*บทความวิชาการ*

# การปนเปื้อนและการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาน้ำจืดแช่แข็งในประเทศไทย : กรณีศึกษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*)

**ชยาภา นิลโกศล[1] ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์[2] ไตรมาศ บุญไทย[2]**
**วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3] และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1*]**

---

*ได้รับบทความ: 10 กันยายน 2561*
*ได้รับบทความแก้ไข: 13 พฤศจิกายน 2561*
*ยอมรับตีพิมพ์: 20 พฤศจิกายน 2561*

## บทคัดย่อ

การปนเปื้อนแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลงและสร้างความกังวลต่อความปลอดภัยทางชีวภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง การปนเปื้อนแบคทีเรียในการแช่แข็งน้ำเชื้อเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การปนเปื้อนแบคทีเรียส่วนใหญ่มักปนเปื้อนจากน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ครีบก้น และอุจจาระและปัสสาวะของปลา การปฏิบัติตามแนวทางของการปฏิบัติงานที่ถูกสุขอนามัยสำหรับห้องปฏิบัติการสามารถลดการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ นอกจากนี้การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อโดยการใช้สายสวนร่วมกับการล้างช่องเพศปลาด้วยน้ำปราศจากเชื้อและเช็ดบริเวณช่องเพศให้แห้ง และการไม่นำน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะมาใช้ในการแช่แข็งยังช่วยลดปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อได้อย่างมาก การประยุกต์ใช้ยาปฏิชีวนะผสม 0.25% Penicillin-Streptomycin ในน้ำเชื้อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพสเปิร์มและการปฏิสนธิ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้แก่ *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescens* ยังคงพบได้และดื้อต่อยาปฏิชีวนะผสมทั้งสองชนิดนี้ รวมทั้งสามารถถ่ายทอดจากน้ำเชื้อแช่แข็งไปยังตัวอ่อนของปลาตะเพียนขาวที่เกิดจากการผสมเทียม ดังนั้นควรทำการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

**คำสำคัญ:** ปลาตะเพียนขาว แบคทีเรีย การปนเปื้อน น้ำเชื้อแช่แข็ง

---

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[3]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: subunti@buu.ac.th

# Bacterial Contamination and Decontamination of Cryopreserved Freshwater Fish Milt in Thailand: Case Study of Silver Barb (*Barbodes gonionotus*) Milt

**Chayapa Ninkoson[1], Treerat Sooksawat[2], Traimat Boonthai[2], Verapong Vuthiphandchai[3] and Subuntith Nimrat[1*]**

*Received: 10 September 2018*
*Revised: 13 November 2018*
*Accepted: 20 November 2018*

## ABSTRACT

Bacteria contamination is an important factor of decline in milt quality and creates a concern in biological safety of cryopreserved sperm. Bacterial contamination can occur in every step of cryopreservation processes, particularly, during milt collection. Most contaminated bacteria usually originate from culture water, anal fins, and fecal and urine mixtures. Implementation of a standard sanitation protocol required for minimal bacterial contamination in laboratory is capable of decreasing degree of contamination. Moreover, rinsing urogenital aperture with sterile water and drying urogenital opening prior to milt collection using a catheter, and no use of milt with fecal and urine mixture can dramatically reduce the number and type of bacterial contaminants in cryostored milt. Application of 0.25% penicillin-streptomycin mixture is also an alternative technique for minimizing bacteria contaminants in cryopreserved milt without negative effect on sperm quality and fertilization success. However, some pathogenic bacteria e.g. *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* still remain due to their resistance to these mixed antibiotics and they can be transferred from cryostored milt to artificially inseminated embryos of silver barb. Therefore, development of effective novel technology for decontamination of pathogenic bacteria in cryostored milt without detrimental effect on fish sperm should be further established.

**Keywords**: silver barb, bacteria, contamination, cryopreserved milt

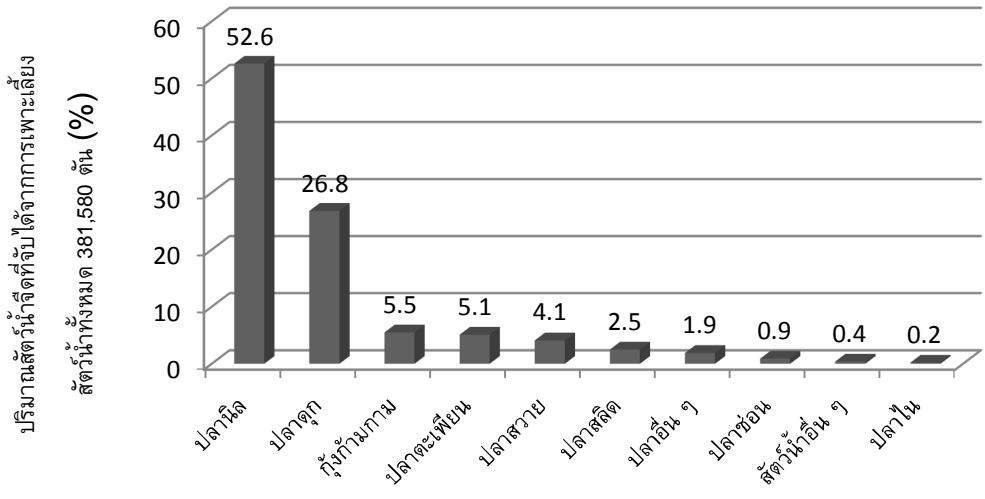
[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University
[2]Biological Science Program, Faculty of Science, Burapha University
[3]Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University
*Corresponding author, e-mail: subunti@buu.ac.th

