



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

นางสุภัณฑิต นิมรัตน์
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

นางสุภัณฑิต นิ่มรัตน์¹
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย²

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
²ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 3/2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำใน
ถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม ในปีที่ 2 เป็น
การศึกษาถึงการใช้สารสกัดสมุนไพรไทยจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดใบมะรุม และสารสกัดชิง
เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะผสมที่มีประสิทธิภาพ คือ Penicillin-streptomycin ในการเก็บรักษา
ถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ เป็นระยะเวลา 1 ปี ผลการศึกษา
พบว่า สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีศักยภาพเหมาะสมในการเก็บรักษา
ถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย เนื่องจากสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยให้มีคุณภาพ
ดีเยี่ยมตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยมีคุณภาพไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่เติม
ยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% นอกจากนั้นยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรีย
กลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่าการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin
ความเข้มข้น 0.1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี ต่อมา
ทำการศึกษาถึงการเก็บรักษาถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม เป็นระยะเวลา 3
เดือน พบว่าสารสกัดใบมะรุมและชิงมีประสิทธิภาพในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของ
กุ้งแชบ๊วยได้ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับการเติมยาปฏิชีวนะ
Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% ตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน แต่อย่างไร
ก็ตามเมื่อประเมินถึงประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียพบว่า สารสกัดชิงสามารถลดปริมาณ
แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้เทียบเท่ายาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความ
เข้มข้น 0.1% และสูงกว่าสารสกัดใบมะรุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: สมุนไพร; การแช่แข็ง; กุ้งแชบ๊วย; ถุ้งน้ำเชื้อ

ABSTRACT

This research work entitles “Application of Thai medicinal plants for controlling human and aquatic animals pathogenic bacteria in *Penaeus merguensis* spermatophores cryopreserved by conventional method and styrofoam box”. This study was the second year which aimed to study the application of two types of ethanolic medicinal herb extracts: moringa (*Moringa oleifera* L.) and ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe) in comparison with efficacious antibiotic cocktails (penicillin-streptomycin) for cryostorage of banana prawn spermatophore using automatic cryofreezer for 1 year. Results showed that 0.1 mg/mL of ethanolic-moringa-leaf extract was capable of suitably cryopreserving banana prawn spermatophore because of retaining percentage of sperm viability over 1 year of the experiment. Similar percentages of viable sperm in banana prawn spermatophore supplemented with penicillin-streptomycin (0.1%) were observed throughout 1 year cryostorage. In addition, 0.1 mg/mL of ethanolic moringa leaf extract showed significantly reduced total heterotrophic bacteria, compared to those in the experiments with the use of 0.1% penicillin-streptomycin in cryostored banana prawn spermatophore for 1 year. Then the study of *Penaeus merguensis* spermatophores cryopreserved by styrofoam box for 3 months was evaluated. Results showed that moringa (*Moringa oleifera* L.) and ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts were able to retain percentage of sperm viability similar to penicillin-streptomycin (0.1%) treatment for 3-month of experimental period. However, for the efficiency of total heterotrophic bacterial reduction, ethanolic-ginger-rhizome extract can decrease the total heterotrophic bacteria similar to those in penicillin-streptomycin (0.1%) treatment and better than those in ethanolic-moringa-leaf extract treatment significantly ($P < 0.05$).

Keywords: Medicinal plants; Cryostorage; Banana prawn; Spermatophore

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
Abstract.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญภาพ.....	VI
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
4 ผลการทดลอง.....	25
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	57
เอกสารอ้างอิง.....	63
ผลผลิต (Output).....	72
ประวัติผู้วิจัย.....	73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	29
2	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ.....	32
3	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ.....	34
4	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ.....	35
5	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ.....	37
6	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae.....	39
7	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae.....	40
8	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae.....	41
9	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม.....	43
10	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม.....	46
11	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม.....	48
12	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม.....	48
13	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม.....	50
14	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae.....	53
15	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae.....	54
16	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Pseudomonadaceae.....	55
17	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Alcaligenaceae..	55
18	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Vibrionaceae.....	56
19	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae.....	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเพศของกุ้ง.....	7
2	ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้ง.....	8
3	ลักษณะการผสมพันธุ์ของกุ้ง.....	9
4	ลักษณะของสเปิร์มกุ้งแช่บ๊วย.....	9
5	เครื่อง Rotary evaporator.....	19
6	เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer).....	20
7	ถังไนโตรเจนเหลว.....	21
8	พ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วย.....	25
9	การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วย.....	26
10	ถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วย.....	26
11	ลักษณะของสุมุนไพรรองอบแห้ง.....	27
12	ลักษณะของสารสกัดสุมุนไพรร.....	27
13	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแช่บ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ	30
14	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่แช่แข็งโดย ใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ.....	33
15	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแช่บ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม.....	44
16	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่แช่แข็งโดย ใช้กล่องโฟม.....	47

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

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

การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งจึงมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ โดยเฉพาะในสัตว์น้ำที่ใกล้สูญพันธุ์หรือมีวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของธนาคารยีน (Gene bank) แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อ (Semen) หรือถุงน้ำเชื้อ (Spermatophore) ที่สมบูรณ์ตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำเอาไว้ใช้ในอนาคต โดยทั่วไปผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำนิยมที่จะใช้น้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ ๆ ผสมกับไข่ เพราะเชื่อว่าคุณภาพน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อ

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

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

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

ไพลด์ต่ำลงเมื่อนำมาผสมเทียบกับไข่ (Stoss and Refstie, 1983; Saad et al., 1988) จึงได้มีการนำเอายาปฏิชีวนะมาใช้ เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียเพื่อทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหรือถุ่นน้ำเชื้อนานขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่ายาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียได้ แต่การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของสเปิร์มและอาจทำให้มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อยา ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพจากสมุนไพรจึงนับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่ามาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรมีความเป็นพิษต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและการประยุกต์ใช้สมุนไพรในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังเป็นแนวทางที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความยั่งยืน

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

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยเรื่อง “การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุ่นน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วย” ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557 ซึ่งผลการวิจัยทำให้ทราบถึงชนิดของบัพเฟอร์ ชนิดของสารโครโอโพรเทคแทนท์ และ Protocol ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาถุ่นน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่เย็นและแช่แข็ง รวมถึงทราบถึงขั้นตอนและวิธีการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุ่นน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่เย็น ซึ่งเป็นการเก็บรักษาแบบระยะสั้น ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยต่อยอด คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้ในการเก็บรักษาถุ่นน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่แข็งแบบเทคโนโลยีดั้งเดิม เพื่อควบคุมและลดปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาแบบระยะยาว ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในการปฏิสนธิ และยังเป็นการลดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคออกสู่

สิ่งแวดล้อม จะทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความเข้มแข็งของอุตสาหกรรมกุ้งทะเลและจะก้าวต่อไปยังสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

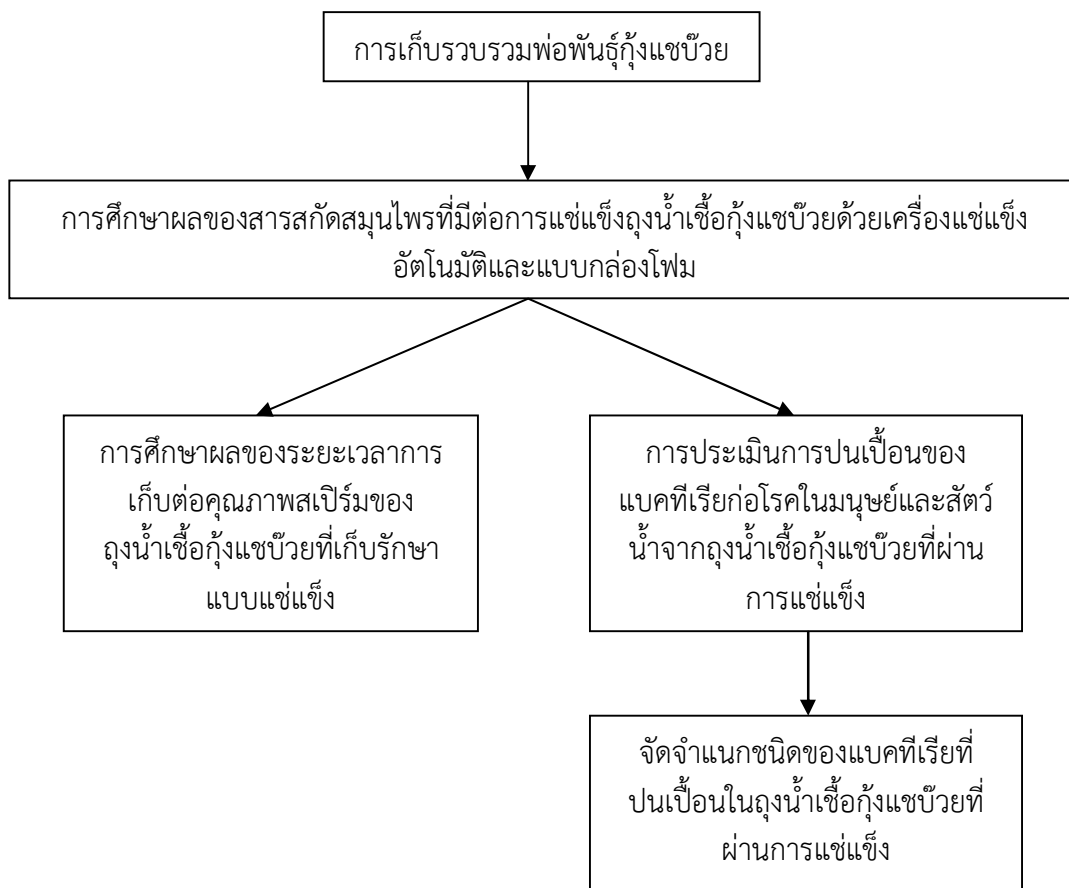
1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวโดยการใช้เทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม

2. เพื่อศึกษาผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกุ้งแช่บ๊วย และการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่แข็ง

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ เริ่มโดยการเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วย การสกัดสมุนไพร จากนั้นทำการศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งแช่บ๊วย โดยศึกษาถึงอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแช่บ๊วยในถุงน้ำเชื้อสดและถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง และทำการประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่ผ่านการแช่แข็งในช่วงเวลาต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 ปี รวมทั้งทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและจัดเก็บแบคทีเรียแบบแช่แข็งสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป และเริ่มทำการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แบบกล่องโฟม โดยการเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วยและสกัดสมุนไพร เพื่อนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยมาศึกษาถึงผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งแช่บ๊วย โดยศึกษาถึงอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแช่บ๊วยในถุงน้ำเชื้อสดและถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง และทำการประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่ผ่านการแช่แข็งในช่วงเวลาต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 3 เดือน รวมทั้งทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและจัดเก็บแบคทีเรียแบบแช่แข็ง

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวียแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวโดยการใช้เทคโนโลยีดั้งเดิมและแบบกล่องโฟม
2. ทราบถึงผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกึ่งแซบวีย และการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง
3. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวียแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป รวมทั้งทำให้สามารถประยุกต์ใช้การเพาะขยายพันธุ์กึ่งแซบวียได้โดยตรง ทำให้การจัดการฟาร์มและการเพาะพันธุ์กึ่งแซบวียมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพดีขึ้น และยังเป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยด้านการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งชนิดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วยหัวข้อดังนี้

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

1. กุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วย (Banana prawn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguensis* ซึ่งมีอนุกรมวิธาน ดังนี้ (ประจวบ หล้าอุบล, 2530)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natenita

Section Penaeidea

Genus *Penaeus*

Species *merguensis*

1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา (ประจวบ หล้าอุบล, 2530)

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

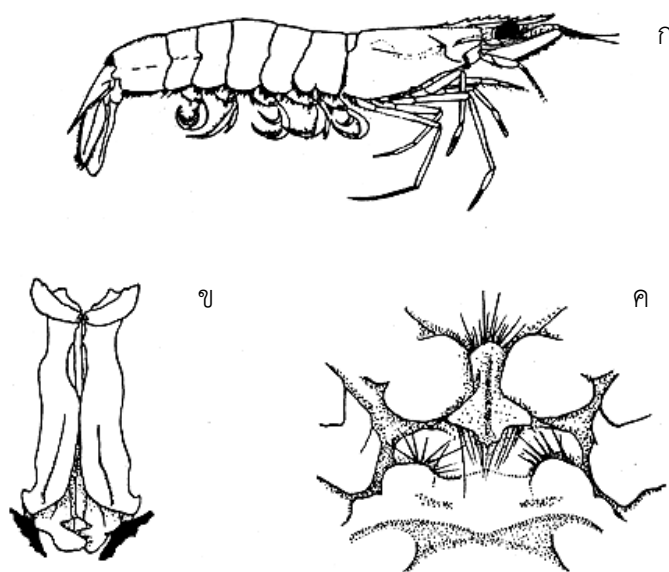
- 1) รยางค์ส่วนหัว (Cephalic appendages) จำนวน 5 คู่
รยางค์คู่ที่ 1-2 ทำหน้าที่รับความรู้สึก (Antenna)
รยางค์คู่ที่ 3, 4 และ 5 ทำหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร (Antenna)
- 2) รยางค์ส่วนอก (Thoracic appendages) จำนวน 8 คู่
รยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8 ช่วยในการกินอาหาร (Maxilliped)
รยางค์คู่ที่ 9-13 ทำหน้าที่ในการเดิน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

