เอกสารอ้างอิง

กนกภรณ์ ทะกัน. 2553. การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นของหอยแครง Bloody cockle (*Anadara granosa*, Linnaeus) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี. รายงานสหกิจ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 57 หน้า.

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2544. การเพาะเลี้ยงหอย. สำนักพิมพ์รั้วเขียว กรุงเทพฯ. 253 หน้า.

ดวงธิดา เทียมคีรี. 2552. การติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของหอยตลับขาว (*Meretrix casta*, GMELIN, 1791) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี. รายงานสหกิจ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 52 หน้า.

นงคราญ ก้อมชัยภูมิ. 2553. ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของหอยลาย (*Paphia undulate*) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี. รายงานสหกิจ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 45 หน้า.

นิสราภรณ์ เพ็ชร์สุทธิ์. 2551. การผลิตสัตว์น้ำ : การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ. 189 หน้า.

ปรีชญา ต. ไชยสุวรรณ วรดร นวลศิริภัค และผกามาศ แย้มสกุล. 2552. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี. โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 83 หน้า.

รุ่งทิวา ตันติชรา. 2550. ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างฉับพลันต่อการพัฒนาและการอยู่รอดของลูกหอยลาย *Paphia undulata*, Born, 1778. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

สุนันท์ ทวยเจริญ, วัฒนา ภู่เจริญ และปรานอม เบ็ญจมาลย์. 2528. ชีววิทยาบางประการของหอยลายที่ปลายแหลมศอก บ้านอ่าวซ่อ ต.อ่าวใหญ่ จ.ตราด. เอกสารรายงาน/วิชาการ ฉบับที่ 41 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 40 หน้า.

สุพรรณี ลีโทชวลิต, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, นารีรัตน์ ฤทธิรุฒน์ และวีลยา แก่นจันทร์. 2552. การปนเปื้อนของ *Cryptosporidium* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในหอยนางรมบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน. 99 หน้า.

Adema C.M., Van der Knaap W.P.W., Sminia T.. 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. Rev. Aquat. Sci. 4: 201-223.

Anderson R.S., Paynter K.T., Burreson E.M.. 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus.* Biol. Bull. 183: 476-481.

Anderson R.S., Burreson E.M., Paynter K.T.. 1995. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. J. Invertebr. Pathol. 66: 82-89.

Andrews J.D.. 1988. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. Amer. Fish. Soc. Spec. Publ. 18: 47-63.

Bower S.M., Blackbourn J., Meyer G.R.. 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Can. J. Zool. 76: 954-959.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and senditive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein bye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Burreson E.M., Ragone Calvo L.M., La Peyre J.F., Counts F., Paynter K.T.. 1994. Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsida). Comp. Biochem. Physiol. 109A: 575-582.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microsc. Res. Tech. 57: 469-476.

Chagot D., Comps M., Boulo V., Ruano F., Grizel H.. 1987.. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. Aquaculture 67: 260-261.

Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: Forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, pp. 299-333.

Choi K.S., Park K.I., Lee K.W., Matsuoka K.. 2002. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. J. Shellfish Res. 21: 119-125.

Chu F.L.E.. 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. Am. Fish Soc. Spec. Publ. 18: 178-188.

Chu, F.-L.E.. 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology. Science publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, pp. 1-42.

Chu F.L.E., La Peyre J.F.. 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). J. Invertebr. Pathol. 54:224-232.

Chu, F.-L. E., La Peyre, J. F.. 1991. Effect of salinity on *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish. Res. 10: 294.

Chu F.L.E., La Peyre J.F.. 1993a. Perkinsus marinus susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. Dis. Aquat. Org. 16: 223-234.

Chu F.L.E., La Peyre J.F.. 1993b. Development of disease caused by the parasite *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. J. Shellfish Res. 12: 21-27.

Cooper, E.L. and Lemmi, C.A.E. 1981. Invertebrate humoral immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 5: 3-21.

Craig A., Powell E.N., Fay R.R., Brooks. J.M.. 1989. Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. Estuaries 12: 82-91.

Crosby M.P., Roberts C.F.. 1990. Seasonal infection intensity cycle of the parasite *Perkinsus marinus* (and absence of *Haplosporidium* spp.) in oysters from a South Carolina salt marsh. Dis. Aquat. Org. 9: 149-155.

