

การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* จากตอนใต้ของไทยในกุ้งกุลาดำ

จรีพร เรืองศรี¹ ไมตรี วรรณเดช¹ สุณีย์ หวันเหลี่ยม¹ อนิดา สงนุ้ย¹
สุภัตรา อรุณรัตน์² นพรัตน์ แท่นมาก¹ จิราพร เพชรรัตน์³ และ กิจการ สุภมาตย์⁴

Abstract

Ruangsi, J.¹, Wannades, M.¹, Wanlem, S.¹, Songnui, A.¹, Arunrat, S.¹, Tanmark, N.¹,
Pecharat, J.² and Supamattaya, K.¹

**Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand
in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius**

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(1) : 43-54

Ten isolates of bacteria were performed from diseased black tiger shrimp collected from farms in Nakhon Si Thammarat, Patthalung, Songkhla, Satun and Patthani. All isolates belonged to *Vibrio harveyi*, forming rounded colonies with smooth periphery and hemolysis of red blood cells. The colonies appeared green and yellow on TCBS selective media and indeed both luminescent and non-luminescent groups. To support good growth as cell proliferation, an addition of 2-8% salt to the culture media was required. Sensitivity tests against antibiotics showed that all ten isolates were sensitive to chloramphenicol, norfloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, oxolinic acid, oxytetracyclin and sarafloxacin at 80, 60, 50, 40, 40 and 30%, respectively. When 12-15 g juvenile shrimp were tested for the virulence by injection, the isolates were highly

¹Aquatic Animal Health Research Center, ²National Biological Control Research Center, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

¹วท.บ.(วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง วท.บ.(ชีววิทยา) ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ¹Ph.D.(Biological Control) รองศาสตราจารย์ ⁴Dr.rer.nat.(Fish Pathology) รองศาสตราจารย์ ศูนย์ชีววินทรีย์ภาคใต้ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: rjareepo@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 22 สิงหาคม 2546

รับลงพิมพ์ 20 ตุลาคม 2546

virulent with OD at 640 nm in the range 0.007-0.139. The bacteria concentration of 1.60×10^6 - 7.27×10^7 CFU/ml caused 50% juvenile mortality in ten days. The physiological changes after susceptibility included a decline in the blood cells ($p < 0.05$), higher plasma pH ($p < 0.05$), decrease in serum protein within 24 h ($p < 0.05$), and a return to normal levels within 48 h. There were no differences in blood sugar levels and phenoloxidase activity between the healthy and the infected individuals. Histological study showed that at an early period of susceptibility, there were swollen tubular lumen, minor cell degeneration of the hepatic tubules and lymphoid organs and aggregation of blood cells around the degenerating cells. During 7-day susceptibility period, there was large scale cell degeneration of the hepatopancreas, lymphoid organs, gills and blood forming organs with a great extent of blood cell aggregation and eventually mortalities occurred. During 14 day susceptibility period, there was almost entire degeneration of cells in hepatic tubules and lymphoid organs causing hepatopancreatic tubular necrosis. During this period, juveniles did not accept feed and total mortality occurred.

Key words : vibriosis, luminescent vibrio, pathogenesis, virulence, *Vibrio harveyi*, black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ

จรีพร เรืองศรี ไมตรี วรรณเดช สุณีย์ หวันเหลี่ยม อนิดา สงนุ้ย สุพัตรา อรุณรัตน์ นพรัตน์ แทนมาก จิราพร เพชรรัตน์ และ กิจการ สุขมาตย์

การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* จากตอนใต้ของไทยในกุ้งกุลาดำ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(1) : 43-54

ผลการทดสอบแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา สตูล และปัตตานี จัดเป็น *Vibrio harveyi* ที่มีลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ ละลายเม็ดเลือดแดง และต้องการเกลือ 2-8% ในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มีทั้งกลุ่มสีเขียวและสีเหลือง เรืองแสงและไม่เรืองแสงในที่มีด เชื้อ 10 ไอโซเลต ไวต่อยาคลอแรมเฟนิคอล นอร์ฟล็อกซาซิน ไตร-เมธโรพริม-ซัลฟาเมทอกซาโซน ออกโซลินิก แอซิด ออกซีเตตราซัยคลิน และ ซาราฟล็อกซาซิน ทดเป็น 80 60 50 40 40 และ 30% ตามลำดับ การศึกษาพบปริมาณเชื้อที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 50% ภายใน 240 ชั่วโมง ตั้งแต่ 1.60×10^6 - 7.27×10^7 CFU/ มล มีค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.007-0.139

หลังการติดเชื้อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดสูงกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้ออย่างชัดเจน ($p < 0.05$) ปริมาณโปรตีนในซีรัมลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ($p < 0.05$) แต่เพิ่มขึ้นสู่ภาวะปกติภายใน 48 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของปริมาณกลูโคสในเลือด และกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสระหว่างกุ้งที่ติดเชื้อและกุ้งปกติ

