NU Science Journal 2011; 8(1): 57- 71

# ผลของสารสกัดพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* Linn.) และสารปฏิชีวนะต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1*] อจิราภา สัญจรดี[2] และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]

# Effect of *Capsicum annuum* Linn. extract and antibiotics on sperm motility rate and total heterotrophic bacteria in African catfish (*Clarias gariepinus*) cryopreservated milt

Subuntith Nimrat[1*], Ajirapha Sunjondee[2] and Verapong Vuthiphandchai[3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

* Corresponding author. E-mail: subunti@buu.ac.th

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาถึงผลของสารสกัดพริกชี้ฟ้าและสารปฏิชีวนะต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ปริมาณและชนิด ของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน ที่เก็บแบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 90 วัน ผลการวิจัยพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนการแช่แข็งอยู่ในช่วง 75.6-80.0% และหลังการ แช่แข็งพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงในทุกชุดการทดลอง ส่วนประสิทธิภาพของสารสกัดพริกชี้ฟ้าต่อปริมาณ และชนิดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมยา ปฏิชีวนะและชุดควบคุม พบว่าปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุด การทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะมีการลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้า และชุดควบคุม อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า สารสกัดพริกชี้ฟ้าที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีประสิทธิภาพในการช่วยลดทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกา เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่แข็งได้ดีกว่าชุดควบคุม ดังนั้นในการศึกษาต่อเนื่องจะทำการศึกษาถึงกระบวนการสกัดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพริกชี้ฟ้าเพื่อ

เพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่มีคุณภาพที่ดีและทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะต่อไป

*คำสำคัญ*: การแช่แข็ง, ปลาดุกอัฟริกัน, การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม, สารสกัดพริกชี้ฟ้า, สารปฏิชีวนะ, แบคทีเรียกลุ่ม เฮทเทอโรโทรปทั้งหมด

**Abstract**

In this study, the effect of *Capsicum annuum* Linn. extracts and antibiotics on sperm motility rate and, quantitative and type of total heterotrophic bacteria isolated from cryopreservated milt of African catfish (*Clarias gariepinus*) in liquid nitrogen at -196 °C for 90 days of the experiment was investigated. Results showed that sperm motility rate before cryopreservation was 75.6-80.0%. After cryopreservation the sperm motility rate lowered in all experiments. The effect of *Capsicum annuum* Linn. extracts on quantitative and types of total heterotrophic bacteria, compared with treatment with antibiotics and the control, demonstrated that the loads and types of total heterotrophic bacteria in the treatment with antibiotics decreased the highest, compared to the others. However, *Capsicum annuum* Linn. extracts in this study presented the better efficacy in reduction of numbers and types of contaminated bacteria in cryopreservated milt of African catfish (*Clarias gariepinus*) than its in the control. As a consequence, the appropriate extract process and concentration of *Capsicum annuum* Linn. in order to increase the efficacy for cryopreservated milt of African catfish (*Clarias gariepinus*) and replace the usage of antibiotic will be studied in the further experiment.

*Keywords*: Cryopreservation, African catfish, Sperm motility rate, *Capsicum annuum* Linn. extracts, Antibiotics, Total heterotrophic bacteria

**บทนำ**

ปลาดุกอัฟริกัน *(Clarias gariepinus)* เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย สามารถเติบโตได้น้ำหนักมากในระยะเวลาสั้นมีความทนทานต่ออุณหภูมิได้ในช่วงกว้างและทนต่อน้ำที่มีออกซิเจนน้อยได้ จนทำให้การเลี้ยงปลาดุกอัฟริกันมีผู้ให้ความสนใจมากขึ้น จึงมีแนวโน้มว่าปลาดุกอัฟริกันจะสามารถเป็นปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ เพราะสามารถเพิ่มรายได้ให้แก่ผู้เลี้ยงได้ (บราลี ทุมกานนท์, 2533) และเป็นปลาชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการบริโภค (Molinari *et al*., 2003) ปัจจุบันจึงมีการเพาะเลี้ยงทั้งการ

