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

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256102A1080009
สัญญาเลขที่ 40/2561

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

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 40/2561

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองแรกเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) แบบกล่องโฟมด้วยการประยุกต์ใช้สารสกัดขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) และใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin (PS) ความเข้มข้น 0.1% จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบมะรุมมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมากกว่าสารสกัดขิง ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยในชุดการทดลองที่เติมสารสกัดใบมะรุมและชุดการทดลองที่เติมสารสกัดขิงมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตลอดการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยเป็นระยะเวลา 1 ปี แต่สารสกัดใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยได้ดีกว่าสารสกัดขิง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมยาปฏิชีวนะพบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ PS ในด้านการกำจัดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการทดลองตอนที่ 2 เป็นการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะและยีนความรุนแรงในการก่อโรคกลุ่ม Narrow-spectrum beta-lactamase (NSBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{PSE-1}), Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{CTX-M}) และ *Amp*C beta-lactamase (ได้แก่ bla_{CMY-1} และ bla_{CMY-2}) ของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ PS และสารสกัดขิงและใบมะรุม ที่แยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง โดยพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ทำการศึกษาในครั้งนี้จำนวน 18 ชนิด ยกเว้น *Plesiomonas shigelloides* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ Cefoxitin, Cephalotin, Sulfonamides และ Trimethoprim-sulfamethoxazole ส่วน *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* พบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Sulfonamides และ Tetracycline และ *Staphylococcus epidermidis / S. lugdunensis* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Tetracycline และแบคทีเรียชนิดสุดท้ายที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ คือ *Tatumella ptyseos* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Cefoxitin และ Cephalotin และไม่พบยีนความรุนแรงกลุ่มนี้ในแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

คำสำคัญ: สมุนไพร; การแช่แข็ง; กุ้งแชบ๊วย; ถุงน้ำเชื้อ

Abstract

This project entitled “Application of Thai medicinal plants for controlling human and aquatic animal pathogenic bacteria in *Penaeus merguiensis* spermatophores cryopreserved by conventional method and styrofoam box” was divided into 2 main experiments. In the first experiment, cryopreservation of banana shrimp (*Penaeus merguiensis*) spermatophores using styrofoam box with addition of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) or moringa (*Moringa oleifera* Lam.) extracts (0.1 mg/ml; final concentration each) in comparison with 0.1% Penicillin-Streptomycin (PS) was developed. Along cryostorage for a year, moringa extract was suitable agent for cryopreservation of banana shrimp spermatophores. Although similar sperm viability percentages of post-thawed sperm supplemented with moringa or ginger extracts were observed, moringa extract significantly reduced ($P < 0.05$) heterotrophic bacteria number in cryostored spermatophore, compared with those added with ginger extract. However, the two tested extracts showed lower efficacy than PS in terms of elimination of heterotrophic bacteria. In the second experiment, antibiotic susceptibility and presence of virulent genes (narrow-spectrum beta-lactamase (NSBL; bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{PSE-1}), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL; bla_{TEM}, bla_{SHV} and bla_{CTX-M}) and *Amp*C beta-lactamase (bla_{CMY-1} and bla_{CMY-2})) of human and aquatic animal pathogenic bacteria isolated from cryostored spermatophores resistant to PS and moringa and ginger extracts were investigated. Most bacteria used in this study were susceptible to 18 tested antibiotics with exception of 4 bacterial species. *Plesiomonas shigelloides* was resistant to 4 antibiotics e.g. cefoxitin, cephalotin, sulfonamides and trimethoprim-sulfamethoxazole while *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* was resistant to sulfonamides and tetracycline. Tetracycline was a only antibiotic that was unable to inhibit *Staphylococcus epidermidis* / *S. lugdunensis* and *Tatumella ptyseos* exhibited resistance characteristics to ampicillin, cefoxitin and cephalotin. Lastly, absence of all virulent genes tested in this study was observed in human and aquatic animal pathogenic bacteria isolates.

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..... 7
3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 18
4 ผลการทดลอง..... 27
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 51
เอกสารอ้างอิง..... 58
ผลผลิต (Output)..... 69
ประวัติคณะผู้วิจัย..... 70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	25
2	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม	30
3	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม	33
4	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม	35
5	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม	36
6	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม	38
7	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae	41
8	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae	42
9	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Pseudomonadaceae	43
10	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Alcaligenaceae	43
11	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Vibrionaceae	44
12	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae	44
13	แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง	46
14	แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง	47
15	การตรวจหายีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง	50

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเพศของกุ้ง	8
2	ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้ง	9
3	ลักษณะการผสมพันธุ์ของกุ้ง	10
4	ลักษณะของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย	10
5	พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย	27
6	การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย	28
7	สารสกัดใบมะรุม	28
8	สารสกัดขิง	29
9	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม	31
10	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม	34
11	แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง	49

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอาชีพที่มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะผลผลิตกุ้งที่มีอยู่ในประเทศสามารถสร้างมูลค่าในการส่งออก และยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย อีกทั้งความต้องการบริโภคกุ้งทะเลเศรษฐกิจในตลาดโลกที่สูงขึ้นเป็นผลให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างรวดเร็ว (Nimrat et al., 2005; 2008; Vuthiphandchai et al., 2007) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้ง และถือเป็นผู้ผลิตรายใหญ่เป็นอันดับ 2 ของโลก (13 %) รองจากประเทศจีน (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 คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งอย่างง่ายโดยใช้กล่องโฟมเพื่อควบคุมและลดปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาแบบระยะยาว ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการปฏิสนธิ และยังเป็นการลดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค

ออกสู่สิ่งแวดล้อม จะทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความเข้มแข็งของอุตสาหกรรมกุ้งทะเลและจะก้าวต่อไปยังสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ต่อไป

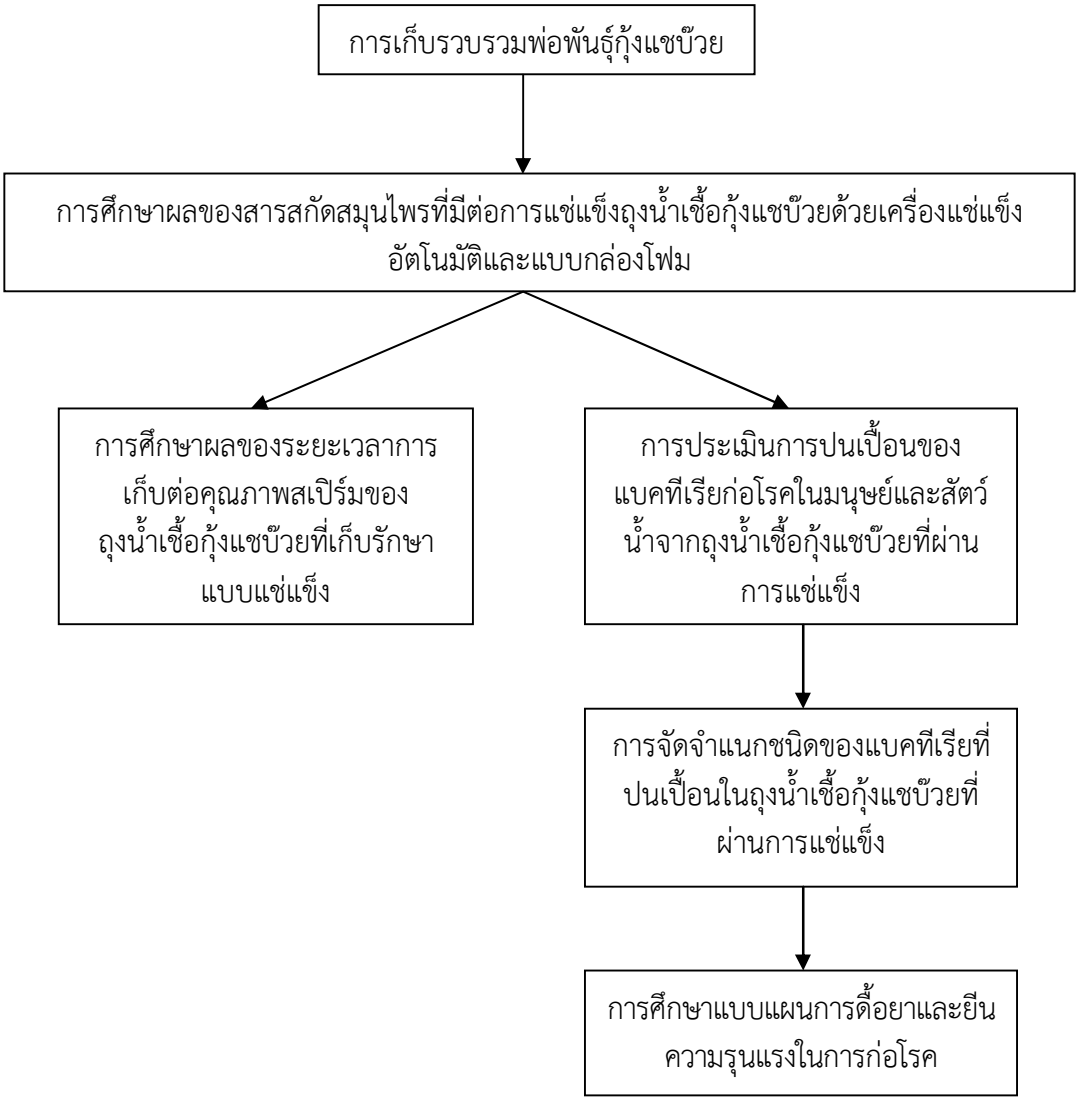
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวโดยการใช้กล่องโฟม
2. เพื่อศึกษาผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย และการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง
3. เพื่อศึกษาแบบแผนการดื้อยาและยีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในปีที่ 3 ทำการศึกษาต่อเนื่องจากปีที่ 2 ในหัวข้อการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยการใช้กล่องโฟม และนำแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็งทั้ง 2 แบบคือ แบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติและแบบกล่องโฟมมาศึกษาต่อเนื่องถึงแบบแผนการดื้อยาและยีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวโดยการใช้กล่องโฟม
2. ทราบถึงผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย และการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยการใช้กล่องโฟม
3. ทราบถึงแบบแผนการดื้อยาและยีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย
4. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการศึกษาขั้นสูงต่อไป รวมทั้งทำให้สามารถประยุกต์ใช้การเพาะขยายพันธุ์กุ้งแชบ๊วยได้โดยตรง ทำให้การจัดการฟาร์มและการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพดีขึ้น และยังเป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยด้านการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งชนิดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

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)

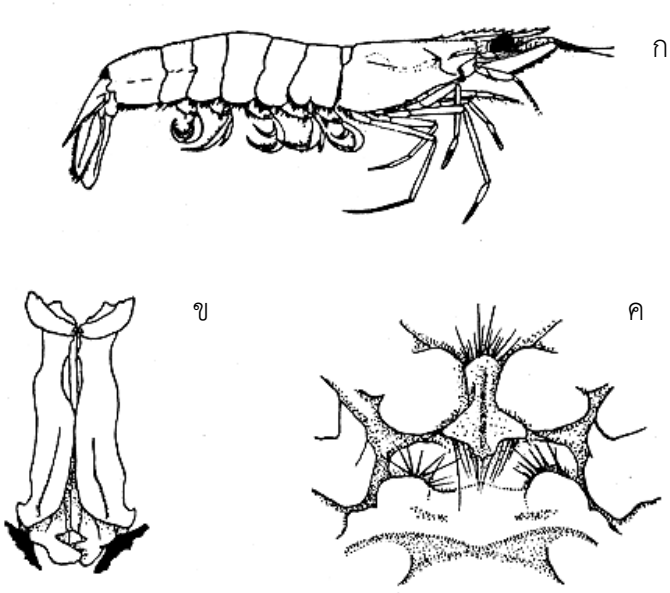
3) รยางค์ส่วนลำตัว (Abdominal appendages) จำนวน 6 คู่