3) ulyangค้ส่วนลำตัวย (Abdominal appendages) จำนวน 6 คู่
 ulyangค้คู่ที่ 14-18 ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ หรือช่วยในการยึดเกาะของไข่อ (Pleopods)

ulyangค้คู่ที่ 19 ทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำหรือเคลื่อนที่ (Uropod)

1.2 ลักษณะและความแตกต่างระหว่างเพศ

กึ่งแซบวัยเพศผู้และเพศเมียสามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยการสังเกตความแตกต่างของลักษณะอวัยวะภายนอกที่ปรากฏ โดยในกึ่งเพศเมียบริเวณที่อยู่ระหว่างโคนคู่ที่ 5 และขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 จะมีอวัยวะที่เรียกว่าทีไลกัม (Thelycum) ส่วนกึ่งเพศผู้จะมีอวัยวะที่เรียกว่า พีแทสมา (Petasma) ซึ่งมีลักษณะเป็นติ่งยื่นออกมาอยู่ระหว่างโคนขาเดินคู่ที่ 1 (สุบัตินัต นิมรัตน์ และวีรพงศวุฒิปันธุ์ชัย, 2555) (ภาพที่ 1 และ 2)



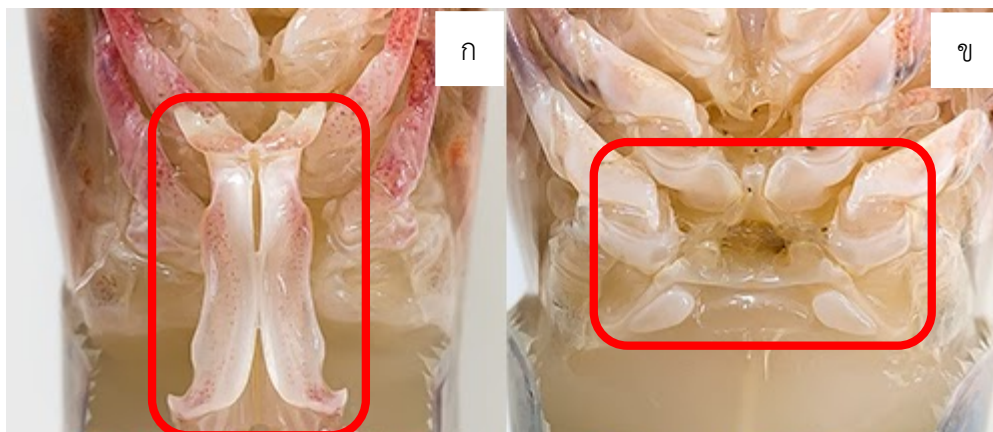
ภาพที่ 1 ลักษณะเพศของกึ่ง

ก : ลักษณะโดยทั่วไปของกึ่ง

ข : Petasma อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้

ค : Thelycum อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย

(Edwards, 1837)



ภาพที่ 2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้ง

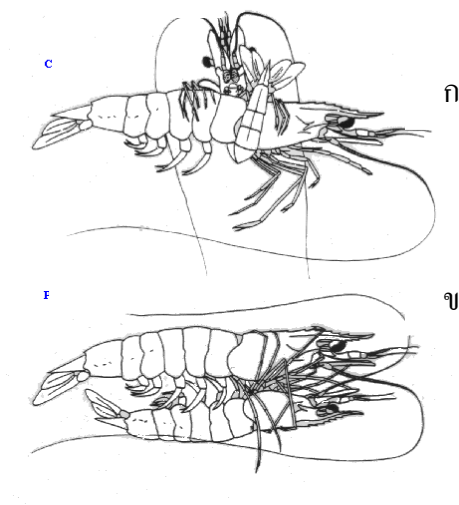
ก : Petasma อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้

ข : Thelycum อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย

(<http://eatishshootipost.sg/2013/12/singapore-prawn-files-sand-prawns-sua.html>)

1.3 การผสมพันธุ์และการวางไข่

ในช่วงฤดูการผสมพันธุ์และวางไข่ เมื่อกุ้งเพศผู้และเพศเมียมีความพร้อมที่จะผสมพันธุ์แล้ว กุ้งเพศเมียจะทำการลอกคราบเป็นระยะเวลาประมาณ 3-6 ชั่วโมง จากนั้นกุ้งเพศผู้จึงจะเข้ามาถอดรัดเพศเมีย และทำความสะอาดบริเวณส่วนท้อง (Ventral thoracic) ของกุ้งเพศเมีย ต่อมากุ้งเพศผู้จะจับกุ้งเพศเมียหางขึ้นพร้อมกับปล่อยถุงน้ำเชื้อ (Gelatinous mass) เข้าไปบริเวณที่โล่กัมของกุ้งเพศเมีย (ประจวบ หล้าอุบล, 2530) (ภาพที่ 3) โดยภายในถุงน้ำเชื้อกุ้งเพศผู้จะประกอบด้วยเซลล์สเปิร์ม ซึ่งเซลล์สเปิร์มของกุ้งเพศผู้จะมีโครงสร้างที่มีส่วนหัวลักษณะกลมหนา และมีขนาดใหญ่ ภายในบรรจุสารพันธุกรรม และส่วนหางมีลักษณะสั้นใช้ในการว่ายน้ำ (ภาพที่ 4) ซึ่งภายหลังจากนั้นไข่ที่มีการพัฒนาอย่างเต็มที่จากกุ้งเพศเมียที่พร้อมวางไข่ จะสังเกตเห็นพฤติกรรมของกุ้งเพศเมียที่จะว่ายน้ำวนไปมาเมื่อมีการกระวนกระวายก่อนที่จะวางไข่ โดยขณะการวางไข่ของกุ้งเพศเมียจะมีลักษณะการงอส่วนของหางเข้าหาลำตัวทางด้านหน้าท้องบริเวณปล้องที่ 4 จากนั้นขาเดินทั้ง 5 คู่ จะงอ และกอดส่วนอกแน่น ส่วนขาว่ายน้ำจะโบกไปข้างหน้า และหลังอย่างสม่ำเสมอ และที่ปลายขาเดิน 3 คู่หลังจะว่ายน้ำทางซ้าย และขวาอย่างซ้ำๆ เพื่อให้ไข่ถูกปล่อยออกมาเนื่องจากการหมุนเวียนของน้ำจากการโบกพัดของขาว่ายน้ำ ทางช่องที่เปิดอยู่บริเวณของขาคู่ที่ 3 (สุภัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2555) แล้วน้ำเชื้อจากถุงน้ำเชื้อที่เก็บไว้ภายในกุ้งเพศเมียจะถูกปล่อยออกมาจากบริเวณรูเปิดของโคนขาคู่ที่ 4 ซึ่งไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้ว (Fertilized eggs) จะจมลง และไข่จะฟักกลายเป็นตัวอ่อนเมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 12-14 ชั่วโมง (ประจวบ หล้าอุบล, 2530)



ภาพที่ 3 ลักษณะการผสมพันธุ์ของกุ้ง

ก : คือลักษณะของกุ้งแชบ๊วยเพศผู้ที่ทำความสะอาดบริเวณส่วนท้องของกุ้งแชบ๊วยเพศเมีย

ข : คือลักษณะการฉีดน้ำเชื้อของกุ้งแชบ๊วยเพศผู้เข้าสู่กุ้งแชบ๊วยเพศเมีย

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



ภาพที่ 4 ลักษณะของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย

(ภาพโดย: ญัฐชนน พลายสิน)

2. การแพร่กระจายของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

การแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การเกิดมลพิษในน้ำ การติดเชื้อจากรา โพรโตซัว ไวรัสและแบคทีเรีย โดยโรคที่พบว่ามีอาการแพร่ระบาดและเป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยง คือ โรควิบริโอซิส (Vibriosis) โรคเอ็นเอชพี (Necrotizing hepatopancreatitis หรือ NHP) โรคติดเชื้อริกเก็ตเซียในเฮปพาโตแพนแครีซิส (Hepatopancreatic rickettsia infection) และโรคติดเชื้อมายโคแบคทีเรีย (Mycobacterial infections) เป็นต้น (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ, 2551) ซึ่งการติดโรคดังกล่าวหากไม่ได้รับการป้องกันและแก้ไข อาจส่งผลเสียหายต่อปริมาณผลผลิตในการเพาะเลี้ยง และระบบนิเวศในการเพาะเลี้ยงได้

2.1 โรควิบริโอซิส

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

V. harveyi เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค Luminescent vibriosis ได้ในกุ้งหลายชนิด เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นต้น (Lavilla-Pitogo et al., 1998; Guzman et al., 2010) ลักษณะอาการของกุ้งที่ติดโรควิบริโอซิสคือ กุ้งจะเกิด

สภาวะขาดออกซิเจน ลำตัวมีสีตัวแดง เหงือกเป็นสีแดงถึงน้ำตาล กินอาหารได้น้อยและว่ายน้ำช้า ๆ อยู่บริเวณผิวน้ำ (Anderson et al., 1988; Nash et al., 1992) สามารถเห็นการเรืองแสงอย่างชัดเจนในเวลากลางคืน (ชลอ ลิมสุวรรณ, 2543; สุปันจิต นิมรัตน์, 2551) และมีโอกาสตายสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Chen, 1992)

ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจึงเป็นปัญหาที่ต้องคำนึงถึง และทำการควบคุมเพื่อป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ซึ่งจะทำให้กุ้งที่ติดโรคตายและสูญเสียปริมาณการผลิต

2.2 โรค Necrotizing hepatopancreatitis หรือ NHP

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

3. การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บิวแบบแช่แข็ง

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

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

การแช่แข็งน้ำเชื้อมีประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ กล่าวคือ ในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำส่วนใหญ่เพศผู้เมื่อถึงระยะโตเต็มวัยจะผลิตน้ำเชื้อได้ตลอดเวลา แต่การตกไข่ของเพศเมียจะไม่สามารถตกไข่ได้ตลอดเวลา ดังนั้นถ้าเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์เพศผู้ไว้ได้เมื่อเพศเมียตกไข่ก็จะสามารถนำมาผสมพันธุ์กับเพศเมียได้ตลอดเวลา รวมถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อนำไปผสมพันธุ์ของสัตว์ที่เป็นกะเทย (Hermaphrodite) เช่น ปลากระรัง (*Epinephelus tauvina*) ที่ช่วงแรกของชีวิตเป็นเพศเมียและเมื่อโตขึ้นจะกลายเป็นเพศผู้ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในเรื่องการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (Interspecific hybridization) เพื่อให้ได้สัตว์ที่พันธุ์ดีกว่าเดิม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

จิตาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษานินดของแบคทีเรีย *Vibrio* ในแม่กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) จากแหล่งธรรมชาติฝั่งอ่าวไทยตะวันออก ผลจากการศึกษาพบ *Vibrio* จากตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่กุ้งแชบ๊วยจำแนกออกเป็น 4 ชนิด คือ *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* และ *V. damsela* ส่วนแบคทีเรีย *Vibrios* ที่แยกได้จากน้ำทะเลในแหล่งที่แม่กุ้งแชบ๊วยอาศัยอยู่ จำแนกได้ 5 ชนิด ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. damsela* และ *V. parahaemolyticus*

สุภัณฑิลา นิรมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2553) ศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระพงขาว (*L. calcarifer*) ด้วยวิธีแช่เย็น โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระพงขาวด้วยวิธีการ

แช่เย็น จากการศึกษพบว่า Penicillin-Streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1% (v/v) สามารถรักษา การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาได้มากที่สุดเป็นระยะเวลา 9 วัน และสามารถลดปริมาณของเชื้อ แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้ดีกว่าชุดควบคุม (Ringer's solution)

สุบัตินิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2555) ทำการศึกษาชนิดของ Extender ที่ เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็ง (*P. merguensis*) ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เย็น โดย ทำการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งไว้ในสารละลาย Extender ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ Ca-F-Saline, Mineral Oil, Ringer's solution, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.8% NaCl ภายใต้อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน จากการทดลองพบว่าถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ใน Mineral oil สามารถรักษาการมีชีวิตรอดของสเปิร์มไว้ได้มากที่สุด เท่ากับ $89.10 \pm 0.81\%$ จากนั้นทำการศึกษา ผลของการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin และ Penicillin-Gentamicin ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2% และทำการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่เย็น ซึ่งจากการศึกษาพบว่าชุดทดลองที่มีการเติม ยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1% แสดงอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มมาก ที่สุด