ผสมเทียมและการผสมพันธุ์เลียนแบบธรรมชาติ แต่เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องเหมือนปลาอื่น ๆ จึงต้องมีการฆ่าปลาดุกเพศผู้ เพื่อเอาน้ำเชื้อ และน้ำเชื้อที่ได้นั้นไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน เนื่องจากน้ำเชื้อปลาจะหยุดการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และการเก็บรักษาน้ำเชื้อจากปลาตามธรรมชาติมักจะมีการปนเปื้อนแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในน้ำและดิน (Wayman and Tiersch, 2000) ดังนั้นควรมีการพัฒนาวิธีการใช้น้ำเชื้อปลาให้มีประสิทธิภาพและลดการสูญเสียน้ำเชื้อ วิธีการหนึ่งที่จะช่วยได้คือ การเก็บรักษาในระยะยาวโดยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (ธานินทร์ พูลเจริญ, 2546) ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไว้นานเป็นปี (Vuthiphandchai *et al*., 2007) จึงทำให้สะดวกต่อการเพาะพันธุ์และสามารถเพาะพันธุ์ปลาได้ตลอดปี (Linhart *et al*., 2005) แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้อจะประสบกับปัญหาของแบคทีเรียปนเปื้อน จึงต้องมีการนำสารปฏิชีวนะเพื่อลดปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนและป้องกันการเกิดโรคระบาดเมื่อมีการนำน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนแบคทีเรียมาใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป (Tiersch, 2001) และสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ คือ สารปฏิชีวนะในกลุ่ม Penicillin-Streptomycin (Nimrat, 2005; Nimrat *et al*., 2006) แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารปฏิชีวนะจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อของปลารวมทั้งเกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในตัวปลาที่ได้รับการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อปลาแช่แข็งดังกล่าว

ดังนั้น การศึกษาและวิจัยหาสารต้านจุลชีพจากสมุนไพรไทยที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีพิษหรือฤทธิ์ข้างเคียงต่ำ จึงมีความจำเป็น (มาลิน จุลศิริ, 2532) และพริกชี้ฟ้าเป็นพืชสมุนไพรที่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (Cichewicz and Thorpe, 1996) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดพริกชี้ฟ้า สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้แทนสารปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

**วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ**

**การเตรียมสารสกัดพริกชี้ฟ้า**

การเตรียมสารสกัดพริกชี้ฟ้าได้ทำการดัดแปลงจากวิธีการของ Comporese และคณะ (2003) โดยนำพริกชี้ฟ้ามาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปตากแดดให้แห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำพริกชี้ฟ้าแห้งมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ หลังจากกรองแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายเมทานอลออกด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเก็บสารสกัดใบมะกรูดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาใช้

**การเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อสดและตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อนำมาแช่แข็ง**

การเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อสดตามวิธีการของ Horvath และคณะ (2007) โดยเลือกปลาดุกอัฟริกันเพศผู้ที่สมบูณ์เพศฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของสเปิร์มในถุงอัณฑะ โดยใช้ฮอร์โมน Luteinizing Hormone-Releasing Hormone agonists (LHRHa) ร่วมกับ Domperidone หลังจากฉีดฮอร์โมนประมาณ 10-12 ชั่วโมง จากนั้นนำปลาไปทำให้สลบโดยนำไปแช่ในน้ำแข็งประมาณ 5-10 นาที และนำปลามาเช็ดแอลกอฮอล์บริเวณลำตัวแล้วผ่าท้องเพื่อนำเอาถุงอัณฑะออกมา นำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้สะอาด ควรระวังไม่ให้น้ำเชื้อมีสิ่งอื่นปะปนอยู่เช่นน้ำเลือด นำถุงอัณฑะที่ได้มาใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish) แห้งและปราศจากเชื้อที่วางอยู่บนน้ำแข็ง ตัดถุงอัณฑะให้แตก ใช้มีดผ่าตัดกดเบาๆ ให้น้ำเชื้อออกจากถุงอัณฑะ กรองเอาน้ำเชื้อด้วยผ้าขาวบางปราศจากเชื้อใส่ในจานแก้วที่แห้งและปราศจากเชื้อที่วางอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นนำน้ำเชื้อสดที่ได้ไปเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปแช่แข็งตามวิธีการของ Nimrat และคณะ (2008) ทำได้โดยนำสารละลาย Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) ผสมกับสารปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin (PS) 1.0% ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 0.65% นำสารละลาย Ca-F HBSS ผสมกับสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ในอัตราส่วน สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ต่อสารละลาย Ca-F HBSS คือ 1:4 (*ส่วนที่ 1*) นำสารละลาย Ca-F HBSS ผสมกับน้ำเชื้อสดในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลาย Ca-F HBSS คือ 1:1 (*ส่วนที่ 2*) จากนั้นนำส่วนที่ 1 และ 2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมชุดการทดลองโดยเปลี่ยนจากสารปฏิชีวนะเป็นสารสกัดพริกชี้ฟ้า ซึ่งจะแบ่งชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมสารปฏิชีวนะ

ชุดการทดลองที่ 2 เติมสารปฏิชีวนะ PS 1.0% เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 เตรียมเหมือนชุดการทดลองที่ 2 โดยเปลี่ยนจากสารปฏิชีวนะเป็นสารสกัดพริกชี้ฟ้า เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้าความเข้มข้น 2.0% เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในหลอดเก็บน้ำเชื้อ และนำไปเก็บในถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป

**การศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดจากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน**

**การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง** (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

หยดตัวอย่างน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.4% ลงไป 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์อย่างเบาๆ และรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ประเมินเปอร์เซ็นต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ 100%, 80%, 60%, 40%, 20% และ สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ 0% (ทำการทดลองทุก ๆ 30 วันเป็นระยะเวลา 90 วัน) โดยในแต่ละครั้งทำการทดลอง 3 ซ้ำ

**การหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันก่อนแช่แข็ง**

เจือจางน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง โดยใช้เทคนิคเจือจางแบบ 10 เท่า (Ten-fold dilution) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ดูดสารละลายเซลล์แขวนลอย (Cell suspension) ของแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยน้ำเชื้อให้ทั่วด้วยวิธีการทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (Spread plate technique) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อที่ผ่านการบ่มมานับจำนวนโคโลนีเป็น CFU/ml บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จัดจำแนกตามวิธีการของ Krieg และ Holt (1984), Sneath และคณะ (1986)

**การหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันหลังแช่แข็ง**

นำหลอดเก็บน้ำเชื้อมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 วินาที จนน้ำเชื้อละลาย (Thawing) ตามวิธีการของ Nimrat และคณะ (2008) และนำมาหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียตามข้อ 3.2 โดยทำการทดลองทุก ๆ 30 วัน เป็นระยะเวลา 90 วัน

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

วิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of variance) และทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ตามวิธีการของ Steel และ Torrie (1980) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

**ผลการทดลอง**

การศึกษาผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่เก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งในโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน ได้ผลการทดลองดังนี้

**1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจากตัวอย่างน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง**

จากการศึกษาการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน พบว่าการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันก่อนการแช่แข็งมีค่าอยู่ในช่วง 75.6 ± 10.3 – 80.0 ± 4.9% น้ำเชื้อที่มีการเติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ามีการเคลื่อนที่สูงที่สุดโดย มีค่าเท่ากับ 80.0 ± 4.9% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ชุดทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin (PS) 0.65% มีค่าการเคลื่อนที่เท่ากับ 75.6 ± 25.8% และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอัฟริกัน (%)

| ระยะเวลาการทดลอง | การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอัฟริกันที่เก็บแบบแช่แข็ง (%) | | |
|---|---|---|---|
| | ชุดควบคุม | PS 0.65% | สารสกัดพริกชี้ฟ้า |
| ก่อนแช่แข็ง | $75.6 \pm 10.3^{bc,1}$ | $75.6 \pm 25.8^{bc,1}$ | $80.0 \pm 4.9^{b,1}$ |
| หลังแช่แข็ง 0 วัน | $68.9 \pm 27.9^{a,2}$ | $64.4 \pm 26.5^{b,2}$ | $51.1 \pm 22.5^{e,2}$ |
| หลังแช่แข็ง 30 วัน | $51.1 \pm 3.8^{a,3}$ | $48.9 \pm 3.8^{a,3}$ | $31.1 \pm 10.2^{c,3}$ |
| หลังแช่แข็ง 60 วัน | $46.7 \pm 6.7^{a,4}$ | $44.4 \pm 7.7^{a,4}$ | $26.7 \pm 6.7^{c,4}$ |
| หลังแช่แข็ง 90 วัน | $37.8 \pm 3.8^{ab,5}$ | $35.6 \pm 3.8^{bc,5}$ | $22.2 \pm 3.8^{d,5}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) ตัวเลขที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05)

