รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม (Application of Thai medicinal plants for controlling human and aquatic animals pathogenic bacteria in *Penaeus merguiensis* spermatophores cryopreserved by conventional method and styrofoam box)

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802136
สัญญาเลขที่ 87/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม (Application of Thai medicinal plants for controlling human and aquatic animals pathogenic bacteria in *Penaeus merguiensis* spermatophores cryopreserved by conventional method and styrofoam box)

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 87/2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม ในปีที่ 1 เป็นการศึกษาถึงการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอล 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดใบมะรุม (*Moringa oleifera* L.) และสารสกัดจากเหง้าขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) โดยเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะผสมที่มีประสิทธิภาพ คือ Penicillin-streptomycin ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ เป็นระยะเวลา 9 เดือน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ 1) เติมสาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น10% (v/v) (ชุดควบคุม) 2) เติมสารปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% 3) เติมสารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 4) เติมสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีศักยภาพเหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย เนื่องจากสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยให้มีคุณภาพดีเยี่ยมตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน โดยมีคุณภาพไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% นอกจากนั้นยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดด้วยประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน

คำสำคัญ: สมุนไพร; การแช่แข็ง; กุ้งแชบ๊วย; ถุงน้ำเชื้อ

ABSTRACT

This research work entitle "Application of Thai medicinal plants for controlling human and aquatic animals pathogenic bacteria in *Penaeus merguiensis* spermatophores cryopreserved by conventional method and styrofoam box" in the first year was to apply two types of ethanolic medicinal herb extracts: moringa (*Moringa oleifera* L.) and ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe) in comparison with efficacious antibiotic cocktails (penicillin-streptomicin) for cryostorage of banana prawn spermatophore using automatic cryofreezer for 9 months. Experiment was divided into 4 treatments including addition of 1) dimethyl sulfoxide (10% (v/v) DMSO; as control), 2) penicillin-streptomycin (0.1%), 3) ethanolic-moringa-leaf extract (0.1 mg/mL) and 4) ethanolic-ginger-rhizome extract (0.1 mg/mL). Results showed that ethanolic extract of moringa leaf was capable of suitably cryopreserving banana prawn spermatophore because of retaining percentage of sperm viability over 9 months of the experiment. Similar percentages of viable sperm in banana prawn spermatophore supplemented with either moringa-leaf extract or penicillin-streptomycin (0.1%) were observed throughout 9-months cryostorage. In addition, ethanolic moringa leaf extract showed not significantly reduced total heterotrophic bacteria, compared to those in the experiments with the use of 0.1% penicillin-streptomycin in cryostored banana prawn spermatophore for 9 months.

Keywords: Medicinal plants; Cryostorage; Banana prawn; Spermatophore

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		II
Abstract		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		V
สารบัญภาพ		VI
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	17
4	ผลการทดลอง	24
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง		46
ผลผลิต (Output)		54
ประวัติคณะผู้วิจัย		55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	28
2	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	31
3	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	33
4	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	34
5	แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	36
6	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae	39
7	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae	40
8	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเพศของกุ้ง	7
2	ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้ง	8
3	ลักษณะการผสมพันธุ์ของกุ้ง	9
4	ลักษณะของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย	9
5	เครื่อง Rotary evaporator	19
6	เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)	20
7	ถังไนโตรเจนเหลว	21
8	พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย	24
9	การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย	25
10	ถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย	25
11	ลักษณะของสมุนไพรหลังอบแห้ง	26
12	ลักษณะของสารสกัดสมุนไพร	26
13	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	29
14	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	32

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอาชีพที่มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะผลผลิตกุ้งที่มีอยู่ในประเทศสามารถสร้างมูลค่าในการส่งออก และยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย อีกทั้งความต้องการบริโภคกุ้งทะเลเศรษฐกิจในตลาดโลกที่สูงขึ้นเป็นผลให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างรวดเร็ว (Nimrat et al., 2005; 2008b; Vuthiphandchai et al., 2007) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้ง และถือเป็นผู้ผลิตรายใหญ่เป็นอันดับ 2 ของโลก (13 %) รองจากประทศจีน (39 %) แต่ผลผลิตกุ้งจากประเทศจีนจะเน้นเพื่อการบริโภคในประเทศ ขณะที่ประเทศไทยเน้นเพื่อการส่งออกถึง 90 % ของผลผลิตที่ได้ โดยในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีสัดส่วนการส่งออกกุ้งในตลาดโลกสูงที่สุด (15 %) รองลงมาคือประเทศเวียดนาม (14 %) และประเทศจีน (12 %) กุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงทั่วโลกและสามารถเป็นสินค้าส่งออกที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศมีประมาณ 7 สายพันธุ์ คือ กุ้งขาวแวนนาไม กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวจีน กุ้งฟ้า กุ้งคุรุมา กุ้งขาวอินเดียและกุ้งแชบ๊วย (ถนอมจิตร สิริภคพร และคณะ, 2556)

กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่นิยมเพาะเลี้ยงมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Boonyaratpalin, 1998) เนื่องจากเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้ดี (Zacharia and Kakati, 2002) ทั้งยังใช้ต้นทุนในการเพาะเลี้ยงต่ำ ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นและได้ผลผลิตสูง ทำให้เกษตรกรนิยมเลี้ยงกันมากขึ้นและมีความต้องการลูกกุ้งแชบ๊วยสำหรับเพาะเลี้ยงปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้กุ้งแชบ๊วยยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ (กำจัด รื่นเริงดี และวิไลวรรณ สอนประสม, 2551) ส่งผลให้มีความต้องการพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์กุ้งปริมาณมากขึ้นตามไปด้วย (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2547) ในปัจจุบันความต้องการกุ้งแชบ๊วยในตลาดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การผลิตกุ้งแชบ๊วยไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด รวมทั้งการผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นสามารถเพิ่มผลผลิตได้ปริมาณน้อย ดังนั้นการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อไว้สำหรับการผสมเทียมจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มปริมาณกุ้งแชบ๊วยให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งจึงมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ โดยเฉพาะในสัตว์น้ำที่ใกล้สูญพันธุ์หรือมีวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของธนาคารยีน (Gene bank) แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อ (Semen) หรือถุงน้ำเชื้อ (Spermatophore) ที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำเอาไว้ใช้ในอนาคต โดยทั่วไปผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำนิยมที่จะใช้น้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ ๆ ผสมกับไข่ เพราะเชื่อว่าคุณภาพน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อ

ขณะรีดออกมาใหม่ ๆ จะดีกว่าน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อที่รักษาเอาไว้ระยะหนึ่งแล้ว แต่บางครั้งในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พ่อพันธุ์จะมีปริมาณน้ำเชื้อหรือสเปิร์มลดลง ถึงแม้ว่าจะสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนหรือใช้วิธีการจัดการสิ่งแวดล้อมให้สัตว์น้ำสร้างน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อมากขึ้น แต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร หรือในบางครั้งการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่างชนิดกัน (Hybridization) ก็มักพบว่าช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อ (Sperm availability) ได้ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (Egg availability) ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการระหว่างการเพาะพันธุ์ นอกจากนี้พ่อพันธุ์สัตว์น้ำที่ถูกรีดน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อบ่อยครั้งก็ไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อได้ทันสำหรับการใช้เพาะพันธุ์ครั้งต่อไป รวมทั้งยังมีปัญหาความแปรปรวนของสัตว์น้ำแต่ละตัว (Individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมของไข่และถุงน้ำเชื้อในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก ซึ่งการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยในปัจจุบันก็นิยมใช้พ่อแม่พันธุ์ที่จับจากธรรมชาติเป็นหลัก และมักพบว่ามีปัญหาคุณภาพสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยไม่แน่นอนในระหว่างการใช้เพาะพันธุ์ เพราะบางครั้งพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่จับได้ก็ไม่มีถุงน้ำเชื้อหรือมีแต่ไม่สมบูรณ์เพศเพียงพอ และการขาดแคลนพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยในบางช่วงของฤดูกาลยังคงเป็นปัญหาหลักที่ต้องแก้ไขเพื่อสามารถควบคุมผลผลิตลูกกุ้งแชบ๊วยได้ตามที่ต้องการ

ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็ง กล่าวโดยสรุปสามารถทำได้โดยการนำเอาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้เป็นเวลานานเป็นปี แต่อย่างไรก็ตามยังมีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่ทำการแช่แข็ง ซึ่งสามารถพบได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการแช่แข็ง นับตั้งแต่การคัดเลือกแหล่งเชื้อพันธุ์ (Gamete collection) การเก็บเซลล์เชื้อพันธุ์ สารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ (Extenders) สารไครโอโพรเทคแทนท์ เวลาสมดุลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Equilibration time) อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) การเก็บรักษาและการละลาย (Thawing; กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) หากพิจารณาดูแล้วทุกขบวนการที่ทำการแช่แข็งมีความสำคัญต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ทำการแช่แข็ง ในอีกแง่หนึ่งคือ อัตราการมีชีวิตของเซลล์ภายหลังการแช่แข็งและการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการแพร่ของน้ำยาผ่านผนังเซลล์ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลการปฏิสนธิและการลดลงของการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการปฏิสนธิ (Saad et al., 1988)

นอกจากนี้การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลานาน อาจพบปัญหาการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาในขั้นตอนการรวบรวมถุงน้ำเชื้อ โดยการปนเปื้อนอาจเกิดจากแบคทีเรียที่อยู่บนผิวตัวกุ้งหรือมีแบคทีเรียปนอยู่ในถุงน้ำเชื้อตั้งแต่แรกขณะที่กุ้งอยู่ในน้ำหรือสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญในระหว่างที่ถุงน้ำเชื้อได้ถูกแช่แข็งเอาไว้ เพราะแบคทีเรียจะทำให้คุณภาพสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็ว (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) นอกจากนี้มีรายงานแสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิกับ

ไข่ลดต่ำลงเมื่อนำมาผสมเทียมกับไข่ (Stoss and Refstie, 1983; Saad et al., 1988) จึงได้มีการนำเอายาปฏิชีวนะมาใช้ เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียเพื่อทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อนานขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่ายาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียได้ แต่การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลต่อคุณภาพของสเปิร์มและอาจทำให้มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อยา ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพจากสมุนไพรจึงนับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรมีความเป็นพิษต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และการประยุกต์ใช้สมุนไพรในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังเป็นแนวทางที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความยั่งยืน

ในปัจจุบันมีการนำสารสกัดสมุนไพรหลายชนิดมาใช้เพื่อควบคุมการปนเปื้อนหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ยกตัวอย่างเช่น Sivaram et al. (2004) ศึกษาการใช้สารสกัด Methanolic จากพืชสมุนไพร 10 ชนิด ในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* จากการทดลองพบว่าสารสกัด Methanolic จากกะเพรา (*Ocimum sanctum*) โสมอินเดีย (*Withania somnifera*) และจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* และ Gnanamani et al. (2003) ศึกษาผลของสารสกัดใบลำโพงขาว (*Datura alba*) และหงอนไก่ (*Celosia argentea*) ที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากคนไข้ คือ *E. coli, Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Shigella* sp., *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp. และ *Vibrio* sp. ผลการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 8 ชนิดได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากสมุนไพรยังเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อ โดยมีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเหง้าไพล เหง้ากระชายดำ ใบมะรุมและใบฝรั่ง สามารถยับยั้ง *Pseudomonas putida, Sphingomonas paucimobilis* และ *Acinetobactor* sp. ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เย็น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2553) และการใช้สารสกัดจากพริกชี้ฟ้าในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกแอฟริกันแบบแช่แข็ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus firmus* และ *B. laterosporus* ในระหว่างการเก็บรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2554) ดังนั้นการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงน่าจะมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยเรื่อง "การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย" ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557 ซึ่งผลการวิจัยทำให้ทราบถึงชนิดของบัฟเฟอร์ ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และ Protocol ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่เย็นและแช่แข็ง รวมถึงทราบถึงขั้นตอนและวิธีการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่เย็น ซึ่งเป็นการเก็บรักษาแบบระยะสั้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยต่อยอด คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิม เพื่อควบคุมและลดปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาแบบระยะยาว ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการปฏิสนธิ และยังเป็นการลดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคออกสู่

สิ่งแวดล้อม จะทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความเข้มแข็งของอุตสาหกรรมกุ้งทะเลและจะก้าวต่อไปยังสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ต่อไป