สุบัตินิต นิมรัตน์ และคณะ (2557ก) ศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin และ Penicillin-Gentamycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 % ต่ออัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและ ปริมาณแบคทีเรียแกรมลบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ผลการศึกษาพบว่าชุดการ ทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1% มีอัตราการรอดชีวิตของ สเปิร์มสูงที่สุด และทุกชุดการทดลองสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งใน ระหว่างที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นได้ตั้งแต่วันแรกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

สุบัตินิต นิมรัตน์ และคณะ (2557ข) ศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin และ Penicillin-Gentamycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2 % ต่ออัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและ ปริมาณแบคทีเรีย *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ผลการศึกษาพบว่า ชุดการทดลองที่ให้ผลการศึกษาคือ ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1% โดยมีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มสูงที่สุด และสามารถยับยั้ง *Pseudomonas* ได้ตั้งแต่วันที่ 21 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

Hwang et al. (2004) ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากกระชายเหลือง (*Kaempferia pandurata*) ในการต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุ คือ *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* และ *S. salivarius* จากการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดจากกระชายเหลืองต่อ *S. sobrinus*, *S. sanguinis* และ *S. salivarius* พบว่าค่า MIC มีค่าเท่ากันคือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง ต่ำกว่าสารป้องกันฟันผุที่สกัดได้จากชาเขียว Carvacrol ทายม์ กานพลูและยูคาลิปตัส ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 125, 125, 250, 500 และ 500 ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดจากกระชายเหลืองความ เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้ง *S. mutans* ได้ภายในเวลา 1 นาที ซึ่งสารสกัดกระชาย เหลืองที่ได้มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของ *S. mutans* ถูกทำลาย

Nimrat et al. (2005) ได้ศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุลาดำ (*P. monodon*) ด้วยวิธีการแช่เย็น และทำการประเมินการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา โดยการทดลองในขั้นตอนแรกทำการศึกษาถึงความเหมาะสมของสารละลาย Extender ทั้งหมด 4

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

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

Nimrat et al. (2006) ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งขาว (*L. vannamei*) แบบแช่เย็น และประเมินการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการศึกษานี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกทำการศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อไว้ในสารละลาย Extender

ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ Mineral oil, Ringer's solution, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.85% NaCl ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เก็บรักษาไว้ใน Mineral oil มีลักษณะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มมีค่ามากที่สุด สำหรับแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในอุณหภูมิแช่แข็งขาวในระหว่างการเก็บรักษา คือ *B. circulans*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp. ต่อมาในขั้นตอนที่สอง ทำการศึกษาผลของการเติมยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาอุณหภูมิแช่แข็งขาวแบบแช่เย็น โดยทำการเก็บรักษาอุณหภูมิแช่แข็งขาวใน Mineral oil ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ และเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% ซึ่งผลการศึกษาค้นพบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในอุณหภูมิแช่แข็งขาวที่เก็บรักษาไว้ 35 วัน ในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% มีค่าสูงสุดเท่ากับ $69.5 \pm 3.9\%$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้เติมยาปฏิชีวนะ ($p < 0.05$) และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอุณหภูมิแช่แข็งขาวใน Mineral oil ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะมีค่าอยู่ระหว่าง 28.3 ± 4.8 ถึง 2416.7 ± 299.4 CFU/g แต่ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียในชุดการทดลองที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.1% ดังนั้นการเก็บรักษาอุณหภูมิแช่แข็งขาวด้วยวิธีการแช่เย็นเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการจัดการการผสมพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งขาว

Yano et al. (2006) ศึกษาถึงฤทธิ์ของเครื่องเทศและสมุนไพร 18 ชนิด ในการต้านแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคทางอาหาร โดยศึกษาถึงปัจจัยร่วมระหว่างผลของอุณหภูมิและระดับของสารอาหาร จากผลการทดลองพบว่าโหระพา (Basil) กานพลู (Clove) กระเทียม (Garlic) มะรุม (Horseradish) มาเจอแรม (Marjoram) โอรีกาโน (Oregano) และไทม์ (Thyme) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวที่อุณหภูมิการบ่ม 30 องศาเซลเซียส ส่วนโหระพา กานพลู กระเทียม มาเจอแรม โอรีกาโน ไทม์ ไซล (Cassumunar) ชิง (Ginger) เจแปนนิส เปปเปอร์ (Japanese pepper) สระระแห่น (Peppermint) โรสแมรี่ (Rosemary) เซจ (Sage) สเปียร์มินท์ (Spearmint) และขมิ้น (Turmeric) สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิการบ่ม 5 องศาเซลเซียส โดยค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ที่น้อยที่สุดคือ 0.001 และ 0.00025 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบในมาเจอแรม ที่อุณหภูมิการบ่ม 30 และ 5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเครื่องเทศและสมุนไพรสามารถใช้ในการป้องกันความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และใช้ในเทคโนโลยีที่ใช้ปัจจัยร่วมหลายปัจจัยร่วมกับการใช้อุณหภูมิต่ำในการป้องกันความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้

Ding et al. (2009) ทำการศึกษาผลของ Extender และสารไครโอโพรเทคแทนต์ต่อการเคลื่อนที่ของน้ำแข็งปลา Mandarin (*Siniperca chuatsi*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง จากการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาน้ำแข็งใน Extender ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำน้ำแข็งดังกล่าวมาใส่ในหลอดแช่แข็ง เพื่อนำไปแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว โดยให้หลอดน้ำแข็งอยู่เหนือผิวหน้าของไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -180 องศาเซลเซียส โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำแข็งวางบนผิวหน้าของไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำหลอดดังกล่าวไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวต่อไป จากนั้นนำน้ำแข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที พบว่าน้ำแข็งมีอัตราการเคลื่อนที่สูงถึง $96 \pm 73\%$ และเมื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิกับไข่และอัตราการฟักพบว่าน้ำแข็งปลา

Mandarin ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งเป็นเวลา 1 สัปดาห์และ 1 ปี มีอัตราการปฏิสนธิกับไข่เท่ากับ 66.0 ± 15.14 และ $54.7 \pm 64.40\%$ ตามลำดับ และมีอัตราการฟักไข่เท่ากับ $62.97 \pm 14.28\%$ และ $52.58 \pm 11.17\%$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่ของน้ำเชื้อสดที่มีค่าเท่ากับ $69.42 \pm 8.11\%$ และ $59.82 \pm 5.27\%$ ตามลำดับ

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ
 - 1.1 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
 - 1.2 ไมโครปิเปต
 - 1.3 หลอดหยด
 - 1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
 - 1.5 ปีกเกอร์ (Beaker)
 - 1.6 ปากคีบ (Forceps)
 - 1.7 หลอด Cryovial
 - 1.8 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)
 - 1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
 - 1.11 กล่องโฟมขนาด 17×32×20 เซนติเมตร
 - 1.12 Programmable controlled-rate freezer

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

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ
 - 3.1 จานเพาะเชื้อ (Petridish)
 - 3.2 0.85% โซเดียมคลอไรด์
 - 3.3 Plate Count Agar (PCA)
 - 3.4 Pseudomonas Isolation Agar (PIA)
 - 3.5 Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar (TCBS)

4. สารเคมี
 - 4.1 Calcium-free saline extender
 - 4.2 DMSO 10% (v/v)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมฟอสฟอรัสกึ่งแซบวีย

ทำการเก็บรวบรวมฟอสฟอรัสกึ่งแซบวียจากทะเลบริเวณหาดบางแสนและเขาสามมุข อำเภอมือเมือง จังหวัดชลบุรี จากนั้นคัดเลือกฟอสฟอรัสกึ่งแซบวียที่สมบูรณ์เพศโดยพิจารณาจากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อ (spermatophores) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 จากนั้นนำฟอสฟอรัสกึ่งแซบวียมาล้างน้ำหนักและวัดความยาวของลำตัว และนำไปเลี้ยงในบ่อขนาด 3x4x1.5 เมตร ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และให้อาหารแก่ฟอสฟอรัสกึ่งแซบวียคือ หมึกและแม่เพรียงวันละ 2 ครั้ง ประมาณ 10% น้ำหนักตัว/วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลที่สะอาดในบ่อพักฟอสฟอรัสประมาณ 30% ทุก ๆ 1-2 วัน ฟอสฟอรัสจะถูกเลี้ยงให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5 วัน และตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสที่มีถุงน้ำเชื้อที่ยังพัฒนาไม่มากนัก เช่น มีสีขาขาวขุ่นเล็กน้อย หรือยังไม่มีถุงน้ำเชื้อจะไม่นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่าฟอสฟอรัสทุกตัวที่ใช้ในการทดลองมีคุณภาพสเปิร์มดี ซึ่งสังเกตเบื้องต้นได้จากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อที่ยังขาวขุ่นมากแสดงถึงคุณภาพสเปิร์มที่ดี ในขณะที่ถุงน้ำเชื้อที่ขาวขุ่นเล็กน้อยแสดงว่าสเปิร์มมีคุณภาพต่ำ

2. การรวบรวมถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวีย

การรวบรวมถุงน้ำเชื้อจากกึ่งแซบวียทำโดยการใช้มือกดเบา ๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของฟอสฟอรัสกึ่งแซบวียทั้ง 2 ข้าง ซึ่งมี Petasma อยู่บริเวณนั้น เมื่อเริ่มเห็นถุงน้ำเชื้อไหลออกมาจึงใช้คีมคีบ (Forceps) ที่สะอาดปราศจากเชื้อดึงเอาถุงน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อนำไปทดลองต่อไป

3. การสกัดสุมุนไพโร (Quave et al., 2008)

นำสุมุนไพโรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ไบมะรุ้ม และชิง ซึ่งผ่านการศึกษาจากโครงการวิจัยเรื่อง “การประยุกต์ใช้สุมุนไพโรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวีย” ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557 มาล้างน้ำทำความสะอาด แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำสุมุนไพโรมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบด นำผงสุมุนไพโรใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุเอทานอล 95% ในอัตราส่วนสุมุนไพโรต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 10 แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบเท่ากับ 100-120 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดสุมุนไพโรผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เพื่อใช้เป็นสารสกัดสต็อก



ภาพที่ 5 เครื่อง Rotary evaporator

4. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

4.1 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ใบมะรุม และขิง จากโครงการวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิว ที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2557 มาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้

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

นำถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวมาเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ตามขั้นตอนการเก็บรักษาในข้อ 4.2 จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองมาศึกษาอัตราการมีชีวิต (ข้อ 4.3.1) ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิว (ข้อ 4.3.2) ขณะเก็บรักษาในระยะเวลาต่างกันตั้งแต่หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน

4.2 การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

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



ภาพที่ 6 เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)



ภาพที่ 7 ถังไนโตรเจนเหลว

4.3 การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บ (Storage period) ต่อคุณภาพสเปิร์มของ ถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บวดยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

นำเอาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บวดยที่มีคุณภาพดีมาแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (ข้อ 4.2) โดยถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บวดยจะถูกแช่แข็งใน Cryovial และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนมากที่เก็บเหล่านี้จะถูกผลิตขึ้นมาในปริมาณมากจากพ่อพันธุ์กึ่งแช่บวดยหลายตัว (Pooled spermatozoa) ที่มีคุณภาพดี ถุงน้ำเชื้อจะถูกนำมาละลายและประเมินคุณภาพของสเปิร์มตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ (หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน) เพื่อประเมินถึงผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อคุณภาพสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง รวมทั้งประเมินการเปลี่ยนแปลงการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำ

4.3.1 การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิต (% Sperm viability)

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

4.3.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจาก ถ้ำน้ำเค็มกึ่งแซบวียที่ผ่านการแช่แข็ง

การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในถ้ำน้ำเค็มกึ่งแซบวียแบบแช่แข็งที่เริ่มต้นจากนำถ้ำน้ำเค็มกึ่งแซบวียแบบแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน มาละลายที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นบดถ้ำน้ำเค็มในโถรงบดยาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วดูน้ำเชื้อใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl จากนั้นปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar, Pseudomonas Isolation Agar และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และในสัตว์น้ำ รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถ้ำน้ำเค็มกึ่งแซบวีย ซึ่งมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

1) การประเมินการปนเปื้อนในถ้ำน้ำเค็มสด (Nimrat et al., 2006; 2008a)

รวบรวมถ้ำน้ำเค็มจากถ้ำแซบวียโดยใช้มือกอดเบาๆ บริเวณโคนขาเดินคูที่ 5 ของพ่อพันธุ์ถ้ำแซบวียทั้ง 2 ซ้าง จากนั้นใช้คีบคีบที่สะอาดดึงถ้ำน้ำเค็มออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วนำถ้ำน้ำเค็มมาบดให้ละเอียดในโถรงบดยา จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อด้วย 0.85% NaCl ที่ระดับความเจือจางต่างๆ แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำเชื้อกึ่งแซบวียที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar, Pseudomonas Isolation Agar และ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar เพื่อศึกษาถึงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ตามลำดับ โดยในแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างจนทั่วจานเพาะเชื้อด้วยวิธีเสปรดเพลท (Spread plate) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการทดลอง และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Schubert (1984), Holt et al. (1994)

2) การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียในถ้ำน้ำเค็มที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Nimrat et al., 2006)

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

Schubert (1984), Holt et al. (1994) โดยเก็บตัวอย่างถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งมาทำการทดลองในช่วงระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน

5. การศึกษาผลของสารสกัดสุมไพรม์ที่มีต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 4 ทุกประการยกเว้นขั้นตอนการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง จะใช้วิธีการแช่แข็งในกล่องโฟมแทนการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ โดยมีขั้นตอนและกระบวนการดังต่อไปนี้

5.1 การทดสอบผลของสารสกัดสุมไพรม์ต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม

นำสารสกัดสุมไพรม์ชนิดเดียวกับการทดลองข้อ 4.1 มาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1	เติม Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 10% (Control)
ชุดการทดลองที่ 2	เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้น 0.1%
ชุดการทดลองที่ 3	เติมสารสกัดไบเมะรุุม ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ชุดการทดลองที่ 4	เติมสารสกัดชิง ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม (ข้อ 5.2) จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองมาศึกษาอัตราการมีชีวิต (ข้อ 4.3.1) ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง (ข้อ 4.3.2) ขณะเก็บรักษาในระยะเวลาต่างกันตั้งแต่หลังการแช่แข็ง 15 นาที, 1 และ 3 เดือน

5.2 การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งโดยวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม

นำถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่เก็บรวบรวมได้ใส่ลงในหลอด Cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO) จากนั้นเติมสารชนิดต่าง ๆ ของแต่ละชุดการทดลองดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 5.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้พักให้อยู่ในสภาวะสมดุล (Equilibrium) นาน 10 นาที จากนั้นนำมาวางบนตะแกรงใส่หลอดทดลองภายในกล่องโฟมขนาด 17 × 32 × 20 เซนติเมตร ที่มีไนโตรเจนเหลว โดยวางให้มีความสูงเหนือผิวไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร ปิดฝาทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที เชี่ยวหลอด Cryovial ให้ตกลงไปอยู่ในไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม จากนั้นจับเวลา 10 นาที นำถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่แช่แข็งตัวมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

บทที่ 4 ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ที่ได้ทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ เป็นระยะเวลา 9 เดือน และในการศึกษาครั้งนี้ (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560) จะทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติต่อเนื่องในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เพื่อศึกษาถึงผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในระยะเวลา 1 ปี รวมทั้งทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยด้วยกล่องโฟม เป็นระยะเวลา 3 เดือน ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

1.1 การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วยสำหรับการแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

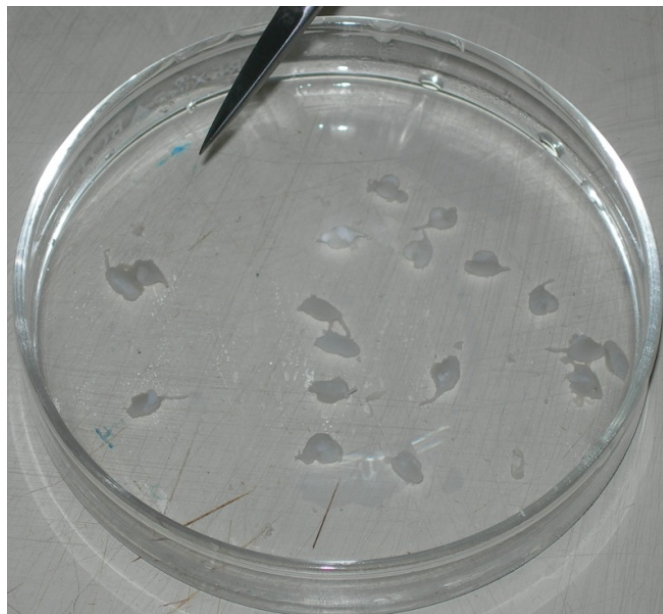
รวบรวมพ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วยอายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 80 ตัว จากทะเลบริเวณหาดบางแสน และเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 25.48 ± 5.19 กรัม มีความยาวจากปลายกรีถึงปลาย Telson เท่ากับ 14.59 ± 0.97 เซนติเมตร (ภาพที่ 8) จากนั้นดึงกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วยทั้ง 2 ข้าง (ภาพที่ 9) แล้วนำมาวางในจานเพาะเชื้อที่มี Ca-free saline ที่ปราศจากเชื้อ (ภาพที่ 10) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 8 พ่อพันธุ์กุ้งแช่บ๊วย



ภาพที่ 9 การดึงถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วย



ภาพที่ 10 ถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วย

1.2 ลักษณะของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

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



(a)



(b)

ภาพที่ 11 ลักษณะของสมุนไพรหลังอบแห้ง
(a) ใบมะรุม (b) ขิง



(a)



(b)

ภาพที่ 12 ลักษณะของสารสกัดสมุนไพร
(a) สารสกัดใบมะรุม (b) สารสกัดขิง

1.3 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

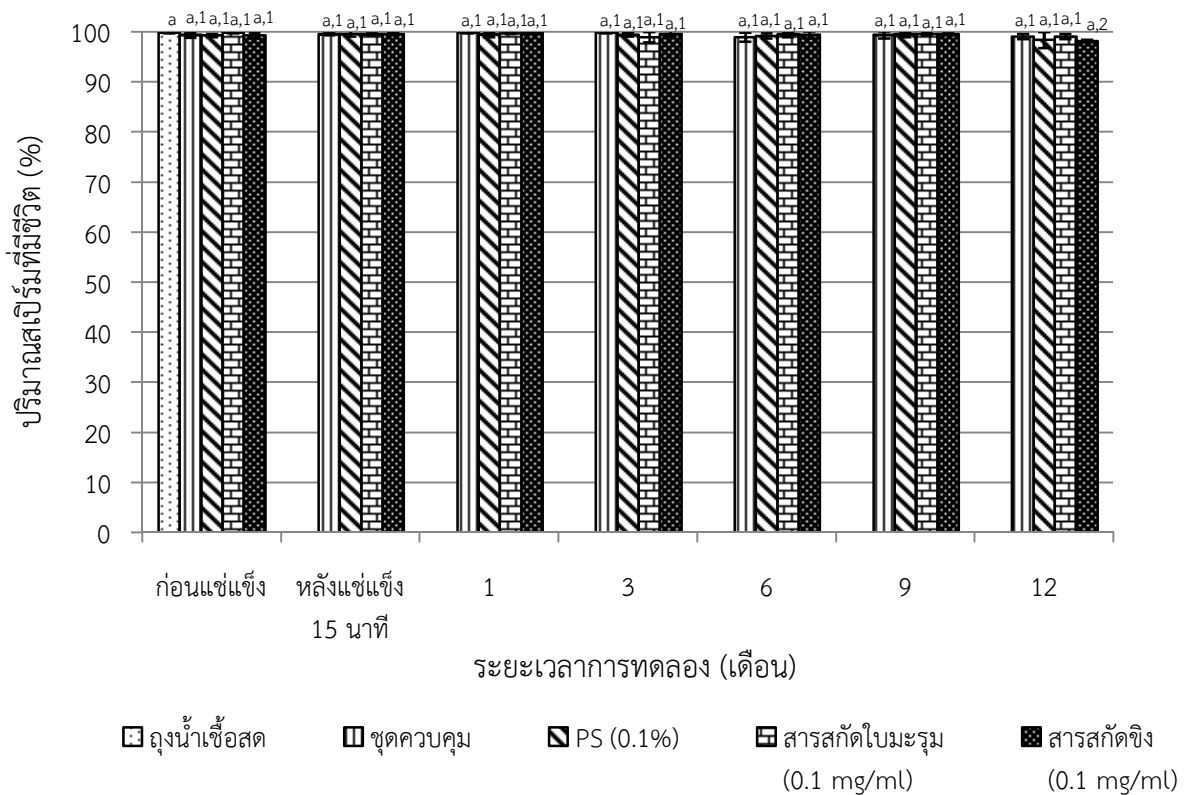
1.3.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติพบว่า เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งก่อนเริ่มต้นการทดลองมีคุณภาพดีเยี่ยม โดยมีค่าเท่ากับ $99.89 \pm 0.19\%$ ส่วนถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่เตรียมสำหรับแช่แข็งด้วยการเติมสารที่แตกต่างกัน ได้แก่ ชุดควบคุม การเติมยาปฏิชีวนะ การเติมสารสกัดใบมะรุม และการเติมสารสกัดขิง มีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับถุงน้ำเชื้อสดก่อนการแช่แข็ง โดยมีค่าเท่ากับ $99.44 \pm 0.51\%$, $99.33 \pm 0.33\%$, $99.89 \pm 0.19\%$ และ $99.33 \pm 0.58\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 12 เดือน ได้แสดงให้เห็นว่าคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับช่วงเริ่มต้นการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดสมุนไพรมีผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน กล่าวคือเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งที่เติมสารสกัดขิงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ $98.22 \pm 0.19\%$ ในขณะที่ถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งในชุดควบคุม ชุดเติมยาปฏิชีวนะและชุดเติมสารสกัดใบมะรุมมีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ $99.11 \pm 0.51\%$, $98.44 \pm 1.58\%$ และ $99.11 \pm 0.51\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดไบอะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดชิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	99.89 ± 0.19 ^a	99.44 ± 0.51 ^{a,1}	99.33 ± 0.33 ^{a,1}	99.89 ± 0.19 ^{a,1}	99.33 ± 0.58 ^{a,1}
หลังแช่แข็ง 15 นาที		99.56 ± 0.19 ^{a,1}	99.67 ± 0.58 ^{a,1}	99.56 ± 0.19 ^{a,1}	99.67 ± 0.33 ^{a,1}
1		99.89 ± 0.19 ^{a,1}	99.56 ± 0.51 ^{a,1}	99.78 ± 0.19 ^{a,1}	99.89 ± 0.19 ^{a,1}
3		99.89 ± 0.19 ^{a,1}	99.44 ± 0.38 ^{a,1}	99.00 ± 1.00 ^{a,1}	99.67 ± 0.58 ^{a,1}
6		99.00 ± 0.88 ^{a,1}	99.22 ± 0.51 ^{a,1}	99.56 ± 0.51 ^{a,1}	99.44 ± 0.69 ^{a,1}
9		99.44 ± 0.69 ^{a,1}	99.56 ± 0.51 ^{a,1}	99.67 ± 0.33 ^{a,1}	99.56 ± 0.19 ^{a,1}
12		99.11 ± 0.51 ^{a,1}	98.44 ± 1.58 ^{a,1}	99.11 ± 0.51 ^{a,1}	98.22 ± 0.19 ^{a,2}

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



ภาพที่ 13 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแซบวัยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
 ทางสถิติ ($P < 0.05$)
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
 ทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.3.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจาก ถูน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

1) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

จากการศึกษาพบว่า ถูน้ำเชื้อสดของกึ่งแซบวัยก่อนเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณ
 แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ $3.33 \pm 0.58 \times 10^3$ CFU/g ซึ่งแตกต่างกับปริมาณ
 แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถูน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยก่อนแช่แข็งในชุดควบคุม ชุดที่เติมยา
 ปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% ชุดที่เติมสารสกัดไบโอะรูมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อ
 มิลลิลิตร และชุดที่เติมสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเท่ากับ $1.00 \pm 0.00 \times 10^3$,
 $1.50 \pm 0.50 \times 10^3$, $1.25 \pm 0.15 \times 10^3$ และ $2.00 \pm 0.00 \times 10^3$ CFU/g ตามลำดับ เมื่อนำถูน้ำเชื้อกึ่งแซบวัย
 มาแช่แข็งพบว่า ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$) โดยสังเกตได้จากปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ในชุดควบคุมมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 12 เดือน ซึ่งรูปแบบการลดลงดังกล่าวนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับการลดลงของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% และสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเท่ากับ $2.00 \pm 0.00 \times 10^2$ และ $1.00 \pm 0.00 \times 10^2$ CFU/g ตามลำดับ หลังการเก็บรักษานาน 12 เดือน แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดขิงมะขามความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดให้มีค่าน้อยกว่า 10 CFU/g ได้ หลังการเก็บรักษานาน 12 เดือน ในไนโตรเจนเหลว แสดงให้เห็นว่าสารสกัดขิงมะขามความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีศักยภาพในการกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ้วยแบบแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 2

2) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio*

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

3) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*

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

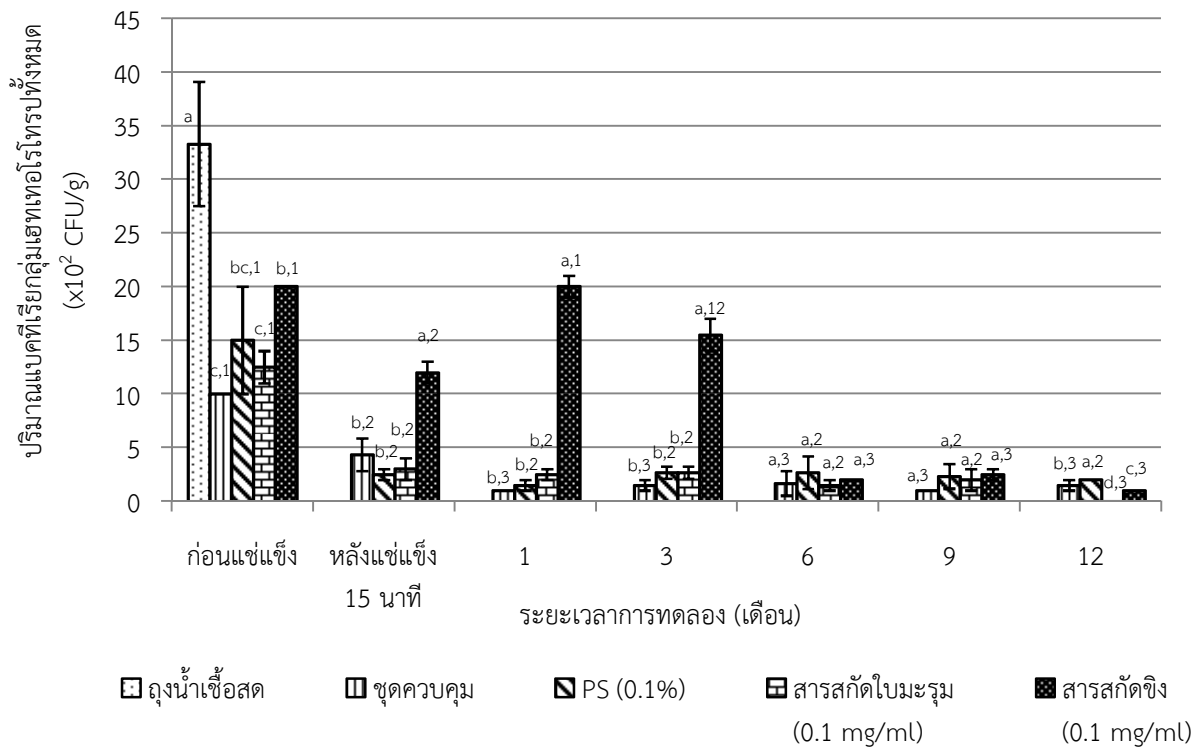
ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุ้ม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	$3.33 \pm 0.58 \times 10^3$ ^a	$1.00 \pm 0.00 \times 10^3$ ^{c,1}	$1.50 \pm 0.50 \times 10^3$ ^{bc,1}	$1.25 \pm 0.15 \times 10^3$ ^{c,1}	$2.00 \pm 0.00 \times 10^3$ ^{b,1}
หลังแช่แข็ง 15 นาที		$4.33 \pm 1.53 \times 10^2$ ^{b,2}	$2.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{b,2}	$3.00 \pm 1.00 \times 10^2$ ^{b,2}	$1.20 \pm 0.10 \times 10^3$ ^{a,2}
1		$1.00 \pm 0.00 \times 10^2$ ^{b,3}	$1.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{b,2}	$2.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{b,2}	$2.00 \pm 1.00 \times 10^3$ ^{a,1}
3		$1.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{b,3}	$2.67 \pm 0.58 \times 10^2$ ^{b,2}	$2.67 \pm 0.58 \times 10^2$ ^{b,2}	$1.55 \pm 0.15 \times 10^3$ ^{a,12}
6		$1.67 \pm 1.15 \times 10^2$ ^{a,3}	$2.67 \pm 1.52 \times 10^2$ ^{a,2}	$1.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{a,2}	$2.00 \pm 0.00 \times 10^2$ ^{a,3}
9		$1.00 \pm 0.00 \times 10^2$ ^{a,3}	$2.33 \pm 1.15 \times 10^2$ ^{a,2}	$2.00 \pm 1.00 \times 10^2$ ^{a,2}	$2.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{a,3}
12		$1.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{b,3}	$2.00 \pm 0.00 \times 10^2$ ^{a,2}	< 10 ^{d,3}	$1.00 \pm 0.00 \times 10^2$ ^{c,3}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 14 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำดื่มที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดไบโม่รุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
หลังแช่แข็ง 15 นาที		< 10	< 10	< 10	< 10
1		< 10	< 10	< 10	< 10
3		< 10	< 10	< 10	< 10
6		< 10	< 10	< 10	< 10
9		< 10	< 10	< 10	< 10
12		< 10	< 10	< 10	< 10

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดไบโม่รุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
หลังแช่แข็ง 15 นาที		< 10	< 10	< 10	< 10
1		< 10	< 10	< 10	< 10
3		< 10	< 10	< 10	< 10
6		< 10	< 10	< 10	< 10
9		< 10	< 10	< 10	< 10
12		< 10	< 10	< 10	< 10

1.3.4 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่แช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

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

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae

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

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

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae

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

หมายเหตุ N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี													
	H ₂ S production	Indole production test	Methyl red test	Voges-Proskauer test	Citrate utilization test	Urease test	Motility	Malonate utilization test	Lysine decarboxyase test	Ornithine decarboxyase test	Gas form			
											Sucrose	Mannitol	Arabinose	Maltose
<i>Obesumbacterium proteus</i> biogroup 1	-	-	+	N	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Tatumella tyseos</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Xenorhabdus luminescens</i> / <i>X. nemtophilus</i>	-	N	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

2. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรที่มีต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวโดยใช้กล่องโฟม

2.1 การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กึ่งแช่บิวสำหรับการแช่แข็งแบบกล่องโฟม

เก็บรวบรวมพ่อพันธุ์กึ่งแช่บิวอายุประมาณ 6 เดือน จำนวน 80 ตัว จากบริเวณทะเลหาดบางแสนและทะเลเขาสามมุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี มีน้ำหนักเฉลี่ย 27.20 ± 0.67 กรัม มีความยาวจากปลายกรีนถึงปลาย Telson เท่ากับ 14.33 ± 1.22 เซนติเมตร จากนั้นดึงถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กึ่งแช่บิวทั้ง 2 ข้าง แล้วนำมาวางในจานเพาะเชื้อที่มี Ca-free saline ที่ปราศจากเชื้อและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส บนน้ำแข็ง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม

2.2.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่บิวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่บิวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่บิวก่อนเริ่มต้นการทดลองมีคุณภาพดีเยี่ยมเช่นเดียวกับถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวที่แช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ โดยมีค่าเท่ากับ $99.78 \pm 0.39\%$ ส่วนเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่บิวในชุดควบคุม ชุดเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% ชุดเติมสารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดเติมสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนการแช่แข็งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับถุงน้ำเชื้อสด โดยมีค่าเท่ากับ $99.61 \pm 0.68\%$, $99.64 \pm 0.03\%$, $99.56 \pm 0.51\%$ และ $99.59 \pm 0.36\%$ ตามลำดับ โดยตลอดการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่บิวเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 9

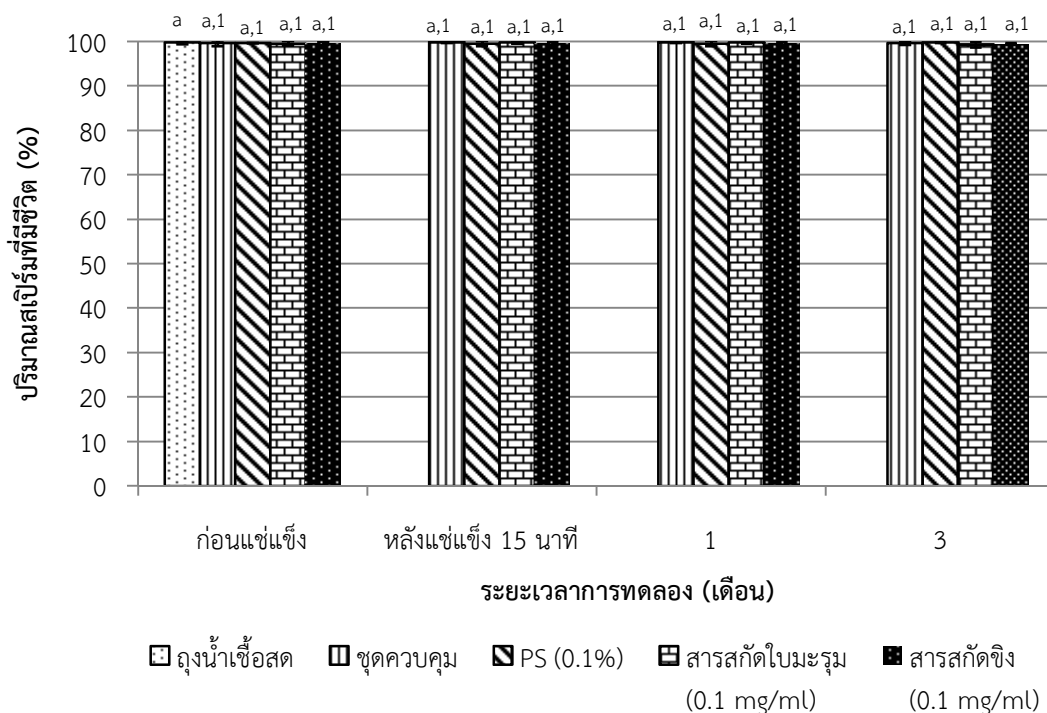
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดใบมะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดขิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	99.78 ± 0.39 ^a	99.61 ± 0.68 ^{a,1}	99.64 ± 0.03 ^{a,1}	99.56 ± 0.51 ^{a,1}	99.59 ± 0.36 ^{a,1}
หลังแช่แข็ง 15 นาที		99.89 ± 0.19 ^{a,1}	99.55 ± 0.53 ^{a,1}	99.78 ± 0.19 ^{a,1}	99.62 ± 0.41 ^{a,1}
1		99.89 ± 0.19 ^{a,1}	99.55 ± 0.53 ^{a,1}	99.77 ± 0.20 ^{a,1}	99.62 ± 0.41 ^{a,1}
3		99.65 ± 0.36 ^{a,1}	99.86 ± 0.24 ^{a,1}	99.30 ± 0.60 ^{a,1}	99.40 ± 0.21 ^{a,1}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 15 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแขบ้วยที่แช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
 ตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

2.2.2 การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำจากถุงน้ำเชื้อกึ่งแขบ้วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม

1) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

ถุงน้ำเชื้อสดของกึ่งแขบ้วยก่อนเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ $2.00 \pm 1.00 \times 10^3$ CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างกับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกึ่งแขบ้วยก่อนแช่แข็งในชุดควบคุม ชุดที่เติมสารสกัดไบโม่รวม ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดที่เติมสารสกัดชิง ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าเท่ากับ $2.00 \pm 0.20 \times 10^3$, $1.50 \pm 0.50 \times 10^3$ และ $1.50 \pm 0.50 \times 10^3$ CFU/g ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแขบ้วยในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลานาน 3 เดือน พบว่าชุดการทดลองที่เติมสารสกัดชิง ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ให้เหลือ $3.00 \pm 1.00 \times 10^2$ CFU/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับถุงน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 10

2) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio*

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 11

3) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยการแช่แข็งในกล่องโฟม พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 12