**2. ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง**

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันในรูปของน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อก่อนและน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งที่ผสมกับสารสกัดพริกชี้ฟ้า ความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสดมีปริมาณเท่ากับ $19.20 \pm 0.21 \times 10^5$ CFU/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) กับทุกชุดการทดลอง ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติมสาร

ปฏิชีวนะ PS 0.65% และชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้า มีปริมาณเท่ากับ 9.63 ± 0.15, 16.57 ± 0.12 และ 15.87 ± 0.15 $\times 10^5$ CFU/ml ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) กับชุดการทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะ PS 0.65% เมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันเป็นเวลา 90 วัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) กับช่วงก่อนการแช่แข็ง และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) กับชุดควบคุม และชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้า มีค่าเท่ากับ 2.53 ± 0.06, 0.95 ± 0.01 $\times 10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดสูงสุด (2.53 ± 0.06 $\times 10^5$ CFU/ml) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) กับชุดการทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะ PS 0.65% ชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้า ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง

| ระยะเวลาการทดลอง | ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง ($\times 10^5$ CFU/ml) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | น้ำเชื้อสด | ชุดควบคุม | PS 0.65% | สารสกัดพริกชี้ฟ้า |
| ก่อนแช่แข็ง | 19.20±0.21$^{a}$ | 16.57±0.12$^{b,1}$ | 9.63±0.15$^{e,1}$ | 15.87±0.15$^{b,1}$ |
| หลังแช่แข็ง 0 วัน | - | 13.43±0.58$^{a,2}$ | 0.08±0.00$^{d,2}$ | 11.97±0.06$^{b,2}$ |
| หลังแช่แข็ง 30 วัน | - | 10.63±0.12$^{a,3}$ | 0.07±0.00$^{e,2}$ | 7.63±0.15$^{b,3}$ |
| หลังแช่แข็ง 60 วัน | - | 6.70±0.10$^{a,4}$ | 0.07±0.00$^{d,2}$ | 1.17±0.01$^{b,4}$ |
| หลังแช่แข็ง 90 วัน | - | 2.53±0.06$^{a,5}$ | 0.07±0.00$^{c,2}$ | 0.95±0.01$^{b,4}$ |
| % reduction | - | 84.73% | 99.27% | 94.01% |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) ตัวเลขที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) % reduction คือ

$$\frac{(\text{ปริมาณแบคทีเรียก่อนแช่แข็ง} - \text{ปริมาณแบคทีเรียหลังแช่แข็ง 90 วัน}) \times 100}{\text{ปริมาณแบคทีเรียก่อนแช่แข็ง}}$$

**3. ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง**

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง และน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง ผสมกับสารสกัดพริกชี้ฟ้า ที่ความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันก่อนแช่แข็งที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้ามี 9 ชนิด คือ *S. intermedius*, *S. saccharolyticus*, *E. coli*, *S. boydii*, *M. agilis*, *B. firmus*, *B. coagulans*, *B. laterosporus* และ *Y. ruckeri* เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าชนิดของแบคทีเรียจะลดลง โดยน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เติมสารสกัดสมุนไพรพริกชี้ฟ้าสามารถยับยั้ง *B. firmus* และ *B. laterosporus* ในวันที่ 30 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3 และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่ม เฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 4

**ตารางที่ 3** ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง

| ชนิดแบคทีเรีย | ระยะเวลาที่ทำการแช่น้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (วัน) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | น้ำเชื้อสด | น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง | | | หลังการแช่แข็ง 0 วัน | | | หลังการแช่แข็ง 30 วัน | | | หลังการแช่แข็ง 60 วัน | | | หลังการแช่แข็ง 90 วัน | | |
| | | ชุดการทดลอง | | | ชุดการทดลอง | | | ชุดการทดลอง | | | ชุดการทดลอง | | | ชุดการทดลอง | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| *Staphylococcus intermedius* | + | + | + | + | + | + | + | + | – | + | + | – | + | + | – | + |
| *S. saccharolyticus* | + | + | + | + | + | + | + | + | – | + | + | – | + | + | – | + |
| *Escherichia coil* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *Shigella boydii* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *Micrococcus agilis* | + | + | + | + | + | + | + | + | – | + | + | – | + | + | – | + |
| *Bacillus firmus* | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | + | – | – | + | – | – |
| *B. coagulans* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *B. laterosporus* | + | + | + | + | + | + | + | + | – | – | + | – | – | + | – | – |
| *Yersinia ruckeri* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