Dungan C.F., Hamilton R.M.. 1995. Use of the tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of in vitro conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. J. Eukaryot. Microbiol. 42: 379-388.

Fisher W.S., Newell R.I.E.. 1986. Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). Comp. Biochem. Physiol. A 85: 365-372.

Flye–Sainte–Marie. J., Soudant, P., Lambert, C., Goïc, N.L., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F.. 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 377: 1-11.

Gauthier J., Vasta G.. 1995. In vitro culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus:* optimisation of the methodology. J. Invertebr. Pathol. 66: 156-168.

Goggin C.L., Lester R.J.G.. 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. Mar. Freshwater Res. 46, 639-646.

Gosling, E.. 2004. Bivalve mollusks. MPG Books Ltd, Cornwall Great Britain. 443 p.

Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 9, 367-385.

Ittoop, G., eorge, K.C., George, R.M., Sobhana, K.S., Sanil, N.K., Nisha, P.C.. 2005. Effect of salinity on the hemocyte profile and phagocytosis in the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). J. Mar. Biol. Ass. India, 47: 31 – 35.

La Peyre J.F., Chu F.E., Meyers J.M.. 1995a. Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. Fish Shellfish Immunol. 5; 179-190.

La Peyre J.F., Chu F.L.E., Vogelbein W.K.. 1995b. In vitro interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster haemocytes. Dev. Comp. Immunol. 19: 291-304.

Leethochavalit S, Chalermwat K, Upatham ES, Choi KS, Sawangwong P, Kruatrachue M. 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. Dis. Aquat. Org. 60:165-71.

McLaughlin S.M., Faisal M.. 1998. In vitro propagation of two *Perkinsus* species from the softshell clam *Mya arenaria*. Parasite 5: 341-348.

Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazanetti, G. P., Cattani, O., Marin, M. G., 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. Mar. Biol. 151: 1051–1058.

McGladdery, S.E., Drinnan, R.E. and Stephenson, M.F. 1993. A manual of parasites, pests and diseases of Canadian Atlantic bivalves. Fisheries and Oceans Canada. 242 p.

Montes J.F., Durfort M., Garcia Valero J.. 1995a. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. Cell Tissue Res. 279: 529-538.

Montes J.F., Durfort M., Garcia Valero J.. 1995b. Characterization and localization of a Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam Tapes semidecussatus. Cell Tissue Res. 280: 27-37.

Montes J.F., Durfort M., Garcia Valero J.. 1996. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. Dis. Aquat. Org. 26, 149-157.

Navas J.I., Castillo M.C., Vera P., Ruiz-Rico M.. 1992. Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). Aquaculture 107: 193-199.

O'Farrell C., La Peyre J.F., Paynter K.T., Burreson E.M.. 2000. Osmotic tolerance and volume regulation in in vitro cultures of the oyster pathogen Perkinsus marinus. J. Shellfish Res. 19:139-145.

Ordás M.C., Gómez-León J., Figueras A., 2001, Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus, R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). J. Shellfish Res. 20: 1019-1024.

Ordás M.C., Ordás A., Beloso, C., Figueras A.. 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunol. 10: 597-609.

Park K.I., Choi K.S. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture 203: 9-22.

Quick J.A., Mackin J.G., 1971. Oyster parasitism by *Labyrinthomyxa marina* in Florida. Florida Dep. Nat. Resour. Prof. Paper Ser. 13: 1-55.

Reid, H. I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, T. H.. 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Org.. 56: 249–258.

Ruddell, C., 1971. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. Histochem. Cell Biology. 26: 98-112.

Sagristà E., Durfort M., Azevedo C.. 1995. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediteranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. Aquaculture 132. 153-160.

Song, L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H.. 2010 Bivalve Immunity. Invertebrate Immunity, ed. K. Söderhäll. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.: Austin. 1-22.

Soniat T.M., 1985. Changes in levels of infection of oysters by *Perkinsus marinus*, with special reference to the interaction of temperature and salinity upon parasitism. Northwest Gulf. Sci. 7: 171-174.

Soniat T.M., 1996, Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. J. Shellfish Res. 15, 35-43.

Soniat T.M., Gauthier J.D.. 1989. The prevalence and intensity of *Perkinsus marinus* from the mid northern Gulf of Mexico, with comments on the relationship of the oyster parasite to temperature and salinity. Tulane Stud. Zool. Bot. 27: 21-27.