## บทนำ

ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2559 มีการเพาะเลี้ยงและจับปลาตะเพียนขาวในประเทศไทยทั้งหมด 40,900 ตัน คิดเป็นมูลค่าทั้งหมด 1,855.8 ล้านบาท สูงเป็นอันดับ 4 ของเปอร์เซ็นต์ปริมาณปลาน้ำจืดทั้งหมดที่จับได้จากการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย [1] (รูปที่ 1) ปลาชนิดนี้ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำธรรมชาติ กินอาหารได้เกือบทุกชนิด จัดเป็นปลากินพืช จึงสามารถใช้เป็นปลากำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำได้ [2] และมีรสหวานมันเมื่อเปรียบเทียบกับปลาน้ำจืดอื่นๆ [3] แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ประสบปัญหาในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ เนื่องจากพ่อพันธุ์เริ่มไม่มีน้ำเชื้อ ถึงแม้ว่าจะใช้ฮอร์โมนในการฉีดกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อได้ แต่คุณภาพน้ำเชื้อก็ลดต่ำลง [4] ทำให้มีการศึกษาถึงวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งการอนุรักษ์ลักษณะสายพันธุ์ที่ดี โดยการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในปัจจุบันมักมีการมุ่งเน้นถึงการพัฒนากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวให้มีความเหมาะสมเพื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่แข็งและเพิ่มประสิทธิภาพในการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์ด้วยเทคนิคการผสมเทียม เช่น การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทกแทนต์ (Cryoprotectant) อัตราการลดอุณหภูมิ (Cooling rate) และระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพหลังการละลายของน้ำเชื้อแช่แข็ง [5]

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีความสามารถในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อให้เหมาะสำหรับการผสมเทียม แต่ก็ยังพบปัญหาด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียหลากหลายชนิด [6] เช่น *Staphylococcus intermedius, Staphylococcus saccharolyticus, Staphylococcus caseolyticus, Escherichia coli, Shigella boydii, Micrococcus agilis, Bacillus firmus, Bacillus coagulans, Bacillus azotoformans, Bacillus brevis, Brevibacillus laterosporus, Yersinia ruckeri, Listeria monocytogenes, Aeromonas sobria, Plesiomonas shigelloides* และ *Flavobacterium breve* เป็นต้น [7-8] แบคทีเรียสามารถปนเปื้อนเข้าสู่น้ำเชื้อได้ในระหว่างขั้นตอนต่างๆ ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ไม่ว่าจะเป็น การรีดน้ำเชื้อ กระบวนการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ เนื่องจากการขาดความระมัดระวังทางด้านความสะอาดและสาธารณสุข [6] หรือการปนเปื้อนในระหว่างที่เก็บรักษาตัวอย่างน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว เช่น การเกิดความเสียหายต่อหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อ การปิดปากหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อไม่สนิท การปนเปื้อนแบคทีเรียของไนโตรเจนเหลว [9] นอกจากนี้ในขั้นตอนการรีดน้ำเชื้อมักมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนปัสสาวะ อุจจาระ และเลือด ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อ [6]

บทความปริทัศน์ฉบับนี้ขอยกตัวอย่างการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเป็นแบบจำลองการปนเปื้อนและวิธีการป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาในประเทศไทย โดยบทความนี้จะกล่าวถึง 1) แหล่งที่มาและการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 2) ผลกระทบจากแบคทีเรียต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็ง และหัวข้อสุดท้ายที่ขอกล่าวถึง คือ การลดและการป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว




**รูปที่ 1** เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสัตว์น้ำจืดที่จับได้จากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งหมด 381,580 ตัน ในปี พ.ศ. 2559

**1. แหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว**

โดยทั่วไปขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญคือ การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายน้ำเชื้อ (Extender buffer) และสารไครโอโพรเทคแทนต์ (Cryoprotectant agents) การลดอุณหภูมิ และการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ในแต่ละขั้นตอนมักมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งขั้นตอนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรียสูงมาก ดังรายงานของ Boonthai และคณะ [6] ที่พบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads และแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic bacteria) ในแหล่งที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงปลาตะเพียนขาว ยกตัวอย่างเช่น น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงปลาครีบก้น (Anal fins) และอุจจาระและปัสสาวะของปลา (ตารางที่ 1) น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงปลาจัดเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดสูงที่สุดจำนวน 14 ชนิด ซึ่ง *Sphingomonas paucimobilis* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คิดเป็น 28.39% ของแบคทีเรียที่พบทั้งหมด จากการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแสดงให้เห็นว่า ครีบก้นของปลาตะเพียนขาวซึ่งเป็นบริเวณที่มักสัมผัสกับน้ำเชื้อระหว่างการรีดน้ำเชื้อมีการปนเปื้อนแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม Aeromonads เช่น *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*, *Aeromonas punctata* subsp. *caviae*, *Aeromonas ichthiosmia* และ *Aeromonas media* ตามปรกติแล้วบริเวณครีบก้นและผิวหนังของปลาชนิดต่างๆ มักเป็นแหล่งที่พบการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียในปริมาณสูงและหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas bestiarum*, *A. caviae*, *Aeromonas jandaei*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, *Aeromonas schubertii*, *Alcaligenes piechaudii, Enterobacter aerogenes, Flexibacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus luteus*, *Moraxella* sp., *Vibrio fluvialis* และแบคทีเรียกลุ่ม Psychrobacters เป็นต้น [10-11] อุจจาระและปัสสาวะของปลาตะเพียนขาวยังเป็นสาเหตุหนึ่งของการปนเปื้อนแบคทีเรีย โดยการปนเปื้อนแบคทีเรียส่วนใหญ่เกิดจาก *A.*

