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

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้สมุนไพรในภาคตะวันออกเพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่แข็ง

(Application of herb in Eastern part of Thailand for long-term cryopreservative of African Catfish (*Clarias gariepinus*) milt)

โดย

นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย [1]

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ [2]

นางสาวกาญจนา หริ่มเพ็ง [2]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

14 พ.ค. 2552
254664

เสนอต่อ

เริ่มบริการ
19 ส.ค. 2552

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษและภาษาไทย	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	3
รายละเอียดเกี่ยวกับปลาดุกอัฟริกัน	3
รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	9
บทที่ 3 วัสดุและอุปกรณ์	12
บทที่ 4 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 5 ผลการทดลอง	18
บทที่ 6 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	35

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อและอวัยวะต่างๆของปลาดุกอัฟริกัน.....	18
2	แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จากอวัยวะของปลาดุกอัฟริกันและจากบ่อเพาะเลี้ยงปลาดุกอัฟริกัน.....	19
3	ผลของการแช่เย็นและยาปฏิชีวนะต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน.....	21
4	ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อแช่เย็นปลาดุกอัฟริกันที่ไม่ใส่และใส่ยาปฏิชีวนะ.....	25
5	ผลของสมุนไพรชนิดต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	26
6	ปริมาณของสารสกัดของสมุนไพร.....	29
7	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดด้วยสารสกัดสมุนไพรจำนวน 6 ชนิด.....	30
8	ผลของสารสกัดสมุนไพรและยาปฏิชีวนะต่อน้ำเชื้อที่แช่เย็น.....	31

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 ลักษณะรูปร่างของปลาดุกอัฟริกัน.....5
2 ลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศปลาดุก.....5

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้สมุนไพรในภาคตะวันออกเพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่แข็ง (Application of herb in Eastern part of Thailand for long-term cryopreservative of African Catfish (*Clarias gariepinus*) milt) สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ข้าพเจ้าและคณะทำงานได้จัดสรรงบประมาณบางส่วนเพื่อสนับสนุนงานนิพนธ์ของ Mr. Ima Yudha Perwira นิสิตปริญญาโท และโครงงานระดับปริญญาตรีของนางสาวชญาภา สัญจรดี ข้าพเจ้าและคณะทำงานขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่างๆ

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัยและคณะ

2 กุมภาพันธ์ 2552

Abstract

Chilli, ginger, garlic and curcuma were extracted with water, methanol, and dichloromethane, and tested for antimicrobial activities against *Bacillus subtilis*, *Aeromonas salmonicida*, *P. fluorescens* and *Staphylococcus sciuri* isolated from gastrointestinal tract, skin, fish meat and sperm milt of African catfish (*Clarias gariepinus*). Using disk assays, the methanolic extract of all herbs tested except garlic exhibited the antimicrobial activity for *P. fluorescens*. In a cryopreserved storage test, three different concentrations (0.25, 0.5 and 2.5 mg/ml) of four methanolic extracts were supplemented in fish semen, compared to the controls with or without 1% penicillin-streptomycin. The experiments showed that the controls with antibiotic supplementation and treatment with curcuma extracts represented the best performance in the highest percentage of sperm motility (37.78 ± 2.22 %) and total heterotrophic bacterial were completely removed within 90 days of experiments. Results concluded that methanolic extract of curcuma (2.5 mg/ml) represented the best efficiency for replacing antibiotic in cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*) semen under chilled storage.

Key words : Garlic, Curcuma, Ginger, Chilli, African Catfish, *P. fluorescens* , cryopreserved storage, Penicillin-streptomycin, Total heterotroph

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพริก ขิง กระเทียมและขมิ้นด้วยสารละลายจำนวน 3 ชนิดคือ น้ำ เมทานอลและไดคลอโรมีเทนในการต้านแบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis*, *Aeromonas salmonicida*, *P. fluorescens* และ*Staphylococcus sciuri* ที่แยกจากลำไส้ ผิวหนัง เนื้อปลา และน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัด 4 ชนิดที่สกัดด้วยเมทานอลยกเว้นกระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* ได้ ดังนั้นจึงนำสารสกัดด้วยเมทานอลทั้ง 4 ชนิด 3 ความเข้มข้น คือ 0.25, 0.5 และ 2.5 mg/ml มาทำการทดสอบการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมและมีการเติมยาปฏิชีวนะชนิด penicillin-streptomycin 1% พบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะและชุดที่เติมสารสกัดขิงพบการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อของปลาดุกอัฟริกาได้สูงสุด คือ 37.78 ± 2.22 % และสามารถกำจัดแบคทีเรียกลุ่ม total heterotroph ได้ทั้งหมดภายในการแช่แข็ง 90 วัน จากการทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดขิงด้วยเมทานอลความเข้มข้นที่ 2.5 mg/ml มีประสิทธิภาพในการทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันด้วยวิธีแช่แข็ง

คำสำคัญ : กระเทียม, ขมิ้น, ขิง, พริก, น้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน, *P. fluorescens*, การเก็บรักษาแบบแช่เย็น, penicillin-streptomycin, แบคทีเรียกลุ่ม total heterotroph

บทที่ 1
บทนำ

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศ มีรูปร่างยาวเรียวและไม่มีเกล็ด เป็นปลาที่มีเนื้อรสชาติอร่อยนุ่มนวลสามารถนำมาปรุงแต่งเป็นอาหารได้หลายชนิด (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532) ในประเทศไทยมีพันธุ์ปลาดุกอยู่ 5 ชนิด แต่ที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายจะมีอยู่ 2 พันธุ์ คือ ปลาดุกด้านและปลาดุกอุย จากการศึกษาพบว่า ปลาดุกเป็นปลาในตระกูลแคชพิช (Catfish) เช่นเดียวกับปลาดุกอุย มีถิ่นกำเนิดในทวีปอัฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias gariepinus* ชื่อสามัญคือ African sharptooth catfish เป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตเร็ว สามารถกินอาหารได้ทุกชนิด มีความต้านทานโรคและสภาพแวดล้อมสูง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดได้ทำการเพาะขยายพันธุ์ปลา โดยนำมาผสมพันธุ์กับปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ ปรากฏว่าการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยเพศเมียผสมกับปลาดุกเทศเพศผู้สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี ลูกที่ได้มีการเจริญเติบโตได้ดี ทนทานต่อโรคสูง มีลักษณะใกล้เคียงกับปลาดุกอุย จนชาวบ้านเรียกปลาดุกลูกผสมนี้ว่าบิ๊กอุย (สุทธิชัย ปทุมล่องทอง, 2548)

เนื่องจากปลาดุกอัฟริกันเป็นปลาพันธุ์ต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทยได้ไม่นานนัก ชื่อที่ใช้เรียกในแต่ละท้องที่จึงแตกต่างกันไปซึ่งก่อให้เกิดความสับสนแก่เกษตรเป็นอย่างมาก แต่ที่จริงแล้วกรมประมงได้ศึกษาอนุกรมวิธานและตั้งชื่อปลาชนิดนี้ว่าปลาดุกเทศ แต่ผู้เพาะพันธุ์แต่ละคนหรือแต่ละท้องที่ได้เรียกชื่อแตกต่างไป เช่น ปลาดุกยักษ์ ปลาดุกอเมซอน ปลาดุกรัสเซีย ปลาดุกคองโก ปลาดุกคอมมิวนิสต์หรือปลาดุกอัฟริกัน (สันต์ นาตะสุวรรณ, 2548)

ปลาดุกนั้นเป็นปลาเศรษฐกิจน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีการเลี้ยงกันทั่วประเทศเป็นปลาที่ได้รับความนิยมบริโภคสูงจึงมีการเพาะและขยายพันธุ์ปลาดุกกันอย่างกว้างขวาง มีโรงเพาะฟักและฟาร์มเลี้ยงปลาดุกจำนวนมาก แต่ปัญหาหนึ่งที่เกษตรมักพบเสมอ คือ ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อจากปลาดุกเพศผู้ออกมานอกตัวได้เหมือนปลาดุกตัวอื่น ๆ จึงจำเป็นต้องนำน้ำเชื้อออกมาจากภายในตัวปลามาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดโดยไม่ให้มีแบคทีเรียปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นถ้ามีน้ำเชื้อเหลือก็ควรมีการเก็บแช่เย็น (ที่อุณหภูมิ 0-4 °C) หรือเก็บแช่แข็ง (ที่อุณหภูมิ -196 °C) เอาไว้ใช้ในครั้งต่อไป เนื่องจากน้ำเชื้อสดที่เหลือใช้จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่เกิน 1 วัน ในขณะที่น้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานเป็น 1-2 สัปดาห์ และน้ำเชื้อที่เก็บแช่แข็งมีชีวิตอยู่ได้เป็นปีทำให้สะดวกต่อการเพาะพันธุ์และสามารถเพาะพันธุ์ปลาดุกได้ตลอดปี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการจัดการฟาร์มของเกษตรกร การปรับปรุงพันธุ์และการรักษาสายพันธุ์ปลาดุกอัฟริกันให้คงอยู่ จากเหตุผลที่กล่าวมานี้สามารถช่วยให้มีการใช้น้ำเชื้ออย่างคุ้มค่า ลดการสูญเสียน้ำเชื้อ โดยสามารถเลือกใช้วิธีการเพาะพันธุ์ปลาแบบใช้น้ำเชื้อแช่เย็น หรือน้ำเชื้อแช่แข็งก็ได้ ซึ่งแนวทางเหล่านี้จะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลาดุกและผู้เพาะเลี้ยงปลาชนิดอื่น ๆ ได้ต่อไป

ปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่ทำการแช่แข็งมีหลายปัจจัย และอยู่ในทุกขั้นตอนของกระบวนการแช่แข็งนับตั้งแต่การคัดเลือกแหล่งเชื้อพันธุ์ (Gamete collection) การเก็บเซลล์เชื้อพันธุ์ สารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ (Extenders) สารไครโอโพรเทคแทรนท์ (Cryoprotectant) เวลาสมดุลของสารไครโอโพรเทคแทรนท์ (Equilibration time) อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) การเก็บรักษาและการละลาย (Thawing) (กฤษณ์, 2536) หากพิจารณาดูแล้วทุกขบวนการที่ทำการแช่แข็งมีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทำการแช่แข็ง ในอีกแง่หนึ่ง คือ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังการแช่แข็งและการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการแพร่ของน้ำยาผ่านผนังเซลล์ นอกจากนี้การปนเปื้อนของแบคทีเรียทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลการปฏิสนธิในปลาและการลดลงของการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการปฏิสนธิ (Sadd et al., 1988) แบคทีเรียต่าง ๆ ไม่อาจทำลายได้ด้วยการแช่แข็งเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นตัวสร้างสาร exotoxin A ในวัวกระทิง (bulls) และสามารถพบได้ในสเปิร์มที่ทำการแช่แข็ง (Getty และ Ellis,1967 อ้างใน Jenkins และ Tiersch,1997) ในการควบคุมจุลินทรีย์ต่าง ๆ อาจทำได้โดยการใส่ยาปฏิชีวนะลงไปอย่างเช่นที่ได้มีการปฏิบัติในสัตว์บกเศรษฐกิจหลาย ๆ ชนิด (Hafez,1983 อ้างใน Jiersch, 1996) แต่ในการใช้ยาปฏิชีวนะจะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะก็มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อเช่นกัน