รยางค์คู่ที่ 14-18 ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ หรือช่วยในการยึดเกาะของไข่ (Pleopods)

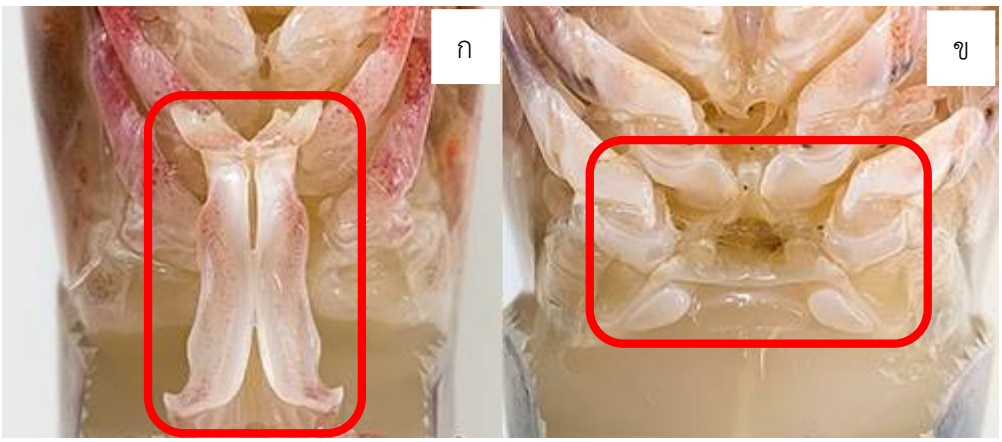
รยางค์คู่ที่ 19 ทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำหรือเคลื่อนที่ (Uropod)

1.2 ลักษณะและความแตกต่างระหว่างเพศ

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



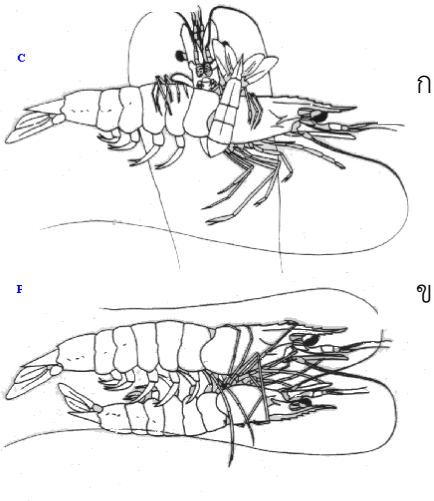
ภาพที่ 1 ลักษณะเพศของกุ้ง
ก : ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้ง
ข : Petasma อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้
ค : Thelycum อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย
(Edwards, 1837)



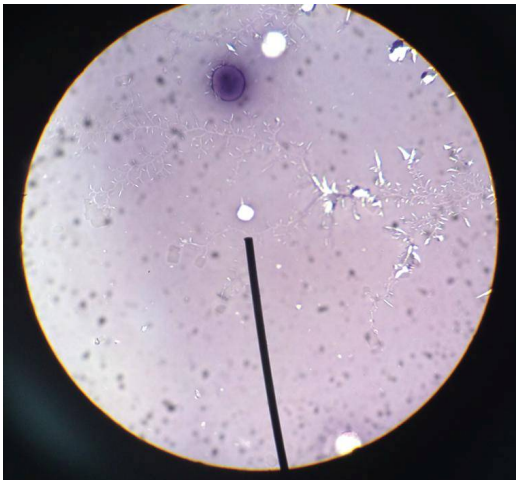
ภาพที่ 2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้ง
ก : Petasma อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้
ข : Thelycum อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย
(http://ieatishootipost.sg/2013/12/singapore-prawn-files-sand-prawns-sua.html)

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) และสามารถหมักย่อยน้ำตาลกูลโคสโดยไม่เกิดก๊าซได้ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551; Baumann and Schubert, 1984) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอหลายชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งในมนุษย์และในสัตว์น้ำหลายชนิด ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ทะเลมหาสมุทร รวมทั้งในบริเวณปากแม่น้ำที่เป็นรอยต่อระหว่างน้ำเค็มและน้ำจืด ดังนั้นจึงสามารถพบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอปนเปื้อนในอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในฟาร์ม โดยในการเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถประสบกับปัญหาการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ 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 กุ้งจะเกิด

สภาวะขาดออกซิเจน 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 ในปี ค.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 (Frelier 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 โดยเริ่มจากไม่กินอาหาร 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 ที่แยกได้จากน้ำทะเลในแหล่งที่แม่กุ้งแชบ๊วยอาศัยอยู่ 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% ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีการ

แช่เย็น 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 นอกจากนั้นสารสกัดจากกระชายเหลืองความเข้มข้น 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* เป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารสกัดจากสาหร่ายสูงสุด จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและสุขภาพของสัตว์น้ำได้

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. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย
    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 กล่องโฟมขนาด 17×32×20 เซนติเมตร
    1.12 Calcium-free saline extender
    1.13 DMSO 10% (v/v)

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
    2.1 แผ่นสไลด์ (Slide)
    2.2 สี Eosin-Nigrosin
    2.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์
    2.4 กล้องจุลทรรศน์
    2.5 Emulsion oil
    2.6 เครื่องนับจำนวน (Counter)

3. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
    3.1 จานเพาะเชื้อ (Petridish)
    3.2 Ethanol 70% และ 95%
    3.3 Sodium chloride
    3.4 Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar (Difco, Spark, USA)
    3.5 Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco, Spark, USA)
    3.6 Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, Spark, USA)
    3.7 Muller Hinton Agar (MHA) (Difco, Spark, USA)
    3.8 Plate Count Agar (PCA) (Difco, Spark, USA)

3.9 Pseudomonas Isolation Agar (PIA) (Difco, Spark, USA)

4. ยาปฏิชีวนะ

4.1 Amikacin (30 ไมโครกรัม)

4.2 Amoxicillin-Clavulanic acid (30 ไมโครกรัม)

4.3 Ampicillin (10 ไมโครกรัม)

4.4 Cefotaxime (30 ไมโครกรัม)

4.5 Cefoxitin (30 ไมโครกรัม)

4.6 Ceftriaxone (30 ไมโครกรัม)

4.7 Cephalotin (30 ไมโครกรัม)

4.8 Chloramphenicol (30 ไมโครกรัม)

4.9 Ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม)

4.10 Gentamicin (10 ไมโครกรัม)

4.11 Imipenem (10 ไมโครกรัม)

4.12 Kanamycin (30 ไมโครกรัม)

4.13 Meropenem (10 ไมโครกรัม)

4.14 Nalidixic acid (30 ไมโครกรัม)

4.15 Piperacillin-tazobactam (110 ไมโครกรัม)

4.16 Sulfonamides (300 ไมโครกรัม)

4.17 Tetracycline (30 ไมโครกรัม)

4.18 Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 ไมโครกรัม)

5. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย

5.1 Chloroform (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

5.2 Ethanol (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

5.3 Isoproponal (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

5.4 20 mg/mL proteinase K (Vivantis, Malaysia)

5.5 Saturated Phenol (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

5.6 10% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)

5.7 Sodium acetate (Merk, Darmstadt, Germany)

5.8 TE buffer (10 mM TRis-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

6. สารเคมี เอนไซม์ และไพรเมอร์ สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

6.1 ไพรเมอร์ (BioDesign, Bangkok, Thailand)

- bla_{TEM} - F 5’ ATGAGTATTCAATTCCG 3’
- bla_{TEM} - R 5’ CTGACAGTTACCAATGCTTA 3’
- bla_{SHV} – F 5’ GGTTATGCGTTATATTCGCC 3’
- bla_{SHV} – R 5’ TTAGCGTTGCCAGTGCTC 3’
- bla_{PSE-1} – F 5’ TGTTACGCAGCAGGGCAGTC 3’
- bla_{PSE-1} – R 5’ CCTAAACCACGAGCCTCATA 3’
- bla_{CTX-M} – F 5’ ACACGTCAACGGCACAATG 3’
- bla_{CTX-M} – R 5’ GAGCCACGTCACCAACTGC 3’
- bla_{CMY-1} – F 5’ ATGCAACAACGACAATCCATCCTG 3’
- bla_{CMY-1} – R 5’ TCAACCGGCCAACTGCGCCAGGAT 3’
- bla_{CMY-2} – F 5’ ATGATGAAAAAATCGTTATGCT 3’
- bla_{CMY-2} – R 5’ TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG 3’

6.2 *Taq* DNA polymerase

6.3 PCR reaction buffer (Vivantis, Malaysia)

6.4 $MgCl_2$ (Vivantis, Malaysia)

6.5 dNTP mix (Vivantis, Malaysia)

7. สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

7.1 Agarose (Vivantis, Malaysia)

7.2 VC 100 bp DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

7.3 VC 1 kb DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

7.4 10 mg/mL Ethidium bromide

7.5 50 X TAE buffer (Vivantis, Malaysia)

7.6 6X loading dye (Fermentas, EU)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

ทำการเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจากบริเวณทะเลหาดบางแสนและเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จากนั้นคัดเลือกพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศโดยพิจารณาจากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อ (Spermatophores) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 จากนั้นนำพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของลำตัว และนำไปเลี้ยงในบ่อขนาด 3 x 4 x 1.5 เมตร ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา การให้อาหารแก่พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยคือ 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. การสกัดสมุนไพร (Quave et al., 2008)

นำสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ใบมะรุม และขิง มาล้างน้ำทำความสะอาด แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำผงสมุนไพรแช่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเอทานอล 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

3. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

3.1 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

นำสารสกัดสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ใบมะรุม และขิง 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 3.2 จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองมาศึกษาอัตราการมีชีวิต (ข้อ 3.3.1) ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย (ข้อ 3.3.2) ขณะเก็บรักษาในระยะเวลาต่างกันตั้งแต่หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน

3.2 การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยโดยวิธีการแช่เข็งในกล่องโฟม

นำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรวบรวมได้ใส่ลงในหลอด Cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO) จากนั้นเติมสารชนิดต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดลองดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ให้อยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibrium) นาน 10 นาที จากนั้นนำมาวางบนตะแกรงใส่หลอดทดลองภายในกล่องโฟมขนาด 17×32×20 เซนติเมตร ที่มีไนโตรเจนเหลว โดยวางให้มีความสูงเหนือผิวไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร ปิดฝาทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที เขี่ยหลอด Cryovial ให้ตกลงไปอยู่ในไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม จากนั้นจับเวลา 10 นาที นำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แข็งตัวมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

3.3 การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บ (Storage period) ต่อคุณภาพสเปิร์มของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

นำเอาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่มีคุณภาพดีมาแช่แข็งในกล่องโฟม (ข้อ 3.2) โดยถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจะถูกแช่แข็งใน Cryovial และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนมากที่เก็บเหล่านี้จะถูกผลิตขึ้นมาในปริมาณมากจากพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยหลายตัว (Pooled spermatophores) ที่มีคุณภาพดี ถุงน้ำเชื้อจะถูกนำมาละลายและประเมินคุณภาพของสเปิร์มตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ (หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน) เพื่อประเมินถึงผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อคุณภาพสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง รวมทั้งประเมินการเปลี่ยนแปลงการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำ

3.3.1 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 ปริมาตรสองเท่าลงไปภายหลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน นำกระจกปิดสไลด์มาเกลี่ยบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ รอให้แห้ง จากนั้น Fix โดย

ผ่านเปลวไฟ ควรระวังไม่ให้ร้อนเกินไป สุ่มนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (Fribourgh, 1966; Vuthiphandchai and Zohar, 1999) สเปิร์มที่มีชีวิต (Viable sperm) จะไม่ดูดซึมสีหรือติดสีย้อม และตัวสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (Dead sperm) จะดูดซับสีหรือติดสีย้อมสีม่วงแดง โดยสุ่มนับสเปิร์มปริมาณ 200 ตัว และทำทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