*punctata* subsp. *caviae*, *Rahnella aquatilis*, *A. ichthiosmia, A. media, Aeromonas punctata* subsp. *punctata, A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. schubertii, Aeromonas aquariorum, Aeromonas veronii* และ *Serratia plymuthica* เป็นต้น [6] นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads เช่น *Pseudomonas otitis*, *Pseudomonas azotoformans, P. fluorescens* และ *Comamonas testosteroni* ปริมาณใกล้เคียงกันในตัวอย่างน้ำเชื้อปลาที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ น้ำที่ใช้เลี้ยงปลา และบริเวณครีบก้นของปลาตะเพียนขาว [6]

การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียจากน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ครีบก้น และน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะของปลาตะเพียนขาว พบว่ามีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด คือ *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens* [6] ซึ่งก่อโรคในปลาน้ำจืดสำคัญหลายชนิด โดย *A. hydrophila* เป็นสาเหตุของโรค motile Aeromonas septicemia ในปลาที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มและตามธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตอบอุ่น [12] และ *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียก่อโรค hemorrhagic septicemia ในปลาน้ำจืด เช่น ปลาไน ปลาไพค์ ปลาในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinids) ปลาในกลุ่มปลากะพง (Percids) และปลาในกลุ่ม coregonids [13] การปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิดในน้ำเชื้อปลาทำให้เกิดความกังวลในการจัดการโรงเพาะฟักและการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถรอดชีวิตในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี [14] และยังสามารถถ่ายทอดไปยังปลารุ่นถัดไป (Vertical transmission) ได้ [11]

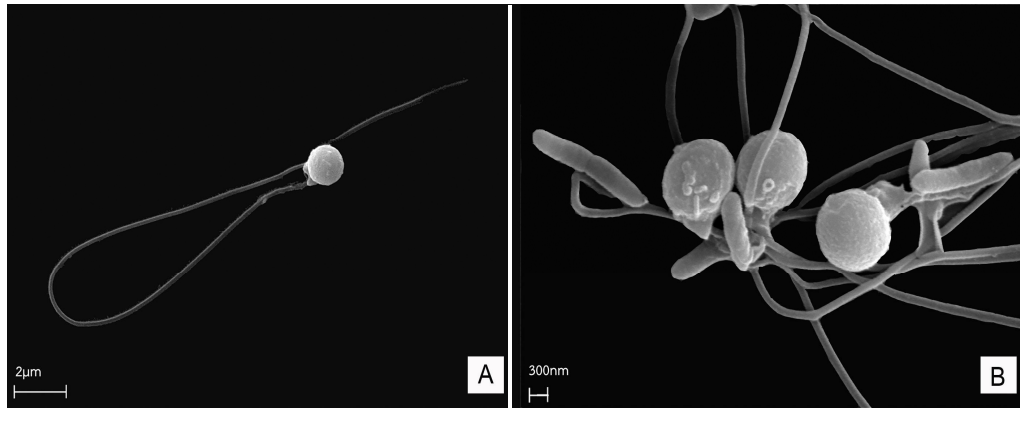
**ตารางที่ 1** การปนเปื้อนแบคทีเรียจากแหล่งที่มาจากปลาและอุปกรณ์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (ดัดแปลงจาก Boonthai และคณะ [6])

| ตัวอย่าง | ปริมาณแบคทีเรีย | | | |
|---|---|---|---|---|
| | แบคทีเรียกลุ่มเฮท-เทอโรโทรปทั้งหมด | แบคทีเรียแกรมลบ | แบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads | แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ |
| น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง (CFU/mL) | $3.06\pm2.08\times10^{4}$ | $2.70\pm0.82\times10^{3}$ | $2.37\pm0.61\times10^{3}$ | $6.20\pm3.16\times10^{1}$ |
| ครีบก้น (CFU/$cm^2$) | $3.55\pm1.28\times10^{3}$ | $2.27\pm1.58\times10^{3}$ | $1.15\pm0.78\times10^{3}$ | $1.70\pm1.04\times10^{1}$ |
| น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ (CFU/mL) | $5.03\pm1.84\times10^{4}$ | $4.57\pm 2.30\times10^{4}$ | $5.57\pm2.59\times10^{3}$ | ไม่พบ |
| ไนโตรเจนเหลวในถังเก็บรักษา (CFU/mL) | $3.10\pm0.95\times10^{2}$ | ไม่พบ | ไม่พบ | $2.84\pm1.69\times10^{2}$ |
| ผิวภายนอกของหลอดฟาง (CFU/straw) | $5.13\pm0.55\times10^{2}$ | ไม่พบ | ไม่พบ | ไม่พบ |
| ถุงมือยาง (CFU/$cm^2$) | $3.14\pm1.62\times10^{2}$ | ไม่พบ | ไม่พบ | ไม่พบ |
| อากาศภายในห้องปฏิบัติการ (CFU $ft^2$/min) | $7.01\pm191\times10^{1}$ | ไม่พบ | ไม่พบ | ไม่พบ |

นอกจากนี้ในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อและการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง อาจเกิดการปนเปื้อนมาจากอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับปฏิบัติงานหรือบริเวณที่ปฏิบัติงาน เช่น ไนโตรเจนเหลวที่อยู่ในถังไนโตรเจน ผิวภายนอกของหลอดฟางที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง ถุงมือยาง และอากาศภายในห้องปฏิบัติงาน (ตารางที่ 1) โดยแบคทีเรียที่พบในไนโตรเจนเหลวส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เช่น *Bacillus safensis* และ *Bacillus* sp. และแบคทีเรียที่พบบนถุงมือยางและไนโตรเจนเหลวส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่มักพบในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา และน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ [6] แสดงให้เห็นว่าน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาและน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะเป็นแหล่งของการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่สำคัญ

