รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** กรุงเทพมหานคร. บริษัทฐานเศรษฐกิจ จำกัด. 202 หน้า.

พรเทพ ปลอดภัย. 2537. **การศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในน้ำทะเล และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพมหานคร.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น และทัศนีย์ สุโกศล. 2529. **อิมมูโนวิทยา.** กรุงเทพมหานคร :

ภาษาอังกฤษ

Acton, R. T., Weinheimer, P. W. and Evans, E. E. 1969. A bactericidal system in the lobster *Homerus americanus*. **J. Invertebr. Pathol**. 13: 463-464.

Adams, A. 1991. Response of Penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. **Fish and Shellfish Immunology**. 1: 59-70.

American Public Health Association. 1980. **Standard method: for the examination of water and waste water**. 15th ed. APHA, Washington. p. 1134.

Anderson, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**. 2: 281-307.

Anderson, R . S. 1975. Phagocytosis by invertebrate cells *in vitro*:biochemical events and other characteristics compared with vertebrate phagocytic system. **Invertebrate Immunity**. New York and London: Academic Press.

_____. 1977. Biochemistry and physiology of invertebrate macrophages *in vitro*. **Comparative Pathobiology**. 3: 1-20.

Anonymous. 1992a. Yellow-head disease of black tiger shrimp. **Asian Shrimp News**. 10:2.

_____. 1992b. Please help to stop the misconception ! A drug residue standard is needed for cultured shrimp industry. **Asian Shrimp News**. 10: 2

Anonymous. 1995. Momentum continues for Thailand's shrimp exports. **ASCC News.** 23: 296.

Ashida, M., Ishizaki, Y. and Iwahana, H. 1982. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or beta-1,3-glucan in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Res. Commu**. 113: 562-568.

_____, and Söderhäll, K. 1983. The prophenoloxidase activating system in crayfish. **Comp. Biochem. Physiol**. 77B(4) : 21-26.

Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Mowan, A. and Rodriguez, J. 1995. Knowledge and research prospects in marine molluc and crustacean immunology. **Aquaculture**. 132: 17-32.

Bang, F. B. 1962. Serological aspects of immunity invertebrates. **Nature**. 196: 88-89.

_____, F. B. 1983. Crustacean disease response. **Pathobiology-the biology of crustacea**. (A. J. Proven Zano Jr, ed.) Academic Press. 6: 114-155.

Baumann, P. and Schubert, H. W. 1986. Vibrionaceae. In : **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol 1. (Butter, J. P., ed.) Waverly Press, Inc. USA. p. 516-538.

Bell, T. A. and Lightner, D. V. 1988. **A handbook of normal Penaeid shrimp histology**. United States of America by Allen Press, Inc., Lawreence, Kansas. p. 114.

Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K. and Toride, Y. 1993. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: M. Shariff, P. P. Subasinghe, and J. R. Arthur. (eds.) **Disease in Asian Aquaculture II**. 469-477.

Brock, J. A. 1992. **Shrimp disease diagnosis and control short course**. Training course notes. Shrimp culture research center, CP. Mahacai Thailand, August 1992. p. 165.

Boyd, C. E. 1989. **Water quality management and aeration in shrimp farming**. Fisheries and Allied Aquaculture Department Series 2 Auburn University, Alabama. 77 p.

Chen, J. C. and Lei, S. C. 1990. Toxicities of ammonia and nitrite to Penaeus monodon juvenile. **J. World Aqua. Soc.** 21(4): 300-306 pp.

Chiang, P., Huo, C. H. and Lin, C. F. 1989. **Pond preparation for shrimp grow-out.** Department of Fisheries and American Soybean Association, Songkla Province, Thailand. 25 p.

Chisholm, J. R. S. and Smith, V. J. 1995. Comparison of antibacterial activity with haemocytes of defferent crustacean species. **Comp. Biochem. Physiol.** 110A(1) :39-45.

Cornick, J. W. and Stewart, J. E. 1968. Interaction of the pathogen, *Gaffkya homari* with natural defense mechanisms of *Homarus americanus*. **J. Fish. Res. Bd. Can.** 25: 695-709.

_____. and Stewaet, J. E. 1973. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph lobster, *Homarus americanus*. **J. Invertebr. Pathol.** 21: 255-262.

Cummins, C. S. and Johnson, J. L. 1971. Taxonomy of the Clostridia : wall compostion and DNA homologies in *Clostridium butyricum* and other butyric acid-producing Clostridia. **J. Gen. Micro.** 67: 33-46.

Ellis, A. E. 1988. **Fish vaccination**. Acadamic Press. p.255

Evans, E. E.,. Cushing, J. E., Sawyer, s., Weinheimer, P. F., Acton, R. T. and McNeely, J. L. 1968a. Induced bactericidal response in the california spiny lobster, *Panulirus interruptus*. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med.** 132: 111-114.

_____., Painter, B., Evans, M. L., Weinheimer, P. and Acton, R. T. 1968b. An induced bactericidin in the spiny lobster, *Panulirus argus*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 128: 394-39.

_____., Weinheimer, P. F., Painter, B. and acton, R.. T. 1969. Secondary and tertiary responses of the induced bactericidin from the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. **J. Bacteriol**. 98: 943-946.