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบในช่วงแรกที่กุ้งติดเชื้อ tubular lumen ของตับและต่อมหน้าเหลืองขยายใหญ่ขึ้น เซลล์ในท่อตับและต่อมหน้าเหลืองตายเล็กน้อย พบเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับเซลล์ที่ตายชัดเจน กุ้งที่ติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ในตับ ต่อมหน้าเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ตายเป็นบริเวณกว้างมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับมากขึ้น กุ้งทยอยตาย กุ้งที่ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ตับและต่อมหน้าเหลืองเกือบทั้งหมดตายเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis ในระยะดังกล่าวกุ้งไม่กินอาหารและตายทั้งหมด

โรคติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio โดยเฉพาะ *Vibrio harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงทำให้เกิดความสูญเสียให้กับธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะ

ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย การศึกษาในหลายๆ ประเทศ แถบเอเชียพบว่า เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่ระบาดทั่วไปมีความรุนแรงและมีแนวโน้มต่อการดื้อยา

ปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดอัตราการตายที่ค่อนข้างสูง และเร็วกว่าในอดีต อย่างไรก็ตามการวิจัยเกี่ยวกับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ในประเทศไทยยังมีอยู่ไม่มากและไม่ชัดเจน การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ ทำให้สามารถนำไปประกอบการจัดการในส่วนของ การเลี้ยงได้ การวิจัยนี้จึงศึกษาถึงการเกิดโรค และความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ก่อให้เกิดโรค เรื่องแสงในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในภาคใต้ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในตัวกุ้งกุลาดำ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อหลังการติดเชื้อ ซึ่งสามารถนำมาเป็นแนวทางในการจัดการให้เหมาะสมกับความรุนแรง และช่วงของการติดเชื้อเพื่อลดการสูญเสียที่เกิดขึ้นในช่วงการเลี้ยง อีกทั้งเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและบริษัทเอกชนที่เกี่ยวข้องกับธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ได้ รวมถึงกรมประมง และนักวิชาการต่างๆ ที่จะนำผลการวิจัยไปศึกษาเพิ่มเติมให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

1.1 เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งต่างๆ ในเขตภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสงขลา จังหวัดปัตตานี จังหวัดสตูล และจังหวัดพัทลุง พื้นที่จังหวัดละ 2 ไอโซเลต ทำการแยกแบคทีเรียจากตับอ่อน (hepatopancreas) หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และแยกต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ 1.5% จนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสรีรวิทยา และศึกษาคุณสมบัติการละลายเม็ดเลือดโดยนำเชื้อที่บริสุทธิ์เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar (BA)

1.2 เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เกษตรกรนำเข้ามาตรวจสอบสุขภาพและวินิจฉัยโรค ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2542 - สิงหาคม 2543 เก็บตัวอย่าง

โดยเฉพาะเลี้ยงแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และแยกต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ 1.5% จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion method (MacFaddin, 1980)

2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์ในข้อ 1.1 มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (MacFaddin, 1980) โดยทดสอบ เอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) เอนไซม์คะตะเลส (catalase test) ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ อะราบีโนส กลูโคส มอลโตส แมนนิทอล ซูโครส อินโนซิทอล ซอร์บิทอล เมลลิไธส แรมโนส ฟรุคโตส แลคโตส แมนโนส L-อาร์จินิน L-ออร์นิติน การทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ คือ อะไมเลส เจลลาติเนส ยูริเอส อาร์จินินไดไฮโดรเลส (arginine dihydrolase) ดีคาร์บอกซิเลส 2 ชนิด คือ ไลซีน (lysine) และออร์นิติน (ornithine) ทริปโทเฟนดีซามิเนส (tryptophane desaminase) การสร้างอินโดล (indole) การสร้างกรด (methyl red test) การสร้างอะซิโตอิน (acetoin) การใช้ซิเตรต (citrate utilization) การเจริญที่อุณหภูมิ 0 4 20 37 40 และ 50°C และการเจริญในสารละลายเกลือ (NaCl) ที่ระดับ 0 2 6 8 10 และ 12% จากนั้นแยกชนิดของเชื้อตามขั้นตอนของ Baumann และคณะ (1984) และ Alsina และ Blanch (1994)

3. ทดสอบความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ

เชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ที่แยกไว้ในข้อ 1.1 จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาทดสอบความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion method (MacFaddin, 1980) วัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นและแปลผลโดยใช้ตารางมาตรฐานในการแปลผลความไวต่อสารปฏิชีวนะ

4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi*

นำเชื้อ *V. harveyi* 10 ไอโซเลต ที่บริสุทธิ์มาทดสอบความรุนแรงของเชื้อในกุ้งกุลาดำขนาด 12-15 กรัม โดยนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาละลายในสารละลายเกลือ 1.5% ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กันประมาณ 7 หลอด สารละลาย