3.3.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ผ่านการแช่แข็ง

การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งที่เริ่มต้นจากนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน มาละลายที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นบดถุงน้ำเชื้อในโกร่งบดยาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วดูดน้ำเชื้อใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl จากนั้นปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA), Pseudomonas Isolation Agar (PIA) และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) Agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และในสัตว์น้ำ รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

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

รวบรวมถุงน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วยโดยใช้มือกดเบา ๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้าง จากนั้นใช้คีมคีบที่สะอาดดึงถุงน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำถุงน้ำเชื้อมาบดให้ละเอียดในโกร่งบดยา จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA, PIA และ TCBS Agar เพื่อศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ตามลำดับ โดยในแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างจนทั่วจานเพาะเชื้อด้วยวิธีสเปรดเพลท (Spread plate) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการทดลอง และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Holt et al. (1984)

2) การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียในถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Nimrat et al., 2006)

ทำโดยละลาย (Thawing) ถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดยนำหลอด Cyovial มาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 2 นาที แล้วนำถุงน้ำเชื้อมาบดให้ละเอียดในโกร่งบดยา จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากการทดลองด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ แล้วปิเปตตัวอย่างสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA, PIA และ TCBS Agar เพื่อศึกษาถึง

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ตามลำดับ โดยในแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างจนทั่วจานเพาะเชื้อด้วยวิธีสเปรดเพลท (Spread plate) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Holt et al. (1984) โดยเก็บตัวอย่างถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งมาทำการทดลองในช่วงระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน

4. การศึกษาแบบแผนการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

นำแบคทีเรียที่จัดจำแนกได้มาทำการศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะขนานต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Disk diffusion ตามวิธีการของ NCCLS (2004) โดยใช้ยาปฏิชีวนะจำนวน 18 ชนิด ดังนี้ Ampicillin (10 ไมโครกรัม), Chloramphenicol (30 ไมโครกรัม), Kanamycin (30 ไมโครกรัม), Nalidixic acid (30 ไมโครกรัม), Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 ไมโครกรัม), Tetracycline (30 ไมโครกรัม), Cefoxitin (30 ไมโครกรัม), Ceftriaxone (30 ไมโครกรัม), Cephalotin (30 ไมโครกรัม), Amoxicillin-Clavulanic acid (30 ไมโครกรัม), Sulfonamides (300 ไมโครกรัม), Ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม), Gentamicin (10 ไมโครกรัม), Meropenem (10 ไมโครกรัม), Cefotaxime (30 ไมโครกรัม), Amikacin (30 ไมโครกรัม), Imipenem (10 ไมโครกรัม) และ Piperacillin-tazobactam (110 ไมโครกรัม) และ/หรือยาอื่น ๆ ที่เหมาะสมกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดนั้น ๆ โดยนำแบคทีเรียเหล่านี้ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy Broth (TSB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นของเชื้อกับ McFarland 0.5 ซึ่งเทียบเท่าได้กับปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/mL ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มในหลอดที่ผ่านการปรับความขุ่นแล้ว บิดไม้พันสำลีให้หมาด ๆ กับข้างหลอด แล้วนำมาป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA) โดยป้ายเป็น 3 ระนาบ ทิ้งไว้นาน 3-5 นาที แล้วนำ Disk ยาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสแล้วนำไปแปรผลเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน

5. การศึกษายีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไปสกัดดีเอ็นเอและนำมาตรวจสอบหายีนความรุนแรงในการก่อโรค โดยมีขั้นตอนและวิธีการดังนี้

5.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ (Sambrook et al., 1989)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 467 ไมโครลิตร และใช้ออโตปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ เติม 10% (w/v) SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Protinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร

3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติม Phenol/Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากันกับตัวอย่าง ผสมโดยการกลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (สารละลายดีเอ็นเอ) ใส่ลงใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ และเติม Phenol/Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากันกับตัวอย่าง ผสมโดยการกลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารละลายดีเอ็นเอส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม Sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่า และเติม Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า ผสมเบา ๆ โดยการกลับหลอดจนกระทั่งดีเอ็นเอตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วน Isopropanol และเติม 70% (v/v) Ethanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน Ethanol ทิ้ง นำหลอดที่มีตะกอนดีเอ็นเออยู่มาวางคว่ำบนกระดาษทิชชูที่สะอาดทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 15-20 ไมโครลิตร และเก็บหลอดที่มีสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

5.2 การเพิ่มปริมาณยีนก่อโรคด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (ตามวิธีการของ Griffiths et al., 2001)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 5.1 มาตรวจสอบยีนความรุนแรงในการก่อโรคจำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ Narrow-spectrum beta-lactamase (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{PSE-1}$), ESBL (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$) และ AmpC beta-lactamase (*bla*$_{CMY-2}$, *bla*$_{CMY-1}$) หรือยีนที่เหมาะสมกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดนั้น ๆ โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ตามวิธีการของ Li et al. (2010) โดยเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR reaction โดยสารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่จำเพาะประกอบด้วย 2.5 mM $MgCl_2$, 100 μM dNTP, 0.64 μM ของไพรเมอร์ (ดังแสดงในตารางที่ 1) และ 1X PCR reaction buffer ที่เติม 1.25 U ของ *Taq* DNA Polymerase ต่อปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ปิดหลอดปฏิกิริยาให้สนิท

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′----3′)	ขนาดของผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)	อ้างอิง
bla_{TEM} - F	ATGAGTATTCAATTCCG	861	Li et al. (2010)
bla_{TEM} - R	CTGACAGTTACCAATGCTTA		
bla_{SHV} - F	GGTTATGCGTTATATTCGCC	865	Li et al. (2010)
bla_{SHV} - R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
bla_{PSE-1} - F	TGTTACGCAGCAGGGCAGTC	914	Li et al. (2010)
bla_{PSE-1} - R	CCTAAACCACGAGCCTCATA		
bla_{CTX-M} - F	ACACGTCAACGGCACAATG	301	Wang et al. (2013)
bla_{CTX-M} - R	GAGCCACGTCACCAACTGC		
bla_{CMY-1} - F	ATGCAACAACGACAATCCATCCTG	1148	Li et al. (2010)
bla_{CMY-1} - R	TCAACCGGCCAACTGCGCCAGGAT		
bla_{CMY-2} - F	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT	1145	Li et al. (2010)
bla_{CMY-2} - R	TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG		

จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initiation denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (1 รอบ)

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ จำนวน 40 รอบ

Denaturation	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Elongation	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Final extention	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 นาที (1 รอบ)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยการทำอะกาโรสอิเล็กโตรโฟริซิสบน 1% (w/v) อะกาโรสเจล โดยใช้ TAE เป็นบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาย้อมด้วย Ethidium bromide (ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator พร้อมบันทึกภาพ

6. 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 และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการใช้กล่องโฟม รวมทั้งการศึกษาถึงแบบแผนการดื้อยาและยีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติและการใช้กล่องโฟม ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1. การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

รวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยอายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 80 ตัว จากบริเวณทะเลหาดบางแสนและเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี กุ้งแชบ๊วยที่รวบรวมได้มีน้ำหนักเฉลี่ย 27.20 ± 0.67 กรัม มีความยาวจากปลายกรีถึงปลาย Telson เท่ากับ 14.33±1.22 เซนติเมตร (ดังรูปที่ 5) ทำการเก็บรวบรวมถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยโดยการดึงจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้าง (ดังรูปที่ 6) แล้วนำมาวางในจานเพาะเชื้อที่มี Ca-F saline ที่ปราศจากเชื้อและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส บนน้ำแข็ง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

รูปที่ 5 พ่อพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

รูปที่ 6 การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

2. สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ใบมะรุม และขิง เมื่อนำมาสกัดและระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator สารสกัดใบมะรุมมีสีเขียวเข้มอมดำ ข้นเหนียว ส่วนสารสกัดขิงมีสีน้ำตาลอมดำ ข้นเหนียว

รูปที่ 7 สารสกัดใบมะรุม

รูปที่ 8 สารสกัดขิง

3. การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

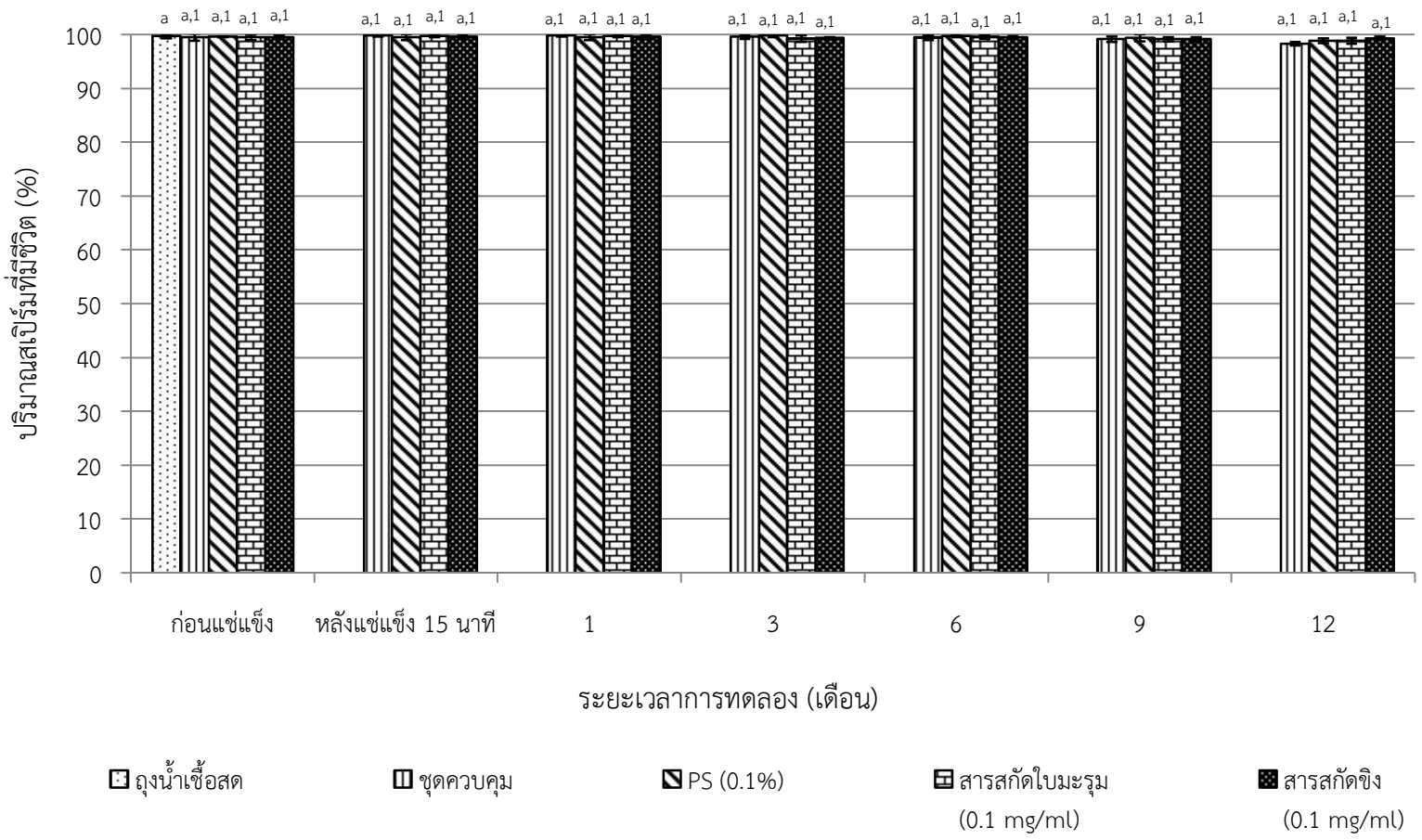
3.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในกล่องโฟม พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยก่อนเริ่มต้นการทดลองมีคุณภาพดีเยี่ยมเช่นเดียวกับสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (จากผลการทดลองในปีงบประมาณที่ผ่านมา) โดยมีค่าเท่ากับ 99.78 ± 0.39% ส่วนเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยในชุดควบคุม ชุดเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% ชุดเติมสารสกัดใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และชุดเติมสารสกัดขิง ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ก่อนการแช่แข็งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับถุงน้ำเชื้อสด โดยมีค่าเท่ากับ 99.61 ± 0.68%, 99.64 ± 0.03%, 99.56 ± 0.51% และ 99.59 ± 0.36% ตามลำดับ โดยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งเป็นเวลา 12 เดือน คุณภาพน้ำเชื้อในทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-Streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	99.78 ± 0.39 [a]	99.61 ± 0.68 [a,1]	99.64 ± 0.03 [a,1]	99.56 ± 0.51 [a,1]	99.59 ± 0.36 [a,1]
หลังแช่แข็ง 15 นาที		99.89 ± 0.19 [a,1]	99.55 ± 0.53 [a,1]	99.78 ± 0.19 [a,1]	99.62 ± 0.41 [a,1]
1		99.89 ± 0.19 [a,1]	99.55 ± 0.53 [a,1]	99.77 ± 0.20 [a,1]	99.62 ± 0.41 [a,1]
3		99.65 ± 0.36 [a,1]	99.86 ± 0.24 [a,1]	99.30 ± 0.60 [a,1]	99.40 ± 0.21 [a,1]
6		99.51 ± 0.43 [a,1]	99.78 ± 0.19 [a,1]	99.63 ± 0.34 [a,1]	99.55 ± 0.21 [a,1]
9		99.21 ± 0.50 [a,1]	99.45 ± 0.69 [a,1]	99.22 ± 0.39 [a,1]	99.22 ± 0.39 [a,1]
12		98.33 ± 0.34 [a,1]	98.90 ± 0.42 [a,1]	98.89 ± 0.51 [a,1]	99.33 ± 0.33 [a,1]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

