สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

# การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีแช่เย็น

**(Development of short-term chilled storage technique of seabass (*Lates calcarifer*) milt)**

โดย
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

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

เสนอต่อ

16 มิ.ค. 2554
284364
21 เม.ย. 2554

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551-2553

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีแช่เย็น (Development of short-term chilled storage technique of seabass (*Lates calcarifer*) milt) ภายใต้แผนงานวิจัยการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ Development of preservation protocol for seabass (*Lates calcarifer*) milt at low temperature for aquaculture สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ข้าพเจ้าและคณะทำงานได้จัดสรรงบประมาณบางส่วนเพื่อสนับสนุนโครงงานทางจุลชีววิทยาระดับปริญญาตรีของนางสาวกุลวดี พิมพ์นวลศรี นางสาวกนิษฐา ตั้งซั่ว นางสาวอพิชญา ปัญญา และนางสาวเบญญพร พัฒน์เจริญ ข้าพเจ้าและคณะทำงาน ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ

สิงหาคม 2553

# บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีแช่เย็น โดยทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกทำการศึกษาถึงสูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น จากการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาแบบแช่เย็นในน้ำยา Ringer's solution ในอัตราส่วน 1:1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 7 วัน รองลงมาคือ น้ำยาสูตร Marine solution และ Modified Ca Free HBSS ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5 วัน ในขั้นตอนที่ 2 ทำการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ของน้ำเชื้อแช่เย็น โดยพบว่าน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่เย็นในน้ำยา Ringer's solution เป็นระยะเวลา 2 วัน มีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิกับไข่และมีค่าอัตราการฟักเท่ากับ 66.1 ± 6.2 และ 56.4 ± 2.9% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับน้ำเชื้อสดที่มีค่าเท่ากับ 75.1 ± 5.8 และ 68.6 ± 4.9% ตามลำดับ ต่อมาในขั้นตอนที่ 3 ได้ศึกษาผลของยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin (PS) ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% (v/v) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น พบว่าการเติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% (v/v) มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นมากที่สุด เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานถึง 9 วัน โดยเปอร์เซ็นต์สเปร์มที่มีชีวิต (37.17 ± 2.04%) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (15.00 ± 10.00%) มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งการเติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% (v/v) สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปเหลือ $2.32 \pm 0.04 \times 10^3$ CFU/mL ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุม ($3.90 \pm 0.03 \times 10^3$ CFU/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ณ วันสุดท้ายของการทดลอง และในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน เหง้ากระชายดำ เหง้าไพล ใบฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร ใบมะรุม เหง้าขมิ้นเครือ ต้นใต้ใบ เหง้ากระชายและผลมะระขี้นก ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวจากการศึกษาพบว่าการใช้สารสกัดเหง้าไพล เหง้ากระชายดำ ใบมะรุมและใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น เนื่องจากสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปร์มที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่นและใกล้เคียงกับการใช้ยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% (v/v) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นด้วย Ringer's solution ร่วมกับการเติมยาปฏิชีวนะ PS 0.1% (v/v) หรือการเติมสารสกัดเหง้าไพล เหง้ากระชายดำ ใบมะรุมและใบฝรั่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถในการแข่งขันในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทยให้มีคุณภาพสูงและยั่งยืนต่อไป

**คำสำคัญ:** ปลากะพงขาว; การแช่เย็น; น้ำเชื้อ; ยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin; สารสกัดสมุนไพร

## Abstract

This objective of this research was to develop the protocol for chilled storage of seabass (*Lates calcarifer*) milt. The experiment was classified into 4 phases. In the first phase, the selection of suitable extender for chilling of seabass milt was examined. Ringer's solution at ratio of 1:1 was the most appropriate extender that prolonged the preservation period for 7 days, followed by Marine solution and Modified Ca Free HBSS for 5 days. In the second phase, the abilities of fertilization and hatching of seabass milt preserved in Ringer's solution under chilled storage were investigated. Fertilization and hatching rates of seabass milt with chilled storage for 2 days were 66.1 ± 6.2 and 56.4 ± 2.9%, respectively, which were not significantly different ($P > 0.05$), compared to those of fresh milt (75.1 ± 5.8 and 68.6 ± 4.9%, respectively). In the third phase, effect of Penicillin-Streptomycin (PS) at concentration of 0.1, 1.0 and 2.0% (v/v) on chilled storage of seabass milt was studied. Application of PS at 0.1% (v/v) was the most suitable technique because it was capable for extension of chilled period for 9 days with percentages of sperm viability and motility for 37.17 ± 2.04% and 15.00 ± 10.00%, respectively, which were significantly greater than those of other treatments. Moreover, decrease in number of total heterotrophic bacteria was observed in chilled milt added with 0.1% (v/v) PS at the end of experiment with $2.32 \pm 0.04 \times 10^3$ CFU/mL, that was significant difference ($P < 0.05$) with control ($3.90 \pm 0.03 \times 10^3$ CFU/mL). In the final phase, application of Thai medicinal herb extracts (*Curcuma longa* L., *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker, *Zingiber cassumunar* Roxb., *Psidium guajava* Linn., *Androqraphis paniculata* Wall ex Ness, *Moringa oleifera* Lam., *Curcuma zedoaria* (Berg) Roscoe, *Phyllanthus niruri* L., *Globba laeta* K. Larsen and *Momordica charantia* L.) was examined for determination of their effectiveness and toxicity on chilled milt of seabass (*Lates calcarifer*). The medicinal extracts of *Z. cassumunar* Roxb., *K. parviflora* Wall. Ex Baker, *M. oleifera* Lam. and *P. guajava* Linn. presented the most effective for chilled storage based on percentages of sperm viability and motility which were higher than those in other treatments and were similar to those with application of 0.1% (v/v) PS. As a consequence, chilled storage of seabass milt in Ringer's solution with combination of either 0.1% (v/v) PS or extracts of *Z. cassumunar* Roxb., *K. parviflora* Wall. Ex Baker, *M. oleifera* Lam. and *P. guajava* Linn. was the adequately effective technology for chilled storage of seabass (*Lates calcarifer*) milt that can support the sustainable efficacy and ability in trade competition of Thai important economic aquaculture.

**Keywords:** *Lates calcarifer*; Chilled storage; Milt; Penicillin-Streptomycin; Herb extract

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | I |
| บทคัดย่อ | II |
| Abstract | III |
| สารบัญ | IV |
| สารบัญตาราง | V |
| สารบัญภาพ | VII |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ | 1 |
| 2 เอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 6 |
| 3 วัสดุและอุปกรณ์ | 17 |
| 4 วิธีดำเนินการทดลอง | 20 |
| 5 ผลการทดลอง | 28 |
| 6 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง | 55 |
| เอกสารอ้างอิง | 65 |
| Output จากโครงการวิจัย | 71 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ปริมาตรน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์สเปอร์มาโตคริท และพิสัยความหนาแน่นของสเปิร์มในปลาบางชนิด | 9 |
| 2 | ความเข้มข้นของสารอินทรีย์บางชนิดในของเหลวในน้ำเชื้อปลาบางชนิด | 10 |
| 3 | คุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ใช้ในการศึกษา | 29 |
| 4 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวหลังจากแช่เย็นในภาชนะรูปแบบต่าง ๆ กันเมื่อให้หรือไม่ให้ออกซิเจนสมทบ | 30 |
| 5 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่กระตุ้นด้วยสารละลาย NaCl และ KCl ที่มีความเข้มข้นต่างกัน | 32 |
| 6 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่กระตุ้นด้วยสารละลาย Glucose และ Mannitol ที่มีความเข้มข้นต่างกัน | 33 |
| 7 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน | 34 |
| 8 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส | 36 |
| 9 | เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส | 38 |
| 10 | เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บในน้ำยา Ringer's solution และเติมยาปฏิชีวนะ | 40 |
| 11 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บในน้ำยา Ringer's solution และเติมยาปฏิชีวนะ | 41 |
| 12 | ผลของยาปฏิชีวนะ PS ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด | 42 |
| 13 | ผลของยาปฏิชีวนะ PS ต่อชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปที่แยกจากน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่เย็น | 44 |
| 14 | ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บแช่เย็นที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของไข่ปลากะพงขาว | 45 |

# สารบัญตาราง (ต่อ)


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 15 | ผลของสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาว | 47 |
| 16 | ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว | 49 |
| 17 | ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวในการทดลองภายใต้สภาวะต่าง ๆ | 51 |
| 18 | แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวในการทดลองภายใต้สภาวะต่าง ๆ | 53 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | รูปร่างของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)..... | 7 |
| 2 | ลักษณะของสเปิร์มปลา..... | 11 |

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นปลาทะเลชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นอาหารทะเลที่มีโปรตีนสูง ไขมันต่ำ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ ในปัจจุบันความต้องการทางการตลาดค่อนข้างสูง เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ทำให้ปลากะพงขาวมีราคาสูง ส่งผลให้เกษตรกรนิยมเลี้ยงเพื่อจำหน่ายอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะบริเวณชายฝั่งทะเล ปลากะพงขาวเป็นขนาดใหญ่ที่ยังสามารถปรับตัวให้สามารถอาศัยอยู่ได้ดีทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย จึงได้รับความนิยมเลี้ยงในเขตจังหวัดที่ติดทะเลของประเทศไทยรวมทั้งบริเวณน้ำจืดในหลายพื้นที่

การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้วิธีเพาะพันธุ์ปลาแบบธรรมชาติที่ปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ผสมพันธุ์วางไข่ในบ่อ ทำให้ได้ลูกพันธุ์ปลามาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว อย่างไรก็ตามการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวโดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นแล้วรีดน้ำเชื้อผสมกับไข่ แล้วนำไข่ไปฟักและอนุบาลต่อไปก็เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในต่างประเทศ โดยเฉพาะเมื่อต้องการผสมเทียมพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาจากต่างถิ่นหรือเป็นสายพันธุ์ที่ต่างกัน ซึ่งการผสมเทียมปลากะพงขาวแม้ว่าจะมีความยุ่งยากในการผสมเทียมในการแยกเพศปลาแต่มีประโยชน์ในการควบคุมผลผลิตที่สามารถวางแผนการผลิตได้ล่วงหน้า ด้วยเหตุที่พ่อพันธุ์ปลากะพงขาวมักมีน้ำเชื้อปริมาณน้อย ทำให้ต้องใช้พ่อพันธุ์หลายตัว โดยต้องจับพ่อพันธุ์ปลาขนาดใหญ่เหล่านี้ออกจากบ่อเพื่อมารีดน้ำเชื้อแล้วนำมาผสมกับไข่ ซึ่งนอกจากจะทำให้พ่อพันธุ์ปลาเครียดแล้ว ยังทำให้การจัดการภายในฟาร์มระหว่างการเพาะพันธุ์มีความยากลำบาก เพราะต้องเสียเวลามากในการรีดน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณมาก ในขณะที่แม่พันธุ์แต่ละตัวมีการตกไข่ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน จึงต้องจับพ่อพันธุ์หลายครั้งหลายตัวเพื่อรีดน้ำเชื้อหลายครั้ง ซึ่งการจับปลากะพงขาวขนาดใหญ่อยู่บ่อยครั้งเหล่านี้ โดยเฉพาะพ่อพันธุ์ อาจทำให้พ่อพันธุ์ติดเชื้อและมีปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้ (Expressible milt) ลดลงอันเป็นผลจากความเครียด และส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาและรักษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิกับไข่ สามารถเก็บได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น (Short-term storage) โดยเก็บรักษาในถังน้ำแข็งหรือตู้เย็นที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย (2-4 องศาเซลเซียส) ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (Long-term storage) โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นปี ข้อดีของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ คือ ทำให้ง่ายแก่การจัดการขณะผสมไข่กับน้ำเชื้อในระหว่างการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งสามารถนำมาใช้ได้ทันที ทำให้การผสมเทียมทำได้

สะดวกและรวดเร็วขึ้นโดยเฉพาะในกรณีที่แม่พันธุ์ตกไข่ไม่พร้อมกันก็สามารถนำน้ำเชื้อมาผสมกับไข่ได้ทันที นอกจากนี้พ่อพันธุ์ก็ไม่จำเป็นที่จะต้องเก็บไว้ในโรงเพาะฟักเช่นเดียวกับแม่พันธุ์ขณะผสมเทียม เนื่องจากน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นสามารถเก็บไว้ได้เป็น Stock อีกทั้งการลำเลียงน้ำเชื้อแช่เย็นก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการผสมเทียมปลาหลาย ๆ ชนิด เพราะใช้เทคโนโลยีที่มีราคาถูก ไม่สลับซับซ้อน สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้เกษตรกรหรือผู้ประกอบการได้ทันที และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาได้ทันทีเพียงแต่ว่าในขั้นตอนการทดลองต้องมีการพัฒนา Protocol ให้เหมาะสมก่อนการนำไปใช้

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำเป็นแนวทางหนึ่งในการยืดระยะเวลาการเก็บที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Undiluted milt or freshly collected milt) และการเก็บน้ำเชื้อโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Diluted milt) อย่างไรก็ตามการนำน้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ ๆ หรือน้ำเชื้อสด (Freshly collected milt or undiluted milt) ออกจากพ่อพันธุ์เพื่อผสมเทียมกับไข่ต้องนำน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่ปลาทันทีหรืออย่างมากไม่เกิน 10 นาที หลังจากการรีดน้ำเชื้อออกจากพ่อพันธุ์ไปเก็บในตู้เย็นต้องนำน้ำเชื้อนั้นมาผสมเทียมกับไข่ทันที เพราะว่าถ้าปล่อยน้ำเชื้อในตู้เย็นไว้นานเกินไปจะไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ (Billard, 1988) ซึ่งการเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์และแช่เย็นในลักษณะเช่นนี้จะเก็บน้ำเชื้อไว้ได้ในระยะเวลาที่สั้นมาก ทำให้ได้มีการพัฒนาวิธีการแช่เย็นน้ำเชื้อ โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (Sperm extender) เพื่อให้ได้เป็น Diluted milt ที่อยู่ใน Tissue culture flask แล้วนำไปแช่เย็นในตู้เย็น หรือตู้แช่ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ระหว่าง 2-4 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานหลายสัปดาห์ หรืออาจเก็บได้นานถึง 2-3 เดือน ขึ้นอยู่กับการพัฒนา Protocol ที่เหมาะสม (Rana, 1995) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในลักษณะที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Diluted milt) จึงมีความเหมาะสมอย่างมากในการนำมาใช้กับการผลิตลูกปลาเชิงการค้า เพราะในระหว่างที่รีดไข่ตัวเมีย ก็เปิด Tissue culture flask แล้วเทผสมกับไข่ทันที ทำให้เพาะพันธุ์ปลาได้รวดเร็ว สะดวก ลดการใช้แรงงานจำนวนมาก และจัดการฟาร์มสะดวกขึ้น ซึ่งวิธีการปฏิบัติเช่นนี้มีการนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดแบบเชิงการค้าในต่างประเทศ เช่น Atlantic halibut (Babiak et al., 2006), Paddle fish (Brown and Mims, 1995) และ Striped bass (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) เป็นต้น

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นมีการศึกษาในประเทศไทยน้อยมาก แต่ในต่างประเทศมีการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเล อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Diluted milt) ได้นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับเทคนิคการเก็บรักษา ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และชนิดของปลา ซึ่งอาจจะเก็บได้

ตั้งแต่ 1-3 ชั่วโมง จนถึง 1-2 เดือน (Scott and Baynes, 1980) สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่ไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Undiluted milt) เท่าที่รายงานมา ได้แก่ การให้ออกซิเจนสมทบ (Stoss et al., 1987) และลักษณะของภาชนะที่เก็บน้ำเชื้อ เช่น ภาชนะที่บรรจุน้ำเชื้อควรมีลักษณะที่เป็นภาชนะทรงตื้น มีฝาปิดและมีออกซิเจนเพียงต่อสเปิร์มขณะทำการเก็บรักษา เนื่องจากเซลล์สเปิร์มที่อยู่ข้างล่างไม่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ จึงต้องทำการเขย่าเบาๆ ทุกวัน (Wayman and Tiersch, 2000) ส่วนการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จะมีความยุ่งยากกว่ามากเพราะจำเป็นต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ระหว่างการเก็บแช่เย็น แต่การเก็บแช่เย็นโดยวิธีนี้ก็สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่อาจเกิดขึ้นในน้ำเชื้อระหว่างการแช่เย็นได้ดีกว่า การเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Stoss, 1983)

โดยทั่วไปน้ำเชื้อของปลา (Milt) ประกอบด้วยสเปิร์ม (Sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (Seminal fluid) โดยที่สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอัณฑะหรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และสเปิร์มปลาน้ำจืดจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีเท่านั้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วยน้ำจืด ในขณะที่น้ำเชื้อปลาทะเลจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 15 นาทีถึง 1 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า Osmolarity ต่ำกว่า (Hypotonicity) ระดับที่พบใน Seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า Osmolarlity สูงขึ้น (Hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa et al., 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ทำให้คุณภาพสเปิร์มคงที่และเก็บรักษาได้นานขึ้น ซึ่งน้ำเชื้อที่เก็บรักษาอย่างเหมาะสมแล้วนี้สามารถนำมาผสมเทียมกับไข่ โดยที่สเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำเท่านั้นในระหว่างการผสมเทียมทำให้สามารถปฏิสนธิไข่ได้

อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดในระหว่างเก็บเซลล์สเปิร์มแบบแช่เย็นคือการเจริญของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อ เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวตัวปลาขณะรีดน้ำเชื้อ ทำให้น้ำเชื้อแช่เย็นเก็บรักษาได้ไม่นาน ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นจึงต้องควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญในระหว่างเก็บน้ำเชื้อแช่เย็น จึงต้องมีการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียขณะแช่เย็นน้ำเชื้อด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งจำเป็นที่ต้องพัฒนาเทคโนโลยีควบคู่กับการพัฒนา Protocols แช่เย็นน้ำเชื้อปลา อย่างไรก็ตามแม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียจะได้ผล แต่การใช้สมุนไพรในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก็ได้มีรายงานศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสมุนไพรในการควบคุมแบคทีเรีย ด้วยเหตุที่ยังไม่มีรายงานการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวในประเทศไทยมาก่อน และมีความจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวขึ้นมาเพื่อนำมาใช้ใน

การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ให้ดีขึ้น และสะดวกต่อการประยุกต์ใช้อย่างง่าย ๆ แต่มีผลทำให้การเพาะพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงจำเป็นที่ต้องมีการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวเพื่อประโยชน์ของการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

**2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

6.1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำ (2-4 องศาเซลเซียส) ในสภาพที่ไม่เจือจางและเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

6.2 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้แช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารสกัดสมุนไพรในการแช่เย็นน้ำเชื้อ

6.3 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลากะพงขาวขณะเก็บแช่เย็น และการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียขณะเก็บรักษา

6.4 พัฒนาเทคโนโลยีของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นเพื่อการผสมเทียมปลา

**3. ขอบเขตของโครงการวิจัย**

พัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำ (2-4 องศาเซลเซียส) ในสภาพที่ไม่เจือจางและเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เพื่อให้ทราบถึงแนวทางที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสเปิร์มแช่เย็นและปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาสเปิร์มแช่เย็น โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและอัตราปฏิสนธิของไข่ รวมทั้งประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เจริญในน้ำเชื้อขณะแช่เย็น รวมทั้งการควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญ โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคที่อาจเพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เพื่อให้สามารถพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อไป ในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรที่หาได้ในภาคตะวันออกในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะในการการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อ

**4. ประโยชน์ที่ได้รับ**

4.1 ทราบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ใช้การเพาะขยายพันธุ์ปลากะพงขาวได้โดยตรง ทำให้การจัดการฟาร์มและการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพดีขึ้น และยังเป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยเก็บน้ำเชื้อปลาทะเลแบบแช่เย็นชนิดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

4.2 ทำให้ทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อและควบคุมปริมาณแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น ซึ่งสามารถที่จะแนะนำและส่งเสริมการใช้ยาปฏิชีวนะให้แก่ผู้ที่สนใจและเกษตรกรในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อไป

4.3 ได้พัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นเพื่อการผสมเทียมปลากะพงขาว โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมต่อไป ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลาได้ต่อไปด้วยการจัดการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยี

# บทที่ 2
# เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

1. ปลากะพงขาว
2. น้ำเชื้อปลา
3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

## 1. ปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ในภูมิภาคเขตอบอุ่นถึงเขตร้อนตั้งแต่ตอนใต้ของประเทศจีนถึงอ่าวเปอร์เซีย และหมู่เกาะต่าง ๆ ของประเทศฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ปาปัวนิวกินี อินโดนีเซียและศรีลังกา ในประเทศไทยพบปลากะพงขาวอาศัยอยู่ทั่วไปตามปากแม่น้ำ ลำคลองที่ไหลสู่ทะเล ปลาชนิดนี้เป็นปลาที่สามารถปรับตัวเข้ากับความเค็มของน้ำได้เป็นช่วงกว้างตั้งแต่น้ำจืดถึงน้ำทะเล (อุธร ฤทธิลึก, 2550) และได้มีการจัดอนุกรมวิธานของปลากะพงขาวดังนี้

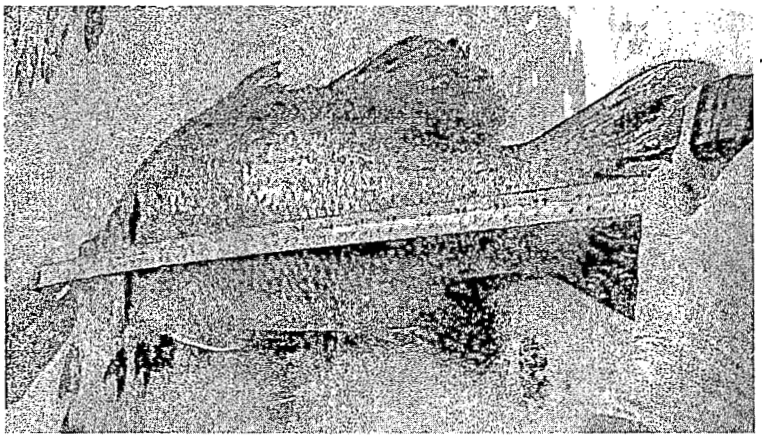
**1.1 อนุกรมวิธาน** (สโมสรนิสิตคณะประมง, 2531)

| | |
|---|---|
| Kingdom | Animalia |
| Phylum | Chordata |
| Class | Teleostomi |
| Order | Percomorphi |
| Family | Centropomidae |
| Genus | *Lates* |
| Species | *Calcarifer* |

**1.2 ลักษณะทั่วไป**

ลักษณะภายนอกของปลากะพงขาวมีลำตัวป้อม แบนข้างเล็กน้อย (ดังภาพที่ 1) ส่วนลึกของลำตัวกว้างพอประมาณ แนวของหลังโค้งและมีส่วนลาดที่บริเวณหัวตั้งแต่ไหลถึงปลายจะงอยปาก ขอบปากเป็นแผ่นใหญ่แยกแนวเป็นตอนต้นและตอนท้ายชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ร่องปากเฉียงลงเล็กน้อย มุมปากยาวเลยลูกตา ปลายปากล่างยื่นยาวเลยปลายปากบนเล็กน้อย มีฟันละเอียดแหลมคมอยู่บนขากรรไกรและเพดานปาก ตาของปลาชนิดนี้มีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม แผ่นแก้มขนาดใหญ่ มีขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่และเรียงต่อกันด้วยซี่เล็ก ๆ ครีบหลังมี 2 อัน

แต่ฐานครีบทั้ง 2 เชื่อมต่อกัน ครีบหลังอันที่หนึ่งมีก้านครีบแข็ง 7-8 อัน ครีบหลังอันที่สองมีก้านครีบอ่อน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน ข้อหางสั้น ครีบหางกลม สีของลำตัว แตกต่างกันตามที่อยู่อาศัย ปลากะพงขาวที่อาศัยในทะเลหรือน้ำกร่อยลำตัวด้านหลังมีสีฟ้าอมเขียว ลำตัวด้านข้างและท้องมีสีเงิน ครีบหลังครึ่งบนมีสีเหลือง ครึ่งล่างมีสีดำ ครีบอื่นมีสีเหลือง ปลากะพงขาวที่อาศัยในน้ำจืดลำตัวด้านข้างถึงท้องมีสีขาวเงิน ครีบหางมีสีดำ ธรรมชาติของปลากะพงขาว เป็นปลามีนิสัยปราดเปรียว ว่องไว ว่ายน้ำได้รวดเร็วในระยะทางสั้น ๆ สามารถกระโดดพ้นน้ำสูงขณะตกใจหรือล่าเหยื่อ แต่ปกติมักอืดอาด เชื่องช้า ชอบนอนพักตามซุ้มและเคล้าคลอตามหลักหรือหินใต้น้ำ อาหารของปลากะพงขาวตามธรรมชาติเป็นเหยื่อที่มีชีวิต เช่น ปลาขนาดเล็ก กุ้ง ปู เมื่อเล็กจะมีนิสัยดุร้าย รวมฝูงล่าเหยื่อ นิสัยนี้จะเปลี่ยนแปลงเมื่อปลาโตขึ้น (สโมสรนิสิตคณะประมง, 2531; อุธร ฤทธิลึก, 2550)



**ภาพที่ 1** รูปร่างของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)
(ภาพโดย: เบญญพร พัฒน์เจริญ)

**1.3 แหล่งอาศัย**

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ที่สุด เจริญเติบโตได้ดีในน้ำกร่อยและน้ำจืด จัดได้ว่าเป็นปลาประเภทสองน้ำ คือในช่วงชีวิตของปลากะพงขาวจะมีการเคลื่อนย้ายไปมา ระหว่างแหล่งน้ำจืดน้ำเค็ม ปลากะพงขาวขนาดใหญ่จะอาศัยอยู่ในแหล่งที่ไม่ห่างไกลออกไปจากฝั่งมากนัก พบมากตามบริเวณปากแม่น้ำลำคลอง ปากทะเลสาบและปากอ่าวบริเวณที่เป็นป่าชายเลนที่มีน้ำเค็มท่วมถึง โดยจะพบอยู่ทั่ว ๆ ไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ประเทศพม่า ไทย เวียดนามและแถบชายฝั่งทะเลของจีนก็พบปลาชนิดนี้เช่นเดียวกัน สำหรับประเทศไทยนั้นสามารถพบปลากะพงขาวตามชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะบริเวณปากแม่น้ำใหญ่ ๆ ที่มีทางออกติดต่อกับทะเลที่มีป่าชายเลนขึ้นปกคลุม ทางจังหวัดตราด จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรสงคราม ฯลฯ (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2541)

**1.4 ลักษณะเพศ**

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่สังเกตแยกเพศได้ยาก แต่ก็สามารถสังเกตเพศได้จากลักษณะภายนอกของตัวปลา โดยเฉพาะปลาเพศผู้จะมีลำตัวยาวเรียวกว่าปลาเพศเมีย ลำตัวบางกว่าปลาเพศเมียและจะมีน้ำหนักน้อยกว่าปลาเพศเมียที่มีขนาดลำตัวยาวเท่ากัน ในปลาเพศเมียนั้นเมื่อถึงฤดูวางไข่ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกันยายน ส่วนท้องจะอวบเป่ง สังเกตได้ชัดเจน เมื่อเวลาเอามือคลำที่ท้องจะมีไข่ไหลออกมา (สโมสรนิสิตคณะประมง, 2531)

**1.5 การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว**

การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวในปัจจุบันมีวิธีการเพาะพันธุ์ปลา 2 วิธีด้วยกัน กล่าวคือ

1) การเพาะพันธุ์ปลาโดยวิธีผสมเทียม ในการเพาะพันธุ์ปลาโดยวิธีดังกล่าวนี้ ผู้ทำการเพาะพันธุ์จะรวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งวางไข่ที่มีไข่แก่และน้ำเชื้อดีมาทำการรีดไข่ แล้วรีดน้ำเชื้อผสมกัน แล้วนำไปเพาะฟักอีกครั้งหนึ่ง

2) การเพาะพันธุ์ปลาโดยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ การเพาะพันธุ์ปลาด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมกันในปัจจุบัน ผู้เพาะพันธุ์ปลาจะต้องรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งต่าง ๆ คัดเลือกปลาที่มีลักษณะเหมาะสม นำมาเลี้ยงไว้เพื่อให้มีไข่แก่และน้ำเชื้อดี สามารถทำได้ 2 วิธี คือการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นและไม่ฉีดฮอร์โมนกระตุ้น หลังจากนั้นก็ปล่อยพ่อแม่พันธุ์วางไข่ในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ แล้วช้อนไข่นำไปฟักต่ออีกครั้ง (สโมสรนิสิตคณะประมง, 2531)

**2. น้ำเชื้อปลา**

น้ำเชื้อปลามีชื่อที่ใช้เรียกเหมือนน้ำเชื้อสัตว์ตัวผู้ทั่วไปคือคำว่า "ซีเมน" (Semen) และคำว่า "มิลท์" (Milt) ซึ่งใช้เรียกน้ำเชื้อของปลาโดยเฉพาะ โดยน้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอัณฑะหรือที่รีดออกมาสด ๆ และสะอาดจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาวจัด ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อออกมา โดยควรสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตรและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ซึ่งน้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวและไม่ควรมีสีอื่นเจือปน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535) น้ำเชื้อที่หลั่งออกมาระหว่างการผสมพันธุ์นั้นอาจจะประมาณปริมาตรต่อการหลั่งแต่ละครั้งได้โดยการใช้มือกดรีดที่ผนังท้องของปลา และใช้หลอดทดสอบที่มีปริมาตรบอกความจุ เช่น Graduate centrifuge tube เป็นอุปกรณ์สำหรับตวงวัดปริมาตรได้ และยังสะดวกเมื่อต้องการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาใดก็ทำได้ในอัตราส่วนที่ต้องการ เพราะน้ำเชื้อสดบรรจุอยู่ในหลอดที่มีปริมาตรบอกความจุไว้แล้ว อย่างไรก็ตามหากเป็นปลาขนาดใหญ่ เช่น ปลาบึก สามารถรีดน้ำเชื้อได้ปริมาณมากหลายร้อยมิลลิลิตร จึงควรใช้ภาชนะขนาดใหญ่ เช่น บีกเกอร์ที่มีปริมาตรบอกความจุ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำเชื้อที่ติดค้างอยู่ในภาชนะ เมื่อมีการถ่ายน้ำเชื้อจากภาชนะหนึ่งไปสู่อีกภาชนะหนึ่ง

ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาและความหนาแน่นของสเปิร์มในน้ำเชื้อนั้นจะมีความผันแปรไปตามชนิดของปลา ดังตารางที่ 1 ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากความแตกต่างของพฤติกรรมและแหล่งน้ำที่ใช้ในการผสมพันธุ์และวางไข่ต่อปริมาตรของน้ำเชื้อ และความหนาแน่นของสเปิร์มของปลาตัวเดียวกันหรือชนิดเดียวกันอาจแตกต่างกันได้ตามฤดูกาลและช่วงเวลาในการผสมพันธุ์ ตัวอย่างเช่นปลาเทราท์สายรุ้ง น้ำเชื้อจะมีสเปอร์มาโตคริท (Spermatocrit) และความหนาแน่นตัวสเปิร์มสูงเพิ่มขึ้นในระยะต้นของฤดูผสมพันธุ์และคงที่ในระยะเวลาต่อมา (วิศว วิชิตวรคุณ, 2543)

**ตารางที่ 1** ปริมาตรน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์สเปอร์มาโตคริท และพิสัยความหนาแน่นของสเปิร์มในปลาบางชนิด (วิศว วิชิตวรคุณ, 2543)

| ชนิดปลา | ปริมาตร (มิลลิลิตร) | Spermatocrit | ความหนาแน่นสเปิร์ม ($\times 10^9$ ตัว/มิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|
| ปลาเทราท์สายรุ้ง | - | 6.2 - 41.0 | 4.8 - 25.4 |
| ปลาเพิร์ช | 0.5 - 1.5 | 29.8 - 94.8 | 37.0 - 127.4 |
| ปลาเทราท์สีน้ำตาล | - | 12.5 - 64.1 | 5.0 - 25.7 |
| ปลาแซลมอน | 3.5 - 20 | 10.2 - 32.8 | 4.9 - 15.4 |
| ปลาเนื้อขาว | - | 10.2 - 32.8 | 3.0 - 16.3 |
| ปลาเทอเบิท | 0.5 - 1.5 | 35.9 - 90.6 | 23.3 - 59.3 |

ข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องน้ำเชื้อปลานี้ มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการคิดค้นพัฒนาสูตรน้ำยาสำหรับเก็บรักษาตัวสเปิร์มปลาไว้เพื่อการขยายพันธุ์ปลา เพราะองค์ประกอบทางเคมีของของเหลวในน้ำเชื้อปลาย่อมมีความแตกต่างกันไปตามกลุ่มหรือชนิดของปลา ดังนั้นการเตรียมน้ำยาที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่มต้องใช้สารเคมีที่เมื่อละลายน้ำเชื้อแล้วให้อิออนชนิดที่เหมาะสม และน้ำยานั้นควรจะมีออสโมลาลิตี (Osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนที่หรือการใช้พลังงานของตัวสเปิร์ม ตลอดจนการรักษาให้ตัวสเปิร์มคงรูป และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษาไว้เพื่อการเพาะขยายพันธุ์และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) จึงได้มีการแสดงส่วนประกอบของสารอินทรีย์บางชนิดไว้ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ความเข้มข้นของสารอินทรีย์บางชนิดในของเหลวในน้ำเชื้อปลาบางชนิด (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

| ชนิดปลา | ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | กลูโคส | ฟรุคโตส | กรดซิตริก | กลีเซอรอล | ไขมัน |
| ปลาเทราท์สายรุ้ง | 2.4-22.2 | 0-0.8 | 4.4-93.7 | 0.3-3 | 3.4-37.3 |
| ปลาเพิร์ช | 0.6-15.7 | 0-1.2 | 16.8-46.6 | 1.0-6.3 | 55.8-148.8 |
| ปลาเทราท์สีน้ำตาล | 0-25.7 | 0-0.6 | 5.0-25.0 | 0.4-4.4 | 27.1-82.5 |
| ปลาแซลมอน | 7.2-39.3 | 0-1.2 | 0.9-12.8 | 0.6-2.7 | 28.6-40.7 |
| ปลาเนื้อขาว | 0.7-21.8 | 0-0.1 | 5.0-33.6 | 3.5-39.1 | - |
| ปลาเทอเบิท | 1.9-7.8 | 0.4-1.4 | 20.4-56.7 | 2.6-4.5 | 45.6-616 |

จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่วัดได้มีความแปรปรวนสูง และยากที่จะอธิบายถึงสาเหตุได้ ยิ่งไปกว่านั้นความสำคัญหรือหน้าที่ของสารอินทรีย์เหล่านี้ในน้ำเชื้อปลาไม่สามารถบอกได้แน่ชัด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นที่ทราบกันดีว่าสารอินทรีย์เช่นน้ำตาลนั้นตัวสเปิร์มจะใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่ในปลาไม่น่าจะมีการใช้พลังงานจากนอกเซลล์ภายหลังเมื่อถูกขับออกจากร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ เพราะจะถูกเจือจางและมีอายุอยู่ได้ไม่นานเกิน 1 นาที ซึ่งตัวสเปิร์มปลาขณะที่มีการเคลื่อนที่คงใช้แต่พลังงานที่สะสมไว้ในเซลล์เท่านั้น ดังนั้นสารอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส คงสะท้อนให้เห็นการใช้พลังงานของอัณฑะปลาเท่านั้น อย่างไรก็ตามกรดซิตริกอาจมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์มปลา เพราะสามารถจับ (Binding) กับอิออนต่าง ๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียมและโพแทสเซียม ความสมดุลของอิออนต่าง ๆ เหล่านี้ช่วยป้องกันไม่ให้ตัวสเปิร์มมีการเคลื่อนที่จนกว่าจะถูกขับออกมานอกร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

### 2.1 ตัวสเปิร์มปลา

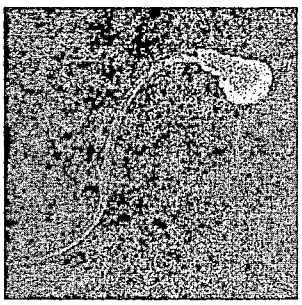
เชื้อตัวผู้ของปลาต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ เพราะไม่มีส่วนอะโครโซม (Acrosome) ทั้งนี้เพราะไข่ปลามีไมโครไพล์ (Micropile) ซึ่งเป็นทางผ่านของเชื้อตัวผู้อยู่แล้ว อะโครโซมจึงไม่จำเป็นสำหรับปลา โดยเชื้อตัวผู้ของปลามีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วนคือ

1) ส่วนหัว คือส่วนของนิวเคลียส ซึ่งมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด นิวเคลียสนี้มีไซโตพลาซึมหุ้มอยู่เพียงบาง ๆ โดยรูปร่างลักษณะและขนาดของส่วนหัวนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา

2) ส่วนกลางหรือมิดพีซ (Mid Piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากหัวและมีรูปร่างต่าง ๆ กันไปตามชนิดของปลา ลักษณะโดยทั่วไปประกอบด้วยส่วนไมโครทุบูล (Microtubule) ซึ่งเป็นแกนกลางของ

ส่วนหาง ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมซึ่งภายในมีไมโตรคอนเดรีย (Mitochondria) และเซ็นตริโอล (Centriole)

3) ส่วนหาง ประกอบด้วยไมโครทูบุลที่เรียงกันเป็นวงรอบ ๆ แกนกลาง 1 คู่ และเรียงเป็นวงรอบแกนกลางอีก 9 คู่ ซึ่งลักษณะเช่นนี้เองที่ทำให้ส่วนหางสามารถเคลื่อนที่ได้ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) ดังภาพที่ 2



**ภาพที่ 2** ลักษณะของสเปิร์มปลา
(สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2551)

เซลล์สเปิร์มจะมีขนาดเล็กมากและมีอายุขัยแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา ซึ่งถ้าเปรียบเทียบอายุขัยของสเปิร์ม ในปลาชนิดเดียวกันแล้วจะขึ้นกับสารละลายบัฟเฟอร์หรือสิ่งแวดล้อมที่ปลาอยู่ เช่น ถ้าอยู่ในน้ำธรรมดาจะมีอายุขัยน้อยกว่าในน้ำเค็มที่มีปริมาณพอเหมาะ และจะมีอายุขัยนานที่สุดถ้าอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย และเมื่อคำนึงถึงอุณหภูมิแล้วจะพบว่าสเปิร์มสามารถอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งจากการทดลองในปลาเศรษฐกิจหลายชนิดพบว่าสามารถเก็บสเปิร์มที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 1-5 องศาเซลเซียสได้นาน 1-2 วัน โดยไม่มีการเสียคุณสมบัติแต่อย่างใด (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2542)

**2.2 การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อปลา**

สเปิร์มที่ถูกสร้างขึ้นจะยังไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในเซมินอล ฟลูอิด (Seminal fluid) แต่จะเคลื่อนที่แบบปราดเปรียว (Swim energetically) เมื่ออยู่ในน้ำ โดยจะมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (สุณีย์ ดวงใหญ่, 2545)

สเปิร์มของปลาสามารถเคลื่อนที่ได้นานแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา และสภาพแวดล้อม เช่น สเปิร์มปลาน้ำกร่อยและปลาทะเลมักจะเคลื่อนที่ได้นานกว่าสเปิร์มปลาน้ำจืดหรือโดยทั่วไปสเปิร์มที่อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายภายในตัวก็มีชีวิตนานกว่า อุณหภูมิน้ำมีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เพราะถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้สเปิร์มมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (Total motile period) ในน้ำน้อยกว่าอุณหภูมิต่ำกว่า นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมี

ระยะเวลาจำกัด เช่น ปลาน้ำจืดส่วนมากจะเคลื่อนที่ได้นานประมาณ 2-3 นาที โดยจะว่ายน้ำปราดเปรียวในระยะแรกและจะค่อย ๆ ว่ายน้ำช้าลงจนหยุดการเคลื่อนที่ ซึ่งในช่วงดังกล่าวถ้าสเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ก็ทำให้สเปิร์มตาย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาสามารถบอกความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำมาเพาะพันธุ์ได้ดี โดยวิธีประเมินมี 3 วิธีดังนี้

1) ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อออกมา โดยสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตรและสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและไม่ควรมีสารอื่นเจือปน

2) การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถพิจารณาได้จากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ทำโดยสุ่มนับสเปิร์มในกล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 0-5 ดังนี้

0 = ไม่มีการเคลื่อนที่

1 = (Poor) มีการเคลื่อนที่น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์และเคลื่อนที่ช้า

2 = (Fair) สเปิร์ม 20-30 เปอร์เซ็นต์ เคลื่อนที่แข็งแรงแต่ไม่สังเกตเห็นคลื่น

3 = (Good) สเปิร์ม 50-70 เปอร์เซ็นต์ เคลื่อนที่แข็งแรงและสังเกตเห็นคลื่นชัด

4 = (Very good) สเปิร์ม 70-80 เปอร์เซ็นต์ เคลื่อนที่แข็งแรงและมีคลื่นให้เห็นน้อยกว่า 5

5 = (Excellent) สเปิร์ม 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเคลื่อนที่รวดเร็วและมีคลื่นรวมชัดเจน

การประเมินแบบนี้ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ (จุฑามาศ พบสุข, 2546) ซึ่งการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้เป็นวิธีที่ได้ผลเร็ว แต่ผลที่ได้ไม่แน่นอนและยังมีปัญหาว่าสเปิร์มที่ไม่เคลื่อนที่เป็นเชื้อที่ตายแล้วจริงหรือไม่ ส่วนใหญ่จะใช้ผลการประเมินโดยวิธีนี้ในการตัดสินใจเบื้องต้น เช่น การเลือกความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหรือใช้ตรวจสอบน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาแต่จะไม่ใช้ในการเปรียบเทียบที่สำคัญ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2551)

3) ตรวจดูตัวเป็นตัวตายด้วยการย้อมสี โดยสีพิเศษบางชนิดเมื่อย้อมแล้วเชื้อตัวผู้ที่ตายจะดูดซับสี ในขณะที่ตัวเป็นจะไม่ดูดซึม ทำให้สังเกตเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน โดยทั่วไปนิยมใช้สีอิโอซิน (Eosin) ผสมกับสีอื่น ๆ ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ สีอิโอซิน-นิโกรซิน (Eosin – Nigrosin Stain) และอิโอซิน-ฟาสก์กรีน (Eosin – Fast Green FCF) ซึ่งวิธีนี้สามารถทำควบคู่กับวิธีที่ 2 โดยจะให้ผลในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น (สุพัตรา วิจิตราพันธุ์, 2543)

**3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา**

**3.1 การเก็บรักษาแบบระยะสั้น** เป็นการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียส เล็กน้อย ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถเก็บได้ทั้งสภาพเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดต่าง ๆ (จุฑามาศ พบสุข, 2546) โดยสารละลายที่ใช้ในการเจือจางมีหลายชนิดเช่น สารละลายรินซิง (Rinsing solution) สารละลายริงเจอร์ (Ringer's solution) ซึ่งสารละลายเหล่านี้สามารถนำไปดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาชนิดต่าง ๆ ได้ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531)

**3.2 การเก็บรักษาแบบระยะยาว** เป็นการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ถ้ามีการเลือกสูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไคโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant; สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารไคโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง (Equilibium time) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง รวมทั้งระดับไนโตรเจนเหลวในถังที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้อย่างเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี ซึ่งให้ผลการเพาะฝักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด (จุฑามาศ พบสุข, 2546)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้ง 2 แบบนี้ มีประโยชน์อย่างยิ่งในการขยายพันธุ์ ประการแรกคือสามารถยืดระยะเวลาการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาให้นานออกไปอีก ในกรณีที่ไม่สามารถจับพ่อแม่พันธุ์ปลาได้พร้อมกัน เช่น ปลาบึก (*Pangasiandon gigas*) จึงต้องเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้เพื่อรอผสมไข่จากแม่พันธุ์ปลา ประการที่สองคือ มีเวลาหาแม่พันธุ์ปลาตัวใหม่ที่มีไข่สมบูรณ์ ทำให้การเพาะฟักดำเนินตามแผนงาน และประการสุดท้ายคือ เป็นการใช้น้ำเชื้ออย่างคุ้มค่า โดยสามารถเก็บรักษาไว้ใช้ต่อไปได้ในกรณีที่ปลาชนิดนั้นไม่เพาะพันธุ์ในที่กักขังหรือบ่อเลี้ยงจึงจำเป็นต้องเพาะพันธุ์โดยการผสมเทียมเพียงวิธีเดียว เช่น ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) (สุณีย์ ดวงใหญ่, 2545) และปลาบางชนิด เช่น ปลาดุก ซึ่งไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้จึงจำเป็นต้องฆ่าปลาและผ่าเอาถุงอัณฑะมาบดเพื่อให้ได้น้ำเชื้อไปผสมกับไข่ ทำให้น้ำเชื้อที่เหลือใช้ไม่สามารถเก็บไว้ใช้ได้ในภายหลัง ซึ่งการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้สามารถเก็บรักษาได้ และการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ยังมีประโยชน์ในด้านอื่นอีก เช่น ง่ายแก่การจัดการผสมเทียมไข่กับน้ำเชื้อในระหว่างการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะสามารถนำมาใช้ได้ทันที ทำให้การผสมเทียมสะดวกและรวดเร็วขึ้น (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548) โดยน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลามีผู้คิดค้นสูตรน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาไว้มากมายหลายสูตร ซึ่งหากพิจารณาจากส่วนประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเหล่านี้จะพบว่ามีคุณสมบัติดังนี้คือ

1) สูตรน้ำยาเหล่านี้ประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับที่ปรากฏในน้ำเลือดและน้ำยานั้นมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของเลือด

2) น้ำยาดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงานและสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

3) เป็นน้ำยาที่ปรับปรุงและพัฒนาจากสูตรน้ำยาที่ใช้อาบหรือหล่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดปลาเทราท์สีน้ำตาล (Cortland salt solution) หรือของกบ (Frog Ringer's solution) ซึ่งการปรับปรุงสูตรน้ำยาบางครั้งไม่ได้อาศัยทฤษฎีหรือการทดลองใด ๆ เป็นการชี้นำการปรับปรุงนั้น แต่เป็นการกระทำจากผลการลองผิดลองถูกเป็นเกณฑ์ (วิศว วิชิตวรคุณ, 2543)

**4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา**

วิศว วิชิตวรกุล (2543) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนโดยวิธีแช่เย็น โดยแบ่งการทดลองเป็นสองส่วน ส่วนแรกทำการเก็บรักษาในบัฟเฟอร์สูตร 5 สูตร ได้แก่ Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-Free HBSS), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Extender 13, Extender 7 และ Cortland ซึ่งพบว่า Ca-Free HBSS สามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นาน 66 ชั่วโมง และส่วนที่สองศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยพบว่าอัตราส่วนของ Ca-Free HBSS ต่อน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานใกล้เคียงกันคือ 60 ชั่วโมง

สุพัตรา วิจิตราพันธ์ (2543) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่เย็น ในน้ำยาสูตรต่าง ๆ ได้แก่ น้ำยาสูตร Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Extender 13, Extender 7 และ Cortland ที่อุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำยาสูตร HBSS ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่สุด โดยสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นาน 72 ชั่วโมง และในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยเจือจางในน้ำยาสูตร HBSS ในแต่อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาสูตร HBSS 1:1, 1:2 และ 1:4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยาสูตร HBSS ในอัตราส่วนต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Neisseria* spp. และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ที่ไม่ใช้ออกซิเจน เป็นสาเหตุที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง

สุณีย์ ดวงใหญ่ (2545) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) โดยวิธีแช่เย็น โดยจากการศึกษาพบว่าบัฟเฟอร์สูตรที่เหมาะสมที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพไว้ได้นานที่สุด คือ Extender 7 สามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นานที่สุด 123 ชั่วโมง ที่แรงดันออสโมติก 375 mmol/kg โดยพบว่าอัตราส่วนของ Extender 7 ต่อน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 1:2 และพบว่าอัตราการปฏิสนธิมีค่าสูงสุดเท่ากับ 26.04% เมื่อเก็บไว้นาน 123 ชั่วโมง

จุฑามาศ พบสุข (2546) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็น ได้ทำการแบ่งการทดลองเป็น 4 ตอน โดยตอนที่ 1 ศึกษาค่าแรงดันออสโมติกที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น โดยพบว่าแรงดันออสโมติกที่เพิ่มมากขึ้นทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง ตอนที่ 2 ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย 10 ชนิด ได้แก่ Dimethylsulfoxide (DMSO), Propylene glycol,

Trehalose, Ethylene glycol, Glycerol, Sucrose, Methanol, Ethanol, Acetamide และ Formamide ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5, 10, 15 และ 20%) ที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ซึ่งจากการทดลองพบว่า DMSO, Propylene glycol, Trehalose และ Ethylene glycol มีความเป็นพิษน้อยที่สุด โดยสามารถรักษาการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันนาน 180 นาที ในทุกระดับความเข้มข้น ตอนที่ 3 หาสูตรบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน ซึ่งบัฟเฟอร์สูตร Extender 7 เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ส่วนตอนที่ 4 โดยทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการรวบรวมน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันพบว่าวิธีที่รีดโดยตรงจากถุงอัณฑะแล้วเจือจางด้วยน้ำยาสูตร Extender 7 ในอัตราส่วน 1:1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานถึง 168 ชั่วโมง

Nimrat et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยนำเอาถุงน้ำเชื้อมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ กัน ได้แก่ Mineral oil, Ringer's solution, Phosphate buffer และ 0.85% Sodium chloride พร้อมกับการเติมหรือไม่เติมยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 0.1, 1.0, 2.0, และ 3.0% จากการศึกษาพบว่า Mineral oil เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (42 วัน) การมีชีวิตของน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาด้วย Mineral oil มีค่าสูงสุดเท่ากับ 58.3 ± 2.9% และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.70±2.90% และจากการศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปอยู่ช่วง 7-21.3 x $10^3$ CFU/ml โดยชนิดของแบคทีเรียที่พบคือ *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนี้ยังศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อร่วมกับบัฟเฟอร์ Mineral oil พบว่ายาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ของ PS สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ดีที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ($P<0.05$) นอกจากนี้ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นในบัฟเฟอร์ Mineral oil ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ผลดีเช่นเดียวกับชุดควบคุมเมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 7-8 วัน

Nimrat et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่าง ๆ กัน ได้แก่ Mineral oil, Ringer's solution, Phosphate buffer และ 0.85% Sodium chloride ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อพบว่า Mineral oil เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อ เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (35 วัน) นอกจากนี้ทำการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อร่วมกับบัฟเฟอร์ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะมีค่าเท่ากับ 69.5±3.9% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะซึ่งมีค่าเท่ากับ 57.7±3.4% นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะ PS ต่อปริมาณแบคทีเรียพบว่า ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 0.1% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ

ซึ่งจากการจำแนกแบคทีเรียพบ *Bacillus circulans*, *Staphylococcus hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp. ในระหว่างการเก็บรักษา

Vuthiphandchai et al. (2009b) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) และการพัฒนาประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นของน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้น้ำเชื้อสดเจือจางในอัตราส่วน 1:1 กับน้ำยาแต่ละสูตร ได้แก่ Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca–F HBSS), Hanks' balanced salt solution (HBSS), extender 7 และ extender 13 แล้วนำไปเก็บรักษาใน Tissue culture flasks พบว่าน้ำยาสูตร Ca-F HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด (10 วัน) และเมื่อนำน้ำยาสูตรนี้ไปใช้ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อในแต่ละช่วงระยะเวลาของฤดูผสมพันธุ์ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ช่วงระยะเวลา คือ ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์ (เดือนพฤษภาคม) ช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ (เดือนสิงหาคม) และช่วงท้ายฤดูกาลผสมพันธุ์ (เดือนพฤศจิกายน) จากการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้จากเดือนสิงหาคมสามารถเก็บรักษาในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS นาน 10 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 20.00±3.10% ในขณะที่น้ำเชื้อของปลาดุกอุยที่ได้จากปลาดุกอุยที่ได้ช่วงต้นและท้ายฤดูผสมพันธุ์สามารถเก็บรักษาได้ 9 และ 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เจือจางกับน้ำยาสูตร Ca-F HBSS ทำให้การปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อกับไข่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยน้ำเชื้อปลาดุกอุยจะมีประสิทธิภาพของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่ดีที่สุดภายในสองวันของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาแต่อย่างไรก็ตามผลเหล่านี้แสดงว่าน้ำเชื้อของปลาดุกอุยสามารถเก็บไว้สำหรับระยะสั้นที่ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ

# บทที่ 3
# วัสดุและอุปกรณ์

## 1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

1.2 หลอดทดลอง

1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.4 Tissue culture flask

1.5 ลูป (Loop)

1.6 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ MonoBloc PG 802-S ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.7 กล่องโฟม

1.8 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Gilson N21808C ประเทศฝรั่งเศส

1.9 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

1.10 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส

1.11 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy autoclave SS-325 ประเทศญี่ปุ่น

1.12 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert KG 8540 ประเทศเยอรมนี

1.13 ไม้บรรทัด

1.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert BE400 ประเทศเยอรมนี

1.15 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus CH30RE200 ประเทศเยอรมนี

1.16 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)

1.17 เครื่องปั่นผสม (Vortex) ยี่ห้อ Vortex Genie 2 G – 560E ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.18 ผ้าขาวบาง

1.19 เครื่องปั่น ยี่ห้อ Moulinex AW9 ประเทศฝรั่งเศส

1.20 เครื่องเขย่า ยี่ห้อ SSeriker II OS-3 ประเทศไทย

1.21 เครื่อง Rotary evapolator ยี่ห้อ Buchi R-205/V Basic ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.22 กระดาษกรอง ยี่ห้อ Whatman number1 ประเทศอังกฤษ

1.23 หัวกรองขนาด 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Minisart ประเทศเยอรมนี

1.24 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump) ยี่ห้อ Thomas ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.25 Hemacytometer ยี่ห้อ BOECO ประเทศเยอรมนี

1.26 เครื่อง Osmometer ยี่ห้อ Model 5520 ประเทศสหรัฐอเมริกา

**2. ยาปฏิชีวนะสารเคมี**

2.1 ยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ยี่ห้อ Gibco ประเทศอังกฤษ

2.2 น้ำยา (Extender) สูตร Ringer's solution

2.3 น้ำยา Ca-Free Hank's balanced salt solution,

2.4 น้ำยาสูตร 1 (He and Wood solution)

2.5 น้ำยา Modified Ca-F-HBSS

2.6 น้ำยา Marine solution

2.7 น้ำยา Cortland solution

2.8 สีย้อม Eosin-Nigrosin

2.9 Dimethyl sulfoxide

2.10 Gram's crystal violet solution

2.11 Gram's safranin O solution

2.12 Gram's iodine solution

2.13 Gram's alcohol solution

2.14 Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.15 Catalase reagent

2.16 Oxidase reagent

2.17 ฮอร์โมน Gonadotropin-releasing hormone analogue (suprefact)

2.18 ฮอร์โมน Motillium

**3. อาหารเลี้ยงเชื้อ**

**3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย**

3.1.1 0.85 เปอร์เซ็นต์ Normal saline

3.1.2 Tryptic Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 Plate Count Agar (PCA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

**3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดลองคุณสมบัติทางชีวเคมี**

3.2.1 Triple Sugar Iron (TSI) agar ยี่ห้อ Oxoid ประเทศอังกฤษ

3.2.2 MR-VP broth ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

3.2.3 Simmon's citrate agar ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

3.2.4 Urea agar ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

3.2.5 OF medium ยี่ห้อ Himedia ประเทศอินเดีย

3.2.6 Nitrate broth ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

3.2.7 Lysine decarboxylase medium

3.2.8 Starch agar

3.2.9 Esculin hydrolysis agar

3.2.10 Pseudomonas fluorescent agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.11 น้ำตาลต่าง ๆ

**4. สมุนไพร**

4.1 เหง้าขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* (Berg) Roscoe)

4.2 เหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker)

4.3 เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

4.4 ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.)

4.5 ต้นฟ้าทะลายโจร (*Androqraphis paniculata* Wall ex Ness.)

4.6 ใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.)

4.7 เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.)

4.8 ต้นใต้ใบ (*Phyllanthus niruri* L.)

4.9 เหง้ากระชายขาว (*Globba laeta* K. Larsen)

4.10 ผลมะระขี้นก (*Momordica charantia* L.)

# บทที่ 4
# วิธีดำเนินการทดลอง

## 1. พ่อพันธุ์ปลากะพงขาวและการวางแผนการทดลอง

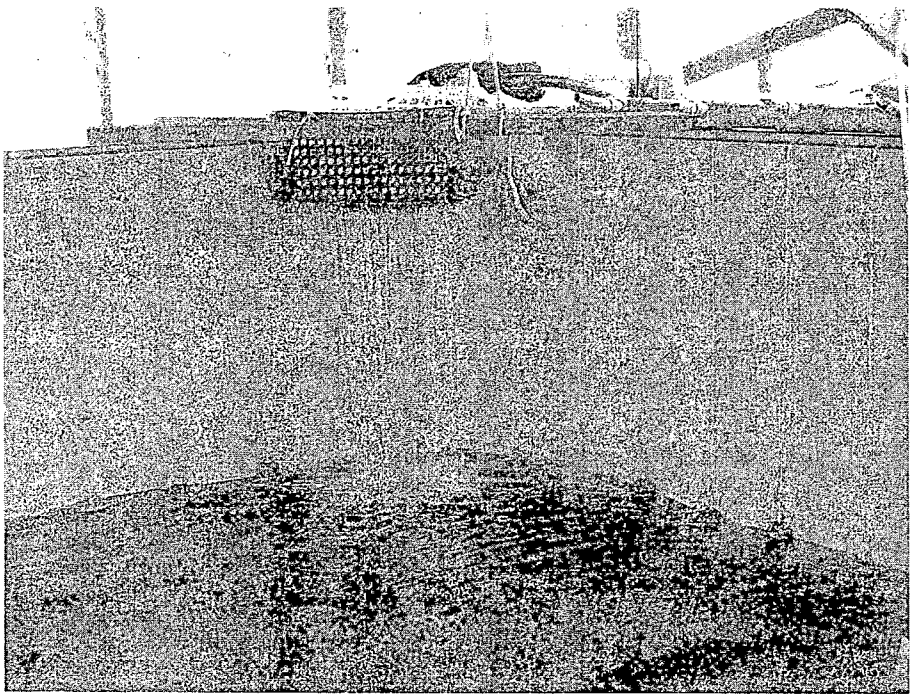
พ่อพันธุ์ปลากะพงขาวที่มีอายุ 3-3.5 ปี (ภาพที่ 3) ได้ถูกรวบรวมมาจากโรงเพาะฟักเอกชน และกระชังเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์บริเวณแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา แล้วนำมาพักไว้ในบ่อพ่อแม่พันธุ์ขนาด 10 ตัน (ภาพที่ 4) ในโรงเพาะเลี้ยงภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แล้วทำการเลี้ยงขุนด้วยปลาข้างเหลืองวันละ 1 ครั้งประมาณ 5% น้ำหนักตัวต่อวัน พ่อพันธุ์ที่ได้ถูกคัดเลือกนำมาใช้ในการทดลองมีความสมบูรณ์เพศโดยดูจากการปรากฏของน้ำเชื้อ ซึ่งมีสีขาวขุ่นเมื่อทำการกดท้องเบา ๆ

พ่อพันธุ์ปลากะพงขาวได้ถูกรวบรวมและลำเลียงมายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เดือนมกราคม – มิถุนายน โดยลำเลียงมาด้วยรถกระบะในภาชนะที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที และเดินทางมาถึงโรงเพาะฟักภายในเวลา 1 ชั่วโมง การพักพ่อพันธุ์ปลากะพงขาวในโรงเพาะฟักใช้เวลา 5-9 วันก่อนเริ่มการทดลองและหยุดให้อาหาร 2 วันก่อนเริ่มทำการทดลอง การกระตุ้นให้พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อทำโดยฉีดกระตุ้นด้วย Gonadotropin-releasing hormone analogue (suprefact) และ Motillium ที่บริเวณโคนครีบหลังในอัตรา 20ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แล้วปล่อยพักไว้ 12 ชั่วโมงจึงทำการรีดน้ำเชื้อ