สารประกอบสมุนไพรธรรมชาติจะถูกนำไปใช้เป็นยาต้านจุลชีพในรูปของสารสกัดและรูปของผง ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จากการศึกษาพบว่าสารสกัด ethanolic จากเมล็ดพริกไทย (*Xylopia aethiopica*) ถูกนำไปใช้ในการต้านรา (*Candida albicans*) และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Salmonella typhi* และ *Proteus vulgaris* (Okeke et al., 2001) สารสกัดจากใบสะเดาอินเดีย *(Azodirachta indica*) กระเพรา (*Ocimum sanctum*) และหน่อขิง (*Zingiber officinalis*) มีผลต่อการยับยั้ง *Alternaria. triticina* (Parveen and Kumar, 2000) สารสกัดจากสาหร่ายทุ่นและสาหร่ายสีแดงยังมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรคได้เช่นกัน (Booma Kasthuri, 1998)

ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาในการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่แข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่แข็งที่มีคุณภาพเมื่อผ่านการเก็บรักษาไปเป็นเวลานาน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในทุกด้านที่อาจมีผลต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาและคุณภาพของน้ำเชื้อให้ยังคงสามารถทำการผสมได้อยู่ เช่น การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันในน้ำยา extender ที่ผสมยาปฏิชีวนะหรือสมุนไพร เปอร์เซ็นต์ของยาปฏิชีวนะหรือสมุนไพรที่ใช้ รวมถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเชื้อที่อาจส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อแย่ลงด้วย

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา จำแนกได้

1. รายละเอียดเกี่ยวกับปลาดุกอัฟริกัน
2. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับปลาดุกอัฟริกัน

ปลาดุกอัฟริกันเป็นปลาในตระกูล Catfish มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias gariepinus* และมีชื่อสามัญว่า African Sharptooth Catfish แต่มีผู้เรียกหลายชื่อ เช่น ปลาดุกยักษ์ ปลาดุกรัสเซีย ปลาดุกคองโก ปลาดุกคอมมิวนิสต์และปลาดุกอเมซอน มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งในระยะเวลา 5 เดือน จะมีน้ำหนักประมาณ 800-1000 กรัม สามารถมีอายุยืนได้ถึงประมาณ 50 ปี มีถิ่นกำเนิดเดิมในประเทศอัฟริกากลาง ชาวรัสเซียนำมาเผยแพร่ในประเทศลาว จากนั้นคนไทยก็ได้นำปลาดุกอัฟริกันจากประเทศลาวเข้ามาเพาะพันธุ์ในประเทศไทย การเจริญเติบโตนั้นในเขตร้อนจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าในเขตหนาว (บราลี ทุมกานนท์, 2533) เนื่องจากปลาดุกอัฟริกันเป็นปลาพันธุ์ต่างประเทศที่เข้ามาในประเทศไทยได้ไม่นานนัก ดังนั้นชื่อที่ใช้เรียกในแต่ละท้องถิ่นจึงแตกต่างกันไป ซึ่งก่อให้เกิดความสับสนแก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก แต่ที่จริงแล้วกรมประมงได้ศึกษาทางอนุกรมวิธานและตั้งชื่อปลาชนิดนี้ว่า ปลาดุกเทศ (สันต์ นาตะสุวรรณ, 2548)

ในปัจจุบันมีการผสมเทียมระหว่างน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) กับไข่ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*, Gunther) ได้เป็นปลาลูกผสมที่เป็นปลาเศรษฐกิจที่เรารู้จัก คือ "บิ๊กอุย" โดยการนำพ่อพันธุ์ปลาดุกอัฟริกันทำการผ่าท้องเพื่อเอาถุงน้ำเชื้อออกมาบีบเอาน้ำเชื้อและเตรียมแม่ปลาดุกอุยที่มีไข่ที่สมบูรณ์มาทำการรีดไข่ใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้นำน้ำเชื้อของปลาดุกอัฟริกันที่บีบไว้มาผสมกับไข่ปลาดุกอุยคนให้เข้ากันด้วยขนไก่ใส่น้ำลงไปในภาชนะที่มีไข่กับน้ำเชื้อเพื่อให้น้ำเชื้อได้ปฏิสนธิกับไข่ หลังจากนั้นก็นำไปใส่ในบ่อเพาะฟักเพื่อทำการฟักต่อไป (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532)

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลาดุกอัฟริกันมีชื่อสามัญคือ African Sharptooth Catfish ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Clarias gariepinus* ซึ่งจัดอยู่ใน

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class: Actinopterygii

Order: Siluriformes

Family: Clariidae

Genus: *Clarius*

Species: *Clarias gariepinus*

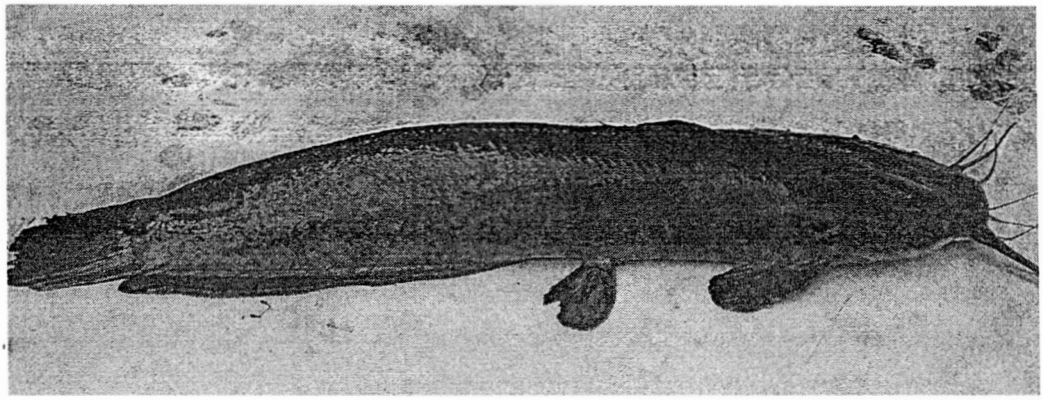
(ที่มา: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Clarias_gariepinus.html)

1.2 ลักษณะและรูปร่าง

รูปร่างของปลาดุกอัฟริกันโตกว่าของปลาดุกอุยและปลาดุกด้าน ปลาดุกอัฟริกันมีลำตัวยาว มีครีบ 2 ครีบ ใกล้ท้ายทอยติดกันเป็นพืดใหญ่คล้ายครีบปลาช่อน มีเงี่ยงที่ไม่แหลมคม ลำตัวมีลายตกกระคล้ายลายหินอ่อน หางคล้ายพัดเหมือนหางปลาช่อน โคนหางมีลายพาดขาว 1 เส้น หนังหนา บางชนิดผิวสีเทาค่อนข้างดำ รอยกระไม่เด่นชัด ท้องขาว แต่บางสายพันธุ์ผิวออกเหลืองนวล ลายกระเด่นชัด ทั้งพันธุ์ผิวดำและผิวเหลืองนวลจะมีพาดหางขาว ส่วนสายพันธุ์ที่มาจากจีนแดงจะไม่มีพาดหางขาว ใต้ท้องเป็นสีขาว จะมีครีบคล้ายพัดอยู่ 2 ข้าง ค่อนมาทางหาง ต่ำลงมาเป็นช่องทวารและเครื่องเพศ จากเครื่องเพศเป็นครีบยาวจรดปลายหาง ครีบทุกแห่งและปลายหางของปลาดุกยักษ์มีสีแดงเรื่อๆ จนบางครั้งหลายท่านจะเรียกว่า ปลาดุกครีบแดงหรือปลาดุกหางแดง

กะโหลกหัวโตค่อนข้างแบนใหญ่ ปลายกะโหลกส่วนใกล้ปากจะงอนขึ้นเล็กน้อย มีลายที่กะโหลกเด่นชัด บริเวณกึ่งกลางเหนือดวงตามีรอยปุ่มลึกและที่เหนือขึ้นไปบริเวณเกือบท้ายทอยมีรอยปุ่มตื้นๆ มีรอยโค้งพระจันทร์สองข้างในแนวเดียวกับดวงตาแต่เหนือขึ้นมาอยู่ระหว่างรอยปุ่มแรกและรอยปุ่มที่สอง ส่วนท้ายทอยของปลาดุกอัฟริกันหยักลึกกว่าปลาดุกด้านและปลาดุกบิ๊กอุย ปากกว้างปากบนตรงปลายมีปุ่มเล็ก ๆ คล้ายหนวดกุด มีหนวดเส้นใหญ่ ๆ 2 เส้น สำหรับสัมผัสและหาอาหารอยู่ตรงกับแนวของดวงตา และมีหนวด 2 เส้นเล็กถัดเข้ามาข้างในใกล้ ๆ กับปุ่มหนวดกุดข้างละเส้น ปากล่างมีหนวด 4 เส้น แต่ 2 เส้นกลางจะเล็กกว่า 2 เส้นข้าง แสดงดังภาพที่ 1

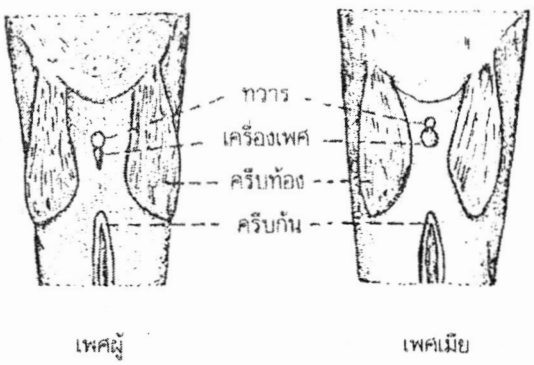
ลักษณะเพศภายนอกของตัวผู้จะมีติ่งหรือเดือยหรืออวัยวะเพศยาวอยู่ใต้ทวาร กึ่งกลางระหว่างปลายครีบใต้ท้องทั้งสองอยู่เหนือจรดครีบยาวที่เป็นเส้นที่ถึงหาง ลำตัวเรียวยาว (บราลี ทุมกานนท์, 2533)