4.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

1) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

ถุงน้ำเชื้อสดของกุ้งแชบ๊วยก่อนเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ $2.00\pm1.00\times10^{3}$ CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างกับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยก่อนแช่แข็งในชุดควบคุม ชุดที่เติมสารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 mg/ml และชุดที่เติมสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 mg/ml ที่มีค่าเท่ากับ $2.00\pm0.20\times10^{3}$, $1.50\pm0.50\times10^{3}$ และ $1.50\pm0.50\times10^{3}$ CFU/g ตามลำดับ โดยการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้มีปริมาณเท่ากับ $2.50\pm1.50\times10^{2}$ CFU/g ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับทั้ง 4 ชุดการทดลองข้างต้น และเมื่อเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลานาน 12 เดือน พบว่ายาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้เหลือ $1.67\pm0.58\times10^{2}$ CFU/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดใบมะรุมและขิง ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ($3.00\pm0.00\times10^{2}$ และ $4.00\pm0.00\times10^{2}$ CFU/g ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 3

2) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio*

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4

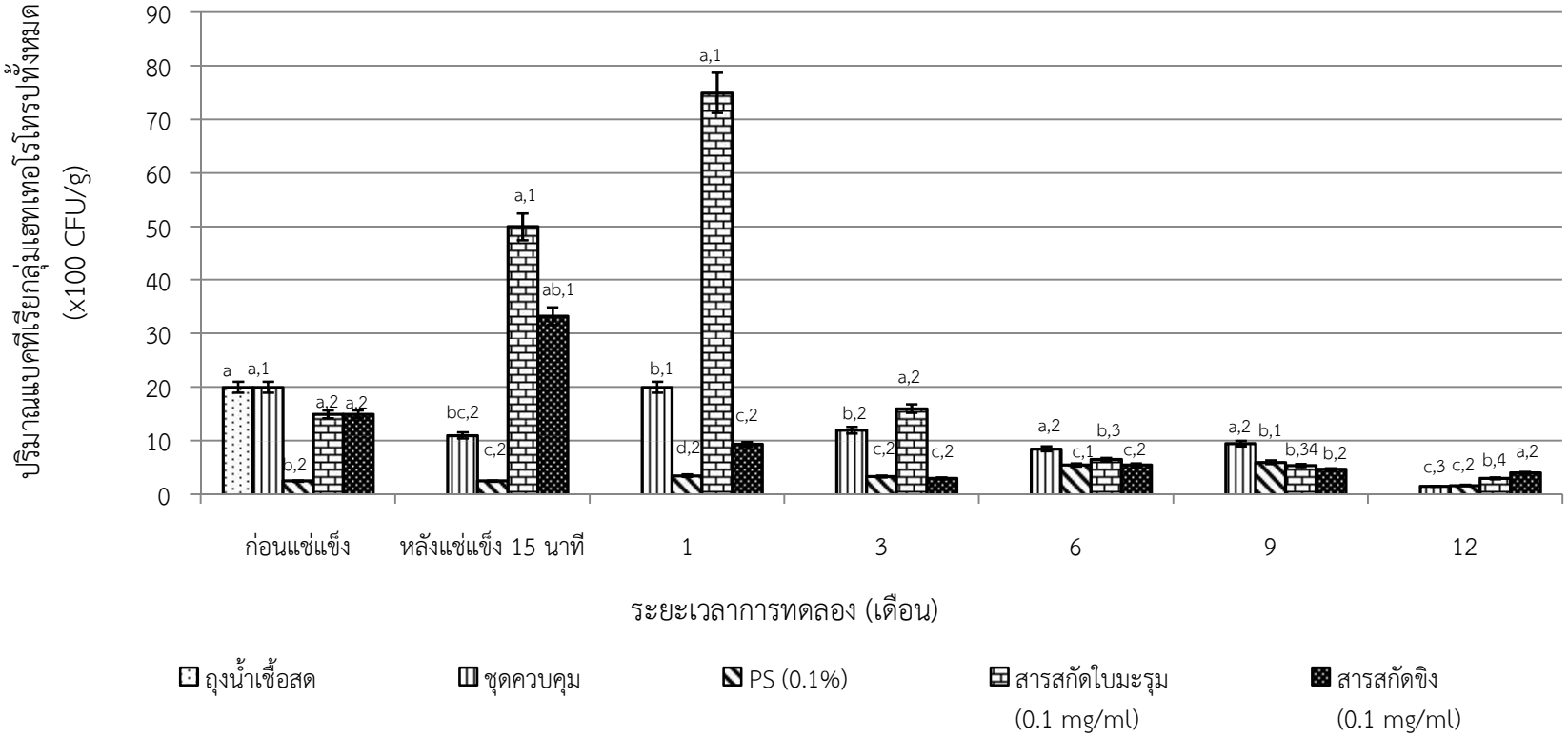
3) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-Streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	$2.00\pm1.00\times10^{3\ a}$	$2.00\pm0.20\times10^{3\ a,1}$	$2.50\pm1.50\times10^{2\ b,2}$	$1.50\pm0.50\times10^{3\ a,2}$	$1.50\pm0.50\times10^{3\ a,2}$
หลังแช่แข็ง 15 นาที		$1.10\pm0.90\times10^{3\ bc,2}$	$2.50\pm1.50\times10^{2\ c,2}$	$5.00\pm2.00\times10^{3\ a,1}$	$3.33\pm1.53\times10^{3\ ab,1}$
1		$2.00\pm0.00\times10^{3\ b,1}$	$3.50\pm0.50\times10^{2\ d,2}$	$7.50\pm4.50\times10^{3\ a,1}$	$9.33\pm0.31\times10^{2\ c,2}$
3		$1.20\pm0.20\times10^{3\ b,2}$	$3.33\pm1.53\times10^{2\ c,2}$	$1.60\pm0.30\times10^{3\ a,2}$	$3.00\pm1.00\times10^{2\ c,2}$
6		$8.50\pm0.50\times10^{2\ a,2}$	$5.50\pm0.50\times10^{2\ c,1}$	$6.50\pm0.50\times10^{2\ b,3}$	$5.50\pm0.50\times10^{2\ c,2}$
9		$9.50\pm0.50\times10^{2\ a,2}$	$6.00\pm1.00\times10^{2\ b,1}$	$5.33\pm1.53\times10^{2\ b,34}$	$4.67\pm1.53\times10^{2\ b,2}$
12		$1.50\pm0.50\times10^{2\ c,3}$	$1.67\pm0.58\times10^{2\ c,2}$	$3.00\pm0.00\times10^{2\ b,4}$	$4.00\pm0.00\times10^{2\ a,2}$

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



รูปที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

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
12		< 10	< 10	< 10	< 10

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

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
12		< 10	< 10	< 10	< 10

3.3 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในกล่องโฟม

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในกล่องโฟมที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% สารสกัดใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และสารสกัดขิง ความเข้มข้น 0.1 mg/ml พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบในถุงน้ำเชื้อมีความหลากหลายกว่าแบคทีเรียที่พบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (จากการศึกษาในปีงบประมาณที่ผ่านมา) โดยสามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 วงศ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก คือ Micrococcaceae ได้แก่ *Kocuria palustris*, *Kytococcus sedentarius*, *Micrococcus antarcticus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *S. epidermidis / S. lugdunensis*, *S. fleurettii*, *S. haemolyticus*, วงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus alcalophilus*, *B. badius*, *B. circulans*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. pantothenticus*, *B. lentimorbus*, *B. macquariensis*, *B. megaterium*, *B. pasteurii* และ *B. thuringiensis* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ วงศ์ Pseudomonadaceae ได้แก่ *Acinetobacter* spp./*A. lwoffii* และ Gilardi rod group 1, วงศ์ Alcaligenaceae ได้แก่ *Bordetella trematum*, วงศ์ Vibrionaceae ได้แก่ *Plesiomonas shigelloides* และวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Xenorhabdus luminescens/X. nematophilus* ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม

ชนิดแบคทีเรีย	ถุงน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3				เดือนที่ 6				เดือนที่ 9				เดือนที่ 12			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม																													
วงศ์ Micrococcaceae																													
Kocuria palustris	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Kytococcus sedentarius	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Micrococcus antarcticus	X	✓	X	X	X	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 aureus subsp. *aureus*	X	X	X	X	X	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 epidermidis / *Staphylococcus lugdunensis*	X	X	X	X	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 fleurettii	X	X	X	X	X	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 haemolyticus	X	X	✓	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
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	X	X	X
Bacillus badius	X	X	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 circulans	✓	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

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	ถุงน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3				เดือนที่ 6				เดือนที่ 9				เดือนที่ 12			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน																													
วงศ์ Bacillaceae																													
Bacillus firmus	✓	X	X	X	X	✓	✓	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
Bacillus pantothenticus	X	X	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	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	X
Bacillus megaterium	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 pasteurii	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
Bacillus thuringiensis	✓	✓	X	X	✓	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน																													
วงศ์ Pseudomonadaceae																													
Acinetobacter spp. / *Acinetobacter lwoffii*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	✓	X
Gilardi rod group 1	X	✓	X	X	X	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 6 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	ถุงน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3				เดือนที่ 6				เดือนที่ 9				เดือนที่ 12			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ไบมะรุม 0.1 mg/mL	ขิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน																													
วงศ์ Alcaligenaceae																													
Bordetella trematum	X	X	X	✓	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
วงศ์ Vibrionaceae																													
Plesiomonas shigelloides	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
วงศ์ Enterobacteriaceae																													
Xenorhabdus luminescens / Xenorhabdus nematophilus	X	✓	X	X	X	X	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 7 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
Kocuria palustris	+	N	-	+	-	+	-	N	N	N	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	N	-	N	N
Kytococcus sedentarius	+	N	-	+	-	-	+	N	S	S	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N	N
Micrococcus antarcticus	+	N	+	+	-	-	-	N	N	N	-	+	-	-	N	N	-	-	-	+	-	-	-	N
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	+	+	-	+	-	+	+	-	R	S	N	N	N	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Staphylococcus epidermidis / S. lugdunensis	+	-	-	+	-	+	N	N	R	S	N	N	N	+	+	+	+	-	+	-	N	-	-	-
Staphylococcus fleurettii	+	-	+	+	-	-	-	-	N	R	N	N	N	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Staphylococcus haemolyticus	+	-	-	+	-	-	+	-	S	S	N	N	N	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก, - หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ, N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ, S หมายถึง Susceptible, R หมายถึง Resistant