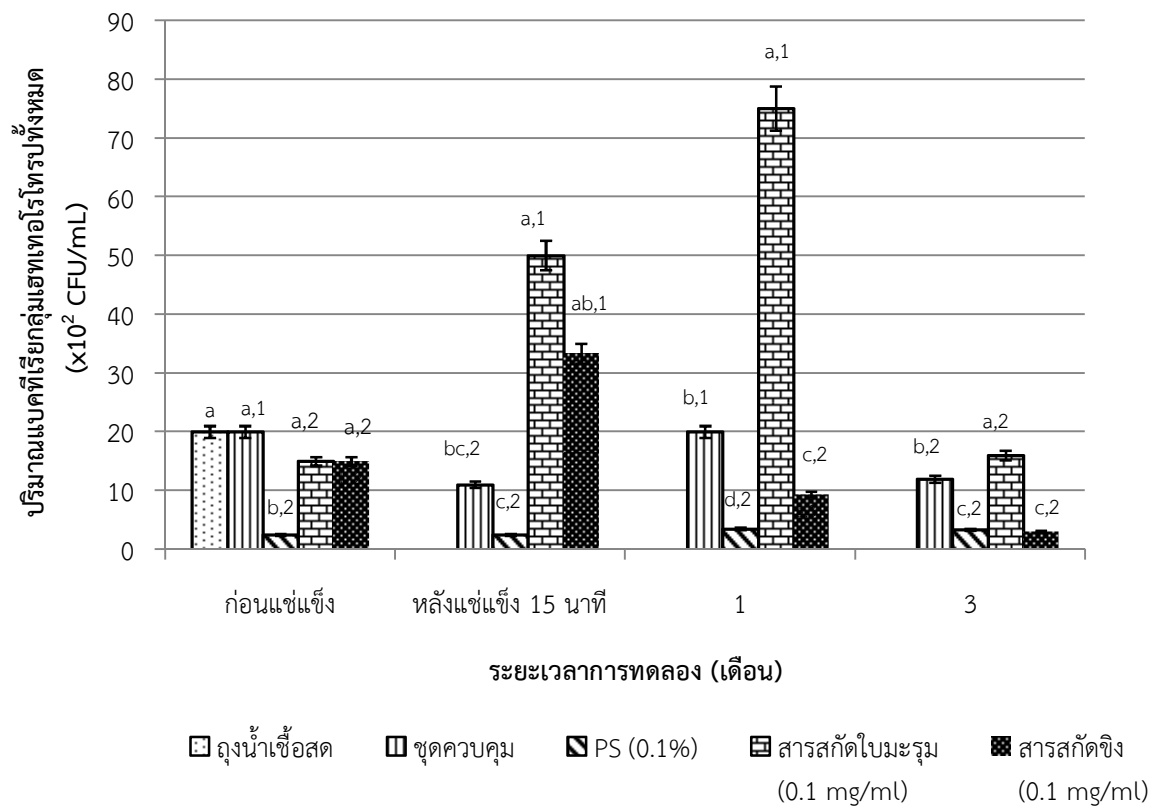
ตารางที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดไบอะรุม (0.1 mg/ml)	สารสกัดชิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	$2.00 \pm 1.00 \times 10^3$ ^a	$2.00 \pm 0.20 \times 10^3$ ^{a,1}	$2.50 \pm 1.50 \times 10^2$ ^{b,2}	$1.50 \pm 0.50 \times 10^3$ ^{a,2}	$1.50 \pm 0.50 \times 10^3$ ^{a,2}
หลังแช่แข็ง 15 นาที		$1.10 \pm 0.90 \times 10^3$ ^{bc,2}	$2.50 \pm 1.50 \times 10^2$ ^{c,2}	$5.00 \pm 2.00 \times 10^3$ ^{a,1}	$3.33 \pm 1.53 \times 10^3$ ^{ab,1}
1		$2.00 \pm 0.00 \times 10^3$ ^{b,1}	$3.50 \pm 0.50 \times 10^2$ ^{d,2}	$7.50 \pm 4.50 \times 10^3$ ^{a,1}	$9.33 \pm 0.31 \times 10^2$ ^{c,2}
3		$1.20 \pm 0.20 \times 10^3$ ^{b,2}	$3.33 \pm 1.53 \times 10^2$ ^{c,2}	$1.60 \pm 0.30 \times 10^3$ ^{a,2}	$3.00 \pm 1.00 \times 10^2$ ^{c,2}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 16 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กลองโพน

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาการทดลองแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrio</i> (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	Penicillin- streptomycin (0.1%)	สารสกัดไบโม่รวม (0.1 mg/ml)	สารสกัดชิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
หลังแช่แข็ง 15 นาที		< 10	< 10	< 10	< 10
1		< 10	< 10	< 10	< 10
3		< 10	< 10	< 10	< 10

ตารางที่ 12 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม

ระยะเวลาการทดลอง (เดือน)	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> (CFU/g)				
	ถุงน้ำเชื้อสด	ชุดควบคุม	0.1%Penicillin- streptomycin	สารสกัดไบโม่รวม (0.1 mg/ml)	สารสกัดชิง (0.1 mg/ml)
ก่อนแช่แข็ง	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
หลังแช่แข็ง 15 นาที		< 10	< 10	< 10	< 10
1		< 10	< 10	< 10	< 10
3		< 10	< 10	< 10	< 10

1.2.3 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถ้ำน้ำเค็มกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในถ้ำน้ำเค็มกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟม สามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 วงศ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก คือ Micrococcaceae ได้แก่ *Kocuria palustris*, *Micrococcus antarcticus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Staphylococcus epidermidis* / *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus fleurettii* และ *Staphylococcus hemolyticus* วงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus badius*, *Bacillus circulans*, *Bacillus fastidiosus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pasteurii* และ *Bacillus thuringiensis* และพบแบคทีเรียแกรมลบ คือ วงศ์ Pseudomonadaceae ได้แก่ Gilardi rod group 1 วงศ์ Alcaligenaceae ได้แก่ *Bordetella trematum*, วงศ์ Vibrionaceae ได้แก่ *Plesiomonas shigelloides* และวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Xenorhabdus luminescens*/*X. Nemptophilus* ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม

ชนิดแบคทีเรีย	ถุ้งน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม																	
วงศ์ Micrococcaceae																	
<i>Kocuria palustris</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓
<i>Micrococcus antarcticus</i>	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X
<i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Staphylococcus fleurettii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X
<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	X	X	✓	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน																	
วงศ์ Bacillaceae																	
<i>Bacillus alcalophilus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓
<i>Bacillus badius</i>	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	✓	X	✓
<i>Bacillus circulans</i>	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
<i>Bacillus fastidiosus</i>	X	X	✓	X	X	✓	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X	X

ตารางที่ 13 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในถุ่่งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	ถุ่่งน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน																	
วงศ์ Bacillaceae																	
<i>Bacillus firmus</i>	✓	X	X	X	X	✓	✓	X	✓	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓
<i>Bacillus insolitus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Bacillus pantothenicus</i>	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus megaterium</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	X	✓	X	X	✓
<i>Bacillus pasteurii</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	✓	X	✓	✓	✓
<i>Bacillus thuringiensis</i>	✓	✓	X	X	✓	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน																	
วงศ์ Pseudomonadaceae																	
Gilardi rod group 1	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ตารางที่ 13 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใช้กล่องโฟม (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	ถุ้งน้ำเชื้อสด	ก่อนแช่แข็ง				หลังแช่แข็ง 15 นาที				เดือนที่ 1				เดือนที่ 3			
		ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL	ชุดควบคุม	0.1% PS	ใบמרรุม 0.1 mg/mL	จิง 0.1 mg/mL
แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน																	
วงศ์ Alcaligenaceae																	
<i>Bordetella trematum</i>	X	X	X	✓	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
วงศ์ Vibrionaceae																	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	X	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
วงศ์ Enterobacteriaceae																	
<i>Xenorhabdus luminescens</i> / <i>Xenorhabdus nemtophilus</i>	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

หมายเหตุ ✓ = พบ
x = ไม่พบ

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม วงศ์ Micrococcaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี																							
	Catalase	Coagulase	Oxidase	Nitrate	Motility	Urease	Arginine dihydrolase	Ornithine	Polymyxin B	Novobiocin	Esculin Hydrolysis	Starch Hydrolysis	Gelatin Hydrolysis	Acid from										
														Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Mannitol	Mannose	Arabinose	Trehalose	Xylose	Raffinose	Cellobiose
<i>Kocuria palustris</i>	+	N	-	+	-	+	-	N	N	N	-	-	-	+	-	+	-	-	-	N	-	N	N	
<i>Micrococcus antarcticus</i>	+	N	+	+	-	-	-	N	N	N	-	+	-	-	N	N	-	-	-	+	-	-	-	N
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	R	S	N	N	N	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>S. lugdunensis</i>	+	-	-	+	-	+	N	N	R	S	N	N	N	+	+	+	+	-	+	-	N	-	-	-
<i>Staphylococcus fleurettii</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	N	R	N	N	N	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	S	S	N	N	N	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

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

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน วงศ์ Bacillaceae

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

N หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Pseudomonadaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี									
	Oxidase	Motile	Urease	Nitrate	Indole	Esculin hydrolysis	Gelatin hydrolysis	Growth on MacConkey agar	OF Mannitol	OF Dextrose
Gilardi rod group 1	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Alcaligenaceae

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

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Vibrionaceae

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

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน วงศ์ Enterobacteriaceae

ชนิดของแบคทีเรีย	การทดสอบทางชีวเคมี													
	H ₂ S	Indole	MR	VP	Citrate	Urease	Motility	Malonate utilization	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Gas form			
											Sucrose	Mannitol	Arabinose	Maltose
<i>Xenorhabdus luminescens/X. nemtophilus</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. การประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรในการเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีศักยภาพเหมาะสมในการเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วย เนื่องจากสามารถรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแช่บ๊วยให้มีคุณภาพดีเยี่ยมตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยมีคุณภาพไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่าการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี

2. การเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่แข็งโดยการใช้กล่องโฟมร่วมกับการประยุกต์ใช้สารสกัดใบมะรุมและสารสกัดขิง พบว่าสารสกัดใบมะรุมและสารสกัดขิงมีประสิทธิภาพในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแช่บ๊วยได้ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% ตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อประเมินถึงประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรียพบว่า สารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดได้เทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 0.1% และสูงกว่าสารสกัดใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

อภิปรายผลการทดลอง

1. การเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ

การศึกษาในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแช่บ๊วยแบบใช้เครื่องมืออัตโนมัติเป็นระยะเวลานานถึง 1 ปี โดยสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างดีเยี่ยม (เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 95%) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเก็บรักษาตั้งแต่การเตรียมถ้ำน้ำเชื้อ สารละลายบัฟเฟอร์ อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายถ้ำน้ำเชื้อ มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานทางวิชาการหลายฉบับที่รายงานถึงความสำเร็จในการเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ยกตัวอย่างเช่น Akarasanon et al. (2004) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man)) ด้วยการเก็บรักษาแบบแช่แข็งนานกว่า 150 วัน Bart et al. (2006) ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมถ้ำน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยมีการปฏิสนธิสูงถึง 79% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม กุ้งทะเล และปูทะเล ในไนโตรเจนเหลวประสบความสำเร็จหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 30 – 31 วัน (Anchordoguy et al., 1988; Chow et al., 1985; Jeyalectumie and Subramoniam, 1989)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาถั่วเขียวแช่แข็งแบบใช้เครื่องมืออัตโนมัติ สารสกัดใบมะรุุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดขิงความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเก็บรักษาถั่วเขียวแช่แข็ง โดยสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรบทั้งหมดได้ดีกว่าสารสกัดขิงในถั่วเขียวแช่แข็งที่ลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษหรือมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยมาก ตามปกติแล้วกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อและถั่วเขียวเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการลดอุณหภูมิ การสูญเสียน้ำของเซลล์ การแช่แข็งและการละลาย (Tiersch, 2006; Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) กระบวนการเหล่านี้ล้วนส่งผลให้เซลล์สเปิร์มได้รับบาดเจ็บและตายได้

ดังนั้นการเติมสารสกัดใบมะรุุมอาจมีบทบาทในการป้องกันอันตรายที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งถั่วเขียวแช่แข็ง โดย Verma et al. (2009) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดใบมะรุุม ได้แก่ Gallic acid, Chlorogenic acid, Ellagic acid และ Ferulic acid และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Kaempferol, Quercetin และ Rutin มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอของหนูทดลอง โดยช่วยป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อและการตายของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระที่ได้จากการสลายตัวของออกซิเจน (Halliwell and Gutteridge, 2003) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เหล่านี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ในหนูขาวใหญ่ (Sprague-Dawley rats) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ในสมองหนูขาวชนิดนี้ (Matis et al., 1988) รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ยังป้องกันการเกิดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Bakkali et al., 2008)

ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารสกัดใบมะรุุมในการเก็บรักษาถั่วเขียวแช่แข็งจึงมีความเหมาะสมทั้งในด้านประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและการลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียม การเพาะพันธุ์ถั่วเขียวในเชิงอนุรักษ์สายพันธุ์และเชิงพาณิชย์ รวมทั้งการใช้ในการบริหารการจัดการฟาร์ม นอกจากนี้การประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรชนิดนี้ยังเป็นการนำองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นสู่การสร้างนวัตกรรมเพื่อทดแทนและ/หรือลดการใช้สารปฏิชีวนะที่นำเข้าจากต่างประเทศ และเป็นการลดการใช้สารปฏิชีวนะที่สามารถตกค้างในธรรมชาติและสร้างผลกระทบต่อระบบนิเวศน์และห่วงโซ่อาหารที่ย้อนกลับมาส่งผลกระทบต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของคนไทย

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

Nimrat et al. (2008) ได้รายงานถึงแบคทีเรียที่พบในถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง ประกอบด้วยแบคทีเรีย 23 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus nonaureus*, *Micrococcus* spp., *Kocuria varians*, *Corynebacterium* spp., *C. aquaticum*, *Rhodococcus* spp., *Bacillus cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. megaterium* และ *B. licheniformis* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia fergusonii*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Enterobacter* spp., *Vibrio* spp., *Brevibacterium* spp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas* spp., *Ps. aeruginosa* และ *Burkholderia cepacia*