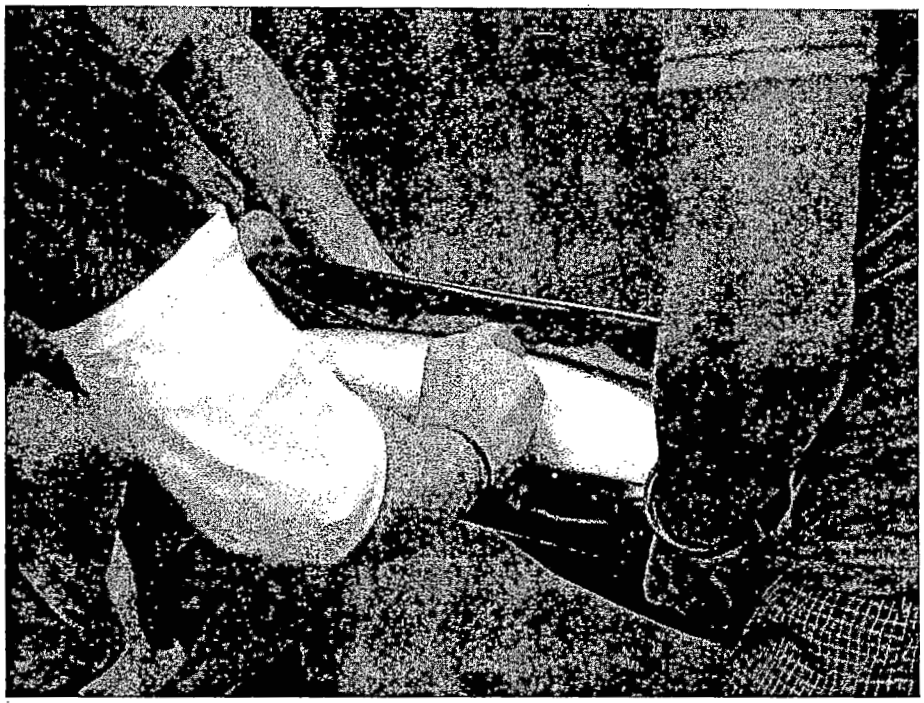
การรวบรวมน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ทำโดยสลบพ่อพันธุ์ด้วย 2-Phenoxyethanol ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม แล้วใช้น้ำทะเลที่สะอาดเช็ดทำความสะอาดบริเวณช่องเพศ (Urogenital papillae) ของพ่อพันธุ์ไม่ให้มีสิ่งสกปรกเจือปน เช็ดบริเวณช่องท้องให้แห้งสนิทและฉีดอีกครั้งด้วย 70 % เอทานอล แล้วทำการรวบรวมน้ำเชื้อออกมาด้วยการกดท้องปลาเบา ๆ เพื่อให้ปัสสาวะออกมาก่อน จนกระทั่งไม่มีปัสสาวะออกมา จากนั้นกดบริเวณท้องปลาตลอดความยาวช่องท้องจากบริเวณใต้ครีบหูมายังช่องเพศเพื่อให้น้ำเชื้อไหลออกมา โดยใช้ Syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร รวบรวมน้ำเชื้อแล้วนำไปวางบนน้ำแข็งแล้วจึงนำไปรวมกันสำหรับการทดลอง (ภาพที่ 5) น้ำเชื้อเหล่านี้ได้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 15 นาที ในระหว่างขั้นตอนการแช่เย็นน้ำเชื้อ การรวบรวมน้ำเชื้อของแต่ละชุดการทดลองจะใช้น้ำเชื้อรวม (Pooled milt) ของพ่อพันธุ์ 4-6 ตัวเพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (Individual variation) ที่นำมาใช้ในแต่ละการทดลอง น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อโดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่นและไม่มีเมือกหรือเลือดปน น้ำเชื้อที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำจะไม่ได้ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ น้ำเชื้อที่รวบรวมได้จะถูกประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อก่อนเริ่มทดลอง โดยพิจารณาจากปัจจัยสำคัญ ได้แก่ ความหนาแน่นของสเปิร์ม การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและแรงดันออสโมติกของ

น้ำเชื้อ ในทุกชุดการทดลองจะใช้น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มขณะเริ่มทดลองมากกว่า 80% เท่านั้น และใช้น้ำเชื้อที่มีสีขาวขุ่นไม่มีสิ่งเจือปนอื่น ๆ

**ภาพที่ 3** พ่อพันธุ์ปลากะพงขาว



**ภาพที่ 4** บ่อพักพ่อพันธุ์ปลากะพงขาว



**ภาพที่ 5** การกดบริเวณท้องปลาตลอดความยาวช่องท้องเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อ

**2. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาว**

ความหนาแน่นของสเปิร์ม (Sperm density) ประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% Normal saline 5,000 เท่า โดยการผสมให้เข้ากันใน Vial ด้วยการใช้ Vortexer แล้วหยดน้ำเชื้อลงใน Hemacytometer (BOECO Hamburg, Germany) เพื่อนับจำนวนสเปิร์มที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Sperm motility) ทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำทะเลลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย Cover glass เบา ๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แล้วจึงประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (OLYMPUS model CX21FS1, Tokyo, Japan) ด้วยวิธี Subjective analysis เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Percentage of motile sperm) ประเมินจากสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว เมื่อถูกกระตุ้นโดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระยะ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999) และ Vuthiphandchai et al. (2009a)

การตรวจวัดค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (Osmolarity or osmotic pressure of seminal plasma) ทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (8,000g) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีเพื่อแยก Seminal fluid ออกจากน้ำเชื้อ จากนั้นนำส่วนใสด้านบน (Seminal fluid) จำนวน

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131


10 ไมโครลิตร มาวัด Osmolarity โดยการใช้เครื่อง Osmometer (Model 5520, Wescor, Logan, UT, USA)

**3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์**

การทดลองแบ่งออกเป็น 8 ชุดการทดลอง ๆ ละ 6 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของลักษณะของภาชนะและการให้ออกซิเจนที่มีต่อระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็น โดยน้ำเชื้อถูกเก็บรักษาไว้ในภาชนะต่าง ๆ กัน 4 ชนิด ได้แก่ Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร, Culture flask ขนาด 75 มิลลิลิตร, Plastic beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร และถุงพลาสติก (Plastic bag) ขนาด 500 มิลลิลิตร ทั้งในสภาพไม่ให้ออกซิเจนและให้ออกซิเจนสมทบ ในกรณีที่ไม่ให้ออกซิเจนสมทบน้ำเชื้อสัมผัสอากาศโดยตรง แต่การให้ออกซิเจนสมทบใช้ Parafilm ปิด Centrifuge tube, Culture flask และ Plastic beaker หลังจากอัดออกซิเจนสมทบเข้าไป ในขณะที่ถุงพลาสติกจะรัดด้วยหนังยางหลังอัดออกซิเจนบริสุทธิ์

น้ำเชื้อปลากะพงขาวถูกรวบรวมจากพ่อพันธุ์หลายตัว (Pooled samples) จากนั้นดูดน้ำเชื้อด้วย Syringe ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะตามที่กล่าวมาและควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 2-4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลองในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้ สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อของทุกชุดการทดลองทุก ๆ วันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น เพื่อทราบช่วงระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อก่อนที่สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล ในชุดการทดลองที่ให้ออกซิเจนสมทบจะทำการอัดออกซิเจนบริสุทธิ์ทุกวันทันทีที่เสร็จสิ้นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่ดีที่สุดจะนำมาใช้ในการผสมเทียมไข่ปลาเพื่อเช็คอัตราปฏิสนธิในปีที่ 2 ของการวิจัย โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ ๆ (กลุ่มควบคุม)

**4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์**

**4.1 การศึกษาผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม**

น้ำเชื้อปลากะพงขาวถูกกระตุ้นด้วยสารละลายต่างชนิดกันซึ่งจะเตรียมให้มีค่า Osmolarity ต่างกันเพื่อทดสอบผลของ Osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อทราบถึงช่วง Osmotic pressure ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ (การทดลองในข้อ 4.2) สารละลาย NaCl, KCl, Sucrose, Mannitol และ $CaCl_2$ ถูกเตรียมขึ้นให้มีค่า Osmolarity ต่าง ๆ กันเพื่อไปกระตุ้นน้ำเชื้อว่ามีการเคลื่อนที่มากน้อยอย่างไร การเตรียมสารละลายทั้งหมดใช้ Deionized water เป็นตัวทำละลาย การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทำโดยหยดน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ ๆ 5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ แล้วจึงหยดสารละลายต่างชนิดกันที่เตรียมขึ้นมาเพื่อทดสอบลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วใช้ Cover glass กดลงไปเบา ๆ แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ทันทีด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าตามเกณฑ์ที่ได้กล่าวมาแล้ว การทดลองนี้ทำให้ทราบถึงระดับ

639.32
ส8231
ด.2
284364

Osmolarity ที่ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (Complete activation point) และไม่เคลื่อนที่ (Immotile) น้ำเชื้อปลากะพงขาวถูกนำมาทดลอง 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

**4.2 การศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว**

ในการพัฒนาหาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น สารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดจะถูกเตรียมขึ้นมาเพื่อเจือจางน้ำเชื้อปลากะพงขาว โดยสารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้จะต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในระหว่างการเก็บแช่เย็น โดยจะปรับให้มีค่า Osmolarity เท่ากับระดับที่พบใน Seminal fluid หรือใช้ระดับ Osmolarity ที่ได้จากการทดลองในปีที่ 1 ซึ่งไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ สารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้ในการทดสอบได้แก่ Ringer's solution, Ca-Free Hank's balanced salt solution, He and Wood solution, Modified Ca-F-HBSS, Marine solution และ Cortland solution ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมนำมาใช้แช่เย็นน้ำเชื้อปลาหลายชนิด สารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้จะถูกเตรียมขึ้นมาเพื่อนำมาเจือจางกับน้ำเชื้อปลากะพงขาวใน Tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1 : 1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในปีที่ 1 แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยเขย่าเบา ๆ จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส จากนั้นน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางจะถูกสุ่มประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มทุกวันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่หรือไม่มีชีวิต ซึ่งทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว รวมทั้งระยะเวลานานที่สุดที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นโดยที่คุณภาพน้ำเชื้อมีการเคลื่อนที่เหมือนน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ การทดลองเพื่อทดสอบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนี้จะใช้น้ำเชื้อของปลาหลายตัว (Pooled milt) เพื่อลดความแปรปรวนที่อาจมีในปลาแต่ละตัว โดยจะทดลองตลอดฤดูผสมพันธุ์วางไข่ น้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่สามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นานที่สุดจะถูกนำมาใช้ในการผสมเทียมเพื่อเช็คอัตราการปฏิสนธิ โดยเปรียบเทียบกับการใช้น้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ ๆ (กลุ่มควบคุม) ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

**5. การควบคุมปริมาณแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น**

น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บแช่เย็นที่ได้พัฒนาวิธีการเก็บรักษาด้วย Protocol ที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.2 จะถูกนำมาเก็บรักษาในสารละลายที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยการเติมยาปฏิชีวนะ (Penicillin-streptomycin) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (0.1, 1, 2%) แล้วประเมินการเจริญของแบคทีเรียและชนิดของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นทุกวันตั้งแต่เริ่มทดลอง (วันที่ 0) จนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่หรือไม่มีชีวิตเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำเชื้อสดที่เก็บแช่เย็นโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วประเมินการเจริญของแบคทีเรียและชนิดของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นทุกวัน แม้ว่าสเปิร์มน่าจะหยุดเคลื่อนที่เร็วกว่าการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ การทดลองนี้จะทำในช่วงต้นฤดู

กลางฤดูและปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของสเปิร์มและการเจริญของแบคทีเรียในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

น้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่เย็นที่เก็บไว้จะถูกนำมาตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียและชนิดของแบคทีเรียที่พบในระหว่างการเก็บรักษา โดยนำน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์มาตรวจสอบตามเวลาที่กำหนดไว้ตั้งแต่เริ่มเก็บรักษาจนสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียจะใช้วิธี Plate count technique โดยนำน้ำเชื้อแช่เย็นมาเจือจางด้วย 0.85% Normal saline แบบ Ten-fold dilution เพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ จากนั้นดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรป แล้วเกลี่ยผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อ นำจานเพาะเชื้อบ่มในตู้บ่มเชื้อในลักษณะคว่ำจาน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตลักษณะโคโลนีและบันทึกผลที่ได้

การตรวจสอบชนิดแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บแช่เย็นจะทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธีการย้อมสีแกรม (Gram's staining) โดยใช้ Loop เขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำเชื้อแช่เย็นที่ต้องการตรวจสอบมาเกลี่ยบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสี Crystal violet และ Safranin O แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X สังเกตการติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแต่ละชนิด บันทึกผลที่ได้ และนำมาจัดจำแนกด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการจัดจำแนกแบคทีเรียของ Bergey's manual of systematic bacteriology การตรวจสอบชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในลักษณะเช่นนี้ทำให้ทราบถึง Profile การเจริญของแบคทีเรียขณะถูกแช่เย็นในช่วงเวลาต่างกัน และทราบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในความเข้มข้นใดจะช่วยลดการเจริญของแบคทีเรียให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้

**6. การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อแช่เย็นในการปฏิสนธิกับไข่**

น้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ ๆ อีกส่วนหนึ่งได้ถูกนำมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 5 โดยเจือจางน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในอัตราส่วน 1:2 ใน Tissue culture flasks ในสภาวะ Aseptic technique พร้อมกับใส่ยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น น้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่เย็น (Extended semen) ที่เตรียมขึ้นมานี้ได้ถูกนำมาวางไว้บนน้ำแข็งภายในถังโฟม (Styrofoam box) เพื่อนำมาผสมเทียมกับไข่ปลากะพงขาวในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่เย็นที่มีต่อการปฏิสนธิกับไข่ปลา

แม่พันธุ์ปลากะพงขาวสมบูรณ์เพศที่ได้ถูกเลี้ยงขุนภายในโรงเพาะฟักได้ถูกคัดเลือกมาผสมเทียม โดยคัดเลือกแม่พันธุ์จำนวน 5 ตัวที่มีลักษณะท้องที่อูมเป่งมาฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่เพื่อรวบรวมไข่ไปผสมเทียมต่อไป การกระตุ้นการตกไข่ปลากะพงขาวทำโดยฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตก

ไข่ที่มีชื่อว่า Gonadotropin Hormone Releasing Hormone analogue (GnRHa) (มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect) ในอัตรา 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone (มีชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วพักแม่พันธุ์ไว้นาน 10-12 ชั่วโมง แล้วจึงรีดไข่ปลาออกมาและตรวจสอบคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยดูจากลักษณะรูปร่างและความสุกของไข่ การรวบรวมไข่ทำโดยนำแม่พันธุ์ปลากะพงขาวมาสลบใน 2-Phenoxyethanol แล้วใช้สายยางขนาดเล็กสอดเข้าไปในช่องเพศเพื่อดูดไข่บางส่วนออกมาดูขนาดและความสุกของไข่ (Ovarian biopsy) ซึ่งเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อมก็ทำการรีดไข่ออกมาใส่ในภาชนะพลาสติกที่แห้งและสะอาด

การผสมเทียมไข่ปลากะพงขาวด้วยน้ำเชื้อปลากะพงขาวใช้น้ำเชื้อจาก 2 ชุดการทดลองคือ น้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ ๆ (Control group) และน้ำเชื้อแช่เย็น (Extended semen) ที่นำไปผสมเทียมกับไข่เป็นช่วง ๆ ในวันที่ 0, 2 และ 4 หลังการเก็บแช่เย็น โดยน้ำเชื้อแช่เย็นในวันที่ 0 ได้ถูกเจือจางโดยเก็บไว้ในน้ำยาประมาณ 10 นาทีก่อนการผสมเทียม และน้ำเชื้อเหล่านี้ได้ถูกประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนการผสมเทียมประมาณ 5-10 นาที การผสมเทียมเริ่มจากนำไข่ประมาณ 500 ใบ ที่ถูกรวบรวมด้วยกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตรที่ตัดปลาย มาใส่ลงไปในจานแก้ว (Petri dish) แล้วนำน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็นมาปฏิสนธิกับไข่ด้วยการใช้สเปิร์ม $3x10^5$ เซลล์ ในการปฏิสนธิไข่ 1 ใบเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อการปฏิสนธิ สำหรับปริมาณน้ำเชื้อที่จะใช้ในการผสมเทียมของทั้ง 2 ชุดการทดลองจะถูกรวบรวมออกมาด้วยการใช้ Glass micropipette ที่มีความเที่ยงตรงในการดูดจำนวนสเปิร์มตามที่ต้องการในการปฏิสนธิไข่ทั้งหมด

น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ได้เก็บแช่เย็นหรือน้ำเชื้อสดเมื่อถูกนำมาเทลงบนไข่ 500 ใบเพื่อปฏิสนธิแล้วก็ใช้ขนไก่คนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันพร้อมกับเติมน้ำทะเล 5 มิลลิลิตรพอท่วมไข่ ปล่อยไว้ 2 นาที จึงทำการล้างไข่ด้วยน้ำทะเล 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่ปลากะพงขาวพัฒนาในจานแก้วโดยให้น้ำท่วมไข่ตลอดเวลาและเปลี่ยนน้ำทะเลทุก ๆ 2-3 ชั่วโมงจนไข่ฟักเป็นลูกปลาวัยอ่อน การประเมินอัตราการปฏิสนธิหรือเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิกับไข่ประเมินเมื่อไข่ปลาพัฒนาถึงระยะ Gastrula stage โดยคำนวณจากจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิต่อจำนวนไข่ที่นับทั้งหมดแล้วคูณด้วย 100 และทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมได้ใช้น้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ ๆ ตามที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% ในการผสมกับไข่ สำหรับอัตราการฟักของไข่ทำโดยคำนวณจากลูกปลาที่ฟักออกมาเป็นตัวต่อไข่ทั้งหมดที่ทำการผสมเทียม

**7. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยการใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย**

**7.1 การศึกษาจากฐานข้อมูลของแพทย์แผนไทย**

คัดเลือกสมุนไพรหรือสูตรยาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ ยกตัวอย่างเช่น *Vibrio, Aeromanas, Flavobacterium* และ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อ

โรคต่อสัตว์น้ำเศรษฐกิจสัตว์น้ำประเภทต่าง ๆ รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคต่อมนุษย์ที่มักจะปนเปื้อนในแหล่งน้ำหรือสัตว์เศรษฐกิจ

**7.2 การสกัดสมุนไพร** (ดัดแปลงจาก Quave *et al.*, 2008)

นำสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน เหง้ากระชายดำ เหง้าไพล ใบฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร ใบมะรุม เหง้าขมิ้นเครือ ต้นใต้ใบ เหง้ากระชายและมะระขี้นก มาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นสมุนไพรให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปทำให้แห้ง จากนั้นนำสมุนไพรแช่ใน 95 % เอทานอล นำสารสกัดมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ละลายสารสกัดที่สกัดได้ด้วย Dimethyl sulfoxide ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

**7.3 การคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวโดยการพิจารณาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อสเปิร์มปลากะพงขาว**

เตรียมน้ำยาสูตร Ringer's solution ซึ่งเป็นน้ำยาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวมากที่สุด จากนั้นนำน้ำยาสูตรดังกล่าวผสมกับสารสกัดสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้นของสมุนไพรเท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมน้ำยาสูตร Ringer's solution ที่น้ำยาผสมกับยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ให้ได้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 0.1 % (ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว) เพื่อใช้เป็น Positive control และไม่ผสมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin เพื่อใช้เป็น Negative control แล้วดูดน้ำยาที่เตรียมไว้ใส่ลงใน Tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำเชื้อสด ผสมให้เข้ากัน ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสมุนไพรเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นยาปฏิชีวนะเท่ากับ 0 และ 0.1 % ตามลำดับ แล้วเก็บ Tissue culture flask ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำเชื้อดังกล่าวมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การมีชีวิตของสเปิร์ม และการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทุก 24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุดและยับยั้งปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมากที่สุด

**8. การวิเคราะห์สถิติ**

ข้อมูลจากการทดลองนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Repeated analysis of variance (Two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SuperANOVA ของ Abacus concepts, Inc.