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี																				
	catalase	Anaerobic growth	VP test	citrate	â Arabinose	Starch hydrolysis	Gas- glucose	Nitrate	â D- mannitol	â D- glucose	Gelatin hydolysis	VP pH <6	VP pH >7	NB 6.8	Growth NaCl 5%	Growth NaCl 7%	Growth with Temp.				
																	10°c	40°c	50°c	55°c	65°c
Bacillus alcalophilus	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Bacillus badius	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	+	+	+	N	-	+	+	-	-
Bacillus circulans	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	N	+	-	-	-
Bacillus fastidiosus	+	-	-	-	N	-	-	-	N	N	-	N	N	-	+	-	+	+	-	-	-
Bacillus firmus	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	N	+	-	-	-
Bacillus insolitus	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Bacillus pantothenticus	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	N	-	-
Bacillus lentimorbus	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus macquariensis	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Bacillus megaterium	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	N	-	+	N	N	+	N	-	-	-
Bacillus pasteurii	+	+	-	+	-	-	-	+	N	-	+	N	N	-	+	+	N	N	-	-	-
Bacillus thuringiensis	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก, - หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ, N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Pseudomonadaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี														
	Oxidase	Motile	Urease	Nitrate	Indole	Esculin hydrolosis	Gelatin hydrolysis	Growth on MacConkey agar	OF Mannitol	OF Dextrose	Yellow pigment	Growth at 37 °C	Growth at 44 °C	Arginine	Malonate
Acinetobacter spp. / *Acinetobacter lwoffii*	-	-	-	-	-	-	+	+	N	-	-	+	-	-	-
Gilardi rod group 1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	N	N	N	N	N

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Alcaligenaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี														
	Oxidase	Motile	Lysine decarboxylase	OF moltose	OF mannitol	Esculin hydrolosis	Catalase	Nitrate reduction	Urease	Growth on MacConkey agar	Citrate	Growth at 25 °C	Growth at 42 °C	Growth in nutrient broth with 6% NaCl	Glucose fermantation
Bordetella trematum	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก, - หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ, N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Vibrionaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี															
	Oxidase	Catalase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Arginine dihydrolase	Gelatin liquefaction	TSI	Indole	Voges-Proskauer	Esculin hydrolysis	Fermentation of			Growth in 1% peptone		
											mannitol	lactose	sucrose	0% NaCl	7% NaCl	11% NaCl
Plesiomonas shigelloides	+	+	+	+	+	-	A/A-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี													
	H_2S	Indole	MR	VP	Citrate	Urease	Motility	Malonate utilization	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Gas form			
											Sucrose	Mannitol	Arabinose	Maltose
Xenorhabdus luminescens/X. nematophilus	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก, - หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ

4. การศึกษาแบบแผนการดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะ จำนวน 18 ชนิด ได้แก่ Amikacin (30 ไมโครกรัม), Amoxicillin-Clavulanic acid (30 ไมโครกรัม), Ampicillin (10 ไมโครกรัม), Chloramphenicol (30 ไมโครกรัม), Cefotaxime (30 ไมโครกรัม), Ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม), Gentamicin (10 ไมโครกรัม), Ceftriaxone (30 ไมโครกรัม), Meropenem (10 ไมโครกรัม), Cefoxitin (30 ไมโครกรัม), Imipenem (10 ไมโครกรัม), Cephalotin (30 ไมโครกรัม), Kanamycin (30 ไมโครกรัม), Nalidixic acid (30 ไมโครกรัม), Sulfonamides (300 ไมโครกรัม), Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 ไมโครกรัม), Tetracycline (30 ไมโครกรัม) และ Piperacillin-tazobactam (110 ไมโครกรัม) ของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติและการใช้กล่องโฟม จำนวน 11 ชนิด คือ *Acinetobacter* spp. */A. lwoffii* strain 1, *Acinetobacter* spp. */A. lwoffii* strain 2, *Bacillus brevis* strain 1, *B. brevis* strain 2, *Bordetella trematum*, *Plesiomonas shigelloides*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. epidermidis/S. lugdunensis* และ *Tatumella ptyseos* ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ยกเว้นแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ที่พบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *Plesiomonas shigelloides* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ Cefoxitin (30 ไมโครกรัม), Cephalotin (30 ไมโครกรัม), Sulfonamides (300 ไมโครกรัม) และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 ไมโครกรัม) *Tatumella ptyseos* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ Ampicillin (10 ไมโครกรัม), Cefoxitin (30 ไมโครกรัม) และ Cephalotin (30 ไมโครกรัม) *S. aureus* subsp. *aureus* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Sulfonamides (300 ไมโครกรัม) และ Tetracycline (30 ไมโครกรัม) และ *S. epidermidis / S. lugdunensis* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 1 ชนิด ได้แก่ Tetracycline (30 ไมโครกรัม) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ชนิดแบคทีเรีย	ยาปฏิชีวนะ																	
	AK	AMC	AMP	C	CTX	CIP	CN	CRO	MEM	FOX	IMP	KF	K	NA	S3	SXT	TE	TZP
Acinetobacter spp. / *Acinetobacter lwoffii* strain 1	S	S	S	S	I	S	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
Acinetobacter spp. / *Acinetobacter lwoffii* strain 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bacillus brevis strain 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bacillus brevis strain 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bordetella trematum	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Plesiomonas shigelloides	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S
Staphylococcus haemolyticus	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
Staphylococcus cohnii subsp. *cohnii*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Staphylococcus epidermidis / *Staphylococcus lugdunensis*	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S
Tatumella ptyseos	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S

หมายเหตุ : S คือ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ, I คือ มีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง, R คือ ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ, ชื่อย่อของยาปฏิชีวนะ คือ AK = Amikacin (30 ไมโครกรัม), AMC = Amoxicillin-Clavulanic acid (30 ไมโครกรัม), AMP = Ampicillin (10 ไมโครกรัม) C = Chloramphenicol (30 ไมโครกรัม), CTX = Cefotaxime (30 ไมโครกรัม), CIP = Ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม), CN = Gentamicin (10 ไมโครกรัม), CRO = Ceftriaxone (30 ไมโครกรัม), MEM = Meropenem (10 ไมโครกรัม), FOX = Cefoxitin (30 ไมโครกรัม), IMP = Imipenem (10 ไมโครกรัม), KF = Cephalotin (30 ไมโครกรัม), K = Kanamycin (30 ไมโครกรัม), NA = Nalidixic acid (30 ไมโครกรัม), S3 = Sulfonamides (300 ไมโครกรัม), SXT = Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 ไมโครกรัม), TE = Tetracycline (30 ไมโครกรัม) และ TZP = Piperacillin-tazobactam (110 ไมโครกรัม)

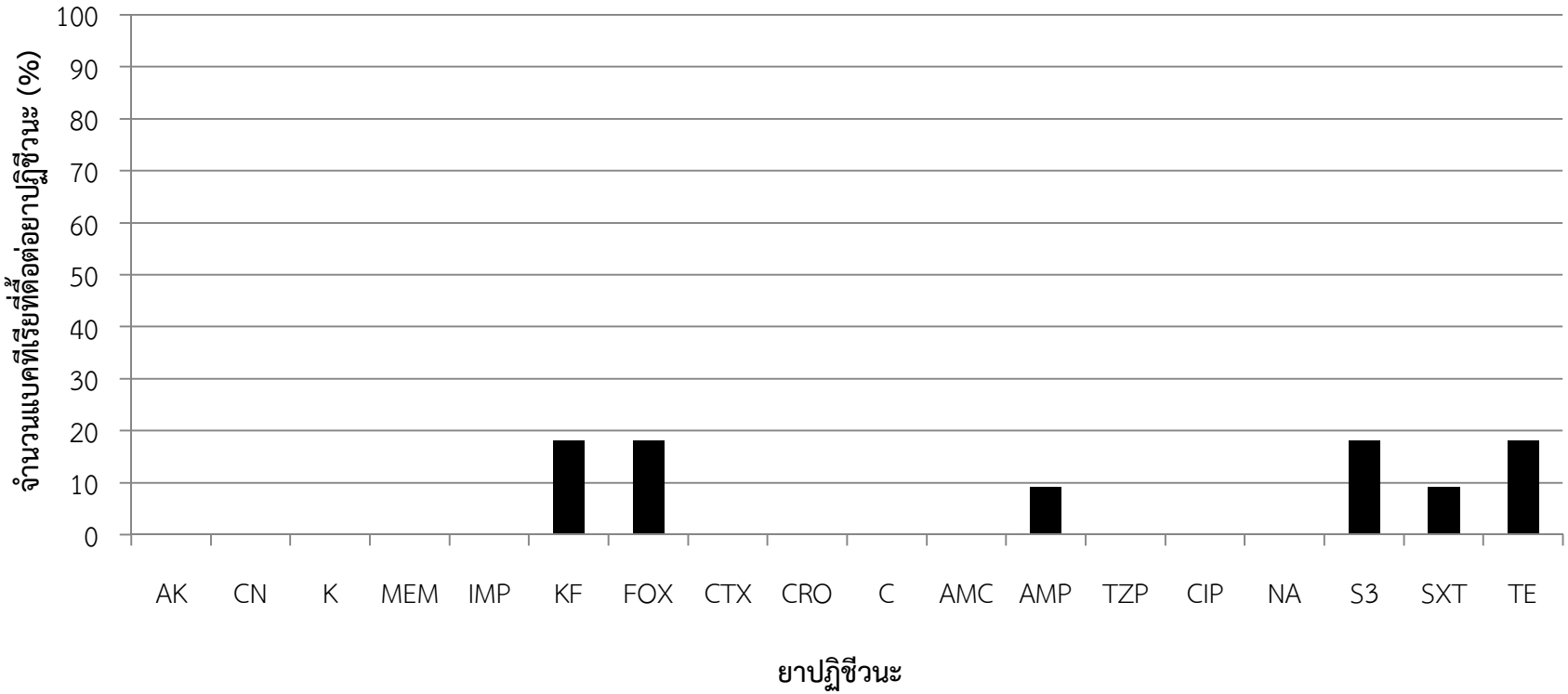
จากการศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 18 ชนิด ของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง จำนวน 11 ชนิด คือ *Acinetobacter* spp. */A. lwoffii* strain 1, *Acinetobacter* spp. */A. lwoffii* strain 2, *Bacillus brevis* strain 1, *B. brevis* strain 2, *Bordetella trematum*, *Plesiomonas shigelloides*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. epidermidis / S. lugdunensis* และ *Tatumella ptyseos* พบการดื้อยาปฏิชีวนะ Cephalotin, Cefoxitin, Sulfonamides และ Tetracycline สูงที่สุด (18.18%) รองลงมาคือ Ampicillin และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (9.09%) ดังแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 11

ตารางที่ 14 แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

กลุ่มยา	ยาปฏิชีวนะ (อักษรย่อ)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อดิสค์)	จำนวนไอโซเลท (เปอร์เซ็นต์)		
			S	I	R
Aminoglycoside	Amikacin (AK)	30 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	Gentamicin (CN)	10 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	Kanamycin (K)	30 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
Cabarpenem	Meropenem (MEM)	10 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	Imipenem (IMP)	10 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
Cephalosporin	Cephalotin (KF) (1^{st} gen)	30 ไมโครกรัม	8 (72.73)	1 (9.09)	2 (18.18)
	Cefoxitin (FOX) (2^{nd} gen)	30 ไมโครกรัม	8 (72.73)	1 (9.09)	2 (18.18)
	Cefotaxime (CTX) (3^{rd} gen)	30 ไมโครกรัม	9 (81.82)	2 (18.18)	0 (0)
	Ceftriaxone (CRO) (3^{rd} gen)	30 ไมโครกรัม	10 (90.91)	1 (9.09)	0 (0)
Chloramphenicol	Chloramphenicol (C)	30 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)