**หมายเหตุ**: + คือ พบ; – คือไม่พบ; ชุดที่ 1 คือ ชุดควบคุม; ชุดที่ 2 คือ ชุดการทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะ PS 0.65%; ชุดที่ 3 คือ ชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้า

**ตารางที่ 4** คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็ง

| การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี | *E. coil* | *S. boydii* | *Y. ruckeri* | *S. intermedius* | *S. saccharolyticus* | *M. agilis* | *B. firmus* | *B. coagulans* | *B.laterosporus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gram stain | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Shape | rod | rod | rod | cocci | cocci | cocci | bacilli | bacilli | bacilli |
| Triple Sugar Iron agar | A/A, + | K/A, - | A/A, - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Catalase | NT | NT | NT | + | + | + | + | + | + |
| Oxidase | - | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Coagulase test | NT | NT | NT | + | - | - | NT | NT | NT |
| $H_2S$ production | - | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Indole production test | + | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Methyl red test | + | + | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Voges-Prosauer test | - | - | - | - | NT | NT | - | + | - |
| Citrate utilization test | - | - | - | NT | NT | NT | - | + | NT |
| Urease test | - | - | - | + | NT | - | NT | NT | NT |
| Motility test | + | - | - | - | - | + | NT | +/- | NT |
| Malonate utilization test | - | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| LDC | + | - | +/- | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| ODC | +/- | - | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from sucrose | +/- | - | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from D-mannitol | + | + | + | +/- | - | - | NT | NT | NT |
| Gas from L-arabinose | + | + | - | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Gas from moltose | + | - | + | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| ADH | NT | NT | NT | NT | NT | - | NT | NT | NT |
| Nitrate reduction | NT | NT | NT | + | + | - | NT | NT | NT |
| Esculin hydrolysis test | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT | NT | NT |
| Starch hydrolysis test | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT | NT | NT |
| Gelatin hydrolysis test | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT | NT | NT |
| Acid from glucose | NT | NT | NT | NT | NT | - | NT | NT | NT |
| Acid from sucrose | NT | NT | NT | + | - | NT | NT | NT | NT |
| Acid from glyceral | NT | NT | NT | NT | NT | - | NT | NT | NT |

**ตาราง 4 (ต่อ)**

| การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี | *E. coil* | *S. boydii* | *Y. ruckeri* | *S. intermedius* | *S. saccharolyticus* | *M. agilis* | *B. firmus* | *B. coagulans* | *B.laterosporus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Acid from lactose | NT | NT | NT | NT | NT | - | NT | NT | NT |
| Acid from mannitol | NT | NT | NT | +/- | - | - | NT | NT | NT |
| Acid from mannose | NT | NT | NT | + | + | - | NT | NT | NT |
| Acid from trehalose | NT | NT | NT | + | - | NT | NT | NT | NT |
| Acid from arabinose | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | - |
| Acid form ammonium salt glucose | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | - |
| Anaerobic growth | NT | NT | NT | NT | NT | NT | - | + | + |
| Growth at 50 °C | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT |
| Growth in 7%NaCl | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | + | NT |

**หมายเหตุ:** LDC; Lysine decarboxylase test, ODC; Ornithine decarboxylase test**;** ADH; Arginine dihydrolase test**,** NT; Not test

**สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง**

การศึกษาผลของการแช่แข็ง สารสกัดพริกชี้ฟ้าและสารปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin (PS) 0.65% ต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแสดงให้เห็นว่า สารปฏิชีวนะ PS 0.65% มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อมากที่สุด เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน 90 วัน โดยยังคงรักษาอัตราการเคลื่อนที่ไว้ได้สูงที่สดุ (3.56 ± 3.8 %) และสามารถลดปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันภายใต้สภาวะแช่แข็งและสาเหตุของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสัตว์น้ำลดลงอาจเกิดจากการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเก็บรักษาในปริมาณสูงซึ่งก๊าซดังกล่าวจะทำให้ pH ภายในเซลล์ของสเปิร์มลดลงจนเป็นอันตรายต่อการสร้าง ATP และการสร้างแฟลกเจลลาและนำมาซึ่งการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ (Bencic *et al*., 2000) รวมทั้งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อวันสุดท้ายของการทดลองในชุดควบคุมจะมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าชุดทดลองที่เติม PS 0.65% สอดคล้องกับการศึกษาของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2553) ที่ได้ศึกษาการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) พบว่าสารปฏิชีวนะ PS 1.0% และ 2.0% มีความเป็นพิษต่อเซลล์สเปิร์มของปลากะพงขาว เนื่องจากทำให้