Fontaine, C. T. and Lighter ,D. V. 1975. Cellular response to injury in Penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-10

Guzman, M. A., Ochoa, J. L. and Vargas-Albores, F. 1993. Hemolytic activity in the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. **Comp. Bilochem. Physiol.** 106A, (2): 271-275

Goldenberg, P. Z. and Greenberg, A. H. 1983. Functional heterogeneity of carbohydrate-binding hemolymph proteins: Evidence of a nonagglutination opsonin in *Homarus americanus*. **J. Invertebr. Immunol**. 42: 33-41

Hall, J. L. and Rowland, D. T. 1974a. Heterogeneity of lobster agglutinins I. Purification and physiochemical charaterization. **Biochemisty.** 13, (4): 821-823

_____. and Rowland, D. T. 1974b. Heterogeneity of lobster agglutinins II. Specific of agglutinins- erythrocyte binding. **Biochemistry.** 13, (4) : 828-832

Hose, J. E. and Martin, G. G. 1989. Defence functions of granulocytes in the ridgeback prawn, Sicyonia ingentis. **J. Invertebr. Patho**. 53: 335-446.

_____. Martin, G. G., Nguyen, V. A. and Rosenstein. T. 1987. Cytochemical Features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull**. 173: 178-187.

Huang, M. T. F., Eble, A. F. and Hammen, C. S. 1981. Immune response of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*, to bacterial infection. **J. Invertebr. Pathol**. 38: 213-219

Humason, G. L. 1979. **Animal Tissue techniques**. 4th ed., W. H. Freem ad Company, San Francisco. 661p.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. **J. Comp. Physiol**. 156B: 175-180

_____. and Söderhäll, K. 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. **Journal of Cell Biology**. 106: 1795-1804.

_____. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity on crustaceans and the proPO system. **Parasitology Today**. 5: 171-176.

Lackie, A. M. 1981. Invertebrate immunity. **Parasitology**. 80: 393-412.

Levett, P. N. 1990. Laboratory methods for anaerobes In: **anaerobic bacteria (A functional_biology)**. St. Edmundsbury Press Ltd. Great Britain. P. 5-18.

Lewis, D. H. and Lawrenee, A. L. 1983. Immunoprophylaxis to *Vibrio* sp. in pond reared shrimp. **Proceeding of the first international conference on warm water aquaculture-crustacea**. February 9-11, Brigham Young University Hawaii.

Lie, K. J., Heyneman, D. and Jeong, K. H. 1976. Studies on resistance in snails. 4. Induction of venticular capsules and changes in the amoebocytes-producing organ during sensitization in *Biomphalaria glabrata* sanils. **J. Parasit.**. 62 : 286-291.

Lightner, D. V. 1996. **A hanbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured Penaeid shrimp**. World Aquaculture Society, Louisiana, USA.

Martin, G. G. and Graves, B. L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. **J. Morphol**. 185 : 339-348.

McCumber, L. J. and Clem, L. W. 1983. Recognition of non-self in crustaceans. **American Zoology**. 23 : 173-183.

McFaddin, J. F. 1980. **Biochemical test for identification of medical bacteria** (2^{nd} ed.) Williams and Wilkins, USA. 527p.

McKay, D. and Jenkin, C. R. 1969. Immunity in the invertebrates. II Adaptive immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). **Immunology.** 17 : 127-137.

_____. and Jenkin, C. R. 1970. Immunity in the invertebrates. Correlation of the phagocytic activity of haemocytes with resistance to infection in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). **Aust. J. Exp. Biol Med. Sci.** 48 : 609-617.

_____. Jenkin, C. R. and Tyson, C.J. 1973. Effect of endotoxin on resistance of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*) to infection. **J. Infect. Dis.** 128 : 165-169.

Mialhe, E., Bachere, E., Boulo, V. and Cadoret, J.P. 1995. Strategy for research and international cooperation in marine invertebrate pathology, immunology and genetics. **Aquaculture**. 132: 33-41.

Mori, K. and Stewart, J. E. 1978a. Natural and induced bactericidal activities of the hepatopancreas of the American lobster, *Homarus americanus*. **J. Invertebr. Pathol.** 32 : 171-176.

Mori, K. and Stewart, J. E. 1978b. The hemolymph bactericidin of American lobster (*Homarus americanus*): adsorption and activation. **J. Fish. Res. Bd. Can.** 3 5 : 1504-1507.

Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarajamorn, A., Prathanpipat, P. and Puamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In : M. Shariff, P. Subasinghe, and J. R. Arthur. (eds.) **Diseases in Asian Aquaculture I.** p. 143-155. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila Phillippines.

_____, Arkarajamon, A. and Withyachumnankul, B. 1993. Histological and rapid haemocyte diagnosis of yellow-head disease in *Penaeus monodon*. In : M. Shariff, P. Subasinghe, and J. R. Arthur. (eds.) **Diseases in Asian Aquaculture II.** p. 89-98.

Nithimathachoke, C.,Prathanpipat, P.,Thongdaeng, K.,Withyachumarnkul, B. and Nash, G. 1995. Luminus bacterial infection in pond reared *Penaeus monodon*. **Asian Shrimp. News.** 23 :1-4.