# บทที่ 5

# ผลการทดลอง

ผลการทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 8 ตอน คือ

1. คุณภาพน้ำเชื้อ
2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์
3. ผลของ Osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
4. ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว
5. ผลของการเติมยาปฏิชีวนะ PS ต่อคุณภาพน้ำเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตร Ringer's solution
6. ผลของการเติมยาปฏิชีวนะ PS ต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตร Ringer's solution
7. การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อแช่เย็นในการปฏิสนธิกับไข่
8. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยการใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

**1. คุณภาพน้ำเชื้อ**

น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่รวบรวมมาในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในประเด็นของความหนาแน่นของสเปิร์มที่พบว่า ในเดือนมกราคม ความหนาแน่นสเปิร์มปลากะพงขาวมีค่าเท่ากับ 4.5 ±1.1 $x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 6.4 ±0.8 $x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเดือนมีนาคม และมีค่าเป็น 5.3 ±0.9 $x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเดือนพฤษภาคม (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างเดือนมกราคม – พฤษภาคม โดยมีค่าเฉลี่ย 86.7 – 88.9% และ 295-306 mOsm/kg ตามลำดับ

**ตารางที่ 3** คุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ใช้ในการศึกษา

| คุณภาพน้ำเชื้อ | ช่วงเวลารวบรวมน้ำเชื้อ | | |
|---|---|---|---|
| | มกราคม | มีนาคม | พฤษภาคม |
| ความหนาแน่นของสเปิร์ม ($x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | 4.5 ±1.1[a] | 6.4 ±0.8[b] | 5.3 ±0.9[b] |
| การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%) | 86.7 ±3.1[a] | 86.7 ±3.1[a] | 88.9±3.3[a] |
| แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (mOsm/kg) | 295 ±4[a] | 302 ±5[a] | 306 ±4[a] |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างช่วงเวลารวบรวมน้ำเชื้อ ($P<0.05$)

**2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์**

น้ำเชื้อปลากะพงขาวขณะเริ่มการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 86.7-91.1% (ตารางที่ 4) การแช่เย็นน้ำเชื้อสดในทุกชุดการทดลองเมื่อเวลาแช่เย็นผ่านไป 30 นาทีมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ Centrifuge tube และ Plastic beaker ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไม่ว่าจะให้หรือไม่ให้ออกซิเจนสมทบต่างก็เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเพียง 1 วันเท่านั้น การใช้ Tissue culture flask ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้ผลการเก็บรักษาที่นานขึ้น โดยเมื่อให้ออกซิเจนสมทบสามารถเก็บรักษาได้ 3 วัน และในสภาพที่ไม่ให้ออกซิเจนสมทบเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ 2 วัน การใช้ถุงพลาสติก (Plastic bag) เก็บรักษาน้ำเชื้อสดในสภาพไม่ให้ออกซิเจนสมทบ หรือให้ออกซิเจนสมทบสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ 3 และ 5 วัน ตามลำดับ

**ตารางที่ 4** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวหลังจากแช่เย็นในภาชนะรูปแบบต่าง ๆ กันเมื่อให้หรือไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

| ชุดการทดลอง | ระยะเวลาการเก็บรักษา (ชั่วโมง) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1. Centrifuge tube | 88.9 ±3.3$^{a}$ | 17.8±2.1$^{b}$ | 4.4±5.1$^{c}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. Centrifuge tube(Without $O_2$) | 86.7 ±3.1$^{a}$ | 15.6±5.1$^{b}$ | 8.9±6.1$^{b}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. Culture flask | 89.0±1.8$^{a}$ | 64.4±2.8$^{b}$ | 51.1±6.1$^{c}$ | 24.4±2.8$^{d}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. Culture flask (Without $O_2$) | 88.9±3.3$^{a}$ | 62.2±3.9$^{b}$ | 55.6±5.1$^{b}$ | 53.3±5.8$^{b}$ | 42.2±3.8$^{c}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5. Plastic beaker | 91.1±3.3$^{a}$ | 44.4±2.8$^{b}$ | 26.7±3.1$^{c}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. Plastic beaker (Without $O_2$) | 88.9 ±3.3$^{a}$ | 42.2±3.9$^{b}$ | 26.7±5.8$^{c}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7. Plastic bag | 86.7 ±3.1$^{a}$ | 66.7±6.7$^{b}$ | 51.1±6.1$^{b}$ | 26.7±3.1$^{c}$ | 17.8±3.9$^{d}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8. Plastic bag (Without $O_2$) | 86.7 ±3.1$^{a}$ | 66.7±6.7$^{b}$ | 62.2±3.9$^{b}$ | 51.1±6.1$^{b}$ | 35.6±5.1$^{c}$ | 24.4±2.8$^{d}$ | 8.9±6.1$^{e}$ | 0 | 0 |

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระยะการเก็บรักษา ($P<0.05$)

**3. ผลของ Osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม**

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย Electrolyte NaCl และ KCl พบว่าเมื่อแรงดันออสโมติกต่ำสเปิร์มจะไม่มีการเคลื่อนที่แต่จะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้นที่ระดับ 100 mM (NaCl) และ 150 mM (KCl) และมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อแรงดันออสโมติกสูงขึ้น (ตารางที่ 5)

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวในสารละลาย Non-electrolyte พบว่าเมื่อแรงดันออสโมติกต่ำ สเปิร์มจะไม่มีการเคลื่อนที่แต่จะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้นที่ระดับ 400 mM (Glucose) และ 200 mM (Mannitol) และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อแรงดันออสโมติกสูงขึ้น (ตารางที่ 6)

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวในสารละลาย $CaCl_2$ พบว่า เมื่อแรงดันออสโมติกต่ำ สเปิร์มจะไม่มีการเคลื่อนที่แต่จะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้น 75 mM ($CaCl_2$) และเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเมื่อแรงดันออสโมติกสูงขึ้น (ตารางที่ 7)

**ตารางที่ 5** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่กระตุ้นด้วยสารละลาย NaCl และ KCl ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

| Molarity | ชนิดสาร Electrolyte | |
|---|---|---|
| (mM) | KCl | NaCl |
| 0 | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| 50 | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| 100 | $0^{a,1}$ | $8.33 \pm 0.92^{b,2}$ |
| 150 | $13.33 \pm 1.924^{a,2}$ | $1\ 0.00 \pm 0^{a,2}$ |
| 200 | $16.67 \pm 3.85^{a,2}$ | $33.33 \pm 3.85^{b,3}$ |
| 300 | $33.33 \pm 3.85^{a,3}$ | $40.00 \pm 0^{a,3}$ |
| 400 | $33.33 \pm 3.85^{a,3}$ | $53.33 \pm 3.85^{b,3}$ |
| 500 | $53.33 \pm 3.85^{a,4}$ | $60.00 \pm 0^{a,4}$ |
| 600 | $53.33 \pm 3.85^{a,4}$ | $80.00 \pm 0^{b,4}$ |
| 700 | $86.67 \pm 3.85^{a,5}$ | $93.33 \pm 3.85^{a,5}$ |
| 800 | $86.67 \pm 3.85^{a,5}$ | $93.33 \pm 3.85^{a,5}$ |
| 900 | $100.00 \pm 0^{a,5}$ | $93.33 \pm 3.85^{a,5}$ |
| 1100 | $100.00 \pm 0^{a,5}$ | $100.00 \pm 0^{a,5}$ |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

**ตารางที่ 6** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่กระตุ้นด้วยสารละลาย Glucose และ Mannitol ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

| Molarity (mM) | ชนิดสาร Non - electrolyte | |
|---|---|---|
| | Glucose | Mannitol |
| 0 | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| 50 | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| 100 | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| 200 | $0^{a,1}$ | $6.67 \pm 0.96^{b,2}$ |
| 300 | $0^{a,1}$ | $13.33 \pm 19.2^{b,2}$ |
| 400 | $13.33 \pm 1.92^{a,2}$ | $20.00 \pm 0.00^{a,2}$ |
| 600 | $33.33 \pm 3.85^{a,2}$ | $46.67 \pm 3.85^{a,2}$ |
| 800 | $83.33 \pm 3.85^{b,3}$ | $73.33 \pm 3.85^{a,3}$ |
| 1000 | $73.33 \pm 3.85^{a,3}$ | $86.67 \pm 3.85^{b,4}$ |
| 1200 | $73.33 \pm 3.85^{a,3}$ | $86.67 \pm 3.85^{b,4}$ |
| 1400 | $80.00 \pm 0^{a,3}$ | $100.00 \pm 0^{b,4}$ |
| 1600 | $80.00 \pm 0^{a,3}$ | $100.00 \pm 0^{b,4}$ |
| 1800 | $100.00 \pm 0^{a,4}$ | $100.00 \pm 0^{a,4}$ |
| 2200 | $100.00 \pm 0^{a,4}$ | $100.00 \pm 0^{a,4}$ |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

**ตารางที่ 7** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

| Molarity (mM) | $CaCl_2$ |
|---|---|
| 0 | $0^{a}$ |
| 25 | $0^{a}$ |
| 50 | $0^{a}$ |
| 75 | $8.33 \pm 0.96^{b}$ |
| 100 | $10.00 \pm 0^{b}$ |
| 150 | $13.33 \pm 1.92^{b}$ |
| 200 | $26.67 \pm 3.85^{c}$ |
| 250 | $26.67 \pm 3.85^{c}$ |
| 300 | $40.00 \pm 6.67^{c}$ |
| 350 | $73.33 \pm 3.85^{d}$ |
| 400 | $80.00 \pm 0^{d}$ |
| 500 | $100.00 \pm 0^{d}$ |
| 700 | $100.00 \pm 0^{d}$ |
| 900 | $100.00 \pm 0.96^{d}$ |
| 1100 | $100.00 \pm 0.96^{d}$ |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

**4. ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว**

**4.1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่**

การทดลองหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นด้วยการเก็บรักษาในน้ำยา Ringer's solution, Ca-Free Hank's balanced salt solution, He and Wood solution, Modified Ca-F-HBSS, Marine solution และ Cortland solution ในอัตราส่วน 1: 1 เมื่อทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 100 % และเก็บรักษาได้นาน 3 วัน แล้วหยุดเคลื่อนที่ แต่เมื่อนำน้ำเชื้อมาเจือจางในน้ำยาสูตร Ringer's solution สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 7 วัน รองลงมาคือ น้ำยาสูตร Modified Ca-F-HBSS และ Marine solution ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5 วัน ส่วนน้ำยาสูตร He and Wood solution เก็บรักษาน้ำเชื้อได้น้อยที่สุด 12 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

| ชนิดของสารบัฟเฟอร์ | ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 12 ชั่วโมง | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Control (น้ำเชื้อสด) | $100.00 \pm 0.00^{a,6}$ | $80.00 \pm 0.00^{b,5}$ | $71.11 \pm 4.44^{c,4}$ | $53.33 \pm 0.00^{d,3}$ | $22.22 \pm 2.22^{e,2}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| Ca-F-HBSS | $100.00 \pm 000^{a,6}$ | $100.00 \pm 0.00^{e,6}$ | $80.00 \pm 0.00^{d,5}$ | $53.33 \pm 0.00^{d,4}$ | $26.67 \pm 0.00^{c,3}$ | $7.78 \pm 1.11^{bc,2}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| Marine solution | $100.00 \pm 0.00^{a,6}$ | $100.00 \pm 0.00^{e,6}$ | $80.00 \pm 0.00^{d,5}$ | $66.67 \pm 0.00^{e,4}$ | $40.00 \pm 0.00^{d,3}$ | $8.89 \pm 2.22^{c,2}$ | $4.44 \pm 2.22^{b,2}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| Ringer's solution | $100.00 \pm 0.00^{a,7}$ | $80.00 \pm 0.00^{b,6}$ | $75.56 \pm 2.22^{cd,6}$ | $62.22 \pm 2.22^{e,5}$ | $60.00 \pm 0.00^{e,5}$ | $42.22 \pm 2.22^{d,4}$ | $31.11 \pm 4.44^{c,3}$ | $11.11 \pm 4.44^{b,2}$ | $1.11 \pm 1.11^{b,1}$ |
| He and Wood solution | $100.00 \pm 0.00^{a,3}$ | $20.00 \pm 0.00^{a,2}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| Modified Ca-F-HBSS | $100.00 \pm 0.00^{a,6}$ | $93.33 \pm 0.00^{d,6}$ | $80.00 \pm 0.00^{d,5}$ | $33.33 \pm 0.00^{c,4}$ | $24.44 \pm 2.22^{c,3}$ | $11.11 \pm 8.01^{b,2}$ | $6.67 \pm 6.67^{b,2}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| Cortland solution | $100.00 \pm 0.00^{a,6}$ | $86.66 \pm 0.00^{c,5}$ | $60.00 \pm 0.00^{b,4}$ | $20.00 \pm 0.00^{b,3}$ | $2.22 \pm 1.11^{b,2}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**4.2 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต**

การทดลองหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นด้วยการเก็บรักษาในน้ำยา Ringer's solution, Ca-Free Hank's balanced salt solution, He and Wood solution, Modified Ca-F-HBSS, Marine solution และ Cortland solution ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของสเปิร์มสดพบว่ามีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต 97.6 ± 1.5% และเก็บรักษาได้นาน 6 วัน สเปิร์มจะตายหมด แต่เมื่อนำน้ำเชื้อมาเจือจางในน้ำยาสูตร Ringer's solution สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 7 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงที่สุด (68.3 ± 3.6%) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อมาเจือจางในน้ำยาสูตร Marine solution และ Modified Ca-F-HBSS ที่มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 56.3 ± 2.7% และ 54.8 ± 4.1% ตามลำดับ ส่วนน้ำยาสูตร He and Wood solution เก็บรักษาน้ำเชื้อได้น้อยที่สุด 6 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 8.2 ± 2.1% ดังแสดงในตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

| ชนิดของสารบัฟเฟอร์ | ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 12 ชั่วโมง | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Control (น้ำเชื้อสด) | $97.6 \pm 1.5^{a,8}$ | $97.7 \pm 1.8^{a,8}$ | $94.1 \pm 2.4^{b,7}$ | $85.8 \pm 1.5^{c,6}$ | $76.2 \pm 2.9^{c,5}$ | $45.6 \pm 2.8^{b,4}$ | $26.7 \pm 3.8^{b,3}$ | $5.1 \pm 4.9^{a,1}$ | $0^{a,1}$ |
| Ca-F-HBSS | $94.8 \pm 2.1^{a,5}$ | $95.3 \pm 1.4^{a,5}$ | $93.4 \pm 0.8^{b,5}$ | $83.3 \pm 1.7^{c,4}$ | $73.6 \pm 3.1^{c,3}$ | $67.8 \pm 1.9^{c,3}$ | $66.9 \pm 2.9^{d,3}$ | $51.7 \pm 3.6^{c,2}$ | $35.7 \pm 4.6^{b,1}$ |
| Marine solution | $95.6 \pm 1.7^{a,4}$ | $94.9 \pm 1.5^{a,4}$ | $92.1 \pm 1.8^{b,4}$ | $86.7 \pm 1.8^{c,3}$ | $75.4 \pm 2.4^{c,23}$ | $68.9 \pm 2.7^{c,2}$ | $70.4 \pm 3.3^{d,2}$ | $63.2 \pm 3.5^{d,1}$ | $56.3 \pm 2.7^{c,1}$ |
| Ringer's solution | $97.1 \pm 1.7^{a,3}$ | $95.5 \pm 2.2^{a,3}$ | $93.6 \pm 1.2^{b,3}$ | $82.2 \pm 2.1^{c,2}$ | $73.7 \pm 2.5^{c,1}$ | $72.2 \pm 2.6^{c,1}$ | $71.1 \pm 4.3^{d,1}$ | $66.6 \pm 4.3^{d,1}$ | $68.3 \pm 3.6^{c,1}$ |
| He and Wood solution | $96.4 \pm 1.8^{a,6}$ | $97.2 \pm 0.9^{a,6}$ | $85.5 \pm 1.7^{a,5}$ | $66.4 \pm 1.9^{a,4}$ | $36.8 \pm 2.3^{a,3}$ | $26.2 \pm 2.8^{a,2}$ | $13.2 \pm 2.8^{a,1}$ | $8.2 \pm 2.1^{a,2}$ | $0^{a,1}$ |
| Modified Ca-F-HBSS | $97.4 \pm 2.1^{a,4}$ | $96.8 \pm 1.4^{a,4}$ | $95.7 \pm 1.3^{b,4}$ | $73.3 \pm 1.4^{b,3}$ | $74.4 \pm 2.2^{c,3}$ | $66.7 \pm 3.7^{c,2}$ | $68.7 \pm 4.6^{d,2}$ | $65.8 \pm 3.4^{d,2}$ | $54.8 \pm 4.1^{c,1}$ |
| Cortland solution | $96.5 \pm 1.8^{a,6}$ | $96.6 \pm 0.9^{a,6}$ | $93.8 \pm 1.1^{b,6}$ | $74.7 \pm 0.9^{b,5}$ | $62.8 \pm 1.7^{b,4}$ | $66.5 \pm 2.6^{c,4}$ | $49.2 \pm 2.7^{c,3}$ | $36.2 \pm 2.9^{b,2}$ | $18.6 \pm 2.6^{b,1}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**5. ผลของการเติมยาปฏิชีวนะ PS ต่อคุณภาพน้ำเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตร Ringer's solution**

จากการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลากะพงขาว พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1%, 1.0% และ 2.0% มีค่าเท่ากับ 91.67 ± 1.63%, 90.50 ± 1.87% และ 86.00 ± 2.37% ตามลำดับ โดยชุดควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ และชุดการทดลองที่เติม PS ความเข้มข้น 0.1% และ 1.0% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 2.0% แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกัน แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ PS มีผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาว โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ PS เพิ่มมากขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลากะพงขาวมีค่าลดลง

นอกจากนี้เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวยาวนานขึ้น พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1%, 1.0% และ 2.0% ในแต่ละวันที่ทำการทดลองมีแนวโน้มลดลง และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกันในทุกชุดการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองการมีชีวิตของน้ำเชื้อในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% มีค่ามากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 37.17 ± 2.04% และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่น รองลงมาได้แก่ ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 1.0% และ 2.0% โดยมีค่าเท่ากับ 31.17 ± 2.04%, 24.83 ± 2.38% และ 20.58 ± 1.63% ตามลำดับ ดังตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บในน้ำยา Ringer's solution และเติมยาปฏิชีวนะ

| ระยะเวลา (วัน) | สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS |
| 0 | $94.33 \pm 1.97^{a,1}$ | $91.67 \pm 1.63^{b,1}$ | $90.50 \pm 1.87^{b,1}$ | $86.00 \pm 2.37^{c,1}$ |
| 1 | $91.17 \pm 2.14^{a,2}$ | $90.67 \pm 1.83^{a,1}$ | $90.25 \pm 1.72^{a,1}$ | $83.58 \pm 1.96^{b,2}$ |
| 2 | $89.08 \pm 1.02^{a,3}$ | $90.25 \pm 1.17^{a,1}$ | $88.25 \pm 1.21^{a,1}$ | $78.42 \pm 1.56^{b,3}$ |
| 3 | $71.25 \pm 2.04^{a,4}$ | $69.17 \pm 1.37^{b,2}$ | $64.58 \pm 1.02^{c,2}$ | $55.33 \pm 1.63^{d,4}$ |
| 4 | $68.25 \pm 0.76^{a,5}$ | $68.08 \pm 1.11^{a,2}$ | $60.75 \pm 1.17^{b,3}$ | $50.75 \pm 0.76^{c,5}$ |
| 5 | $54.08 \pm 1.43^{a,6}$ | $55.58 \pm 1.02^{a,3}$ | $47.50 \pm 1.05^{b,4}$ | $41.33 \pm 1.03^{c,7}$ |
| 6 | $47.58 \pm 1.02^{a,7}$ | $49.25 \pm 3.57^{a,4}$ | $41.75 \pm 1.78^{c,5}$ | $43.75 \pm 2.44^{b,6}$ |
| 7 | $38.08 \pm 1.06^{b,8}$ | $43.25 \pm 2.44^{a,5}$ | $35.08 \pm 1.43^{c,6}$ | $29.08 \pm 1.43^{d,8}$ |
| 9 | $31.17 \pm 2.04^{b,9}$ | $37.17 \pm 2.04^{a,6}$ | $24.83 \pm 2.38^{c,7}$ | $20.58 \pm 1.63^{d,9}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

