว่าปริมาณของฮอร์โมนเมสทาโนโลนในตัวอย่างปลานิล มีความสัมพันธ์กับปริมาณฮอร์โมนที่ปลาได้รับจากการกินอาหารผสมฮอร์โมน ปริมาณฮอร์โมนในตัวอย่างปลานิลต่ำกว่าปริมาณที่น้อยที่สุดที่วิธีนี้สามารถตรวจพบได้ (< 0.5 ppb) เมื่อหยุดให้อาหารที่ผสมฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการศึกษาเป็นการแสดงปริมาณ ฮอร์โมนตกค้างที่สามารถตรวจพบในลูกปลานิลในระยะเวลา 3 วันแรกหลังจากหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมน ดังนั้นปลานิลขนาดบริโภคซึ่งหยุดให้อาหารผสมฮอร์โมนประมาณ 8 เดือน จึงไม่ควรมีฮอร์โมนตกค้างในระดับที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ นอกจากการใช้ฮอร์โมนเพศชายในการเพาะเลี้ยงปลานิลในระบบอุตสาหกรรมแล้ว การผลิตปลานิลของประเทศไทยยังต้องใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อเมื่อมีการเลี้ยงปลานิลแบบหนาแน่น โดยเฉพาะการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิสซึ่งเป็นโรคที่ก่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิลทั่วโลก ปัจจุบันเกษตรกรไทยควบคุมการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซิส

โคซิสโดยการใช้อาหารด้านจุลชีพผสมอาหารให้ปลาป่วยกิน อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคด้วยยาต้านจุลชีพมักมีปัญหาด้านประสิทธิผลของการรักษาและการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อปลาและสิ่งแวดล้อม การใช้วัคซีนป้องกันโรคเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมโรคสเตรปโตคอคโคซิสในอุตสาหกรรมการผลิตปลาเพื่อบริโภคของหลายประเทศ แต่ยังไม่มีการปฏิบัติในประเทศไทย การศึกษานี้ได้พัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ควบคุมโรคสเตรปโตคอคโคซิสในฟาร์มปลานิลของประเทศไทย ทำการศึกษาโดยการคัดเลือกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลป่วย จำแนกลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อ โดยการเปรียบเทียบส่วนของ 16S rRNA gene และ *sodA* gene จาก *S. agalactiae* จำนวน 10 สายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งระบาดต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก นำเชื้อที่คัดเลือกผลิตเป็นวัคซีนรวม (multivalent) ชนิดเชื้อตาย (inactivated vaccine) การทดสอบประสิทธิผลของวัคซีนโดยการฉีดวัคซีนขนาด 5×10^8 cell/ตัว เข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ปลานิล (น้ำหนักตัว 120-200 g) ให้ผลกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *S. agalactiae* เมื่อตรวจวัดที่ 2 สัปดาห์หลังจากปลาได้รับวัคซีน โดยมีระดับแอนติบอดีที่สูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีนประมาณ 3 เท่า ผลการทดสอบความต้านทานโรคเมื่อระยะเวลา 6 เดือนหลังจากปลาได้รับวัคซีน 1 ครั้ง โดยการฉีดเชื้อทับเข้าช่องท้องประมาณ 2×10^8 cells/น้ำหนักปลา 100 g พบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีน (อัตราการรอด 60%) มีความต้านทานโรที่สูงกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน (อัตราการรอด 10%) นอกจากนี้การทดสอบคุณภาพวัคซีนพบว่าวัคซีนมีความปลอดภัยต่อปลาและปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการเจริญเติบโตตามปกติ

คำสำคัญ: สอร์โมน เมสทานโกลน โรคสเตรปโตคอคโคซิส ปลานิล วัคซีน

Abstract

246416

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is presently a major fresh water fish culture in Thailand. Tilapia aquaculture in Thailand yields approximately 200,000 tons production per year for local consumption demand and international trade. Along with the farming intensification, hormone and antimicrobial are applied during the farming process. Tilapia aquaculture is currently produced using monosex-male tilapia because male tilapia has better yield than the female, and monosex population allows an effective management of a single crop. Androgenic steroids; such as 17 alpha-methyltestosterone, mestanolone, are commonly used in feeding the early stage fry to induce male sex-reversed tilapia. Early stage fry are fed androgenic hormone 80 mg/kg feed for 21-23 consecutive days. The residues of hormone in tilapia, however, have not been reported in Thailand. The present study aims to analyze the amount of mestanolone deposited in tilapia tissues following a course of androgenic hormone administration. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS) techniques are developed to quantitate the amount of mestanolone ≥ 0.5 ng/g (LOQ = 0.5 ppb). The techniques show recovery of the compound 82.30-112.44 %, coefficient of variation (CV) 2.15-11.88 %, and a linear relationship between spiked concentrations and analyzed values was found between 0.5-10.0 ng/g ($r^2 > 0.99$). Results show that deposition of mestanolone in tilapia tissue is associated with the amount of mestanolone taken by the fish. Mestanolone in tilapia tissue was found < 0.5 ppb on the 5th day of the hormonal diet withdrawn. The non-detectable amount of mestanolone in tilapia meat observed in the present study suggests that the androgenic steroid fed during the early stage of tilapia fry is metabolized after an adequate withdrawal period during grown out stage and leaves no detectable residue. In addition to the hormonal application in male sex-reversed tilapia farming, the use of antimicrobial to control infectious disease is constantly found consequently to the farming intensification. Streptococcosis, a disease caused by streptococci bacteria, has been reported in many countries and has economic consequences on mass mortality in all stages of tilapia farming. The current regimen used to control streptococcosis in Thai tilapia farming is the oral antimicrobial medication. The application of oral antimicrobial is not usually effective, but residues of the antimicrobials may cause adverse implications. Vaccination against the disease is recommended for good aquaculture practice and it is being conducted in many countries. Streptococcosis vaccine development and its application were carried out in this study. Diseased fish from overall culture areas were examined for the pathogen characterization. *S. agalactiae* 10 isolates selected from different culture areas; centre, northern-east and west of Thailand, were comparatively characterized for 16S rRNA and *sodA* gene sequence. Multivalent inactivated vaccine was evaluated against *S. agalactiae* infections in juvenile tilapia (120-200 g body weight). The intraperitoneal vaccination of farmed fish, at 5×10^8 CFU/fish, resulted in

246416

high level of the specific agglutinating antibodies observed at 2 weeks post vaccination. The specific antibody titres following a single vaccination were approximately 3 times of those found in non-vaccinated healthy farmed fish. At 6 months post vaccination, the vaccinated fish were demonstrated protection against a single intraperitoneal challenge of 2×10^8 cell *S. agalactiae*/ 100 g fish. Survival from the challenge was 60% in the vaccinated fish, while 10% survival was reported in the non-vaccinated fish. Along with the vaccine efficacy study, the safety test of vaccine showed no evidence of negative impacts on health performance in the vaccinated tilapia.

Key words: hormone mestanolone streptococcosis tilapia vaccine

สารบัญเรื่อง
(Table of Contents)

	หน้าที่
โครงการย่อยที่ 1 ปริมาณฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนตกค้างในปลานิลแปลงเพศ	19
Deposition of Testosterone in Sex-Reversed Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
บทที่ 1 บทนำ	21
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	35
ส่วนที่ 1 การเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลโดยใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลน	36
ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิล	39
บทที่ 4 ผลการวิจัย	49
ส่วนที่ 1 การเหนี่ยวนำเพศผู้ในลูกปลานิลโดยใช้ฮอร์โมนเมสทาโนโลน	49
ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเมสทาโนโลนในเนื้อปลานิล	52
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการดำเนินงาน	69
โครงการย่อยที่ 2 ออโตจีนส์วัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง	73
(Autogenous Vaccine against Streptococcosis in Farmed Tilapia)	
บทที่ 1 บทนำ	75
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	79
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	87
ส่วนที่ 1 ศึกษาอุบัติการณ์ของโรคสเตรปโตคอคโคซิสและรวบรวมเชื้อสเตรปโตคอคคัสในฟาร์มปลานิลของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553	87
ส่วนที่ 2 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นปัญหาในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย	90
ส่วนที่ 3 การพัฒนาออโตจีนส์วัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล	93
บทที่ 4 ผลการวิจัย	99
ส่วนที่ 1 ศึกษาอุบัติการณ์ของโรคสเตรปโตคอคโคซิสและรวบรวมเชื้อสเตรปโตคอคคัสในฟาร์มปลานิลของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553	99
ส่วนที่ 2 การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นปัญหาในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิลภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย	107
ส่วนที่ 3 การพัฒนาออโตจีนส์วัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล	116
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการดำเนินงาน	129
บทสรุปงานวิจัย	133
บรรณานุกรม	135

สารบัญตาราง
(List of Tables)