**2. ผลกระทบของแบคทีเรียต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็ง**

การปนเปื้อนแบคทีเรียส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และการปฏิสนธิลดลง ยกตัวอย่างเช่น เมื่อเติมแบคทีเรียก่อโรค *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* หรือ *P. fluorescens* ลงในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวส่งผลให้การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย [14] นอกจากนั้น Boonthai et al. [15] ได้ศึกษาการปฏิสนธิของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เติมแบคทีเรีย *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* หรือ *P. fluorescens* พบว่า การปฏิสนธิมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ก่อให้เกิดการจับกลุ่มของสเปิร์ม (Sperm agglutination) (รูปที่ 2) [16] ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ผ่านช่องไมโครไพล์ (Micropyle) และเกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์สเปิร์ม [17] รวมทั้งการหลั่งสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สเปิร์มของแบคทีเรีย เช่น α-haemolysin ซึ่งทำให้สเปิร์มสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่และเกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของสเปิร์ม [18] นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สเปิร์มตาย (Apoptosis) ได้ด้วยสารเมตาโบไลท์ (Metabolites) ที่สร้างขึ้น และการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์สเปิร์มและแบคทีเรีย [19]




**รูปที่ 2** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (A) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวปกติ และ (B) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เกิดการจับกลุ่มเนื่องจากการเติม *P. fluorescens* BG20 [16]

การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนอกจากจะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ การมีชีวิตและการปฏิสนธิที่ลดลงแล้ว ยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถถ่ายทอดไปยังปลารุ่นถัดไป (Vertical transmission) โดยตัวอ่อนระยะแกสทรูลา (Gastrula) ที่ได้จากการผสมเทียมระหว่างน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่ปนเปื้อนด้วย *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* หรือ *P. fluorescens* กับไข่ปลาตะเพียนขาวที่ปราศจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้พบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens* [15] ดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** การตรวจพบ *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens* ในตัวอ่อนของปลาตะเพียนขาวระยะแกสทรูลาที่ได้จากการผสมเทียมระหว่างน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่ปนเปื้อนด้วย *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* หรือ *P. fluorescens* กับไข่ปลาตะเพียนขาว (ดัดแปลงจาก Boonthai และคณะ [15])

| ชุดการทดลอง | จำนวนตัวอย่างที่เป็นผลบวก (%) | |
|---|---|---|
| | ***A. hydrophila* subsp. *hydrophila*** | ***P. fluorescens*** |
| น้ำเชื้อสด | ไม่พบ | ไม่พบ |
| น้ำเชื้อเจือจางที่เติม *A. hydrophila* BG19 | 7/30 (23.3) | ไม่พบ |
| น้ำเชื้อเจือจางที่เติม *P. fluorescens* BG20 | ไม่พบ | 21/30 (70.0) |

**หมายเหตุ** จำนวนตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 30 ตัวอย่าง

**3. การลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว**

การลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาจะช่วยให้น้ำเชื้อมีคุณภาพดี ยืดอายุการเก็บรักษา เพิ่มอัตราการปฏิสนธิกับไข่และป้องกันการเกิดโรคในฟาร์มเพาะเลี้ยง อันจะส่งผลต่อเนื่องไปถึงการลดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงและการจัดการฟาร์ม การลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อสามารถจำแนกได้เป็น 2 วิธีการหลักๆ ได้แก่ 1) การควบคุมหรือการลดการปนเปื้อนด้วยการปฏิบัติงานที่ถูกสุขลักษณะในระหว่างขั้นตอนการเก็บน้ำเชื้อและขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ และ 2) การควบคุมหรือการลดการปนเปื้อนด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

3.1 การควบคุมหรือการลดการปนเปื้อนด้วยการปฏิบัติงานที่ถูกสุขลักษณะในระหว่างขั้นตอนการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ

กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวสามารถลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งได้ด้วยการจัดการตามหลักปฏิบัติที่ถูกสุขลักษณะของการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่นำเสนอโดย Boonthai และคณะ [6] โดยแนวทางการปฏิบัติงานเริ่มตั้งแต่การสร้างความตระหนักต่อผู้ปฏิบัติงานถึงการปนเปื้อนสามารถส่งผ่าน