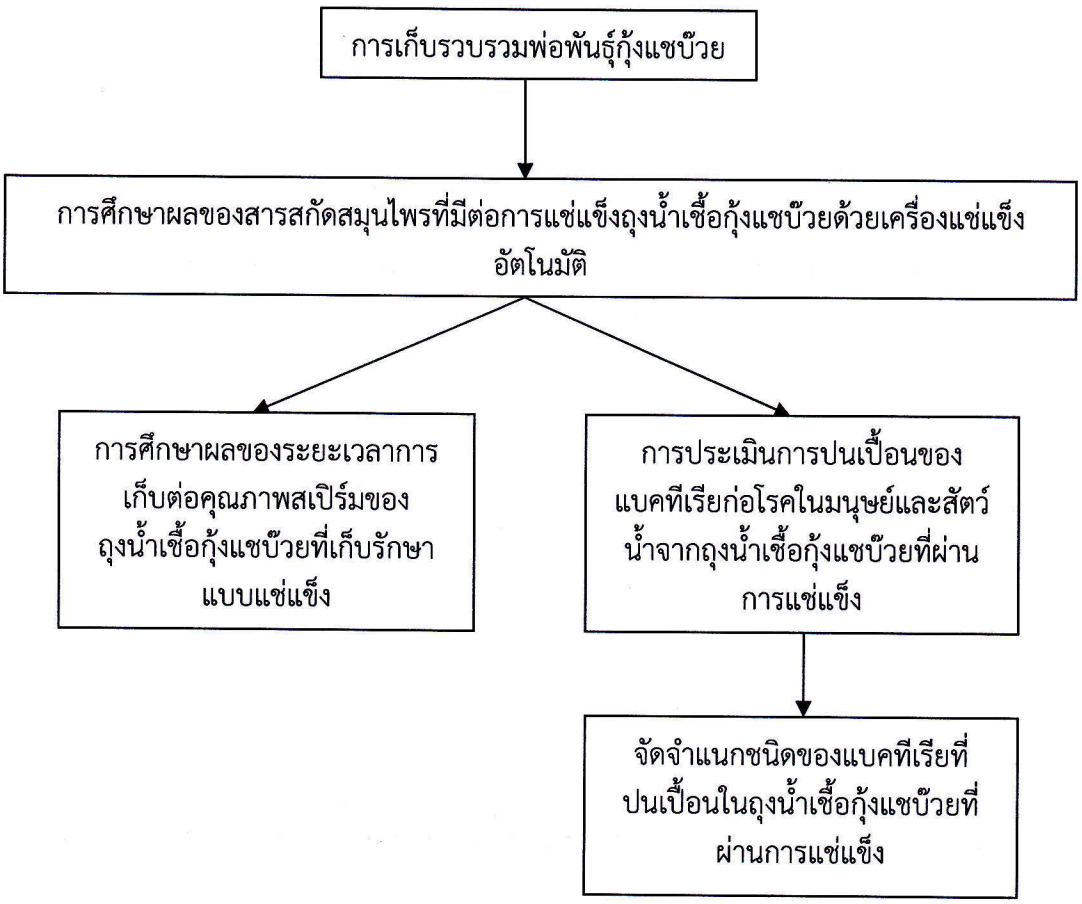
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวโดยการใช้เทคโนโลยีดั้งเดิม
2. เพื่อศึกษาผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย และการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ เริ่มโดยการเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย การสกัดสมุนไพร จากนั้นทำการศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย โดยศึกษาถึงอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยในถุงน้ำเชื้อสดและถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง และทำการประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ผ่านการแช่แข็งในช่วงเวลาต่าง ๆ เป็นระยะเวลานาน 9 เดือน รวมทั้งทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและจัดเก็บแบคทีเรียแบบแช่แข็งสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวโดยการใช้เทคโนโลยีดั้งเดิม
2. ทราบถึงผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย และการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วยหัวข้อดังนี้

1. กุ้งแชบ๊วย
2. การแพร่กระจายของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงกุ้ง
3. การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. กุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วย (Banana prawn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguiensis* ซึ่งมีอนุกรมวิธานดังนี้ (ประจวบ หลำอุบล, 2530)

Phylum Arthropada
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decepoda
Suborder Natenita
Section Penaeidea
Genus *Penaeus*
Species *merguiensis*

1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา (ประจวบ หลำอุบล, 2530)

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลประเภทหนึ่งที่จัดอยู่ในคลาสครัสเตเซียน (Crustacean) เป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง หายใจโดยใช้เหงือก มีหนวด 2 เส้น อยู่บริเวณส่วนหัวของกุ้ง มีลำตัวงอยาว และลำตัวเป็นข้อปล้องทั้งหมด 19 ข้อ ซึ่งแต่ละข้อปล้องจะประกอบด้วยรยางค์จำนวน 1 คู่ แต่ละคู่จะมีหน้าที่แตกต่างกัน โดยแต่ละคู่สามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ตามปล้อง ดังนี้

1) รยางค์ส่วนหัว (Cephalic appendages) จำนวน 5 คู่
   รยางค์คู่ที่ 1-2 ทำหน้าที่รับความรู้สึก (Antenna)
   รยางค์คู่ที่ 3, 4 และ 5 ทำหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร (Antenna)
2) รยางค์ส่วนอก (Thoracic appendages) จำนวน 8 คู่
   รยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8 ช่วยในการกินอาหาร (Maxilliped)
   รยางค์คู่ที่ 9-13 ทำหน้าที่ในการเดิน (Pereiopods)

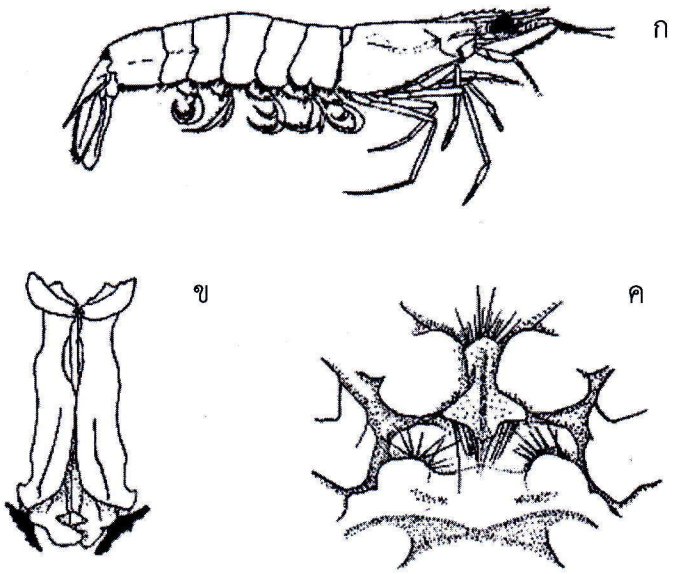
3) รยางค์ส่วนลำตัว (Abdominal appendages) จำนวน 6 คู่

รยางค์คู่ที่ 14-18 ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ หรือช่วยในการยึดเกาะของไข่ (Pleopods)

รยางค์คู่ที่ 19 ทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำหรือเคลื่อนที่ (Uropod)

1.2 ลักษณะและความแตกต่างระหว่างเพศ

กุ้งแชบ๊วยเพศผู้และเพศเมียสามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยการสังเกตความแตกต่างของลักษณะอวัยวะภายนอกที่ปรากฏ โดยในกุ้งเพศเมียบริเวณที่อยู่ระหว่างโคนคู่ที่ 5 และขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 จะมีอวัยวะที่เรียกว่าทีไลกัม (Thelycum) ส่วนกุ้งเพศผู้จะมีอวัยวะที่เรียกว่า พีแทสมา (Petasma) ซึ่งมีลักษณะเป็นติ่งยื่นออกมาอยู่ระหว่างโคนขาเดินคู่ที่ 1 (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2555) (ภาพที่ 1 และ 2)



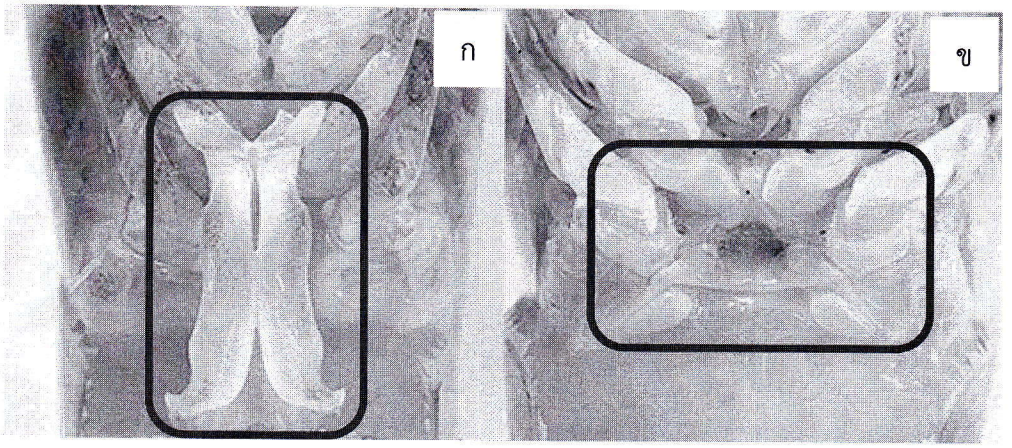
ภาพที่ 1 ลักษณะเพศของกุ้ง

ก : ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้ง

ข : Petasma อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้

ค : Thelycum อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย

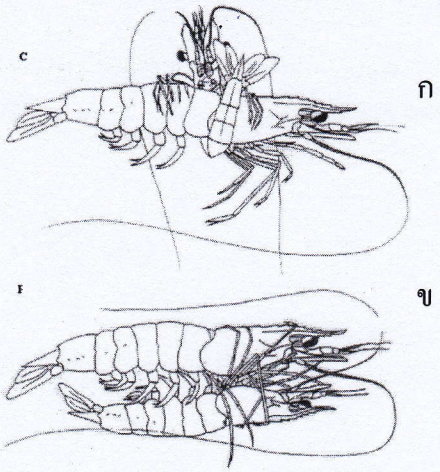
(Edwards, 1837)



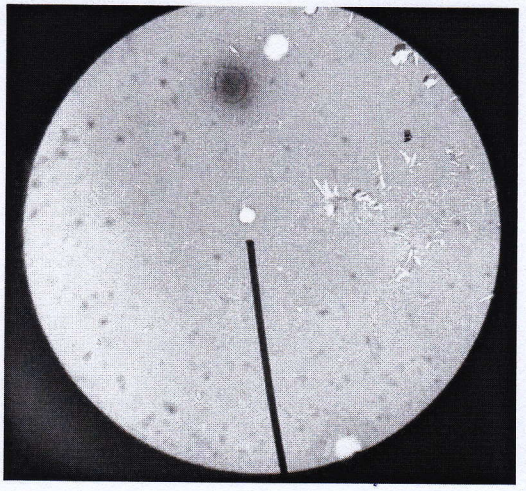
ภาพที่ 2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้ง
ก : Petasma อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้
ข : Thelycum อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย
(http://ieatishootipost.sg/2013/12/singapore-prawn-files-sand-prawns-sua.html)

1.3 การผสมพันธุ์และการวางไข่

ในช่วงฤดูการผสมพันธุ์และวางไข่ เมื่อกุ้งเพศผู้และเพศเมียมีความพร้อมที่จะผสมพันธุ์แล้ว กุ้งเพศเมียจะทำการลอกคราบเป็นระยะเวลาประมาณ 3-6 ชั่วโมง จากนั้นกุ้งเพศผู้จึงจะเข้ามากอดรัดเพศเมีย และทำความสะอาดบริเวณส่วนท้อง (Ventral thoracic) ของกุ้งเพศเมีย ต่อมากุ้งเพศผู้จะจับกุ้งเพศเมียหงายขึ้นพร้อมกับปล่อยถุงน้ำเชื้อ (Gelatinous mass) เข้าไปบริเวณทีไลกัมของกุ้งเพศเมีย (ประจวบ หลำอุบล, 2530) (ภาพที่ 3) โดยภายในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจะประกอบด้วยเซลล์สเปิร์ม ซึ่งเซลล์สเปิร์มของกุ้งแชบ๊วยจะมีโครงสร้างที่มีส่วนหัวลักษณะกลมหนา และมีขนาดใหญ่ภายในบรรจุสารพันธุกรรม และส่วนหางมีลักษณะสั้นใช้ในการว่ายน้ำ (ภาพที่ 4) ซึ่งภายหลังจากนั้นไข่ที่มีการพัฒนาอย่างเต็มที่จากกุ้งเพศเมียที่พร้อมวางไข่ จะสังเกตเห็นพฤติกรรมของกุ้งเพศเมียที่จะว่ายน้ำวนไปมามีอาการกระวนกระวายก่อนที่จะวางไข่ โดยขณะการวางไข่ของกุ้งเพศเมียจะมีลักษณะการงอส่วนของหางเข้าหาลำตัวทางด้านหน้าท้องบริเวณปล้องที่ 4 จากนั้นขาเดินทั้ง 5 คู่ จะงอ และกดส่วนอกแน่น ส่วนขาว่ายน้ำจะโบกไปข้างหน้า และหลังอย่างสม่ำเสมอ และที่ปลายขาเดิน 3 คู่หลังจะว่ายไปทางซ้าย และขวาอย่างช้าๆ เพื่อทำให้ไข่ถูกปล่อยออกมาเนื่องจากการหมุนเวียนของน้ำจากการโบกพัดของขาว่ายน้ำ ทางช่องที่เปิดอยู่บริเวณของขาคู่ที่ 3 (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2555) แล้วน้ำเชื้อจากถุงน้ำเชื้อที่เก็บไว้ภายในกุ้งเพศเมียจะถูกปล่อยออกมาจากบริเวณรูเปิดของโคนขาคู่ที่ 4 ซึ่งไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้ว (Fertilized eggs) จะจมลง และไข่จะฟักกลายเป็นตัวอ่อนเมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 12-14 ชั่วโมง (ประจวบ หลำอุบล, 2530)