หน้าที่

โครงการย่อยที่ 1 ปริมาณฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนตกค้างในปลานิลแปลงเพศ	
Deposition of Testosterone in Sex-Reversed Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
ตารางที่ 2.1	ฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ชนิดอื่นๆที่นำมาใช้ผสมอาหารให้ปลานิลเพื่อวัตถุประสงค์ในการเหนี่ยวนำเพศ ขนาดที่ใช้ ชนิดของปลาที่ทดลอง และ%ของเพศผู้ที่ได้
27	
ตารางที่ 2.2	คุณสมบัติที่ต้องการสำหรับวิธีการตรวจแบบ screening methodology
28	
ตารางที่ 2.3	วิธีการหลักในการตรวจแบบ screening methodology
29	
ตารางที่ 2.4	แสดงข้อดีข้อเสียของเทคนิคการตรวจทั้งวิธีทาง immunology และ chromatography
33	
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ตารางที่ 4.1	แสดงค่า titer ของ Karl Fischer Reagent
56	
ตารางที่ 4.2	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในตัวอย่างเมสทาโน โลนด้วยวิธี Karl Fischer Titration
56	
ตารางที่ 4.3	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเมสทาโน โลนในวัตถุดิบ
58	
ตารางที่ 4.4	system suitability test ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโน โลนที่ตกค้างในเนื้อปลานิล
60	
ตารางที่ 4.5	การตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมสทาโน โลนที่ตกค้างในเนื้อปลานิล
61	
ตารางที่ 4.6	ความเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นของวิธีวิเคราะห์เมสทาโน โลนในเนื้อปลานิล
62	
ตารางที่ 4.7	Limit of quantitation ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมสทาโน โลนในเนื้อปลานิล
67	
ตารางที่ 4.8	ผลการตรวจสอบการกลับคืนของการสกัดเมสทาโน โลนจากเนื้อปลานิล (recovery of extraction)
67	
ตารางที่ 4.9	ผลการวิเคราะห์สารตกค้างของเมสทาโน โลนในปลานิลที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมสทาโน โลนเป็นเวลา 23 วัน
68	

สารบัญตาราง

(List of Tables)

	หน้าที่
โครงการย่อยที่ 2 ออโตจีนัสวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง (Autogenous Vaccine against Streptococcosis in Farmed Tilapia)	
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างไพรเมอร์สำหรับตรวจระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส	83
ตารางที่ 2.2 รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เซลล์แบคทีเรียส่วนประกอบหรือสารต่างๆ ที่ผลิต ขึ้นมาจากเชื้อแบคทีเรียในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคในปลา	86
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์จรรยาบรรณการศึกษาต่างๆ เพื่อใช้สำหรับยืนยันชนิดเชื้อสเตรปโตคอคคัส	89
ตารางที่ 3.2 เชื้อ <i>S. agalactiae</i> จากปลานิลป่วยในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 นำมาใช้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสเตรปโตคอคคัส	90
ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์ตรวจหา ยีน 16S rRNA และยีน <i>sodA</i> gene เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทาง วิวัฒนาการของเชื้อ สเตรปโตคอคคัส ตามรายงานการศึกษาของ Maisak และคณะ ปี 2010	91
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ตารางที่ 4.1 ตัวอย่างปลาส่งตรวจจากฟาร์มที่สงสัยการเกิด โรคสเตรปโตคอคโคซิสพิจารณา จากอาการแสดง วิกการรอยโรค การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นและการยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธี PCR ทางห้องปฏิบัติการ	103
ตารางที่ 4.2 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ได้จากปลานิลในประเทศไทย ปลาชนิดอื่นๆ และเชื้อมาตรฐาน	108
ตารางที่ 4.3 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>sodA_{int}</i> ของ เชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ได้จากปลานิลในประเทศไทย และสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC13813	109
ตารางที่ 4.4 เชื้อมาตรฐานเฉพาะส่วนยีน 16S rRNA และ <i>sodA_{int}</i> จากฐานข้อมูลในระบบ GenBank เพื่อใช้วิเคราะห์ phylogenetic analysis	111
ตารางที่ 4.5 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่แยกจากปลานิลในประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบ กับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ	113

สารบัญตาราง
(List of Tables)