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในชุดการทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ความเข้มข้น ลดลงอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ส่วนประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน พบว่าสารปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการลดทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่เติมสารสกัดพริกชี้ฟ้าและชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2554) ที่พบว่าสารปฏิชีวนะ PS 1.0% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษา แบบแช่เย็นได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ PS 0.1% ส่วนประสิทธิภาพของสารสกัดพริกชี้ฟ้าต่ออัตราการเคลื่อนที่และการลดปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน พบว่าสารสกัดพริกชี้ฟ้ามีประสิทธิภาพเป็นอันดับที่ 3 ในการรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันโดยสารปฏิชีวนะและชุดควบคุมมีประสิทธิภาพในการรักษาอัตราการเคลื่อนที่ได้ดีที่สุดและรองลงมาตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดพริกชี้ฟ้ามีความสามารถในการลดปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในพบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันได้เป็นอันดับที่ 2 รองจากชุดทดลองที่เติมสารปฏิชีวนะ ถึงแม้ว่าสารสกัดพริกชี้ฟ้าที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันทดแทนสารปฏิชีวนะได้เนื่องจากมีผลกระทบต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแต่ก็ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้ค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นจึงทำให้น่าจะมีการศึกษาต่อเนื่องถึงกระบวนการสกัดและความเข้มข้นของสารสกัดพริกชี้ฟ้าที่เหมาะสมและนำมาศึกษาต่อไป และจากการสืบค้นที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดพริกชี้ฟ้าต่ออัตราการเคลื่อนที่และการลดปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันและในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ทำให้มีข้อมูลการศึกษาที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาถึงสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่นๆ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Sivaram และคณะ (2004) ได้ศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ ใบสะเดา (*Azadirachta indica*), ใบหอมแขก (*Murraye Koenigii*), ใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*), ใบจากต้น *Daemia extensa*, ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum*), ใบมะเขือ (*Solanum surattense*), Guduchi (*Tinospora cardifolia*), รากโสมอินเดีย (*Withania somnifera*), เมล็ดสมอ (*Terminalia bellirica*) และเมล็ดจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาเก๋าจุดน้ำตาล (*Epinephelus sanctum*) พบว่ามีสมุนไพรเพียง 3 ชนิด คือ ใบกะเพรา รากโสมอินเดีย และเมล็ดจันทร์เทศ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยัง V. harveyi ได้ดีนอกจากนี้จากการศึกษาของภัคไทยชนะ (2547) พบว่า สารสกัดพริกขี้หนูสด (*Capsicum frutescens* Linn.) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรียได้ 4 ชนิด คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *Acinetobacter lwoffii* และ *Vibrio cholera* และจากรายงานของพนมพร ภานุทัต และสาวิตรี วทัญญูไพศาล (2543) โดยพบว่าสารสกัดพริกขี้หนู (Capsicum frutescens Lim) มีความสามารถในการยับยั้ง*S. aureus* ทั้งนี้การยับยั้งแบคทีเรียเป็นผลมาจากพริก ขี้หนูมีสารแคปไซซิน ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ เป็นต้น (Siripongvutikorn *et al*., 2004)

จากการศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้สารปฏิชีวนะเป็นสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่พบว่าแบคทีเรียที่พบว่ารอดชีวิตในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็งตลอด 90 วัน ได้แก่ *E. coli*, *Shigella boydii*, *Bacillus coagulans* และ *Yersinia ruckeri* ซึ่งแบคทีเรียชนิด *S. boydii* และ *Y. ruckeri* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง (Ranjbar *et al.,* 2008; Strom-Bestor *et al*., 2010) ดังนั้นต้องมีการตระหนักถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันซึ่งเมื่อทำการผสมเทียมในขั้นตอนต่อไปอาจจะทำให้เกิดการระบาดของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในคนและสัตว์น้ำต่อไปได้

ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาต่อไปถึงการประยุกต์ใช้สารสกัดพริกชี้ฟ้าและสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่เหมาะสมเพราะพืชสมุนไพรเป็นพืชที่หาง่าย ราคาถูก และเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำเพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำปราศจากสารปฏิชีวนะและลดการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกลุ่มก่อโรคและแบคทีเรียกลุ่มดื้อยาต่อไป

**กิตติกรรมประกาศ**

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวาริชศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้

**เอกสารอ้างอิง**

ธานินทร์ พูลเจริญ. (2546). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ด้วยวิธีการแช่แข็งด้วยไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ เอทไธลีนไกลคอลและพรอพไพลีนไกลคอล. ปัญหาพิเศษทางวาริชศาสตร์, ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

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

พนมพร ภานุทัต และสาวิตรี วทัญญูไพศาล. (2543). การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารด้วยสารสกัดจากพืชเครื่องเทศและสมุนไพรไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

ภัค ไทยชนะ. (2547). การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพริกขี้หนูสดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกับความเชื้อในการบริโภคพริกขี้หนูสด. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มาลิน จุนศิริ. (2532). ยาต้านจุลชีพ. กรุงเทพฯ: อักษรบัณฑิต.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553). การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีแช่เย็น. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กุลวดี พิมพ์นวลศรี ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2554). ผลของยาปฏิชีวนะและการแช่เย็นปลากะพงขาวต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อ. วารสารคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (*In press*)

Bencic, D.C., Ingermann, R.L. and Cloud J.G. (2002). Dose $CO_2$ enhance short-term storage success of Chinook Salmon (*Oncorhymchus tshawytscha*) milt. *Theriogenology*, *56*, 157-166.

Cichewicz, R.H. and Thorpe, P.A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *52*, 61-70.

Comporese, A., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Morsellino, N., De Simone, F. and Tubaro, A. (2003). Screening of antibacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology, 87*, 103-107.

Horvath, A., Miskolczi, E., Mihalffy, S., Osz, K., Szabo, K. and Urbanyi, B. (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, *54*, 251-257.

Krieg, N.R. and Holt, J.G. (1984). Bergey 's manual of systematic bacteriology, volume 1. Baltimore: Williams & Wilkins.

Linhart, O., Marek, R., Martin, F., David, G. and Martin, K. (2005). Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis*) sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology*, *51*, 250-261.

Molinari, L.M., Scoaris, D.O., Pedroso, R.B., Bittencourt, R.L.N., Nakamura, C.V., Nakamura, T.U., Filho, B.A.A. and Filho, B.P.D. (2003). Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in semi-intensive system. *Maringa*, *25*, 267-271.

Nimrat, S. (2005). Preservation of black tiger shrimp *Penaeus monodon* spermatophores by chilled storage. *Journal of the World Aquaculture Society*, *36*(1), 76-86.

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

Nimrat, S., Bart, A.N., Keatsaksit, A. and Vuthiphandchai, V. (2008). Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Peanaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture*, *274*, 247-253.

Ranjbar, R., Mammina, C., Pourshafie, M.R. and Soltan-Dallal, M.M. (2008). Characterization of endemic *Shigella boydii* strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *BMC Research Notes, 1*(74), 1-6.

Siripongvutikorn, S., Thammaratwasik, P. and Hung, Y.M. (2004). Antimicrobial and antioxidation effects of Thai seasoning, Tom-yum. *LWT-Food Science and Technology*, *38*, 347-352.

Sivaram, V., Babu, M.M., Immanual, 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.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Shape, M.E. and Volt, J.G. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology, volume. 2. Baltimore: Williams and Wilkins.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1980). Principles and procedures of statistics. A Biometric Approach 2nd eds. New York: McGraw-Hill.

Strom-Bestor, M., Mustamaki, N., Heinikainen, S., Hirvela-Koski, V., Verner-Jeffreys, D. and Wiklund, T. (2010). Introduction of *Yersinia ruckeri* biotype 2 into finnish fish farms. *Aquaculture*, *308*, 1–5.

Tiersch, T.R. (2001). Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine Biotechnology*, *3*, S212–S223.

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.

Wayman, W.R. and Tiersch, T.R. (2000). Research methods for cryopreservation of sperm. In Cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. Baton Rouge: The World Aquaculture. Pp. 264-275. *Bulletin of Zambia*, *5*, 187-198.