เชื้อแต่ละหลอดแบ่งเป็น 3 ส่วนเพื่อนำไปเจือจางและเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ 1.5% เพื่อนับปริมาณเชื้อต่อมิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร และนำมาฉีดเข้ากึ่งกลูตาต้าจำนวน 10 ตัว บันทึกเวลาและจำนวนกึ่งที่ตายหลังจากฉีดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 10 วัน แล้วนำผลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีการของ Reed and Muench (1938) แยกเชื้อแบคทีเรียจากตับและกล้ามเนื้อของกึ่งที่ป่วยตายมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อว่าเป็นเชื้อเดียวกัน

5. การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของกึ่งกลูตาต้าก่อนและหลังการติดเชื้อ

ฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า LD_{50} ที่ 10 วัน เข้ากึ่งกลูตาต้าขนาดประมาณ 12-15 กรัม ในปริมาณ 0.1 มล/ ตัว กลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือ (1.5% NaCl) ปริมาตรเท่ากัน และเลี้ยงกึ่งในน้ำทะเลความเค็ม 25 ส่วนในพัน อุณหภูมิ 28-30°C ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวมของกึ่งกลูตาต้า ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามวิธีการของกิจการและสิทธิ (2538) โดยเจาะเลือดกึ่งจากชุดควบคุมและชุดติดเชื้อช่วงเวลาละ 20 ตัว ละ 0.1 มล ผสมกับทริปแฟนบลู (trypan blue) 0.25% 0.9 มล หลังจากผสมกันดีแล้วนำมานับเม็ดเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและสไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) จำนวนปริมาณเม็ดเลือด/ ลบ.มล

วิเคราะห์ห้องคัพประกอบเลือดคือปริมาณโปรตีนในซีรัมโดยเจาะเลือดกึ่งจากชุดควบคุมและชุดติดเชื้อช่วงเวลาละ 20 ตัว ละ 0.4-0.5 มล วางให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง บดเลือดแล้วปั่นแยกด้วยเครื่องเซนต์ริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C แยกส่วนใส (ซีรัม) เพื่อวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) เก็บตัวอย่างเลือด 0.1 มล ผสมกับ trichloro acetic acid (TCA) 3% 1 มล ปั่นแยกด้วยเครื่องเซนต์ริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด ตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) เลือดที่เจาะประมาณ 0.1-0.2 มล. นำมาวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดทันที

โดยใช้ micro-probe pH meter (Metler Delta) และวัดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดโดยเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Soderhall และคณะ (1988) ตามขั้นตอนที่รายงานโดยกิจการและคณะ (2543 ก)

6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ทำการเตรียมกึ่งทดลองเช่นเดียวกับการทดลองการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและเก็บตัวอย่างกึ่งกลูตาต้าในชุดควบคุมและชุดติดเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ ชุดละ 10 ตัว ตามวิธีการของ Bell และ Lightner (1988) โดยฉีด Davidson's fixative เข้าในส่วนของตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อลำตัวหลายๆ บริเวณ ประมาณ 1-2 มล/ตัว หลังจากนั้นตัดแยกส่วนหัว ลำตัว ตอในน้ำยาชนิดเดิมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเปลี่ยนลงแช่ในแอลกอฮอล์ 50% แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยการขจัดน้ำออก (dehydration) นำพาราฟินเข้า (infiltration) และตัดให้มีความบาง 3-5 ไมครอน ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซียลีน และอีโอซิน (Humason, 1979) ตรวจสอบผลและบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเปรียบเทียบผลกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้พบว่า กึ่งกลูตาต้าที่ป่วยเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio จะมีการภายนอกคือ ตัวกึ่งมีสีเข้ม เปลือกกรอบแกรบ ตัวหลวม มีน้ำขังในบริเวณข้อต่อระหว่างส่วนหัวและลำตัวมากกว่ากึ่งปกติ นอกจากนั้นลักษณะที่สังเกตได้ภายนอกคือเปลือกและระยางค์ร่อนบางบริเวณ เชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่จัดเป็น *V. harveyi* (Table 1) อย่างไรก็ตามในครั้งนี้นพบว่ามีบางไอโซเลตเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4°C และในน้ำที่มีเกลือ 10% ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในอดีต (Baumann et al., 1984, Jiravanichpaisan et al., 1994; Suwanto et al., 1998) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปรับตัวให้ทนต่ออุณหภูมิและความเค็มช่วงกว้างขึ้น สัมพันธ์กับการศึกษาของสุภญาและคณะ (2543) ที่ว่าเชื้อ *V. harveyi* เจริญได้

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *Vibrio* isolates from difference areas of southern part of Thailand.