	หน้าที่
โครงการย่อยที่ 2 ออโตจีนัสวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง	
(Autogenous Vaccine against Streptococcosis in Farmed Tilapia)	
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ตารางที่ 4.6 ร้อยละความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>soda_{int}</i> fragment จากเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่แยกจากปลานิลในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสชนิดอื่นๆ	115
ตารางที่ 4.7 ปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 1	117
ตารางที่ 4.8 ปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 2	119
ตารางที่ 4.9 ปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 3	121
ตารางที่ 4.10 ประเมินความปลอดภัยของวัคซีน : จำนวนปลานิลแดงพ่อแม่พันธุ์ (น้ำหนักตัว 120-200 กรัม) รอดชีวิต และปริมาณไข่จากแม่พันธุ์ปลานิลแดง (น้ำหนักตัว 210 กรัม) ภายหลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายผลิตจากเชื้อ <i>S. agalactiae</i> (isolate no. 1, 26, 43, 45 และ 59)	125
ตารางที่ 4.11 ระดับแอนติบอดี (antibody titer) ตรวจสอบด้วยวิธี Direct Agglutination test จากเซรัมของปลานิลแดงและปลานิลดำที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายที่ผลิตจากเชื้อ <i>S. agalactiae</i>	126
ตารางที่ 4.12 ประเมินความต้านทานต่อโรคสเตรปโตคอคโคซิสหลังจากได้รับวัคซีนแล้วเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) จำนวนปลารอดชีวิตหลังจากฉีดเชื้อสเตรปโตคอคคัส (6×10^8 เซลล์ต่อตัวปลา) เข้าช่องท้อง	127

สารบัญภาพ
(List of Illustration)

หน้าที

โครงการย่อยที่ 1 ปริมาณฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนตกค้างในปลานิลแปลงเพศ		
Deposition of Testosterone in Sex-Reversed Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)		
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง		
รูปที่ 2.1	โครงสร้างทางเคมีฮอร์โมนเพศผู้ที่นิยมนำมาใช้เหนี่ยวนำเพศผู้ในปลานิล	26
รูปที่ 2.2	หลักการของ Sandwich ELISA	30
บทที่ 4 ผลการวิจัย		
รูปที่ 4.1	รูปแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียในปลานิล	50
รูปที่ 4.2	รูปแสดงเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในปลานิล	51
รูปที่ 4.3	IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน	53
รูปที่ 4.4	IR spectrum ของตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลน	54
รูปที่ 4.5	overlay IR spectrum ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลนและตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลน	55
รูปที่ 4.6	DSC thermogram ของวัตถุคิบเมสทาโนโลน	57
รูปที่ 4.7	HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานเมสทาโนโลน (1 mg/ml)	59
รูปที่ 4.8	HPLC chromatogram ของตัวอย่างวัตถุคิบเมสทาโนโลน (1 mg/ml)	59
รูปที่ 4.9	LC-MS chromatogram ของสารละลายผสมของสารมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลน และ ไฟแนสเทอไรค์ ความเข้มข้น 5 ng/g และ 50 ng/g เข้าสู่ LC-MS system จำนวน 6 ครั้ง (system suitability test)	60
รูปที่ 4.10	LC-MS chromatogram ของสารละลายมาตรฐานใช้งานเมสทาโนโลน ความเข้มข้น 0.5 ng/g, 1 ng/g, 2 ng/g, 3 ng/g, 5 ng/g, 7.5 ng/g, และ 10 ng/g กับสารมาตรฐานภายใน ไฟแนสเทอไรค์ ความเข้มข้น 50 ng/g	63
รูปที่ 4.11	ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (method linearity) ของวิธีวิเคราะห์เมสทาโนโลน ในเนื้อปลานิลด้วย LC-MS	65
รูปที่ 4.12	LC-MS chromatogram ของเมสทาโนโลน ความเข้มข้น 1 ng/g, 5 ng/g และ 7.5 ng/g ที่มี สารละลายมาตรฐานภายในไฟแนสเทอไรค์ ความเข้มข้น 50 ng/g ที่สกัดจากเนื้อปลานิล	66

สารบัญภาพ
(List of Illustration)