ภาพที่ 3 ลักษณะการผสมพันธุ์ของกุ้ง
ก : คือลักษณะของกุ้งแชบ๊วยเพศผู้ที่ทำความสะอาดบริเวณส่วนท้องของกุ้งแชบ๊วยเพศเมีย
ข : คือลักษณะการฉีดน้ำเชื้อของกุ้งแชบ๊วยเพศผู้เข้าสู่กุ้งแชบ๊วยเพศเมีย
(http://www.m_e_hassanin.staff.zu.edu.eg/m.e.hassanin/page.asp?id=54)



ภาพที่ 4 ลักษณะของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย
(ภาพโดย: ณัฐชนน พลายสิน)

2. การแพร่กระจายของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

การแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การเกิดมลพิษในน้ำ การติดเชื้อจากรา โพรโตซัว ไวรัสและแบคทีเรีย โดยโรคที่พบว่ามีการแพร่ระบาดและเป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยง คือ โรควิบริโอซิส (Vibriosis) โรคเอ็นเอชพี (Necrotizing hepatopancreatitis หรือ NHP) โรคติดเชื้อริกเก็ตเซียในเฮปปาโตแพนเครียส (Hepatopancreatic rickettsia infection) และโรคติดเชื้อมัยโครแบคทีเรียม (Mycobacterial infections) เป็นต้น (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, 2551) ซึ่งการติดโรคดังกล่าวหากไม่ได้รับการป้องกันและแก้ไข อาจจะส่งผลเสียหายต่อปริมาณผลผลิตในการเพาะเลี้ยง และระบบนิเวศในการเพาะเลี้ยงได้

2.1 โรควิบริโอซิส

โรควิบริโอซิส (Vibriosis) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลวิบริโอ (*Vibrio*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน โดยอาจมีลักษณะเป็นท่อนตรงหรือท่อนโค้งคล้ายเครื่องหมายจุลภาค มีขนาดประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยการใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) และสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสโดยไม่เกิดก๊าซได้ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551; Baumann and Schubert, 1984) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอหลายชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งในมนุษย์ และในสัตว์น้ำหลายชนิด ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ทะเล มหาสมุทร รวมทั้งในบริเวณปากแม่น้ำที่เป็นรอยต่อระหว่างน้ำเค็มและน้ำจืด ดังนั้นจึงสามารถพบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอปนเปื้อนในอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในฟาร์มโดยในการเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถประสบกับปัญหาการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ซึ่งเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในการเพาะเลี้ยง (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, 2551; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551) เนื่องจากปัจจัยและสภาวะทางสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีคุณภาพไม่ดี ความหนาแน่นของกุ้งภายในบ่อเพาะเลี้ยง อุณหภูมิของน้ำสูงเกินไปและน้ำมีค่า DO ต่ำ เป็นต้น (Lewis, 1973; Lightner and Lewis, 1975; Brock and Lightner, 1990) ปัจจัยเหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการติดเชื้อและเกิดการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อดังกล่าวในกุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ (Sizemore and Davis, 1985) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ (Lightner and Lewis, 1975; Adams, 1991; Lightner et al., 1992; Lavilla-Pitogo et al., 1996; Lavilla-Pitogo et al., 1998; Chen et al., 2000) แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคติดเชื้อดังกล่าวนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอหลายชนิด ได้แก่ *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio penaeicida* (Brock and Lightner, 1990; Ishimaru et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานการระบาดของโรควิบริโอซิสในกุ้งจากการติดเชื้อ *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis* และแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ (Lightner, 1996)

V. harveyi เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค Luminescent vibriosis ได้ในกุ้งหลายชนิด เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นต้น (Lavilla-Pitogo et al., 1998; Guzman et al., 2010) ลักษณะอาการของกุ้งที่ติดโรควิบริโอซิสคือ กุ้งจะเกิดสภาวะขาดออกซิเจน ลำตัวมีสีตัวแดง เหงือกเป็นสีแดงถึงน้ำตาล กินอาหารได้น้อยและว่ายน้ำช้า ๆ อยู่บริเวณผิวน้ำ (Anderson et al., 1988; Nash et al., 1992) สามารถเห็นการเรืองแสงอย่างชัดเจนในเวลากลางคืน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551) และมีโอกาสตายสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Chen, 1992)

ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจึงเป็นปัญหาที่ต้องคำนึงถึงและทำการควบคุมเพื่อป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ซึ่งจะทำให้กุ้งที่ติดโรคตายและสูญเสียปริมาณการผลิต

2.2 โรค Necrotizing hepatopancreatitis หรือ NHP

โรคติดเชื้อที่พบว่ามีการระบาดในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่สำคัญอีกโรคหนึ่ง คือ โรค Necrotizing hepatopancreatitis หรือ NHP เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีความรุนแรง และเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ลักษณะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค NHP เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีขนาดเล็ก มีรูปร่างไม่แน่นอน และจะพบอยู่ภายในเซลล์เท่านั้น (Obligate intracellular rickettsia-like pathogen) (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และนิติ ชูเชิด, 2550) การระบาดของโรค NHP พบครั้งแรกในมลรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปีค.ศ. 1995 ทั้งนี้การระบาดของโรค NHP มักปรากฏขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 29-31 องศาเซลเซียส และความเค็มของน้ำเท่ากับ 20-40 พีพีที ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน แต่อย่างไรก็ตามในกุ้งตัวอ่อนจะไม่พบการระบาดของโรค NHP โดยโรคดังกล่าวจะพบการระบาดเฉพาะในกุ้งที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินเท่านั้น และสามารถพบการระบาดได้ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้การแพร่ระบาดของโรค NHP มีสาเหตุจากการกินกุ้งที่เป็นพาหะหรือกุ้งที่ติดโรค NHP อยู่เข้าไปโดยตรง การปนเปื้อนของน้ำหรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค NHP ในอุจจาระของกุ้งที่ติดเชื้อก็สามารถเป็นสาเหตุของการติดต่อโรคดังกล่าวได้ (Freliler et al., 1993; Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, 2008; Australian Government Department of Agriculture Fisheries and Forestry, 2012) รวมทั้งยังมีปัจจัยของสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมดังกล่าวไว้ข้างต้นร่วมด้วย สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของโรคตั้งแต่ช่วงกลางปี พ.ศ. 2548 ในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในหลายพื้นที่แถบฝั่งทะเลอันดามัน ลักษณะของกุ้งที่เป็นโรค โดยเริ่มจากกุ้งไม่กินอาหาร เปลือกบาง และตัวหลวม เหงือกมีลักษณะสีดำ มีบาดแผลตามลำตัว ตับและตับอ่อนฝ่อ การติดเชื้อ NHP อย่างรุนแรงจะทำให้ลักษณะของตับและตับอ่อนเละจนเหลว บวมน้ำ จำนวน R และ B-cells ลดลง เซลล์บุท่อตับและตับอ่อนมีขนาดเล็กลง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และนิติ ชูเชิด, 2550)

3. การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อจัดเป็นการเก็บรักษาสเปิร์มระยะยาวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานกว่าปกติ เพราะจะสามารถช่วยคงสภาพเซลล์ของสเปิร์มไว้ได้ เนื่องจากขบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เกือบเป็นศูนย์ และเมื่อละลายเซลล์อย่างถูกต้องทำให้เซลล์กลับมาอยู่ในสภาพเดิมและมีชีวิตอยู่ได้ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิในเซลล์ เซลล์อาจได้รับอันตรายเพราะภายนอกเซลล์มักจะเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งก่อนน้ำภายในเซลล์ ส่งผลให้สารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นสูงซึ่งมีสภาพเป็น Hypertonic กับสารละลายในเซลล์ที่ยังไม่ถูกแช่แข็ง ทำให้เกิดแรงดันออสโมติกส่งผลให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์เพื่อปรับสมดุลให้สารละลายทั้งสองด้านมีความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้นเซลล์จะมีขนาดเล็กลงระหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็ง การลดอุณหภูมิเร็วและเหมาะสมสามารถลดการเหี่ยวของเซลล์ได้ เนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกภายนอกไม่ทัน อย่างไรก็ตามการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไปจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์เป็นอันตรายต่อเซลล์เช่นกัน ดังนั้นในขบวนการแช่แข็งจึงมีการเติมสารเคมี คือ น้ำยา Extender เพื่อเจือจางน้ำเชื้อ โดย Extender ที่ดีควรมีคุณสมบัติคล้าย Seminal plasma คือทำให้สเปิร์มที่นำออกมาข้างนอกอยู่ในสภาวะเหมือนอยู่ในถุงสเปิร์มไม่เคลื่อนที่และลดการสูญเสียพลังงาน อีกทั้งยังช่วยรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดระหว่างการลดอุณหภูมิและยังเป็นสารอาหารให้กับเซลล์อีกด้วย สำหรับสารอาหารที่สำคัญที่ใช้ในการแช่แข็งคือ สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Ice crytal) ภายในเซลล์ ป้องกันเซลล์เหี่ยว ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการเสียสมดุลของเกลือแร่และอิเลคโตรไลท์ อีกทั้งยังสามารถรักษาคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และออกาแนลล์ให้มีสภาพปกติระหว่างแช่แข็ง การเก็บรักษาเซลล์โดยวิธีการแช่แข็งต้องกำหนดระยะเวลาที่เหมาะสม ให้เซลล์ปรับตัวกับสารละลาย (Equilibration time) อัตราการลดอุณหภูมิ อุณหภูมิสารละลาย ลักษณะหลอดแช่แข็ง การดูแลถังไนโตรเจนเหลวที่ถูกต้องและเหมาะสมจึงจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน

การแช่แข็งน้ำเชื้อมีประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ กล่าวคือ ในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำส่วนใหญ่นั้นเพศผู้เมื่อถึงระยะโตเต็มวัยจะผลิตน้ำเชื้อได้ตลอดเวลา แต่การตกไข่ของสัตว์เพศเมียจะไม่สามารถตกไข่ได้ตลอดเวลา ดังนั้นถ้าเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์เพศผู้ไว้ได้เมื่อเพศเมียตกไข่ก็จะสามารถนำมาผสมพันธุ์กับเพศเมียได้ตลอดเวลา รวมถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อนำไปผสมพันธุ์ของสัตว์ที่เป็นกะเทย (Hermaphrodite) เช่น ปลากะรัง (*Epinephelus tauvina*) ที่ช่วงแรกของชีวิตเป็นเพศเมียและเมื่อโตขึ้นจะกลายเป็นเพศผู้ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในเรื่องการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (Interspecific hybridization) เพื่อให้ได้สัตว์ที่พันธุ์ดีกว่าเดิม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียวิบริโอในแม่กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) จากแหล่งธรรมชาติฝั่งอ่าวไทยตะวันออก ผลจากการศึกษาพบ *Vibrio* จากตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่กุ้งแชบ๊วยจำแนกออกเป็น 4 ชนิด คือ *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus V. fluvialis* และ *V. damsela* ส่วนแบคทีเรีย Vibrios ที่แยกได้จากน้ำทะเลใน

แหล่งที่แม่กุ้งแชบ๊วยอาศัยอยู่ จำแนกได้ 5 ชนิด ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. damsela* และ *V. parahaemolyticus*

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2553) ศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ด้วยวิธีแช่เย็น โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีการแช่เย็น จากการศึกษาพบว่า Penicillin-Streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1% (v/v) สามารถรักษาการมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาได้มากที่สุดเป็นระยะเวลา 9 วัน และสามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้ดีกว่าชุดควบคุม (Ringer's solution)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2555) ทำการศึกษาชนิดของ Extender ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*) ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เย็น โดยทำการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยไว้ในสารละลาย Extender ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ Ca-F-Saline, Mineral Oil, Ringer's solution, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.8% NaCl ภายใต้อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน จากการทดลองพบว่าถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ใน Mineral oil สามารถรักษาการมีชีวิตรอดของสเปิร์มไว้ได้มากที่สุด เท่ากับ 89.10 ± 0.81% จากนั้นทำการศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin และ Penicillin-Gentamicin ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2% และทำการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เย็น ซึ่งจากการศึกษาพบว่าชุดทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1% แสดงอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มมากที่สุด