Paterson, W. D., and Stewart, J. E. 1974. *In vitro* phagocytosis by haemocytes of the american loster (*Homorus amerricanus*) **J. Fish. Res. Bd. Can.** 31: 1051-1056

_____. and Stewart, J. E. 1979. Rate and duration of phagocytic increase in lobster induced by *pseudomonas perolens* endotoxin. **Devl. Comp. Immunol.** 3:353-357

_____., Stewart, J. E. and Zwicker, B. M. 1976. Phagocytosis as cellular immune response mechanism in the American lobster , *Homanus americanus*. **J. Invertebr. Pathol.** 27: 95-104.

Raa, J., Roerstad, G., Engstad, R. and Robertsen, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to micromial infections. In : M. Shariff, P. Subasinghe, and J. R. Arthur. (eds.) **Diseases in Asian Aquaculture I.** p. 39-50. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila Phillippines.

Raticliffe, N. A. 1985. Invertabrate immunity-A primer for the non-specialist. **Immunology letters.** 10: 253-270.

Sakai, M. Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1993. Enhancement of non- specific immun response in Rainbow Trout, *Oneorhynchus mykiss*, by oral administration of *Clostridium butyricum* miyari bacterin. In: **Diseas in Asian Aquaculture** 2nd Symposium on October 24-29. Thailand.

Schapiro, H. C., Steenbergen, J. E., Fitzgerald, Z. A. 1977. Hemocytes and phagocytosis in the American lobster, *Homarus americanus*. In: **Comparative Pathobiology** Vol. 3 p. 127-133.

Schleifer, K. H. and Kandler ,O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bact. Reviews**. 36: 4:407-477.

Schwab, G. E. and Reeves,P. R. 1966. Comperison of the bactericidal activity of different vertebrate sera. **J. Bacteriol**. 91: 106-112

Sharon, N. and Lin, H. 1972. Lectins: cell- agglutinating and suger specific protein. **Science**. 177: 949-959.

Sindermann, C. J. 1971. Internal defences of Crustacea: A review. **Fisheries Bulletin** 69: 455-489

_____. 1988. **Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture**, 2nd ed. Elseviar press: 1-10 p.

_____. 1990. Mechanisms of internal defense. In : **Principal disease of marine fish and shellfish**. Vol. 2. 2nd ed. Academic press Inc. p. 247-290.

Sleytr, U. B., Messner, P., Minnikin, D. E., Heckel, J. E., Virjr, M. and Russell, R. B. B. 1988. Structure of bacteria and their envelopes. In: I. Hancock. and I. Poxton (eds.) **Bacterial cell surface technique**. John Wiley & Sons Ltd. Press. p1-31.

Smith, R. H. and Pistole, T. G. 1985. Bactericidal activity of the granules isolated from amoebocytes of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. **J. Invertebr. pathol.** 45: 272-275.

Smith, V. J. and Chisholm, R. S. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish and Shellfish Immunology** 2: 1-31

_____. and Söderhäll, K. 1983a. Beta-1,3-glucan activity of crustacean hemocytes in *vitro* and *in vivo*. **Biol. Bull.** 164: 299-314.

Smith, V. J. and Söderhäll, K. 1983b. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. **Cell Tiss. Res.** 233: 295-303

_____. and Söderhäll, K. 1986. Cellulular immune mechanisms in the Crustacea. **Symposim Zoological Society** (London) No. 56 (lackie, A.M., ed.) 59-79. Oxford: Clarendon Press.

Söderhäll, K. 1981. Fungal cell wall β-1,3 glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. **Devl Comp. Immunol**. 5: 565-573.

_____. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanism in arthropods a review. **Devl. Comp. immunol** 6: 601-611.

_____. 1983. Beta-1,3 glucan enhancement of protease activity in crayfish haemocyte lysate. **Comp. Biochem. Physiol**. 74B: 221-224.

_____,and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. **Annual Rev. Fish Dis**. p. 1-24.

_____. and hall, L. 1983. Lipopolysacchride-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysaste. **Biochem. Biophys. Acta**, 797: 99-104.

_____. and smith, V. J. 1983. Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. **Devl. Comp. Immunol**. 7 : 229-239

_____. and smith, V. J. 1986. Prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defence system in arthropods. **Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods** (A. P. Gupta, ed.) :New york : Wiley Interscience. p 251-285

_____. and smith, V. J. The prohenoloxidase activating system : the biochemical of its activation and role in arthropod cellular immunity with special reference to crustaceans. **Immunity in Invertebrates.** (M. Brehelin,ed.) Berlin: Springer-Verlag. 208-233

Söderhäll, K. and Unestam, T. 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthopod immunity: the specificity of cell wall Glucan activation and activation by purified fungal glycoprotein. **Can. J. Microbiol.** 25: 404-416

_____., Smith, V. J. and Johnson, M. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated hemocyte populations of two crustaceans: evidence for cell co- peration in the defencd reactions of arthropods. **Cell and Tissue Research.** 245: 43-49.

_____., Roenger, W., Soderhall, I., Newton, R. P. and Ratcliffe, N. A. 1988. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of hemocyte prophenoloxidase by a β-1,3-glucan. **Insect Biochemistry**. 18:323-330.