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของปลาดุกอัฟริกัน

1.3 ความแตกต่างระหว่างเพศของปลาดุก

การแยกเพศนับว่าเป็นเรื่องที่สำคัญมากเพราะก่อนที่จะนำปลาดุกนั้นไปทำการเพาะพันธุ์จำเป็นต้องทราบเพศของปลาดุกก่อนว่าเป็นตัวผู้หรือตัวเมีย โดยสังเกตได้จากลักษณะเพศที่เห็นได้ง่ายและเด่นชัด คือ ตัวผู้ใกล้กับช่องทวารจะมีอวัยวะเพศลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา แต่ถ้าเป็นตัวเมียนั้นอวัยวะเพศจะสั้นกว่าและค่อนข้างกลม แสดงดังภาพที่ 2 ปลาดุกที่จะทราบเพศได้ถูกต้องนั้นต้องเป็นปลาที่มีขนาดยาวเกิน 15 เซนติเมตรขึ้นไป นอกจากนี้ในช่วงฤดูวางไข่ส่วนท้องของปลาตัวเมียจะอูมเป่งกว่าปกติ ซึ่งลักษณะที่สังเกตเห็นได้ชัดว่าฝักไข่เจริญเต็มที่ ถ้าใช้มือบีบเบาๆ ที่อวัยวะเพศของปลาตัวเมียมีไข่ไหลออกมา (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532)



ภาพที่ 2 ลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศปลาดุก
(ที่มา: ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532, หน้า 14)

1.4 ฤดูการผสมพันธุ์และการวางไข่

ปลาดุกที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาตินั้นจะวางไข่ในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม หลังจากที่ได้จับคู่พร้อมที่จะผสมพันธุ์กันแล้ว ปลาตัวผู้และปลาตัวเมียจะขุดหลุมหรือโพรงในดินใต้ระดับน้ำประมาณ 20-30 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นที่ผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งไข่ของปลาดุกจะเป็นไข่ที่วางหรือเกาะติดอยู่กับพื้นก้นหลุมหรือโพรง ไข่มีสีเหลืองอมน้ำตาล (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532)

1.5 อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้หรืออัณฑะ (testis) มีลักษณะเป็นพูยาว 2 พูอยู่ภายในช่องท้องติดกับผนังช่องท้องด้านบน โดยมีเยื่อบาง ๆ ยึดไว้เรียกว่า mesorchium ปลายด้านหนึ่งของทั้ง 2 พูนี้จะมาเชื่อมรวมกันเป็นท่อน้ำเชื้อ (vas deferens) ซึ่งมีขนาดสั้น ๆ และไปเปิดออกสู่บริเวณช่องเพศ (urogential pore) ซึ่งเป็นช่องเปิดร่วมของปัสสาวะและน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกตัวปลา ลักษณะอัณฑะของปลาจะแตกต่างกัน เช่น ปลาดุกอุยมีอัณฑะเป็นพูยาว 2 พู และแตกแขนงคล้ายนิ้วมือ อัณฑะของปลาดุกด้านมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่ไม่แตกแขนง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

อัณฑะมีหน้าที่ในการผลิตสเปิร์มและฮอร์โมนเพศในระบบสืบพันธุ์ (steroid hormone) โครงสร้างอัณฑะของปลากระดูกแข็งประกอบด้วยเยื่อที่หุ้มอัณฑะ เรียกว่า ทูนิคา อัลบูจิเนีย (tunica albuginia) เช่นเดียวกับที่พบในรังไข่ โครงสร้างอัณฑะของปลากระดูกแข็งสามารถจำแนกได้ 2 แบบ ได้แก่

1. tubular type ลักษณะอัณฑะจะไม่มีช่องว่าง (lumen) ในระหว่างการพัฒนาการสร้างน้ำเชื้อ (spermatogenesis) นั้น น้ำเชื้อจะค่อย ๆ พัฒนาด้านปลาย (blind sac) มายัง vas efferens และปล่อยน้ำเชื้อออกไปทาง vas efferens

2. lobule type ลักษณะอัณฑะจะมีช่องว่างอยู่ตรงกลาง (central lumen) ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำเชื้อที่ได้พัฒนาการสร้างน้ำเชื้อออกมายัง vas efferens และปล่อยออกนอกตัว (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

1.6 การพัฒนาการสร้างน้ำเชื้อ (spermatogenesis)

การพัฒนาการสร้างน้ำเชื้อปลามีความสลับซับซ้อนน้อยกว่าการพัฒนาการสร้างไข่ปลาเป็นอย่างมาก ขั้นตอนการพัฒนาการสร้างน้ำเชื้อประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

1. spermatogenesis จัดเป็นขั้นตอนที่มีการเพิ่มจำนวนของน้ำเชื้อโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสทำให้มีจำนวน spermatogonia มากมายและเริ่มพัฒนาไปเป็น primary spermatocytes จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้ง ดังนี้

1.1 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะที่ 1 ทำให้ primary spermatocytes กลายเป็น secondary spermatocytes ที่มีขนาดเล็กลงจำนวน 2 เซลล์

1.2 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะที่ 2 ทำให้ secondary spermatocytes กลายเป็น spermatids ดังนั้นเมื่อเสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจะได้ spermatids cell จาก primary spermatocytes จำนวน 1 เซลล์ อย่างไรก็ตามแม้ว่า spermatids จะมีโครโมโซม 1 ชุด แต่ยังไม่มีส่วนหางจึงยังไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้

2. spermiogenesis ในระยะนี้ spermatid จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนได้เป็นสเปิร์มาโตซัว (spermatozoa) ซึ่งจะมีหางและมีความพร้อมในการปฏิสนธิกับไข่ได้ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

1.7 ลักษณะรูปร่างของน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อปลาแตกต่างจากของสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ตรงที่ไม่มีส่วนของอะโครโซม (acrosome) ทั้งนี้เพราะไข่ปลามีไมโครพิล (micropyle) ซึ่งเป็นทางผ่านของน้ำเชื้ออยู่แล้ว น้ำเชื้อจะมีองค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ

1. ส่วนหัว (head) เป็นที่อยู่ของนิวเคลียสและเป็นส่วนที่สำคัญที่สุด ซึ่งมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด นิวเคลียสนี้มีไซโตพลาสซึม (cytoplasm) หุ้มอยู่เพียงบางๆ จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าส่วนหัวของอสุจิปลาตะเพียนขาว ปลาดุกและปลาทอง มีลักษณะกลม ส่วนของปลาไนเป็นรูปไข่

2. ส่วนลำตัว (mid piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากส่วนหัว ประกอบด้วย ส่วนไมโครทูบูล (microtubule) ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนกลางของส่วนหาง ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ภายในมีไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และเซนทริโอล (centriole)

3. ส่วนหาง (tail) ประกอบด้วยไมโครทูบูล (microtubule) ที่เรียงเป็นวงรอบๆ แกนกลาง ล้อมรอบด้วย plasma membrane โดยส่วนใหญ่จะมี (microtubule) เป็นแกนกลาง 1 คู่ และเรียงเป็นวงรอบแกนกลางอีก 9 คู่ ลักษณะเช่นนี้ทำให้ส่วนหางสามารถเคลื่อนไหวได้ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

1.8 น้ำเชื้อปลา

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อโดยควรสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตรและสิ่งเจือปนอื่นๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและไม่ควรมีสิ่งเจือปน เช่น ถ้ามีสีชมพูหรือสีแดงจะเป็นน้ำเชื้อที่คุณภาพไม่ดี การประเมินโดยวิธีนี้จะเป็นการประเมินเบื้องต้น ควรที่จะทำการประเมินควบคู่กับการประเมินการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม และการย้อมสีตัวเป็นตัวตายด้วย เนื่องจากน้ำเชื้อขาวขุ่นอาจมีคุณภาพที่ไม่ดีก็ได้ในบางครั้ง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

น้ำเชื้อปลาที่รีดได้มีสิ่งเจือปน เช่น สีคล้ายน้ำเลือด หรือสีเหลืองแสดงว่าน้ำเชื้อนั้นปนเปื้อนด้วยเลือดหรือสิ่งขับถ่ายอื่น ๆ และเป็นน้ำเชื้อที่คุณภาพไม่ดีไม่เหมาะสมแก่การเก็บรักษา และถ้าหากเก็บน้ำเชื้อนั้นผสมกับไข่เพื่อการเพาะขยายพันธุ์ก็อาจเป็นสาเหตุให้ไข่ปลานั้นมีอัตราการผสมและฟักออกเป็นตัวได้น้อยกว่าการใช้น้ำเชื้อปลาที่ไม่มีการปนเปื้อน

น้ำเชื้อที่หลั่งออกมาระหว่างการผสมพันธุ์นั้นอาจประมาณปริมาตรการหลั่งแต่ละครั้งได้ โดยการใช้มือกดที่ผนังท้องของปลา และใช้หลอดทดสอบที่มีปริมาตรบอกความจุ เช่น graduate centrifuge tube เป็นอุปกรณ์สำหรับตวงวัดปริมาตรได้ และยังสะดวกเมื่อต้องการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาใด ก็ทำได้ในอัตราส่วนที่ต้องการ เพราะน้ำเชื้อสดบรรจุอยู่ในหลอดที่มีปริมาตรบอกความจุไว้แล้ว (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

1.9 การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลา

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาสามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. รีดโดยตรงจากตัวปลาโดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้องของปลาเพศผู้ซึ่งจะมีน้ำเชื้อสีขาวข้นคล้ายน้ำนมไหลออกมา เช่น ปลาตะเพียน ปลาสวาย เป็นต้น

2. ใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (urogenital pore) เช่น ปลาบึก

3. ผ่าท้องปลาพร้อมนำอัณฑะ (testis) ไปบดแยกเอาน้ำเชื้อออกไปผสมเทียม ซึ่งมักปฏิบัติกับปลาที่มีน้ำเชื้อน้อย หรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อออกมาได้ เช่น ปลาดุก (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

1.10 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามี 2 แบบ คือ

1. การเก็บรักษาแบบระยะสั้น เป็นการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถเก็บได้ทั้งสภาพเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดต่างๆ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

2. การเก็บรักษาแบบระยะยาว เป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ถ้ามีการเลือกสูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะ equilibrium time (ช่วงเวลาหลังจากที่ผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง รวมทั้งระดับไนโตรเจนเหลวในถังที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างถูกต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อของปลาแต่ละชนิด จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี เมื่อจะนำมาใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ ผลการผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

2. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

จริยาและคณะ (2532) ศึกษาการใช้สารสกัดใบฝรั่งและเปลือกมังคุดในการต้านเชื้อแบคทีเรียโรคอุจจาระร่วง 12 สายพันธุ์ *Vibrio* 2 สายพันธุ์ *Shigella* 4 สายพันธุ์ *Salmonella* 5 สายพันธุ์ และ Enteropathogenic *E.coli* พบว่าเชื้อโรคอุจจาระร่วงทั้ง 12 สายพันธุ์จะไม่เจริญถ้าใช้ความเข้มข้นของสารสกัดโดยการต้มใบฝรั่ง 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและจากเปลือกมังคุด 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด สำหรับยาหม้อที่ใช้ดื่มตามตำราไทยของใบฝรั่งเพื่อเปรียบเทียบและเปลือกมังคุดจะมีน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ใช้อยู่แต่ละครั้งประมาณ 621±9 และ 116±7 มิลลิกรัมตามลำดับ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและประมาณยาหม้อที่ดื่มในแต่ละครั้งพบว่าใบฝรั่งเป็นสมุนไพรในการรักษาโรคอุจจาระร่วงได้ดีกว่าเปลือกมังคุด