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2557ก) ศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin และ Penicillin-Gentamycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 % ต่ออัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและปริมาณแบคทีเรียแกรมลบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ผลการศึกษาพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1% มีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มสูงที่สุด และทุกชุดการทดลองสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในระหว่างที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นได้ตั้งแต่วันแรกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2557ข) ศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin และ Penicillin-Gentamycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 % ต่ออัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและปริมาณแบคทีเรีย *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ผลการศึกษาพบว่าชุดการทดลองที่ให้ผลการศึกษาดีที่สุดคือ ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1% โดยมีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มสูงที่สุด และสามารถยับยั้ง *Pseudomonas* ได้ตั้งแต่วันที่ 21 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

Hwang et al. (2004) ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากกระชายเหลือง (*Kaempferia pandurata*) ในการต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ คือ *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* และ *S. salivarius* จากการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดจากกระชายเหลืองต่อ *S. sobrinus*, *S. sanguinis* และ *S. salivarius* พบว่าค่า MIC มีค่าเท่ากันคือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารป้องกันฟันผุที่สกัดได้จากชาเขียว Carvacrol ทายม์ กานพลูและยูคาลิปตัส ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 125, 125, 250, 500 และ 500 ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดจากกระชายเหลืองความ

เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้ง *S. mutans* ได้ภายในเวลา 1 นาที ซึ่งสารสกัดกระชายเหลืองที่ได้มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของ *S. mutans* ถูกทำลาย

Nimrat et al. (2005) ได้ศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ด้วยวิธีการแช่เย็น และทำการประเมินการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา โดยการทดลองในขั้นตอนแรกทำการศึกษาถึงความเหมาะสมของสารละลาย Extender ทั้งหมด 4 ชนิด คือ Mineral oil, Ringer's solution, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.85% NaCl เพื่อใช้สำหรับเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 42 วัน โดยปราศจากการเติมยาปฏิชีวนะ พบว่า Mineral oil เป็นสารละลาย Extender ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มสูงที่สุดเท่ากับ 58.3 ± 2.9% เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 42 วัน และจากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Ps. aeruginosa* เป็นชนิดของแบคทีเรียกลุ่มหลักที่สามารถคัดแยกได้มากที่สุดจากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ รวมทั้งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจนับได้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นตลอดระยะเวลาการศึกษา ในการศึกษาขั้นที่ 2 จึงทำการศึกษาผลของการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำใน Mineral oil ที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin–Streptomycin ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0.1%, 1%, 2% และ 3% ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนปริมาณแบคทีเรียที่นับได้ทั้งหมด *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Ps. aeruginosa* ในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีปริมาณที่ลดลงอยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 14 ภายหลังจากการเก็บรักษา และจากการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิจากการผสมเทียมพบว่าถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาไว้ใน Mineral oil เป็นระยะเวลา 7-8 วัน ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส มีอัตราการฟักของตัวอ่อนใกล้เคียงกับชุดควบคุม ดังนั้นการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่เย็นเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการจัดการการผสมพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ หรือสัตว์น้ำกลุ่มไม่มีกระดูกสันหลังที่สร้างถุงน้ำเชื้อชนิดอื่น ๆ

Bansemir et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่สามารถใช้ได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดการใช้สารปฏิชีวนะที่มักส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยมุ่งเน้นสารสกัดทางธรรมชาติจากสิ่งแวดล้อมทางน้ำ การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดจากสาหร่ายที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลาและคัดเลือกสารสกัดที่มีคุณสมบัติที่ดีที่น่าจะนำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงทำการสกัดสารสกัดจากสาหร่าย 26 ชนิด ด้วยสารไดคลอโรมีเทน เมทานอลและน้ำเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา 5 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum* และ *Yersinia reckeri* โดยพบว่าสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายสีแดงชนิด *Asparagopsis armata*, *Ceramium rubrum*, *Dracheilla minuta*, *Falkenbergia rufolanosa*, *Gracilaria cornea* และ *Halopitys incurvus* ที่สกัดโดยใช้สารไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมากที่สุด ซึ่ง *V. anguillarum* และ *P. anguilliseptica* เป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารสกัดจากสาหร่าย

สูงสุด จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและสุขภาพของสัตว์น้ำได้

Nimrat et al. (2006) ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งขาว (*L. vannamei*) แบบแช่เย็น และประเมินการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกทำการศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อไว้ในสารละลาย Extender ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ Mineral oil, Ringer's solution, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.85% NaCl ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่าถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ใน Mineral oil มีลักษณะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มมีค่ามากที่สุด สำหรับแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวในระหว่างการเก็บรักษา คือ *B. circulans*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp. ต่อมาในขั้นตอนที่สองทำการศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวแบบแช่เย็น โดยทำการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวใน Mineral oil ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ และเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin–Streptomycin 0.1% ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวที่เก็บรักษาไว้ 35 วัน ในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin–Streptomycin 0.1% มีค่าสูงสุดเท่ากับ 69.5±3.9% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมยาปฏิชีวนะ ($p<0.05$) และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ใน Mineral oil ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะมีค่าอยู่ระหว่าง 28.3±4.8 ถึง 2416.7±299.4 CFU/g แต่ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียในชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin–Streptomycin 0.1% ดังนั้นการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่เย็นเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการจัดการการผสมพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งขาว

Yano et al. (2006) ศึกษาถึงฤทธิ์ของเครื่องเทศและสมุนไพร 18 ชนิด ในการต้านแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคทางอาหาร โดยศึกษาถึงปัจจัยร่วมระหว่างผลของอุณหภูมิและระดับของสารอาหาร จากผลการทดลองพบว่าโหระพา (Basil) กานพลู (Clove) กระเทียม (Garlic) มะรุม (Horseradish) มาเจอแรม (Marjoram) โอรีกาโน (Oregano) และไธม (Thyme) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวที่อุณหภูมิการบ่ม 30 องศาเซลเซียส ส่วนโหระพา กานพลู กระเทียม มาเจอแรม โอรีกาโน ไธม ไพล (Cassumunar) ขิง (Ginger) เจแปนนิสเปปเปอร์ (Japanese pepper) สะระแหน่ (Peppermint) โรสแมรี่ (Rosemary) เซจ (Sage) สเพียมิ้นท์ (Spearmint) และขมิ้น (Turmeric) สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิการบ่ม 5 องศาเซลเซียส โดยค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ที่น้อยที่สุด คือ 0.001 และ 0.00025 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบในมาเจอแรม ที่อุณหภูมิการบ่ม 30 และ 5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเครื่องเทศและสมุนไพรสามารถใช้ในการป้องกันความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และใช้ในเทคโนโลยีที่ใช้ปัจจัยร่วมหลายปัจจัยร่วมกับการใช้อุณหภูมิต่ำในการป้องกันความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้

Ding et al. (2009) ทำการศึกษาผลลบของ Extender และสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา Mandarin (*Siniperca chuatsi*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง จากการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อใน Extender ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำน้ำเชื้อดังกล่าวมาใส่ในหลอดแช่แข็ง เพื่อนำไปแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว

โดยให้หลอดน้ำเชื้ออยู่เหนือผิวหน้าของไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -180 องศาเซลเซียส โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อวางบนผิวหน้าของไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำหลอดดังกล่าวไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวต่อไป จากนั้นนำน้ำเชื้อมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที พบว่าน้ำเชื้อมีอัตราการเคลื่อนที่สูงถึง 96±73% และเมื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิกับไข่และอัตราการฟักพบว่าน้ำเชื้อปลา Mandarin ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งเป็นเวลา 1 สัปดาห์และ 1 ปี มีอัตราการปฏิสนธิกับไข่เท่ากับ 66.0±15.14 และ 54.7±64.40% ตามลำดับ และมีอัตราการฟักไข่เท่ากับ 62.97±14.28% และ 52.58±11.17% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่ของน้ำเชื้อสดที่มีค่าเท่ากับ 69.42±8.11% และ 59.82±5.27% ตามลำดับ

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ
    - 1.1 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
    - 1.2 ไมโครปิเปต
    - 1.3 หลอดหยด
    - 1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
    - 1.5 บีกเกอร์ (Beaker)
    - 1.6 ปากคีบ (Forceps)
    - 1.7 หลอด Vial และ Cryovial
    - 1.8 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)
    - 1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
    - 1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
    - 1.11 Programmable controlled-rate freezer
2. อุปกรณ์ในการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
    - 2.1 แผ่นสไลด์ (Slide)
    - 2.2 สี Eosin-Nigrosin
    - 2.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์
    - 2.4 กล้องจุลทรรศน์
    - 2.5 Emulsion oil
    - 2.6 เครื่องนับจำนวน (Counter)
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ
    - 3.1 จานเพาะเชื้อ (Petridish)
    - 3.2 Plate Count Agar (PCA)
    - 3.3 Pseudomonas Isolation Agar (PIA)
    - 3.4 Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar (TCBS)
4. สารเคมี
    - 4.1 Calcium-free saline extender
    - 4.2 DMSO 10% (v/v)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

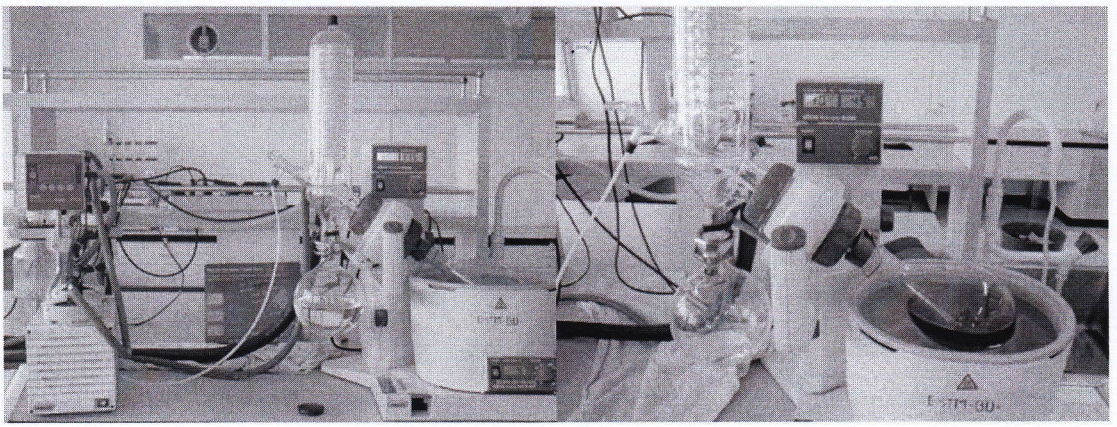
ทำการเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจากทะเลบริเวณหาดบางแสนและเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จากนั้นคัดเลือกพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศโดยพิจารณาจากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อ (spermatophores) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 จากนั้นนำพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของลำตัว และนำไปเลี้ยงในบ่อขนาด 3x4x1.5 เมตร ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และให้อาหารแก่พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย คือ หมึกและแม่เพรียงวันละ 2 ครั้ง ประมาณ 10% น้ำหนักตัว/วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลที่สะอาดในบ่อพักพ่อพันธุ์ประมาณ 30% ทุก ๆ 1-2 วัน พ่อพันธุ์จะถูกเลี้ยงให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5 วัน และตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงพ่อพันธุ์ พ่อพันธุ์ที่มีถุงน้ำเชื้อที่ยังพัฒนาไม่มากนัก เช่น มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย หรือยังไม่มีถุงน้ำเชื้อจะไม่นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่าพ่อพันธุ์ทุกตัวที่ใช้ในการทดลองมีคุณภาพสเปิร์มดี ซึ่งสังเกตเบื้องต้นได้จากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อที่ยิ่งขาวขุ่นมากแสดงถึงคุณภาพสเปิร์มที่ดี ในขณะที่ถุงน้ำเชื้อที่ขาวขุ่นเล็กน้อยแสดงว่าสเปิร์มมีคุณภาพต่ำ

2. การรวบรวมถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

การรวบรวมถุงน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วยทำโดยการใช้มือกดเบา ๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้าง ซึ่งมี Petasma อยู่บริเวณนั้น เมื่อเริ่มเห็นถุงน้ำเชื้อโผล่ออกมาจึงใช้คีมคีบ (Forceps) ที่สะอาดปราศจากเชื้อดึงเอาถุงน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อนำไปทดลองต่อไป

3. การสกัดสมุนไพร (Quave et al., 2008)

นำสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ใบมะรุม และขิง ซึ่งผ่านการศึกษาจากโครงการวิจัย เรื่อง "การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย" ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557 มาล้างน้ำทำความสะอาด แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำผงสมุนไพรใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเอทานอล 95% ในอัตราส่วนสมุนไพรต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 10 แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบเท่ากับ 100-120 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดสมุนไพรผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เพื่อใช้เป็นสารสกัดสต็อค