Song, Y. L. and Hsieht, Y. T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. **Dev. Comp. Immuno.** 18 : 201-209.

_____. and Sung H. H. 1990. Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacterin prepared from *Vibrio vulnificus*. **Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.** 10:98-99.

Sritunyalucksana, K. 1995. **Study of the humoral defense factors in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*.** Master Thesis, Mahidol University.

Stewart, J. E. and Zwicker, B. M. 1972. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus* : products of hemocyte-plasma interaction. **Can. J. Microbiol.** 18 :1499-1509.

_____. and Zwicker, B. M. Induction of internal defense mechanism in the lobster, *Homarus americanus*. **Contemporary topic in immunology**. vol 4. (Cooper, E. L...ed.) plenum Publishing Corp. New York . p. 233-239.

Sung, H. H., Song, Y. L. and Kou, G. H. 1991. Potential uses of bacterin to prevent shrimp vibriosis. **Fish. Shellfish. Immunol.** 1: 311-312

Sung, h. h., Kou. G. H. and Song, Y. L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathol.** 29(1): 11-17.

Takahashi, Y. 1993. Enhancement of resistance to bacterial infection in prawn, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Clostridium butyricum* miyairi bacterial cell powder. Ltd. cited by NIPPON KAYAKU Co., Ltd.

Unestam, T. and Soderhall, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reaction in crayfish. **Nature**, London. 267 : 45-46.

Vargas-Albores, F., Guzman, M. A. and Ochoa, J. L. 1993. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. **Comp. Biochem. Physiol**. 104B : 407-413.

Vasta, G. R., Warr, G. W. and Marchalonis, J. J. 1983. Serological characterization of humoral lectins from the freshwater prawn, *Macrobrahium rosenbergii*. **Devl. Comp. Immunol**. 7 : 13-20.

Weinheimer, P. F., Acton, R.. T., Sayer, S. and Evans, E. E. 1968. Specificity of the induced bactericidin of the west spiny lobster, *Panulirus argus*. **J. Bacteriol**. 98 : 947-948.

Wetzel, R. G. 1975. **Limnology**. W. B. Saunders Co., Philadelphia. 743 p.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 สูตรอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด Lobster Hemolymph Medium (LHM) (Paterson and Stewart, 1974)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$. $6H_2O$)	1.0
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	28.4
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$. $7H_2O$)	2.0
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$. $2H_2O$)	2.25
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.7
Dextrose	1.0
MEM essential amino acid + glutamine (50X)(Gibco)	20 มิลลิลิตร/ลิตร
MEM Vitamins solution (100X)(Gibco)	10 มิลลิลิตร/ลิตร
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2 HPO_4. $7H_2O$)	0.125
Phenol red (0.5%)	1 มิลลิลิตร/ลิตร
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	3.0
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ปรับให้มีค่าความเป็นกรด ด่าง 7.6 ด้วย 1N NaOH

2 สูตรอาหาร Minimum Medium For Bactericidin Assay (Davis and Mingioli, 1996)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	7.0
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0
ไตรโซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7$.$2H_2O$)	0.5
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$. $7H_2O$)	2.0
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$. $2H_2O$)	2.25
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด ด่าง 7.6 ด้วย 1 N. NaOH นึ่งค่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที)

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ PYG (Peptone Yeast Extract Medium)

(Cummims and Johnson, 1971; Levett,1990)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Peptone (Difco)	1.25
Yeast extract (Difco)	1.25
Glucose	3.0
L-Cystine	0.5
Thioglycolic acid	0.3
Resazurin (0.01%)	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด ด่าง 7.0 ด้วย 1N NaOH และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที)

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Yeast Extract (Difco)	5
Proteose Peptone No. 3 (Difco)	10
Sodium Citrate	10
Sodium thiosulfate	10
Oxgall	8
Saccharose	20
Sodium chloride	10
Ferric citrate	1
Brom Thymol Blue	0.04
Thylmol Blue	0.04
Agar	15
น้ำกลั่น	1000 ml

ต้มให้ละลายปรับให้มีค่าความเป็นกรด ด่าง 8.6 ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 Brain Heart Infusion Broth with 1.5% NaCl

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Calf Brians, Infusion from	200
Beef Heart, Infusion from	250
Proteose peptone	10
Dextrose	2
Sodium chloride	15
Disodium Phosphate	2.5
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด ด่าง 7.4 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที)

6 Brain Heart Infusion Broth with 2.0% NaCl

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Calf Brians, Infusion from	200
Beef Heart, Infusion from	250
Proteose peptone	10
Dextrose	2
Sodium chloride	20
Disodium Phosphate	2.5
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด ด่าง 7.4 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตราฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121°C 15 นาที)

7 0.125 % glutaraldehyde

ส่วนประกอบ	มิลลิลิตร
Glutaraldehyde	0.125
LHM	100

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่ 4°C

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและสีย้อมเพื่อการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 Davidson's fixative (Bell and Lightner, 1988)

95% ethyl alcohol	330 มิลลิลิตร
100% formalin (formaldehyde 37-39%)	220 มิลลิลิตร
glacial acetic acid	115 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	335 มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.2 Hematoxylin และ Eosin (H&E) (Humason, 1979)