นอกจากนั้น Oxley et al. (2002) ได้รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* และ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มักพบในลำไส้กุ้ง ส่วน Jeyasekaran et al. (2006) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียพบในกุ้งขาวอินเดียสด (Fresh raw shrimp) ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* และ *Serratia* แบคทีเรียทุกชนิดที่พบในถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งในการศึกษาในครั้งนี้จัดเป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรคในมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรค ได้แก่ *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *B. brevis* และ *T. ptyseos* โดย *S. cohnii* subsp. *cohnii* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปบนผิวหนังและเยื่อของมนุษย์ แต่ในบางสภาวะแบคทีเรียชนิดนี้สามารถฉวยโอกาสในการก่อโรค (Stefano et al., 2012) มีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฝีในสมอง (Brain abscess) ปอดบวม (Pneumonia) โรคถุงน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน (Acute cholecystitis) เยื่อหัวใจอักเสบ (Endocarditis) การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (Bacteremia) การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) และโรคข้ออักเสบติดเชื้อ (Septic arthritis) (Soldera et al., 2013)

แบคทีเรียอีกชนิดที่สามารถฉวยโอกาสก่อโรค คือ *B. brevis* แบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างรุนแรงในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Immunocompromised host) ผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (Intravenous drug users) ผู้ป่วยที่ได้รับการศัลยกรรมประสาท (Neurosurgery) การรักษาเกี่ยวกับกระดูกและข้อ (Orthopedics procedure) บาดแผลไฟไหม้ (Burn victims) ผู้ป่วยที่ได้รับการฟอกไต (Dialysis patients) และผู้ป่วยที่มีแผลบาดเจ็บ เป็นต้น โดยมีรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเซลล์ตับชนิด Hepatocellular carcinoma ที่เกิดภาวะเยื่อช่องท้องอักเสบ (Peritonitis) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของ *B. brevis* (Parvez et al., 2009) และแบคทีเรียชนิดสุดท้าย คือ *T. ptyseos* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดที่ฉวยโอกาสก่อโรคในมนุษย์ ในปัจจุบันข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มากนัก แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Tracheobronchial/pulmonary infections) เช่น ปอดบวม (Pneumonitis) โรคหอบหืด (Asthma) โรคหลอดเลือดอักเสบที่เกิดร่วมกับมีก้อนเนื้อ (Wegener granulomatosis) โรคปอดอักเสบเรื้อรัง (Chronic lung disease) และภาวะปอดบวม น้ำ (Pulmonary edema) (Hollis et al., 1981; Farmer et al., 1985; Stone et al., 2007) การติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับวัณโรคปอด (Pulmonary tuberculosis) (Berka et al., 2001) และการติดเชื้อ

ในระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) (Janda and Abbot, 2006) นอกจากนั้นข้อมูลทางคลินิกยังระบุถึงการคัดแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายในประเทศบราซิล ที่เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *T. typhosus* ทั้ง 2 ราย (da Costa et al., 2008)

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

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

2. การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแบบแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟมร่วมกับการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรมะรุมและขิง

การศึกษาวิจัยถึงกระบวนการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งโดยใช้อุปกรณ์อย่างง่ายนั้นคือการใช้กล่องโฟมและไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ซึ่งยังมีการศึกษาน้อยมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ โดยส่วนใหญ่เน้นเป็นการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Anchordoguy et al. 1987, 1988; Diwan et al., 1994; Chow et al. 1985) ยกตัวอย่างเช่น Leena Grace and Natarajan (2003) สามารถเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งกูด้า (*Penaeus monodon*) ในไนโตรเจนเหลวได้นานกว่า 30 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 90% ในขณะที่ Diwan and Joseph (1999) พบว่าการใช้สารไตรโพรเทคแทนท์ร่วมกันสองชนิดคือ DMSO (5%) ร่วมกับ Glycerol (5%) และ DMSO (5%) ร่วมกับน้ำตาล Trehalose (0.25 M) สามารถเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งชาวอินเดีย (*Penaeus indicus*) ได้นานกว่า 60 วัน โดยเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 75-80% นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าการศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งกูด้ากึ่งทะเลและปูทะเลในไนโตรเจนเหลวประสบความสำเร็จหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 30-31 วัน (Anchordoguy et al., 1988; Chow et al., 1985; Jeyalectumie and Subramoniam, 1989)

ส่วนการแช่แข็งกุ้งน้ำเชื้อกุ้งโดยใช้อุปกรณ์แช่แข็งอย่างง่ายนั้นมีเพียง Akarasanon et al. (2004) ที่ศึกษาการเก็บรักษากุ้งน้ำเชื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* (de Man)) ในหลอด Vial และลดอุณหภูมิการแช่แข็งด้วยการใช้ภาชนะอย่างง่าย ก่อนใส่หลอด Vial ที่บรรจุกุ้งน้ำเชื้อกุ้งก้ามกรามลงในไนโตรเจนเหลว โดยประสบความสำเร็จในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อกุ้งก้ามกรามได้นานกว่า 150 วัน โดยใช้สาร Ethylene Glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ดังนั้นจากการทบทวนวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่าการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นการศึกษาครั้งแรกที่สามารถแช่แข็งกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งโดยใช้อุปกรณ์อย่างง่าย นั่นคือกล่องโฟม โดยสามารถเก็บรักษาได้อย่างน้อย 3 เดือน โดยยังคงคุณสมบัติที่ดีเยี่ยมของน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งในการนำไปใช้ในการผสมเทียม ได้แก่ การรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 99% โดยมีแนวโน้มว่าสามารถเก็บรักษาได้นานเทียบเท่าการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้เครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ ซึ่งการเก็บรักษากุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็งโดยการใช้กล่องโฟมนี้ จะต้องทำการศึกษาต่อเนื่องให้ครบ 1 ปี เพื่อให้ทราบถึงผลของการเก็บรักษากุ้งน้ำเชื้อในระยะยาว ซึ่งคณะผู้วิจัยจะดำเนินการทดลองในโครงการวิจัยปีต่อไป (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561)

การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้กล่องโฟม ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาถูกมาก เมื่อเทียบกับเครื่องมือลดอุณหภูมิที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศและมีราคาที่แพงมาก กลับมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันในการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็ง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีอย่างง่าย ราคาถูก สู่ภาคการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การบริหารจัดการฟาร์ม และการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ ทำให้เกษตรกรเข้าถึงเทคโนโลยีได้ง่ายขึ้นและลดการพึ่งพาเทคโนโลยีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในกล่องโฟม พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบในกุ้งน้ำเชื้อมีความหลากหลายกว่าแบคทีเรียที่พบในกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในเครื่องอัตโนมัติ โดยสามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 วงศ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก คือ Micrococccaceae ได้แก่ *Kocuria palustris*, *Micrococcus antarcticus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *S. epidermidis* / *S. lugdunensis*, *S. fleurettii* และ *S. haemoliticus* วงศ์ Bacillaceae ได้แก่ *Bacillus alcalophilus*, *B. badius*, *B. circulans*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. pantothenicus*, *B. megaterium*, *B. pasteurii* และ *B. thuringiensis* และพบแบคทีเรียแกรมลบ คือ วงศ์ Pseudomonadaceae ได้แก่ Gilardi rod group 1 วงศ์ Alcaligenaceae ได้แก่ *Bordetella trematum*, วงศ์ Vibrionaceae ได้แก่ *Plesiomonas shigelloides* และวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Xenorhabdus luminescens*/X. *Nemtophilus* สอดคล้องกับการศึกษาของ Nimrat et al. (2006) ที่รายงานว่าแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบได้มากในกุ้งน้ำเชื้อกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น โดยแบคทีเรียที่พบในการศึกษาดังกล่าวประกอบด้วย *Bacillus circulans*, *Staphylococcus hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp.

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีบางชนิดที่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรค แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญ คือ *S. aureus* subsp. *aureus* แบคทีเรียชนิดนี้ก่อโรคหลายชนิดในมนุษย์ อาทิ ก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุก ๆ บริเวณของร่างกาย

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

ส่วนแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคที่พบในการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ *S. haemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคที่รู้จักอย่างกว้างขวางและเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่เกิดจากอุปกรณ์ที่ใช้สวนทางการแพทย์ (Medical catheter) (Daniel et al., 2014) *S. haemolyticus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษกลุ่ม Enterotoxins และ Hemolysins ได้แก่ สาร Enterotoxins กลุ่ม SE(A), SE(B) และ SE(C) สารพิษกลุ่มนี้จัดเป็นสารกลุ่ม Exoproteins ที่ก่อให้เกิดการอักเสบของระบบทางเดินอาหารอย่างรุนแรงและอาเจียน หากได้รับสารชนิดนี้จากการรับประทาน (Valle et al., 1990) *Bordetella trematum* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบในการศึกษาในครั้งนี้อย่างจัดเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรค โดยมีรายงานการพบแบคทีเรียชนิดนี้จากแผลติดเชื้อ หูอักเสบ แผลจากโรคเบาหวานและการติดเชื้อในกระแสเลือด (Vandamme et al., 1996; Daxboeck et al., 2004; Halim et al., 2014)

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กำจัด รื่นเรืองดี และวิไลวรรณ สอนประสม. (2551). *การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย (Penaeus merguensis, de Man) ด้วยระบบปิดหมุนเวียน*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (หน้า 369-376). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลิมสุวรรณ และนิติ ชูเชิด. (2550). *การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อ Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) ในประเทศไทย*. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (หน้า 574-581). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. (2543). *กุ้งไทย 2000*. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์.
- ถนอมจิตร สิริภคพร, บุญใจ แก้วน้อย และจุฬารัตน์ โฆชะโก. (2556). *ความสามารถในการแข่งขันของกุ้งไทยในตลาดโลก*. ใน สัมมนาวิชาการเศรษฐกิจภาคใต้ปี 2556 วันที่ 13 ธันวาคม 2556 ธนาคารแห่งประเทศไทย วันที่ค้นข้อมูล 20 สิงหาคม 2557, เข้าถึงได้จาก [http://www.bot.or.th/Thai/EconomicConditions/Thai/South/DocLib/the_study_of_Shrimp_Industry\(Publish\).pdf](http://www.bot.or.th/Thai/EconomicConditions/Thai/South/DocLib/the_study_of_Shrimp_Industry(Publish).pdf)
- ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์. (2551). *โรคที่สำคัญในกุ้งทะเล*. วันที่ค้นข้อมูล 15 พฤษภาคม 2557, เข้าถึงได้จาก http://niah.dld.go.th/th/AnimalDisease/aquatic_ShrimpDis.htm
- ธิดาพร ฉวีภักดิ์, ลีลา เรืองแป้น และวริษฐา หนูปิ่น. (2549). *การผลิตและแบคทีเรีย Vibrio spp. ในแม่กุ้งแชบ๊วยจากแหล่งธรรมชาติภาคตะวันออก*. วันที่ค้นข้อมูล 24 กุมภาพันธ์ 2551, เข้าได้ถึงจาก <http://www.fisheries.go.th/cf-chan/Paper/seminar/seminar-dof-49/di053.pdf>
- ประจวบ หล้าอุบล. (2530). *กุ้ง Natantia*. กรุงเทพฯ: นลิน.
- สุบัตินิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553). *การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีการแช่เย็น*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เสนอต่อ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- สุบัตินิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2555). *การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อนำมาทำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในกุ้งแชบ๊วย*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- สุบัตินิต นิมรัตน์, ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2557ก). *Effect of antibiotics on sperm viability and gram negative bacterial counts in chilled storage for Banana Prawn (Penaeus merguensis) spermatophore*. ในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 7 การประชุมสัมมนาทางวิชาการ

ระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 4 และการประชุมวิชาการราชชนครินทร์ วิชาการและวิจัย ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท จ.ชลบุรี วันที่ 14-16 พฤษภาคม 2557.

สุบัณฑิต นิมรัตน์, ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2557ข). *Effect of antibiotics on sperm viability and Pseudomonas counts in chilled storage for Banana Prawn (Penaeus merguensis) spermatophore*. ในการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 7 การประชุมสัมมนาทางวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 4 และการประชุมวิชาการราชชนครินทร์วิชาการและวิจัย ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท จ.ชลบุรี วันที่ 14-16 พฤษภาคม 2557.

สุบัณฑิต นิมรัตน์, อจิราภา สัจจรดี และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2554). ผลของสารสกัดพริกขี้หนู (*Capsicum annuum* Linn.) และสารปฏิชีวนะต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาตุ๊กอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนครสวรรค์*, 8(1): 57-71.

สุบัณฑิต นิมรัตน์. (2551). *การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน: วงศ์วิบริโอนาสีอี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิมรัตน์. (2555). *การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม : วงศ์ไมโครคอคเคซีอี และสเตรปโตคอคเคซีอี*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพจน์ จิงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. (2547). *เปรียบเทียบผลผลิตจากการเก็บไร่น้ำกร่อย 5 วิธี*. นครศรีธรรมราช: ศูนย์พัฒนาประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ.