Soudant, P., Leite, R., Chu, F-L., Villalba, A., Cancela, L.. 2008. http : www.univ-brest.fr/IUEM/UMR6539/.../Soudant2008.p...

Steinert S.A., Pickwell G.V.. 1985. Multiple forms of lysozyme in copper stressed mussels (*Mytilus edulis*). Mar. Environ. Res. 17: 211-214.

Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., Wada, K., 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster Pinctada fucata. Cell Tissue Research. 266: 75-82.

Taveekijakarn, P., Somsiri, T., Puttinaowarat, S., Tundavanitj, S., Chinabut., Nash, G.. 2008. Parasitic fauna of rock oyster (Saccostrea forskali) cultured in Thailand, pp. 335-342. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 pp.

Tasumi, S. & Vasta, G.R.. 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. J. Immunol. 179: 3086-3098.

Thao, N.T.T. (2008). Infection of parasite *Perkinsus* sp. in soft clam *Paphia undulata* at Kiengiang & Baria-Vungtau provinces. Scientific Journal of Can Tho University, Specific Issue on Aquaculture and Fisheries 1: 222-230. (Full paper in Vietnamese)

Tuntiwaranuruk C, Chalermwat K, Upatham ES, Kruatrachue M, Azevedo C. 2004. Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of bivalves from Chonburi province, Gulf of Thailand. Dis. Aquat. Org. 58:47-53.

Tuntiwaranuruk, C, Chalermwa, K., Pongsakchat, V., Meepool, A., Upatham, E.S., Kruatrachue, M.. 2008. Infection of *Nematopsis* oocysts in different size classes of the farmed mussel *Perna viridis* in Thailand. Aquaculture 281: 12-16.

Uddin, M.J., Yasin, Z., Khallil, M., Shau-Hwai, A.T. 2011. Parasites of blood cockle (*Anadara granosa* Linnaeus, 1958) from the Straits of Malacca. Journal of Shellfish Research. 30: 875–880.

Wilson-Ormond, E.A., Powell, E.N., Choi ,K-S., Song, J. 1993. *Perkinsus marinus* assay In: Lauenstein GG and Cantillo AY (eds), Comprehensive descriptions of complementary measurements. Sampling and analytical methods of the national status and trends program national benthic surveillance and mussel watch projects vol II. NOAA technical memorandum NOS ORCA 71 p II.79 - II.84

Yue, X., Liu, B. and Xue, Q. 2011. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam Meretrix meretrix potentially functioning in host immunity. Fish & Shellfish Immunology. 30: 550-558.

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน

1. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรสิต *Perkinsus* sp.**

Fluid Thioglycollate medium	8.94	กรัม
Sodium Chloride	6	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน นำไปต้มจนได้เป็นสีเหลืองอำพัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. **การเตรียม SM 30**

Sodium Chloride (NaCl); BDH PROLABO^{R}	24.29	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); MERCK ,Germany		
4.85 กรัม		
Magnesium chloride ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ; BDH Anala R^{R} ,England	3.49	กรัม
Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$); MERCK, Germany	1.17	กรัม
Potassium Chloride (KCl); J.T.Baker ,Mexico	0.77	กรัม
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$); Carlo erba reagent s.r.l.	0.38	กรัม
Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) ;	0.07	กรัม
Panreac quimica sa		
Potassium hypophosphite (KH_2PO_2) ; J.T.Baker ,Mexico	0.045	กรัม
Penicillin (IU ml^{-1}); SIGMA, Germany	0.031	กรัม
Streptomycin (ug ml^{-1}) ; Fluka BioChemika,China	0.1	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร pH 7.4 กรองด้วยเมมเบรน 0.2 ไมครอน

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนปริมาณน้อยด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