ตัวผู้ปฏิบัติงานได้ การทำความสะอาดห้องปฏิบัติการ การเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อและน้ำยาที่ใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จนไปถึงข้อปฏิบัติหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3 นอกจากแนวทางการปฏิบัติข้างต้นแล้วขั้นตอนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ในปัจจุบันการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยมือ (Hand stripping) ด้วยการกดและบีบบริเวณท้องปลาเบาๆ [2] น้ำเชื้อปลาที่เก็บได้ควรมีสีขาวขุ่นและปราศจากการปนเปื้อนจากเลือด ปัสสาวะหรืออุจจาระ เพราะการปนเปื้อนจะส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อในระหว่างการแช่แข็งและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ และอีกเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการรวบรวมน้ำเชื้อ ซึ่งสามารถลดการปนเปื้อนเลือด อุจจาระและปัสสาวะได้ คือ การใช้สายสวน (Catheterization) เทคนิคนี้เป็นการใช้ท่อหรือสายยางขนาดเล็กสอดใส่เข้าไปบริเวณช่องเพศของปลา [20] โดยงานวิจัยของ Dreanno และคณะ [21] พบว่าการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อของปลา turbot (*Psetta maxima*) ด้วยการสอดสายสวนสามารถลดการปนเปื้อนปัสสาวะได้ 9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการรีดน้ำเชื้อด้วยมือที่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนถึง 15 เปอร์เซ็นต์ และในงานวิจัยของ Boonthai และคณะ [19] ที่มุ่งเน้นในการศึกษาวิธีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีการเก็บที่แตกต่างกัน 4 วิธี คือ T1) การรีดน้ำเชื้อด้วยมือโดยไม่ล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ T2) การรีดน้ำเชื้อด้วยมือหลังจากล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ T3) การใช้สายสวนในการเก็บน้ำเชื้อโดยไม่ล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ และ T4) การใช้สายสวนในการเก็บน้ำเชื้อหลังจากล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ โดยพบว่าการล้างทำความสะอาดและเช็ดบริเวณช่องเพศของปลาตะเพียนขาวให้แห้งร่วมกับการใช้สายสวนในการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ (T4) สามารถลดปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ในน้ำเชื้อได้ถึง 2 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยมือและไม่ล้างช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ (T1) (ตารางที่ 4) และยังพบว่าไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียบางชนิดที่พบได้ในน้ำเชื้อที่รีดด้วยมือและไม่ล้างช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ (T1) ได้แก่ *Staphylococcus haemolyticus*, *Kocuria varians*, *Bacillus megaterium* และ *Flavobacterium aquatile* (รูปที่ 3) ถึงแม้ว่าการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อด้วยวิธีการนี้จะยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย แต่ถือว่าเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถนำไปใช้ในการปฏิบัติงานได้ เนื่องจากสามารถลดปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ดีกว่าการรีดน้ำเชื้อด้วยมือซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมในปัจจุบัน แต่ยังต้องมีความระมัดระวังหรือเพิ่มมาตรการอื่นที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรีย เพราะการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อด้วยวิธีการนี้ยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด เช่น *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens*

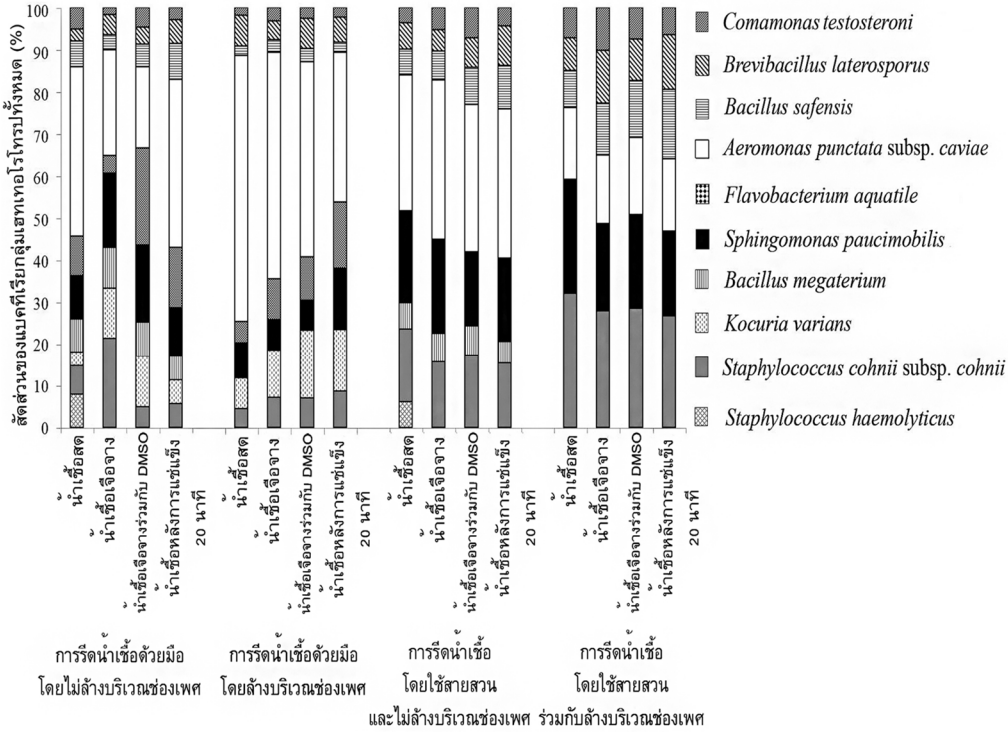
**ตารางที่ 3** แนวทางการปฏิบัติเพื่อลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (ดัดแปลงจาก Boonthai และคณะ [6])