ธิดารัตน์ (2535) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และร้อยละ 85 จากใบฟ้าทะลายโจรเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง บิดและเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินหายใจ โดยใช้วิธี Agar dilution พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงและบิดได้ดีกว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินหายใจสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 85 ที่มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณ andrographolide 8.30 มิลลิกรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E.coli*, *Salmonella krefeld*, *Salmonella thypi*, *V. cholerae* และ *Shigella dysenteriae* ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน

Ghosh และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองพบว่า methanolic ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากผลดิบของฝรั่งจัดเป็นตัวยับยั้งโรคอุจจาระร่วงที่สำคัญซึ่งจะลดการหดตัวของกระเพาะอาหารในสัตว์ทดลองและยับยั้งการสร้าง Acetyl Choline จากลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภาและพบว่าสารที่สกัดได้จากใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Shigella* spp. และ *Vibrio cholerae* ได้

Christensen และ Tiersch (1997) ทำการทดลองเก็บรักษาสเปิร์มพวก Channel Catfish ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรน้ำยาปกติและสูตรที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ antibiotic/antimycotic (A/AC) ซึ่งมีส่วนผสมของ penicillin 10,000 ยูนิต, streptomycin 10 มิลลิกรัม และ amphotericin 25 ไมโครกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร ในสารละลาย 0.9% NaCl โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 2 ความเข้มข้นในการทดลอง คือ 0.1% และ 1% จากการทดลองพบว่าสูตรความเข้มข้น 1% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมากกว่าโดยในวันที่ 6 ของการเก็บรักษามีประมาณ 20% ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนไหวในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา

Jenkins และ Tiersch (1997) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาสเปิร์มของปลา Channel catfish โดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างสเปิร์มถูกเก็บไว้ในน้ำยาสูตร HBSS

แบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile) และในสูตร HBSS ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ จากการทดลองพบว่าสเปิร์มในน้ำยาสูตร HBSS ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่เคลื่อนไหวเลย เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ส่วนสเปิร์มในสูตร HBSS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สเปิร์มทั้งหมดจะหยุดการเคลื่อนไหวภายในเวลา 10 วัน โดยที่การเคลื่อนที่จะลดลงตามการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

Samy และคณะ (1998) ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นประเทศอินเดียจำนวน 34 ชนิด ความเข้มข้น 1,000-5,000 ppm ต่อการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus vulgaris* และ *Pseudomonas aerogenes* ด้วยเทคนิค disc diffusion method พบว่าสารสกัดจากพืช 16 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยสารสกัดจากต้นราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) ต้นรกฟ้าขาว (*Terminalia arjuna*) และต้นคนทีเขมา (*Vitex negundo*) มีประสิทธิภาพยับยั้งสูงกว่าสารสกัดจากพืชชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Gnanamani และคณะ (2003) ศึกษาผลของสารสกัด ethamolic จากใบลำโพงขาว (*Datura alba*) และหงอนไก่ (*Celosia argentea*) ต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคที่แยกได้จากคนไข้ คือ *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Shigella* sp., *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp. และ *Vibrio* sp. ด้วยเทคนิค disc diffusion พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 8 ชนิดได้ โดยสารสกัด ethanolic จากใบลำโพงขาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิดสูงกว่าสารสกัดจากใบหงอนไก่ประมาณ 50% และเมื่อเปรียบเทียบกับ silver sulphadiazine ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้อย่างแพร่หลาย พบว่าสารสกัดจากใบลำโพงขาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่ายาปฏิชีวนะดังกล่าว ดังนั้นการใช้สารสกัดสมุนไพรสามารถช่วยควบคุมแบคทีเรียก่อโรค และลดโอกาสเสี่ยงการเกิดโรคจากแบคทีเรียได้

Sivaram และคณะ (2004) ได้ศึกษาสารสกัด Methanolic จากพืชสมุนไพร 10 ชนิดในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาเก๋าจุดน้ำตาล (*Epinephelus tauvina*) และผลของสารสกัดเหล่านี้ที่เติมลงในอาหารต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเก๋าจุดน้ำตาลระยะวัยรุ่น จากการทดลองพบว่าสารสกัด Methanolic จากกะเพรา (*Ocimum sanctum*) โสมอินเดีย (*Withania somnifera*) และจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น ดังนั้นจึงนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้มาทำบริสุทธิ์และเติมลงในอาหารที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 800 mg/kg และนำไปเลี้ยงปลาเก๋าจุดน้ำตาลระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 30.0±0.5 g เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่าปลาเก๋าจุดน้ำตาลกลุ่มที่ได้รับอาหารที่เติมสารสกัดกะเพราและโสมอินเดียความเข้มข้น 100 และ 200 mg/kg มีกิจกรรมการกลืนกิน (phagocytosis) กิจกรรมการต้านแบคทีเรียของซีรั่ม (serum bactericidal activity) อัตราส่วนอัลบูมิน-โกลบบูลลิน (albumin-globulin ratio) และลิวโคคริต (leukocrit) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่สารสกัดจันทน์เทศทุกความเข้มข้นที่เติมลงในอาหารไม่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของปลาเก๋าจุดน้ำตาล อัตรา

การเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาเก๋าจุดน้ำตาลกลุ่มที่ได้รับสารสกัดโสมอินเดียมีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกับปลาเกาจุดน้ำตาลกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกะเพราความเข้มข้น 100 และ 200 mg/kg และมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) เมื่อเติม *V. harveyi* ลงในระบบเพาะเลี้ยงปลาเก๋าจุดน้ำตาลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจันทน์เทศความเข้มข้น 100 mg/kg มีอัตราการตาย 100% ขณะที่สารสกัดกะเพราและโสมอินเดียความเข้มข้น 100 และ 200 mg/kg สามารถลดอัตราการตายได้สูงถึง 5% และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นสูงสามารถลดอัตราการตายของปลาเก๋าจุดน้ำตาลได้แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการใช้สารสกัดสมุนไพรในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Zampini และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัด ethanolic ของต้น jarilla pispito (*Zuccagnia punctata*) ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองในประเทศอาร์เจนตินาต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ด้วยเทคนิค agar diffusion และ bioautography method พบว่าสารสกัด ethanolic ของต้น jarilla pispito มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration; MIC) เหล่านี้อยู่ระหว่าง 25-200 µg/ml และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimal bacteriocidal concentration; MBC) มีค่าเท่ากับค่า MIC จนถึงมากกว่าค่า MIC 2 เท่า จากการทดสอบด้วยเทคนิค bioautography แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบหลักของ ethanolic ของต้น jarilla pispito สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* และสารประกอบอย่างน้อย 3 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในสารสกัด ethanolic สามารถยับยั้ง *K. pneumoniae* และ *E. coli* ได้ เมื่อนำมาสกัด ethanolic มาสกัดบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจลได้สารประกอบที่เรียกว่า 2′, 4′-dihydroxycholcone เมื่อนำสารประกอบนี้มายับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* อยู่ระหว่าง 0.10-1.00 µg/ml ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า MIC ของยา imipenem (0.25-16 µg/ml) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากต้น jarilla pispito มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (multi-resistant bacteria) และน่าจะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไป

บทที่ 3

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)

1.2 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

1.3 เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)

1.4 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)

1.5 ไมโครปิเปต (micropipette)

1.6 ตราชั่ง, เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

1.7 ตู้ปลอดเชื้อ

1.8 โฮโมจิไนเซอร์ (homogenizer)

1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

1.10 Rotary evarator

1.11 ถังน้ำแข็ง

1.12 ถังไนโตรเจนเหลว

1.13 เครื่องลดอุณหภูมิ Programmable Controlled rate freezer (Cryologic Pty, lty) รุ่น CL 3000

1.14 สมุนไพร

1.15 ปลาดุกอัฟริกัน

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม และทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

2.1.1 Gram's crystal violet

2.1.2 Gram's iodine

2.1.3 Gram's alcohol

2.1.4 Gram's safranin

2.1.5 Malachite green

2.1.6 Oxidase reagent

2.1.7 Catalase reagent

2.1.8 Kovac' reagent

2.1.9 Voges-Proskauer reagent

2.1.10 Methyl red reagent

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมเซลล์

3.1.1 Muller-Hinton Agar

3.1.2 Muller-Hinton Broth

3.1.3 Trypticase soy agar (TSA)

3.1.4 Trypticase soy broth (TSB)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

3.2.1 MacConkey Agar

3.2.3 Nutrient Agar

3.2.3 Plate Count Agar (PCA)

3.2.4 *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA)

3.2.5 Thiosulphate Citrate Bile Salts Agar

3.2.6 0.85% Normal saline

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.3.1 Triple sugar iron agar (TSI)

3.3.2 Semisolid indole motility test medium (SIM)

3.3.3 MR-VP medium

3.3.4 Urease

3.3.5 Simmon's citrate agar

3.3.6 Lysine decarboxylase

3.3.7 Arginine decaboxylase

3.3.8 Ornithine decaboxylase

3.3.9 Oxidation-Fermentation medium

3.3.10 Nitrate Broth

3.3.11 Lysine Iron Agar (LIA)

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียก่อโรคจากน้ำเชื้อและอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอัฟริกัน

1.1 การเตรียมน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน

เลือกปลาดุกอัฟริกันเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ มาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิในอัณฑะ โดยใช้ฮอร์โมน Luteinzing Hirmone Releasing Hormone analogue (LHRHa) มีชื่อทางการค้าว่า "Suprefect" ในอัตรา 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone (ชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตราส่วน 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม เช็ดลำตัวปลาด้วยแอลกอฮอล์ก่อนทำการผ่าตัดท้องปลาเพื่อนำเอาถุงอัณฑะออกมา หลังจากฉีดฮอร์โมนประมาณ 10-12 ชั่วโมง นำถุงอัณฑะมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้สะอาด ควรระวังไม่ให้น้ำเชื้อมีสิ่งอื่นปะปนอยู่ เช่น น้ำเลือด นำถุงอัณฑะที่ได้มาใส่ในจานแก้ว (Petridish) แห้ง และปราศจากเชื้อแบคทีเรียที่วางอยู่บนน้ำแข็ง ตัดถุงอัณฑะให้แตก แล้วใช้มีดผ่าตัดกดเบา ๆ ให้น้ำเชื้อออกจากถุงอัณฑะ กรองน้ำเชื้อด้วยผ้าขาวบางที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย ใส่ในจานแก้วแห้งและปราศจากแบคทีเรียที่วางอยู่บนน้ำแข็ง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การหาปริมาณแบคทีเรียในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกอัฟริกัน

การแยกแบคทีเรียจากปลาดุกอัฟริกันด้วยการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 25 กรัม ผสมกับ Normal saline 0.85 % ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วตีบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผสมหรือจากน้ำหรือดินตะกอนของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาเจือจางด้วย Normal saline 0.85 % ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA, TCBS และ PIA จานละ 0.1 มิลลิลิตร โดยแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ แล้วสเปรดเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณเป็น CFU/g นำโคโลนีที่แตกต่างกันไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียโดย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt & Bergey, 1994) และ API kit

1.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

Subculture เชื้อที่อยู่ในอาหาร กึ่งแข็งกึ่งเหลวลงอาหารแข็ง (TSA) เพื่อให้เชื้อที่มีความสดและใหม่ ด้วยวิธีการ Cross streak plate technique นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้จากข้อที่ 1.1 ไปทำการย้อมแกรม (Gram's staining) บันทึกผล นำไปทำ

การทดสอบด้วย การทดสอบทางชีวเคมี เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อทุกชุดการทดลอง จดบันทึก

2. การศึกษาสมุนไพรที่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียและการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

2.1 ศึกษาคุณสมบัติของสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียก่อโรค

ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ และพบได้ง่ายในภาคตะวันออก

2.2 การสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น พริก กระเทียม และขิง มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปตากให้แห้งและนำไปอบที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำสมุนไพรแห้งมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นหลังจากนั้นนำสมุนไพรบดไปสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ หลังจากกรองแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายเมทานอลในตู้อบ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำมาคำนวณปริมาณของสารสกัดของสมุนไพรต่อไปรวมทั้งเก็บสารสกัดสมุนไพรที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาใช้

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพรที่ศึกษาด้วยวิธี disk diffusion

2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากข้อที่ 1

นำเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller-Hinton Broth เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการทดสอบ ให้ได้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับความขุ่นของ McFarland No.0.5 ทดสอบ biochemical test เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อได้แก่ TSI, motile, simmon citrate agar, lysine decarboxylase, indole test

2.3.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยง Muller-Hinton Broth ให้ได้ความขุ่นของแบคทีเรียเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland No.0.5 ใช้ไม้พันสำลีจุ่มลงใน suspension ของเชื้อบิดพอหมาด ๆ กับข้างหลอดจากนั้น ป้ายลงบนหน้าอาหาร MHA โดยป้ายให้ทั่วโดยทำมุมซึ่งกันและกัน 60 องศา ทำซ้ำ 3 ครั้งวางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที การเตรียม disc โดยหยดสมุนไพรที่สกัดได้แต่ละชนิดลงบน disc 20 ไมโครลิตร อบให้แห้ง วาง disc ที่หยดสารสกัดและ disc ยาปฏิชีวนะลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผล inhibition zone รอบ ๆ แผ่น disc

2.4 การทดสอบผลของยาปฏิชีวนะและสมุนไพรต่อน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันในระหว่างการแช่แข็ง

2.4.1 การทดสอบผลของยาปฏิชีวนะ

นำน้ำเชื้อจากปลาดุกอัฟริกันด้วยกรรมวิธีที่ 1.1 หลังจากนั้นทำการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 treatment คือ

Treatment 1 Buffer (Control)

Treatment 2 Buffer + 1.0 % ยาปฏิชีวนะ

ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำยา extender 4 มิลลิลิตรและน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน tissue culture flask สำหรับทั้ง 2 Treatment และชุด Treatment ที่ 2 เตรียม Penicillin-Streptomycin ใส่ลงใน tissue culture flask ให้มีความเข้มข้นยาปฏิชีวนะ เท่ากับ 0.1% เขย่าให้เข้ากันนำหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดูดน้ำเชื้อที่ผสมใส่ในหลอดฟางประมาณ 0.4 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางให้สนิทด้วยคีมลนไฟหนีบทิ้งหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อไว้ประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำหลอดฟางไปทำการลดอุณหภูมิด้วยเครื่อง Programmable Controlled rate freezer (Cryologic Pty, lty) รุ่น CL 3000 ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (-5 องศาเซลเซียส/นาที) โดยลดอุณหภูมิจนอุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ -40 องศาเซลเซียส พักไว้ 2 นาที นำหลอดฟางที่ลดอุณหภูมิตามกำหนดใส่ในถังไนโตรเจนเหลวให้ได้หลอดฟางที่บรรจุลงไปในถัง หลังจากทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีในถังไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำหลอดฟางออกมาประมาณ 5 หลอด ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที นำหลอดฟางที่ละลายน้ำเชื้อแล้วมาตัดเพื่อเอาน้ำเชื้อออกมาใส่ในหลอด dilute ให้ได้ปริมาณน้ำเชื้อ 2 มิลลิลิตร นำน้ำเชื้อที่ได้ไปศึกษาปริมาณแบคทีเรียและอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

2.4.2 การทดสอบผลของสมุนไพรและยาปฏิชีวนะ

ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.4.1 ยกเว้นมีการเติมสารแตกต่างกันคือ

Treatment 1 Buffer (Control)

Treatment 2 Buffer + 1.0% ยาปฏิชีวนะ

Treatment 3 Buffer + สารสกัดพริกด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

Treatment 4 Buffer + สารสกัดขมิ้นด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

Treatment 5 Buffer + สารสกัดขิงด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

2.4.3 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ใช้เข็มเขี่ยที่สะอาดเขี่ยน้ำเชื้อแตะลงบนสไลด์ หยดน้ำเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ รีบนำมาดูการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 × 40 เท่า ภายในเวลาไม่เกิน 1 นาที โดยแบ่งประเมินเป็นระดับดังนี้

- สเปิร์มเคลื่อนที่ 100%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 80%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 60%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 40%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 20%
- สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ 0%

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 5

ผลการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียจากน้ำเชื้อและอวัยวะต่างๆของปลาดุกอัฟริกัน

จากการศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อและอวัยวะต่างๆของปลาดุกอัฟริกัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อและอวัยวะต่างๆของปลาดุกอัฟริกัน

ตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรีย		
	Total heterotroph (CFU/ml × 10^4)	Total gram-negative (CFU/ml × 10^4)	Presumptive *Pseudomonas* (CFU/ml × 10^4)
น้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน			
1	25.27 ± 0.87	7.97 ± 0.80	9.63 ± 0.75
1	69.67 ± 0.96	29.00 ± 0.52	65.67 ± 0.74
ผิวหนังปลาดุกอัฟริกัน			
1	85.00±6	0.30±0.04	0.33±0.05
2	46.00±5	8.20±1.27	0.94±0.02
2	5.00±0.7	0.06±0.01	0.07±0.01
1	3.00±0.4	0.00±0.00	0.07±0.01
5	22.00±1	0.34±0.12	0.07±0.01
6	8.00±8	0.08±0.09	0.07±0.0
ลำไส้ปลาดุกอัฟริกัน			
6	10.00±1	8.00±1.3	0.74±0.11
2	157.00±3	140±19.8	1.72±0.01
2	5.00±0.7	1.30±0.3	0.94±0.02
5	5.00±0.7	0.90±0.1	0.15±0.007
5	2.00±0.01	2.20±0.2	0.002±0.00
6	1113.00±203	2010.00±49.5	61.33±4.62
2	144.00±12	73.00±10.4	4.45±1.06
เนื้อปลาดุกอัฟริกัน			
2	0.095±0.0212	0.010±0.00	0.00±0.00
5	0.05.±0.00	0.010±0.00	0.035±0.0353
6	0.085±0.0353	0.010±0.00	0.00±0.00

4	0.0533±0.0152	0.030±0.00	0.00±0.00
4	0.11±0.0141	0.015±0.0070	0.010±0.00
4	0.055±0.0212	0.010±0.00	0.00±0.00
7	0.11±0.020	0.075±0.0353	0.0133±0.0058

ตารางที่ 2 แบคทีเรียชนิดต่างๆ จากอวัยวะของปลาดุกอัฟริกันและจากบ่อเพาะเลี้ยงปลาดุกอัฟริกัน

Family	Genus
Enterobacteriaceae	*Enterobacter aerogenes*
	Enterobacter cloacae
	Enterobacter gergoviae
	Klebsiella terrigena
	Klebsiella pneumoniae
Micrococcaceae	*Staphylococcus epidermidis*
Pseudomonaceae	*Burkholderia cepacia*
	Pseudomonas fluorescens
	Pseudomonas luteola
	Stenotrophomonas maltophilia
Spore forming bacteria	*Bacillus badius*
	Bacillus firmus
	Bacillus cereus
	Bacillus laterosporus,
	Bacillus pasteurii
	Bacillus sphaericus
Other gram-negative bacteria	*Acinetobacter lwoffi*
	Achromobacter xylosoxidans
	Aeromonas caviae
	Moraxella urethralis
	Ochrobactrum antrophi

จากการเก็บตัวอย่างจากน้ำเชื้อและอวัยวะส่วนต่างๆของปลาดุกอัฟริกัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม THB มีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างจากลำไส้ปลาดุกอัฟริกัน เท่ากับ 157.00 ± 3.00 × 10^4 CFU/g และมีปริมาณต่ำสุดในตัวอย่างจากเนื้อปลาดุกอัฟริกัน เท่ากับ 0.05 ± 0.00 × 10^4 CFU/g ดังตารางที่ 1 ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* มีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างจากน้ำเชื้อปลาดุก เท่ากับ 65.67 ± 0.74 × 10^4 CFU/g มีปริมาณต่ำสุดในตัวอย่างจากเนื้อปลาดุกอัฟริกัน เท่ากับ 0.00 ± 0.00 CFU/g นอกจากนั้นพบว่า ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Gram - negative มีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างจากลำไส้ปลาดุกอัฟริกันเท่ากับ 2010.00 ± 49.5 × 10^4 CFU/g และมีปริมาณต่ำสุดในตัวอย่างจากผิวหนังปลาดุกอัฟริกัน เท่ากับ 0.00 ± 0.00 CFU/g

2. ผลของการแช่แข็งและยาปฏิชีวนะต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน

2.1 ผลของการแช่แข็งและยาปฏิชีวนะต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มผลของการแช่แข็งและยาปฏิชีวนะต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotroph, Gram-negative และ *Pseudomonas* ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันในระหว่างการแช่แข็งภายใต้สภาวะต่างๆ คือ น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน extender ที่ไม่ใส่และใส่ยาปฏิชีวนะ และน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน extender ที่ไม่ใส่และใส่ยาปฏิชีวนะ แสดงดังตารางที่ 3 ดังนี้