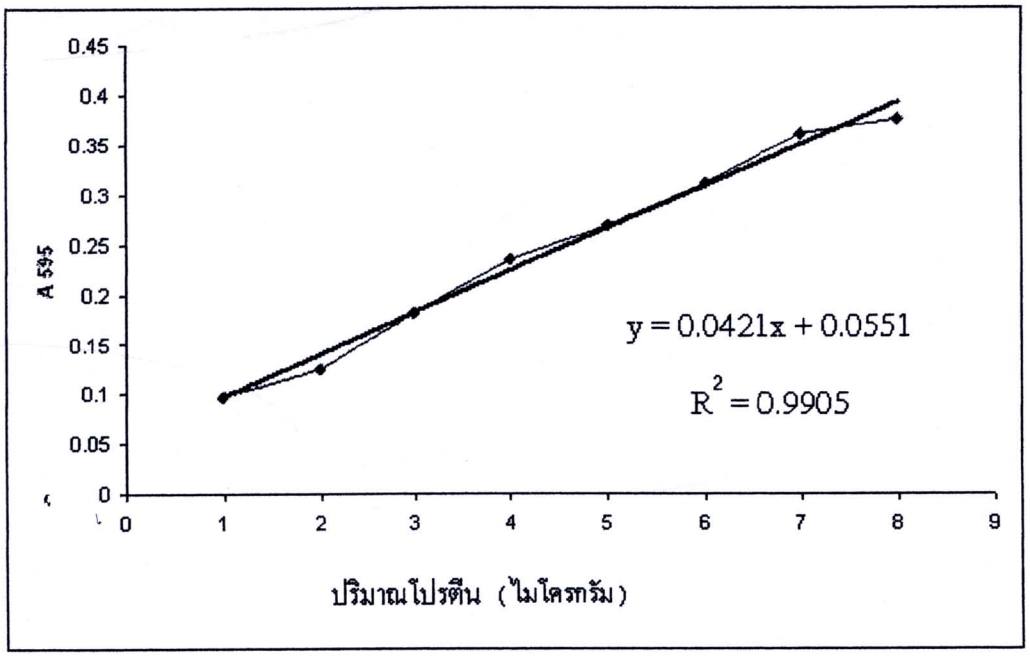
การเตรียม 10 ug/ml

1. เตรียม 1.0 mg/ml ชั่ง Bovine serum albumin (BSA) 0.0250 g ละลายใน 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) เติม PBS จนได้ปริมาตร 25 ml

2. เตรียม 10 ug/ml BSA ปิเปต 1.0 mg/ml 100 ul เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตรเป็น 10 ml

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โปรตีนปริมาณน้อย

หลอดที่	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)	10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร BSA (ไมโครลิตร)	0.01 โมลาร์ Tris-HCl, pH 7.6 (ไมโครลิตร)	Biorad Dye Reagent (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร
1 (Blank)	0	0	800	200	0.000
2	1	100	700	200	0.099
3	2	200	600	200	0.125
4	3	300	500	200	0.181
5	4	400	400	200	0.235
6	5	500	300	200	0.268
7	6	600	200	200	0.312
8	7	700	100	200	0.360
9	8	800	0	200	0.376
ตัวอย่าง	-	800	-	200	0.314



กราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรและปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)

การคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยแทนค่าในสูตร

ความเข้มข้นโปรตีน = (ค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 595 นาโนเมตร-0.0551) / 0.0421
(ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

ตัวอย่างเช่น

ความเข้มข้นโปรตีน = (0.314 – 0.0551) / 0.0421
(ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)

ความเข้มข้นโปรตีน = (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) X ความเข้มข้นที่เจือจาง X 1000
(ไมโครกรัม / มิลลิลิตร) 800

= 6.149X400X1000 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร
800

= 3074.82 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

ความเข้มข้นโปรตีน = 3074.82 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร
(มิลลิกรัม / มิลลิลิตร) 1000

= 30.74 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณ Lysozyme

Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptic Soy Agar	14	กรัม
น้ำกลั่น	350	มิลลิลิตร