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

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

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

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

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

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

- Anderson, I.G., Shamsudin, M.N. and Shariff, M. (1988). Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fis. Sci.*, 2: 93-108.
- Australian Government Department of Agriculture Fisheries and Forestry. (2008). *Diseases of crustaceans bacterial diseases – Necrotising hepatopancreatitis*. In Aquatic animal diseases significant to Australia: Identification Field Guide. (pp. 1-4) Australia: Fisheries and Forestry.
- Australian Government Department of Agriculture Fisheries and Forestry. (2012). *Necrotising hepatopancreatitis (NHP) (Also known as infection with necrotizing hepatobacterium or NHP bacterium)*, In Aquatic animal diseases significant to Australia: Identification Field Guide. (pp. 254-261) Australia: Fisheries and Forestry.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. and Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252: 79-84.
- Bart, A.N., Choosuk, S. and Thakur, D.P. (2006). Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquacult Res.*, 37: 523–528.
- Baumann, P. and Schubert, R.H.W. (1984). *Family II. Vibrionaceae Veron 1965*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 516-517. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Berka, M., Uzun, K., Bozkurt, H., Kurtoglu, M.G., Guducuoglu, H. and Aydin, S. (2001). Pulmonary infection of *Tatumella ptyseos* developed on the background of pulmonary tuberculosis. *Eastern Journal of Medicine*, 6(1): 33-34.
- Boonyaratpalin, M. (1998). Nutrition of *Penaeus merguensis* and *Penaeus idicus*. *Reviews in Fisheries Science*, 9: 69-78.
- Brock, J.A. and Lightner, D.V. (1990). *Chapter 3: Diseases of Crustacea*. In: O. Kinne (ed.) Diseases of Marine Animals Vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.
- Caceres, A., Cabrera, O., Morales, O., Mollinedo, P. and Mendia, M. (1991). Pharmacological properties of *Moringa oleifera* 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 33: 213-216.
- Chen, D. (1992). *An overview of the disease situation, diagnostic techniques, treatments and preventatives used on shrimp farms in China*. In: W. Fuls and

- K.L. Main (eds.) Diseases of Cultured Penaeid Shrimps in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Hawaii. pp. 47-55.
- Chen, F.R., Liu, P.C. and Lee, K.K. (2000). Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. *Zool Naturforsch*, 55: 94-99.
- Chow, S., Taki, Y. and Ogasawara, Y. (1985). Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol Bull.*, 168: 471-475.
- Chuang, P.H., Lee, C.W., Chou, J.Y. and Murugan, M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology*, 98: 232-236.
- da Costa, P.S.G., de Castro Mendes, J.M. and Ribeiro, G.M. (2008). *Tatumella ptyseos* causing severe human infection: report of the first two Brazilian cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(5): 442-443.
- Daniel, B., Saleem, S., Naseer, G. and Fida, A. (2014). Significance of *Staphylococcus haemolyticus* in hospital acquired infections. *J Pioneer Med Sci.*, 4(3): 119-125.
- Daxboeck, F., Goerzer, E., Apfalter, P., Nehr, M. and Krause, R. (2004). Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet Med.*, 21: 1247-1248.
- Ding, S., Gea, J., Hao, C., Zhanga, M., Yan, M., Xu, Z., Pan, J., Chen, S., Tian, Y., and Huang, Y. (2009). Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Animal Reproduction Science*, 113: 229-235.
- Diwan A.D. and Joseph, S. (1999). Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. *Milne Edwards Indian J. Fish.*, 46(2): 159-166.
- Diwan A.D., Joseph, S and Nandakumar, A. (1994). Cryobanking potentials of marine shrimp gametes. *Mar. Fish. Infor. Serv. T & E Ser.*, 131: 35-37.
- Edwards, H.M. (1837). *Synopsis of biological data on the penaeid prawn*. Retrieved May 15, 2014, from <http://www.fao.org/docrep/005/ac765t/ac765t10.htm>.
- Falcon, R., Carbonell, G., Figueredo, P., Butiao, F., Saridakis, H., Pelayo, J. and Yano, T. (2003). Intracellular vacuolation induced by culture filtrates of *Plesiomonas shigelloides* isolated from environmental sources. *J. App. Microbiol.*, 95: 273-278.
- Farmer III, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G.P., Asbury, M.A., Riddle, C., Wathen-Grady, H.G., Elias, C. and Fanning, G.R. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.*, 21: 46-76.
- Frelier, P.F., Loy J.K. and Kruppenbach, B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, 61: 44-48.

- Fribourgh, J.H. (1966). The application of the differential staining method to low temperature studies on goldfish spermatozoa. *Progressive Fish-culturist*, 28: 227-230.
- Gardner, S., Fowlston, S. and George, W. (1987). *In vitro* production of cholera toxin-like activity by *Plesiomonas shigelloides*. *J. Infect. Dis.*, 156: 720–722.
- Gnanamani, A., Shanmuga Priya, K., Radhakrishnan, N. and Babu, M. (2003). Antibacterial activity of two plant extracts on eight burn pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 59-61.
- Guzman, G.A., Martinez, J.G.S., Castaneda, R.P., Monzon, A.P., Rodriguez T.T. and Hernandez, D.L.C. (2010). Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the world aquaculture society*, 41(3): 464-470.
- Halim, I., Ihibbane, F., Belabbes, H., Zerouali, K. and Mdaghri, N.E. (2014). Isolation of *Bordetella trematum* from bacteremia. *Ann Biol Clin (Paris)*, 72: 612– 614.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2003). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford; University press.
- Holcomb, M., Cloud, J.G. and Ingermann, R.L. (2005). Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquaculture Research*, 36: 1555-1561.
- Hollis, D.G., Hickman, F.W., Fanning, G.R. Farmer III, J.J., Weaver, R.E. and Brenner, D.J. (1981). *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., a member of the family Enterobacteriaceae found in clinical specimens. *J Clin Microbiol.*, 14: 79-88.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins.
http://www.m_e_hassanin.staff.zu.edu.eg/m.e.hassanin/page.asp?id=54
- Huber, I., Spanggard, B., Appel, K., Rossen, L. Nielson, T. and Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.*, 96: 117–132.
- Hwang, J.K., Chung, J.Y., Baek, N.I. and Park, J.H. (2004). Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23: 377-381.
- Ishimaru, K., Akarawa-Matsushita, M. and Muroga, K. (1995). *Vibrio penaeicida* sp., nov., a pathogen of kuruma shrimps (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 8-19.

- Janda, J.M. and Abbot, S.L. (2006). *Uncommon enterobacterial genera associated with clinical specimens*. In: The enterobacteria. ASM press
- Jenkins, J.A. and Tiersch, T.R. (1997). A Preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28(3): 282-288.
- Jeyalectumie, C. and Subramoniam, T. (1989). Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biol Bull*, 177: 247-253.
- Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Jeya Shakila, R. and Sukumar, D. (2006). Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. *Food microbiology*, 23: 526-533.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Leaño, E.M. and Paner, M.G. (1996). *Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, Penaeus monodon, associated with dominance of luminescent bacteria, Vibrio harveyi in the rearing environment*. SICCPPS book of abstracts, SEAFDEC, Iloilo City, Philippines. p.40
- Lavilla-Pitogo, C.R, Leaño, E.M and Paner M.G. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164(1-4): 337-349.
- Leena Grace, B. and Natarajan P. (2003). Cryopreservation of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) spermatozoa. *Indian J. Fish.*, 50(3): 415-419.
- Levin, R.E. (2008). *Plesiomonas shigelloides* - An aquatic food borne pathogen: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology, and molecular detection. *Food Biotechnology*, 22: 189-202.
- Lewis, D.H. (1973). Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. *Proc. Wld. Maricult. Soc.* 4: 333-338.
- Lightner, D.V. (1996). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Lightner, D.V. and Lewis, D.H. (1975). A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, 37(5-6): 25-28.
- Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M., Mohney, L.L., Natividad, J.M., Rukyani, A. and Poernomo, A. (1992). *A review of some major diseases of economic significance in penaeid shrimps/shrimps of the Americas and Indo-Pacific*. In: M. Shariff, R. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Proceedings 1st Symposium on

- Diseases in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 57-80.
- Mathews, B., Douglas, H. and Guiney, D. (1988). Production of a heat stable enterotoxin by *Plesiomonas shigelloides*. *Microb. Pathogen.*, 5: 207–213.
- Matis, E.Y., Kurakolova, E.A., Burkova, V.N. and Vengerovskii, A.I. (1988). Hydrocarbons and carotenoids of the medicinal mud of Lake Karachi. *Chemistry of Natural Compounds*, 24: 1573-8388.
- Miller, M. and Koburger, J. (1985). *Plesiomonas shigelloides*: an opportunistic food and water borne pathogen. *J. Food Protect.* 48: 449–457.
- Monteil, H. and Harf-Monteil, H. (1997). *Plesiomonas shigelloides*: une bacterie exotique. *La Lettre de l'infectiologue de la Microbiologie à la Clinique.*, 7: 255–262.
- Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P. and Ruamthaveesub, P. (1992). *Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand*. In: M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Authur (eds.) Diseases in Asian Aquaculture 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 143-155.
- Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. (2008). *Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review*, in: Schwartz, S.H. (Ed.), Aquaculture Research Trends. Nova Science Publishers, New York, pp. 149-184.
- Nimrat, S., Bart, A.N, Keatsaksit, A. and Vuthiphandchai, V. (2008a). Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture*, 274: 247–253.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Maleweach, P. and Vuthiphandchai, V. (2008b). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, 285: 123-129.
- Nimrat, S., Sangnawakij, T. and Vuthiphandchai, V. (2005). Preservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores by chilled storage. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36: 76-86.
- Nimrat, S., Siriboonlamom, S., Zhang S., Xu, Y. and Vuthiphandchai, V. (2006). Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. *Aquaculture*, 261: 944–951.

- Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 214-233.
- Parvez, N., Cornelius, L.K. and Fader, R. (2009). Case report: *Brevibacillus brevis* Peritonitis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 337: 297-299.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T. and Bennett, B.C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118: 418-428.
- Rahman, M.M., Sheikh, M.M.I., Sharmin, S.A., Islam, M.S., Rahman, M.A., Rahman, M. M. and Alam, M.F. (2006). Antibacterial activity of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some human pathogenic bacteria. *Journal of Natural Science*, 8: 219-227.
- Saad, A., Billard, R. and Theron, M.G. (1988). Short-term storage of milt from common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 71: 133-150.
- Schubert, R. (1984). *Genus IV. Plesiomonas Habs and Schubert. (1962)*. In: Kreig, N., Holt, I., eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol I. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co., pp. 548-550.
- Singapore Prawn Files: The Sand Prawns - Sua Lor, Greasyback, Jinga, Middle, Western King, Red Spot King Prawns. Retrieved May 15, 2014, from <http://ieatishootipost.sg/2013/12/singapore-prawn-files-sand-prawns-sua.html>.
- Sivaram, V., Babu, M.M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. and Marian, M.P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237: 9-20.
- Sizemore, R.K. and Davis, J.W. (1985) Source of *Vibrio* spp. found in the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J Invertebr Pathol*, 46: 109-110.
- Soldera, J., Nedel, W.L., Cardoso, P.R. and d'Azevedo, P.A. (2013). Bacteremia due to *V. urealyticus* caused by infected pressure ulcer: case report and review of the literature. *Sao Paulo Med J.*, 131: 59-61.
- Stefano, M., Del Rosso, A., Saldutto, P., Paradiso Galatioto, G. and Vicentini, C. (2012). Intrascrotal Abscess, *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus cohnii* ssp. *cohnii*: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Urology*, 1-4.
- Stone, N.D., O'Hara, C.M., Willians, P.P., McGowan, J.E. and Tenover, F.C. (2007). Comparison of disk diffusion, VITEK 2, and broth microdilution antimicrobial

- susceptibility results for unusual species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.*, 45: 340-346.
- Stoss, J. and Refstie, T. (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30: 229-236.
- Tiersch, T.R. (2006). Fish sperm cryopreservation for genetic improvement and cryopreservation in Southeast Asia. *Fish for the People*, 4: 21-33.
- Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A. and Vadillo, S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl Environ Microbiol.*, 56(5): 1323-1326.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K. and Hinz, K.H. (1996). *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* R ger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.*, 46: 849 – 858.
- Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S. and Rao, C.V. (2009). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2196-2201.
- Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. (1999). Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 65-72.
- Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N. (2007). Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology*, 68: 1192-1199.
- Yano, Y., Satomi, M., and Oikawa, H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 6-11.
- Zacharia, S. and Kakati, V.S. (2002). Growth and survival of *Penaeus merguensis* postlarvae at different salinities. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 54(4): 157-162.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

สุบัณฑิต นิर्मรัตน์, ตีร์รัตน์ สุขสวัสดิ์, ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2560). ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเก็บรักษาและการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮลิโคแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง. การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 9 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วันที่ 25-26 พฤษภาคม พ.ศ. 2560

2. การจดสิทธิบัตร

-

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

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-