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotroph ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน พบว่าในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ 25.27 ± 0.87 x 10^4 CFU/ml และเมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอยู่ในช่วง 13.13 ± 0.42 x 10^4 CFU/ml ถึง 20.27 ± 2.41 x 10^4 CFU/ml โดยในวันที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ 20.27 ± 2.41 x 10^4 CFU/ml ส่วนในวันที่ 30 ถึงวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวลดลงเล็กน้อยและเริ่มคงที่ในวันที่ 30, 60, 90 และ 120 และในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวน้อยที่สุดเท่ากับ 13.13 ± 0.42 x 10^4 CFU/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะในวันที่ 0 กับวันที่ 150 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของการแช่แข็งและยาปฏิชีวนะต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน

เวลา (วัน)	ชุดทดลอง											
	ชุดควบคุม						ชุดเติมยาปฏิชีวนะ					
	ชนิดของแบคทีเรีย						ชุดเติมยาปฏิชีวนะ					
	Total Heterotroph		Gram-negative		*Pseudomonas*		Total Heterotroph		Gram-negative		*Pseudomonas*	
	ปริมาณ CFU/g	การลดลง (%)	ปริมาณ CFU/g	การลดลง (%)	ปริมาณ CFU/g	การลดลง (%)	ปริมาณ CFU/g	การลดลง (%)	ปริมาณ CFU/g	การลดลง (%)	ปริมาณ CFU/g	การลดลง (%)
ก่อนการแช่แข็ง	$25.27 \pm 0.87^{a,1}$	0	$7.97 \pm 0.80^{a,1}$	0	$9.63 \pm 0.75^{a,1}$	0	$12.87 \pm 2.52^{b,1}$	0	$0.82 \pm 0.22^{b,1}$	0	$0.73 \pm 0.07^{b,1}$	0
30 นาทีหลังแช่แข็ง	$20.27 \pm 2.41^{a,2}$	19.79	$6.47 \pm 0.70^{a,2}$	18.82	$8.47 \pm 0.83^{a,12}$	12.05	$1.93 \pm 0.35^{b,2}$	85	$0.66 \pm 0.04^{b,12}$	19.51	$0.62 \pm 0.13^{b,2}$	15.07
30 วัน หลังแช่แข็ง	$17.4 \pm 1.31^{a,3}$	31.14	$6.33 \pm 0.64^{a,23}$	20.58	$7.67 \pm 0.83^{a,23}$	20.73	$1.31 \pm 0.42^{b,2}$	89.82	$0.66 \pm 0.04^{b,12}$	20.73	$0.18 \pm 0.018^{b,34}$	75.34
60 วัน หลังแช่แข็ง	$16.8 \pm 2.91^{a,3}$	33.52	$6.0 \pm 0.8^{a,23}$	18.82	$7.5 \pm 0.72^{a,23}$	22.12	$1.25 \pm 0.18^{b,2}$	90.29	$0.66 \pm 0.04^{b,12}$	12.05	$0.19 \pm 0.015^{b,3}$	73.97
90 วัน หลังแช่แข็ง	$16.27 \pm 1.21^{a,3}$	35.62	$5.57 \pm 0.25^{a,23}$	30.11	$7.17 \pm 0.40^{a,23}$	25.55	$1.27 \pm 0.21^{b,2}$	90.29	$0.53 \pm 0.122^{b,23}$	35.37	$0.08 \pm 0.014^{b,4}$	89.04
120 วัน หลังแช่แข็ง	$16.07 \pm 0.31^{a,3}$	36.41	$5.27 \pm 0.70^{a,23}$	33.88	$7.07 \pm 0.70^{a,3}$	26.58	$1.33 \pm 0.30^{b,2}$	89.67	$0.39 \pm 0.18^{b,3}$	52.44	$0.07 \pm 0.005^{b,4}$	90.41
150 วัน หลังแช่แข็ง	$13.13 \pm 0.42^{a,4}$	48.04	$5.13 \pm 0.71^{a,3}$	35.63	$6.47 \pm 0.58^{a,3}$	32.81	$0.83 \pm 0.15^{b,2}$	93.55	$0.12 \pm 0.016^{b,4}$	85.37	$0.06 \pm 0.019^{b,4}$	91.78

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตัวเลขที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ส่วนน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ 12.87 ± 2.52 x 10^4 CFU/ml และเมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.83 ± 0.15 x 10^4 CFU/ml ถึง 12.87 ± 2.52 x 10^4 CFU/ml โดยในวันที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ 1.93 ± 0.35 x 10^4 CFU/ml ส่วนในวันที่ 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวลดลงเล็กน้อย โดยในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวน้อยที่สุดเท่ากับ 0.83 ± 0.15 x 10^4 CFU/ml และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3 เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวทั้งในน้ำเชื้อก่อนและน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Gram-negative บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน พบว่าในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ 7.97 ± 0.80 x 10^4 CFU/ml และเมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอยู่ในช่วง 5.13 ± 0.71 x 10^4 CFU/ml ถึง 6.47 ± 0.70 x 10^4 CFU/ml โดยในวันที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ 6.47 ± 0.70 x 10^4 CFU/ml ส่วนในวันที่ 30 ถึงวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวลดลงเล็กน้อย และในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวน้อยที่สุด เท่ากับ 5.13 ± 0.71 x 10^4 CFU/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3

ส่วนน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ 0.82 ± 0.22 x 10^4 CFU/ml และเมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.12 ± 0.016 x 10^4 CFU/ml ถึง 0.66 ± 0.04 x 10^4 CFU/ml โดยในวันที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ 0.66 ± 0.04 x 10^4 CFU/ml ส่วนในวันที่ 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวลดลง โดยในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวน้อยที่สุด เท่ากับ 0.12 ± 0.016 x 10^4 CFU/ml และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะในวันที่

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

0 และ 150 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3 เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวทั้งในน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็ง ที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* Isolation Agar ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน พบว่าในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ $9.63 \pm 0.75 \times 10^4$ CFU/ml และเมื่อทำการ แช่แข็งน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอยู่ในช่วง $6.47 \pm 0.58 \times 10^4$ CFU/ml ถึง $8.47 \pm 0.83 \times 10^4$ CFU/ml โดยในวันที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ $8.47 \pm 0.83 \times 10^4$ CFU/ml ส่วนในวันที่ 30 ถึงวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวลดลงเล็กน้อย โดยในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวน้อยที่สุด เท่ากับ $6.47 \pm 0.58 \times 10^4$ CFU/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3

ส่วนน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ $0.73 \pm 0.07 \times 10^4$ CFU/ml และเมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวอยู่ในช่วง $0.06 \pm 0.019 \times 10^4$ CFU/ml ถึง $0.62 \pm 0.13 \times 10^4$ CFU/ml โดยในวันที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ $0.62 \pm 0.13 \times 10^4$ CFU/ml ส่วนในวันที่ 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวลดลง โดยในวันที่ 150 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เท่ากับ $0.06 \pm 0.019 \times 10^4$ CFU/ml และเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 90, 120 และ 150 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 3 เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวทั้งในน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็ง ที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและใส่ยาปฏิชีวนะ ในวันที่ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2.2 ผลของการแช่แข็งและยาปฏิชีวนะต่อชนิดแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่แช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน โดยทำการศึกษาในสภาวะต่างๆ คือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและ

254664
639.3749
ว462ก
ค.2

ใส่ยาปฏิชีวนะ และน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและใส่ยาปฏิชีวนะ แสดงดังตารางที่ 4 ดังนี้

จากการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันในสภาวะต่างๆ คือ น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและใส่ยาปฏิชีวนะ และน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะและใส่ยาปฏิชีวนะ พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อสด กับน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *Pseudomonas luteola*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Ochrobactrum antrophi*, *Burkholderia cepacia* และ *Stenotrophomonas maltophilia* แสดงดังตารางที่ 4 ส่วนชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็งที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *Pseudomonas luteola*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Ochrobactrum antrophi*, *Burkholderia cepacia* และ *Stenotrophomonas maltophilia* แสดงดังตารางที่ 4

3. การสำรวจและค้นคว้าเอกสารเกี่ยวกับสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่พบในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สมุนไพรที่ได้ทำการสำรวจที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกอัฟริกันที่ไม่ใส่และใส่ยาปฏิชีวนะ

ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกอัฟริกันที่ไม่ใส่และใส่ยาปฏิชีวนะ	ระยะเวลาที่ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (วัน)													
	น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง		น้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง 0 วัน		30 วัน		60 วัน		90 วัน		120 วัน		150 วัน	
	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ	ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ	ใส่ยาปฏิชีวนะ
1. *Pseudomonas luteola*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. *Staphylococcus epidermidis*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. *Bacillus cereus*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. *Enterobacter cloacae*	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
5. *Ochrobactrum antrophi*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6. *Burkholderia cepacia*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7. *Stenotrophomonas maltophilia*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + พบ, - ไม่พบ

ตารางที่ 5 ผลของสมุนไพรชนิดต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ชื่อสมุนไพร	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสกัด	ผลการออกฤทธิ์	ยับยั้งเชื้อ	คุณสมบัติพิเศษอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
ละหุ่ง	Castor-Oil Plant	*Ricinus communis*	butanolic	มีฤทธิ์สูง	*Vibiro parahaemolyticus*	-	Immanuel et al., 2004
ว่านธรณีสาร	-	*Phyllanthus niruri*	butanolic	มีฤทธิ์ปานกลาง	*Vibiro parahaemolyticus*	-	Immanuel et al., 2004
หญ้าคัดเค้า	Harsh slit wert, Yaa hua to	*Leucus aspera*	butanolic	มีฤทธิ์ปานกลาง	*Vibiro parahaemolyticus*	-	Immanuel et al., 2004
มันสำปะหลัง	Cassava Root	*Manihot esculenta*	butanolic	มีฤทธิ์ต่ำ	*Vibiro parahaemolyticus*	-	Immanuel et al., 2004
เมล็ดพืชตระกูลพลู		*Piper nigrum* (L.)	ethanolic	มีฤทธิ์	*Candida albicans* *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* *Salmonella typhi* *Proteus vulgaris*	-	Okeke et al., 2001
สะเดาอินเดีย	Neem Tree, Nim Tree	*Azadirachta indica* Juss		มีฤทธิ์	*Alternaria triticina*	-	Parveen and Kumar, 2000
กะเพรา	Holy basil, Sacred basil	*Ocimum sanctum* L.		มีฤทธิ์	*Alternaria triticina*	-	Parveen and Kumar, 2000
ขิง	Ginger	*Zingiber officinale* Rosc.		มีฤทธิ์	*Alternaria triticina*	-	Parveen and Kumar, 2000

ตารางที่ 5 ผลของสมุนไพรชนิดต่างๆ ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ชื่อสมุนไพร	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารสกัด	ผลการออกฤทธิ์	ยับยั้งเชื้อ	คุณสมบัติพิเศษอื่นๆ	เอกสารอ้างอิง
ฟ้าทะลายโจร	SugarApple, Custard Apple	*Andrographis paniculata* Ness.	methonolic	มีฤทธิ์	*Bacillus subtilis, Pseudomonas vulgaris Salmonella Typhi, Klebsiella pneumonia P. aeroginosa, P. fluorescens Vibrio* sp., *Staphylococcus aureus Aeromonas hydrophila*	-ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา -เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกกุ้งให้อยู่ระดับสูง	Citarasu, 2000
มะแว้งเครือ	-	*Solanum trilobatum* Linn.	methonolic	มีฤทธิ์	*Bacillus subtilis, Pseudomonas vulgaris Salmonella Typhi, Klebsiella pneumonia P. aeroginosa, P. fluorescens Vibrio* sp., *Staphylococcus aureus Aeromonas hydrophila*	-ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา -เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกกุ้งให้อยู่ระดับสูง	Citarasu, 2000
-	Psoralea seed, Malay tea, Bemchi	*Psoralea corylifolia*	methonolic	มีฤทธิ์สูง	*Bacillus subtilis, Pseudomonas vulgaris Salmonella Typhi, Klebsiella pneumonia P. aeroginosa, P. fluorescens, Vibrio* sp. *Staphylococcus aureus, Aeromonas hydrophila*	-ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา -เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของลูกกุ้งให้อยู่ระดับสูง	Citarasu, 2000

และได้ดำเนินการเลือกสมุนไพรจำนวน 4 ชนิดมาสกัดและดำเนินการทดสอบความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียที่พบในแบคทีเรียที่ปนเปื้อน

4. การสกัดสมุนไพร

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าสารสกัดสารสกัดกระเทียมด้วย Methanol มีเปอร์เซ็นต์การสกัดสูงสุดถึง 10.62% รองลงมา คือสารสกัดสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ 7.71% ส่วนสารสกัดจากสารสกัดข่าด้วยน้ำ สารสกัดขมิ้นด้วยน้ำและสารสกัดขมิ้นด้วย Dichloromethane ให้เปอร์เซ็นต์การสกัดในปริมาณน้อยคือ 0.77-0.79 % หลังจากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดไปทดสอบในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 ชนิดที่แยกมาจากสิ่งแวดล้อมหรือตัวปลาดุกอัฟริกันดังแสดงในตารางที่ 7

จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่าสารสกัดสารสกัดขมิ้นด้วย methanol มีความสามารถในการยับยั้ง *P. fluorescens* มากที่สุดคือ มี inhibition zone เท่ากับ 11±2.516611 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดพริกด้วย methanol, สารสกัดขิงด้วย methanol, สารสกัดขิงด้วยน้ำ แต่สารสกัดทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas salmonicida* นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดทั้งหมดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ยกเว้นสารสกัดพริกด้วย methanol และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus sciuri* ยกเว้นสารสกัดขิงด้วย methanol

หลังจากนั้นนำสารสกัดพริก ขมิ้นและขิงด้วยสารเมทานอลมาทดสอบในการแช่แข็งเปรียบเทียบกับชุดแช่แข็งที่ไม่มีการเติมและมีการเติมยาปฏิชีวนะชนิด penicillin-streptomycin 1% ผลการทดสอบพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะและชุดที่มีการเติมสารสกัดขิงด้วยเมทานอลพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด เท่ากับ 37.78±2.22% และลดแบคทีเรียกลุ่ม THB ได้ 100% ภายในการแช่แข็ง 90 วัน โดยชุดควบคุมมีการลดลงของปริมาณแบคทีเรีย 100% เช่นกัน แต่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 35.55±2.22% ส่วนสารสกัดขมิ้นและพริกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม THB ได้ 100% แต่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 15.55±2.22% และ 22.22±2.22% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารสกัดของสมุนไพร

สารสกัดสมุนไพร	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Extract yield (กรัม)	Extract yield (%)
สารสกัดพริกด้วยน้ำ	700	26.04	3.72
สารสกัดพริกด้วย Methanol	700	27.83	3.98
สารสกัดพริกด้วย Dichloromethane	700	18.86	2.69
สารสกัดขิงด้วยน้ำ	650	5.14	0.79
สารสกัดขิงด้วย Methanol	650	11.75	1.81
สารสกัดขิงด้วย Dichloromethane	650	7.68	1.18
สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ	700	53.98	7.71
สารสกัดกระเทียมด้วย Methanol	700	74.37	10.62
สารสกัดกระเทียมด้วย Dichloromethane	700	18.7	2.67
สารสกัดขมิ้นด้วยน้ำ	700	6.14	0.77
สารสกัดขมิ้นด้วย Methanol	700	8.18	1.02
สารสกัดขมิ้นด้วย Dichloromethane	700	6.2	0.78

ตารางที่ 7 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดด้วยสารสกัดสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด

สารสกัดสมุนไพร	Inhibition zone (มิลลิเมตร)											
	Bacillus subtilis			*Aeromonas salmonicida*			*Pseudomonas fluorescens*			*Staphylococcus sciuri*		
	2.5 mg/mL	250 mg/mL	800 mg/mL	2.5 mg/mL	250 mg/mL	800 mg/mL	2.5 mg/mL	250 mg/mL	800 mg/mL	2.5 mg/mL	250 mg/mL	800 mg/mL
Dichloromethane (DCM)	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
METHANOL	7±0.0	7±0.0	7±0.0	7±0.0	7±0.0	7±0.0	7±0.0	7±0.0	7±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
น้ำ	6±0.0	7±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	7±0.0	6±0.0	7±0.0	7±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดพริกด้วย DCM	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดพริกด้วย methanol	6±0.516398	6±0.516398	7±0.516398	6±0.0	6±0.0	6±0.0	7.1±1.266228	9.5±1.266228	7.6±1.266228	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดพริกด้วยน้ำ	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดกระเทียมด้วย DCM	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดกระเทียมด้วย methanol	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดขมิ้นด้วย DCM	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดขมิ้นด้วย methanol	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	11±2.516611	8±2.516611	6±2.516611	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดขมิ้นด้วยน้ำ	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดขิงด้วย DCM	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดขิงด้วย methanol	6±0.0	7±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.57735	6±0.57735	7±0.57735	6±0.0	6±0.0	6±0.0
สารสกัดขิงด้วยน้ำ	6±0.0	7±0.0	6±0.0	7±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดสมุนไพรและยาปฏิชีวนะต่อน้ำเชื้อที่แช่แข็ง

Treatment	เวลา (วัน)									
	ก่อนแช่แข็ง		หลังแช่แข็ง (1ชั่วโมง)		หลังแช่ 60 วัน		หลังแช่ 60 วัน		หลังแช่ 90 วัน	
	Sperm motility (%)	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)	Sperm motility (%)	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)	Sperm motility (%)	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)	Sperm motility (%)	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)	Sperm motility (%)	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)
1	$75.55 \pm 2.22^{a,1}$	1.33×10^{5}	$64.45 \pm 2.22^{b,34}$	2.44×10^{5}	$48.89 \pm 2.22^{c,2}$	1.33×10^{5}	$44.44 \pm 4.44^{c,2}$	-	$35.55 \pm 2.22^{d,1}$	-
2	$75.55 \pm 2.22^{a,1}$	0.08×10^{5}	$68.89 \pm 1.11^{a,4}$	17.25×10^{5}	$51.11 \pm 2.22^{b,2}$	5.70×10^{5}	$46.67 \pm 3.85^{b,2}$	-	$37.78 \pm 2.22^{c,1}$	-
3	$80.00 \pm 0.00^{a,12}$	16.00×10^{5}	$51.11 \pm 2.22^{b,12}$	14.2×10^{5}	$31.11 \pm 5.88^{c,1}$	5.70×10^{5}	$26.67 \pm 3.85^{cd,1}$	-	$22.22 \pm 2.22^{d,2}$	-
3	$84.44 \pm 2.22^{a,2}$	13.20×10^{5}	$44.45 \pm 2.22^{b,1}$	3.95×10^{5}	$24.44 \pm 2.22^{c,1}$	5.70×10^{5}	$20.00 \pm 0.00^{cd,1}$	-	$15.55 \pm 2.22^{d,1}$	-
5	$77.78 \pm 2.22^{a,12}$	4.05×10^{5}	$57.78 \pm 2.22^{b,23}$	1.84×10^{5}	$42.22 \pm 2.22^{c,2}$	1.63×10^{5}	$40.00 \pm 3.85^{c,2}$	-	$37.78 \pm 2.22^{c,1}$	-

หมายเหตุ : Treatment 1 คือ Control ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ

Treatment 2 คือ Control ที่เติมยาปฏิชีวนะ

Treatment 3 คือ น้ำเชื้อ + สารสกัดพริกด้วยเมทานอล

Treatment 4 คือ น้ำเชื้อ + สารสกัดขมิ้นด้วยเมทานอล

Treatment 5 คือ น้ำเชื้อ + สารสกัดขิงด้วยเมทานอล

บทที่ 6

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่างานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกเริ่มที่ทำการศึกษาถึงปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม THB, Total gram-negative และ *Pseudomonas* ในลำไส้ ผิวหนัง น้ำเชื้อของปลาดุกอัฟริกัน ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้น่าจะจึงมีประโยชน์อย่างสูงต่องานวิจัยในอนาคตที่จะทำการศึกษาในด้านแบคทีเรียวิทยาในปลาดุกอัฟริกันเพื่อการประยุกต์ ใช้ในด้านต่างๆ ต่อไป และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในลำไส้ปลาดุกอัฟริกันมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม THB และกลุ่ม total gram-negative สูงสุดในลำไส้ของปลาดุกอัฟริกัน อยู่ในช่วง $1,113.00 \pm 203 \times 10^4$ CFU/g ถึง $2010.00 \pm 49.5 \times 10^4$ CFU/g ส่วนปริมาณกลุ่ม *Pseudomonas* มีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างจากลำไส้ปลาดุกอัฟริกัน เท่ากับ $2010.00 \pm 49.5 \times 10^4$ CFU/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มในปริมาณที่ค่อนข้างจะใกล้เคียงกับสิ่งแวดล้อมอื่นในบ่อน้ำจืด

ส่วนชนิดของแบคทีเรียที่พบในอวัยวะต่างของปลาดุกอัฟริกันมีความหลากหลาย ได้แก่ Enterobacteriaceae (*Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. gergoviae*, *Klebsiella terrigena*, *K. pneumoniae*), Gram positive cocci พบเพียง 1 ชนิด คือ *Staphylococcus epidermidis*, Pseudomonaceae (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. luteola*, *Stenotrophomonas maltophilia*), Bacillaceae (*Bacillus badius*, *B. firmus*, *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. pasteurii*, *B. sphaericus*) และ *Acinetobacter lwoffi Achromobacter xylosoxidans*, *Aeromonas caviae*, *Moraxella urethralis* และ *Ochrobactrum antrophi* โดยมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการก่อโรคต่อสัตว์น้ำจืด คือ *P. fluorescens* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mahmoud *et al.* (2004) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของปลาคาร์พและพบแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* และ *Bacillus* เป็นต้น รวมทั้งจากการศึกษาของ Sugita, Shibuya, Shimooka and Deguchi (1996) ที่ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของปลาน้ำจืด 7 ชนิดและจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, *Pesudomonas* spp., *Aeromonas caviae*., *Bacillus* spp., *Acinetomonas* spp. และ *Moraxella* spp. เป็นต้น นอกจากนั้นผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jenkins and Tiersch (1997) ซึ่งทำการทดลองศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุก channel catfish ซึ่งพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Aeromonas,* และ *Klebsiella* ซึ่งคาดว่าจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของปลาดุก

จากการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ร่วมกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน เปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันโดยไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะพบว่า ในชุดควบคุมภายหลังการแช่แข็ง 150 วัน มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total heterotroph, Total gram-negative และ

Pseudomonas ลดลงร้อยละ 48.04, 35.63 และ 32.81 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการแช่แข็งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม THB, Total gram-negative และ *Pseudomonas* ได้ แต่เมื่อเติมยาปฏิชีวนะร่วมกับการแช่แข็งพบว่า มีปริมาณแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มลดลงร้อยละ 93.55, 85.37 และ 91.78 ตามลำดับ ภายหลังการแช่แข็ง 150 วัน ซึ่งการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin สามารถช่วยลดปริมาณแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลของยาปฏิชีวนะสามารถลดปริมาณแบคทีเรียจะทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้นกว่าการมีปริมาณแบคทีเรียจำนวนมากในน้ำเชื้อเนื่องจากการมีปริมาณของแบคทีเรียในน้ำเชื้อสูงจะทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อต่ำลงเพราะการเกิดสภาวะ hypoxia หรือสภาวะการขาดแคลนออกซิเจนส่งผลให้สเปิร์มมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ และยังทำให้ความสามารถในการนำไปปฏิสนธิกับไข่ลดลงด้วยเนื่องจากจะไปปิดกั้น micorpyle ซึ่งเป็นช่องทางที่สเปิร์มจะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Holcomb, Cloud & Ingermann, 2005) รวมถึงแบคทีเรียจะมีการใช้ออกซิเจนทำให้สภาวะในน้ำเชื้อมีออกซิเจนลดลง และแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและของเสียต่าง ๆ ออกมา ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อต่ำลง (Jenkins & Tiersch, 1997)

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกอัฟริกันที่ไม่ใส่และใส่ยาปฏิชีวนะ พบแบคทีเรียได้แก่ *Pseudomonas luteola*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum antrophi*, *Burkholderia cepacia* และ *Stenotrophomonas maltophilia* เมื่อผ่านการแช่แข็ง 150 วัน ยังคงพบแบคทีเรียทุกชนิดทั้งชุดที่ใส่และไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ ยกเว้น *Enterobacter cloacae* ที่ไม่พบภายหลังใส่ยาปฏิชีวนะในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า *Pseudomonas luteola*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum antrophi*, *Burkholderia cepacia* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ยังคงดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Penicillin-Streptomycin

จากการศึกษาปริมาณของสารสกัดของสมุนไพรพบว่า สารสกัดกระเทียมด้วยเมทานอลมีปริมาณสารสกัดสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดกระเทียมด้วยน้ำและสารสกัดใบมะกรูดด้วยน้ำ ส่วนสารสมุนไพรที่ให้ปริมาณสารสกัดต่ำที่สุด คือ สารสกัดใบมะกรูดด้วย Dichloromethane รองลงมาคือ สารสกัดขมิ้นด้วยน้ำและสารสกัดขมิ้นด้วย Dichloromethane นอกจากนั้นยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารสกัดสมุนไพรจำนวน 6 ชนิด สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดขมิ้นด้วย methanol ความเข้มข้น 2.5 mg/mL สามารถยับยั้ง *Pseudomonas fluorescens* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดพริกด้วยเมทานอลความเข้มข้น 250 mg/mL และ สารสกัดข่าด้วยน้ำความเข้มข้น 2.5 mg/mL ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียอีก 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus sciuri* และ *Aeromonas salmonicida* ไม่มีสารสกัดสมุนไพรใดสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ได้เลย

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang et al. (2009) ที่รายงานถึงสารสกัดขมิ้นด้วย 95% (v/v) เอทานอลที่สามารถยับยั้ง *Pseudomonas fluorescens* ด้วยความเข้มข้น 20-80 mg/ml แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* และ *Lactobacillus* รวมทั้งไม่สามารถยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus*, *E. coli* 29522 และ *S. aureus* 29523 ด้วยน้ำขมิ้นสด (Vuddhakul et al., 2007) ส่วนแบคทีเรียอีก 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus sciuri* และ *Aeromonas salmonicida* ไม่มีสารสกัดสมุนไพรใดสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ได้เลย แต่จากการศึกษาของ Mayachiew และ Devahastin (2007) พบว่า สารสกัดข่าด้วยเอทานอล 95 % สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ โดยมีค่า The maximum inhibition zones, MIC และ MBC เท่ากับ 29 ± 0.6 mm, 0.78 mg/ml และ 2.34 mg/ml ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Oonmetta-aree และคณะ (2005) พบว่าสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ ข่า กระชาย ขิงและขมิ้นที่สกัดด้วยเอททานอล 100 % สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ โดยมีค่า inhibition zones เท่ากับ 22.33 ±0.58, 11.00±0.00, 11.00±0.00 และ 10.00±0.00 ตามลำดับ

ดังนั้นสมุนไพรธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ควบคุม รักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียได้ รวมทั้งอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการภูมคุ้มกัน และส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ดังงานวิจัยของ Jian และ Wu (2003) ได้ศึกษาผลของสมุนไพรจีน 2 ชนิด คือ รากต้นหางฉี (*Radix astragalin seu Hedysari*) และรากโสมตังกุยจีน (*Radix angelicae sinensis*) ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจง ปริมาณเซลล์ฟาโกไซต์ กิจกรรมของไลโซไซม์ คอมพลีเมนต์และความต้านทานต่อ *Vibrio alginolyticus* ของปลา yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) ทำการทดลองโดยเลี้ยงปลา yellow croaker แล้วเติมแบคทีเรียก่อโรค คือ *V. alginolyticus* ปริมาณ 10^8 cell/ml และให้อาหาร (ซูริมิ) ที่เติมสมุนไพรจีนทั้ง 2 ชนิดผสมกันความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% (w/w) เป็นเวลา 30 วันพบว่าสมุนไพรจีนความเข้มข้น 0.5% ที่เติมลงในอาหารไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในทางตรงกันข้ามซูริมิที่เติมสมุนไพรจีนความเข้มข้น 1.0 และ 1.5% มีผลให้กิจกรรมของไลโซไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้เป็นเวลา 20, 25 และ 30 วัน เป็นผลทำให้กิจกรรมของคอมพลีเมนต์เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารชนิดนี้เป็นเวลา 15 วัน อัตราการรอดชีวิตของปลา yellow croaker มีค่าสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับซูริมิที่เติมสมุนไพรจีนความเข้มข้น 0.5% และกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 37 และ 75% ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรจีนสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและเพิ่มความต้านทานโรคของปลา yellow croaker ได้ ดังนั้นการศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสกัดขมิ้นและพริกด้วยเมทานอลจะได้ดำเนินการทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จริยา สินเดิมสุข, สมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์, วีณา จารุปรีชาชาญ.(2532) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 16(2):32-5.

ไชยา อุ้ยสูงเนิน. (2532). การเลี้ยงปลาดุก. กรุงเทพฯ: พรสาส์น.

ธิดารัตน์ ปลื้มใจ. 2535. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้าทะลายโจร.วารสารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ : 34 (1) : 9-15.

บราลี ทุมกานนท์. (2533). การเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลาดุกยักษ์. นนทบุรี: ม.ป.ท.

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

สันต์ นาตะสุวรรณ. (2548). คู่มือปลาน้ำจืด. กรุงเทพฯ: เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง.

สุทธิชัย ปทุมล่องทอง. (2548). ปลาเศรษฐกิจคู่ชีวิตคนไทย. กรุงเทพฯ: สถาพรบุ๊ค.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2538). การเพาะขยายพันธุ์ปลา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

Booma Kasthuri, R. (1998). Antimicrobial activity of selected species of seaweeds on pathogenic and non pathogenic bacteria. M. Sc. Dissertation. M.S. University, Tirunelveli, Tamilnadu, India.

Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. (1997). Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: Effect of cryoprotectant, straw size, and formulation of extender. Theriogenology, 47 : 639-645.

Ghosh TK, Sen T, Das A, Dutta AS and Nag Chaudhuri AK. (1993). Antidiarrhoeal activity of the methanolic fraction of the extract of unripe fruits of *Psidiun guajava* Linn. Phytother Res, 7: 431-3.

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

Gunder, H. Clarias gariepinus North African catfish Retrieved November 20, 2008, from http:// animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Clarias_gariepinus.html

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

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

Immanuel, G., Vincybai, V.C., Sivaram, Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture, 236 : 53-65.

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

Jian, J. and Wu, Z. (2003). Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). Aquaculture, 218 : 1-9.

Mahmoud, B. S. M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shik, S. I., Suk, C. D. and Suzuki T, (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. Food Microbiology, 21, 657-666.

Mayachiew P. and Devahastin S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. LWT 41: 1153-1159.

Okeke, M.I., Iroegbu, C.V.J., Jideofor, C.O., Okoli, A.S. and Esimore, C.O. (2001). Antimicrobial activity of ethanol extracts of two indigenous Nigerian spices. J. Herbs Spices Med. Plants, 8(4) : 39-46.

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

Parveen, S. and Kumar, V.R. (2000). Effects of extracts of some medicinal plants on the growth of *Alternaria triticina. Indones.* J. Phytol. Res. 13 : 19-196.

Sadd, A., Billard, R., Theron, M.C. and Hollebeeq, M.G. (1988). Short-term preservation of Carp (*Cyrinus carpio*) semen. Aquaculture, 71 : 133-150.

Samy, R.P., Ignacimuthu, S. and Sen, A. (1998). Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. Journal of Ethnopharmacology, 62 : 173-182.

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

Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y. (1996). Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. Aquaculture, 145, 195-203.

Vuddhakul, V., Bhoopong, P., Hayeebilan, F., Subhadhirasakul, S. (2007) Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Food Microbiology 24: 413–418.

Zampini, I.C., Vattuone, M.A. and Isla, M.I. (2005). Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. Journal of Ethnopharmacology 102 : 450-456.