ตารางที่ 14 แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (ต่อ)

กลุ่มยา	ยาปฏิชีวนะ (อักษรย่อ)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อดิสค์)	จำนวนไอโซเลท (เปอร์เซ็นต์)		
			S	I	R
Penicillin	Amoxicillin-Clavulanic acid (AMC)	30 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	Ampicillin (AMP)	10 ไมโครกรัม	10 (90.91)	0 (0)	1 (9.09)
	Piperacillin-tazobactam (TZP)	110 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
Quinolone	Ciprofloxacin (CIP)	5 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	Nalidixic acid (NA)	30 ไมโครกรัม	11 (100)	0 (0)	0 (0)
Sulfonamide	Sulfonamides (S3)	300 ไมโครกรัม	9 (81.82)	0 (0)	2 (18.18)
	Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	25 ไมโครกรัม	9 (81.82)	1 (9.09)	1 (9.09)
Tetracycline	Tetracycline (TE)	30 ไมโครกรัม	9 (81.82)	0 (0)	2 (18.18)



รูปที่ 11 แบบแผนการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

หมายเหตุ : ชื่อย่อของยาปฏิชีวนะ คือ AK = Amikacin (30 ไมโครกรัม), AMC = Amoxicillin-Clavulanic acid (30 ไมโครกรัม), AMP = Ampicillin (10 ไมโครกรัม) C = Chloramphenicol (30 ไมโครกรัม), CTX = Cefotaxime (30 ไมโครกรัม), CIP = Ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม), CN = Gentamicin (10 ไมโครกรัม), CRO = Ceftriaxone (30 ไมโครกรัม), MEM = Meropenem (10 ไมโครกรัม), FOX = Cefoxitin (30 ไมโครกรัม), IMP = Imipenem (10 ไมโครกรัม), KF = Cephalotin (30 ไมโครกรัม), K = Kanamycin (30 ไมโครกรัม), NA = Nalidixic acid (30 ไมโครกรัม), S3 = Sulfonamides (300 ไมโครกรัม), SXT = Trimethoprim-sulfamethoxazole (25 ไมโครกรัม), TE = Tetracycline (30 ไมโครกรัม) และ TZP = Piperacillin-tazobactam (110 ไมโครกรัม)

5. การศึกษายีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาถึงยีนความรุนแรงในการก่อโรค (Virulent gene) กลุ่ม Narrow-spectrum beta-lactamase (NSBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{PSE-1}), Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{CTX-M}) และ *Amp*C beta-lactamase (ได้แก่ bla_{CMY-1} และ bla_{CMY-2}) ในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง จากผลการศึกษาพบว่าไม่พบยีนความรุนแรงในการก่อโรคในแบคทีเรียทั้ง 11 ชนิด ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 การตรวจหายีนความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ชนิดแบคทีเรีย	NSBL			ESBL			AmpC	
	bla_{TEM}	bla_{SHV}	bla_{PSE-1}	bla_{TEM}	bla_{SHV}	bla_{CTX-M}	bla_{CMY-1}	bla_{CMY-2}
Acinetobacter spp. / *Acinetobacter lwoffii* strain 1	x	x	x	x	x	x	x	x
Acinetobacter spp. / *Acinetobacter lwoffii* strain 2	x	x	x	x	x	x	x	x
Bacillus brevis strain 1	x	x	x	x	x	x	x	x
Bacillus brevis strain 2	x	x	x	x	x	x	x	x
Bordetella trematum	x	x	x	x	x	x	x	x
Plesiomonas shigelloides	x	x	x	x	x	x	x	x
Staphylococcus haemolyticus	x	x	x	x	x	x	x	x
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	x	x	x	x	x	x	x	x
Staphylococcus cohnii subsp. *cohnii*	x	x	x	x	x	x	x	x
Staphylococcus epidermidis / *Staphylococcus lugdunensis*	x	x	x	x	x	x	x	x
Tatumella ptyseos	x	x	x	x	x	x	x	x

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งโดยการใช้กล่องโฟมร่วมกับการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรใบมะรุมและขิง ความเข้มข้น 0.1 mg/ml พบว่าสารสกัดใบมะรุมมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมากกว่าสารสกัดขิง ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยในชุดการทดลองที่เติมสารสกัดใบมะรุมและชุดการทดลองที่เติมสารสกัดขิงมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตลอดการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยเป็นระยะเวลา 1 ปี แต่สารสกัดใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยได้ดีกว่าสารสกัดขิง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% ในด้านการกำจัดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

2. จากการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เทคโนโลยีแบบดั้งเดิมและการใช้กล่องโฟม พบว่าแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 18 ชนิด ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ยกเว้น *Plesiomonas shigelloides* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ Cefoxitin, Cephalotin, Sulfonamides และ Trimethoprim-sulfamethoxazole ส่วน *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* พบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Sulfonamides และ Tetracycline และ *Staphylococcus epidermidis / S. lugdunensis* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Tetracycline และแบคทีเรียชนิดสุดท้ายที่พบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะ คือ *Tatumella ptyseos* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Cefoxitin และ Cephalotin

3. การศึกษาถึงยีนความรุนแรงในการก่อโรค (Virulent gene) กลุ่ม Narrow-spectrum beta-lactamase (NSBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{PSE-1}), Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{CTX-M}) และ *Amp*C beta-lactamase (ได้แก่ bla_{CMY-1} และ bla_{CMY-2}) ในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เทคโนโลยีแบบดั้งเดิมและการใช้กล่องโฟม จำนวน 11 ชนิด พบว่าไม่พบยีนความรุนแรงในการก่อโรคในแบคทีเรียทั้ง 11 ชนิดที่นำมาศึกษา

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยถึงกระบวนการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแบบแช่แข็งโดยใช้อุปกรณ์อย่างง่ายนั้น คือการใช้กล่องโฟมและไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ยังคงมีการศึกษาน้อยมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ โดยส่วนใหญ่นั้นเป็นการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Anchordoguy et al., 1987, 1988; Diwan et al., 1994; Chow et al., 1985) ยกตัวอย่างเช่น Leena Grace and Natarajan (2003) สามารถเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในไนโตรเจนเหลวได้นานกว่า 30 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 90% ในขณะที่ Diwan and Joseph (1999) พบว่าการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ร่วมกัน 2 ชนิด คือ DMSO (5%) ร่วมกับ Glycerol (5%) และ DMSO (5%) ร่วมกับน้ำตาล Trehalose (0.25 M) สามารถเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวอินเดีย (*Penaeus indicus*) ได้นานกว่า 60 วัน โดยเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 75-80% นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม กุ้งทะเลและปูทะเลในไนโตรเจนเหลวประสบความสำเร็จหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 30 – 31 วัน (Anchordoguy et al., 1988; Chow et al., 1985; Jeyalectumie and Subramoniam, 1989)

ส่วนการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งโดยใช้อุปกรณ์แช่แข็งอย่างง่ายนั้นมีเพียง Akarasanon et al. (2004) ที่ศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man)) ในหลอด Vial และลดอุณหภูมิการแช่แข็งด้วยการใช้ภาชนะอย่างง่ายก่อนใส่หลอด Vial ที่บรรจุถุงน้ำเชื้อกุ้งก้ามกรามลงในไนโตรเจนเหลว โดยประสบความสำเร็จในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man)) ได้นานกว่า 150 วัน โดยใช้สาร Ethylene Glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ดังนั้นจากการทบทวนวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่าการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นการศึกษาในครั้งแรกที่สามารถแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยโดยใช้อุปกรณ์อย่างง่าย นั่นคือกล่องโฟม โดยสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 1 ปี โดยยังคงคุณสมบัติที่ดีเยี่ยมของน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยสำหรับนำไปใช้ในการผสมเทียม ได้แก่ การรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 95% แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเก็บรักษาตั้งแต่การเตรียมถุงน้ำเชื้อ สารละลายบัฟเฟอร์ อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายถุงน้ำเชื้อ มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยระยะยาว

การแช่แข็งโดยใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติจะมีการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ ในขณะที่การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วนั้นจะส่งผลให้เกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์มากขึ้น (Woods et al., 2004) โดยอัตราการลดอุณหภูมิสำหรับการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งนั้นมีลักษณะจำเพาะเจาะจงในแต่ละชนิด ดังรายงานของ Suquet et al. (2000) และ Gwo (2000) โดยการลดอุณหภูมิการแช่แข็งอย่างช้า ๆ นั้นประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งหลายชนิด เช่น กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Bart et al., 2006; Vuthiphandchai et al., 2007) กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) (Lezcano et al., 2004) กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) (Chow et al., 1985) กุ้งทะเลต่าง ๆ เช่น *Sicyonia ingentis* (Anchordoguy et al., 1988) ในขณะที่การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วนั้นสามารถใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น อัตราการลดอุณหภูมิ 5 ถึง 30 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาการรอดชีวิต

ของน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำได้สูง (85-90%) ดังรายงานการศึกษาของ Arun and Subramoniam (1997) ทั้งนี้กระบวนการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจง (Species-specific) โดยอาจเป็นเพราะลักษณะที่แตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาและกระบวนการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้น้ำเชื้อกุ้งแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารเคมีและกระบวนการแช่แข็งที่แตกต่างกันออกไป (Kopeika et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้กล่องโฟม ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาถูกมาก เมื่อเทียบกับเครื่องมือลดอุณหภูมิที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ และมีราคาที่แพงมาก กลับมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันในการลดอุณหภูมิถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีอย่างง่าย ราคาไม่แพงสู่ภาคการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การบริหารการจัดการฟาร์ม และการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ ทำให้เกษตรกรเข้าถึงเทคโนโลยีได้ง่ายขึ้นและลดการพึ่งพาเทคโนโลยีที่มีราคาสูงจากต่างประเทศ

จากการประยุกต์ใช้สารสกัดขิงและใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาโดยใช้กล่องโฟม พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มีศักยภาพในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดยสารสกัดใบมะรุมมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดขิงในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย โดยสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตได้ใกล้เคียงกับสารสกัดขิง แต่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้ดีกว่าสารสกัดขิง สารสกัดใบมะรุมที่เติมลงในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อ โดยปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้การลดลงของแบคทีเรียในน้ำเชื้อนั้นย่อมส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อนั้นทำให้เกิดภาวะขาดแคลนออกซิเจน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตลดลง รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทำลายสเปิร์ม เช่น เอนไซม์ และของเสียที่เกิดจากการเจริญของแบคทีเรีย (Jenkins and Tiersch, 1997) การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมีจากมะรุมนั้นได้พบว่า สารสกัดจากมะรุมประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนินและอัลคาลอยด์ (Bukar et al., 2010) Renitta et al. (2009) รายงานว่าสารสกัดใบ ดอก และเมล็ดมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* typhi A, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* และยีสต์ *Candida albicans* ส่วน Vieira et al. (2010) รายงานว่าสารสกัดใบมะรุมสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus* และ *Vibrio cholerae* รวมถึงงานวิจัยอีกหลายฉบับที่ระบุถึงคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดชนิดนี้ ได้แก่ *Shigella shinga*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* และ *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus*-β-haemolytica, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* และ *Bacillus megaterium* และเชื้อรา ได้แก่ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton xoccosum* และ *Microsporum canis* (Caceres et al., 1991; Rahman et al., 2006; Chuang et al., 2007; Bukar et al., 2010)

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในกล่องโฟม พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบในถุงน้ำเชื้อมีความหลากหลายกว่าแบคทีเรียที่พบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (การศึกษาในปีที่ผ่านมา) โดยสามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 วงศ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก คือ Micrococcaceae ได้แก่ *Kocuria palustris*, *Kytococcus sedentarius*, *Micrococcus antarcticus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *S. epidermidis / S. lugdunensis*, *S. fleurettii*, *S. haemolyticus*, วงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus alcalophilus*, *B. badius*, *B. circulans*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. pantothenticus*, *B. lentimorbus*, *B. macquariensis*, *B. megaterium*, *B. pasteurii* และ *B. thuringiensis* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ วงศ์ Pseudomonadaceae ได้แก่ *Acinetobacter* spp./*A. lwoffii* และ Gilardi rod group 1, วงศ์ Alcaligenaceae ได้แก่ *Bordetella trematum*, วงศ์ Vibrionaceae ได้แก่ *Plesiomonas shigelloides* และวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Xenorhabdus luminescens/X. nemtophilus* สอดคล้องกับการศึกษาของ Nimrat et al. (2006) ที่รายงานว่าแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบได้มากในถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น โดยแบคทีเรียที่พบในการศึกษาดังกล่าวประกอบด้วย *Bacillus circulans*, *Staphylococcus hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp.