นอกจากนั้นจากการศึกษาการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจากตัวอย่างน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Ringer's solution พบว่าในวันแรกของการทดลองน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $100 \pm 0.00$ % ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0 % ซึ่งมีค่าเท่ากับ $100 \pm 0.00$ % ในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 11) เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวยาวนานขึ้นพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีแนวโน้มลดลง โดยในวันที่ 9 ของการทดลองน้ำเชื้อปลากะพงขาวในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS 0.1 % มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเหลือ $15.00 \pm 10.00$ % เท่ากัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS 1.0 % และ 2.0 % มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเหลือ $0 \pm 0.00$ % ทั้งสองชุดการทดลอง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) กับสองชุดการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น

**ตารางที่ 11** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บในน้ำยา Ringer's solution และเติมยาปฏิชีวนะ

| ระยะเวลา (วัน) | การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ชุดควบคุม | PS 0.1% | PS 1.0% | PS 2.0% |
| 0 | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ |
| 1 | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $93.33 \pm 10.33^{a,12}$ |
| 2 | $90.00 \pm 11.00^{a,1}$ | $93.33 \pm 10.33^{a,1}$ | $90.00 \pm 11.00^{a,2}$ | $83.33 \pm 8.17^{a,2}$ |
| 3 | $73.33 \pm 10.33^{a,2}$ | $70.00 \pm 11.00^{a,2}$ | $66.77 \pm 10.33^{a,3}$ | $46.67 \pm 10.33^{b,3}$ |
| 4 | $66.67 \pm 10.33^{a,2}$ | $66.67 \pm 10.30^{a,2}$ | $60.00 \pm 0.00^{a,3}$ | $43.33 \pm 8.16^{b,3}$ |
| 5 | $53.33 \pm 10.33^{a,3}$ | $53.33 \pm 10.30^{a,3}$ | $45.00 \pm 10.00^{a,4}$ | $26.67 \pm 10.33^{b,4}$ |
| 6 | $40.00 \pm 0.00^{a,4}$ | $43.33 \pm 8.16^{a,34}$ | $26.67 \pm 10.33^{b,5}$ | $23.33 \pm 8.16^{b,4}$ |
| 7 | $30.00 \pm 11.00^{ab,4}$ | $33.33 \pm 10.30^{a,4}$ | $20.00 \pm 0.00^{bc,5}$ | $15.00 \pm 10.00^{c,5}$ |
| 9 | $15.00 \pm 10.00^{a,5}$ | $15.00 \pm 10.00^{a,5}$ | $0.00 \pm 0.00^{b,6}$ | $0.00 \pm 0.00^{b,6}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**6. ผลของการเติมยาปฏิชีวนะ PS ต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตร Ringer's solution**

**6.1 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น**

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปของน้ำเชื้อในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1%, 1.0% และ 2.0% มีค่าเท่ากับ $3.67 \pm 0.19$, $2.90 \pm 0.14$, $2.55 \pm 0.10$ และ $0.98 \pm 0.05 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ โดยชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% และ 1.0% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกัน แต่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 2.0% แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ PS มีผลต่อการลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรป เมื่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ PS เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในน้ำเชื้อปลากะพงขาวมีค่าลดลง

เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวยาวนานขึ้น พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1%, 1.0% และ 2.0% ในแต่ละวันที่ทำการทดลองมีแนวโน้มลดลง และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกันในทุกชุดการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น2.0% มีค่าน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $0.10 \pm 0.01\times10^3$ CFU/mL และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่น รองลงมาได้แก่ ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น1.0% , 0.1% และชุดควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ $1.47 \pm 0.02$, $2.32 \pm 0.04$ และ $1.67 \pm 0.05\times10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 12

**ตารางที่ 12** ผลของยาปฏิชีวนะ PS ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

| ระยะเวลา (วัน) | ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ($\times 10^3$ CFU/mL) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | PS 0.1% | PS 1.0% | PS 2.0% |
| 0 | $3.67 \pm 0.19^{a,12}$ | $2.90 \pm 0.14^{a,1}$ | $2.55 \pm 0.10^{a,123}$ | $0.98 \pm 0.05^{b,1}$ |
| 1 | $4.50 \pm 0.18^{a,1}$ | $2.20 \pm 0.04^{b,1}$ | $1.08 \pm 0.03^{c,5}$ | $0.50 \pm 0.01^{c,2}$ |
| 2 | $3.98 \pm 0.04^{a,12}$ | $3.08 \pm 0.03^{b,1}$ | $2.72 \pm 0.02^{b,1}$ | $0.48 \pm 0.02^{c,2}$ |
| 3 | $3.18 \pm 0.02^{a,2}$ | $2.95 \pm 0.04^{ab,1}$ | $2.58 \pm 0.04^{b,12}$ | $0.42 \pm 0.03^{c,23}$ |
| 4 | $3.75 \pm 0.06^{a,12}$ | $2.96 \pm 0.06^{b,1}$ | $2.25 \pm 0.02^{c,23}$ | $0.35 \pm 0.02^{d,23}$ |
| 5 | $3.95 \pm 0.04^{a,12}$ | $2.90 \pm 0.02^{b,1}$ | $2.18 \pm 0.02^{c,23}$ | $0.28 \pm 0.01^{d,23}$ |
| 6 | $4.23 \pm 0.04^{a,12}$ | $2.37 \pm 0.04^{b,1}$ | $2.62 \pm 0.04^{b,12}$ | $0.22 \pm 0.01^{c,23}$ |
| 7 | $4.58 \pm 0.04^{a,1}$ | $2.25 \pm 0.01^{b,1}$ | $1.95 \pm 0.05^{b,34}$ | $0.17 \pm 0.01^{c,3}$ |
| 9 | $3.90 \pm 0.03^{a,12}$ | $2.32 \pm 0.04^{b,1}$ | $1.47 \pm 0.02^{c,45}$ | $0.10 \pm 0.01^{d,3}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**6.2 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น**

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากน้ำเชื้อปลากะพงขาวเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่เติมยาปฏิชีวนะ PS พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปที่พบในน้ำเชื้อของชุดควบคุม ได้แก่ *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *Listeria ivanovii*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *C. paurometabolum* และ *Staphylococcus saccharolyticus* โดยพบ *B. mycoides* ในทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลาการทดลอง และพบ *L. ivanovii* ในชุดควบคุมจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง นอกจากนั้นยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 2.0% สามารถยับยั้ง *S. saccharolyticus*, *L. ivanovii* และ *B. cereus* ได้ตั้งแต่วันที่ 0, 1 และ 3 ของการทดลอง ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่า *C. paurometabolum* และ *C. pseudodiphtheriticum* ไวต่อยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% และ 1.0% ตามลำดับ ดังตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** ผลของยาปฏิชีวนะ PS ต่อชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปที่แยกจากน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่เย็น

| แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรป | ระยะเวลาที่ทำการทดลอง | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | วันที่ 0 | | | | วันที่ 1 | | | | วันที่ 2 | | | | วันที่ 3 | | | | วันที่ 4 | | | | วันที่ 5 | | | | วันที่ 6 | | | | วันที่ 7 | | | | วันที่ 9 | | | |
| | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS | Control | 0.1% PS | 1.0% PS | 2.0% PS |
| *Bacillus cereus* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *B. mycoides* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *Listeria ivanovii* | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| *Staphylococcus saccharolyticus* | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *C. paurometabolum* | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**หมายเหตุ** + คือ พบ

- คือ ไม่พบ

**7. การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อแช่เย็นในการปฏิสนธิกับไข่**

น้ำเชื้อปลากะพงขาวได้ถูกแช่เย็นด้วย Ringer's solution ในวันที่ 0 (Extended semen) เมื่อนำไปผสมเทียมกับไข่ปลากะพงขาวที่รีดออกมาจากแม่ปลากะพงขาว ปรากฏว่าสามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาได้ 72.4 ± 4.6% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับน้ำเชื้อสด (Fresh milt) ที่ให้ค่าอัตราปฏิสนธิกับไข่ 75.1 ± 5.8% เช่นเดียวกับน้ำเชื้อแช่เย็นวันที่ 2 ที่สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 66.1 ± 6.2% (ตารางที่ 14) อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษาไว้นาน 4 วันสามารถปฏิสนธิไข่ได้เพียง 47.3 ± 3.9% สำหรับเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ที่ปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็นในวันที่ 0 และ 2 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 56.4 – 68.6% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นนาน 4 วันที่ให้เปอร์เซ็นต์การฟักเพียง 35.1% (ตารางที่ 14)

**ตารางที่ 14** ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บแช่เย็นที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของไข่ปลากะพงขาว

| ชุดการทดลอง | อัตราการปฏิสนธิ (%) | อัตราการฟัก (%) |
|---|---|---|
| น้ำเชื้อสด | $75.1 \pm 5.8^{a}$ | $68.6 \pm 4.9^{a}$ |
| น้ำเชื้อแช่เย็นวันที่ 0 | $72.4 \pm 4.6^{a}$ | $65.7 \pm 3.7^{a}$ |
| น้ำเชื้อแช่เย็นวันที่ 2 | $66.1 \pm 6.2^{a}$ | $56.4 \pm 2.9^{a}$ |
| น้ำเชื้อแช่เย็นวันที่ 4 | $47.3 \pm 3.9^{b}$ | $35.1 \pm 7.8^{a}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

**8. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่อุณหภูมิต่ำโดยการใช้สมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย**

**8.1 ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น**

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน เหง้ากระชายดำ เหง้าไพล ใบฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร ใบมะรุม เหง้าขมิ้นเครือ ต้นใต้ใบ เหง้ากระชายและมะระขี้นก ที่มีความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 95.04 ± 3.56 % ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ (0 % PS) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 93.35 ± 2.34 % ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติม 0.1 % PS และชุดการทดลองที่เติมสารสกัดจากไพล ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย กระชายดำ กระชายขาว มะระขี้นก มะรุม ฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง และใต้ใบ

มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตต่ำกว่าชุดที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 86.52 ± 2.41, 89.98 ± 1.48, 90.54 ± 3.88, 90.73 ± 3.64, 91.76 ± 3.72, 91.29 ± 4.19, 92.88 ± 2.65, 91.48 ± 3.04, 76.87 ± 2.39, 88.67 ±4.20 และ 89.04 ± 3.07% ตามลำดับ

เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวเป็นเวลา 2 วัน พบว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติม 0.1 % PS สารสกัดไพล ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย กระชายดำ กระชายขาว มะรุม ฟ้าทะลายโจร และใบฝรั่งสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25.94 ± 3.34, 42.88 ± 5.89, 33.33 ± 4.01, 28.00 ± 3.63, 34.18 ± 6.23, 36.33 ± 5.96, 31.27 ± 5.48, 36.52 ± 8.06, 31.37 ± 4.21 และ 37.73 ± 6.03 % ส่วนชุดการทดลองที่เติมสารสกัดจากมะระขี้นก และใต้ใบ สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้น้อยที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองดังกล่าวข้างต้น โดยมีค่าเท่ากับ 25.94 ± 5.23 และ 23.69 ± 4.40 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15

**ตารางที่ 15** ผลของสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาว

| ชุดการทดลอง | เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (%) | | |
|---|---|---|---|
| | วันที่ 0 | วันที่ 1 | วันที่ 2 |
| น้ำเชื้อสด | 95.04 ± 3.56 $^{1}$ | | |
| Control | 93.35 ± 2.34 $^{a,1}$ | 88.48 ± 3.69 $^{b,1}$ | 25.94 ± 3.34 $^{c,45}$ |
| 0.1% PS | 86.52 ± 2.41 $^{a,3}$ | 85.49 ± 2.31 $^{a,1}$ | 42.88 ± 5.89 $^{b,1}$ |
| ไพล | 89.98 ± 1.48 $^{a,123}$ | 85.77 ± 2.77 $^{b,1}$ | 33.33 ± 4.01 $^{c,23}$ |
| ขมิ้นชัน | 90.54 ± 3.88 $^{a,123}$ | 89.70 ± 4.43 $^{a,1}$ | 28.00 ± 3.63 $^{b,345}$ |
| ขมิ้นอ้อย | 90.73 ± 3.64 $^{a,12}$ | 88.76 ± 4.94 $^{a,1}$ | 34.18 ± 6.23 $^{b,23}$ |
| กระชายดำ | 91.76 ± 3.72 $^{a,12}$ | 90.26 ± 3.21 $^{a,1}$ | 36.33 ± 5.96 $^{b,12}$ |
| กระชายขาว | 91.29 ± 4.19 $^{a,12}$ | 87.55 ± 3.09 $^{a,1}$ | 31.27 ± 5.48 $^{b,34}$ |
| มะระขี้นก | 92.88 ± 2.65 $^{a,12}$ | 88.86 ± 3.88 $^{a,1}$ | 25.94 ± 5.23 $^{b,45}$ |
| ใบมะรุม | 91.48 ± 3.04 $^{a,12}$ | 88.48 ± 2.81 $^{a,1}$ | 36.52 ± 8.06 $^{b,12}$ |
| ฟ้าทะลายโจร | 76.87 ± 2.39 $^{a,4}$ | 74.53 ± 3.33 $^{a,2}$ | 31.37 ± 4.21 $^{b,34}$ |
| ใบฝรั่ง | 88.67 ± 4.20 $^{a,23}$ | 88.30 ± 4.53 $^{a,1}$ | 37.73 ± 6.03 $^{b,12}$ |
| ใต้ใบ | 89.04 ± 3.07 $^{a,23}$ | 87.73 ± 6.50 $^{a,1}$ | 23.69 ± 4.40 $^{b,5}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
Control: ไม่เติมยาปฏิชีวนะและสารสกัดสมุนไพร
0.1% PS: เติม PS 0.1%

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ที่มีความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 100.00 ± 0.001 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ (0% PS) น้ำเชื้อที่เติมสารสกัดเหง้าไพล เหง้าขมิ้นชัน เหง้าขมิ้นอ้อย เหง้ากระชายดำ ผลมะระขี้นก ใบมะรุม ใบฝรั่งและต้นใต้ใบ โดยมีค่าเท่ากันทั้งหมด (100.00 ± 0.00) ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติม 0.1% PS สารสกัดเหง้ากระชายขาว และใบฟ้าทะลายโจร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ค่อนข้างต่ำและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ

ชุดการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เท่ากับ 86.67 ± 10.33, 90.00 ± 10.95, 73.33 ± 10.33 ตามลำดับ

เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวเป็นเวลา 2 วัน พบว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมสารสกัดไพล ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย มะระขี้นก ฟ้าทะลายโจรและใต้ใบ สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้น้อยที่สุด ซึ่งชุดการทดลองที่เติมสารสกัดไพล ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย มะระขี้นกและฟ้าทะลายโจร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลงเหลือเพียง 20.00 ± 0.00 และชุดการทดลองที่เติมสารสกัดต้นใต้ใบ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 23.33 ± 8.16 ส่วนชุดการทดลองที่เติม 0.1% PS สารสกัดเหง้ากระชายดำ เหง้ากระชายขาว ใบมะรุมและใบฝรั่ง สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ได้สูงกว่าชุดการทดลองดังกล่าวข้างต้นและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 26.67 ± 10.33, 30.00 ± 10.95, 26.67 ± 10.33, 43.33 ± 8.16, 33.33 ± 10.33 ตามลำดับ โดยที่น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เติมสารสกัดจากใบมะรุม สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 16

**ตารางที่ 16** ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว

| ชุดการทดลอง | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว | | |
|---|---|---|---|
| | วันที่ 0 | วันที่ 1 | วันที่ 2 |
| น้ำเชื้อสด | $100.00 \pm 0.00^{1}$ | - | - |
| Control | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $80.00 \pm 0.00^{b,12}$ | $20.00 \pm 0.00^{c,4}$ |
| 0.1% PS | $86.67 \pm 10.33^{a,2}$ | $80.00 \pm 0.00^{a,12}$ | $26.67 \pm 10.33^{b,34}$ |
| เหง้าไพล | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $66.67 \pm 10.33^{b,3}$ | $20.00 \pm 0.00^{c,4}$ |
| เหง้าขมิ้นชัน | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $20.00 \pm 0.00^{b,4}$ | $20.00 \pm 0.00^{b,4}$ |
| เหง้าขมิ้นอ้อย | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $20.00 \pm 0.00^{b,4}$ | $20.00 \pm 0.00^{b,4}$ |
| เหง้ากระชายดำ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $86.67 \pm 10.33^{a,1}$ | $30.00 \pm 10.95^{b,23}$ |
| เหง้ากระชายขาว | $90.00 \pm 10.95^{a,2}$ | $63.33 \pm 8.16^{b,3}$ | $26.67 \pm 10.33^{c,34}$ |
| ผลมะระขี้นก | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $76.67 \pm 8.16^{b,2}$ | $20.00 \pm 0.00^{c,4}$ |
| ใบมะรุม | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $66.67 \pm 10.33^{b,3}$ | $43.33 \pm 8.16^{c,1}$ |
| ใบฟ้าทะลายโจร | $73.33 \pm 10.33^{a,3}$ | $60.00 \pm 0.00^{a,3}$ | $20.00 \pm 0.00^{b,4}$ |
| ใบฝรั่ง | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $83.33 \pm 8.16^{a,12}$ | $33.33 \pm 10.33^{b,2}$ |
| ต้นใต้ใบ | $100.00 \pm 0.00^{a,1}$ | $76.67 \pm 8.16^{b,2}$ | $23.33 \pm 8.16^{c,34}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
Control: ไม่เติมยาปฏิชีวนะและสารสกัดสมุนไพร
0.1% PS: เติม PS 0.1%

**8.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อปริมาณและชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่เย็น**

จากการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ เหง้าไพล เหง้าขมิ้นชัน เหง้าขมิ้นอ้อย เหง้ากระชายดำ เหง้ากระชายขาว ผลมะระขี้นก ใบมะรุม ใบฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่งและต้นใต้ใบความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ $1.11 \pm 0.20 \times 10^{3}$ CFU/mL ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เติม 0.1% PS เหง้าขมิ้นอ้อย เหง้ากระชายดำและผลมะระขี้นก ซึ่งมี

ค่าเท่ากับ 0.60 ± 0.23, 0.38 ± 0.10, 0.88 ± 0.36 และ 2.53 ± 0.88 x $10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมเหง้าไพล เหง้าขมิ้นชัน เหง้ากระชายขาว ใบมะรุม ใบฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่งและต้นใต้ใบ มีปริมาณแบคทีเรียค่อนข้างสูง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น โดยมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ 27.67 ± 3.67, 20.37 ± 2.70, 9.40 ± 0.99, 97.50 ± 5.82, 23.02 ± 1.23, 7.28 ± 0.58, 22.03 ± 1.47 และ 18.50 ± 3.23 x $10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เติมสารสกัดเหง้ากระชายขาวมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม

เมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวเป็นเวลา 2 วัน พบว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมเหง้ากระชายขาว ผลมะระขี้นก ใบฟ้าทะลายโจรและใบฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเพิ่มขึ้น เท่ากับ 142.00 ± 22.41, 108.67 ± 10.93, 7.27 ± 0.77, 46.50 ± 8.00 และ 30.17 ± 3.66 x $10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติม 0.1% PS เหง้าไพล เหง้าขมิ้นชัน เหง้าขมิ้นอ้อย เหง้ากระชายดำ ใบมะรุมและต้นใต้ใบ มีปริมาณลดลงอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม โดยมีปริมาณลดลงเหลือ 1.33 ± 0.52, 0.33 ± 0.01, 0.10 ± 0.06, 0.33 ± 0.13, 0.20 ± 0.11, 1.97 ± 0.63 และ 5.93 ± 0.76 x $10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17

**ตารางที่ 17** ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวในการทดลองภายใต้สภาวะต่าง ๆ

| ชุดการทดลอง | ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรป (x $10^3$ CFU/mL) | |
|---|---|---|
| | ระยะเวลาการทดลอง (วัน) | |
| | 0 | 1 |
| น้ำเชื้อสด | 1.11 ± 0.20$^{c}$ | - |
| Control | 27.67 ± 3.67$^{b,2}$ | 142.00 ± 22.41$^{a,1}$ |
| 0.1% PS | 0.60 ± 0.23$^{b,6}$ | 1.33 ± 0.52$^{a,5}$ |
| เหง้าไพล | 20.37 ± 2.70$^{a,34}$ | 0.03 ± 0.01$^{b,5}$ |
| เหง้าขมิ้นชัน | 9.40 ± 0.99$^{a,5}$ | 0.10 ± 0.06$^{b,5}$ |
| เหง้าขมิ้นอ้อย | 0.38 ± 0.10$^{a,6}$ | 0.33 ± 0.13$^{a,5}$ |
| เหง้ากระชายดำ | 0.88 ± 0.36$^{a,6}$ | 0.20 ± 0.11$^{b,5}$ |
| เหง้ากระชายขาว | 97.50 ± 5.82$^{b,1}$ | 108.67 ± 10.93$^{a,2}$ |
| ผลมะระขี้นก | 2.53 ± 0.88$^{b,6}$ | 7.27 ± 0.77$^{a,5}$ |
| ใบมะรุม | 23.02 ± 1.23$^{a,3}$ | 1.97 ± 0.63$^{b,5}$ |
| ใบฟ้าทะลายโจร | 7.28 ± 0.58$^{b,5}$ | 46.50 ± 8.00$^{a,3}$ |
| ใบฝรั่ง | 22.03 ± 1.47$^{b,3}$ | 30.17 ± 3.66$^{a,4}$ |
| ต้นใต้ใบ | 18.50 ± 3.23$^{a,4}$ | 5.93 ± 0.76$^{b,5}$ |