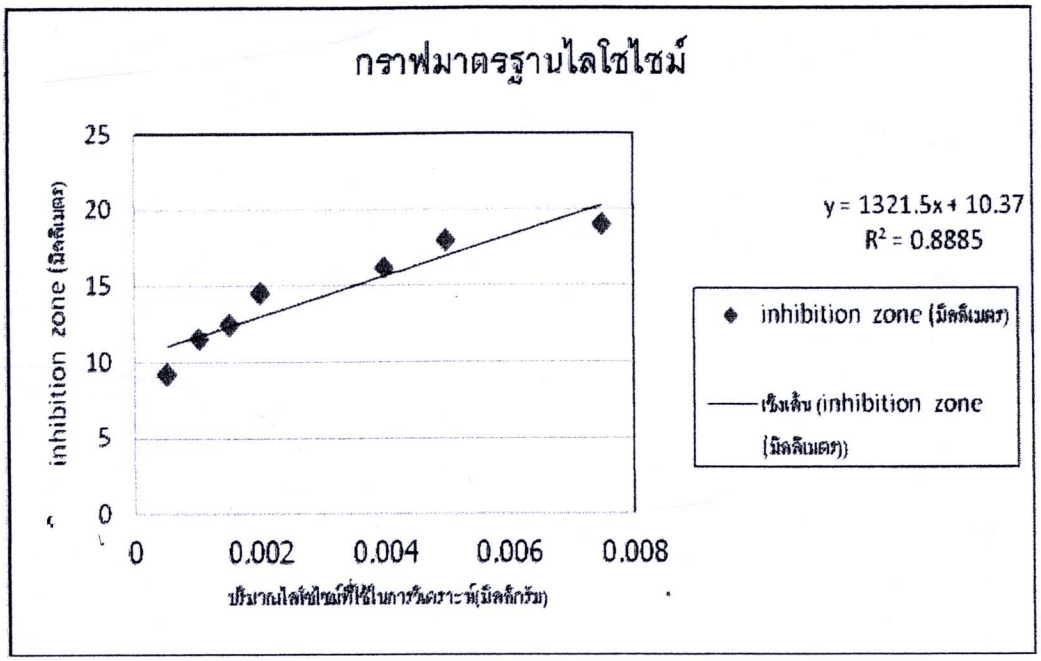
ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

5. การวิเคราะห์ปริมาณ Lysozyme

ตารางภาคผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของไลโซไซม์ใช้สำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน

ปริมาณไลโซไซม์ ไมโครกรัม/ มิลลิกรัม	ปริมาณไลโซไซม์ (ไมโครกรัม)	ปริมาณไลโซไซม์ ที่ใช้ในการ วิเคราะห์ (มิลลิกรัม)	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของ inhibition zone (mm.)	ค่าเฉลี่ยของ เส้นผ่าศูนย์กลาง ของ inhibition zone (mm.)
10	0.5	0.0005	9.5,9	9.25
20	1.0	0.0010	11.5,11	11.50
30	1.5	0.0015	13,12	12.50
40	2.0	0.0020	15,14	14.50
50	2.5	0.0025	15,13.5	14.25
80	4.0	0.0040	16.5,16	16.25
100	5.0	0.0050	18.5,17.5	18.00
150	7.5	0.0075	19,19	19.00
200	20	0.0100	18.5,20	19.25

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย



การคำนวณหาปริมาณของไลโซไซม์ ใช้สมการ

$$y = 1321.5x + 10.37$$

ดังนั้นปริมาณของไลโซไซม์ $= \dfrac{(\text{inhibition zone (mm)}) - 10.37)}{1321.5}$

ปริมาณไลโซไซม์ (มิลลิกรัม) $= \dfrac{(15 - 10.37)}{1321.5}$

$= 0.0035$ มิลลิกรัม หรือ 3.50 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ข
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สหกิจศึกษา

เรื่อง

การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นของหอยแครง Bloody cockle (*Anadara granosa* ,Linnaeus) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

Basic studies Defense mechanisms of Bloody cockle (*Anadara granosa)* on Moungmai coast of Chonburi province

โดย

นางสาวกนกภรณ์ ทะกัน

รหัส 5010101301

สาขาการประมง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษารายวิชาสหกิจศึกษา (ทป 497)

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2553

ชื่อเรื่อง : การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นของหอยแครง Bloody cockle (*Anadara granosa*, Linnaeus.) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

ชื่อผู้เขียน : นางสาวกนกภรณ์ ทะกัน

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.สุพรรณี ลีโทชวลิต

ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

อาจารย์ ดร.กระสินธุ์ หังสพฤกษ์

บทคัดย่อ

การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองเบื้องต้นในน้ำเลือดหอยแครง พบว่าปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดหอยแครง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5148 - 4.2290 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หอยแครงสามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ร้อยละ 49 – 73 แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio และเชื้อ *E. coli* ได้ และความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงคนหมู่ A, B และ AB เกาะกลุ่มอยู่ในช่วง 3.89 – 21.05, 3.89 – 84.21 และ 1.94 – 84.21 ไตเตอร์ / มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ผลการทดสอบพบปริมาณไลโซไซม์ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2554 คือ 0.0030, 0.0050 และ 0.0025 มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยพบปริมาณไลโซโซม์ในน้ำเลือดหอยแครงมากที่สุดในเดือนธันวาคม และในน้ำเลือดหอยแครงมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดเฉลี่ย 192 x10^6±8.59,243.8 x 10^6±31.89, 251.4 x 10^6±10.61 และ233.6x 10^6±27.48 เซลล์/มิลลิลิตร