1.2.1 การเตรียม Mayer's hematoxylin

hematoxylin crystals	4.0 กรัม
น้ำกลั่น	2000 มิลลิลิตร
Sodium iodate	0.8 กรัม
Potassium หรือ Ammonium alum	200 กรัม
Citric acid	4.0 กรัม
Chloral hydrate	200.0 กรัม

ละลาย alum ในน้ำกลั่นแล้วเติม hematoxylin คนให้ละลาย เติม Sodium iodate ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้สีอมม่วง (red-dish violet) ควรทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

1.2.2การเตรียม Eosin

eosin Y, CI 45380	3.0 กรัม
70% ethyl alcohol	1000.0 มิลลิลิตร
glacial acetic acid	5.0 มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกันแล้วเติม glacial acetic acid 2-3 หยดก่อนใช้

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาทางพยาธิวิทยา

2.1 fix ตัวอย่างกุ้งด้วย Davidson's fixative ทิ้งไว้ 24-72 ชั่วโมง ถ้าหากเกินระยะเวลาให้ย้ายตัวอย่างลงในเอธิลแอลกอฮอล์ 50% เก็บตัวอย่างได้นานโดยไม่จำกัดเวลา

2.2 ตัดชิ้นเนื้อเยื่อ ความหนาไม่ควรเกิน 0.5 เซนติเมตร

2.3 นำเนื้อเยื่อที่ได้มาผ่านขั้นตอนต่างๆ โดยใช้เครื่อง Automatic tissue processor ดังนี้

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	50% alcohol	0.5-1
2	70% alcohol	0.5-1
3	95% alcohol I	0.5-1
4	95% alcohol II	0.5-1
5	95% alcohol III	0.5-1
6	100% alcohol I	0.5-1
7	100% alcohol II	0.5-1
8	100% alcohol III	0.5-1
9	Chlorofrom I	1
10	Chlorofrom II	1.30
11	Parafin I	1.30
12	Parafin II	2

2.4 นำเนื้อเยื่อวางในพิมพ์ (mold) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (parafin embedding)

2.5 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้ มาแต่งหน้าให้เรียบ และตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้มีความหนา 4-5 ไมครอน

2.6 นำไปลอยในน้ำอุ่น 45-50 องศาเซลเซียส ให้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่างที่สมบูรณ์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์อย่างน้อย 3 ชั่วโมง

3. วิธีการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin โดยผ่านขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.1 นำสไลด์จากข้อ 6 ไปละลายพาราฟิน (deparaffinized) ด้วย Xylene และดูดน้ำ (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100% ถึง 70% ตามลำดับ แช่ในน้ำกลั่นนาน 2-3 นาที

3.2 ซับน้ำออกแช่ใน hematoxylin นาน 5-10 นาที ล้างในน้ำประปาที่ไหลเบาๆ นาน 2-3 นาที

3.3 ซับน้ำออก แช่ใน Eosin นาน 5-10 นาที

3.4 ดึงน้ำออกด้วย alcohol 95% แล้วทำให้สะอาดด้วย xylen นาน 2-3 นาที

3.5 ปิดด้วยกระจก (cover glass) ปิดให้แน่นด้วยน้ำยา permount

ภาคผนวก ค

การเตรียมสีย้อมและวิธีการย้อมสีเพื่อศึกษา Phagocytosis

1. การเตรียมสีย้อม Wright และ Giemsa

1.1 การเตรียม Wright stain

Wright eosin methyene blue	0.24 กรัม
Methyl alcohol	100 มิลลิลิตร

ละลายผง Wright's eosin methylene blue ใน Methyl alcohol จนหมดกรองใส่ขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ 5 วันก่อนใช้

1.2 การเตรียม Giemsa stain

1.2.1 Giemsa stock solution

ผง Giemsa	0.75 กรัม
methyl alcohol	75 กรัม
glycerine	25 กรัม

ละลายผง Giemsa กับ glycerine โดยค่อยๆ ใส่ผง Giemsa ทีละน้อยจนหมด ตั้งไฟให้อุ่นเพื่อให้การละลายดีขึ้น ทิ้งไว้ให้เย็นเติม methyl alcohol ทีละน้อยจนหมด กรองใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน ก่อนนำมาใช้

1.2.2 Haden's Phosphate Buffer

1.2.2.1 Stock solution

Monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4)	6.63 กรัม
Anhydrous dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4)	2.56 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

1.2.2.2 Working solution

Stock solution	3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	97 มิลลิลิตร

การเตรียม Giemsa working solution

นำ Giemsa stock solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับ working solution ของ Haden's phosphate buffer 9 มิลลิลิตร

2. การย้อมสีเม็ดเลือดเพื่อศึกษา Phagocytosis

2.1 นำ แผ่นสไลด์แช่ใน 100% Methanol 5 นาที

2.2 ย้อมด้วย Wright's stains 10 นาที

2.3 ล้างด้วยน้ำกลั่น 30 วินาที

2.4 ย้อมด้วยสี Giemsa 30 นาที

2.5 ล้างด้วยน้ำกลั่น 30 วินาที

2.6 ซับให้แห้งแล้ว mounted ด้วย permount

2.7 ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

วัสดุอาหาร	%
ปลาป่น	15.0
กากถั่วเหลือง	36.0
หัวและเปลือกกุ้งป่น	10.0
แป้งสาลี	20.0
รำ	12.0
ไขมัน	2.0
ลิกนิน	2.0
วิตามินรวม	0.5
แร่ธาตุรวม	0.5
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	1.0
วิตามินซี	0.038