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
Control = ชุดควบคุมที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ PS และสารสกัดสมุนไพร
0.1% PS = ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS 0.1%

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียจากน้ำเชื้อปลากะพงขาวเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่เติมสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในน้ำเชื้อสด ได้แก่ *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter* sp., *Yersinia ruckeri*, *Kluyvera cryocrescens*, *Staphylococcus xylosus*, *Bacillus subtilis*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. thuringiensis/cereus* และ *B. brevis/sphaericus* และในชุดควบคุมพบแบคทีเรียชนิดเดียวกับน้ำเชื้อสด ยกเว้น *Y. ruckeri* นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวเป็นเวลา 3 วัน

สารสกัดไพล กระชายดำ ใบฝรั่ง ใต้ใบและมะระขี้นก มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิด ยกเว้น *B. circulans* อีกทั้งสารสกัดจากกระชายขาวก็มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีเช่นเดียวกัน โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด ยกเว้น *Acinetobacter* sp. ดังแสดงในตารางที่ 18

**ตารางที่ 18** แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวในการทดลองภายใต้สภาวะต่าง ๆ

| ชนิดของแบคทีเรีย | ระยะเวลาการแช่เย็น | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | วันเริ่มต้นการทดลอง (Day 0) | | | | | | | | | | | | วันสุดท้ายของการทดลอง (Day 2) | | | | | | | | | | |
| | น้ำเชื้อสด | Control | 0.1% PS | ไพล | ขมิ้นชัน | ขมิ้นอ้อย | กระชายดำ | กระชายขาว | มะระขี้นก | ใบมะรุม | ฟ้าทะลายโจร | ใบฝรั่ง | ใต้ใบ | Control | 0.1% PS | ไพล | ขมิ้นชัน | ขมิ้นอ้อย | กระชายดำ | กระชายขาว | มะระขี้นก | มะรุม | ฟ้าทะลายโจร | ใบฝรั่ง | ใต้ใบ |
| *Pseudomonas putida* | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| *Sphingomonas paucimobilis* | + | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Acinetobacter* sp. | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - |
| *Yersinia ruckeri* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Kluyvera cryocrescens* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Staphylococcus xylosus* | + | + | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Bacillus subtilis* | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *B. firmus* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *B. circulans* | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + |
| *B. coagulans* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *B. thuringiensis/cereus* | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *B. brevis/sphaericus* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |

Control: ไม่เติมยาปฏิชีวนะและสารสกัดสมุนไพร 0.1% PS: เติม PS 0.1% +: พบ -: ไม่พบ

เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด พบว่าสารสกัดไพล กระชายดำ ใบฝรั่ง และใบมะรุม มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นและทำการศึกษาเชิงลึกต่อไป เพราะสารสกัดทั้ง 4 ชนิดนี้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย กระชายขาว มะระขี้นก ฟ้าทะลายโจรและใต้ใบ รวมทั้งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวและยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในน้ำเชื้อได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas putida* และ *Yersinia ruckeri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลา *Sphingomonas paucimobilis* และ *Acinetobacter* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ที่พบในการทดลองครั้งนี้

# บทที่ 6
# สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

## สรุปผลการทดลอง

สูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นคือ การเก็บรักษาในน้ำยา Ringer's solution โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 7 วัน รองลงมาคือ น้ำยาสูตร Modified Ca-F-HBSS และ Marine solution ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5 วัน

การเติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นมากที่สุด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงสุด (37.17 ± 2.04%) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม (31.17 ± 2.04%) โดยชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% สามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปให้ลดลงเหลือ 2.32 ± 0.04, 1.47 ± 0.02 และ 0.10 ± 0.01 × $10^3$ CFU/mL ตามลำดับ และชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 24.83 ± 2.38 และ 20.58 ± 1.63% ตามลำดับ ณ วันสุดท้ายของการทดลอง ถึงแม้ว่าเมื่อยาปฏิชีวนะมีความเข้มข้นสูงสุดจะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปต่ำที่สุด

การใช้สารสกัดไพล กระชายดำ ใบมะรุมและใบฝรั่งมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น เนื่องจากการใช้สารสกัดสมุนไพรดังกล่าวสามารถรักษาค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น และใกล้เคียงกับการใช้ยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% รวมทั้งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียและกำจัดแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ คือ *Pseudomonas putida* และกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ คือ *Sphingomonas paucimobilis* และ *Acinetobacter* sp. ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงการใช้สารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดนี้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นต่อไป เพื่อใช้แทนยาปฏิชีวนะซึ่งก่อให้เกิดการพัฒนาของแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะยังก่อให้เกิดการตกค้างในสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

## อภิปรายผลการทดลอง

คุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวมีการเปลี่ยนแปลงในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งเหมือนกับการทดลองในปลาไหลที่พบว่าความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Sahinoz et al. 2007) การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของปลาในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เป็นปรากฏการณ์ที่มักพบทั่วไปในปลาหลายชนิด เช่น

Atlantic cod (Rouxel et al., 2008), Striped bass (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) เป็นต้น ซึ่งเชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องกับอายุของสเปิร์ม (Sperm aging) ที่มีการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ (Sperm plasma membrane) และระดับฮอร์โมนเพศในร่างกาย (Suquet et al., 1998)

รูปแบบของภาชนะเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาที่อาจยาวขึ้น หรือสั้นลง เช่น สาเหตุที่ทำให้การใช้ Centrifuge tube สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้สั้นที่สุดนั้น เนื่องจากพื้นที่ผิวของน้ำเชื้อเมื่ออยู่ใน Centrifuge tube มีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ทำให้สเปิร์มที่เก็บรักษาอยู่อาจเกิดสภาวะขาดอากาศที่จำเป็นสำหรับการมีชีวิตรอดของเปิร์ม Truscott et al. (1968) ได้รายงานว่าการสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการลดลงของ pH อย่างรวดเร็วระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อน่าจะมีส่วนทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลา Atlantic salmon ลดลง Harvey and Kelley (1984) รายงานว่าน้ำเชื้อสดของปลาหมอเทศที่แช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะหยุดเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเมื่อแช่เย็นไว้เพียง 60-120 ชั่วโมง Ritar and Campet (2000) รายงานว่าน้ำเชื้อปลา Striped trumpeter ที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูงอยู่เมื่อเก็บไว้ 2 วัน แต่จะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นและหยุดเคลื่อนที่ภายใน 8 วัน

การใช้ Plastic bag เก็บรักษาน้ำเชื้อให้ผลการเก็บรักษาดีที่สุด ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากพื้นที่ผิวของถุงพลาสติกที่มาก ทำให้สเปิร์มได้รับอากาศ หรือออกซิเจนมีชีวิตนานขึ้นเพราะได้รับอากาศหรือออกซิเจนมากขึ้น ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับ DiLauro et al. (1994) ที่แช่เย็นน้ำเชื้อปลา Atlantic sturgeon ในถุงพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 6 วัน การใช้ออกซิเจนสมทบในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของปลาที่รวบรวมออกมาใหม่ ๆ ให้พบว่าให้ผลการเก็บรักษาที่ดีกว่าการใช้อากาศหรือก๊าซไนโตรเจน ดังเช่นที่พบในน้ำเชื้อปลา Striped bass หลังการแก็บรักษาผ่านไป 48 ชั่วโมง (Jenkins-Keeran et al., 2001) ข้อมูลวิจัยจากการแช่เย็นน้ำเชื้อสดของปลากะพงขาวเมื่อใช้ออกซิเจนสมทบให้ผลที่ดีกว่าการให้อากาศน่าจะชี้ให้เห็นว่าน้ำเชื้อของปลากะพงขาวที่มีการปฏิสนธิภายนอกร่างกายน่าจะมีขบวนการเมแทบอลิซึมที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจน (Aerobic metabolism) มากกว่าขบวนการเมแทบอลิซึมในสภาวะขาดอากาศ (Glycolytic metabolism) (Mann, 1964) ดังเช่นที่พบในน้ำเชื้อของผู้ชาย (Human sperm) ที่การให้อากาศหรือออกซิเจนสมทบในการเก็บแช่เย็นจะให้ผลการเก็บรักษาที่สั้น เนื่องจากน้ำเชื้อผู้ชายจะเป็นอันตรายในสภาวะ Oxidative damage (Aitken et al., 1998) งานวิจัยต่อไปควรศึกษาถึงอัตราการระเหย (Evaporation rate) ของน้ำเชื้อสดที่แช่เย็นในภาชนะ เพราะว่าน้ำเชื้อปลากะพงขาวในทุกชุดการทดลองมีลักษณะที่เหนียวขึ้น (Viscosity) เมื่อเวลาเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้อาจช่วยทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อสดทำได้นานขึ้น และการใช้ออกซิเจนสมทบในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวจะให้ผลที่ดี แต่ก็ควรวิจัยเพิ่มเติมว่ามีความคุ้มทุนในการใช้ออกซิเจนในต้นทุนการผลิตมากน้อยเพียงใด

จากการหาค่าแรงดันออสโมติกพบว่า แรงดันออสโมติกของสารละลาย KCl, NaCl, $CaCl_2$, Glucose และ Mannitol ที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงขึ้นจะกระตุ้นให้สเปิร์มปลากะพงขาวเคลื่อนที่มากขึ้น สอดคล้องกับ Krasznai et al. (2003) ที่พบว่าการใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกที่สูงกว่าของเหลวที่หล่อเลี้ยง (Seminal plasma) มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และสอดคล้องกับ Morisawa et al. (1983) ที่รายงานว่า ค่าแรงดันออสโมติกที่สมดุลกับของเหลวที่หล่อเลี้ยงทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่

จากการทดลองหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น พบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อสด (Freshly collected milt) สามารถเก็บรักษาได้นาน 3 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อผสมน้ำยา (Extended milt) พบว่าสูตรน้ำยา (Extender) ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นได้นานที่สุดคือ Ringer's solution ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นาน 7 วัน รองลงมาคือ Modified Ca-Free- HBSS และ Marine solution ที่เก็บรักาได้นาน 5 วันเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดแบบไม่ผสมน้ำยาจะมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาได้สั้นกว่าการเก็บรักษาแบบผสมน้ำยา อาจเนื่องจากน้ำเชื้อสดเมื่อนำออกมาอยู่ในภาชนะเก็บรักษาจะมีโอกาสสัมผัสกับอากาศและอาจทำให้มีการระเหยของน้ำเชื้อ ทำให้คุณสมบัติของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป ในขณะที่การนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในน้ำยาหรือสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีแร่ธาตุหรือน้ำตาลที่ใกล้เคียงกับที่พบในของเหลวที่หล่อเลี้ยงได้เป็นน้ำเชื้อเจือจางนั้นจะช่วยปกป้องเซลล์สเปิร์มในสารละลายทำให้สเปิร์มเสมือนอยู่ในของเหลวที่หล่อเลี้ยงตลอดเวลา โดยที่สภาวะการระเหยเกิดขึ้นน้อยกว่าการแช่เย็นน้ำเชื้อสด จึงทำให้น้ำเชื้อแช่เย็นสามารถเก็บได้นาน (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้โดยการรีดน้ำเชื้อปลากะพงขาวแล้วเจือจางด้วยสูตรน้ำยาหรือบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก็สามารถนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปใช้ผสมเทียมกับไข่ปลากะพงขาวได้ต่อไป

จากการศึกษาหาสูตรน้ำยา (Extender) และอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นในอัตราส่วน 1:3, 1:6 และ1:9 พบว่าน้ำยาสูตร Ringer's solution อัตราส่วน 1:6 มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาสเปิร์มปลากะพงขาวแบบแช่เย็น โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ 36 ชั่วโมงเท่ากับ 53.33% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chao et al. (1992) ที่ใช้ Ringer's solution เป็นน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเก๋าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการศึกษาของ Renard et al. (1994) ที่ได้ทำการทดลองพบว่า Ringer's solution จัดเป็น Extender จำพวก Hypoosmotic ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาทะเล แต่ผลการทดลองที่ได้ก็ให้ผลตรงข้ามกับการทดลองของ Ji et al. (2004 ) ที่ใช้ Modified plaice Ringer's Solution เป็นน้ำยาในการเก็บรักษาสเปิร์มปลา Sea perch ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง

การศึกษาหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวเพื่อไม่กระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ระหว่างการเจือจางด้วยสารละลาย เพราะนั่นหมายถึงความล้มเหลวตั้งแต่เริ่มการทดลอง ซึ่งการแช่เย็นน้ำเชื้อด้วยการเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์จำเป็นต้องทำให้น้ำเชื้อเหมือนมี

สภาพที่ไม่เคลื่อนที่เหมือนอยู่ในอัณฑะ (Testis) จึงมั่นใจได้ว่าขณะเริ่มทดลองเจือจางน้ำเชื้อปลากะพงขาวในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้ สเปิร์มจะไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่เด็ดขาด แต่ระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อจะนานเพียงไรก็ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงไรในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น เช่นมีแร่ธาตุ หรือสารอาหารมากน้อยเพียงไร โดยทั่วไปสเปิร์มปลาน้ำทะเลจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับหรือน้อยกว่าค่าแรงดันออสโมติกของของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกมากกว่าที่พบในของเหลวที่หล่อเลี้ยง (Morisawa et al., 1983)

ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางใน Ringer's solution ในการปฏิสนธิกับไข่ปลากะพงขาวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการเก็บรักษาไว้ 4 วันเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บแช่เย็นเอาไว้ด้วยการเจือจาง Ringer's solution นั้นสามารถนำมาใช้ผสมเทียมได้ไม่เกิน 2 วันหลังการเก็บรักษา การลดลงของความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากะพงขาวในกรณีนี้น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการเก็บแช่เย็น เนื่องจากน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ ๆ มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 86.7 ± 4.9% มีค่าไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นไว้ 0 หรือ 2 วันที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มระหว่าง 78.7 – 82.5% แต่น้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นเอาไว้นาน 4 วันกลับมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเหลือประมาณ 44.7 ± 5.7% ซึ่งน่าจะทำให้โอกาสของสเปิร์มในการว่ายน้ำเข้าไปปฏิสนธิไข่น้อยลง เนื่องจากใช้อัตราส่วนของจำนวนสเปิร์มในการปฏิสนธิไข่เท่ากัน แต่จำนวนสเปิร์มที่สามารถว่ายน้ำเข้าไปปฏิสนธิไข่มีน้อยลงเหลือประมาณ 44.7 ± 5.7% เปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ที่ถูกผสมด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นในระยะเวลาไม่เกิน 2 วันที่ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดก็แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่แช่เย็นเอาไว้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผสมเทียมไม่เกิน 2 วันหลังการเก็บรักษาแช่เย็น

ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของสเปิร์มต่อไข่ได้มีการศึกษาทั้งในน้ำเชื้อสด เช่นปลาเทราต์สายรุ้ง (Lahnsteiner et al., 1997 ) และน้ำเชื้อที่แช่เย็นในปลาหมอเทศ (Harvey and Kelley, 1984) และปลาไน (Saad et al., 1988) เป็นต้น Magyary et al. (1996) ได้ศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาไนพบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการปฏิสนธิ (Positive correlation; r = 0.85) เมื่อใช้จำนวนสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่เท่ากับ $1x10^5$-$1.5x10^5$:1 อย่างไรก็ตามก็มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าสเปิร์มที่ไม่เคลื่อนที่ (Immotile sperm) ก็มีความสามรถในการปฏิสนธิกับไข่ปลาได้ เนื่องจากใช้สัดส่วนของสเปิร์มต่อไข่มากขึ้น ทำให้สเปิร์มบางส่วนถูกดันเข้าไปในช่องทางที่สเปิร์มจะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Micropyle) ได้ (Erdahl and Graham, 1987; Trippel and Neilson, 1992) การใช้จำนวนสเปิร์มที่เพิ่มขึ้นในการปฏิสนธิกับไข่ 1 ใบ (Sperm to egg ratio) จะช่วยให้สามารถปฏิสนธิไข่ได้มากขึ้น โดยเฉพาะในกรณีที่ใช้สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ต่ำ ดังที่พบในรายงานที่พบในน้ำเชื้อปลาไน (Saad et al.,1988) นอกจากนี้ก็มีรายงานว่าน้ำเชื้อปลา Walleye ที่มีสเปิร์มเคลื่อนที่ประมาณ 40% มีค่าอัตราการปฏิสนธิ

สูงกว่าน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่าเมื่อใช้จำนวนสเปิร์มเท่ากันในการปฏิสนธิไข่ (Casselman et al., 2006) Saad et al. (1988) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการปฏิสนธิกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็น 0 หลังจากเก็บรักษา 6 - 8 วัน แต่เมื่อเติมสารปฏิชีวนะ (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Streptomycin + 50 IU Bipenicillin) ในน้ำยา พบว่าในการเก็บรักษา 8 วัน สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วัน ก็ยังมีอัตราการปฏิสนธิกับไข่มีค่า 20 %

ด้วยเหตุที่น้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาไว้ไม่เกิน 2 วันในการทดลองครั้งนี้สามารถปฏิสนธิไข่ได้ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ๆ ซึ่งการเลือกใช้อัตราส่วนของสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่ด้วยการใช้สเปิร์ม $3x10^5$ ตัวในการปฏิสนธิไข่ 1 ใบของการทดลองครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสัดส่วนดังกล่าวอาจยังไม่เหมาะสม หรือยังไม่เหมาะสม (Optimize) ดีพอ ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาผลของ Sperm to egg ratios ในการปฏิสนธิไข่ปลากะพงขาวต่อไป และควรจะได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวที่มีต่อการปฏิสนธิ หรือการฟักของไข่ปลากะพงขาวต่อไปเพื่อสามารถนำข้อมูลไปใช้ผสมเทียมไข่ปลากะพงขาวให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นต่อไป แม้ว่าการผสมเทียมปลากะพงขาวจะมีความยุ่งยากในการรีดไข่แม่พันธุ์เนื่องจากแม่ปลามีขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามแม้ว่าโดยทั่วไปการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวจะเพาะพันธุ์แบบธรรมชาติ แต่การนำเทคโนโลยีการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวมาผสมเทียมกับไข่ก็มีประโยชน์ในประเด็นการจัดการภายในฟาร์มที่สามารถเพาะพันธุ์ปลาได้มากขึ้น

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียมให้ยาวนานมากขึ้น (Komrakova and Holtz, 2009; Vuthiphandchai et al., 2009a) แต่ปัญหาของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นมักประสบปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค (ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์, 2542) ซึ่งอาจจะเป็นแหล่งให้เกิดโรคระบาดของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำดังกล่าวได้ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวการเติมยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกที่จะลดปริมาณแบคทีเรียในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำ (Saad et al., 1988)

จากการศึกษาในครั้งนี้ที่ทำการศึกษาการเติมยาปฏิชีวนะ PS 3 ความเข้มข้น พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% มีค่าเท่ากับ $37.17 \pm 2.04\%$ ในวันที่ 9 ของการทดลองซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม และชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้นอื่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่าการเติมยาปฏิชีวนะในปริมาณที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวสามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นในครั้งนี้สูงกว่าชุดควบคุมอาจเป็นเพราะการเติมยาปฏิชีวนะสามารถฆ่าแบคทีเรียได้หลายชนิดยกตัวอย่างเช่น *Bacillus* , *Staphylococcus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) ซึ่งการปนเปื้อนของแบคทีเรียใน