ภาพที่ 5 เครื่อง Rotary evaporator

4. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

4.1 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

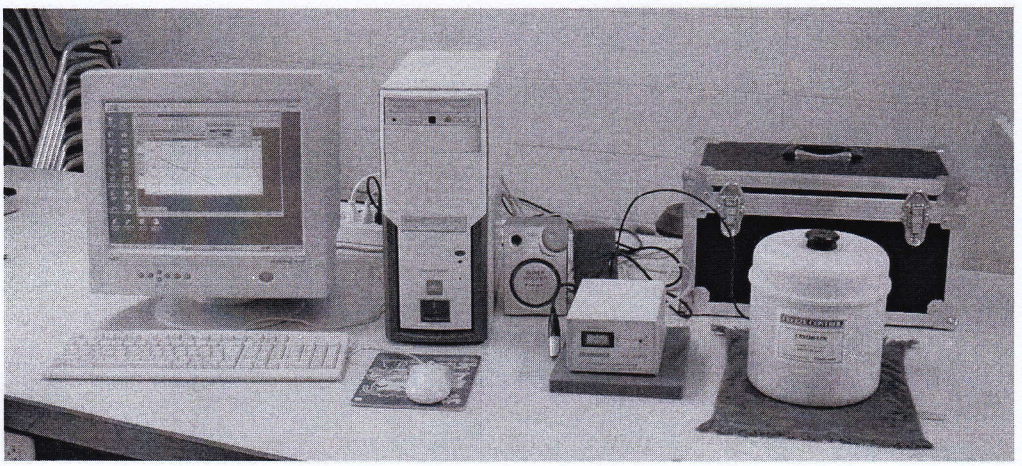
คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ใบมะรุม และขิง จากโครงการวิจัย เรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557 มาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1	เติม Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 10% (v/v) (Control)
ชุดการทดลองที่ 2	เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1%
ชุดการทดลองที่ 3	เติมสารสกัดใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ชุดการทดลองที่ 4	เติมสารสกัดขิง ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

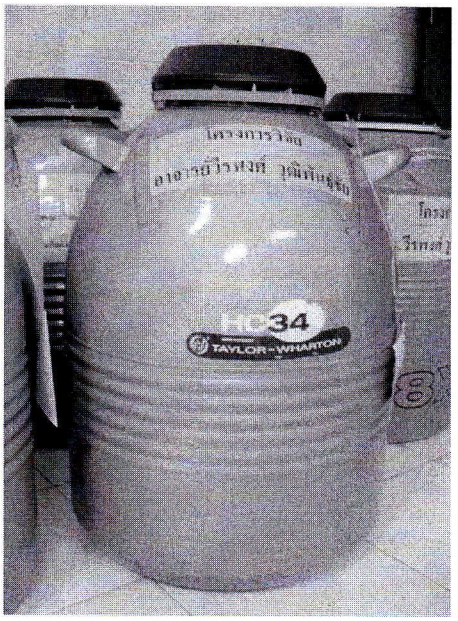
นำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ตามขั้นตอนการเก็บรักษาในข้อ 4.2 จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองมาศึกษาอัตราการมีชีวิต (ข้อ 4.3.1) ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย (ข้อ 4.3.2) ขณะเก็บรักษาในระยะเวลาต่างกันตั้งแต่หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6 และ 9 เดือน

4.2 การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

นำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรวบรวมได้ใส่ลงในหลอด Cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO) จากนั้นเติมสารชนิดต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดลองดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ให้อยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibrium) นาน 10 นาที ดูดสารละลายออก แล้วนำมาแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ที่ 2 องศาเซลเซียส/นาที อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส Hold 0.5 นาที ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งที่ได้ลดอุณหภูมิแล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)



ภาพที่ 7 ถังไนโตรเจนเหลว

4.3 การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บ (Storage period) ต่อคุณภาพสเปิร์มของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

นำเอาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่มีคุณภาพดีมาแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (ข้อ 4.2) โดยถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจะถูกแช่แข็งใน Cryovial และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนมากที่เก็บเหล่านี้จะถูกผลิตขึ้นมาในปริมาณมากจากพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยหลายตัว (Pooled spermatophores) ที่มีคุณภาพดี ถุงน้ำเชื้อจะถูกนำมาละลายและประเมินคุณภาพของสเปิร์มตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ (หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6 และ 9 เดือน) เพื่อประเมินถึงผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อคุณภาพสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง รวมทั้งประเมินการเปลี่ยนแปลงการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำ

4.3.1 การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิต (% Sperm viability)

การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิต (% Sperm viability) ทำโดยละลาย (Thawing) ถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดยนำหลอด Cyovial มาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาสับให้ละเอียดบนแผ่นสไลด์ด้วยใบมีด และแบ่งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย 1 ถุงต่อ 2 สไลด์หยด Eosin ปริมาตร 1 หยด และหยด Nigrosin ปริมาตรสองเท่าลงไปภายหลัง จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำกระจกปิดสไลด์มาเกลี่ยบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ รอให้แห้ง จากนั้น Fix โดยผ่านแปลวไฟ ควรระวังไม่ให้ร้อนเกินไป สุ่มนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (Fribourgh, 1966; Vuthiphandchai and Zohar, 1999) สเปิร์มที่มีชีวิต (Viable sperm) จะไม่ดูดซึมสีหรือติดสีย้อม และตัวสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (Dead sperm) จะดูดซับสีหรือติดสีย้อมสีม่วงแดง โดยสุ่มนับสเปิร์ม ปริมาณ 200 ตัว และทำทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

4.3.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ผ่านการแช่แข็ง

การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งที่เริ่มต้นจากนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6 และ 9 เดือน มาละลายที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นบดถุงน้ำเชื้อในโกร่งบดยาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วดูดน้ำเชื้อใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl จากนั้นปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar, Pseudomonas Isolation Agar และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และในสัตว์น้ำ รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

1) การประเมินการปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อสด (Nimrat et al., 2006; 2008)

รวบรวมถุงน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วยโดยใช้มือกดเบาๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้าง จากนั้นใช้คีมคีบที่สะอาดดึงถุงน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วนำถุงน้ำเชื้อมาบดให้ละเอียดในโกร่งบดยา จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่างๆ แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar, Pseudomonas Isolation Agar และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar เพื่อศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ตามลำดับ โดยในแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างจนทั่วจานเพาะเชื้อด้วยวิธีเสปรดเพลท (Spread plate) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการทดลอง และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Holt et al. (1984)

2) การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียในถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Nimrat et al., 2006)

เจือจางตัวอย่างถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากการทดลองด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเจือจางที่ต้องการ แล้วปิเปตตัวอย่างสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar, Pseudomonas Isolation Agar และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar เพื่อศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ตามลำดับ โดยในแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างจนทั่วจานเพาะเชื้อด้วยวิธีเสปรดเพลท (Spread plate) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Holt

et al. (1984) โดยเก็บตัวอย่างถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งมาทำการทดลองในช่วงระยะเวลาต่างกัน ตั้งแต่ หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6 และ 9 เดือน

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

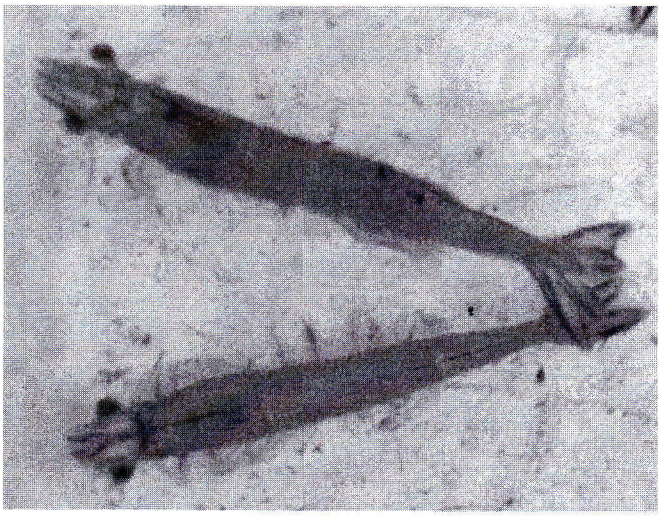
ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ The statistical program for the social sciences (SPSS) เปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ P = 0.05

บทที่ 4
ผลการทดลอง

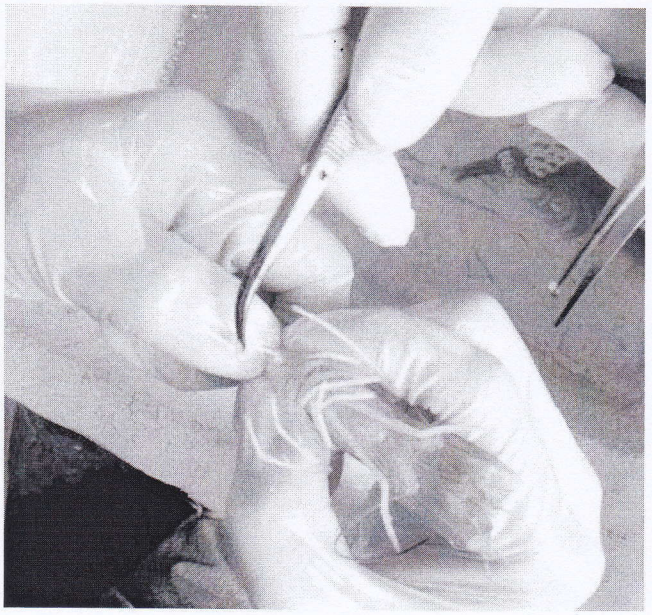
การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ เป็นระยะเวลานาน 9 เดือน ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1. การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์ และการรวบรวมถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

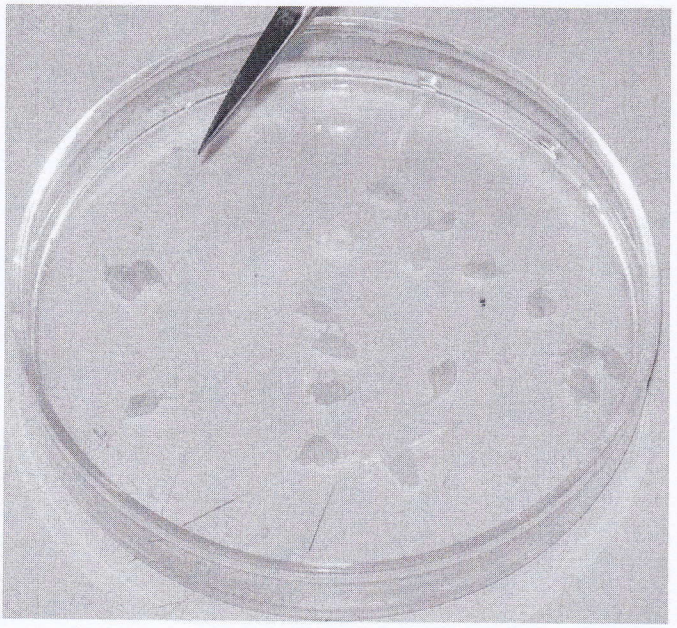
รวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยอายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 80 ตัว รวบรวมได้จากทะเลบริเวณหาดบางแสนและเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 25.48±5.19 กรัม มีความยาวจากปลายกรีถึงปลาย Telson เท่ากับ 14.59±0.97 เซนติเมตร (ภาพที่ 8) จากนั้นดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้าง (ภาพที่ 9) แล้วนำมาวางในจานเพาะเชื้อที่มี Ca-free saline ที่ปราศจากเชื้อและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 8 พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย



ภาพที่ 9 การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย



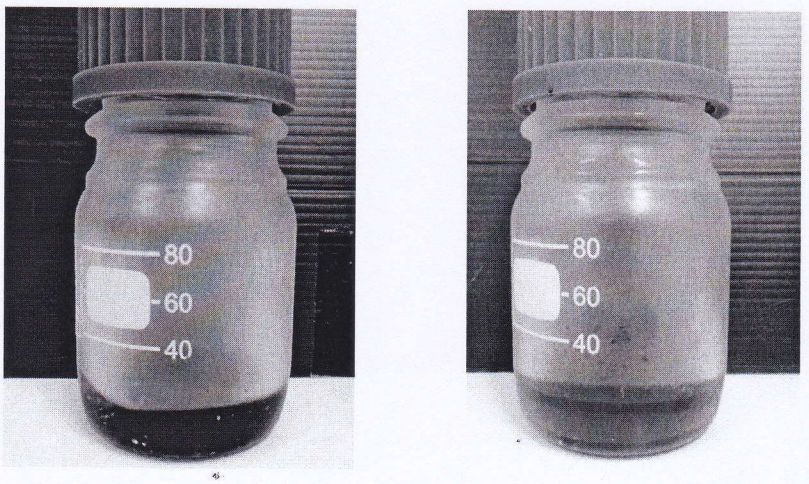
ภาพที่ 10 ถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

2. ลักษณะของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ใบมะรุม และขิง โดยหลังอบแห้งมีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 11 เมื่อนำมาสกัดและระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator สารสกัดใบมะรุมมีสีเขียวเข้มอมดำ ข้นเหนียว ส่วนสารสกัดขิงมีสีน้ำตาล ข้นเหนียว ดังแสดงในภาพที่ 12

(a) (b)

ภาพที่ 11 ลักษณะของสมุนไพรหลังอบแห้ง
(a) ใบมะรุม (b) ขิง



(a) (b)

ภาพที่ 12 ลักษณะของสารสกัดสมุนไพร
(a) สารสกัดใบมะรุม (b) สารสกัดขิง

3. การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

3.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติพบว่า เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยก่อนเริ่มต้นการทดลองมีคุณภาพดีเยี่ยม โดยมีค่าเท่ากับ 99.89 ± 0.19% ส่วนถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เตรียมสำหรับแช่แข็งด้วยการเติมสารที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% ชุดที่เติมสารสกัดใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดที่เติมสารสกัดขิง ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับถุงน้ำเชื้อสดก่อนการแช่แข็ง โดยมีค่าเท่ากับ 99.44 ± 0.51%, 99.33 ± 0.33%, 99.89 ± 0.19% และ 99.33 ± 0.58% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน พบว่ามีปริมาณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 99.44 ± 0.69%, 99.56 ± 0.51%, 99.67 ± 0.33% และ 99.56 ± 0.19% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าคุณภาพน้ำเชื้อมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับช่วงเริ่มต้นการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1

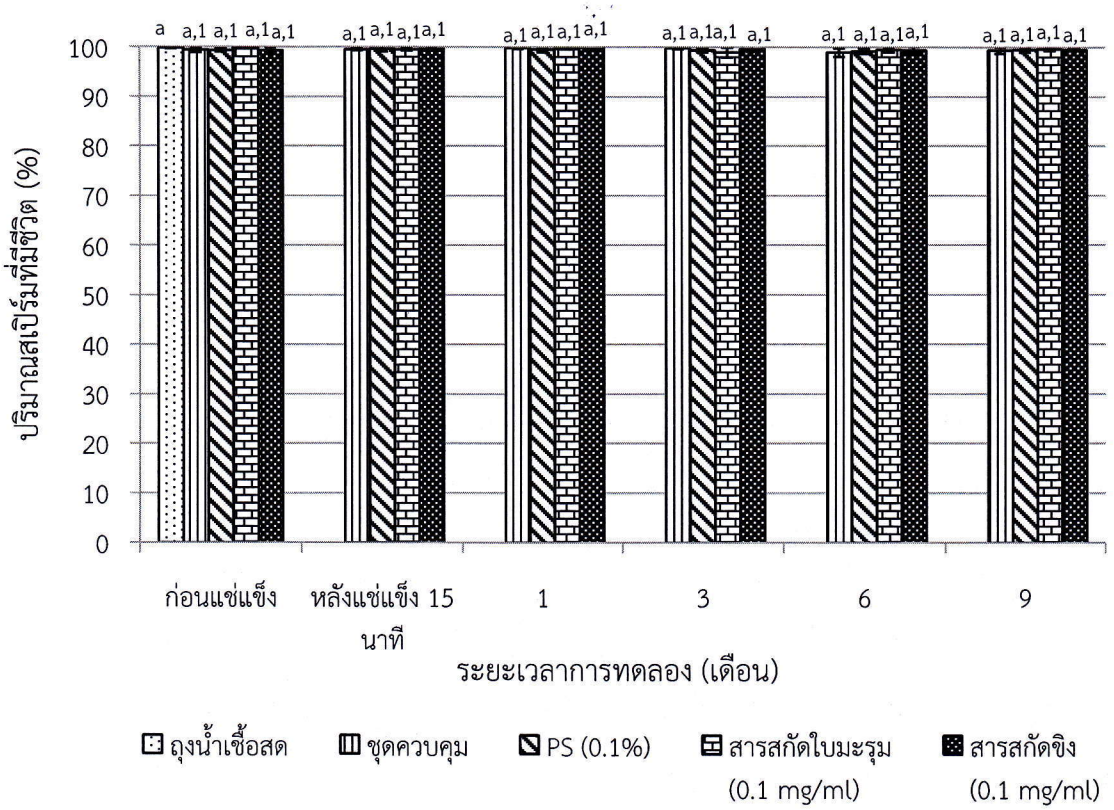
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	99.89 ± 0.19 [a]	99.44 ± 0.51 [a,1]	99.33 ± 0.33 [a,1]	99.89 ± 0.19 [a,1]	99.33 ± 0.58 [a,1]
หลังแช่แข็ง 15 นาที		99.56 ± 0.19 [a,1]	99.67 ± 0.58 [a,1]	99.56 ± 0.19 [a,1]	99.67 ± 0.33 [a,1]
1		99.89 ± 0.19 [a,1]	99.56 ± 0.51 [a,1]	99.78 ± 0.19 [a,1]	99.89 ± 0.19 [a,1]
3		99.89 ± 0.19 [a,1]	99.44 ± 0.38 [a,1]	99.00 ± 1.00 [a,1]	99.67 ± 0.58 [a,1]
6		99.00 ± 0.88 [a,1]	99.22 ± 0.51 [a,1]	99.56 ± 0.51 [a,1]	99.44 ± 0.69 [a,1]
9		99.44 ± 0.69 [a,1]	99.56 ± 0.51 [a,1]	99.67 ± 0.33 [a,1]	99.56 ± 0.19 [a,1]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

1) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

ถุงน้ำเชื้อสดของกุ้งแชบ๊วยก่อนเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ $3.33\pm0.33\times10^{3}$ CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างกับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยก่อนแช่แข็งในชุดควบคุม ชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% ชุดที่เติมสารสกัดใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดที่เติมสารสกัดขิง ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเท่ากับ $1.00\pm0.00\times10^{3}$, $1.50\pm0.50\times10^{3}$, $1.25\pm0.15\times10^{3}$ และ $2.00\pm0.00\times10^{3}$ CFU/g ตามลำดับ เมื่อนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแช่แข็งเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีปริมาณเท่ากับ $1.00\pm0.00\times10^{2}$, $2.33\pm1.15\times10^{2}$, $2.00\pm1.00\times10^{2}$ และ $2.50\pm0.50\times10^{2}$ CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

2) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio*

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3

3) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4

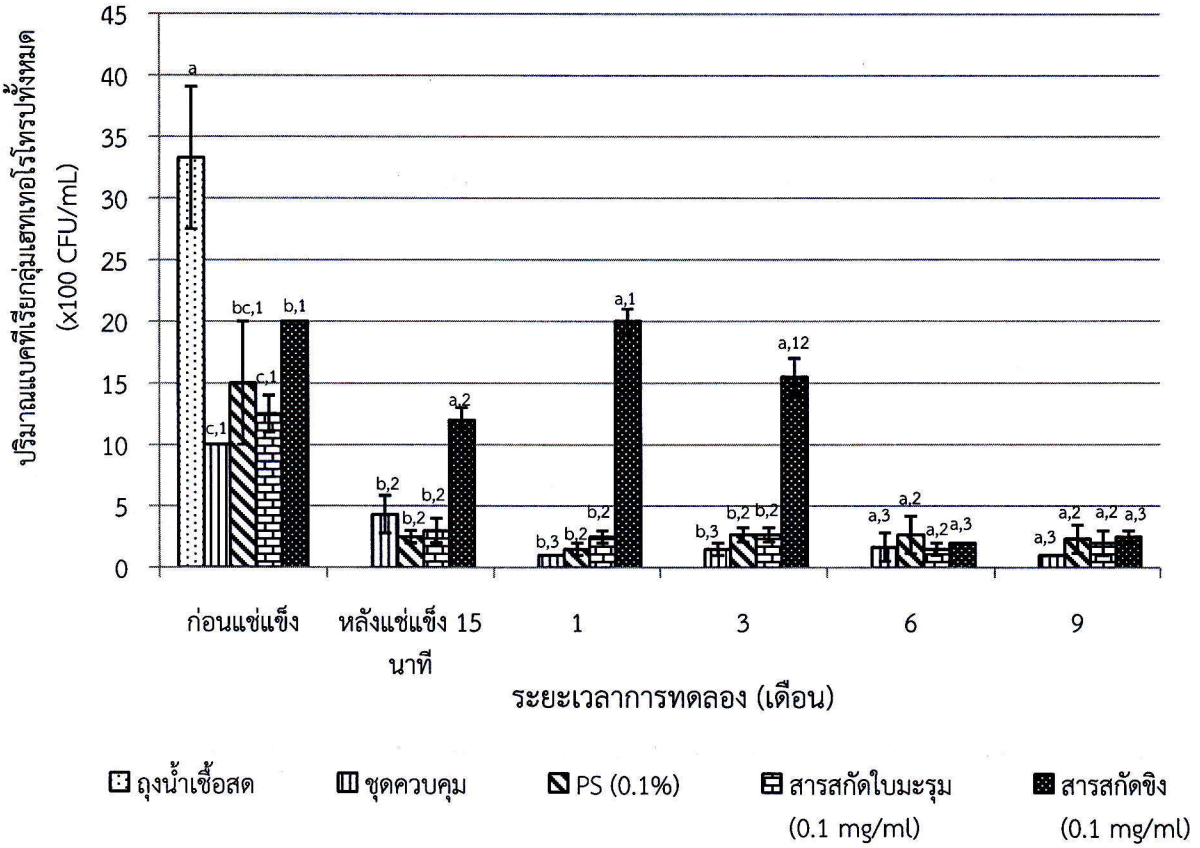
ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	$3.33\pm0.58\times10^{3\ a}$	$1.00\pm0.00\times10^{3\ c,1}$	$1.50\pm0.50\times10^{3\ bc,1}$	$1.25\pm0.15\times10^{3\ c,1}$	$2.00\pm0.00\times10^{3\ b,1}$
หลังแช่แข็ง 15 นาที		$4.33\pm1.53\times10^{2\ b,2}$	$2.50\pm0.50\times10^{2\ b,2}$	$3.00\pm1.00\times10^{2\ b,2}$	$1.20\pm0.10\times10^{3\ a,2}$
1		$1.00\pm0.00\times10^{2\ b,3}$	$1.50\pm0.50\times10^{2\ b,2}$	$2.50\pm0.50\times10^{2\ b,2}$	$2.00\pm1.00\times10^{3\ a,1}$
3		$1.50\pm0.50\times10^{2\ b,3}$	$2.67\pm0.58\times10^{2\ b,2}$	$2.67\pm0.58\times10^{2\ b,2}$	$1.55\pm0.15\times10^{3\ a,12}$
6		$1.67\pm1.15\times10^{2\ a,3}$	$2.67\pm1.52\times10^{2\ a,2}$	$1.50\pm0.50\times10^{2\ a,2}$	$2.00\pm0.00\times10^{2\ a,3}$
9		$1.00\pm0.00\times10^{2\ a,3}$	$2.33\pm1.15\times10^{2\ a,2}$	$2.00\pm1.00\times10^{2\ a,2}$	$2.50\pm0.50\times10^{2\ a,3}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 14 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
หลังแช่แข็ง 15 นาที		< 10	< 10	< 10	< 10
1		< 10	< 10	< 10	< 10
3		< 10	< 10	< 10	< 10
6		< 10	< 10	< 10	< 10
9		< 10	< 10	< 10	< 10

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
หลังแช่แข็ง 15 นาที		< 10	< 10	< 10	< 10
1		< 10	< 10	< 10	< 10
3		< 10	< 10	< 10	< 10
6		< 10	< 10	< 10	< 10
9		< 10	< 10	< 10	< 10

3.4 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ คือ แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae ได้แก่ *Arthrobacter agilis*, *Kocuria palustris*, *Nesterenkonia halobia*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus lentus* และ *Staphylococcus muscae* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus fastidiosus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus macquariensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pantothenticus* และ *Bacillus pasteurii* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบนั้นพบไม่มากนักคือ แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Obesumbacterium proteus* biogroup 1, *Tatumella ptyseos* และ *Xenorhabdus luminescens/X. nemtophilus* ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ชนิดแบคทีเรีย	ถุงน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3				เดือนที่ 6				เดือนที่ 9			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม																									
วงศ์ Micrococcaceae																									
Arthrobacter agilis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kocuria palustris	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	X
Nesterenkonia halobia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	✓	✓	✓	X	X	X	X	X
Staphylococcus cohnii subsp. *cohnii*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Staphylococcus kloosii	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Staphylococcus lentus	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Staphylococcus muscae	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ตารางที่ 5 แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	ถุงน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3				เดือนที่ 6				เดือนที่ 9			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน																									
วงศ์ Bacillaceae																									
Bacillus alcalophilus	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓
Bacillus brevis	X	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X
Bacillus fastidiosus	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus firmus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus insolitus	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus lentimorbus	X	X	X	X	✓	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus macquariensis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus megaterium	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus pantothenticus	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓
Bacillus pasteurii	X	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	✓	X	X	X	✓