| | |
|---|---|
| **ข้อปฏิบัติสำหรับผู้ปฏิบัติงาน** | |
| 1 | ผู้ที่สัมผัสกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาต้องพึงระลึกอยู่เสมอว่าผู้ที่สัมผัสหรือผู้ปฏิบัติงาน สามารถเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนได้ |
| 2 | ผู้ที่เป็นโรคระบบทางเดินหายใจไม่สามารถเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและไม่สามารถสัมผัสอุปกรณ์ในห้องทดลองได้ ถ้าหากไม่สวมหน้ากากอนามัยป้องกันเสียก่อน |
| **การเตรียมและเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ** | |
| 1 | ต้องสวมถุงมือยาง และถอดออกเมื่อเตรียมน้ำเชื้อเสร็จสิ้น |
| 2 | ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่มือ เช่น เอทานอล 70% เพื่อลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อจากตัวปลาสู่น้ำเชื้อปลา |
| 3 | ทำความสะอาดอวัยวะสืบพันธุ์และบริเวณรอบๆ ช่องเพศด้วยกระดาษที่เช็ดแล้วทิ้ง |
| **กระบวนการเก็บน้ำเชื้อและสุขอนามัยในห้องปฏิบัติการ** | |
| 1 | ใช้อุปกรณ์ที่ใช้แล้วทิ้งถ้าหากมีความพร้อมด้านงบประมาณ |
| 2 | ต้องใส่หน้ากากอนามัยและเสื้อกาวน์เพื่อลดการปนเปื้อนให้น้อยที่สุด |
| 3 | อุปกรณ์ที่นำกลับมาใช้ใหม่จะต้องฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เช่น อุปกรณ์ แก้ว (บีกเกอร์) และน้ำที่นำมาละลายน้ำเชื้อแช่แข็งต้องฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ |
| 4 | ทำความสะอาดอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น อุปกรณ์พลาสติก (ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ท่อพลาสติก ภาชนะที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยความร้อนได้ ด้วยเอทานอล 70% (non-denatured) แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง และตากให้แห้งเพื่อไม่ให้มีแอลกอฮอล์หลงเหลืออยู่ |
| 5 | ลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในสารละลายน้ำเชื้อและสารละลายอื่นๆ ที่ใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยความร้อนได้ ด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm |
| 6 | ฆ่าเชื้อบริเวณปฏิบัติงานที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งก่อนและหลังการใช้งานด้วยเอทานอล 70% |
| 7 | ถูพื้นบริเวณห้องปฏิบัติงานหลังจากเสร็จสิ้นการใช้งานด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีองค์ประกอบของสารฆ่าเชื้อ เช่น Benzalkonium chloride, Ethoxylated alcohol |
| 8 | แบ่งส่วนอุปกรณ์หรือน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็งให้มีความพอดีสำหรับการใช้งานในแต่ละครั้ง |

**ตารางที่ 4** ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่พบในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่รวบรวมจากวิธีการรีดน้ำเชื้อที่ แตกต่างกัน (ดัดแปลงจาก Boonthai และคณะ [19])

| วิธีการทดลอง | ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/mL) | | |
|---|---|---|---|
| | แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด | แบคทีเรียแกรมลบ | แบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads |
| การรีดน้ำเชื้อด้วยมือโดยไม่ล้างบริเวณช่องเพศ (T1) | $5.60\pm1.73\times10^{5a}$ | $5.35\pm0.99\times10^{5a}$ | $3.31\pm1.22\times10^{4a}$ |
| การรีดน้ำเชื้อด้วยมือโดยล้างบริเวณช่องเพศ (T2) | $6.63\pm2.76\times10^{4b}$ | $4.57\pm2.48\times10^{4b}$ | $7.60\pm1.95\times10^{3b}$ |
| การรีดน้ำเชื้อโดยการใช้สายสวนและไม่ล้างบริเวณช่องเพศ (T3) | $3.01\pm0.32\times10^{4b}$ | $2.17\pm0.76\times10^{4b}$ | $3.24\pm1.30\times10^{3b}$ |
| การรีดน้ำเชื้อโดยการใช้สายสวนร่วมกับล้างบริเวณช่องเพศ (T4) | $7.87\pm2.00\times10^{3c}$ | $5.63\pm2.74\times10^{3c}$ | $6.30\pm2.88\times10^{2c}$ |

**หมายเหตุ:** ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่ยกขึ้นในคอลัมน์เดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)




**รูปที่ 3** สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปชนิดต่างๆ ที่พบในน้ำเชื้อที่เก็บรวบรวมด้วยการรีดด้วยมือหรือสายสวนร่วมกับการล้างช่องเพศหรือไม่ล้างช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ [19]

3.2 การควบคุมหรือการลดการปนเปื้อนด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำเชื้อ