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีบางชนิดที่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรค แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ คือ *S. aureus* subsp. *aureus* แบคทีเรียชนิดนี้ก่อโรคหลายชนิดในมนุษย์ อาทิ ก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุก ๆ บริเวณของร่างกาย การติดเชื้อที่ผิวหนังสามารถทำให้ติดเชื้ออย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง ก่อให้เกิดหนองและการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia) รุนแรง และอาจก่อให้เกิดอาการของโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบและเป็นหนอง เป็นต้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียอีกชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง นั่นคือ *P. shigelloides* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมในเขตร้อนชื้นและเขตอบอุ่นไม่ว่าจะเป็นน้ำจืด เช่น แม่น้ำ ทะเลสาบ และน้ำทะเล เช่น บริเวณปากแม่น้ำ (Monteil and Harf-Monteil, 1997; Levin, 2008) โดยสามารถล่องลอยอยู่ในน้ำและอาศัยอยู่ในสัตว์น้ำ เช่น ปลา ปู กุ้ง หอยนางรมและหอยแมลงภู่ เป็นต้น (Schubert, 1984; Oxley et al., 2002; Huber et al., 2004) การติดเชื้อภายในลำไส้จากแบคทีเรียชนิดนี้ยังมีผลให้เกิดอาการติดเชื้อในกระแสเลือดและโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูง (Miller and Koburger, 1985; Ampofo et al., 2001) ทั้งนี้เนื่องด้วยแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถผลิตสารพิษได้หลายชนิด เช่น Cholera-like (CL) enterotoxin (Gardner et al., 1987; Abbott et al., 1991), Thermostable (TS) (Mathews et al., 1988; Abbott et al., 1991) และ Thermolabile labile (TL) enterotoxin เป็นต้น (Falcon et al., 2003)

ส่วนแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ *S. haemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคที่รู้จักอย่างกว้างขวางและเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เกิดจากอุปกรณ์ที่ใช้สวนทางการแพทย์ (Medical catheter) (Daniel et al., 2014) *S. haemolyticus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษกลุ่ม Enterotoxins

และ Hemolysins ได้แก่ สาร Enterotoxins กลุ่ม SE(A), SE(B) และ SE(C) สารพิษกลุ่มนี้จัดเป็นสารกลุ่ม Exoproteins ที่ก่อให้เกิดการอักเสบของระบบทางเดินอาหารอย่างรุนแรงและอาเจียน หากได้รับสารชนิดนี้จากการรับประทาน (Valle et al., 1990) *B. trematum* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ที่จัดเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรค โดยมีรายงานการพบแบคทีเรียชนิดนี้จากแผลติดเชื้อ หูอักเสบ แผลจากโรคเบาหวานและการติดเชื้อในกระแสเลือด (Vandamme et al., 1996; Daxboeck et al., 2004; Halim et al., 2014) และท้ายสุด *K. sedentarius* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทางทะเล (ZoBell and Upham, 1944) เช่น ชายฝั่งทะเลประเทศเกาหลีใต้ (Bhattarai et al., 2006) และดินตะกอนนอกชายฝั่งทะเลสาธารณรัฐปาเลา (Republic Palau) (Gontang et al., 2007) เป็นต้น รวมทั้งยังพบได้บ่อยครั้งจากผิวหนังมนุษย์ (Kloss et al., 1974) ในปัจจุบันองค์ความรู้เกี่ยวกับความสามารถในการทำให้เกิดโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ยังมีรายงานไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการขาดแคลนข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่อาจทำให้เกิดการจัดจำแนกที่ผิดพลาด เช่น ความไวต่อสารปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์ของแบคทีเรียชนิดนี้กำลังเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ดังเช่นการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ (Endocarditis) (Becker et al., 2003; Mnif et al., 2006)

การศึกษาแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติและใช้กล่องโฟม พบว่าแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 18 ชนิด ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ยกเว้น *P. shigelloides* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ Cefoxitin, Cephalotin, Sulfonamides และ Trimethoprim-sulfamethoxazole ส่วน *S. aureus* subsp. *aureus* พบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Sulfonamides และ Tetracycline และ *S. epidermidis / S. lugdunensis* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Tetracycline และแบคทีเรียชนิดสุดท้ายที่พบว่าดื้อต่อยาปฏิชีวนะ คือ *T. ptyseos* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ Ampicillin, Cefoxitin และ Cephalotin โดยรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า *P. shigelloides* เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Quinolone (Oflaxacin และ Levofloxacin) รวมถึงยาปฏิชีวนะกลุ่ม Cephalosporin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Penicillin และ Ampicillin เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เบต้าแลคตาเมส รวมถึงยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracyclins, Cotrimoxazole และ Chloramphenicol (Brenden et al., 1988; Kain and Kelly, 1989) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *P. shigelloides* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลในบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน โดยพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin, Amikacin, Trimethoprim/sulfamethoxazole, Gentamicin และยาปฏิชีวนะกลุ่ม Cephalosporins (Cefazolin, Cefuroxime, Ceftazidime, Cefotaxime, Cefepime และ Cefoxitin) (Chen et al., 2013) ทั้งนี้ความแตกต่างของแบบแผนความไวต่อสารต้านจุลชีพนั้นไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ซึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่างของสายพันธุ์ที่แยกได้จากภูมิภาคต่างกัน (Kain and Kelly, 1989) ถึงแม้ว่าการรักษาอาการผู้ป่วยลำไส้อักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. shigelloides* ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะจะมีความจำเป็นไม่มากนัก เนื่องจากอาการของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้จะหายภายในระยะเวลาไม่นาน (Soweid and Clarkston, 1995) แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยจะช่วยลดระยะเวลาของโรคเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ (Kain

and Kelly, 1989) ดังนั้นการทราบถึงแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดนี้จึงมีความสำคัญเพื่อใช้ในการคัดเลือกสารต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยของบุคลากรทางการแพทย์

ส่วนแบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *S. aureus* subsp. *aureus* ก็มีรายงานเช่นเดียวกัน โดยแบคทีเรียชนิดนี้มีสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Methicillin (Methicillin resistant *S. aureus*) ดื้อต่อ Tetracycline เป็นอย่างมาก (de Neeling et al., 2007; Guardabassi et al., 2007) การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า *S. aureus* มีอุบัติการณ์ของการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamides เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Genc et al., 2008) รวมทั้งการศึกษาหลายๆ ฉบับได้ชี้ไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ระบุถึงการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Tetracycline ของ *S. epidermidis* (Dougherty et al., 1991; Nishijima et al., 1994) ทั้งนี้การดื้อต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่พบในการศึกษาในครั้งนี้อาจเกิดจากการใช้สารต้านจุลชีพอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาทิเช่น Sulfonamides, Penicillins, Quinolones, Tetracyclines และ Phenicols ส่งผลให้เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งนำไปสู่การแพร่กระจายของแบคทีเรียเหล่านี้ออกสู่สิ่งแวดล้อมใกล้เคียงและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ในธรรมชาติ (World Health Organization, 2011; Miranda et al., 2013)

เมื่อศึกษายีนความรุนแรงในการก่อโรคกลุ่ม Narrow-spectrum beta-lactamase (NSBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{PSE-1}), Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL ได้แก่ bla_{TEM}, bla_{SHV} และ bla_{CTX-M}) และ *Amp*C beta-lactamase (ได้แก่ bla_{CMY-1} และ bla_{CMY-2}) ในแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง จำนวน 11 ชนิด โดยไม่พบยีนเหล่านี้ในแบคทีเรียทั้ง 11 ชนิดที่ทำการศึกษา สอดคล้องกับผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านี้ที่พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไวต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Penicillins และกลุ่ม Cephalosporin ยกเว้นแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *P. shigelloides* และ *T. ptyseos* ซึ่งการดื้อยากลุ่มนี้ของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นในการดื้อยาปฏิชีวนะ ตามปกติแล้วแบคทีเรียที่สามารถผลิต Extended-spectrum beta-lactamase จะมีความสามารถในการดื้อต่อยากลุ่มอื่นนอกเหนือจากกลุ่ม Penicillins โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาปฏิชีวนะกลุ่ม Oxyimino-cephalosporins ส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยดำเนินการได้ยุ่งยากขึ้น (Ahmad et al., 1999; Bradford, 2001) การระบาดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้สร้างปัญหาอย่างมากต่อผู้ป่วยในโรงพยาบาลทั่วโลก โดยอุบัติการณ์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เริ่มขึ้นในแถบยุโรปตะวันตก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยาปฏิชีวนะกลุ่ม Extended-spectrum beta-lactam ได้ถูกนำมาใช้ในเชิงการแพทย์ในพื้นที่นี้เป็นครั้งแรก แต่หลังจากการพบอุบัติการณ์ในยุโรปไม่นานก็พบอุบัติการณ์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในสหรัฐอเมริกาและทวีปเอเชียตามมา ซึ่งอุบัติการณ์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่และแต่ละประเทศ (Bradford, 2001) จากรายงานทางการแพทย์แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลุ่มนี้พบในแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นส่วนใหญ่ โดยแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิต Extended-spectrum beta-lactamase สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม อาทิ กลุ่ม TEM-1 เป็นกลุ่มที่พบได้ทั่วไปของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตเอนไซม์ β-lactamase แบคทีเรียกลุ่มย่อยนี้สามารถ

ไฮโดรไลซ์ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Penicillins และ Early cephalosporins เช่น Cephalothin และ Cephaloridine กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ กลุ่ม SHV-1 เป็นกลุ่มย่อยที่พบมากใน *Klebsella pneumoniae* (Tzouvelekis and Bonomo, 1999) โดยเกิดจากการแสดงออกของยีน bla_{SHV-1} ซึ่งพบได้ที่พลาสมิดของเซลล์แต่อาจพบได้ในโครโมโซมของเซลล์เช่นเดียวกัน เนื่องจากการถ่ายทอดของยีนจากพลาสมิดสู่โครโมโซม (Livermore, 1995) เอนไซม์กลุ่มนี้นอกจากพบใน *K. pneumoniae* แล้วยังพบในแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Citrobacter diversus, E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford et al., 1995; El Harrif-Heraud et al., 1997; Naas et al., 1999) และกลุ่มย่อยอีกกลุ่มหนึ่ง คือ CTX-M เป็นกลุ่มที่พบใน *Salmonella enterica* serovar Typhimurium บางสายพันธุ์ และ *E. coli* รวมถึงแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae บางชนิด (Bradford, 2001)

ถึงแม้ว่าการศึกษาในครั้งนี้จะประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งด้วยการเติมสารสกัดสมุนไพรใบมะรุม ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ทั้งด้วยเทคนิคการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (การศึกษาในปีที่ผ่านมา) และการใช้กล่องโฟม โดยสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการผสมเทียมของถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อให้มั่นใจได้ว่าถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการผสมเทียมและพัฒนาสู่การจัดการฟาร์มและเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

ถนอมจิตร สิริภคพร, บุญใจ แก้วน้อย และ จุฬารัตน์ โฆษะโก. (2556). ความสามารถในการแข่งขันของกุ้งไทยในตลาดโลก. *ใน สัมมนาวิชาการเศรษฐกิจภาคใต้ปี 2556 วันที่ 13 ธันวาคม 2556 ธนาคารแห่งประเทศไทย* 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. ใน *แม่กุ้งแชบ๊วยจากแหล่งธรรมชาติภาคตะวันออก*. วันที่ค้นข้อมูล 24 กุมภาพันธ์ 2551, เข้าได้ถึงจาก http://www.fisheries.go.th/cf-chan/Paper/seminar/seminar-dof-49/di053.pdf

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

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

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, ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และ วีรพงศ์ 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 และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2557ข). Effect of antibiotics on sperm viavility and *Pseudomonas* 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. (2551). *การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน: วงศ์วิบริโอนาซีอี.*กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2555). *การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม วงศ์ไมโครคอคเคซีอีและสเตรปโตคอคเคซีอี.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และ ชัยรัตน์ พุ่มช่วย. (2547). เปรียบเทียบผลผลิตจากการเก็บไรน้ำกร่อย 5 วิธี. นครศรีธรรมราช: *ศูนย์พัฒนาประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ*, 2547.