ตารางที่ 5 แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	*ถุงน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3				เดือนที่ 6				เดือนที่ 9			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน																									
วงศ์ Enterobacteriaceae																									
Obesumbacterium proteus biogroup 1	✓	X	X	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tatumella ptyseos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Xenorhabdus luminescens/ X. nemtophilus	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

หมายเหตุ ✓ = พบ
X = ไม่พบ

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี																								
														Acid from											
	Catalase	Coagulase	Oxidase	Nitrate	Motility	Urease	Arginine dihydrolase	Ornithine	Polymyxin B	Novobiocin	Esculin Hydrolysis	Starch Hydrolysis	Gelatin Hydrolysis	Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Mannitol	Mannose	Arabinose	Trehalose	Xylose	Raffinose	Cellobiose
Arthrobacter agilis	+	N	+	-	+	-	-	N	N	N	+	+	+	-	N	N	-	-	-	N	N	-	N	N
Kocuria palustris	+	N	-	+	-	+	-	N	N	N	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	N	-	N	N
Nesterenkonia halobia	+	N	+	-	-	-	-	N	N	N	N	+	N	+	N	N	+	+	+	N	-	+	N	N
Staphylococcus cohnii subsp. *cohnii*	+	-	-	-	-	-	-	-	S	R	N	N	N	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Staphylococcus kloosii	+	-	-	-	-	-	-	-	S	R	N	N	N	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus lentus	+	-	+	+	-	-	-	-	S	R	N	N	N	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Staphylococcus muscae	+	-	-	+	-	-	-	-	N	S	N	N	N	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+

หมายเหตุ N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ, S หมายถึง Susceptible, R หมายถึง Resistant

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี																				
					Acid from												Growth at				
	Catalase	Anaerobic growth	VP test	Citrate utilization	D- mannitol	D- glucose	L- arabinose	Starch hydrolysis	Gas from glucose	Nitrate reduction	Gelatin hydrolysis	pH in VP broth <6	pH in VP broth >7	Growth at pH 6.8 Nutrient broth	Growth in NaCl 5%	Growth in NaCl 7%	10°c	40°c	50°c	55°c	65°c
Bacillus alcalophilus	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Bacillus brevis	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Bacillus fastidiosus	+	-	-	-	N	N	N	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Bacillus firmus	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	N	+	-	-	-
Bacillus insolitus	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Bacillus lentimorbus	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus macquariensis	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Bacillus megaterium	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	N	-	+	N	+	+	N	-	-	-
Bacillus pantothenticus	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	N	-	-
Bacillus pasteurii	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-

หมายเหตุ N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี														
												Gas form			
	TSI	H_2S production	Indole production test	Methyl red test	Voges-Proskauer test	Citrate utilization test	Urease test	Motility	Malonate utilization test	Lysine decarboxykase test	Ornithine decarboxykase test	Sucrose	Mannitol	Arabinose	Maltose
Obesumbacterium proteus biogroup 1	N	-	-	+	N	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Tatumella ptyseos	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Xenorhabdus luminescens/ X. nemtophilus	N	-	N	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีศักยภาพเหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย เนื่องจากสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยให้มีคุณภาพดีเยี่ยมตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน โดยมีคุณภาพไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% นอกจากนั้นยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดด้วยประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบใช้เครื่องมืออัตโนมัติเป็นระยะเวลานาน 9 เดือน โดยสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างดีเยี่ยม (เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 95%) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเก็บรักษาตั้งแต่การเตรียมถุงน้ำเชื้อ สารละลายบัฟเฟอร์ อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายถุงน้ำเชื้อ มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานทางวิชาการหลายฉบับที่รายงานถึงความสำเร็จในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแบบแช่แข็ง ยกตัวอย่างเช่น Akarasanon et al. (2004) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man)) ด้วยการเก็บรักษาแบบแช่แข็งนานกว่า 150 วัน Bart et al. (2006) ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยมีการปฏิสนธิสูงถึง 79% นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม กุ้งทะเล และปูทะเล ในไนโตรเจนเหลวประสบความสำเร็จหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 30 – 31 วัน (Anchordoguy et al., 1988; Chow et al., 1985; Jeyalectumie and Subramoniam, 1989)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งสองชนิดมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย สารสกัดใบมะรุมมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดขิงในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดยสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้ดีกว่าสารสกัดขิงในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ลดอุณหภูมิด้วยเครื่องอัตโนมัติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยมาก ตามปกติแล้วกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อและถุงน้ำเชื้อเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการลดอุณหภูมิ การสูญเสียน้ำของเซลล์ การแช่แข็งและการละลาย (Tiersch, 2006; Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) กระบวนการเหล่านี้ล้วนส่งผลให้เซลล์สเปิร์มได้รับบาดเจ็บและตายได้ ดังนั้นการเติมสารสกัดใบมะรุมอาจมีบทบาทในการป้องกันอันตรายที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดย Verma et al. (2009) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดใบมะรุม ได้แก่ Gallic acid, Chlorogenic acid, Ellagic acid และ Ferulic acid และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Kaempferol, Quercetin

และ Rutin มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอของหนูทดลอง โดยช่วยป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อและการตายของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระที่ได้จากการสลายตัวของออกซิเจน (Halliwell and Gutteridge, 2003) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เหล่านี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ในหนูขาวใหญ่ (Sprague-Dawley rats) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ในสมองหนูขาวชนิดนี้ (Matis et al., 1988) รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ยังป้องกันการเกิดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Bakkali et al., 2008) ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารสกัดใบมะรุมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจึงมีความเหมาะสมทั้งในด้านประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและการลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อเพื่อการนำไปใช้ในการผสมเทียม เพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยในเชิงอนุรักษ์สายพันธุ์และเชิงพานิชย์ รวมทั้งการใช้ในการบริหารการจัดการฟาร์ม นอกจากนั้นการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ยังเป็นการนำองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นสู่การสร้างนวัตกรรมเพื่อทดแทนและ/หรือลดการใช้สารปฏิชีวนะที่นำเข้าจากต่างประเทศ และเป็นการลดการใช้สารปฏิชีวนะที่สามารถตกค้างในธรรมชาติและสร้างผลกระทบต่อระบบนิเวศน์และห่วงโซ่อาหารที่ย้อนกลับมาส่งผลกระทบต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของคนไทย

ส่วนการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธีการแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ พบแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ คือ แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae ได้แก่ *Arthrobacter agilis*, *Kocuria palustris*, *Nesterenkonia halobia*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus lentus* และ *Staphylococcus muscae* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus fastidiosus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus macquariensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pantothenticus* และ *Bacillus pasteurii* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบนั้นพบไม่มากนักคือ แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Obesumbacterium proteus* biogroup 1, *Tatumella ptyseos* และ *Xenorhabdus luminescens/X. nemtophilus*

จากการศึกษาของ Nimrat et al. (2008a) ได้รายงานถึงแบคทีเรียที่พบในถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งประกอบด้วยแบคทีเรีย 23 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus* nonaureus, *Micrococcus* spp., *Kocuria varians*, *Corynebacterium* spp., *C. aquaticum*, *Rhodococcus* spp., *Bacillus cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. megaterium* และ *B. licheniformis* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia fergusonii*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes xylosoxidanes*, *Enterobacter* spp., *Vibrio* spp., *Brevibacterium* spp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas* spp., *Ps. aeruginosa* และ *Burkholderia cepacia* นอกจากนั้น Oxley et al. (2002) ได้รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* และ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มักพบในลำไส้กุ้ง ส่วน Jeyasekaran et al. (2006) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียพบในกุ้งขาวอินเดียสด (fresh raw shrimp) ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* และ *Serratia*

แบคทีเรียทุกชนิดที่พบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งในการศึกษาในครั้งนี้จัดเป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรคในมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Bacillus brevis* และ *Tatumella ptyseos* โดย *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปบนผิวหนังและเยื่อบุของมนุษย์ แต่ในบางสภาวะแบคทีเรียชนิดนี้สามารถฉวยโอกาสในการก่อโรค (Stefano et al., 2012) มีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฝีในสมอง (Brain abscess) ปอดบวม (Pneumonia) โรคถุงน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน (Acute cholecystitis) เยื่อบุหัวใจอักเสบ (Endocarditis) การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (Bacteremia) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) และโรคข้ออักเสบติดเชื้อ (Septic arthritis) (Soldera et al., 2013) แบคทีเรียอีกชนิดที่สามารถฉวยโอกาสก่อโรค คือ *Bacillus brevis* แบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างรุนแรงในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Immunocompromised host) ผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (Intravenous drug users) ผู้ป่วยที่ได้รับการศัลยกรรมประสาท (Neurosurgery) การรักษาเกี่ยวกับกระดูกและข้อ (Orthopedics procedure) บาดแผลไฟไหม้ (Burn victims) ผู้ป่วยที่ได้รับการฟอกไต (Dialysis patients) และผู้ป่วยที่มีบาดแผลบาดเจ็บ เป็นต้น โดยมีรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเซลล์ตับชนิด Hepatocellular carcinoma ที่เกิดภาวะเยื่อบุช่องท้องอักเสบ (Peritonitis) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของ *Bacillus brevis* (Parvez et al., 2009) และแบคทีเรียชนิดสุดท้าย คือ *Tatumella ptyseos* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดที่ฉวยโอกาสก่อโรคในมนุษย์ ในปัจจุบันข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้มีไม่มากนัก แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Tracheobronchial/pulmonary infections) เช่น ปอดบวม (Pneumonitis) โรคหอบหืด (Asthma) โรคหลอดเลือดอักเสบที่เกิดร่วมกับมีก้อนเนื้อ (Wegener granulomatosis) โรคปอดอักเสบเรื้อรัง (Chronic lung disease) และภาวะปอดบวมน้ำ (Pulmonary edema) (Hollis et al., 1981; Farmer et al., 1985; Stone et al., 2007) การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับวัณโรคปอด (Pulmonary tuberculosis) (Berka et al., 2001) และการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) (Janda and Abbot, 2006) นอกจากนั้นข้อมูลทางคลินิคยังระบุถึงการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายในประเทศบราซิล ที่เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *Tatumella ptyseos* ทั้ง 2 ราย (da Costa et al., 2008)

ตามปกติแล้วการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อจะทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง เนื่องมาจากแบคทีเรียได้แย่งปริมาณก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจ ทำให้เกิดภาวะการขาดแคลนก๊าซออกซิเจนซึ่งจะส่งผลให้น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตต่ำ อีกทั้งยังทำให้ความสามารถในการนำไปปฏิสนธิกับไข่ลดลงด้วย เนื่องจากแบคทีเรียจะไปปิดกั้นช่องทางที่สเปิร์มจะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Holcomb et al., 2005) รวมถึงแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและของเสียต่าง ๆ ออกมาส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อต่ำลง (Jenkins and Tiersch, 1997)

ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัด

ใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาคุณสมบัติด้านเภสัชศาสตร์ของสารสกัดใบมะรุม และพบว่าสารสกัดชนิดนี้ที่ประกอบด้วยสารประกอบกลุ่มฟีนอลและ Alkaloids มีฤทธิ์ในการต้านราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Shigella shinga, Pseudomonas aeruginosa, Shigella sonnei* และ *Pseudomonas* spp. แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus*-β-haemolytica, *Bacillus subtilis, Sarcina lutea* และ *Bacillus megaterium* รวมทั้งเชื้อรา ได้แก่ *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Epidermophyton xoccosum* และ *Microsporum canis* (Caceres et al., 1991; Rahman et al., 2006; Chuang et al., 2007)

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กำจัด รื่นเริงดี และวิไลวรรณ สอนประสม. (2551). การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*, de Man) ด้วยระบบปิดหมุนเวียน. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตร-ศาสตร์ ครั้งที่ 46 (หน้า 369-376). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และนิติ ชูเชิด. (2550). การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อ Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) ในประเทศไทย. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (หน้า 574-581). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ถนอมจิตร สิริภคพร, บุญใจ แก้วน้อย และ จุฬารัตน์ โฆษะโก. (2556). ความสามารถในการแข่งขันของกุ้งไทยในตลาดโลก. ใน สัมมนาวิชาการเศรษฐกิจภาคใต้ปี 2556 วันที่ 13 ธันวาคม 2556 ธนาคารแห่งประทศไทย วันที่ค้นข้อมูล 20 สิงหาคม 2557, เข้าถึงได้จาก http://www.bot.or.th/Thai/EconomicConditions/Thai/South/DocLib/the_study_of_Shrimp_Industry(Publish).pdf