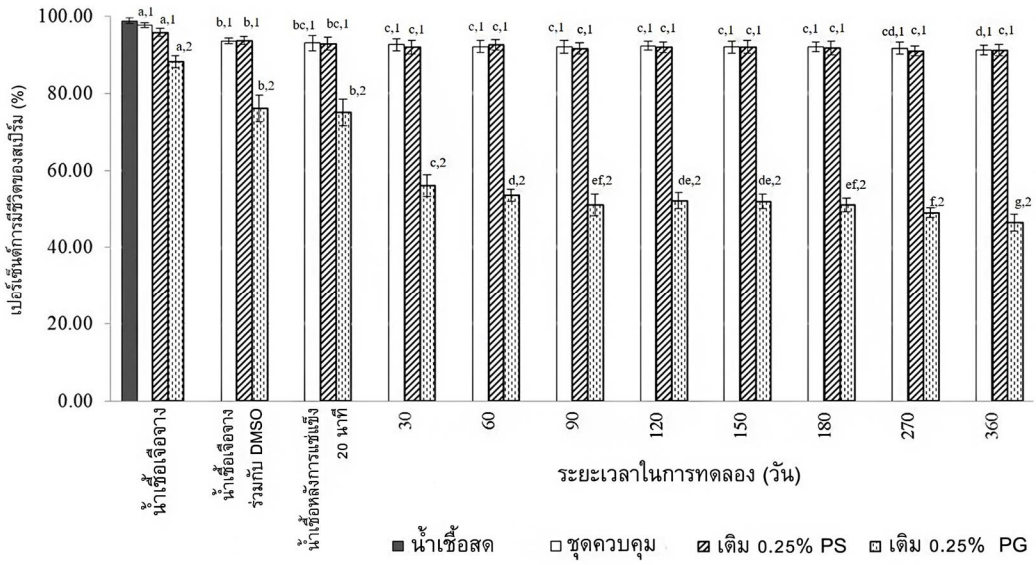
การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันทั่วไปเพื่อป้องกันการปนเปื้อนหรือยับยั้งการติดเชื้อของแบคทีเรียยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม Aminoglycosides, Penicillins และอนุพันธ์ของยากลุ่มดังกล่าวนิยมนำมาใช้เพื่อควบคุมการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลา ยกตัวอย่างเช่น Viveiros และคณะ [22] ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 0.1 mg/mL เติมลงในน้ำเชื้อปลา Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) แช่เย็น โดยมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะในปลาชนิดอื่นๆ อีก เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลาแซลมอนแอตแลนติก (*Salmo salar*) ปลาเทราต์สีน้ำตาล (*Salmo trutta*) และปลาดุกอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) [23-25] รวมถึงได้มีการนำมาใช้ในน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาว โดย Boonthai และคณะ [14] ได้ทำการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกันระหว่าง Penicillin–Streptomycin (PS) ความเข้มข้น 0.25% และ Penicillin–Gentamicin (PG) ความเข้มข้น 0.25% พบว่ายาปฏิชีวนะร่วม PG ความเข้มข้น 0.25% นั้นสามารถลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะร่วม PS (ตารางที่ 5) นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะยังสามารถลดจำนวนชนิดของแบคทีเรียได้ เมื่อเติมยาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.25% สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum, B. safensis*, *A. punctata* subsp. *caviae*, *S. plymuthica*, *Pseudomonas* sp. และ *P. azotoformans* ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ PG ความเข้มข้น 0.25% นั้นสามารถกำจัดแบคทีเรียได้หลายชนิดมากกว่า PS ได้แก่ *B. subtilis* subsp. *inaquosorum, B. safensis*, *A. punctata* subsp. *caviae*, *C. testosteroni*, *Br. laterosporus*, *Sp. paucimobilis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila, S. plymuthica, Pseudomonas* sp., *P. azotoformans* และ *P. fluorescens* [14]

แม้ว่าการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะสามารถลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงคุณภาพของน้ำเชื้อด้านอื่นด้วยเช่นกัน เช่น อัตราการปฏิสนธิกับไข่ของน้ำเชื้อ เป็นต้น โดยยาปฏิชีวนะจะต้องไม่เป็นพิษต่อสเปิร์ม ดังรายงานวิจัยของ Boonthai และคณะ [14] แสดงให้เห็นว่า แม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะร่วม PG ความเข้มข้น 0.25% สามารถลดปริมาณแบคทีเรียและกำจัดแบคทีเรียบางชนิดได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะร่วม PS ความเข้มข้น 0.25% แต่เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เติมยาปฏิชีวนะร่วม PG ความเข้มข้น 0.25% มีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เติมยาปฏิชีวนะร่วม PS ความเข้มข้น 0.25% อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4) จากการสังเกตลักษณะโครงสร้างของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ทำให้พบความแตกต่างระหว่างสเปิร์มที่เติมยาปฏิชีวนะร่วม PS ความเข้มข้น 0.25% และยาปฏิชีวนะร่วม PG ความเข้มข้น 0.25% (รูปที่ 5) ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) ของสเปิร์มที่เติมยาปฏิชีวนะ PG ได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง รวมถึงสูญเสียไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) รอบๆ ส่วนกลางตัวเซลล์สเปิร์ม (Midpiece) [26] แต่ในทางตรงกันข้ามเซลล์สเปิร์มที่เติม PS นั้นมีลักษณะปรกติไม่แตกต่างจากเซลล์ของสเปิร์มในชุดควบคุมที่เป็นน้ำเชื้อสด ดังนั้นการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ PS ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อและลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

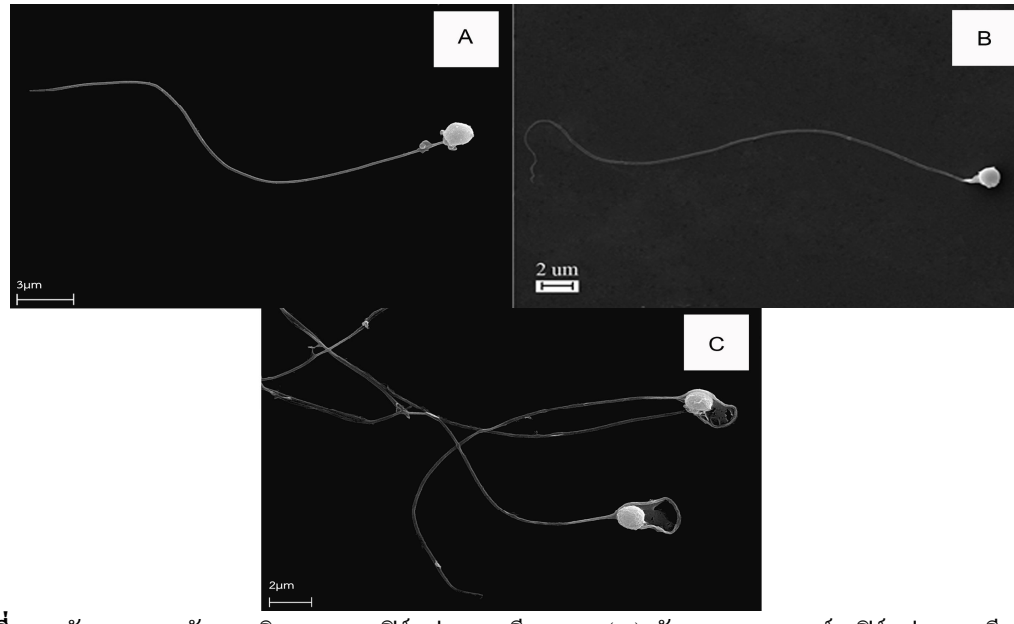
**ตารางที่ 5** ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ที่ตรวจพบในน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะร่วมกัน Penicillin–Streptomycin (PS) ความเข้มข้น 0.25% และ Penicillin–Gentamicin (PG) ความเข้มข้น 0.25% (ดัดแปลงจาก Boonthai และคณะ [14])