	หน้าที่
โครงการย่อยที่ 2 ออโตจีนัสวัคซีนป้องกันโรคStreptococcosis ในปลานิลเพาะเลี้ยง (Autogenous Vaccine against Streptococcosis in Farmed Tilapia)	
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
รูปที่ 4.1 วิการภายนอกของโรคStreptococcosis ช่วงการศึกษา ปี พ.ศ. 2553	100
รูปที่ 4.2 วิการภายในของโรคStreptococcosis ช่วงการศึกษา ปี พ.ศ. 2553	100
รูปที่ 4.3 การวินิจฉัยเชื้อStreptococcosis ทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้นที่แยกจากปลานิลป่วยด้วย โรคStreptococcosis ระบาดช่วง ปี พ.ศ. 2553 ตามวิธีตรวจในรายงานการศึกษา Maisak และคณะ ปี 2007	101
รูปที่ 4.4 ตัวอย่างการอ่านผลตรวจวินิจฉัยยืนยันชนิดของเชื้อStreptococcosis ทางชีวโมเลกุลด้วย วิธี PCR ตามรายงาน Wongtavatchai และคณะ ปี 2008	102
รูปที่ 4.5 PCR product ของยีน 16S rRNA (1,234 bp) และ <i>sodA_{int}</i> fragment (512 bp) จากเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ซึ่งเพาะแยกได้จากปลานิลป่วย	107
รูปที่ 4.6 Multiple sequence alignment ของ manganese-dependent superoxide dismutase (Mn- SOD) แสดงลำดับกรดอะมิโนจากข้อมูล sequencing ของเชื้อ <i>S. agalactiae sodA_{int}</i> fragment (CAB09346, isolated from human in USA type strain of <i>S. agalactiae</i> ATCC13813)	110
รูปที่ 4.7 Phylogenetic tree จากการเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สำหรับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่แยกจากปลานิลป่วย ในช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับ เชื้อStreptococcosis ชนิดอื่นๆ	112
รูปที่ 4.8 Phylogenetic tree จากการเรียงและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>sodA_{int}</i> fragment สำหรับเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่แยกจากปลานิลป่วย ในช่วงปี พ.ศ. 2553 เปรียบเทียบกับเชื้อStreptococcosis ชนิดอื่นๆ	114
รูปที่ 4.9 ปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการ ทดสอบระบบครั้งที่ 1	117
รูปที่ 4.10 ปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง จากการ ทดสอบระบบครั้งที่ 2	119

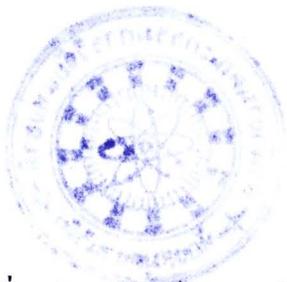
สารบัญภาพ
(List of Illustration)



หน้าที

โครงการย่อยที่ 2 ออโตจีนัสวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิลเพาะเลี้ยง (Autogenous Vaccine against Streptococcosis in Farmed Tilapia)	
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
รูปที่ 4.11 ปริมาณเชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบระบบครั้งที่ 3	121
รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ในการทดสอบระบบเครื่อง fermentor ครั้งที่ 1, 2 และ 3	122
รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบเชื้อมีชีวิต (Viable cell count) ของเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ในการทดสอบระบบเครื่อง fermentor ครั้งที่ 1, 2 และ 3	122
รูปที่ 4.14 เชื้อ <i>S. agalactiae</i> บ่มเพาะเลี้ยงใน fermentor เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง	123
รูปที่ 4.15 การเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีของปลานิลแดงและปลานิลดำ ขนาดประมาณ 200 กรัม หลังจากได้รับวัคซีนเชื้อตายเป็นเวลา 0, 3, 6 และ 10 สัปดาห์ ด้วยวิธี Direct Agglutination test	126
รูปที่ 4.16 อัตราการรอดในปลานิลที่ผ่านการฉีดวัคซีนมาแล้วเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) และฉีดเชื้อที่ขนาด 6×10^8 เซลล์ต่อตัวปลา เข้าช่องท้อง แล้วเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 28 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดวัคซีน	128

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 28 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน..... 246416
เลขเรียกหนังสือ.....



คำอธิบายสัญลักษณ์
(List of Abbreviations)

โครงการย่อยที่ 1 ปริมาณฮอร์โมนเพศโทสเทอโรนตกค้างในปลานิลแปลงเพศ
Deposition of Testosterone in Sex-Reversed Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

°C	=	degree Celsius
cm ⁻¹	=	per centimeter
CV	=	coefficient variance
DSC	=	Differential scanning calorimetry
ELISA	=	Enzyme-linked-immunosorbent assay
g	=	gram
HPLC	=	High performance liquid chromatography
HPTLC	=	High performance thin-layer chromatography
kg	=	kilogram
LC-MS	=	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LOD	=	Limit of detection
LOQ	=	Limit of quantitation
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
MRL	=	Maximum residue limit
ng	=	nanogram
ppb	=	part per billion
RIA	=	Radioimmunoassay
RSD	=	Relative standard deviation
TBME	=	tert-butyl methyl ether
µm	=	micrometer
µl	=	microliter

โครงการย่อยที่ 2 ออโตจีนัสวัคซีนป้องกันโรคสเตรปโตคอคคัสในปลานิลเพาะเลี้ยง
Autogenous Vaccine against Streptococcosis in Farmed Tilapia

bp	=	base pair
<i>cpn</i>	=	chaperonin
ECP	=	Extracellular product
FKC	=	Formalin killed cell
LPS	=	lipopolysaccharide
M	=	mole
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
<i>sodA</i>	=	Superoxide dimutase A