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์. (2551). โรคที่สำคัญในกุ้งทะเล. วันที่ค้นข้อมูล 15 พฤษภาคม 2557, เข้าถึงได้จาก http://niah.dld.go.th/th/AnimalDisease/aquatic_ShrimpDis.htm

ธิดาพร ฉวีภักดิ์, ลิลา เรืองแป้น และวริษฐา หนูปิ่น. (2549). ปรสิตและแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในแม่กุ้งแชบ๊วยจากแหล่งธรรมชาติภาคตะวันออก. วันที่ค้นข้อมูล 24 กุมภาพันธ์ 2551, เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/cf-chan/Paper/seminar/seminar-dof-49/di053.pdf

ประจวบ หลำอุบล. (2530). *กุ้ง Natantia*. กรุงเทพฯ: นลิน.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2551). การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน: วงศ์วิบริโอนาซีอี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2557ก). Effect of antibiotics on sperm viavility and gram negative bacterial counts in chilled storage for Banana Prawn (*Penaeus merguiensis*) spermatophore. ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 7 การประชุมสัมมนาทางวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 4 และการประชุมวิชาการราชนครินทร์วิชาการและวิจัย ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท จ.ชลบุรี วันที่ 14-16 พฤษภาคม 2557.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2557ข). Effect of antibiotics on sperm viavility and *Pseudomonas* counts in chilled storage for Banana Prawn (*Penaeus merguiensis*) spermatophore. ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย

เทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 7 การประชุมสัมมนาทางวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 4 และการประชุมวิชาการราชนครินทร์วิชาการ และวิจัย ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท จ.ชลบุรี วันที่ 14-16 พฤษภาคม 2557.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553). การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีการแช่เย็น. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เสนอต่อ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2555). การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อนการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ อจิราภา สัญจรดี และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554) ผลของสารสกัดพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* Linn.) และสารปฏิชีวนะต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 8(1): 57-71.

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. (2547). เปรียบเทียบผลผลิตจากการเก็บไรน้ำกร่อย 5 วิธี. นครศรีธรรมราช: ศูนย์พัฒนาประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2547.

Adams, A. (1991). Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish Shellfish Immunol 1: 59–70.

Akarasanon, K., Damrongphol, P. and Poolsanguan, W. (2004). Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquacult Res., 35: 1415–1420.

Anchordoguy, T., Crowe, J.H., Griffin, F.J. and Clark, W.H. (1988). Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. Cryobiology, 25: 238–243.

Anderson, I.G., Shamsudin, M.N. and Shariff, M. (1988). Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. Asian Fis. Sci., 2: 93-108.

Australian Government Department of Agriculture Fisheries and Forestry. (2008). Diseases of crustaceans bacterial diseases – Necrotising hepatopancreatitus. In Aquatic animal diseases significant to Australia: Identification Field Guide. (pp. 1-4) Australia: Fisheries and Forestry.

Australian Government Department of Agriculture Fisheries and Forestry. (2012). Necrotising hepatopancreatitis (NHP) (Also known as infection with necrotizing hepatobacterium or NHP bacterium), In Aquatic animal diseases significant to

Australia: Identification Field Guide. (pp. 254-261) Australia: Fisheries and Forestry.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.

Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. and Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. Aquaculture 252: 79-84.

Bart, A.N., Choosuk, S. and Thakur, D.P. (2006). Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquacult Res, 37: 523–528.

Berka, M., Uzun, K., Bozkurt, H., Kurtoglu, M.G., Guducuoglu, H. and Aydin, S. (2001). Pulmonary infection of *Tatumella ptyseos* developed on the background of pulmonary tuberculosis. Eastern Journal of Medicine, 6(1): 33-34.

Baumann, P. and Schubert, R.H.W. (1984). Family II. Vibrionaceae Veron 1965. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 516-517. Edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Boonyaratpalin, M. (1998). Nutrition of *Penaeus merguiensis* and *Penaeus idicus.* Reviews in Fisheries Science, 9: 69-78.

Brock, J.A. and Lightner, D.V. (1990). Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.) Diseases of Marine Animals Vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.

Caceres, A., Cabrera, O., Morales, O., Mollinedo, P. and Mendia, M. (1991). Pharmacological properties of *Moringa oleifera* 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology, 33: 213-216.

Chen, D. (1992). An overview of the disease situation, diagnostic techniques, treatments and preventatives used on shrimp farms in China. In: W. Fuls and K.L. Main (eds.) Diseases of Cultured Penaeid Shrimpin Asia and the Unites States. The Oceanic Institute, Hawaii. pp. 47-55.

Chen, F.R., Liu, P.C. and Lee, K.K. (2000). Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicus*. Zool Naturforsch, 55: 94-99.

Chow, S., Taki, Y. and Ogasawara, Y. (1985). Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol Bull, 168: 471–475.

Chuang, P.H., Lee, C.W., Chou, J.Y. and Murugan, M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. Bioresource Technology, 98: 232-236.

da Costa, P.S.G., de Castro Mendes, J,M. and Ribeiro, G.M. (2008). *Tatumella ptyseos* causing severe human infection: report of the first two brazilian cases. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12(5): 442-443.

Ding, S., Gea, J., Hao, C., Zhanga, M., Yan, M., Xu, Z., Pan, J., Chen, S., Tian, Y., and Huang, Y. (2009). Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi.* Animal Reproduction Science, 113: 229-235.

Edwards, H.M. (1837). Synopsis of biological data on the penaeid prawn. Retrieved May 15, 2014, from http://www.fao.org/docrep/005/ac765t/ac765t10.htm.

Farmer III, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G.P., Asbury, M.A., Riddle, C., Wathen-Grady, H.G., Elias, C. and Fanning, G.R. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol., 21: 46-76.

Frelier, P.F., Loy J.K. and Kruppenbach, B. (1993). Tranmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei.* J. Invertebr. Pathol., 61: 44-48.

Fribourgh, J.H. (1966). The application of the differential staining method to low temperature studies on goldfish spermatozoa. Progessive Fish-culturist, 28: 227-230.

Gnanamani, A., Shanmuga Priya, K., Radhakrishnan, N. and Babu, M. (2003). Antibacterial activity of two plant extracts on eight burn pathogens. Journal of Ethnopharmacology, 86: 59-61.

Guzman, G.A., Martinez, J.G.S., Castaneda, R.P., Monzon, A.P., Rodriguez T.T. and Hernandez, D.L.C. (2010). Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American white shrimp, *Litopenaeus vannamei.* Journal of the world aquaculture society, 41(3): 464-470.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2003). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: University press.

Holcomb, M., Cloud, J.G., and Ingermann, R.L. (2005). Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. Aquaculture Research, 36: 1555-1561.

Hollis, D.G., Hickman, F.W., Fanning, G.R. and Farmer III, J.J., Weaver, R.E. and Brenner, D.J. (1981). *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp..nov., a member of the family Enterobacteriaceae found in clinical specimens. J Clin Microbiol., 14: 79-88.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins.

Hwang, J.K., Chung, J.Y., Baek, N.I., and Park, J.H. (2004). Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. International Journal of Antimicrobial Agents, 23: 377-381.

Ishimaru, K., Akarawa-Matsushita, M., Muroga, K. (1995). *Vibrio penaeicida* sp., nov., a pathogen of kuruma shrimps (*Penaeus japonicus*). Int. J. Syst. Bacteriol., 43: 8-19.

Janda, J.M. and Abbot, S.L. (2006). Uncommon enterobacterial genera associated with clinical specimens. In: The enterobacteria. ASM press

Jenkins, J.A. and Tiersch, T.R. (1997). A Preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. Journal of the World Aquaculture Society, 28(3): 282-288.

Jeyalectumie, C. and Subramoniam, T. (1989). Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. Biol Bull, 177: 247–253.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Jeya Shakila, R. and Sukumar, D. (2006). Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. Food microbiology, 23: 526–533.

Lavilla-Pitogo, C.R., Leano, E.M. and Paner, M.G. (1996). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent bacteria, *Vibrio harveyi* in the rearing environment. SICCPPS book of abstracts, SEAFDEC, Iloilo City, Philippines. p.40

Lavilla-Pitogo, C.R, Leaño, E.M and Paner M.G. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture, 164(1-4): 337-349.

Lewis, D.H. (1973). Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. Proc. Wld. Maricult. Soc., 4: 333-338.

Lightner, D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M., Mohney, L.L., Natividad, J.M., Rukyani, A. and Poernomo, A. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid shrimps/shrimps of the Americas and Indo-Pacific. In: M. Shariff, R. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Proceedings 1st Symposium on

Diseases in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 57-80.

Lightner, D.V. and Lewis, D.H. (1975). A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Mar. Fish. Rev., 37(5-6): 25-28.

Matis, E.Y., Kurakolova, E.A., Burkova, V.N. and Vengerovskii, A.I. (1988). Hydrocarbons and carotenoids of the medicinal mud of Lake Karachi. Chemistry of Natural Compounds, 24: 1573-8388.

Nash, G. Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P. and Ruamthaveesub, P. (1992). Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand. In: M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Authur (eds.) Diseases in Asian Aquaculture 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 143-155.

Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. (2008). Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In: Aquaculture Research Trends. Edited by Stephen H. Schwartz. Nova Science Publishers, Inc. pp. 149-184.

Nimrat, S., Sangnawakij, T. and Vuthiphandchai, V. (2005). Preservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores by chilled storage. Journal of the World Aquaculture Society, 36: 76-86.

Nimrat, S., Siriboonlamom, S., Zhang, S., Xu, Y., and Vuthiphandchai, V. (2006). Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. Aquaculture, 261: 944-951.

Nimrat, S., Bart, A.N, Keatsaksit, A. and Vuthiphandchai, V. (2008a). Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. Aquaculture, 274: 247–253.

Nimrat, S. Suksawat, S., Maleeweach, P. and Vuthiphandchai, V. (2008b). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. Aquaculture, 285: 123-129.

Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguiensis*. Journal of Applied Microbiology, 93: 214-233.

Parvez, N., Cornelius, L.K. and Fader, R. (2009). Case report: *Brevibacillus brevis* Peritonitis. The American Journal of the Medical Sciences, 337: 297-299.

Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T. and Bennett, B. C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and

adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology, 118: 418-428.

Rahman, M.M., Sheikh, M.M.I., Sharmin, S.A., Islam, M.S., Rahman, M.A., Rahman, M.M. and Alam, M.F. (2006). Antibacterial activity of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some human pathogenic bacteria. Journal of Natural Science, 8: 219-227.

Saad, A., Billard, R. and Theron, M.G. (1988). Short-term storage of milt from common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 71: 133-150.

Singapore Prawn Files: The Sand Prawns - Sua Lor, Greasyback, Jinga, Middle, Western King, Red Spot King Prawns. Retrieved May 15, 2014, from http://ieatishootipost.sg/2013/12/singapore-prawn-files-sand-prawns-sua.html.

Sivaram, V., Babu, M.M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. and Marian, M.P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture, 237: 9-20.

Sizemore, R.K. and Davis, J.W. (1985) Source of *Vibrio* spp. found in the hemolymph of the blue crab Callinectes sapidus. J Invertebr Pathol, 46: 109–110.

Soldera, J., Nedel, W.L., Cardoso, P.R. and d'Azevedo, P.A. (2013). Bacteremia due to I ssp. *urealyticus* caused by infected pressure ulcer: case report and review of the literature. Sao Paulo Med J, 131: 59-61.

Stefano, M., Del Rosso, A., Saldutto, P., Paradiso Galatioto, G. and Vicentini, C. (2012). Intrascrotal Abscess, *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus cohnii* ssp. *cohnii*: A Case Report and Review of the Literature. Case Reports in Urology, 2012: 313694.

Stone, N.D., O'Hara, C.M., Willians, P.P., McGowan, J.E. and Tenover, F.C. (2007). Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial susceptibility results for unusual species of Enterobacteriaceae. J Clin Micriobiol., 45: 340-346.

Stoss, J. and Refstie, T. (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. Aquaculture, 30: 229-236.

Tiersch, T.R. (2006). Fish sperm cryopreservation for genetic improvement and cryopreservation in Southeast Asia. Fish for the People, 4: 21-33.

Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S. and Rao, C.V. (2009). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. Food and Chemical Toxicology, 47: 2196-2201.

Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. (1999). Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society 30: 65-72.

Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N. (2007). Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. Theriogenology, 68: 1192-1199.

Yano, Y., Satomi, M., and Oikawa, H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Microbiology, 111: 6-11.

Zacharia, S. and Kakati, V.S. (2002). Growth and survival of *Penaeus merguiensis* postlarvae at different salinities. The Israeli Journal of Aquaculture, 54(4): 157-162.

http://www.m_e_hassanin.staff.zu.edu.eg/m.e.hassanin/page.asp?id=54