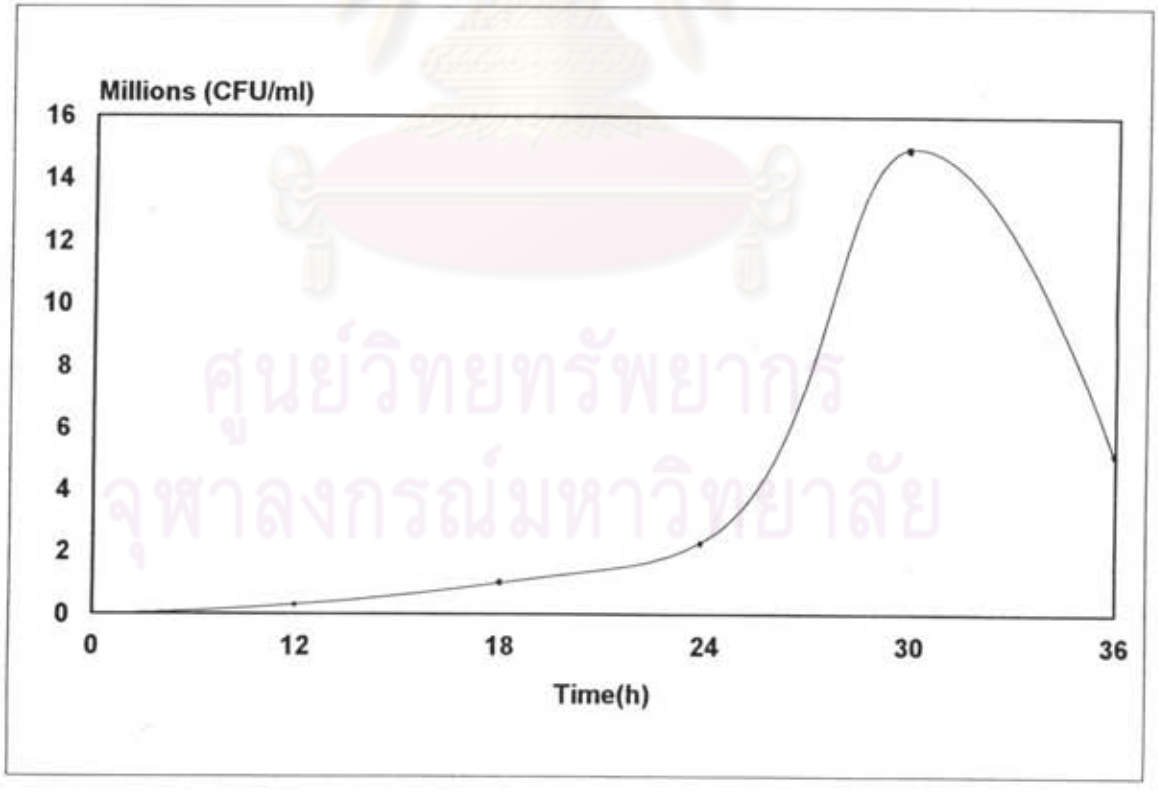
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *C. butyricum* สายพันธุ์ HA-1 (MAFF 519001)