ปริมาณสูงส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อลดต่ำลง เนื่องมาจากแบคทีเรียได้แย่งปริมาณก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจทำให้เกิดภาวะการขาดแคลนก๊าซออกซิเจนซึ่งจะส่งผลให้น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตต่ำอีกทั้งยังทำให้ความสามารถในการนำไปปฏิสนธิกับไข่ลดลงด้วยเนื่องจากแบคทีเรียจะไปปิดกั้นช่องทางที่สเปิร์มจะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Holcomb et al., 2005)

จากผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Vuthiphandchai et al. (2009b) ที่ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นโดยใช้บัฟเฟอร์ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.5% พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานถึง 10 วัน นอกจากนี้ Christensen and Tiersch (1996) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) โดยเปรียบเทียบการเก็บรักษาแบบที่เติมยาปฏิชีวนะและไม่เติมยาปฏิชีวนะพบว่า ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ รวมทั้ง Nimrat and Vuthiphandchai (2008) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% พบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะสามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของสัตว์น้ำเนื่องจากมีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงสุด (69.50 ± 3.90%) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม (57.70 ± 3.40%) และรายงานของ Stoss and Holtz (1983) กล่าวว่ายาปฏิชีวนะ Penicillin และ Streptomycin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาเทราท์สายรุ้งได้

แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการเติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้นสูง (1.0 และ 2.0%) มีผลทำให้อัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปน่าจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำเชื้อ และมีผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อ นอกจากนี้ยังมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำเชื้อในสัตว์กลุ่มยูคาริโอต (Akhter et al. 2007)

จากการเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 วัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% มีปริมาณเท่ากับ 3.67 ± 0.19, 2.90 ± 0.14, 2.55 ± 0.10 และ 0.98 ± $0.05\times10^3$ CFU/mL ตามลำดับ โดยพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปได้แตกต่างกัน โดยในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้นต่ำอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ถึงแม้ว่าในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 0.1% จะสามารถลดปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มเฮทเทอโรโทรปได้ไม่มากนัก แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้มีปริมาณแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการทดลองและเมื่อพิจารณาประกอบกับเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจากสามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้และไม่มีผลต่อ

เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ดังนั้นการเติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 0.1% มีส่วนช่วยลดการเจริญของแบคทีเรียได้ระดับหนึ่งและมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว

ส่วนชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 2.0% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียอย่างเห็นได้ชัดเจนกว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 1.0% นั่นแสดงว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 2.0% สามารถช่วยยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต เพราะเมื่อความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวจะลดลงเนื่องจากความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะที่กล่าวมาข้างต้น การลดลงของแบคทีเรียในชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ PS สอดคล้องกับการทดลองของ Akinbowale et al. (2007) ที่เปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทราท์สายรุ้งพบว่า การเติมยาปฏิชีวนะสามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ รวมทั้ง Nimrat et al. (2005) ได้ทำการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) แบบแช่เย็นโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0% และชุดควบคุม พบว่ายาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้มากกว่าความเข้มข้นต่ำและดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้น 0.1% สามารถเก็บรักษาได้นาน 7-8 วันและยังประสบผลสำเร็จในการผสมกับไข่

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดลองพบว่า ยาปฏิชีวนะ PS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Corynebacterium paurometabolum* ได้ตั้งแต่วันแรกของการทดลอง ส่วน *Staphylococcus saccharolyticus* และ *Bacillus cereus* ยับยั้งได้ในวันที่ 1 และ 4 ของการทดลอง โดย Sternbach and Varon (1992) กล่าวว่า *Staphylococcus* ไวต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Corynebacterium* เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้ (Otsuka et al., 2006) รวมถึงจากการศึกษาของ Jensen et al. (2001) รายงานว่า *Bacillus cereus* ไวต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin และ Streptomycin ทั้งอาจเป็นเพราะยาปฏิชีวนะ Penicillin ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (Volk and Wheeler, 1988) ซึ่งทำให้แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ส่งผลให้แบคทีเรียเหล่านั้นจึงหายไปในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะชนิดนี้ ในขณะที่ *Bacillus mycoides* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1% ขึ้นไป ตลอดระยะเวลาการทดลอง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ PS (Yilmaz et al. 2006) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียกลุ่มนี้มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าแลคเทมเมส (β-lactamase) ออกมาย่อยสลายยา Penicillin จึงทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ PS และสามารถสังเคราะห์ผนังเซลล์และเปปติโดไกลแคนได้ (Popham et al., 1999)

การใช้สารสกัดสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ ไพล ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย กระชายดำ กระชายขาว มะระขี้นก ใบมะรุม ฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง และใต้ใบเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวในชุดการทดลองที่เติมสารสกัดไพล ขมิ้นอ้อย กระชายดำ ใบมะรุมและใบฝรั่งมีค่าเท่ากับ 33.33 ± 4.01%, 34.18 ± 6.23%, 36.33 ± 5.96%, 36.52 ± 8.06% และ 37.73 ± 6.03% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดควบคุม (25.94 ± 3.34%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเกิดจากสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สเปิร์มปลากะพงขาว ซึ่งจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดไพล ขมิ้นอ้อย กระชายดำ ใบมะรุม และใบฝรั่งที่สกัดด้วยเอทานอลไม่มีพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต เช่น เซลล์สเปิร์มและเซลล์ต่าง ๆ ของหนูถีบจักร (*Mus musculus*) เนื่องจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (ทรงพล ชีวะพัฒน์ และคณะ, 2545; พีรรัชต์ ไทยนะ และคณะ, 2540)

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่าสารสกัดมะรุมสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำปลากะพงขาวได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 43.33 ± 8.16% ในวันที่ 2 ของการทดลอง รองลงมาคือ สารสกัดจากใบฝรั่งและกระชายดำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 33.33 ± 10.33 และ 30.00 ± 10.95% ตามลำดับ โดยชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลองดังกล่าวข้างต้นมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 20 ± 0.00% อย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดเหล่านี้ไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยมาก โดย Verma et al. (2009) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดใบมะรุม ได้แก่ Gallic acid, Chlorogenic acid, Ellagic acid และ Ferulic acid และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Kaempferol, Quercetin และ Rutin มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอของหนูทดลอง

นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เติมสารสกัดสมุนไพรมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอาจเกิดจากปัจจัยอื่น เช่น สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (Jaiarj et al., 1999; Oonmetta-aree et al., 2006) ตามปกติแล้วการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาจะทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง เนื่องมาจากแบคทีเรียได้แย่งปริมาณก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจ ทำให้เกิดภาวะการขาดแคลนก๊าซออกซิเจนซึ่งจะส่งผลให้น้ำเชื้อมีอัตราการมีชีวิตต่ำ อีกทั้งยังทำให้ความสามารถในการนำไปปฏิสนธิกับไข่ลดลงด้วย เนื่องจากแบคทีเรียจะไปปิดกั้นช่องทางที่สเปิร์มจะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Holcomb et al., 2005) รวมถึงแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและของเสียต่าง ๆ ออกมา ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อต่ำลง (Jenkins and Tiersch, 1997)

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยการเติมสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิดเป็นเวลา 2 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เติมสารสกัดไพลสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด โดยสามารถลดปริมาณแบคทีเรียให้เหลือเพียง 0.03 ± 0.01 x $10^3$ CFU/mL ในวันที่ 2 ของการทดลอง รองลงมา คือ ขมิ้นชัน กระชายดำ ขมิ้นอ้อย มะรุม ใต้ใบ และมะระขี้นก โดยมีค่าเท่ากับ 0.10 ± 0.06, 0.20 ± 0.11, 0.33 ± 0.13, 1.97 ± 0.63, 5.93 ± 0.76, และ 7.27 ± 0.77x $10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่มีค่าเท่ากับ 142.00 ± 22.41 x $10^3$ CFU/mL แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลองที่เติม 0.1% PS ที่มีค่าเท่ากับ 1.33 ± 0.52 x $10^3$ CFU/mL ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1%

จากการเปรียบเทียบชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในน้ำเชื้อปลากะพงขาวในชุดควบคุมกับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดสมุนไพร 10 ชนิดที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าชุดควบคุมพบแบคทีเรียที่ปนเปื้อน 6 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus circulans* ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมสารสกัดไพล กระชายดำ มะระขี้นก ใบฝรั่งและใต้ใบมีการปนเปื้อนของ *Bacillus circulans* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาว ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย โดย Cheeptham et al. (2002) ได้รายงานว่าสารสกัดจากไพลสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสาร Curcuminoids ที่เป็นสารสำคัญของสารสกัดไพลมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและดีเอ็นเอ นอกจากนี้ Oonmetta-aree et al. (2006) รายงานว่าพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae (ข่า ขิง ขมิ้นและกระชาย) มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ซึ่งในสารสกัดดังกล่าวมีสารประกอบฟีนอลที่สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้คุณสมบัติการคัดเลือกสารผ่านเข้าออกเซลล์สูญเสียไป (Wu and Ng, 2008) เช่นเดียวกับพืชสมุนไพรในวงศ์ Cucurbitaceae (ตำลึงและมะระขี้นก) สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้ด้วยฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลเช่นเดียวกัน (Farrukh et al., 2008)

จากรายงานวิจัยของ Jaiarj et al. (1999) ได้รายงานว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีสารฟลาโวนอยด์ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ β-*Streptococcus* group A นอกจากนี้สารสกัดจากใต้ใบมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Lactobacillus* sp., *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* (Lopez et al., 2003)

นอกจากนั้นการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus xylosus*, *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis/cereus*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. coagulans* และ *B. brevis/sphaericus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*Pseudomonas putida*, *Kluyvera cryocrescens*, *Acinetobacter* sp. และ *Sphingomonas paucimobilis*) เนื่องจากความแตกต่างของสภาพ

ความไวต่อสารสกัดของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ กล่าวคือผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอกที่เป็นชั้นของลิพิดและ Periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก จึงทำให้สารออกฤทธิ์ในสารสกัดสมุนไพร เช่นสารกลุ่มฟีนอลิกซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนั้นในการทดลองครั้งนี้ใช้เอทานอลซึ่งเป็นสารที่มีขั้วในการสกัดสมุนไพร ดังนั้นสารสกัดที่ได้จึงน่าจะมีขั้วจึงทำให้สารที่สกัดได้ผ่านเข้าเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบที่ผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยชั้นของลิพิดที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว (Zhang et al., 2009) จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกตายในที่สุด

เมื่อพิจารณาผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ต่ออัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด พบว่าสารสกัดไพล กระชายดำ ใบฝรั่ง และใบมะรุม มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็นและทำการศึกษาเชิงลึกต่อไป เพราะสารสกัดทั้ง 4 ชนิดนี้มีผลต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย กระชายขาว มะระขี้นก ฟ้าทะลายโจร และใต้ใบ รวมทั้งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาว และยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในน้ำเชื้อได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas putida*, *Yersinia ruckeri* และ *B. brevis/sphaericus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลา และ *Sphingomonas paucimobilis* และ *Acinetobacter* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ที่พบในการทดลองครั้งนี้

# เอกสารอ้างอิง


กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. (2541). *การเพาะเลี้ยงพืชและสัตว์น้ำ*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

จุฑามาศ พบสุข. (2546). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็น*. ปัญหาทางวาริชศาสตร์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ทรงพล ชีวะพัฒน์, เอมมนัส อัตตวิชญ์, ธิดารัตน์ บุญรอด, พิลาศลักษณ์ อัครชลานนท์, ประถม ทองศรีรักษ์ และมาลี บรรจบ. (2545). *การศึกษาพิษเฉียบพลันของใบมะรุม*. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

พีรรัชต์ ไทยนะ, มาลินี วงศ์นาวา, วีรวัฒน์ มหัทธนตระกูล นิสิตา, บำรุงวงศ์ วันดี, อุดมอักษร, อำพล รังสิมาพงศ์, อนุพงศ์ นิติเรืองจรัส และปนัดดา มุสิกวัณณ์. (2540). *การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบฝรั่งในหนูขาวใหญ่*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, ภาควิชาเภสัชวิทยาและภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์และคณะแพทย์ศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์. (2542). ปลากะพงขาวสัตว์น้ำเศรษฐกิจครองตลาด. *วารสารกสิกร*, 72(2), 149-163.

วิศว วิชิตวรกุล. (2543). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่เย็น*. ปัญหาทางวาริชศาสตร์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2535). *การผสมพันธุ์สัตว์น้ำ*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). *การเพาะพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2548). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยแบบแช่เย็นและแบบแช่เข็งเพื่อการผสมเทียม*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, ภาควิชาวาริชศาสตร์และภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สโมสรนิสิตคณะประมง. (2531). *การเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว: หลักการและแนวปฏิบัติ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุณีย์ ดวงใหญ่. (2545). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (Pangaslas larneudii) แบบแช่เย็น*. ปัญหาทางวาริชศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และกาญจนา หริ่มเพ็ง. (2551). *การประยุกต์ใช้สมุนไพรและสูตรยาสมุนไพรในภาคตะวันออกเพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็น.* รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุพัตรา วิจิตราพันธุ์. (2543). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็น.* ปัญหาทางวาริชศาสตร์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุภาพร สุกสีเหลือง. (2542). *มีนวิทยา.* กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2538). *การเพาะขยายพันธุ์ปลา.* ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุธร ฤทธิลึก. (2550). *การเลี้ยงปลาเพื่อการค้า.* กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Mllne, P., Jennings, Z., and Irvine, D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59, 1037-1046.

Akhter, S., Sajjad, M., Andrabi, S. M. H., Ullah, N., and Qayyum, M. (2007). Effect of antibiotics in extender on fertility of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Veterinary Journal*, 27(1), 23-16.

Akinbowale, O. L., Peng, H., Grant, P., and Barton, M. D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout farms in Australia. *International Journal of Agents*, 30, 177-182.

Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G., and Johnsen, S. (2006). Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. II: Effect of spermiation advancement, catheterization of semen, and production-scale application. *Theriogenology*, 66, 2036-2046.

Billard, R. (1988). Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine Behavior & Physiology*, 14, 3-21.

Brown, G. G., and Mims, S. D. (1995). Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish semen. *The Progressive Fish-Culturist*, 57, 64-69.

Casselman, S.J., Schulte-Hostedde, A.I., and Montgomerie, R. (2006). Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 63, 2119-2125.

Chao, N. H., Tsai,H. P., and Liao, I. C. (1992). Short-and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fisheries Science*, 5, 103-116.

Cheeptham, N., and Towers, G. H. N. (2002). Light-mediated activities of some Thai medicinal plant teas. *Fitoterapia*, 73, 651-662.

Christensen, J. M., and Tiersch, T.R. (1996). Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27, 340-346.

DiLauro, M. N., Krise, W. F., Hendrix, M. A., and Baker, S. E. (1994). Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish-Culturist*, 56, 143-144.

Erdahl, A.W, and Graham, E.F. (1987). Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. *Aquaculture*, 60, 311-321.

Farrukh, U., Shareef, H., Mahmud, S., Ali, S. A., and Rizwani, G. H. (2008). Antibacterial activities of *Coccinia grandis* L. *Pakistan Journal of Botany*, 40(3), 1259-1262.

Harvey, B., and Kelley, R. N. (1984). Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* semen. *Aquaculture*, 36, 85-95.

Holcomb, M., Cloud, J. G., and Ingermann, R. L. (2005). Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquaculture Research*, 36(15), 1555-1561.

Jaiarj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, S., and Ruangsomboon, O. (1999). Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 203-212.

Jenkins, J. A., and Tiersch, T. R. (1997). A preliminary bacteriological study of refrigerated Channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28, 282-288.

Jenkins-Keeran, K., Schreuders, P., Edwards, K., and Woods, L. C. (2001). The effects of oxygen on the short-term storage of striped bass sperm. *North American Journal of Aquaculture*, 63, 238-241.

Jensen, L. B., Baloda, S. B., Boye, M., and Aarestrup, F. M. (2001). Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environment International*, 26, 581-587.

Ji, X. S., Chen, S. L., Tian, Y. S., Yu, G. C., Sha, Z. X., Xu, M. Y., and Zhang, S. C. (2004). Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production scale fertilization. *Aquaculture*, 241, 517-528.

Komrakova, M., and Holtz, W. (2009). Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture*, 286, 156-163.

Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S.,Tron, L., Gaspar, R., and Marian, T. (2003). Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources*, 16, 445-449.

Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A. (1997). Aging processes of rainbow trout semen during storage. *Progressive Fish-Culturist*, 59, 272-279.

Lopez, C. M., Nitisinprasert, S., Wanchaitanawong, P., and Poovarodom, N. (2003). Antimicrobial activity of medicinal plant extracts against foodborne spoilage and pathogenic microorganisms. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 37, 460-467.

Magyary, I., Urbanyi, B., and Horvath, L. (1996). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 117-119.

Mann, T. (1964). *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* London: Methuen and Co.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., and Yasuda, K. (1983). Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 107, 95-103.

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

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(1), 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.

Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., and Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Technology*, 39, 1214-1220.

Otsuka, Y., Ohkusu, K., Kawamura, Y., Baba, S., Ezaki, T., and Kimura, S. (2006). Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54, 109-114.

Popham, D. L., Gilmoreopham, M. E., and Setlow, P. (1999). Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *Journal of Bacteriology*, 181, 126-132.

Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., and Bennett, B. C. (2008). Effect of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 418-428.

Rana, K. (1995). Preservation of gametes. In N. R. Bromage and R. J. Roberts (Eds.), Broodstock Management and Egg and Larval Quality (pp. 53-75). Cambridge: Cambridge University Press.

Renard, P., Strussmann, C. A., Ling, H., and Takashima, F. (1994). Evaluation of extenders for Pjerrey *Odontesthes bonariensis* sperm. *Fisheries Science*, 60(6), 661-666.

Ritar, A. J., and Campet, M. (2000). Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineata*). *Theriogenology*, 54, 467-480.

Rouxel, C., Suquet, M., Cosson, J., Severe, A., Quemener, L., and Fauvel, C. (2008). Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquaculture Research*, 39, 434-440.

Saad, A., Billard, R., Theron, M. C., and Hollebecq, M. G. (1988). Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71, 133-150.

Sahinoz, E., Aral, F. and Dogu, Z. (2007). Changes in Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning period. *Theriogenology*, 67, 848–854.

Scott, A. P., and Baynes, S. M. (1980). A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 17, 707-739.

Sternbach, G., and Varon, J. (1992). Alexander Fleming: The spectrum of penicillin. *Journal of Emergency Medicine*, 10(1), 89-91.

Stoss, J. (1983). Fish gamete preservation and spermatozoa physilogy. In: W. S. Hoar., D. J. Randall and E. M. Donalson (Eds.), Fish Physiology, Vol. 9, Part B. (pp. 306-350). New York: Academic Press.

Stoss, J., and Holtz, W. (1983). Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 30, 269-274.

Stoss, J., Geries, L., and Holtz, W. (1987). The role of spermatozoa depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. *Aquaculture*, 61, 275-279.

Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J. L., and Billard, R. (1998). The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: Effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *Journal of Fish Biology*, 52, 31-41.

Trippel, E.A., and Neilson, J.D. (1992). Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 49, 2118-2127.

Truscott, B., Idler, D. R., Hoyle, R. J., and Freeman, H. C. (1968). Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 25, 363-372.

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

Volk, W. A., and Wheeler, M. F. (1988). *Basic Microbiology*. New York: Harper & Row Publishers.

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., Chomphuthawach, S., and Nimrat, S. (2009a). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity. *Theriogenology*, 72, 129-138.

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I., and Nimrat., S. (2009b). Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. *Aquaculture*, 296, 58-64.

Wayman, W. R., and Tiersch, T. R. 2000. Research methods for cryopreservation of sperm. In T. R. Tiersch and P.M. Mazik (Eds.) Cryopreservation in Aquatic species (pp. 264-275). Baton Rouge: World Aquaculture Society.

Wu, S. J., and Ng, L. T. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT*, 41, 323-330.

Yilmaz, M., Soran, H., and Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161, 127-131.

Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., and Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, 81, 686-692.

## Output จากโครงการวิจัย

284364

**ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ**

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กุลวดี พิมพ์นวลศรี ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553). ผลของยาปฏิชีวนะและการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อ. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ* (Submitted และอยู่ในระหว่างการแก้ไขเนื้อหาบางส่วนก่อนจะพิจารณารับตีพิมพ์)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กนิษฐา ตั้งชั่ว และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553). ผลของยาปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทางทะเลและการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ* (Submitted)