Abbott, S., Kokka, R. and Janda, J. (1991). Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides. J. Clin. Microbiol*, 29: 148–153.

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

Ahmad, M., Urban, C., Mariano, N., Bradford, P.A., Calcagni, E., Projan, S.J., Bush, K. and Rahal, J.J. (1999). Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infection Diseases*, 29: 352–355.

Akarasanon, K., Damrongphol, P. and Poolsanguan, W. (2004). Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquacult Res*, 35:1415–20.

Ampofo, K., Graham, P., Ratner, A., Rajagopalan, L., Della-Latta, P. and Saiman, L. (2001). *Plesiomonas shigelloides* sepsis and splenic abscess in an adolescent with sickle-cell disease. *Pediatr. Infect. Dis*, 20: 1178–1179.

Anchordoguy, T.J., Crowe, J.H., Clark, J.R. and Griffin, F.J. (1987). Cryopreservation of sperm from the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. Abstract from 18th annual meeting of the world aquaculture society. Gnayaquil, Ecuador

Anchordoguy, T., Crowe, J.H., Griffin, F.J., and Clark, W.H. Jr. (1988). Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology*, 25(3): 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.

Arun, R. and Subramoniam, T. (1997). Effect of freezing rates on the survival of penaeid prawn larvae: A parameter analysis. *Cryo Letters*, 18(6): 359-368.

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.

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*, 37:523–8.

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 & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Becker, K., J. Wullenweber, H. J. Odenthal, M. Moeller, P. Schumann, G. Peters, and C. von Eiff. (2003). Prosthetic valve endocarditis due to *Kytococcus schroeteri*. *Emerg. Infect. Dis*, 9: 1493–1494.

Bhattarai, H.D., Lee, Y.K., Cho, K.H., Lee, H.K. and Shin, H.E. (2006). The study of antagonistic interactions among pelagic bacteria: a promising way to coin environmental friendly antifouling compounds. *Hydrobiologica*, 568: 417- 423.

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

Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 933-951.

Bradford, P. A., Urban, C., Jaiswal, A., Mariano, N., Rasmussen, B.A., Projan, S.J., Rahal, J.J. and Bush, K. (1995). SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 899–905.

Brenden, R.A., Miller, M.A. and Janda, J.M. (1988). Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. *Review Infection Diseases*, 10: 303–316.

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.

Bukar, A., Uba, A. and Oyeyi, T.I. (2010). Antimicrobial Profile of *Moringa oleifera* Lam. Extracts Against some Food – Borne Microorganisms. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 3(1): 43-48.

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.

Chen, X., Chen, Y., Yang, Q., Kong, H., Yu, F., Han, D., Zheng, S., Cui, D. and Li, L. (2013). *Plesiomonas shigelloides* infection in southeast China. *PLOS ONE*, 8: e77877.

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.

Daniel, B., Saleem, S., Naseer, G. and Fida, A. (2014). Significance of *Staphylococcus haemolyticus* in hospital acquired infections. *J Pioneer Med Sci*, 4(3): 119-125.

Daxboeck, F., Goerzer, E., Apfalter, P., Nehr, M. and Krause, R. (2004). Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet Med*, 21: 1247–1248.

De Neeling, A.J., van den Broek, M.J.M., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuvel, M.G., Dam-Deisz, W.D.C., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., Van Duijkeren, E. and Huijsdens, X.W. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology*, 122: 366–372.

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.

Diwan A.D. and Joseph, S . (1999). Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards *Indian J. Fish., 46(2) : 159-166*

Diwan A.D., Joseph, S and Nandakumar, A. (1994). Cryobanking potentials of marine shrimp gametes. *Mar. Fish. Infor. Serv. T & E Ser*., 131: 35-37.

Dougherty, J.M., McCulley, J.P., Silvany, R.E. and Meyer, D.R. (1991). The role of tetracycline in chronic blepharitis: inhibition of lipose production in staphylococci. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32: 2970-2975.

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.

El Harrif-Heraud, Z., Arpin, C., Benliman, S. and Quentin, C. (1997). Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4 producing strains of *Citrobacter diversus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2561–2567.

Falcon, R., Carbonell, G., Figueredo, P., Butiao, F., Saridakis, H., Pelayo, J. and Yano, T. (2003). Intracellular vacuolation induced by culture filtrates of *Plesiomonas shigelloides* isolated from environmental sources. *J. App. Microbiol,* 95: 273–278.

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. *Progressive Fish-culturist*, 28: 227-230.

Gardner, S., Fowlston, S. and George, W. (1987). *In vitro* production of cholera toxin-like activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J. Infect. Dis*, 156: 720–722.

Genc, Y., Ozkanca, R. and Bekdemir, Y. (2008). Antimicrobial activity of some sulfonamide derivatives on clinical isolates of *Staphylococcus aureus. Annuals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 7, 17.*

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.

Gontang, E.A., Fenical, W. and Jensen, P.R. (2007). Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 73: 3272-3282.

Griffiths, S., Melville, K., Cook, M., and Vincent, S. (2001). Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13, 355–363.

Guardabassi, L., Stegger, M. and Skov, R. (2007). Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*, 122: 384–386.

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.

Gwo, J-C. (2000). Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research*, 31: 259-271.

Halim, I., Ihbibane, F., Belabbes, H., Zerouali, K. and Mdaghri, N.E. (2014). Isolation of *Bordetella trematum* from bacteremia. *Ann Biol Clin (Paris)*, 72: 612– 614.

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

Huber, I., Spanggard, B., Appel, K., Rossen, L. Nielson, T. and Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol*, 96: 117–132.

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.

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*, 177:247–53.

Kain, K.C. and Kelly, M.T. (1989). Antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from patients with diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1609–1610.

Kloss, W.E., Tornabebe, T.G. and Schleifer, K.H. (1974). Isolation and characterization of *Micrococci* from human skin, including two species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae. Int J Syst Bacteriol*, 24:79-101.

Kopeika, E., Kopeika, J. and Zhang, T. (2007). Cryopreservation of fish sperm. In: Day, J.G., Stacey, G.N. (Eds.), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols., 2ed. Humana Press Totowa, New Jersey, pp. 203–218.

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.

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

Leena Grace, B. and Natarajan P. (2003). Cryopreservation of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) spermatozoa. *Indian J. Fish*., 50(3) : 415-419.

Levin, R. E. 2008. *Plesiomonas shigelloides* - An aquatic food borne pathogen: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology and molecular detection. *Food Biotechnology*, 22: 189–202.

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

Lezcano, M., Granja, C. and Salazar, M. (2004). The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology*, 48: 349–356.

Li, L., Jiang, Z. G., Xia, L. N., Shen, J. Z., Dai, L., Wang, Y., Huang, S. Y., and Wu, C. M. (2010). Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichai coli* isolated from chickens in China during 1970-2007. *Veterinary Microbiology*, 144, 505-510.

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

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.

Livermore, D. M. (1995). β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 557–584.

Mathews, B., Douglas, H. and Guiney, D. (1988). Production of a heat stable enterotoxin by *Plesiomonas shigelloides.* Microb. *Pathogen*, 5: 207–213.

Miller, M. and Koburger, J. (1985). *Plesiomonas shigelloides:* an opportunistic food and water borne pathogen. *J. Food Protect*, 48: 449–457.

Miranda, C.D., Tello, A. and Keen, P.L. (2013). Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Front Microbiology*, 4: 233-237.

Monteil, H., Harf-Monteil, H. (1997). *Plesiomonas shigelloides*: une bacterie exotique. La Lettre de l'infectiologue de la Microbiologie à la Clinique. XII: 255–262.

Mnif, B., Boujelbene, I., Mahjoubi, F., Gdoura, R., Trabelsi, I., Moalla, S., Frikha, I., Kammoun, S. and Hammami, A. (2006). Endocarditis due to *Kytococcus schroeteri*: Case report and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:1187-1189.

Naas, T., Philippon, L., Poirel, L., Ronco, E. and Nordman, P. (1999). An SHV-derived extended-spectrum β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1281–1284.

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.

National committee for Clinical Laboratory Standards. (2004). NCCLs document M2-A8 Vol. 24 No.1

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., Suksawat, S., Maleeweach, P. and Vuthiphandchai, V. (2008). 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.

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.

Nishijima, S., Akamatsu, H., Akamatsu, M., Kurokawa, I. and Asada, Y. (1994). The antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne. *Journal of Dermatology*, 21: 166–171.

Oxley, A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of wild and cultured hanana prawn, *Prenaeus merginsis*. *J. Appl. Microbiol*, 93:214–223.

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.

Renitta, R.E, Anitha, J. and Napolean, P. (2009). Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. Current. *Biotica*. 3(1): 33-37.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schubert, R. (1984). Genus IV. *Plesiomonas* Habs and Schubert. (1962). In: Kreig, N., Holt, I., eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol I.* Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co., pp. 548–550.

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.

Soweid, A.M. and Clarkston, W.K. (1995). *Plesiomonas shigelloides*: an unusual cause of diarrhea. *AJG*, 90: 2235–2236.

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

Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. and Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(3): 231 – 243.

Tzouvelekis, L.S. and Bonomo, R.A. (1999). SHV-type β-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5: 847–864.

Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A. and Vadillo, S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl Environ Microbiol*, 56(5): 1323-1326.

Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K. and Hinz, K.H. (1996). *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol*, 46: 849 – 858.

Vieira, G.H.F., Mourao, J.A., Angelo, A.M., Costa, R.A. and Vieira, R.H.S.F. (2010). Antibacterial Effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* Against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52(3): 129-132.

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.

Wang, J. -Y., Tang, P., Cui, E. -H., Wang, L. -Q., Liu, W. -H., Ren, J. -J., Wu, N., Qiu, Y. -H., and Liu. H. -J. (2013). Characterization of antimicrobial resistance and related resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from chickens in China during 2007-2012. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (46), 5238-5247.

Woods E.J., Benson J.D., Agca Y. and Critser J.K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 48(2):146-156.

World Health Organization. Tackling Antibiotic Resistance from a Food Safety Perspective in Europe. Copenhagen: *World Health Organization* (2011). Available from: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf.

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.

ZoBell, C.E. and Upham, H.C. (1944). A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull Scripps Inst Oceanogr Calif*, 5:239-292.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ วารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ชยาภา นิลโกศล และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2561). ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในกล่องโฟม. การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม วันที่ 24-25 พฤษภาคม พ.ศ. 2561. หน้า 327-335.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-