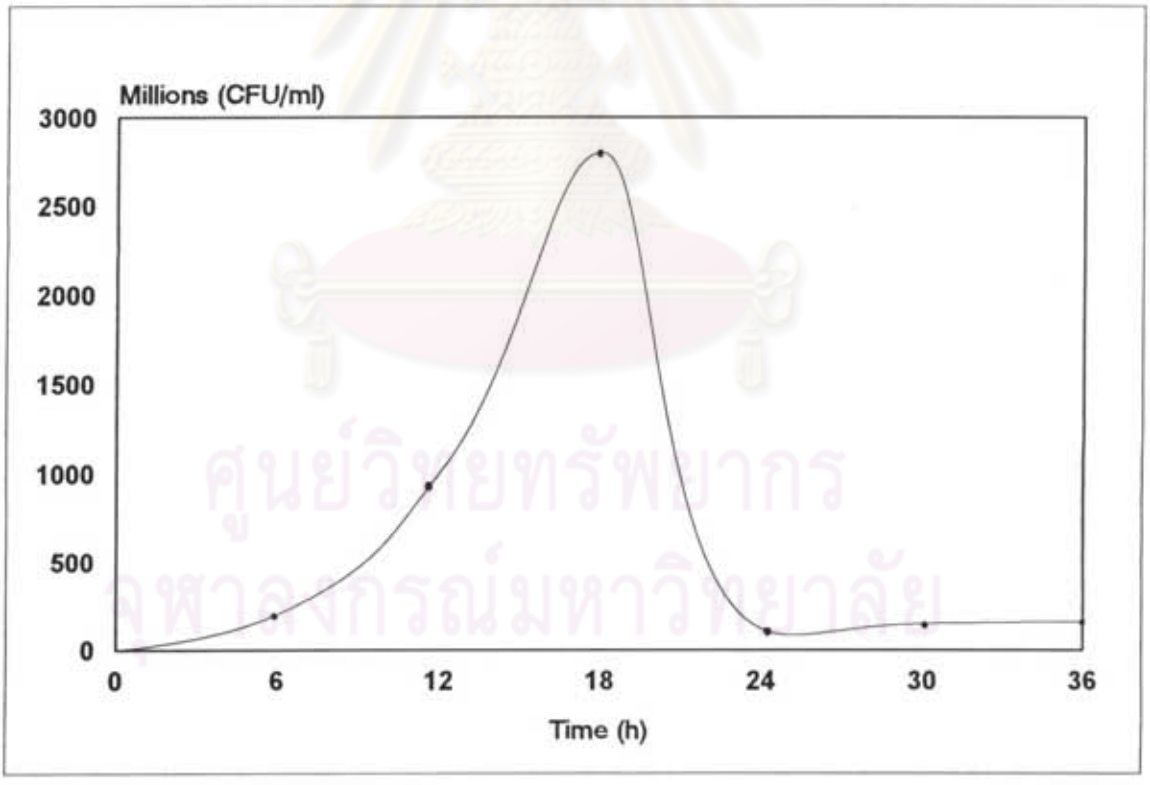
เมื่อนำ *C. butyricum* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70° C ปริมาตร 0.5 ml เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PYG ปริมาตร 200 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วัดปริมาณเชื้อโดยวิธี Spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PYG พบว่า *C. butyricum* จะเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 30 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.4×10^7 CFU/ml จากกราฟการเจริญที่ได้จึงควรเก็บเซลล์ของ *C. butyricum* ในช่วง late log phase คือ ที่เวลา 24-30 ชั่วโมง มาใช้ในการเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการเสริมภูมิคุ้มกัน เนื่องจากหลังจากเข้าสู่ระยะ Stationary phase เซลล์จะมีการสร้างสปอร์ ซึ่งจะทำให้คุณสมบัติของผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ D003

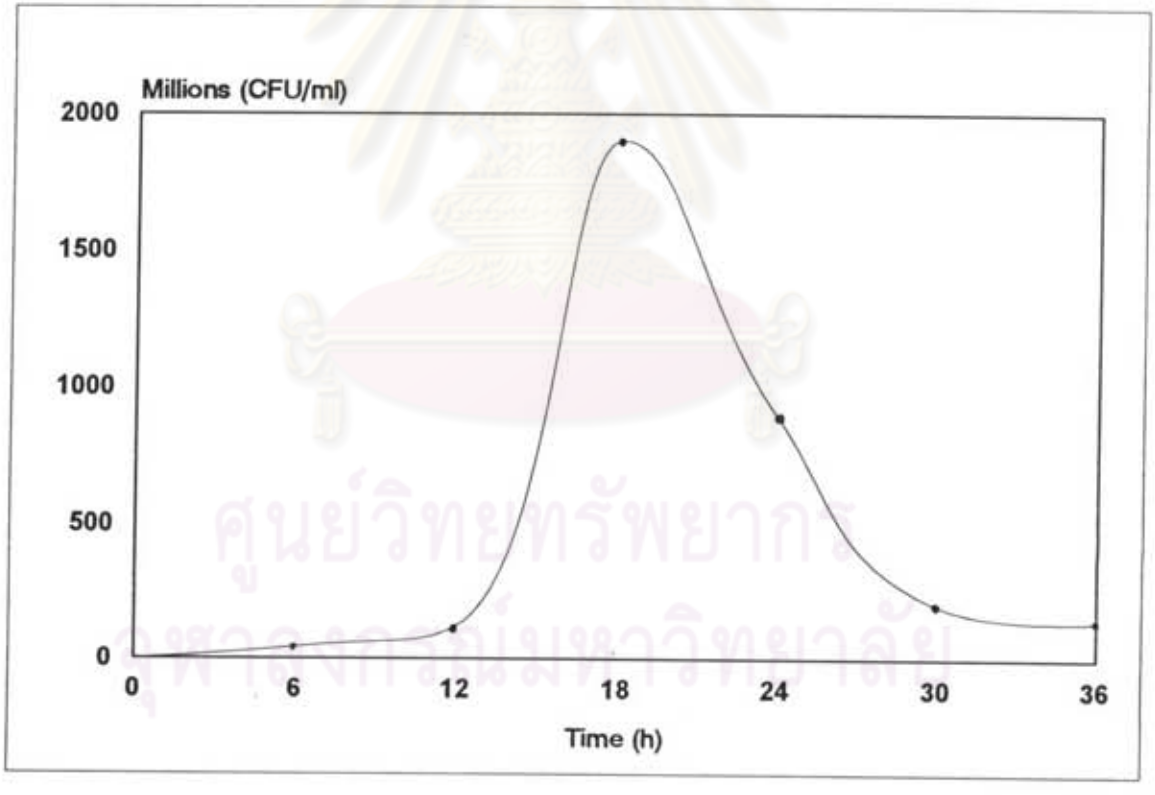
เมื่อนำ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70°C ปริมาตร 20 µl มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วัดปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS พบว่า *V. parahaemolyticus* จะเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.0×10^9 CFU/ml จากกราฟการเจริญที่ได้ จึงควรนำ *V. parahaemolyticus* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย (challenge test) จาก *V. parahaemolyticus* ซึ่งในการทดสอบใช้วิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. *Vibrio* sp. สายพันธุ์ D006