Characteristics	V002	V018	V022	V031	V039	V045	V046	V048	V049	V050
Growth on TCBS	G	G	G/Y	G	G	G	G	G	G	G
Luminescent	N	N	L	L	L	L	L	L	L	L
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduction of NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Enzyme production										
- Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptophane desaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensitive to 0/129 (150 ug)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of										
- Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Arabinose	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
- Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at										
0°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4°C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(to be continued)

Table 1. (Continued)

Characteristics	V002	V018	V022	V031	V039	V045	V046	V048	V049	V050
Growth in NaCl at										
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	-	-	-	+/-w	-	-	-	-	-	-
12%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identification	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh	Vh

Note: G = green, Y = yellow, L = luminescent, N = non-luminescent, + = positive, - = negative, +/- = not clear, w = weak, Vh = *Vibrio harveyi*

ดีในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 5-60 ส่วนในพัน โดยเฉพาะในน้ำที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 25-32°C จะเจริญได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ Lavilla-Pitogo และคณะ (1998) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีที่ความเค็มตั้งแต่ 5-70 ส่วนในพัน จึงอาจจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้มีการแพร่ระบาดได้เป็นบริเวณกว้างทั่วทุกภูมิภาคของโลก

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความไวต่อสารปฏิชีวนะ 6 ชนิดแตกต่างกัน (Table 2) ส่วนตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่เก็บรวบรวมจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคพบว่าเชื้อแบคทีเรียมากกว่าครึ่งของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่แยกได้คือต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เว้นแต่สารปฏิชีวนะในกลุ่มนอร์ฟล็อกซาซิน ที่พบว่าเพียง 35.55% ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมด ที่ต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้ (Table 3) ซึ่งแตกต่างจากรายงานก่อนหน้าโดย Ruangpan (1997) ที่พบว่าเชื้อกลุ่มเดียวกันไวต่อยาเกือบทุกชนิด เช่นเดียวกับ

มณฑลเชียร และคณะ (2533) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* 93 ไอโซเลต ไม่ติดต่อยาคลอแรมเฟนิคอล และไตรเมทโทพริมเลย จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่แบคทีเรียมีการปรับตัวคือต่อยาบางกลุ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

ผลการศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* 10 ไอโซเลตที่แยกจากพื้นที่ต่างกัน พบว่าเชื้อบางไอโซเลตมีความรุนแรงสูงมาก โดยปริมาณที่ทำให้กุ้งตาย 50% ภายใน 10 วัน มีค่าเพียง $1.60-3.79 \times 10^6$ CFU/มล และจากข้อมูลโดยรวมพบว่าปริมาณเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 50% ภายใน 10 วัน มีค่า $1.11-7.27 \times 10^7$ CFU/มล และมีการดุดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 640 นาโนเมตร 0.007-0.136 (Table 4) ซึ่งพบว่ามีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับรายงานของมณฑลเชียรและคณะ (2533) ที่ทดสอบความรุนแรงของ *V. harveyi* ที่แยกจากลูกกุ้งกุลาดำ พบความเข้มข้นของเชื้อจากการวัดค่าการดุดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร มีค่าถึง 0.54-0.84 จึงทำให้ลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วาร์ 7 (PL7) ตาย

Table 2. Sensitivity of *Vibrio harveyi* isolates from infected shrimp from difference areas of southern part of Thailand

Antibiotic	No of tested isolates	Sensitivity (%)	Resistance (%)
Oxolinic acid	10	40	60
Norfloxacin	10	60	40
Oxytetracyclin	10	40	60
Sulfamethoxazole trimetroprim	10	50	50
Sarafloxacin	10	30	70
Chloramphenicol	10	80	20

Table 3. Sensitivity of different isolates of *Vibrio* spp. isolated from infected shrimp during October 1999 - August 2000.

Antibiotic	No of tested isolates	Sensitivity (%)	Resistance (%)
Norfloxacine	52	64.45	35.55
Chloramphenicol	110	32.69	67.31
Oxolinic acid	110	27.27	72.73
Sulfamethoxazol -trimetophrim	93	30.91	69.09
Oxytetracyclin	51	31.18	68.82

Table 4. Virulence of different isolates of *Vibrio harveyi* collected from different areas of southern part of Thailand after infestation in 12-15 g of black tiger shrimp by injection method.

Isolates	OD 640	LD ₅₀ at 10 days (CFU/ml)
V002	0.059	2.73×10 ⁷
V018	0.053	4.08×10 ⁷
V022	0.139	7.27×10 ⁷
V031	0.095	5.00×10 ⁷
V039	0.063	4.65×10 ⁷
V045	0.059	1.11×10 ⁷
V046	0.081	1.60×10 ⁶
V048	0.007	3.79×10 ⁶
V049	0.069	3.17×10 ⁷
V050	0.096	4.97×10 ⁷

OD = optical density LD = lethal dose

ประมาณ 50% ทั้งที่การศึกษาดังกล่าวทดลองในลูกกุ้งซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อโรคต่ำกว่ากุ้งใหญ่ การศึกษารังนี้จึงชี้ให้เห็นว่า *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคและสร้างความเสียหายมากในธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีความรุนแรงสูงขึ้น นอกจากนั้นการศึกษาพบว่าเชื้อที่แยก 10 ไอโซเลต มีจำนวนถึง 8 ไอโซเลตที่เรืองแสง และจากผลการทดลองพบเชื้อมีความรุนแรง และมีเปอร์เซ็นต์ในการติดต่อสารปฏิชีวนะสูงกว่าไอโซเลตที่ไม่เรืองแสง สัมพันธ์กับข้อสังเกตของ Abraham และคณะ (1997) ที่พบว่าเชื้อ *V. harveyi* ไอโซเลตที่เรืองแสงมีการติดต่อสารปฏิชีวนะสูงกว่าไอโซเลตที่ไม่เรืองแสง

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของตัวกุ้งโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดตั้งรายละเอียดใน Table 5 พบกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณ

เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่ากุ้งปกติมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเป็นสิ่งแปลกปลอมเมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งเม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับเพื่อกำจัดออกนอกตัว จึงทำให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Martin และคณะ (1993) ที่ว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง *Sicyonia ingentis* ลดลง 20% หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับรายงานของกิจการและคณะ (2543 ข) ที่ได้ฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกุ้งพบว่าปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงทันทีในชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 2 และ 3 และเมื่อตรวจผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบเม็ดเลือดจำนวนมากเข้ามาล้อมจับเซลล์ยีสต์ อย่างไรก็ตามการทดลองดังกล่าวพบปริมาณเม็ดเลือดเริ่มไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากชั่วโมงที่ 4 แล้วจะเพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง และเข้าสู่ระดับปกติภายใน 48 ชั่วโมง ในขณะที่

Table 5. Blood components of 12-15 g of black tiger shrimp during 24 and 48 hours after bacteria infestation.

Parameters	24 h post injection*		48 h post injection*	
	Control	Treatment	Control	Treatment
THC ($\times 10^7$ cell/ml)	3.36 \pm 1.30 ^a	2.15 \pm 1.03 ^b	3.52 \pm 1.27 ^a	2.33 \pm 1.42 ^b
Blood pH	7.68 \pm 0.22 ^a	7.89 \pm 0.14 ^b	7.62 \pm 0.17 ^a	7.89 \pm 0.14 ^b
Blood glucose (mg %)	23.14 \pm 9.05 ^a	24.55 \pm 9.0 ^a	25.58 \pm 4.79 ^a	26.13 \pm 9.43 ^a
Serum protein (g %)	29.20 \pm 5.28 ^a	22.63 \pm 7.58 ^b	28.52 \pm 9.38 ^a	28.32 \pm 6.84 ^a
PO activity (unit/ min/ mg protein)	298.25 \pm 174.26 ^a	469.66 \pm 412.68 ^a	195.35 \pm 58.45 ^a	188.76 \pm 67.27 ^a

Means \pm SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different ($p > 0.05$)

* n = 20

ที่ทดลองครั้งนี้แม้ว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง กุ้งยังคงมีปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนในระดับต่ำมาก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งอาจเป็นเพราะแบคทีเรียที่เข้าสู่ตัวกุ้งสามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้น จึงทำให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต้องทำหน้าที่ในการกำจัดอย่างต่อเนื่อง

นอกจากนั้นผลการทดสอบการละลายเม็ดเลือดพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถละลายเม็ดเลือดได้ ซึ่งสนับสนุนรายงานของ Lee และคณะ (1995) ที่ว่าแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอบางสายพันธุ์สามารถผลิตสาร hemolysin ที่ละลายเม็ดเลือดทำให้เม็ดเลือดตายแล้วถูกกำจัดออกนอกตัวกุ้ง นอกจากนี้ Montero และคณะ (1999) ตรวจพบสาร hemolysin ที่มีความเข้มข้นสูงมากจากสารที่ผลิตออกมานอกเซลล์ของ *V. harveyi* เมื่อทดสอบคุณสมบัติในการละลายเม็ดเลือดพบว่าสามารถละลายเม็ดเลือดแดงของ ลา ม้า และแกะ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นไปได้ว่าเม็ดเลือดบางส่วนถูกละลายด้วยสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรียแล้วถูกกำจัดออกนอกร่างกาย จึงทำให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง

สำหรับผลการศึกษาค่าประจวบเลือดพบความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งจากรายงานการศึกษาของกิจการและคณะ (2543 ก) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำปกติในสภาพบ่อเลี้ยงมีค่าเฉลี่ย 7.4 และในกรณีที่น้ำกุ้งปกติมาเลี้ยงไว้ในสภาพของบ่อทดลองความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดจะเพิ่มขึ้นโดยมีค่าเฉลี่ย 7.7 แต่การศึกษานี้พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ

เลือดสูงถึง 7.89 สอดคล้องกับรายงานของยอดยิ่ง (2541) ที่ว่าเมื่อแบคทีเรียเข้าไปในกระแสเลือด แบคทีเรียจะใช้เลือดซึ่งมีโปรตีนและสารอาหารต่างๆ เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ และในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ แอมโมเนียอิสระ รวมทั้งสารประกอบพวก phenate ที่มีฤทธิ์เป็นด่างถูกผลิตและปล่อยออกมา ส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้น ดังนั้นความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดที่เพิ่มกว่าค่าปกตินี้จะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติจากการติดเชื้อได้ โดยเฉพาะความผิดปกติจากเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งที่เกิดการติดเชื้อในกลุ่มอื่นๆ มาก่อน แต่มีรายงานว่า การผันแปรของค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งอาจมีผลมาจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อม เช่น กุ้งขาว *P. paulensis* มีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแอมโมเนียมากกว่า 20 ส่วนในล้าน (Schmitt and Santos, 1999) ซึ่งในสภาพการเลี้ยงจริงๆ นั้น ผู้ประกอบการสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียไม่ให้มีค่าเกิน 0.05 ส่วนในล้านอยู่แล้ว ปัจจัยดังกล่าวจึงไม่น่าจะมีผลมากนัก

ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรัมพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงที่ติดเชื้อปริมาณโปรตีนในซีรัมมีค่าต่ำมากแต่เมื่อผ่านไปจนถึง 48 ชั่วโมงไม่พบความแตกต่าง เช่นเดียวกับปริมาณกลูโคสในเลือด และความว่องไวของฟีนอลออกซิเดส ก็ไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามปริมาณกลูโคสในเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่ง

เป็นเพราะการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งอยู่ในสภาวะที่มีความเครียด จากรายงานของ Hall และ Van-Ham (1998) พบว่าในภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด เช่น จากการลดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจาก 6.6 มก/ลิตร เหลือ 5.9 มก/ลิตร มีผลให้ปริมาณกลูโคสในเลือดกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นจาก 1.1 มิลลิโมล/ลิตร เป็น 2.3 มิลลิโมล/ลิตร และจากรายงานของ Luo (1996) ที่ศึกษาในกุ้งชาวจีน *P. chinensis* ที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มไวรัสโอมีปริมาณกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น และปริมาณของโปรตีนในซีรัมลดลงเล็กน้อยเช่นกัน ส่วนความว่องไวของฟีนอลออกซิเดสที่พบว่าในช่วงแรกมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม อาจเป็นเพราะกุ้งได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ผนังเซลล์มีส่วนประกอบของลิโปพอลิแซค-

คาร์ไรด์และเพปทิโดไกลัยแคน ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Unestem and Soderhall, 1977) จึงทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดความว่องไวของฟีนอลออกซิเดส และระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ในร่างกายได้ สัมพันธ์กับรายงานของ Sung และคณะ (1996) ที่ว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ *V. vulnificus* ที่ฆ่าด้วยความร้อน, β -1,3 glucan และ Zymosan ด้วยการแช่ความว่องไวของฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 3 ชั่วโมง แรกหลังจากการแช่ และมีค่าลดลงอยู่ในระดับปกติที่ 72 ชั่วโมง จากรายงานของ Devaraja และคณะ (1998) พบว่าความว่องไวของฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งที่ให้กินอาหารผสมแบคทีรินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *V. harveyi* และกลูแคนมีค่าเพิ่มขึ้น

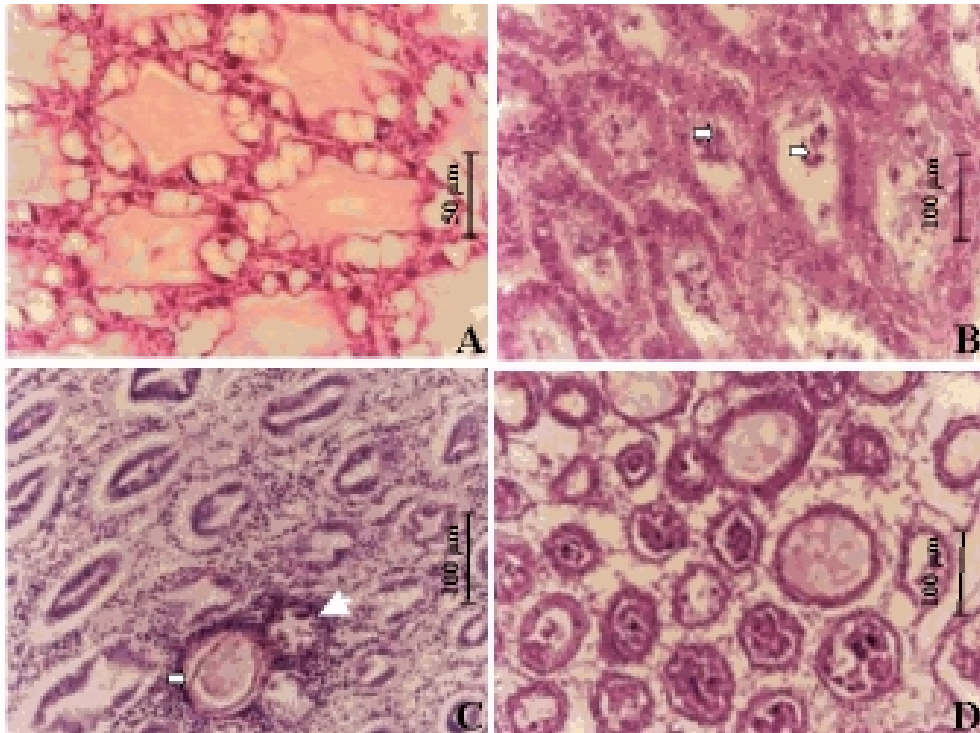


Figure 1. (A) Normal hepatopancreas of *Penaeus monodon*, (bar = 50 μ m). (B) Early stages (48 h) of *Vibrio harveyi* in hepatopancreas, showed necrosis of tubular epithelium and cell detachment (open arrow, bar = 100 μ m). (C) Chronic infection (7 day) of hepatopancreas, exhibited hemocytic infiltration in intertubular space and atrophy of hepatopancreatic tubules (arrow, bar = 100 μ m). Bacterial cells filled the tubular lumen of hepatopancreas (open arrow, bar = 100 μ m). (D) Chronic infection (14 day), the figure showed tubular degeneration and dilation of intertubular spaces of hepatopancreas, (bar = 100 μ m). (H&E stained)

กว่าชุดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน แสดงว่าองค์ประกอบของผนังเซลล์ หรือสารประกอบอื่นที่ผลิตจากแบคทีเรีย และยีสต์ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งได้ ซึ่งแนวทางดังกล่าวสามารถพัฒนาการผลิตวัคซีนหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่าในช่วงแรกที่กุ้งติดเชื้อ tubular lumen ของตับและต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ขึ้น เซลล์ในท่อตับและต่อมน้ำเหลืองตายเล็กน้อย พบเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับเซลล์ที่ตายชัดเจน กุ้งที่ติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ในท่อตับและต่อมน้ำเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ตายเป็นบริเวณกว้างมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับมากขึ้น กุ้งทยอยตาย กุ้งที่ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ตับและต่อมน้ำเหลืองเกือบทั้งหมดตายเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis (Figure 1, A-D) ในระยะดังกล่าวกุ้งไม่กินอาหารและตายทั้งหมด

ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อข้างต้น น่าจะส่งผลให้กระบวนการต่างๆ ในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป เพราะการอักเสบของเหงือก แอ่งเลือด อาจทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจน ความสามารถในการจับออกซิเจนของเม็ดเลือดลดลง ซึ่งมีผลให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอในการเลี้ยงเซลล์ หรือในกระบวนการหายใจของเซลล์ ส่วนการอักเสบและตายของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะที่เห็นได้ชัดเจนคือ เซลล์ตับและตับอ่อน และต่อมน้ำเหลือง จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของตัวกุ้งลดลง กินอาหารลดลง อ่อนแอ มีการแทรกซ้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย จนทำให้เกิดการตายสร้างความสูญเสียในที่สุด ดังนั้นแนวทางในการจัดการเพื่อหลีกเลี่ยง หรือลดความสูญเสียจากเชื้อดังกล่าวสามารถทำได้ โดยการตรวจสอบสุขภาพของกุ้งอย่างสม่ำเสมอ ในกรณีที่กุ้งเริ่มติดเชื้อควรมีการทดสอบและเลือกยาที่เหมาะสมในการรักษาโรค รวมทั้งควบคุมสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเพื่อลดความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และศูนย์ชีววินทรีย์ภาคใต้ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหา-

วิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนวิจัยบางส่วน แก่โครงการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์ จรีพร เรืองศรี สุภภา ศิริรัฐนิคม และ นรินทร์ สงสีจันทร์. 2543 ก. ศึกษาค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(ฉบับพิเศษ): 597-603.
- กิจการ ศุภมาตย์ วุฒิพร พรหมขุนทอง ชูติมา ตันติกิตติ และ Hoffmann, R.W. 2543 ข. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(ฉบับพิเศษ): 581-588.
- กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 1-17.
- มณฑียร ส่งเสริม บัญญัติ สุขศรีงาม และปภาศิริ ศรีโสภากรณ์. 2533. การศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. ว. ศรีนครินทร์วิโรฒ วิจัยและพัฒนา. 4: 15-24.
- ยอดยิ่ง เทพรานนท์. 2541. วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งอื่นๆ ในสกุล *Penaeus*: หลักการ รายละเอียดของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและกำจัดโรคและผลของการใช้วัคซีนกับกุ้งกุลาดำ. เอกสารทางวิชาการ, ทดลองและวิจัย, ศูนย์วิจัยกุ้งกุลาดำ มหาชัย.
- สุภภา ศิริรัฐนิคม จรีพร เรืองศรี ไมตรี วรรณเดช อภิญญา ส่งประดิษฐ์ นเรศ ชวนยุก วีรพงษ์ เทพอักษร และ กิจการ ศุภมาตย์. 2543. ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อไวรัสเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) ในน้ำทะเล. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(ฉบับพิเศษ): 697-705.
- Abraham, T.J., Manley, R., Palaniappan, R. and Dhevendaran, K. 1997. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. J. Aquacult. Tropics. 12: 1-8.
- Alsina, M. and Blanch, A.R. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol. 76: 79-85.

- Bell, T.A. and Lightner, D.V. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 114 p.
- Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. 1984. Section 5 facultatively anaerobic gram-negative rods. genus I *Vibrio pacini* 1954, 411 AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (eds. Krieg, N.R. and Holt, J.G.), Baltimore; Williams and Wilkins. 1: 518-538
- Devaraja, T.N., Ota, S.K., Shubha, G., Karuanasagar, I., Tauro, P. and Karunasagar, I. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio bacterin* and yeast glucan. In Advances in Shrimp Biotechnology. (ed. Flegel, T.W.), Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November, Chiang Mai, Thailand. 167-170.
- Hall, M.R. and Van-Ham, E.H. 1998. The effect of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World Aquacult. Soc. 29(3): 99-111.
- Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques. Freeman, W.H. and Company, San Francisco. 661 p.
- Hyvarinen, A. and Nikkila, E. 1962. Specific determination of blood glucose with o-toluidine. Clin. Chem. Acta. 7: 140-143.
- Jiravanichpaisan, P., Miyazaki, T. and Limsuwan, C. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health. 6: 27-35.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Albright, L.J. and Paner, M.G. 1998. Will microbial manipulation sustain the ecological balance in shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. In Advances in Shrimp Biotechnology, (ed. Flegel, T.W.), Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November, Chiang Mai, Thailand. 185-192.
- Lee, K.K., Chen, F.R. and Liu, P.C. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 5: 385-387.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Luo, R. 1996. Study on the contents of serum protein and glucose in the haemolymph of the shrimp *Penaeus chinensis*. Oceanol. Limnol. Sin Haiyang Yu Huzhao. 27: 476-480.
- MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 522 p.
- Martin, G.G., Poole, D., Poole, C., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., McKrell, N. and Wang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Invertebr. Pathol. 62: 308-315.
- Montero, A.B., Austin, B., Stewart-Tull, D.E.S., Dennis, P.J. and Godfree, A.F. 1999. Characterization of extracellular products from *Vibrio harveyi* carchariae with toxicity to *Nephrops norvegicus*. J. App. Microbiol. 85: p 259 .
- Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
- Ruangpan, L., Direkbusarakom, S., Danayadol, Y. and Srikaew, Y. 1997. Efficiency of commercial drug for control diseases in black tiger shrimp on the growth inhibition of luminous and *Vibrio* bacteria. Thech. Paper No. 19/1997 National Institute of Coastal Aquaculture, Songkhla. 10 p. (In Thai with English abstract)
- Schmitt, A.S.C. and Santos, E.A. 1999. Haemolymph nitrogenous constituents and nitrogen efflux rates of juvenile shrimp, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante), exposed to ambient ammonia-N. Aquacult. Res. 30: 1-11.
- Soderhall, K., Rogener, W., Newton, R.P. and Ratcliffe, N.A. 1988. The properties and purification of *Blaberus craniifer* protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1,3 glucan. Insect Biochem. 18: 322-330.
- Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crust. Biol. 16: 278-284.

Suwanto, A., Yahana, M., Herawaty, E. and Angka, S.L. 1998. Genetic diversity of luminous *Vibrio* isolated from shrimp larvae. In *Advances in Shrimp Biotechnology*, (ed. Flegel, T.W.), Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November, Chiang Mai, Thailand. 217-224.

Unestem, T. and Soderhall, K. 1977. Soluble and fragments from fungal cell walls elicits defense reaction in crayfish. *Nature* 267: 45-46.