คำสำคัญ : หอยแครง, กลไกการป้องกันตัวเอง, เลคติน, ไลโซไซม์, การยับยั้งแบคทีเรีย

สหกิจศึกษา

เรื่อง

การติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันของหอยตลับขาว (*Meretrix casta*, GMELIN, 1791) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

Perkinsus sp. infection *Vibrio* spp. and lectin in immune system of *Meretrix casta* on Moungmai coast of Chonburi province

โดย

นางสาวดวงธิดา เทียมคีรี

รหัส 4910101330

สาขาการประมง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษารายวิชาสหกิจศึกษา (ทป 497)

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2552

ชื่อเรื่อง : การติดเชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และระบบภูมิคุ้มกันของหอยตลับจากแหล่งเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ ชลบุรี

ชื่อผู้เขียน : นางสาวดวงธิดา เทียมดีรี

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.สุพรรณี ลีโทชวลิต

ดร.จันทร์จรัส วัฒนะไชติ

ผศ.ชนกันต์ จิตมนัส

บทคัดย่อ

จากการศึกษา *Perkinsus* sp. และเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในหอยตลับขาว *Meretrix casta* บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยตลับอ่างศิลา และชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 สถานีละ 30 ตัว ของทุกๆ เดือน โดยวิธี Quantitative Method พบการปนเปื้อนปรสิตชนิดนี้ในเดือนพฤศจิกายนเท่านั้นคิดเป็นร้อยละ 6.67 จากจำนวนหอยที่นำมาศึกษาทั้งหมด และการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในน้ำเลือดหอยตลับ 10 ตัว พบเชื้อในเดือนพฤศจิกายน ธันวาคม 2552 และมกราคม 2553 เฉลี่ยจำนวน 814 CFU/มิลลิลิตร, 1507 CFU/มิลลิลตร และ 227 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และในแหล่งน้ำที่เพาะเลี้ยงหอยตลับ 3 แหล่ง คือ แหลมแท่น, อ่างศิลา และเมืองใหม่ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 – เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ที่แหลมแท่นพบ158-1251 CFU/มิลลิตร, อ่างศิลา 770-1644 CFU/มิลลิลิตร และเมืองใหม่ 300-1632 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการตรวจสอบชนิดเชื้อวิบริโอพบว่าน่าจะเป็น *V . alginolyticus* นอกจากนี้ยังตรวจพบเลคตินในน้ำเลือดหอยตลับขาวจากแหล่งเพาะเลี้ยงหอยตลับในบริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี เมื่อทดสอบการเกาะกลุ่มโดยใช้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอในสภาพปกติและเม็ดเลือดแดงคนหมู่เอที่ปรับปรุงด้วยเอนไซม์ทริปซินได้ปริมาณ 4-256 ไตเตอร์ และ 8-1024 ไตเตอร์ตามลำดับ

คำสำคัญ : เชื้อปรสิต *Perkinsus* sp. , แบคทีเรีย *Vibrio* spp. , เลคติน , หอยตลับขาว

สหกิจศึกษา

เรื่อง

ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของหอยลาย (*Paphia undulata*) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

Non – specific immunity in Baby clam (*Paphia undulata*) on Moungmai coast of Chonburi province

โดย

นางสาวนงคราญ ก้อมชัยภูมิ

รหัส 5010101333

สาขาการประมง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษารายวิชาสหกิจศึกษา(ทป 497)

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีการศึกษา 2553

ชื่อเรื่อง : ระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของหอยลาย (*Paphia undulata*) บริเวณชายฝั่งทะเลเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี

ชื่อผู้เขียน : นางสาวนงคราญ ก้อมชัยภูมิ

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.สุพรรณี ลีไทชวลิต

ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

ดร.กระสินธุ์ หังสพฤกษ์

บทคัดย่อ

ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ (Non – specific immunity) ของหอยลาย พบว่าปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลายทั้ง 4 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 – เดือนมกราคม 2554 พบว่าปริมาณไลโซไซม์ คือ -95.47, -83.52, -20.19 และ-44.84ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณไลโซไซม์ในหอยที่นำมาทำการศึกษามีน้อยมากจึงไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ จากวิธีการทดลองที่ 3.1 และพบว่าในเดือนตุลาคม 2553 ปริมาณไลโซไซม์จะมีน้อยที่สุด ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดหอยมีค่าระหว่าง 0.53-2.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงคนหมู่ A,B,AB อยู่ระหว่าง 75.47-366.84, 75.47-1,347.36 และ 0-168.4 ตามลำดับ การยับยั้งแบคทีเรียของโปรตีนในน้ำเลือดหอยพบว่า หอยลายสามารถยับยั้งเชื้อ v. *parahaemolyticus* ได้ร้อยละ 65 , E.*coli* ได้ร้อยละ 14-67 และ M. *luteus* ได้ร้อยละ 49-73 ส่วนเชื้อ v.*harveyi* และ v. *cholera* ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ สำหรับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดจากกรศึกษาในครั้งนี้พบว่าปริมาณเม็ดเลือดหอยลายพบมากที่สุดในเดือนธันวาคม 2553 และน้อยที่สุดในเดือนพฤศจิกายน 2553 คือ $0.79 \times 10^6 \pm 0.13 \times 10^6$ และ $0.33 \times 10^6 \pm 0.23 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร จากการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของหอยลาย จะพบว่าหอยลายมีระบบภูมิคุ้มกันค่อนข้างต่ำ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันเหล่านี้เป็นกลไกการป้องกันตัวเองต่อโรคต่างๆที่จะเข้าสู่ตัวหอย

คำสำคัญ : หอยลาย, ระบบภูมิคุ้มกัน, ไลโซไซม์, เลคติน, การยับยั้งแบคทีเรีย

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

Antibacterial proteins in the hemolymph of oyster *(Saccostrea forskali)* which culture along the east coast of Chonburi Rayong and Chanthaburi Provinces

นางสาวปรีชญา ต.ไชยสุวรรณ
นายวรดร นวลศิริภัค
นางสาวผกามาศ แย้มสกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2552

หัวข้อโครงงานพิเศษ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนจากน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

ชื่อนักศึกษา นางสาว ปรีชญา ต.ไชยสุวรรณ
นาย วรดร นวลศิริภัค
นางสาว ผกามาศ แย้มสกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาปริมาณเลคตินในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบที่เพาะเลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรีโดยใช้เม็ดเลือดแดงคนหมู่โอ พบว่าในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบ จากจังหวัดชลบุรีมีปริมาณเลคตินอยู่ในช่วง 1,280-10,240 ไตเตอร์/มล. ในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบจากระยอง และจันทบุรีมีปริมาณเลคตินอยู่ในช่วง160-20,480ไตเตอร์/มล.โดยเลคตินทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 4–50 องศาเซลเซียส ต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อช่วยในการเกาะกลุ่ม และมีความจำเพาะกับ N-acetyl-D-glucosamine นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบสามารถยับยั้งเชื้อ *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *E. coli* , *M. luteus* และ *P. aeruginosa* โดยพบว่าหอยนางรมปากจีบจากจังหวัดระยอง อ่างศิลา และเมืองใหม่ยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ดีที่สุดร้อยละ 89, 48 และ27 ตามลำดับ หอยนางรมปากจีบจากจังหวัดจันทบุรียับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus* และ*V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดร้อยละ 56 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยโปรตีนในน้ำเลือดหอยนางรมปากจีบจากอ่างศิลาและเมืองใหม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 4-60 องศาเซลเซียส การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Gel Filtration Chromatography สามารถแยกโปรตีนได้ 1 กลุ่ม มีน้ำหนักโมเลกุล 68.6 กิโลดาลตัน และได้แถบของโปรตีน 4 แถบหลักใน SDS-PAGE สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 8 ไตเตอร์ และปริมาณโปรตีน 25 ไมโครกรัม สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ร้อยละ 69

คำสำคัญ : โปรตีนต้านแบคทีเรีย, เลคติน, หอยนางรมปากจีบ