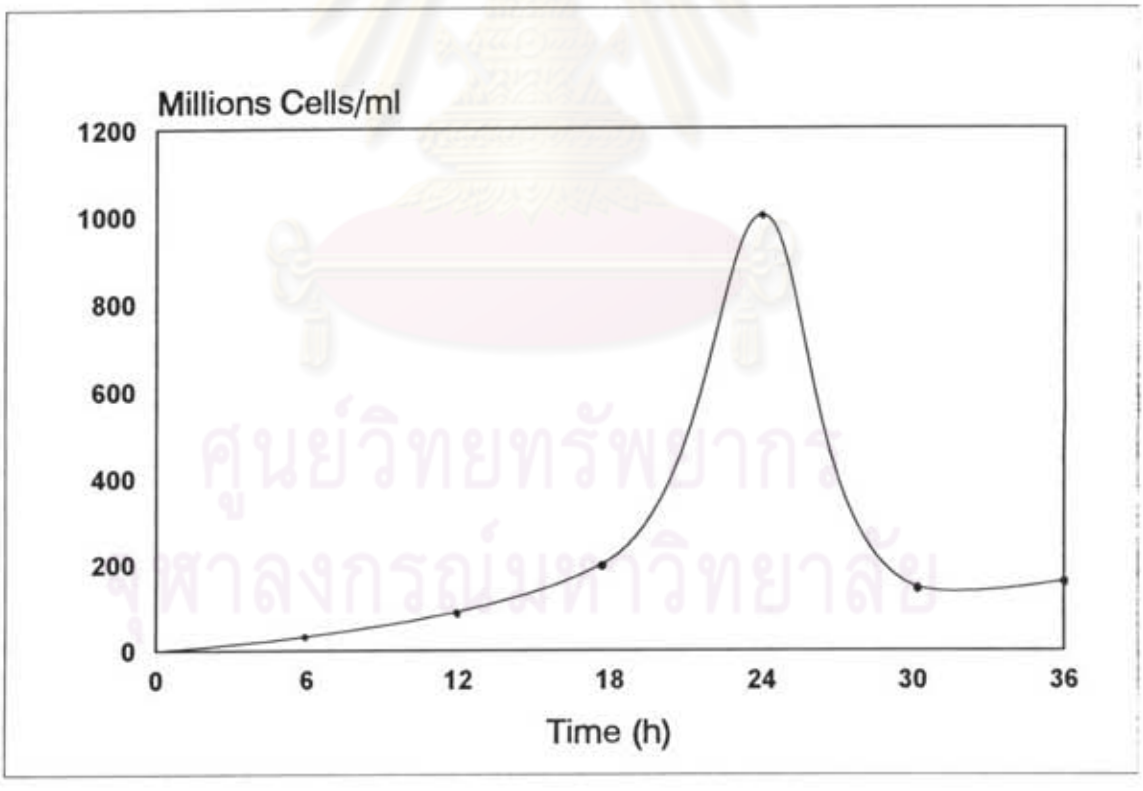
เมื่อนำ *Vibrio* sp. ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่ -70°C ปริมาตร 20 µl มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS พบว่า *Vibrio* sp. จะเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ stationary phase ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 9.9×10^8 CFU/ml จากกราฟการเจริญที่ได้ จึงควรนำ *Vibrio* sp. ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาใช้ในการทดสอบหา bactericidin titer



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. *V. harveyi* สายพันธุ์ D331

เมื่อนำ *V. harveyi* ซึ่งเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ -70°C ปริมาตร 25 µl เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ที่เพิ่มโซเดียมคลอไรด์ 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS พบว่า *V. harbeyi* จะเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่เวลา 18 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.0×10^9 CFU/ml จากกราฟการเจริญที่ได้ จึงควรนำ *V. harveyi* ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมงมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย (challenge test) จาก *V. harveyi* ซึ่งในการทดสอบใช้วิธีการแช่



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

คุณภาพน้ำที่กุ้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ

Parameter	Optimum value	Reference
pH	7.5-8.5	ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2538
	7.3-8.8	Chiang et al., 1989
HCO_3 (ppm)	>80-160	Boyd, 1989
NH_3-N (ppm)	<0.4-2.0	Boyd, 1989
NO_2-N (ppm)	<3.8	Chen and Lei, 1990
NO_3-N (ppm)	not toxic (0.01-0.05 ppm in natural water)	Wetzel, 1975

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจันทนา นิธิเมธาโชค เกิดเมื่อวันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2508 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2531 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ในปีการศึกษา 2536 ปัจจุบันทำงานในตำแหน่งพนักงานวิจัย อาวุโส แผนกสุขภาพกุ้ง ศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้ง บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ (มหาชน) จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย