รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

เรื่อง
การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืน เพื่อการค้าและการอนุรักษ์

Sustainable Development of Storage Technology of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) Milt for Commercial and Conservation

โดย

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

งายวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืนเพื่อการค้าและการอนุรักษ์ (Sustainable development of storage technology of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt for commercial and conservation) สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ข้าพเจ้าและคณะผู้ทำงานขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

ตุลาคม 2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืนเพื่อการค้าและการอนุรักษ์ ในปีที่ 1 ได้ทำการศึกษาถึงชนิดและอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น และความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น ผลจากการศึกษาพบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น เนื่องจากสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 10% ส่วนการศึกษาถึงอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายพบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 20% หลังการแช่เย็นนาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) จึงได้นำการเจือจางน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1 :1 มาทำการศึกษาต่อไป ในขั้นตอนต่อมาทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น พบว่าการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% มีประสิทธิภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาสวายต่ำ โดยประเมินจากการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายรวมทั้งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 และการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในขั้นตอนต่อไป

คำสำคัญ: การแช่เย็น; ปลาสวาย; น้ำเชื้อ; ยาปฏิชีวนะ; แบคทีเรีย

ABSTRACT

The research project entitled "Sustainable development of storage technology of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt for commercial and conservation" in the first year was designed to study the appropriate type and ratios of buffering solution for chilled storage of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt and toxicity of antibiotics on inhibiting pathogenic bacteria in chilled milt. Results showed that Extender 7 and Ca-F HBSS were the most suitable extender for chilled storage because they were able to preserve milt for 5 days (120 hours) with 10% sperm motility. To determine appropriate dilution ratios of Striped Catfish milt in Ca-F HBSS buffer among 1:1, 1:2 and 1:4, all tested ratios demonstrated no significant difference ($P > 0.05$) in motility. This was about 20% sperm motility after 5 days (120 hours) of storage. Therefore, milt dilution with Ca-F HBSS at a ratio of 1:1 was used on subsequent experiments. In the next step, toxicity of antibiotics for inhibiting pathogenic bacteria in chilled-stored Striped Catfish milt was evaluated. Results showed that 0.1% Penicillin-streptomycin was an effective antibiotic for inhibiting pathogenic bacteria in chilled-stored Striped Catfish milt because of low toxicity and decline in total heterotrophic bacteria in Striped Catfish milt. The use of 0.1% Penicillin-streptomycin was suitable for further development on storage technology of Striped Catfish milt.

Key words: Refrigerated storage; Striped Catfish; Semen; Antibiotics; Bacteria

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ii
บทคัดย่อ		iii
Abstract		iv
สารบัญ		v
สารบัญตาราง		vi
สารบัญภาพ		vii
บทที่		
1	ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	20
4	ผลการทดลอง	28
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง		47
Output จากโครงการวิจัย		52

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ 100 มิลลิลิตร) ของสารอินทรีย์บางอย่างในของเหลวในน้ำเชื้อปลาบางชนิด	7
2	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอโรโมแนส	10
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ	29
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายในสูตรน้ำยา Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน	30
5	ผลของยาปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของปลาสวายแช่เย็น	32
6	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น	34
7	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด	36
8	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ	37
9	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1%	38
10	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1%	39
11	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2%	39
12	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 0.1%	40
13	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 1%	41
14	ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยา Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 2%	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปลาสวาย	6
2	ตัวสเปิร์มปลาสวาย	8
3	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (a) การติดสีแกรมของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (b) รูปร่างของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส	9
4	แหล่งที่พบแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (a) แม่น้ำ (b) น้ำเสีย	9
5	อาการติดเชื้อจาก *A. hydrophila* ที่บริเวณผิวหนัง	10
6	ลักษณะของปลาที่เป็นโรค MAD (a) อาการท้องบวม (b) เลือดออกบริเวณเหงือกและผิวหนัง (c) ผิวหนังและเกล็ดหลุดออก	12
7	(a) ลักษณะรูปร่างของ *Pseudomonas* spp. (b) ลักษณะรูปร่างของ *Leucothrix* spp	14
8	(a) การจับพ่อพันธุ์ปลาสวาย (b) พ่อพันธุ์ปลาสวาย	22
9	การปรับสภาพแวดล้อมพ่อพันธุ์ปลาสวาย ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	22
10	(a) การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของสเปิร์มในถุงอัณฑะปลาสวาย (b) การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาสวาย	23
11	การเจือจางน้ำเชื้อปลาสวาย	24
12	การย้อมสีสเปิร์มด้วยเทคนิคการย้อม Eosin-Nigrosin	25
13	การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายด้วยเทคนิคการย้อมสี Eosin-Nigrosin	33

บทที่ 1
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปลาน้ำจืดมีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม และโภชนาการของประเทศอย่างมาก เนื่องจากปลาเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ตลอดจนงานในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังช่วยให้ตลาดแรงงานขยายตัว รัฐบาลจึงได้ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี เพื่อเป็นการทดแทนการประมงจากแหล่งธรรมชาติที่ให้ผลผลิตลดลงจากการทำประมงอย่างผิดกฎหมาย เช่น การจับปลาในฤดูวางไข่ การระเบิดปลา เป็นต้น และโอกาสที่การเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดจะขยายตัวได้ยังมีอีกมาก เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ที่สามารถนำมาทำฟาร์มเพาะเลี้ยงได้หลายแห่ง และยังมีเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะรองรับการขยายพันธุ์และการอนุบาลปลาได้ (ศักดิ์ชัย, 2536)

จากสถิติและผลการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของกรมประมงในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้รายงานว่า ปริมาณและมูลค่าสัตว์น้ำที่สำคัญของไทย 10 อันดับ ได้แก่ ปลานิล ปลาไน ปลาตะเพียน ปลาสลิด ปลาจีน ปลาดุกและปลาช่อน อยู่ในลำดับที่ 1 ถึง 7 ส่วนปลาสวาย อยู่ในลำดับที่ 8 กุ้งก้ามกราม และปลาหมอเทศ อยู่ในลำดับที่ 9 และ 10 ตามลำดับ โดยมีปริมาณผลผลิตปลาสวายรวมทั้งประเทศ 7,678.01 ตัน คิดเป็นมูลค่า 138 ล้านบาท และมีการเลี้ยงอยู่ในทุกภูมิภาคของประเทศ โดยเฉพาะภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลางและภาคตะวันออก จากมากไปหาน้อยตามลำดับ (กองเศรษฐกิจการประมง, 2541) แสดงให้เห็นว่าปลาสวายเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย และเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยทั่วไป เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี สามารถนำไปบริโภคได้ทั้งปลาสดและทำเป็นปลาแปรรูปได้หลายชนิด เช่น ปลาแห้งรมควัน ปลาร้า ปลาส้มและอื่น ๆ นอกจากนี้ตลาดปลาสวยงามในต่างประเทศ เช่น ฮ่องกง สิงคโปร์ และประเทศในแถบยุโรปได้ให้ความสนใจกับลูกปลาสวายขนาดเล็กเป็นอย่างมาก และเนื้อปลาสวายลอกหนังแช่แข็งก็เป็นที่น่าสนใจเช่นกัน (สมปอง, 2523)

ในอดีตลูกปลาสวายจะถูกรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อส่งขายต่อผู้เลี้ยงปลา ทั้งนี้เพราะปลาสวายเป็นปลาที่ไม่แพร่พันธุ์วางไข่ในบ่อหรือในกระชังที่กักขัง จนกระทั่งกรมประมงประสบผลสำเร็จในการผสมเทียมปลาสวายในปี พ.ศ. 2509 อย่างไรก็ตาม ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายนของทุกปี มักประสบปัญหาการขาดแคลนลูกปลา เนื่องจากอยู่นอกช่วงฤดูผสมพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมในแต่ละท้องถิ่น และความช้าเร็วของฤดูฝนในแต่ละปีด้วย (สมปอง, 2523) ในขณะที่ปลาสวายทางภาคใต้สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดทั้งปี ผู้เลี้ยงปลาสวายบางรายจึงต้องสั่งซื้อลูกพันธุ์ปลาจากทางภาคใต้โดยการลำเลียงขนส่งลูกปลาทางรถยนต์และทางอากาศ (กาญจนรีและคณะ, 2539) เนื่องมาจากแรงจูงใจเรื่องราคาของผลผลิตปลาสวายในช่วงนอกฤดูเก็บเกี่ยวที่อาจมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 50-70 บาทในบางพื้นที่ เช่น จ. เชียงใหม่ และ จ. ขอนแก่น (กองเศรษฐกิจการประมง, 2541) ดังนั้น หากมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลาสวายให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การนำน้ำเชื้อแช่เย็นหรือแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์ เพื่อลดต้นทุนในการเลี้ยง จับ และรีดน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียมก็จะสามารถลดต้นทุนทั้งในส่วนของการเพาะพันธุ์ลูกปลาของผู้เพาะลูกปลาขาย และต้นทุนค่าลูกพันธุ์ปลาของผู้เลี้ยงปลาเนื้อได้ ซึ่งการพัฒนาเทคโนโลยีเหล่านี้จำเป็นต้องมีการ

ประเมินความเสี่ยงของอุบัติการณ์ในการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้นมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ

อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่ประสบอยู่ขณะนี้ของการเลี้ยงปลาสวายก็คือ การขาดแคลนลูกพันธุ์ปลาสวายที่จะนำมาเลี้ยง อันเนื่องจากไม่สามารถควบคุมการผลิตเพาะพันธุ์ปลาได้ตามที่ต้องการ เพราะว่าปลาสวายแม้ว่าจะผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล แต่ก็บ่อยครั้งที่ความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์เกิดไม่พร้อมกัน เช่น บางครั้งแม่พันธุ์มีไข่แก่แต่พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อน้อยมาก หรือพ่อพันธุ์มีความพร้อมแต่แม่พันธุ์มีไข่ที่ไม่สุกเต็มที่ เป็นต้น รวมทั้งน้ำเชื้อที่รีดได้มักมีปัสสาวะออกมาด้วย ทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสดได้นาน เนื่องจากคุณภาพสเปิร์มลดลงเมื่อมีการปนเปื้อนด้วยปัสสาวะ ปัญหานี้แม้ว่าจะเกิดขึ้นในพ่อแม่พันธุ์ปลาชนิดอื่นๆ แต่ก็ไม่มีความรุนแรงมากเหมือนปลาสวายในประเด็นที่พ่อแม่พันธุ์ปลาสวายมักมีขนาดใหญ่กว่าพ่อแม่พันธุ์ปลาทั่วไป โดยมีขนาดอย่างน้อย 4 กิโลกรัมขึ้นไป ทำให้เมื่อจับหรือลำเลียงปลาสวาย ปลาจะมีความเครียดมาก และมีผลต่อคุณภาพไข่ และคุณภาพน้ำเชื้อ ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จ ในปัจจุบันการเพาะพันธุ์ปลาสวายนิยมเพาะพันธุ์ด้วยการผสมเทียมโดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ แล้วรีดน้ำเชื้อผสมกับไข่ หรืออาจทำโดยปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ผสมพันธุ์กันเองภายในบ่อ แล้วทำการเก็บไข่ไปฟักและอนุบาลต่อไป อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเพาะพันธุ์ปลาสวายด้วยวิธีไหนก็จะเจอปัญหาความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ที่มักไม่พร้อมกัน หรือปัญหาปริมาณน้ำเชื้อที่พ่อพันธุ์มีน้อยดังที่กล่าวมาแล้ว

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีความเจริญก้าวหน้าอยู่ในแนวหน้าของโลก ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคการเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องและยาวนาน แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดก็คือ พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Spawning season) พ่อพันธุ์จะมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนให้ปลาสร้างน้ำเชื้อแต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เพราะโดยทั่วไปแล้วช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศ มักจะเกิดก่อน แต่จะยาวนานกว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศ นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (Egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรือเกิดจากความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว (Individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (Freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมนั้นก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้ผสมเทียมทันที ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผสมพันธุ์ไม่ติด (วีรพงศ์, 2536) ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อที่พร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เมื่อแม่ปลามีความพร้อมในการเพาะขยายพันธุ์

ด้วยเหตุที่การเพาะพันธุ์ปลาสวายด้วยการผสมเทียมเป็นวิธีที่ควบคุมผลผลิตลูกปลาได้ตามความต้องการของตลาด และทำให้การจัดการภายในฟาร์มมีความสะดวก แต่การที่พ่อพันธุ์ปลาสวายมีน้ำเชื้อน้อย ทำให้ต้องรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวเพื่อผสมเทียมกับไข่ หรือบ่อยครั้งที่แม่พันธุ์ปลาสวายที่ทำการเพาะมีการตกไข่ไม่พร้อมกัน ทำให้การผสมเทียมต้องจับพ่อปลาบ่อยครั้งมากขึ้นเพื่อผสมเทียม ซึ่งต้องใช้แรงงานมากขึ้นในการจับพ่อพันธุ์ และปลามีความเครียด สภาพการณ์เช่นนี้เป็นปัญหาที่พบบ่อย ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาสวายไม่สามารถผลิตลูกปลาได้ตามความต้องการของตลาดหรือมีผลผลิตต่ำ แนวทางที่เหมาะสมในการแก้ปัญหาดังกล่าวแนวทางหนึ่งก็คือ เมื่อจับพ่อพันธุ์ปลาสวายมารีดน้ำเชื้อก็ควรรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวในเวลาเดียวกัน เพื่อให้ได้น้ำเชื้อปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ และเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำสามารถเก็บได้ใน 2 ลักษณะ ได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น (Short-term storage) โดยเก็บรักษาในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย (0-4 องศาเซลเซียส) ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (Long-term storage) โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นปี และน้ำเชื้อที่ได้ก็มีคุณภาพดีเหมือนน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ (Freshly collected milt) การพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายให้มีชีวิตยืนยาวและใช้ประโยชน์ได้นานที่สุด จะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาสวายให้ดีขึ้น และควบคุมการผลิตได้ตามที่ต้องการ กล่าวคือเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อมก็รีดไข่ แล้วนำน้ำเชื้อแช่เย็นที่อยู่ใน Tissue culture flask หรือน้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟาง (Straw) มาผสมเทียมกับไข่ทันทีโดยไม่ต้องจับพ่อพันธุ์ขึ้นจากบ่อเพื่อรีดน้ำเชื้อ ซึ่งจะลดการใช้พื้นที่ในฟาร์มที่ต้องขังพ่อพันธุ์ ทำให้ประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ดีขึ้น และยังสามารถนำน้ำเชื้อแช่เย็น หรือน้ำเชื้อแช่แข็งจากที่อื่น ๆ มาผสมเทียมกับไข่ได้ทันทีเมื่อแม่พันธุ์มีการตกไข่

อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดในระหว่างเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำคือการเจริญของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อ ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากแบคทีเรียที่อยู่บนผิวตัวปลา แบคทีเรียที่ปนเปื้อนนี้สามารถเจริญในระหว่างเก็บน้ำเชื้อได้ เพราะแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเลือดหรือมีอาหารโดยเฉพาะของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์ม ซึ่งมีธาตุอาหารหลายชนิดที่แบคทีเรียชอบ ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี ซึ่งการปนเปื้อนนี้มีผลทำให้การปฏิสนธิและคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาลดลง (Sadd et al., 1988) การป้องกันการปนเปื้อนอาจทำได้โดยการใส่ยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกับการเก็บรักษาสเปิร์มของสัตว์บกเศรษฐกิจหลาย ๆ ชนิด แต่การใช้ยาปฏิชีวนะจะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะอาจมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำและการพัฒนาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำและมนุษย์

นอกจากนั้นในปัจจุบันพบว่าเกิดภัยพิบัติจากน้ำท่วมทั่วประเทศจึงทำให้ตระหนักถึงประโยชน์ของการแช่เย็นและแช่แข็ง เนื่องจากน้ำท่วมจากน้ำหลากหรือน้ำเอ่อล้นจากแม่น้ำหรือทะเลสามารถทำให้บ่อเลี้ยงพ่อพันธุ์เกิดความเสียหายและทำให้เกิดการสูญเสียพ่อพันธุ์อย่างมาก ดังนั้นการเก็บน้ำเชื้อโดยเฉพาะการเก็บรักษาแบบแช่แข็งซึ่งในต่างประเทศ ยกตัวอย่างเช่น ประเทศญี่ปุ่นและประเทศไต้หวันได้มีการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจอย่างเป็นระบบทำให้สามารถอนุรักษ์น้ำเชื้อและสามารถนำน้ำเชื้อมาใช้ได้ตลอดเวลาโดยไม่ต้องคำนึงถึงฤดูกาลที่มีน้ำเชื้อหรือช่วงที่มี

น้ำเชื้อไม่สมบูรณ์ จึงเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจได้อย่างครอบคลุมทั้งประโยชน์ทางการค้าและประโยชน์ทางด้านการอนุรักษ์

ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งให้มีคุณภาพดี และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ได้เหมือนการใช้น้ำเชื้อสด เพื่อให้มั่นใจได้ว่าเทคโนโลยีการแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายเมื่อนำมาใช้เพาะพันธุ์จะมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคปลาในภายหลัง รวมทั้งลดอัตราการเกิดโรคระบาดที่สืบเนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อนั่นเอง และสามารถทำการอนุรักษ์น้ำเชื้อปลาสวายได้ เนื่องจากในทางทฤษฎีแล้วน้ำเชื้อสัตว์น้ำสามารถเก็บได้ตลอดไป หากมีเทคโนโลยีการเก็บรักษาที่เหมาะสม (Ashwood-Smith, 1980; Suquet et al., 1998)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพและสามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลานาน

2. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำ (2-4 องศาเซลเซียส) ในสภาพที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

3. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้แช่เย็นน้ำเชื้อปลาสวายและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

4. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายขณะเก็บแช่เย็น และการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียขณะเก็บรักษา

5. พัฒนาเทคโนโลยีของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นด้วยการเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องประกอบด้วยหัวข้อดังนี้

1. ปลาสวาย
2. น้ำเชื้อปลา
3. แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลา
4. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่เย็น-แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

1. ปลาสวาย

ปลาสวายเป็นปลาพื้นเมืองของไทย พบได้ทั่วไปในแม่น้ำเจ้าพระยา ท่าจีน ป่าสัก และแม่น้ำโขง เป็นปลาที่กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ แต่จะชอบกินเนื้อสัตว์มากกว่าโดยจะชอบกินอาหารบริเวณก้นบ่อ นอกจากนี้แล้วปลาสวายยังเป็นปลาที่เลี้ยงได้ผลดีทั้งในกระชังและในบ่อ โดยตามธรรมชาติของปลาสวายจะวางไข่ในแหล่งน้ำไหล โดยจะวางไข่ในฤดูฝน (สมปอง, 2523)

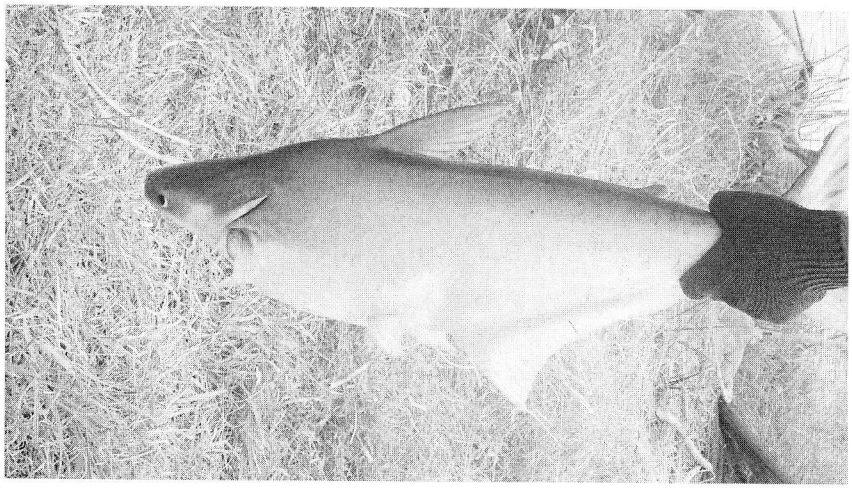
ปลาสวายมีชื่อสามัญว่า Striped catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon hypophthalmus* มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Vertebrata
Class Pisces
Subclass Teleostomi
Order Cypriniformes (Ostariphysi)
Suborder Siluroidei (Nematogathi)
Family Pangasiidae
Genus *Pangasianodon*
Species *Pangasianodon hypophthalmus*

1.1 ลักษณะทั่วไป

ปลาสวายเป็นปลาน้ำจืดที่ไม่มีเกล็ด ลำตัวเรียวยาว ลักษณะด้านหน้าค่อนไปทางอ้วนกลม มีหลังค่อนข้างตรง ส่วนหน้าลาดลงถึงปาก ปากกว้างทู่ มีหนวดสั้นๆ 2 คู่ มีกระโดงครีบหลัง 2 ครีบ ไม่ติดต่อกัน ครีบอันหลังเล็กมาก เป็นครีบไขมัน (Adipose Fin) นอกจากนี้ยังมีครีบอก 1 คู่ ปลายหางยาวและเว้าลึกเป็นแฉก หลังมีสีหม่นเข้ม ตามครีบมีสีเหลืองค่อนข้างดำ (ภาพที่ 1) ปลาสวายมีลักษณะส่วนสัดคล้ายปลาเทโพ แต่แตกต่างกันโดยใช้จุดเป็นเครื่องสังเกตได้ง่ายๆ คือ ปลาเทโพจะมีจุดกลมดำที่เหนือโคนครีบหู หรือที่ชาวบ้านเรียกว่า "หู" อีกข้างละหนึ่งจุด (ดีพร้อม, 2529) โดยเฉลี่ยปลาสวายอายุ 1 ปีจะมีน้ำหนัก 2 กิโลกรัมต่อตัวขึ้นไป ส่วนความยาววัดจากปากไปถึงปลายหางประมาณ 30-45 เซนติเมตร แต่เคยมีการพบปลาสวายขนาดใหญ่ในแหล่งน้ำธรรมชาติมีความยาว 88.5 เซนติเมตร และมีน้ำหนักมากถึง 9 กิโลกรัมเศษ ซึ่งปลาสวายเป็นสัตว์น้ำที่ให้เนื้อในปริมาณค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืดด้วยกัน ข้อเด่นของปลาชนิดนี้ก็คือ ในส่วนที่เป็นเนื้อจะ

ไม่มีก้างแทรกเหมือนปลาตะเพียน ดังนั้นจึงมีผู้นิยมรับประทานปลาชนิดนี้กันอยู่ไม่น้อย (สมควร, 2542)



ภาพที่ 1 ปลาสวาย

1.2 แหล่งอาศัย

ปลาสวายมักจะว่ายรวมกันไปเป็นฝูง ๆ อาศัยอยู่ในน้ำลึก ซึ่งมีกระแสน้ำไหลถ่ายเทได้ ชอบรวมกลุ่มพักอยู่ในร่มใกล้พันธุ์ไม้น้ำ เช่นตามใต้แพผักบุ้ง หรือใต้กอผักตบชวา ปลาสวายเป็นปลาที่ตื่นตกใจง่ายเมื่อถูกรบกวนหรือถูกทำอันตราย (อดุลย์, 2532)

1.3 ลักษณะเพศ

ลักษณะเพศของปลาสวายนั้น ตัวผู้มีท้องเรียบไม่นูน พื้นท้องแข็งกว่าตัวเมีย ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี แคบเล็ก มีสีแดงอ่อน เมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมาให้เห็นได้ชัด ส่วนตัวเมียมีลักษณะที่พอจะสังเกตได้ชัดคือ บริเวณส่วนท้องอูมเป่ง กลมนูนออกมาเห็นได้ถนัด พื้นท้องมีผิวเนียนนิ่ม ลักษณะของช่องเพศเป็นรูปรีมีขนาดกว้างใหญ่กว่าของตัวผู้ นอกจากนั้นตรงบริเวณช่องเพศยังมีลักษณะพองเป่งปรากฏเป็นสีแดงเข้ม (เอกสารคำแนะนำกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550)

2. น้ำเชื้อปลา

น้ำเชื้อปลามีชื่อที่ใช้เรียกเหมือนน้ำเชื้อสัตว์ตัวผู้ทั่วไปคือคำว่า "ซีเมน" (Semen) และคำว่า มิลท์ (Milt) ซึ่งใช้เรียกน้ำเชื้อของปลาโดยเฉพาะ โดยน้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอัณฑะ หรือที่รีดออกมาสดๆ และสะอาดจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาวจัด โดยลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อออกมา โดยควรสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งน้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและไม่ควรมีสีอื่นเจือปน (วีรพงศ์, 2535) ข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องน้ำเชื้อปลานี้ มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการคิดค้นพัฒนาสูตรน้ำยาสำหรับเก็บรักษา

ตัวสเปิร์มปลาไว้เพื่อการขยายพันธุ์ปลา เพราะองค์ประกอบทางเคมี และฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลาย่อมมีความแตกต่างกันไปตามกลุ่มหรือชนิดของปลา ดังนั้นการเตรียมน้ำยาที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่มต้องใช้สารเคมีที่เมื่อละลายน้ำเชื้อแล้วให้อิออนชนิดที่เหมาะสม และน้ำยานั้นควรจะมีออสโมลาลิตี (Osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของตัวสเปิร์มตลอดจนการรักษาให้ตัวสเปิร์มคงรูป และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษาไว้เพื่อการเพาะขยายพันธุ์ และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา จึงได้มีการแสดงส่วนประกอบของสารอินทรีย์บางชนิดไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1 (กฤษณ์, 2536)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ 100 มิลลิลิตร) ของสารอินทรีย์บางอย่างในของเหลวในน้ำเชื้อปลาบางชนิด (กฤษณ์, 2536)

ชนิดปลา	ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในของเหลวในน้ำเชื้อปลา (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)				
	กลูโคส	ฟรุคโตส	กรดซิตริก	กลีเซอรอล	ไขมัน
Rainbow trout	2.4-22.2	0-0.8	4.4-93.7	0.3-3	3.4-37.3
Perch	0.6-15.7	0-1.2	16.8-46.6	1.0-6.3	55.8-148.8
Brown trout	0-25.7	0-0.6	5.0-25.0	0.4-4.4	27.1-82.5
Salmon	7.2-39.3	0-1.3	0.9-12.8	0.6-2.7	28.6-40.7
Whitefish	0.7-21.8	0-0.1	5.0-33.6	3.5-39.1	-
Burbot	1.9-7.8	0.4-1.4	20.4-56.7	2.6-4.5	45.6-616

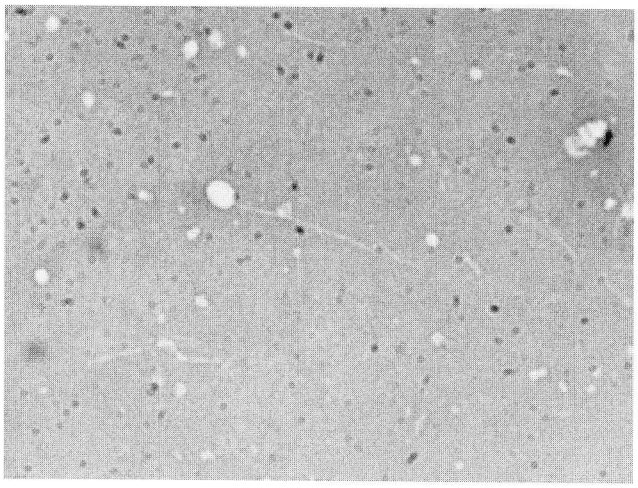
จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่วัดได้มีความแปรปรวนสูงและยากที่จะอธิบายถึงสาเหตุได้ ยิ่งไปกว่านั้นความสำคัญหรือหน้าที่ของสารอินทรีย์เหล่านี้ในน้ำเชื้อปลาก็ไม่มีใครบอกได้แน่ชัด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นที่ทราบกันดีว่าสารอินทรีย์เช่น น้ำตาลตัวสเปิร์มจะใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่ในปลาไม่น่าจะมีการใช้พลังงานจากนอกเซลล์ภายหลังเมื่อถูกขับออกจากร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ เพราะจะถูกเจือจางและมีอายุอยู่ได้ไม่นานเกิน 1 นาที ตัวสเปิร์มปลาขณะที่มีการเคลื่อนไหวคงมีโอกาสใช้แต่พลังงานที่สะสมไว้ในเซลล์เท่านั้น ดังนั้นสารอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส คงสะท้อนให้เห็นการใช้พลังงานของอัณฑะปลาเท่านั้น อย่างไรก็ตามกรดซิตริกอาจมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนไหวของตัวสเปิร์มปลา เพราะสามารถจับ (Binding) กับอิออนต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียมและโพแทสเซียม ความสมดุลของอิออนต่างๆ เหล่านี้ช่วยป้องกันไม่ให้ตัวสเปิร์มมีการเคลื่อนไหวจนกว่าจะถูกขับออกนอกร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ (กฤษณ์, 2536)

ลักษณะสเปิร์มของปลาต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เพราะไม่มีส่วนอะโครโซม (Acrosome) ทั้งนี้เป็นเพราะไข่ปลามีไมโครไพล์ซึ่งเป็นทางผ่านของเชื้อตัวผู้อยู่แล้ว อะโครโซมจึงไม่จำเป็นสำหรับปลา โดยเชื้อตัวผู้ของปลามีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วนคือ หัว มิดพีซและหาง (ภาพที่ 2)

1) หัว คือส่วนของนิวเคลียส ซึ่งมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด นิวเคลียสนี้มีไซโตพลาสซึมหุ้มอยู่เพียงบางๆ โดยรูปร่างลักษณะและขนาดของส่วนหัวนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา

2) มิดพีซ (Mid piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากส่วนหัวและมีรูปร่างต่างๆ กันไปตามชนิดของปลา ลักษณะทั่ว ๆ ไปประกอบด้วยส่วนไมโครทุบูล (Microtubule) ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนหาง ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมซึ่งภายในมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเซ็นตริโอล (Centriole)

3) หาง ประกอบด้วยไมโครทุบูลที่เรียงกันเป็นวงรอบ ๆ แกนกลาง 1 คู่ และเรียงเป็นวงรอบแกนกลางอีก 9 คู่ ซึงลักษณะเช่นนี้เองที่ทำให้ส่วนหางสามารถเคลื่อนไหวได้ (อุทัยรัตน์, 2531)



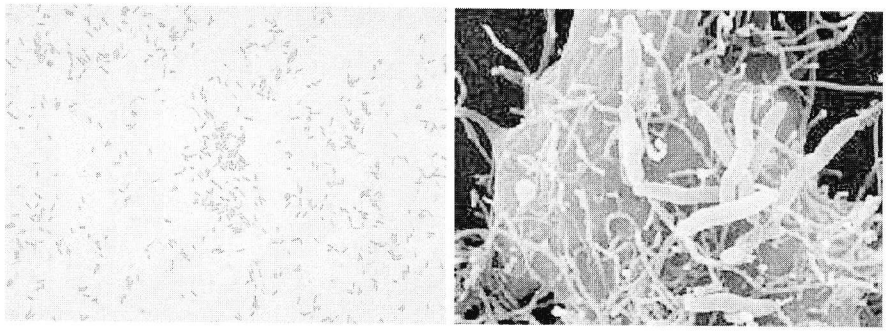
ภาพที่ 2 ตัวสเปิร์มปลาสวาย

3. แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลา

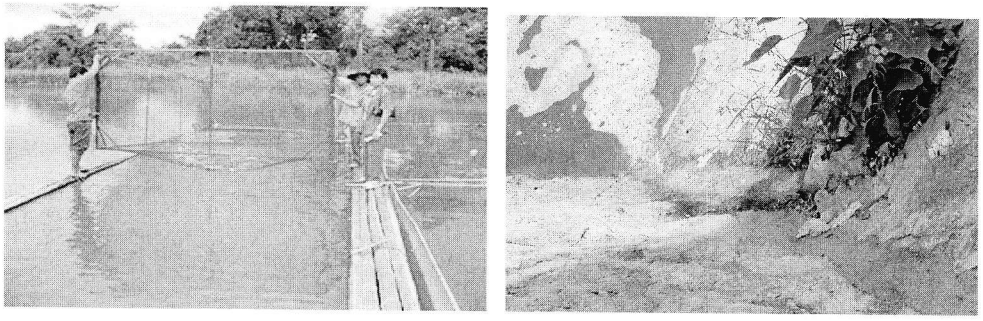
ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาเป็นอาชีพหลักที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและอุตสาหกรรมการส่งออกอาหารเป็นอย่างมาก แต่ในช่วง 2 – 3 ปีที่ผ่านมาปริมาณการส่งออกสัตว์น้ำเหล่านี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากมีการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำเหล่านี้ โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ไวรัส โพรโทซัวและปรสิตหลายชนิด โรคที่มักพบได้บ่อยและสร้างปัญหาให้กับผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ยกตัวอย่างเช่น โรควิบริโอซิส (Vibriosis) เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio*) และโรคฟูรังคูโลซิส (Furunculosis) เกิดจากการติดเชื้อ *Aeromonas* sp. เป็นต้น แบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง ดินในบ่อเพาะเลี้ยง (ในกรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงในบ่อดิน) และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่นแต่มีปริมาณไม่มากนัก เช่น ปนเปื้อนมาจากมูลนกพิราบ (Al-Harbi, 2003) โดยแบคทีเรียก่อโรคที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำและดินในบ่อเพาะเลี้ยงปลา ได้แก่

3.1 แบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (*Aeromonas* spp.)

แอโรโมแนสเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน (ภาพที่ 3) พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น แม่น้ำ ลำคลอง น้ำเสีย (ภาพที่ 4) โดยมีคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 2 แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถก่อโรคในคน เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ โรคอาหารเป็นพิษและติดเชื้อที่ผิวหนัง (ภาพที่ 5) เป็นต้น



ภาพที่ 3 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส
(a) การติดสีแกรมของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส
(b) รูปร่างของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)



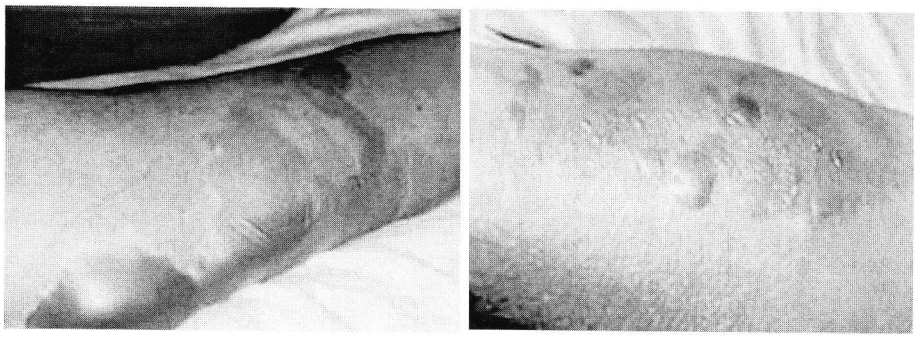
(a) (b)

ภาพที่ 4 แหล่งที่พบแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส
(a) แม่น้ำ
(b) น้ำเสีย
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอโรโมแนส (สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

การทดสอบ	*A. hydrophila*	*A. caviae*	*A. sobria*
Cytochrome oxidase test	+	+	+
D-glucose fermentation test	+	+	+
Arginine dihydrolase test	+	+	-
Ornithine decarboxylase test	-	-	-
Lysine decarboxylase test	+	-	+, weak
H_2S from cysteine test	+	+	ND
Gas from glucose	+	+	+
Indole production test	+	+	+
Esculin hydrolysis test	+	+	-

หมายเหตุ weak ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ช้า
ND ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 5 อาการติดเชื้อจาก *A. hydrophila* ที่บริเวณผิวหนัง
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

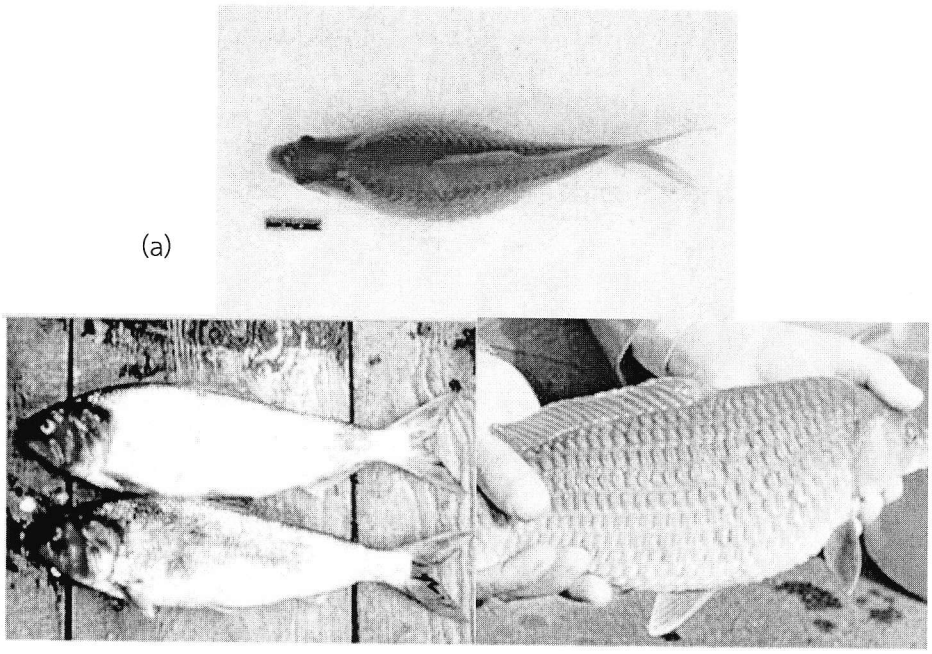
แบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนสสามารถก่อโรคในสัตว์ เช่น ปลาและกบ เป็นต้น โดยชนิดที่สามารถก่อโรคในสัตว์ ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. caviae* และ *A. veronii* (Noga, 2000; Soo et al., 2007)

3.1.1 *A. hydrophila*

A. hydrophila เป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลา กบและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาน้ำจืด โรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ เรียกว่า Motile aeromonad disease (MAD) ซึ่งทำให้เกิดอาการติดเชื้อในกระแสเลือดที่เรียกว่า Motile aeromonad septicemia (MAS; Noga, 2000) แบคทีเรียเหล่านี้แพร่กระจายได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและจัดเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส สามารถก่อโรคได้หากปลาอยู่ในสภาวะเครียดและระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น ขาดสารอาหาร อุณหภูมิสูงเกินไป อาศัยอยู่ในระบบเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น รวมทั้งการเคลื่อนย้ายจากที่หนึ่งสู่ที่หนึ่งก็สามารถทำให้ปลาติดเชื้อได้เช่นกัน เมื่อเกิดการติดเชื้อปลาจะมีอาการติดเชื้อในกระแสเลือด เลือดออกบริเวณผิวหนัง ท้องบวม ตาโปน หลอดเลือดบริเวณเหงือกเกิดการโป่งพอง ผิวหนังหรือเกล็ดหลุดลอก ดังภาพที่ 6 ส่งผลให้อวัยวะภายใน ได้แก่ ท่อทางเดินอาหาร ไต กล้ามเนื้อและม้ามเกิดการอักเสบและถูกทำลาย (Lewbart, 2001)

การวินิจฉัยโรค MAD กระทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากตัวอย่างปลามักปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียชนิดอื่น อวัยวะที่เหมะสมต่อการนำมาวินิจฉัยโรค คือ ไต ซึ่งการวินิจฉัยต้องใช้การเพาะเชื้อร่วมกับการสังเกตอาการของปลาที่เป็นโรคจึงจะทำให้รักษาเป็นไปอย่างถูกต้องและแม่นยำ ปลาที่ติดเชื้อในระยะแรกอาจจะตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะและการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงได้ดี ช่วงเริ่มต้นการรักษาควรใช้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์รักษากว้าง (Broad spectrum) และไม่ควรปล่อยไว้นานยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ได้แก่ Enrofloxacin, Trimethoprin-sulfamethoxazole และ Amikacin ในกรณีที่บ่อเพาะเลี้ยงมีปลาเป็นจำนวนมากเมื่อปลาแสดงอาการที่น่าสงสัยควรรีบแยกปลาที่แสดงอาการนั้นออกจากปลาตัวอื่นเพื่อนำไปเลี้ยงตามลำพัง

การป้องกันโรค MAD ที่ดีที่สุด คือ การแยกหรือการกักกันบริเวณแพร่เชื้อ เช่น การเลี้ยงปลาในบ่อปลาควรเลี้ยงปลาที่เป็นโรคแยกจากปลาปกติอย่างน้อย 1 เดือน นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันได้ด้วยการรักษาคุณภาพน้ำให้ดีอยู่เสมอ โดยเปลี่ยนน้ำอย่างน้อยร้อยละ 25 ของบ่อทุกเดือน การไม่เลี้ยงปลาแบบหนาแน่น การรักษาอุณหภูมิให้เหมาะสมและการเติมอากาศอย่างเพียงพอ (Lewbart, 2001)



(a)

(b) (c)

ภาพที่ 6 ลักษณะของปลาที่เป็นโรค MAD
(a) อาการท้องบวม
(b) เลือดออกบริเวณเหงือกและผิวหนัง
(c) ผิวหนังและเกล็ดหลุดออก
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

3.1.2 *A. salmonicida*

A. salmonicida เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้นจนถึงกลมหรือรี มีความกว้างของเซลล์ประมาณ 1 ไมโครเมตร ยาว 1.7 – 2 ไมโครเมตร บางสายพันธุ์จะมีรูปร่างกลมหรือรี เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีโคโลนีกลม ขอบเรียบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูลและไม่เคลื่อนที่ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 22-25 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาน้ำจืดและปลาทะเล โดยเป็นสาเหตุของโรค Furunculosis ซึ่งพบการก่อโรคครั้งแรกในปลาเทราต์ในทวีปยุโรปในปี ค.ศ. 1890 ซึ่งมักจะระบาดในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง การก่อโรคเกิดจากแบคทีเรียผลิตสารพิษที่เรียกว่า “Leucocidin” (Elliott and Shotts, 1980; Shotts and Talkington, 1980; Popoff, 1984; Munn, 2004) ในช่วงทศวรรษที่ 1980 เกิดการระบาดของโรค Furunculosis ครั้งใหญ่ในประเทศสกอตแลนด์และนอร์เวย์ ทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาเทราต์ต้องประสบกับปัญหาการตายของปลากว่าร้อยละ 50 (Munn, 2004)

ปลาที่เป็นโรค Furunculosis จะเซื่องซ้าโดยเฉพาะเมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้น ปลาที่ติดเชื้อจะมารวมกันแน่นบริเวณขอบบ่อหรือผิวน้ำ ลำตัวมีสีเข้มขึ้น เบื่ออาหาร ถ้าปลามีอาการหนักจะไม่กินอาหาร อาการภายนอกพบว่าบริเวณโคนครีบและในปากมีสีแดง เกิดแผลเปื่อยบริเวณผิวหนังหรือเกล็ด ตาโปน มีอาการห้อเลือดและท้องบวม อวัยวะภายใน เช่น เนื้อเยื่อไขมัน รังไข่ ผนังกระเพาะอาหาร เยื่อหุ้มหัวใจและกล้ามเนื้อจะมีเลือด รวมทั้งอาจพบฝีในตับ ไต ม้ามและกล้ามเนื้อ ปลาที่มีอาการขั้นเรื้อรังอาจเกิดเป็นแถบสีเทาในตับและไต ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อถูกทำลาย เมื่อปลาอ่อนแอลงจะทำให้จุลินทรีย์อื่นฉวยโอกาสก่อโรค เช่น แบคทีเรียชนิดอื่น เชื้อรา โพรโตซัว ไวรัส เป็นต้น ปลาไม่ได้รับการรักษาจะตายในที่สุด (ชลอ, 2528; Wiklund and Dalsgaard, 1998; Lewbert, 2001)

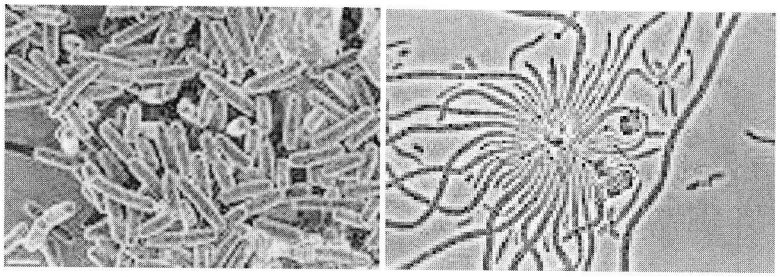
3.2 แบคทีเรียสกุล *Edwardsiella*

แบคทีเรียสกุล *Edwardsiella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น แม่น้ำ น้ำเสีย เป็นต้น เป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาโดยจะทำให้เกิดโรค Edwardsiellosis เมื่อปลาติดเชื้อจะมีอาการติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง เซื่องซ้า เบื่ออาหาร เป็นแผลเปื่อยบริเวณผิวหนังหรือเกล็ดหลุดและหายใจติดขัด โรคนี้จะทำให้ปลามีอัตราการตายสูงมาก (Lewbart, 2001) มีรายงานว่า *E. tarda* เป็นสาเหตุที่ทำให้ปลา Turbot (*Scophthamus maximus* L.) เกิดโรค (Zhaolan et al., 2007) และ *E. ictaluri* จะทำให้ปลาดุก ปลา Green knife fish (*Eigenmannia virescens*) และปลา Danios (*Danio devario*) เป็นโรค (Lewbart, 2001; Kent and Lyons, 1982; Blazer et al., 1985) นอกจากนี้ *E. tarda* ยังก่อโรคในคน โดยทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบและอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง (Vandepitte et al., 1983; Humphrey et al., 1986)

3.3 แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ

นอกจากแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มแอโรโมแนสและเอดเวิร์ดเซลลาแล้ว ยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ยกตัวอย่าง เช่น *Pseudomonas* sp. และ *Leucothrix* sp. โดย *Pseudomonas* sp. (ภาพที่ 7a) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและในคน เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคได้ในคน รวมไปถึงพืชและสัตว์ (Pelczar et al., 1986) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่มักก่อให้เกิดโรคในปลาสวยงามที่เลี้ยงอยู่ในตู้ปลา อาการของปลาที่ติดเชื้อเช่นเดียวกัน จะมีอาการตกเลือดและเป็นแผลตามลำตัวแต่อาจจะเล็กกว่า อวัยวะภายในมีอาการตกเลือด ตาบวม ท้องบวม ส่วน *Leucothrix* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายแสดงดังภาพที่ 7b นอกจากนั้น *Flexibacter columnaris* บางทีเรียกว่า โรคตัวด่างหรือโรคคอลัมนาริส เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ปลาที่เป็นโรคนี้จะมีแผลด่างขาวตามลำตัว ซึ่งถ้าปล่อยไว้นานอาจกลายเป็นแผลลึกได้ มักเกิดกับปลาที่บอบช้ำจากการลำเลียงขนส่งในช่วงฤดูที่อุณหภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงจากสูงไปหาต่ำ ปลาจะมีอาการตัวด่างซีดเป็นแถบ ครีบเปื่อย กร่อน กระสับกระส่าย และตายเป็นจำนวนมาก และวัณโรคปลา (Fish tuberculosis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium* sp. ซึ่งพบได้เสมอในปลา

สวยงามที่กินเนื้อที่เลี้ยงอยู่ในตู้กระจก เช่น ปลากัด ปลาเทวดา เป็นต้น ปลาอาจจะไม่แสดงอาการให้เห็นหรือมีอาการให้เห็น คือ น้ำหนักตัวลดลง ไม่กินอาหาร เกล็ดหลุด มีแผล ตาโปน ว่ายน้ำผิดปกติ และมีจุดขาวเกิดขึ้นตามอวัยวะภายใน เป็นต้น (โชคชัย, 2548)



(a) (b)

ภาพที่ 7 (a) ลักษณะรูปร่างของ *Pseudomonas* spp.
(b) ลักษณะรูปร่างของ *Leucothrix* spp.
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

แบคทีเรียก่อโรคมักจะปนเปื้อนมากับน้ำ ดินพื้นบ่อและอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ และแบคทีเรียก่อโรคยังสามารถปนเปื้อนมาทางอากาศ นั่นคือ มูลนกจากนกที่บินผ่านบ่อเพาะเลี้ยงนั่นเอง ดังการศึกษาของ Al-Harbi (2003) พบว่าแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในบ่อเพาะเลี้ยงปลานิลลูกผสมและทางเดินอาหารของปลานิลลูกผสม (Red tilapia; *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) ในประเทศซาอุดิอาระเบียมีการปนเปื้อนมาจากมูลนกพิราบที่อาศัยในบริเวณดังกล่าว

3. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่เย็น-แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

ปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดในระหว่างเก็บเซลล์แบบแช่เย็นและแช่แข็ง คือการเจริญของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อ อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวหนังปลา หรืออาจมีแบคทีเรียปนอยู่ในน้ำเชื้อตั้งแต่แรกขณะที่ปลาอยู่ในน้ำ หรือสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาแช่เย็นและแช่แข็งจึงต้องควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญในระหว่างที่น้ำเชื้อได้ถูกแช่เย็นและแช่แข็งเอาไว้ เพราะแบคทีเรียจะทำให้คุณภาพสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็ว (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) โดยทั่วไปแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเลือด หรือมีอาหารโดยเฉพาะน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (Seminal plasma) ซึ่งมีธาตุอาหารหลายชนิดที่แบคทีเรียชอบ ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี ดังนั้นการศึกษาการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียขณะแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้สารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องพัฒนาเทคโนโลยีควบคู่กับการพัฒนา Protocols แช่เย็นและแช่แข็งของน้ำเชื้อปลาสวาย

โดยทั่วไปการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำระหว่างการเก็บรักษาแช่เย็นมีผลต่อคุณภาพสเปิร์ม การเคลื่อนที่หรือการมีชีวิตของสเปิร์ม และระยะเวลาเก็บรักษา (Jenkins and Tiersch, 1997; Nimrat et al., 2005, Nimrat et al., 2006) ซึ่งเป็นปัญหาที่พบในระหว่างการแช่เย็นน้ำเชื้อของสัตว์บกเช่นกัน (Shin et al., 1988; Jasko et al., 1993) นอกจากนี้มีรายงานแสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิกับไข่ลดต่ำลงเมื่อนำมาผสมเทียมกับไข่ (Stoss and Refstie, 1983; Saad et al., 1988) จึงได้มีการนำเอาสารปฏิชีวนะมาใช้เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นได้นานขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียได้ แต่ก็มีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ เช่น penicillin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยการทำหน้าที่เป็น Cell wall synthesis inhibitor ในขณะที่ Oxytetracycline และ Gentamycin ทำหน้าที่เป็น protein synthesis inhibitor หรือ enrofloxacin ทำหน้าที่เป็น nucleic acid synthesis inhibitor เป็นต้น (Walsh, 2000; Todar, 2003) ดังนั้นการใช้สารปฏิชีวนะจึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นได้

การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำได้มีการทดลองทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและมีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศ ยกตัวอย่างเช่น

นลินี (2527) ทดลองเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius goionotus*) โดยศึกษาในน้ำยา 16 สูตร อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:3 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าน้ำยาสูตรที่ 16 ซึ่งประกอบด้วย $KHCO_3$ 125 mM, Sucrose 250 mM และ Reduced glutathione 9.75 mM ให้ผลดีกว่าน้ำยาสูตรอื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 76%, 71% และ 67% ตามลำดับ ของระยะเวลาการเก็บรักษา

นิศา (2539) ได้ทดลองเก็บรักษาสเปิร์มของปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ ในตู้เย็นภายใต้อุณหภูมิ 0-6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ พบว่า น้ำยาสูตร 0.85% NaCl และ Modified Cortland's #1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดี

ผาณิต และคณะ (2553) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) แบบแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลาย NaCl, KCl, $CaCl_2$, Glucose และ Mannitol ที่ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 และ 300 mM ในทุกสารละลาย พบว่าสเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูง (100%) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ (0, 25 และ 50 mM) และในสารละลายที่ความเข้มข้นสูงขึ้น สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลง ตอนที่ 2 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Ethanol, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15, และ 20 % ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่า การใช้

สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ผสม 15% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงที่สุด (78.90±1.1 %)

Hulata and Rothbard (1979) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) ในสภาพเข้มข้นและเจือจางในน้ำยา อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส นาน 45 ชั่วโมง เมื่อนำมาผสมกับไข่สด พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นและเจือจางด้วยน้ำยาให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

Stoss et al. (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทราต์สายรุ้ง (Rainbow trout) แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า ความสูงของน้ำเชื้อที่เก็บไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร ขณะเก็บแช่เย็นเพื่อให้สเปิร์มได้มีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ

Sadd et al. (1988) ทำการทดลองเก็บรักษาสเปิร์มของปลาไน (*C. carpio*) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการปฏิสนธิกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลอง และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็นศูนย์หลังจากเก็บรักษาไว้นาน 6-8 วัน แต่เมื่อเติมยาปฏิชีวนะ คือ Streptomycin ผสมกับ Penicillin ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในสูตรน้ำยาในเวลา 8 วันของการเก็บรักษา พบว่าสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วัน สเปิร์มยังมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมากกว่า 80% และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ประมาณ 80%

DiLauro et al. (1994) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic sturgeon แช่เย็นโดยไม่เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ ไว้บนน้ำแข็ง และให้ออกซิเจนสมทบทุกวันพบว่า น้ำเชื้อสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยที่คุณภาพของสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

Satterfield and Flickinger (1995) ได้นำน้ำเชื้อปลา Walleye จำนวน 8 ml มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ 1:2 ภายในกล่องแซนวิส (Plastic Rubbermaid sandwich container) ขนาด 11.4 x 10.8 เซนติเมตร แล้วจึงเก็บแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งอัดออกซิเจนสมทบทุกวัน ปรากฏว่าน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บไว้นาน 5 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ดี มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ

Vuthiphandchai et al. (2009) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกแบบแช่เย็นเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพของน้ำเชื้อปลาดุกอุยในช่วงฤดูกาลวางไข่ และการพัฒนาประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นของน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2006 โดยพบว่าตลอดระยะเวลาการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจากการศึกษาผลของการใช้บัฟเฟอร์ Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในอัตราส่วนของน้ำเชื้อสดต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:1, 1:2 หรือ 1:4 พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด (10 วัน) โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นที่เวลาสองวันมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาการจัดเก็บมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุย

การเก็บรักษาสเปิร์มที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ได้มีการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศดังนี้

สุบัณฑิต และคณะ (2551) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) แบบแช่เย็น โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยา Extender ที่ไม่เติมและเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2% และเก็บแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส โดยศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มพบว่า น้ำเชื้อที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะมีอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด รองลงมาคือที่เติมยาปฏิชีวนะ 0.1 และ 1% โดยการเคลื่อนที่หยุดในวันที่ 7 และน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ 2 % การเคลื่อนที่หยุดในวันที่ 6 และทำการศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) เป็นเวลาตั้งแต่วันที่ 0-7 พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และ *Moraxella urethralis* เป็นส่วนใหญ่

สุบัณฑิต และคณะ (2553) ศึกษาถึงผลของสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 2.5 mg/mL และยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% ต่อการเคลื่อนที่และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 วัน ผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันมีอัตราการเคลื่อนที่สูงสุด (17.78±3.80 %) ในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดขมิ้น และพบว่าสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง ส่วนการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดพบว่า ทุกชุดการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% สามารถลดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้สูงสุด

สุบัณฑิต และคณะ (2554ก) ศึกษาถึงผลการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) รวมถึงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ณ อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน จากการศึกษาพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1 % เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับชุดควบคุม (15.00 ± 10.00%) โดยชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0.00 ± 0.00% ทั้งนี้ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% ยังสามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียทางทะเลให้ลดลงเหลือ 1.00 ± 0.63×10^2 CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม (2.00 ± 1.00×10^2 CFU/ml) และสามารถกำจัด *Escherichia adecarboxylata*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa*, *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus varians* ได้รวดเร็วกว่าชุดควบคุม

สุบัณฑิต และคณะ (2554ข) ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงผลของการแช่เย็นและการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin (PS) ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0% ต่อการมีชีวิต ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นเป็นเวลา 9 วัน จากการศึกษาพบว่ายาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว เนื่องจากมีการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวสูงที่สุด (37.17 ± 2.04%) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS 1.0% นอกจากนี้ยังพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปมีค่าเท่ากับ 2.32 ± 0.04 × 10^3 CFU/mL ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุมที่มีค่ากับ 3.90 ± 0.03 × 10^3 CFU/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาว ยกเว้น *Bacillus mycoides* ได้ภายในวันที่ 7 ของการทดลอง

สุบัณฑิต และคณะ (2554ค) ศึกษาถึงผลของสารสกัดใบมะกรูด 3 ความเข้มข้น (0.1, 0.5 และ 2.5 mg/mL) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น เป็นเวลานาน 10 วัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% โดยมีชุดควบคุม คือ ชุดที่ไม่เติมสารสกัดใบมะกรูดและยาปฏิชีวนะ จากผลการทดลองในวันสุดท้ายของการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% มีการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 17.78 ± 3.80% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดใบมะกรูดที่มีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.00 ± 0.00% ในทุกความเข้มข้น นอกจากนั้นชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะมีการเคลื่อนที่สูงกว่าชุดควบคุม (13.33 ± 2.31%) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% สามารถลดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้สูงสุด (0.02 ± 0.00 ×10^3 CFU/mL) รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมสารสกัดจากใบมะกรูดที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ 0.26 ± 0.09 ×10^3 CFU/mL ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็น ได้แก่ชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่มากที่สุด และสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีความต้องการในการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ จึงทำให้ในการศึกษาต่อไปจะมีการดำเนินการพัฒนากระบวนการสกัดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบมะกรูด เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็นได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Jenkins and 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 ซึ่งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลา ได้แก่ *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Aeromonas* และ *Klebsiella*

Christensen and Tiersch (1996) ทำการทดลองเก็บรักษาสเปิร์มปลา Channel Catfish ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรน้ำยาปกติและสูตรที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Antibiotic/antimycotic (A/AC) ซึ่งมีส่วนผสมของ Penicillin 10,000 ยูนิต, Streptomycin 10 มิลลิกรัม และ Amphotericin 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 0.9% NaCl โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 2 ความเข้มข้นในการทดลอง คือ 0.1% และ 1% จากการทดลองพบว่าสูตรความเข้มข้น 1% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมากกว่า โดยในวันที่ 6 ของการเก็บรักษามีประมาณ 20% ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

1. พ่อพันธุ์ปลาสวาย

ปลาสวายเพศผู้สมบูรณ์เพศที่เก็บรวบรวมจากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืด อำเภอพานทอง จังหวัดชลบุรี

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 จานเพาะเชื้อ
2.2 หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร
2.3 หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร
2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
2.5 เครื่องชั่ง
2.6 กล่องโฟม
2.7 ไมโครปิเปต
2.8 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
2.9 กล้องจุลทรรศน์
2.10 คีมคีบ
2.11 ตู้บ่มเชื้อ
2.12 ทิปปราศจากเชื้อ
2.13 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
2.14 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
2.15 Tissue culture flask
2.16 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
2.17 ไม้บรรทัด
2.18 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส

3. สารเคมี

3.1 สีย้อม Eosin 0.5%
3.2 สีย้อม Nigrosin 10%
3.3 แอลกอฮอล์ 70% และ 95 %
3.4 Penicillin-streptomycin
3.5 Penicillin-gentamicin
3.5 สารละลาย 0.85% NaCl
3.6 Gram's crystal violet
3.7 Gram's iodine

3.8 Gram's alcohol

3.9 Gram's safranin

3.10 Oxidase reagent

3.11 Catalase reagent

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Trypticase Soy Agar (TSA)

3.2. MacConkey Agar (MC)

3.3 Plate Count Agar (PCA)

3.4 Pseudomonas Isolation Agar (PIA)

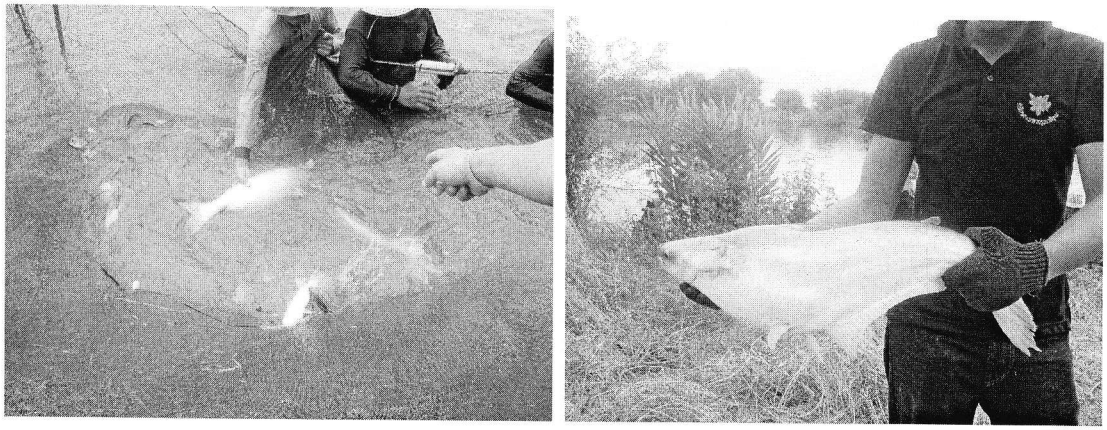
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาสวายและการประเมินคุณภาพสเปิร์ม

พ่อพันธุ์ปลาสวายจากบริเวณอำเภอพนัสนิคม และอำเภอพานทอง จังหวัดชลบุรี (ภาพที่ 8) ถูกรวบรวมและเลี้ยงให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5 วัน ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ภาพที่ 9) จากนั้นฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของสเปิร์มในถุงอัณฑะ โดยใช้ฮอร์โมน Luteinzing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) มีชื่อทางการค้าว่า "Suprefect" ในอัตรา 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone (ชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตราส่วน 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนประมาณ 10-12 ชั่วโมง (ภาพที่ 10) นำมาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Sperm motility) ความหนาแน่นของสเปิร์ม (Sperm density) จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต (Sperm viability) และแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ (Osmolarity) โดยเช็ดแอลกอฮอล์บริเวณลำตัวของปลาสวาย จากนั้นรีดน้ำเชื้อปลาสวายลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ โดยรีดอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเลือด ปัสสาวะหรือน้ำ ลงในน้ำเชื้อซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ แล้วนำน้ำเชื้อปลาสวายที่รีดได้ทั้งหมดมารวมกัน (Pooled milt samples) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (Individual variation) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่เย็น โดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่นและไม่มีเมือกหรือเลือดปน และจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้นเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดี พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปทำน้ำเชื้อแช่เย็น โดยน้ำเชื้อที่รวบรวมมาจะถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาที ในระหว่างขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่เย็น

ความหนาแน่นของสเปิร์มจะประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% Saline ผสมให้เข้ากันในหลอด Vial ด้วยการใช้เครื่อง Vortex แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน Haemacytometer และนับจำนวนสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การตรวจสอบค่า Osmolarity ของน้ำเชื้อทำโดยนำน้ำเชื้อมา

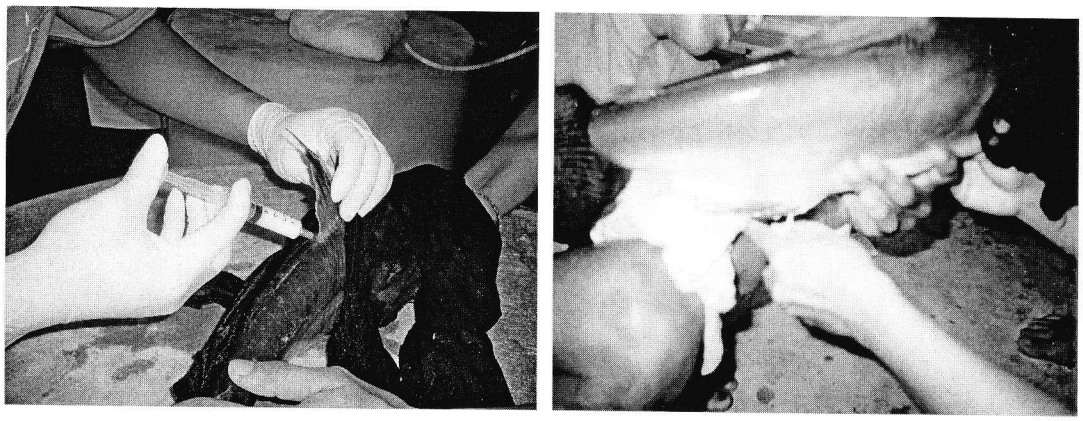
ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงเพื่อแยกของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์มออกจากสเปิร์ม จากนั้นนำของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์มปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวัดค่า Osmolarity ด้วยเครื่อง Osmometer



(a) (b)

ภาพที่ 8 (a) การจับพ่อพันธุ์ปลาสวาย
(b) พ่อพันธุ์ปลาสวาย

ภาพที่ 9 การปรับสภาพแวดล้อมพ่อพันธุ์ปลาสวาย ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



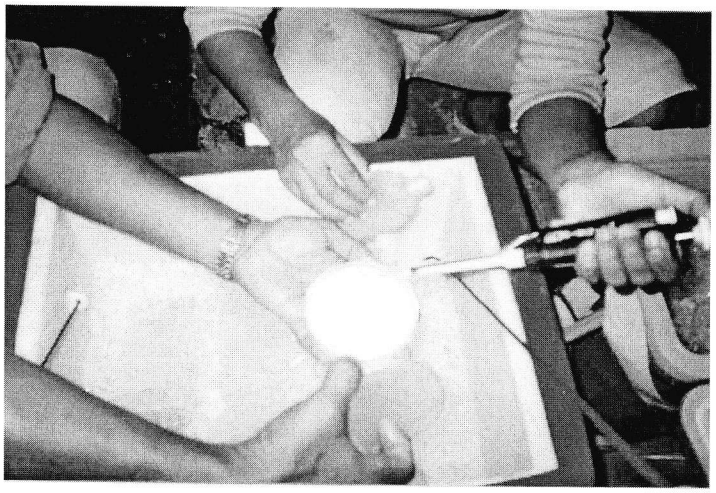
(a) (b)

ภาพที่ 10 (a) การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของสเปิร์มในถุงอัณฑะปลาสวาย
(b) การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาสวาย

2. การศึกษาชนิดและอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่จะไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในระหว่างการเก็บน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำ (2-4 องศาเซลเซียส) โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

นำน้ำเชื้อปลาสวายมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (Sperm extender) โดยน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Extender 7, Extender 13, Hank's balanced salt solution (HBSS) และ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ซึ่งเป็นสูตรของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้แพร่หลายและประสบผลสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นในปลาหลายชนิด การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อ (5 มิลลิลิตร) ที่รวบรวมได้มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมขึ้นใน Tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:1 โดยปริมาตร แล้วเขย่าเบา ๆ เพื่อให้น้ำเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 11) ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จะถูกนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มในระยะเวลาต่างกัน ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนกระทั่งน้ำเชื้อหยุดการเคลื่อนที่หลังจากน้ำเชื้อถูกเจือจาง โดยประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl ซึ่งการทดลองจะทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่จะใช้น้ำเชื้อที่ไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์



ภาพที่ 11 การเจือจางน้ำเชื้อปลาสวาย

ในขั้นตอนต่อมาก็จะทำการทดสอบเพื่อทราบถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ตัวที่ดีที่สุดเพื่อพัฒนาวิธีการเก็บรักษาให้ดีขึ้น โดยใช้วิธีการดังที่ได้กล่าวมาเพียงแต่ใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:9 แล้วจึงประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เก็บไว้ที่ 2-4 องศาเซลเซียส ทุกวันเช่นกัน จนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่

3. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

3.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ

3.1.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อสด (Vuthiphandchai et al., 2009)

ใช้เข็มเขี่ยที่สะอาดเขี่ยน้ำเชื้อสดที่เตรียมได้จากการทดลองแตะลงบนสไลด์ หยดน้ำเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ รีบนำมาดูการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 × 40 เท่า ภายในเวลาไม่เกิน 20 วินาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแบ่งประเมินเป็นระดับดังนี้

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

3.1.2 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เย็น

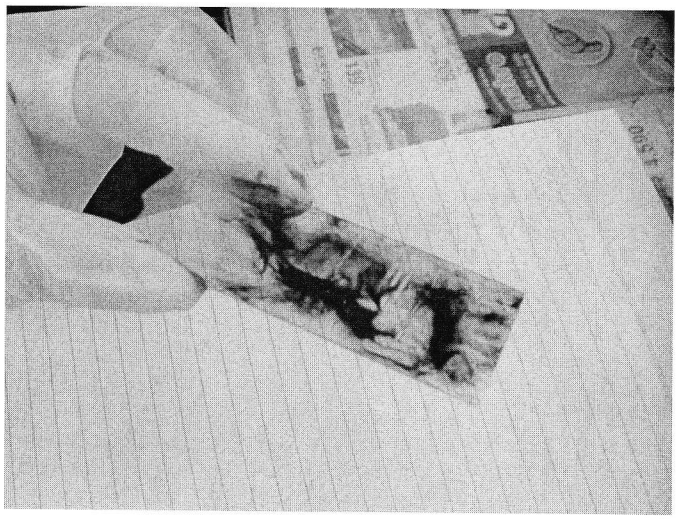
ใช้เข็มเขี่ยที่สะอาดเขี่ยน้ำเชื้อใน Tissue culture flask ที่เก็บแช่เย็นในชุดการทดลองต่าง ๆ มาแตะลงบนสไลด์ หยดน้ำเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ นำมาดูการเคลื่อนที่ประเมินผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2009) ตามที่กล่าวมาแล้ว ทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อหยุดการเคลื่อนที่ โดยทำการทดลองครั้งละ 3 ซ้ำ

3.2 การประเมินอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มจากตัวอย่างน้ำเชื้อ

3.2.1 การประเมินอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อสด

(Vuthiphandchai et al., 2009)

ใช้เข็มเขี่ยแตะน้ำเชื้อสดที่เตรียมได้จากการทดลองแช่เย็นน้ำเชื้อปลาสวาย ลงบนสไลด์ หยดสีย้อม Eosin 1 หยด และ Nigrosin 1 หยดลงด้านข้างผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้สเปิร์มที่ยังมีชีวิตอยู่เสียชีวิตและ smear บาง ๆ เพื่อให้เห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 12) นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟให้แห้ง ระวังอย่าให้ร้อนเกินไป ตรวจนับใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 × 100 เท่า โดยกระจายสุ่มนับเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ซึ่งสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมแต่สเปิร์มที่ตายจะติดสีย้อมสีม่วง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 12 การย้อมสีสเปิร์มด้วยเทคนิคการย้อม Eosin-Nigrosin

3.2.2 การประเมินอัตราที่มีชีวิตของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เย็น

(Vuthiphandchai et al., 2009)

ใช้เข็มเขี่ยแตะน้ำเชื้อใน Tissue culture flask ที่เตรียมได้จากการทดลองแช่เย็นน้ำเชื้อลงบนสไลด์ หยดสีย้อม Eosin 1 หยด และ Nigrosin 1 หยด ลงด้านข้างผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เพื่อกันไม่ให้สเปิร์มที่ยังมีชีวิตอยู่เสียชีวิตและ smear บาง ๆ เพื่อให้เห็นได้ชัดเจน นำสไลด์

ไปผ่านเปลวไฟให้แห้ง ระวังอย่าให้ร้อนเกินไป ตรวจนับใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 x 100 เท่า โดยกระจายสุ่มนับเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ซึ่งสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมแต่สเปิร์มที่ตายติดสีม่วง โดยน้ำเชื้อแช่เย็นจะทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อหยุดการเคลื่อนที่ โดยในแต่ละครั้งทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. การทดสอบความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะต่อการเคลื่อนที่ การมีชีวิตของสเปิร์ม และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางแบคทีเรียวิทยาของน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น (Vuthiphandchai et al., 2009)

การทดสอบความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น ทำการทดลองโดยเลือกชนิดและปริมาณของสารละลายบัฟเฟอร์ (Sperm extender) ที่เหมาะสมจากข้อ 2 ได้แก่ Ca-F HBSS ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:1 และแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ดังนี้

Treatment 1 Extender (Control)
Treatment 2 Extender ผสมกับ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1%
Treatment 3 Extender ผสมกับ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0%
Treatment 4 Extender ผสมกับ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.0%
Treatment 5 Extender ผสมกับ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1%
Treatment 6 Extender ผสมกับ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0%
Treatment 7 Extender ผสมกับ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.0%

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และน้ำเชื้อในอัตราส่วนที่เหมาะสมใส่ลงใน Tissue culture flask ปราศจากเชื้อ เติม Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ใส่ลงใน Tissue culture flask ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเท่ากับ 0, 0.1, 1.0 และ 2.0% เขย่าให้เข้ากัน ความเข้มข้นละ 3 Flask เก็บน้ำเชื้อโดยแช่ไว้ในตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อหยุดการเคลื่อนที่ โดยทุก 24 ชั่วโมง นำน้ำเชื้อที่ได้ไปศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อและการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรีย

4.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาสวาย

การประเมินอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาสวาย มีขั้นตอนการทดลองดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3

4.2 การศึกษาผลของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น

การทดสอบผลของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสวาย ทำโดยนำน้ำเชื้อสดของปลาสวาย (Fresh milt) น้ำเชื้อแช่เย็นมาเจือจางด้วยสารละลาย

โซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA), MacConkey Agar (MA) และ Pseudomonas Isolation Agar (PIA) เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งมีรายละเอียดในขั้นตอนการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียดังนี้

4.2.1 การศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียจากน้ำเชื้อสด (Nimrat et al., 2006)

เจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อสดของปลาสวายด้วย 0.85 % Normal saline ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) จำนวน 2 ชุด, MacConkey Agar (MA) และ Pseudomonas Isolation Agar (PIA) จานละ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ และ *Pseudomonas* ตามลำดับ โดยในแต่ละการเจือจางทำ 3 ซ้ำ สเปรดเพลทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อีกชุดหนึ่งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มชอบเย็น

4.2.2 การศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียจากน้ำเชื้อแช่เย็น (Nimrat et al., 2006)

เจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เย็นที่เตรียมได้จากการทดลองด้วย 0.85 % Normal saline ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) จำนวน 2 ชุด, MacConkey Agar (MA) และ Pseudomonas Isolation Agar (PIA) จานละ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ และ *Pseudomonas* ตามลำดับ โดยในแต่ละการเจือจางทำ 3 ซ้ำ สเปรดเพลทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อีกชุดหนึ่งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มชอบเย็น จากนั้นนับปริมาณโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เย็นมาทำการทดลองทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อหยุดการเคลื่อนที่

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ The statistical program for the social sciences (SPSS) version 19.0 เปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $P = 0.05$

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดและอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น และการศึกษาความเป็นพิษและผลของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ชนิดและอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย

การศึกษาชนิดและอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็นได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน โดยในตอนแรก ทำการแช่เย็นน้ำเชื้อในน้ำยาบัฟเฟอร์ (Sperm extender) 4 สูตร คือ Extender 7, Extender 13, Hank's balanced salt solution (HBSS) และ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยนำน้ำเชื้อสดของปลาสวายที่รีดออกมาใหม่ ๆ มาเจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ (Diluted milt) ใน Tissue culture flask ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำยาสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย คือ Extender 7 และ Ca-F HBSS ซึ่งสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 10% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองอื่น ส่วนน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Extender 13 และ HBSS มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเก็บรักษานาน 24 และ 72 ชั่วโมง ในขณะที่สเปิร์มในน้ำเชื้อสดที่ไม่ได้เจือจาง (กลุ่มควบคุม) หยุดเคลื่อนที่หลังเก็บแช่เย็นนาน 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

ชั่วโมง	สูตรน้ำยา				
	Extender 7	Extender 13	HBSS	Ca-F HBSS	Control
0	96.7±2.2 ^{a,1}	95.2±3.5 ^{a,1}	93.5±2.7 ^{a,1}	94.7±2.9 ^{a,1}	94.5±2.9 ^{a,1}
0.5	94.4±2.2 ^{a,1}	92.1±2.9 ^{a,1}	86.7±2.9 ^{a,1}	85.5±3.2 ^{ab,1}	56.7±4.2 ^{b,2}
3	65.7±3.5 ^{b,12}	72.2±3.8 ^{b,1}	56.7±4.5 ^{b,2}	78.7±2.2 ^{b,1}	26.7±2.7 ^{c,3}
6	58.2±2.9 ^{b,1}	45.7±4.1 ^{c,2}	47.4±2.9 ^{bc,2}	63.6±4.3 ^{c,1}	16.7±4.5 ^{d,3}
12	41.6±4.5 ^{c,2}	26.6±4.2 ^{d,23}	38.6 ±4.4 ^{c,2}	56.7±2.8 ^{d,1}	7.8±2.2 ^{e,4}
24	33.7±3.7 ^{d,12}	0 ^{e,4}	23.7±1.9 ^{d,3}	42.6±4.1 ^{e,1}	0 ^{f,4}
48	23.7±4.7 ^{de,1}	0 ^{e,3}	6.7±1.7 ^{e,2}	34.1±3.7 ^{ef,1}	0 ^{f,3}
72	16.7±3.9 ^{e,1}	0 ^{e,2}	0 ^{f,2}	24.5±2.1 ^{f,1}	0 ^{f,2}
96	12.7±2.2 ^{ef,1}	0 ^{e,2}	0 ^{f,2}	16.7±2.9 ^{g,1}	0 ^{f,2}
120	8.5±2.7 ^{f,1}	0 ^{e,2}	0 ^{f,2}	6.5±2.3 ^{h,1}	0 ^{f,2}

หมายเหตุ: ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองในตอนที่สอง ได้นำน้ำเชื้อปลาสวายมาเจือจางใน Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:9 เปรียบเทียบกับการแช่เย็นน้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 20% หลังการแช่เย็นนาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) (ตารางที่ 4) น้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 1:9 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเพียง 72 ชั่วโมง โดยสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ประมาณ 12.7% ในขณะที่สเปิร์มของน้ำเชื้อสดสามารถเก็บรักษาได้เพียง 24 ชั่วโมงก่อนหยุดเคลื่อนที่ แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาสวายที่เจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 มีความเหมาะสมไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายในสูตรน้ำยา Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อต่อน้ำยาบัฟเฟอร์สูตร Ca-F HBSS				
	1 ต่อ 1	1 ต่อ 2	1 ต่อ 4	1 ต่อ 9	กลุ่มควบคุม
0	95.6±2.8 ^{a,1}	89.5±3.7 ^{a,1}	92.5±2.8 ^{a,1}	91.6±3.7 ^{a,1}	92.6±3.3 ^{a,1}
0.5	86.7±3.6 ^{a,1}	86.7±2.7 ^{a,1}	85.4±2.2 ^{a,1}	85.5±2.8 ^{a,1}	73.1±2.9 ^{b,2}
3	92.5±2.9 ^{a,1}	89.9±3.2 ^{a,1}	88.9±1.9 ^{a,1}	73.3±3.4 ^{b,2}	42.8±3.9 ^{c,3}
6	78.8±4.2 ^{b,1}	82.2±1.9 ^{b,1}	85.5±4.2 ^{a,1}	56.7±2.5 ^{c,2}	29.5±4.1 ^{d,3}
12	67.6±3.5 ^{bc,12}	74.2±4.8 ^{bc,1}	78.7±3.1 ^{ab,1}	44.4±1.8 ^{d,3}	21.5±3.7 ^{e,4}
24	54.4±2.8 ^{d,2}	61.5±3.9 ^{d,1}	67.7±2.9 ^{c,1}	38.6±2.9 ^{d,3}	12.2±2.1 ^{f,4}
48	42.7±2.2 ^{d,3}	51.7±4.4 ^{e,2}	61.3±2.3 ^{c,1}	21.5±3.7 ^{e,4}	0 ^{g,5}
72	35.3±2.9 ^{e,2}	46.7±3.1 ^{e,1}	53.7±3.4 ^{d,1}	12.7±2.6 ^{f,3}	0 ^{g,4}
96	27.7±2.9 ^{f,2}	35.2±2.8 ^{f,12}	42.4±3.5 ^{e,1}	0 ^{g,3}	0 ^{g,3}
120	19.5±3.4 ^{g,1}	23.3±3.3 ^{g,1}	25.2±2.8 ^{f,1}	0 ^{g,2}	0 ^{g,2}

หมายเหตุ: ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ความเป็นพิษและผลของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น

2.1 ผลของยาปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่เย็น

จากการศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่เจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าในวันแรกของการทดลองสเปิร์มมีการเคลื่อนที่เท่ากันทุกชุดการทดลอง คือ 100% แต่เมื่อเวลาผ่านไปเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงเรื่อย ๆ โดยในวันที่ 7 ของการทดลอง น้ำเชื้อปลาสวายที่เติม Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% และ 1% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 46.67 ± 11.50% รองลงมาคือ น้ำเชื้อปลาสวายในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติม Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 0.1% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 40 ± 0.00 และ 40.00 ± 11.50% ตามลำดับ โดยน้ำเชื้อปลาสวายที่เติม Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 26.67 ± 11.50% ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของยาปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของปลาสวายแช่เย็น

ระยะเวลาการทดลอง (วัน)	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (%)							
	น้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin			Penicillin-gentamycin		
			0.1%	1%	2%	0.1%	1%	2%
0	100.00±0.00[1]	100.00±0.00 [a,1]	100.00 ±0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [d,1]
1	-	93.33 ± 11.50 [ab,1]	93.33 ± 11.50 [ab,1]	93.33 ±11.50 [ab,1]	80.00 ± 0.00 [b,2]	93.33 ± 11.50 [ab,1]	86.67 ± 11.50 [ab,12]	80.00 ± 0.00 [b,2]
2	-	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	73.33 ± 11.50 [bc,1]
3	-	73.33 ± 11.50 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	73.33 ± 11.50 [bc,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	80.00 ± 0.00 [b,1]	73.33 ± 11.50 [cc,1]
4	-	66.67 ± 11.50 [bc,,12]	73.33 ± 11.50 [bc,1]	66.67 ± 11.50 [bc,12]	60.00 ± 0.00 [c,2]	66.67 ± 11.50 [bc,12]	60.00 ± 0.00 [c,2]	60.00 ± 0.00 [c,2]
5	-	60.00 ± 0.00 [c,1]	60.00 ± 0.00 [c,1]	60.00 ± 0.00 [c,1]	53.33 ± 11.50 [cd,1]	60.00 ± 0.00 [c,1]	60.00 ± 0.00 [c,1]	60.00 ± 0.00 [c,1]
6	-	46.67 ± 11.50 [cd,2]	60.00 ± 0.00 [c,1]	53.33 ± 11.50 [cd,12]	46.67 ±11.50 [d,2]	60.00 ± 11.50 [c,1]	53.33 ± 11.50 [d,12]	46.67 ± 11.50 [d,2]
7	-	40.00 ± 0.00 [d,2]	46.67 ± 11.50 [d,1]	46.67 ± 11.50 [d,1]	26.67 ± 11.50 [e,4]	40.00 ± 0.00 [d,2]	33.33 ± 11.50 [d,3]	33.33 ± 11.50 [d,3]

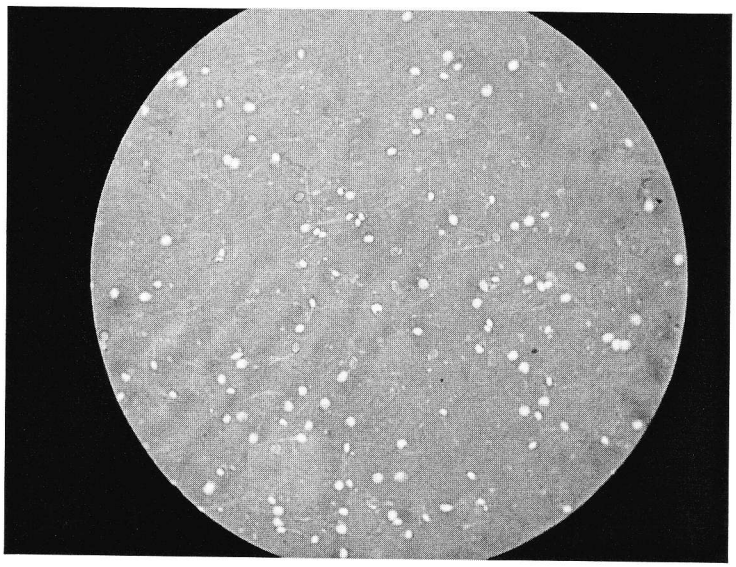
หมายเหตุ: ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

- หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจ

2.2 ผลของยาปฏิชีวนะต่อการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายแช่เย็น

ความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin มีผลทำให้สเปิร์มปลาสวายติดสีย้อม Eosin-Nigrosin โดยสเปิร์มที่มีชีวิตไม่ติดสี ในขณะที่สเปิร์มที่มีชีวิตติดสีแดง (ภาพที่ 13) จากการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายแช่เย็น พบว่าน้ำเชื้อปลาสวายมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงที่สุดในวันแรกของการทดลอง หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยในวันที่ 7 ของการทดลอง น้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% มีการรอดชีวิตของสเปิร์มมากที่สุดอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 83.67 ± 1.45% รองลงมาคือน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 0.1% ชุดควบคุมและน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% ที่มีค่าเท่ากับ 76.18 ± 1.42%, 73.33 ± 2.52% และ 73.08 ± 1.06% ตามลำดับ ดังตารางที่ 6



ภาพที่ 13 การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายด้วยเทคนิคการย้อมสี Eosin-Nigrosin

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น

ระยะเวลาการทดลอง (วัน)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลาสวาย (%)							
	น้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin			Penicillin-gentamycin		
			0.1%	1%	2%	0.1%	1%	2%
0	100.00 ± 0.00[1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	98.00 ± 1.73 [a,1]	100.00 ± 0.00 [a,1]	96.00 ± 2.00 [a,2]	99.00 ± 1.73 [a,1]
1	-	99.33 ± 0.58 [a,1]	98.00 ± 2.65 [ab,1]	95.00 ± 1.00 [b,2]	96.00 ± 1.00 [a,2]	96.67 ± 3.51 [b,2]	92.33 ± 2.08 [b,3]	95.67 ± 2.51 [b,2]
2	-	98.33 ± 1.53 [ab,1]	97.67 ± 1.63 [b,1]	97.67 ±1.55 [b,1]	96.00 ± 1.53 [a,2]	92.33 ± 2.08 [c,3]	92.33 ± 2.58 [b,3]	86.00 ± 1.23 [c,4]
3	-	97.00 ± 1.28 [b,1]	96.00 ± 1.95 [b,1]	87.00 ± 1.44 [c,3]	85.00 ± 4.21 [b,4]	92.33 ± 2.48 [c,2]	89.67 ± 1.33 [c,23]	84.67 ± 2.05 [c,4]
4	-	94.67 ± 0.58 [c,1]	94.67 ± 0.58 [c,1]	86.33 ± 1.73 [c,34]	84.01 ± 3.60 [b,4]	92.33 ± 2.08 [c,2]	89.12 ± 1.23 [c,3]	81.33 ± 1.53 [cd,5]
5	-	91.67 ± 2.89 [c,1]	92.33 ± 2.04 [c,1]	77.33 ± 2.52 [d,4]	79.01 ± 1.73 [bc,3]	86.67 ± 4.16 [d,2]	82.06 ± 2.00 [d,3]	80.33 ± 0.58 [d,23]
6	-	81.67 ± 5.69 [d,2]	90.33 ± 1.53 [d,1]	74.33 ± 1.12 [d,3]	76.00 ± 2.65 [d,3]	81.00 ± 1.01 [e,2]	75.67 ± 1.15 [e,3]	80.05 ± 0.99 [d, 2]
7	-	73.33 ± 2.52 [e,2]	83.67 ± 1.45 [e,1]	73.08 ± 1.06 [d,2]	70.67 ± 2.15 [e,3]	76.18 ± 1.42 [f,2]	71.67 ± 1.25 [e,3]	72.33 ± 2.52 [e,3]

หมายเหตุ: ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

- หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจ

2.3 ผลของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น

2.3.1 แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

จากการตรวจนับแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด พบว่าน้ำเชื้อสดมีปริมาณแบคทีเรียสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $3.87 \pm 1.20 \times 10^{6}$ CFU/ml ส่วนชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.60 \pm 0.46 \times 10^{5}$ CFU/ml ในขณะที่แบคทีเรียในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะมีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เพิ่มสูงขึ้น โดยชุดการทดลงที่เติม Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดต่ำที่สุดอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ $8.33 \pm 3.51 \times 10^{3}$ และ $5.33 \pm 2.31 \times 10^{3}$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วันพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% และ 2% และชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 2% มีประสิทธิภาพลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีปริมาณลดลงเหลือ $1.00 \pm 1.00 \times 10^{2}$, $3.67 \pm 2.52 \times 10^{2}$ และ $1.00 \pm 1.00 \times 10^{2}$ CFU/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

ระยะเวลาการทดลอง (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/ml)							
	น้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin-streptomycin			Penicillin-gentamycin		
			0.1%	1%	2%	0.1%	1%	2%
0	$3.87 \pm 1.20 \times 10^{6\ 1}$	$1.60 \pm 0.46 \times 10^{5\ a,2}$	$1.37 \pm 0.35 \times 10^{5\ a,2}$	$5.00 \pm 1.00 \times 10^{4\ a,3}$	$8.33 \pm 3.51 \times 10^{3\ a,4}$	$1.13 \pm 0.15 \times 10^{5\ b,2}$	$1.33 \pm 0.21 \times 10^{4\ a,3}$	$5.33 \pm 2.31 \times 10^{3\ a,4}$
1	-	$3.90 \pm 2.08 \times 10^{4\ b,1}$	$1.40 \pm 0.10 \times 10^{3\ b,2}$	$5.00 \pm 3.60 \times 10^{2\ b,3}$	$4.00 \pm 3.00 \times 10^{2\ b,3}$	$1.73 \pm 0.25 \times 10^{4\ b,1}$	$5.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ c,3}$	$3.33 \pm 1.32^{x} 10^{2\ b,3}$
2	-	$5.47 \pm 1.07 \times 10^{4\ b,1}$	$3.10 \pm 0.56 \times 10^{3\ b,2}$	$5.33 \pm 1.49 \times 10^{2\ b,3}$	$3.67 \pm 1.46 \times 10^{2\ b,3}$	$1.67 \pm 0.25 \times 10^{3\ c,2}$	$7.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ c,3}$	$4.33 \pm 2.52 \times 10^{2\ b,3}$
3	-	$3.63 \pm 1.76 \times 10^{4\ b,1}$	$5.33 \pm 3.51 \times 10^{3\ b,2}$	$4.33 \pm 0.25 \times 10^{2\ b,3}$	$1.67 \pm 0.68 \times 10^{2\ b,3}$	$1.40 \pm 0.10 \times 10^{3\ c,2}$	$6.00 \pm 0.10 \times 10^{2\ c,3}$	$2.33 \pm 1.53 \times 10^{2\ b,3}$
4	-	$5.87 \pm 5.51 \times 10^{4\ b,\ b,1}$	$2.10 \pm 0.36 \times 10^{3\ b,2}$	$2.33 \pm 0.58 \times 10^{2\ b,3}$	$2.00 \pm 0.00 \times 10^{2\ b,3}$	$2.63 \pm 1.23 \times 10^{3\ c,2}$	$1.67 \pm 0.15 \times 10^{2\ c,3}$	$2.67 \pm 2.21 \times 10^{2\ b,3}$
5	-	$7.20 \pm 0.80 \times 10^{4\ b,1}$	$1.80 \pm 0.89 \times 10^{3\ b,2}$	$3.67 \pm 0.15 \times 10^{2\ b,3}$	$3.33 \pm 0.12 \times 10^{2\ b,3}$	$1.83 \pm 0.57 \times 10^{3\ c,2}$	$3.33 \pm 2.08 \times 10^{2\ c,3}$	$4.67 \pm 3.51 \times 10^{2\ b,3}$
6	-	$9.10 \pm 0.55 \times 10^{4\ b,1}$	$1.23 \pm 0.49 \times 10^{3\ b,2}$	$3.00 \pm 0.00 \times 10^{2\ b,3}$	$2.67 \pm 0.16 \times 10^{2\ b,3}$	$1.53 \pm 0.21 \times 10^{3\ c,2}$	$2.00 \pm 0.00 \times 10^{2\ c,3}$	$4.33 \pm 3.05 \times 10^{2\ b,3}$
7	-	$1.54 \pm 0.12 \times 10^{5\ a,1}$	$1.00 \pm 0.20 \times 10^{3\ b,2}$	$1.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ b,3}$	$3.67 \pm 2.52 \times 10^{2\ b,3}$	$1.17 \pm 0.12 \times 10^{3\ c,2}$	$1.17 \pm 0.15 \times 10^{3\ b,2}$	$1.00 \pm 1.00 \times 10^{2\ b,3}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

- หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจ

2.3.2 แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียกลุ่ม Presumptive *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่มชอบเย็น

จากการทดลองตรวจนับแบคทีเรียแกรมลบพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำเชื้อสดเท่านั้น โดยมีปริมาณเท่ากับ $1.00 \pm 0.00 \times 10^3$ CFU/ml ในขณะที่น้ำเชื้อในชุดควบคุมและน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะไม่พบการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Presumptive *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่มชอบเย็นไม่พบในทุกตัวอย่างตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย

2.3.3 ผลของยาปฏิชีวนะต่อชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายสด พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสดประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ได้แก่ *Bacillus azotoformans, Bacillus brevis, Bacillus laterosporus* และ *Listeria monocytogenes* กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ได้แก่ *Aeromonas sobria, Plesiomonas shigelloides* และ *Flavobacterium breve* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ได้แก่ *Staphylococcus caseolyticus*

จากการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสวายที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ได้แก่ *Bacillus azotoformans, Bacillus brevis, Bacillus laterosporus* และ *Listeria monocytogenes* กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ได้แก่ *Flavobacterium breve* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ได้แก่ *Staphylococcus caseolyticus* ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus azotoformans	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus brevis	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavobacterium breve	+	+	+	+	+	+	+	+
Listeria monocytogenes	+	+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus caseolyticus	+	+	+	+	+	+	-	-

+ พบ

- ไม่พบ

จากการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ได้แก่ *Bacillus brevis, Bacillus firmus, Bacillus laterosporus, Bacillus lentimorbus* และ *Listeria monocytogenes* กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ได้แก่ *Flavobacterium breve* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ได้แก่ *Staphylococcus caseolyticus* ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1%

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus brevis	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus firmus	+	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus lentimorbus	+	-	-	-	-	-	-	-
Flavobacterium breve	+	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	+	+	+	+	+	-	-	-
Staphylococcus caseolyticus	+	+	+	+	+	+	+	+

+ พบ
- ไม่พบ

จากการศึกษาน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน คือ *Bacillus brevis, Bacillus laterosporus, Bacillus licheniformis, Bacillus mycoides* และ *Listeria monocytogenes* และแกรมบวก รูปกลม คือ *Marinococcus halophilus* ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1%

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus brevis	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus licheniformis	+	+	-	-	-	-	-	-
Bacillus mycoides	+	+	+	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	+	+	+	+	-	-	-	-
Marinococcus halophilus	+	+	+	+	+	+	-	-

+ พบ

- ไม่พบ

จากการศึกษาน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2% พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน *Bacillus brevis, Bacillus laterosporus, Bacillus licheniformis* และ *Listeria monocytogenes* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม คือ *Staphylococcus caseolyticus* ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2%

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus brevis	+	+	+	+	-	-	-	-
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus licheniformis	+	+	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	+	+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus caseolyticus	+	+	+	+	+	+	+	+

+ พบ

- ไม่พบ

จากการศึกษาน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 0.1% พบแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก รูปท่อน *Bacillus azotoformans, Bacillus brevis, Bacillus laterosporus และ Listeria monocytogenes* แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน คือ *Flavobacterium breve* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม คือ *Staphylococcus kloosii* ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 0.1%

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus azotoformans	+	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus brevis	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavobacterium breve	+	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus kloosii	+	+	+	-	-	-	-	-

+ พบ

- ไม่พบ

จากการศึกษาน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 1% พบเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน คือ *Bacillus azotoformans, Bacillus brevis, Bacillus laterosporus, Bacillus lentimorbus* และ *Listeria monocytogenes* ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 1%

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus azotoformans	+	+	-	-	-	-	-	-
Bacillus brevis	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus lentimorbus	+	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	+	+	+	+	+	+	+	+

+ พบ

- ไม่พบ

จากการศึกษาน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 2% พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ได้แก่ *Bacillus azotoformans, Bacillus brevis, Bacillus laterosporus* และ *Listeria monocytogenes* และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ได้แก่ *Staphylococcus kloosii* ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin- gentamycin ความเข้มข้น 2%

แบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ทำการแช่เย็น (วัน)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Bacillus azotoformans	+	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus brevis	+	+	+	-	-	-	-	-
Bacillus laterosporus	+	+	+	+	+	+	+	+
Listeria monocytogenes	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus kloosii	+	+	+	+	+	+	-	-

+ พบ

- ไม่พบ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ Extender 7, Extender 13, Hank's balanced salt solution (HBSS) และ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น พบว่า Extender 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น โดยสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 10% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองอื่น

2. การเจือจางน้ำเชื้อในสารสะลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:9 เปรียบเทียบกับการแช่เย็นน้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 20% หลังการแช่เย็นนาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) น้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 1:9 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเพียง 72 ชั่วโมง โดยสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ประมาณ 12.7% ในขณะที่สเปิร์มของน้ำเชื้อสดสามารถเก็บรักษาได้เพียง 24 ชั่วโมงก่อนหยุดเคลื่อนที่ แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาสวายที่เจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 มีความเหมาะสมไม่แตกต่างกัน

3. การเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% มีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาสวายต่ำ โดยประเมินจากการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อภิปรายผลการทดลอง

1. ชนิดและอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า Extender 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น โดยสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) โดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ประมาณ 10% ปกติแล้วสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้นมีความสำคัญที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จในการเก็บรักษา เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์นั้นมีคุณสมบัติดังนี้ 1) เป็นน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น 2) มีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม 3) มีสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานของสเปิร์ม และ 4) มีความสามารถในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) โดยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการเก็บรักษาสเปิร์มของสัตว์น้ำแบบแช่แข็งแตกต่างกันออกไป

เช่น Ringer's solution สำหรับน้ำเชื้อปลาเก๋า, *Epinephelus malabaricus* (Chao et al., 1992), Modified plaice Ringer's Solution สำหรับน้ำเชื้อปลา Sea perch, *Lateolabrax japonicus* (Ji et al., 2004) และ Ca-F HBSS สำหรับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* (Routray et al., 2008) เป็นต้น

จากการศึกษาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็น พบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อสด (Freshly collected milt) สามารถเก็บรักษาได้นาน 1 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อผสมน้ำยา (Extended milt) พบว่าสูตรน้ำยา (Extender) ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่เย็นได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ Extender 7 และ Ca-F HBSS ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นาน 5 วัน รองลงมาคือ HBSS ที่เก็บรักษาได้นาน 2 วัน แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดแบบไม่ผสมน้ำยาจะมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาได้สั้นกว่าการเก็บรักษาแบบผสมน้ำยา อาจเนื่องจากน้ำเชื้อสดเมื่อนำออกมาอยู่ในภาชนะเก็บรักษาจะมีโอกาสสัมผัสกับอากาศและอาจทำให้มีการระเหยของน้ำเชื้อ ทำให้คุณสมบัติของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป ในขณะที่การนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในน้ำยาหรือสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีแร่ธาตุหรือน้ำตาลที่ใกล้เคียงกับที่พบในของเหลวที่หล่อเลี้ยงได้เป็นน้ำเชื้อเจือจางนั้นจะช่วยปกป้องเซลล์สเปิร์มในสารละลายทำให้สเปิร์มเสมือนอยู่ในของเหลวที่หล่อเลี้ยงตลอดเวลา โดยที่สภาวะการระเหยเกิดขึ้นน้อยกว่าการแช่เย็นน้ำเชื้อสด จึงทำให้น้ำเชื้อแช่เย็นสามารถเก็บได้นาน (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) ผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้โดยการรีดน้ำเชื้อปลาสวายแล้วเจือจางด้วยสูตรน้ำยาหรือบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม คือ Extender 7 และ Ca-F HBSS ก็สามารถนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปใช้ผสมเทียมกับไข่ปลาสวายได้ต่อไป

จากการศึกษาการเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายด้วยสูตรน้ำยา (Extender) ที่เหมาะสม คือ Ca-F HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:9 พบว่าน้ำเชื้อปลาสวายที่เจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นไม่แตกต่างกัน การศึกษาชนิดและอัตราส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายเพื่อไม่กระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ระหว่างการเจือจางด้วยสารละลาย เพราะนั่นหมายถึงความล้มเหลวตั้งแต่เริ่มการทดลอง ซึ่งการแช่เย็นน้ำเชื้อด้วยการเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์จำเป็นต้องทำให้น้ำเชื้อเหมือนมีสภาพที่ไม่เคลื่อนที่เหมือนอยู่ในอัณฑะ (Testis) จึงมั่นใจได้ว่าขณะเริ่มทดลองเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายในสารละลายบัฟเฟอร์สเปิร์มจะไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่เด็ดขาด แต่ระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อจะนานเพียงไรก็ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์ว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงไรในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น เช่นมีแร่ธาตุหรือสารอาหารมากน้อยเพียงไร โดยทั่วไปสเปิร์มปลาน้ำจืดจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับหรือมากกว่าค่าแรงดันออสโมติกของของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำกว่าที่พบในของเหลวที่หล่อเลี้ยง (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008)

2. ความเป็นพิษและผลของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น

จากการทดลองเพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่เจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ทั้งแบบน้ำเชื้อสด แบบไม่เติมยาและเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2% ตามลำดับ แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในชั่วโมงแรกของการทดลองทุกชุดการทดลองจะมีอัตราเคลื่อนที่เท่ากันคือ 100% แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลอง และเมื่อถึงวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลองพบว่าสเปิร์มในทุกชุดการทดลองยังมีการเคลื่อนที่อยู่ โดยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อที่เจือจางในยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1 และ 1% มีค่าการเคลื่อนที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนน้ำเชื้อที่เจือจางในยาปฏิชีวนะ 2% จะมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่าน้ำยาชุดอื่น ๆ เล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง และเมื่อถึงวันสุดท้ายของการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2% มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะสูง ๆ จะมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้อยกว่าที่ความเข้มข้นยาปฏิชีวนะต่ำ ๆ เนื่องจากความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะอาจเป็นพิษต่อสเปิร์ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Christensen and Tiersch (1996) ที่เสนอว่าการเติมยาปฏิชีวนะ A/AC ที่ความเข้มข้น 1% การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะน้อยกว่าการเติมยาปฏิชีวนะ 0.1% และจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นสามารถช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของทัศนีย์ และคณะ (2529) ที่ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาแบบชั่วคราวที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส โดยพบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาวิธีดังกล่าวนี้สามารถเก็บได้นานกว่าหนึ่งวัน และการศึกษาของศิริพร และคณะ (2550) ที่พบว่าสามารถเก็บน้ำเชื้อปลาดุกเทศในสารละลายบัฟเฟอร์ได้นานถึง 144 ชั่วโมง ทั้งนี้ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นยังขึ้นอยู่กับการควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะเก็บรักษา เนื่องจากน้ำเชื้อของปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาที (วีรพงศ์และสุบัณฑิต, 2548)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่ทำการทดสอบเปรียบเทียบยากลุ่ม Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นของน้ำเชื้อปลาสวาย โดยจากการศึกษาพบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสดมีปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันแรกของการทดลอง ส่วนวันที่ 1-7 ของการทดลองพบว่าชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา โดยมีปริมาณมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นสามารถช่วยยืดอายุใน

การเก็บรักษาได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียเมื่อระยะเวลาผ่านไปมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยเมื่อปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อสูงนั้นจะมีผลทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อต่ำลง เพราะสเปิร์มจะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ แบคทีเรียที่ปนเปื้อนจะมีการใช้ออกซิเจนทำให้สเปิร์มในน้ำเชื้อเกิดสภาวะ Hypoxia หรือสภาวะการขาดแคลนออกซิเจน และยังทำให้ความสามารถของสเปิร์มในการนำไปปฏิสนธิกับไข่ลดลงด้วยเพราะแบคทีเรียจะไปปิดกั้น Micorpyle ซึ่งเป็นช่องทางที่สเปิร์มจะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ (Holcomb et al., 2005) นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนและของเสียต่าง ๆ ออกมา ทำให้เป็นอันตรายต่อสเปิร์มได้ (Jenkins and Tiersch, 1997) ดังนั้นการที่ปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นสามารถส่งผลต่อน้ำเชื้อปลาในการนำไปใช้ในการผสมเทียมได้

จากการศึกษาครั้งนี้มีการใช้ยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin และ Penicillin-gentamycin ร่วมด้วยในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น ซึ่งยาปฏิชีวนะ penicillin เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Penicillins G มีผลในการขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากยาปฏิชีวนะ Penicillin นี้จะไปรวมตัวกับ Penicillin-bindind protein (PBP) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้ ส่วนยาปฏิชีวนะ Streptomycin อยู่ในกลุ่ม Aminoglycoside สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน (Aerobic gram-negative bacteria) โดยการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) (ธเนศ, 2550) การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ Streptomycin นั้นจะต้องผ่านผนังเซลล์โดยขบวนการ Active transport และ Passive diffusion ซึ่งยาจะผ่านผนังเซลล์ได้ดีขึ้นเมื่อมียาที่ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (เช่น Penicillin) อยู่ด้วย โดยเมื่อยาปฏิชีวนะ Penicillin รวมกับ Streptomycin แล้วจะสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้เป็นส่วนใหญ่และทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้จากการที่ยาเข้าไปเกาะกับ 30S ribosomal subunit ของแบคทีเรีย (กมลชัย, 2543) ซึ่งจากการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin มีปริมาณแบคทีเรียต่ำกว่าชุดควบคุมตั้งแต่วันแรกของการทดลอง โดยชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อได้ไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันแรกของการทดลอง แต่เมื่อเวลาผ่านไปพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียลดลงเรื่อย ๆ จนถึงจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง ดังนั้นการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1% นั้นมีส่วนในการช่วยลดปริมาณแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% นั้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่าตั้งแต่วันแรกของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเวลาผ่านไปพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 7 และชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2% พบว่าเพียงชั่วโมงแรกของการทดลองก็สามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ Penicillin-streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1% และปริมาณแบคทีเรียลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันสุดท้ายของการทดลองเช่นกัน นั่นแสดงว่า Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 2% นั้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความ

เข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1 และ1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีประโยชน์เป็นอย่างมากในการผสมเทียม เนื่องจากทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นให้มีคุณภาพที่ดีและเหมาะสมแก่การนำไปใช้ต่อไป โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับการเติมยาปฏิชีวนะนี้สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยังสามารถช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายให้ยาวนานยิ่งขึ้นได้อีกด้วย โดยการศึกษาครั้งนี้ถือว่าเป็นส่วนหนึ่งในการปรับปรุงและพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายเพื่อการค้าและการอนุรักษ์เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการเพาะเลี้ยงปลาสวายของประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กมลชัย ตรงวานิชนาม. (2543). *การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมประมง. (2550). *ปลาที่เลี้ยงเพาะง่าย ตอนปลาสวาย* (เอกสารคำแนะนำ). กรุงเทพฯ : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

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

กาญจนรี พงษ์ฉวี, สนธิพันธุ์ ผาสุขดี, วสันต์ ศรีวัฒนะ, วิชัย ก้องรัตนโกศล และสมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. (2539). การลำเลียงพันธุ์ปลาสวาย โดยการขนส่งทางอากาศ. *วารสารการประมง*, 49(6), 515-520.

กองเศรษฐกิจการประมง. (2541). *สถิติสัตว์น้ำจืด*. กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ: กรมประมง.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2528). *โรคปลา*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. (2548). *หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โฟร์เพซ.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. (2529). *การเลี้ยงปลา* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์.

ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์, บุญนำ สุขทิศ, สุริยา ทานสุทัศน์, และเพียงใจ แก้วจรูญ. (2529). การเก็บรักษาเชื้อปลาเทพาและปลาปลาบึก. ใน *เอกสารวิชาการฉบับที่ 66*. กรุงเทพฯ : สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

ธเนศ เฟื่องฟู. (2550). *ยาและโรคติดเชื้อ*. กรุงเทพฯ: บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด.

นลินี มารคแมน. (2527). *การศึกษาเบื้องต้นของกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่เย็น.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิศา ไชยรักษ์. (2539). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกโดยวิธีการแช่แข็ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ผาณิต จันโอกุล วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สก เทศ (Labeo rohita) แบบแช่แข็ง*. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3 ณ อาคาร 28 ชั้น 3 มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม วันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2553

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

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

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2548). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม*. รายงานการวิจัย, ภาควิชาวาริชศาสตร์และภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. (2536). *การเลี้ยงปลาน้ำจืด*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ศิริพร คชรัตน์, จุฑามาศ พบสุข, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2550). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (Clarias gariepinus) แบบแช่เย็น.* การประชุมวิชาการครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กนกพร อุ่มแสง และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2551) *ผลของยาปฏิชีวนะและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็นต่อประมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total heterotroph.* การประชุมทางวิชาการ "วิจัยบูรพา ครบรอบวันสถาปนา 58 ปี" มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี วันที่ 7 กรกฎาคม 2551.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2552). *การเพาะลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ พนัส นันติ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2553). *ผลของสารสกัดขมิ้นต่อการเคลื่อนที่และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (Clarias gariepinus) แช่เย็น.* การประชุมระดมสมองการสร้างเครือข่ายความร่วมมือด้านวิจัย ทอมก: วิถีวิจัยและการพัฒนาประเทศ. ณ โรงแรมเอเชีย กรุงเทพฯ วันที่ 25 มิถุนายน 2553.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กนิษฐา ตั้งซั่ว ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554ก) ผลของยาปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทางทะเลและการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* 39(2): 252-262.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กุลวดี พิมพ์นวลศรี ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554ข) ผลของยาปฏิชีวนะและการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อ. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.* 43(1): 13-25.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ พนัส นันติ พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554ค). ผลของสารสกัดใบมะกรูดต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) แช่เย็น. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.* 30(4): 386-394.

สมควร ดีรัศมี. (2542). *การเลี้ยงปลาเบญจพรรณ.* กรุงเทพฯ: แสงปัญญาเลิศจำกัด.

สมปอง หิรัญวัฒน์. (2523). *ชีวประวัติของปลาสวาย (เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2523).* กรุงเทพฯ: สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง.

อดุลย์ พงศ์สุวรรณ. (2532). *ปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย.* กรุงเทพฯ : บริษัทสามัคคีสาสน์จำกัด.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2531). *การเพาะขยายพันธุ์ปลา.* ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Al-Harbi, A.H. (2003). Faecal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x*Oreochromis aureus* in Saudi Arabia. *Aquaculture Research* 34: 517-524.

Ashwood-Smith, M.J. (1980). Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: M.J. Ashwodd-Smith and J. Farrant (eds), Low temperature preservation in medecine and biology, (pp. 19-44). *Turnbridge Wells*: Pitman Medical Ltd.

Blazer, V.S., Shotts, E.B. and Waltman, W.D. (1985). Pathology associated with *Edwardsiella ictaluri* in catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, and *Danio devario* (Hamilton-Buchanan, 1822). *Journal of Fish Biology* 27: 167-175.

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.

Christensen, J.M. and Tiersch, R.T. (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 storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish-culturist* 56: 143–144.

Elliott, D.G. and Shotts, E.B. (1980). Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): Microbiological examination of diseases fish from seven locations. *Journal of Fish Disease* 3: 133-143.

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.

Hulata, G. and Rothbard, S. (1979). Cold storage of carp semen for short period. *Aquaculture* 16: 267-269.

Humphrey, J.D., Lancaster, C. and Gudkovs, N. (1986). Exotic bacterial pathogens *Edwardsiella tarda* and *Edwardsiella ictaluzg* from imported ornamental fish *Betta splendens* and *Puntius conchonius,* respectively: Isolation and quarantine significance. *Australian Veterinary Journal* 63: 369-371.

Jasko, D.J., Bedford, S.J., Cook, N.L., Mumford, E.L., Squires, E.L. and Pickett, B.W. (1993). Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 40: 885-893.

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

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.

Kent, M.L. and Lyons, J.M. (1982). *Edwardsiella ictaluri* in the green knife fish, *Eigenmania virescens. Fish Health News* 11(1-2): ii.

Lewbart, G.A. (2001). *Bacteria and ornamental fish*. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 10 (1): 48-56.

Munn, C.B. (2004). *Marine microbiology*. BLOS Sciencetific Publisher, London.

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: 76-86.

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

Noga, E.J. (2000). *Fish Disease, Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Pelczar, Jr. M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. (1986). *Microbiology*. 5th ed. Singapore: Mc Graw-Hill Book Company.

Popoff, M. (1984). Genus III *Aeromonas*. In: N.R. Krieg (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.

Routray, P., Dash, S. N., Dash, C., Swain, P., Sarkar, S. K., and Sarangi, N. (2008). Cryopreservation of silver barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) spermatozoa: Effect of extender composition, cryoprotective agents and freezing rate on their postthawing fertilization ability. *Aquaculture Research* 39: 1597-1605.

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

Satterfield, J.R., Jr. and Flickinger, S.A. (1995). Field Collection and short-term storage of walleye semen. *The Progressive Fish-Culturist* 57(3): 182-187.

Shin, S.J., Lein, D.H., Patten, V.H. and Ruhnke, H.L. (1988). A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* 29: 577-591.

Shotts, E.B. and Talkington, F.D. (1980). Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): Characterization of the causative agent. *Journal of Fish Diseases* 3: 181-186.

Soo, E.C., Huenupi, E., Alfonso, L.O.B. and Hui, J.P.M. (2007). *HPLC-MS-based metabolomic atudy of the effect of acute handling stress in juvenile atlantic salmon (Salmo salar).* Poster presentation in: 8th International Marine Biotechnology Conference, Eilat, Israel, March 11-16.

Stoss, J. and Refstie, T. (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30(1-4): 229-236.

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., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R. (1998). Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquatic Living Resources* 11: 45-48.

Todar, K. (2003). *Antibiotics. Todar's* Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net.

Vandepitte, J., Lemmens, P. and De Swert. (1983). Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. *Journal of Clinical Microbiology* 17:165-167.

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

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.

Wiklund, T. and Dalsgaard, I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: A review. *Disesses of Aquatic Organism* 32: 49-69.

Zhaolan, M., Peng, X., Yunxiang, M., Zhifeng, Z. and Jie, L. (2007). An ESRB mutant of *fish pathogenic Edwardsiella tarda is attenuated and effective as a live vaccine against the haemorrhagic septicemia in turbot Scophthamus maximus (L.).* International marine biotechnology conference, Dan hotel, Eilat, Israel, March 11-13, 2007.

Output จากโครงการวิจัย

การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ (Full paper)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2557) ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น. ในการประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 10 เครือข่ายวิจัย สร้างความรู้สู่อาเซียน. มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 22-23 กรกฎาคม 2557.

การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2557) ความเป็นพิษและผลของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น. นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ ภาคตะวันออก ครั้งที่ 31 วันที่ 18-20 สิงหาคม 2557