| กลุ่มแบคทีเรีย | ชุดการทดลอง | ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/mL) |
|---|---|---|
| แบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด | ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมยาปฏิชีวนะ | $5.4 \pm 1.6 \times 10^{3}$ [a] |
| | เติม 0.25% PS | $8.3 \pm 4.9 \times 10^{2}$ [b] |
| | เติม 0.25% PG | ไม่พบ [c] |
| แบคทีเรียแกรมลบ | ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมยาปฏิชีวนะ | $3.8 \pm 1.9 \times 10^{3}$ [a] |
| | เติม 0.25% PS | $2.7 \pm 0.6 \times 10^{1}$ [b] |
| | เติม 0.25% PG | $3.0 \pm 1.0 \times 10^{1}$ [b] |
| แบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads | ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมยาปฏิชีวนะ | $2.5 \pm 0.9 \times 10^{2}$ [a] |
| | เติม 0.25% PS | $2.3 \pm 0.5 \times 10^{1}$ [b] |
| | เติม 0.25% PG | ไม่พบ [b] |

**หมายเหตุ:** ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่ยกขึ้นในคอลัมน์เดียวกันและแบคทีเรียกลุ่มเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$); PS คือ Penicillin–Streptomycin และ PG คือ Penicillin–Gentamicin




**รูปที่ 4** เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่เติมยาปฏิชีวนะและไม่ได้เติมยาปฏิชีวะนะ ภายในระยะการเก็บรักษา 360 วัน ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; ตัวอักษรที่ยกขึ้นในชุดการทดลองเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา และ ตัวเลขที่ยกขึ้น ณ ช่วงเวลาเดียวกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) ของแต่ละชุดการทดลอง [14]




**รูปที่ 5** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (A) ลักษณะของเซลล์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวปรกติของน้ำเชื้อสด; (B) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวปรกติในชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin–Streptomycin (PS) และ (C) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin–Gentamicin (PG) ที่พบการหลุดลอกของเยื่อหุ้มเซลล์ออกจากหัวสเปิร์ม [26]

## สรุป

การปนเปื้อนแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อปลาแช่แข็งลดลง ไม่ว่าจะเป็นการลดลงของการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบางชนิดเช่น *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens* สามารถรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและมีความสามารถในการถ่ายทอดไปยังปลาตะเพียนขาววัยอ่อนที่เกิดจากการผสมเทียม การปนเปื้อนแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เริ่มตั้งแต่การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายน้ำเชื้อและสารไครโอโพรเทคแทนต์ การลดอุณหภูมิ และการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว โดยแหล่งที่มาที่สำคัญของการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อ คือ น้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ครีบก้นปลาซึ่งเป็นบริเวณที่มักสัมผัสกับน้ำเชื้อระหว่างการรีดน้ำเชื้อ และอุจจาระและปัสสาวะที่มักปนเปื้อนในน้ำเชื้อ นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อหรือบริเวณที่ปฏิบัติงานยังเป็นแหล่งของการปนเปื้อนแบคทีเรียได้เช่นเดียวกัน ไม่ว่าจะเป็นไนโตรเจนเหลวที่ใช้เก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อ หลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง ถุงมือยาง และอากาศภายในห้องปฏิบัติงาน ดังนั้นการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ เพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและลดการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรค การลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อสามารถดำเนินการได้ง่ายๆ ด้วยการปฏิบัติตามแนวทางการปฏิบัติงานที่ถูกหลักสุขอนามัยสำหรับห้องปฏิบัติการที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยเริ่มจากการสร้างความตระหนักของผู้ปฏิบัติงานในเรื่องการส่งผ่านการปนเปื้อนของแบคทีเรีย การทำความสะอาดห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ การปฏิบัติระหว่างการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ การเตรียมน้ำเชื้อและน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จนไปถึงข้อปฏิบัติหลังเสร็จสิ้นการใช้งานห้องปฏิบัติการ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรียจากแหล่งปนเปื้อนสำคัญ ได้แก่ น้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ครีบก้นปลา และอุจจาระและปัสสาวะ ข้อปฏิบัติหนึ่งที่แนะนำสำหรับการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ คือ การล้างช่องเพศปลาด้วยน้ำปราศจากเชื้อและเช็ดให้แห้งก่อนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อโดยการใช้สายสวน รวมทั้งผู้ปฏิบัติงานต้องไม่นำน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะมาใช้แช่แข็ง นอกจากนี้ยังมีอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ คือ การเติมยาปฏิชีวนะผสมระหว่าง Penicillin และ Streptomycin ความเข้มข้น 0.25% ลงในน้ำเชื้อปลาเจือจาง การเติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งและลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามข้อควรระวังของการใช้ยาปฏิชีวนะผสมชนิดนี้ คือ ยาปฏิชีวนะผสม PS ไม่มีศักยภาพในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรค คือ *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens* ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะผสมชนิดนี้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิด การพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาแช่แข็งโดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อจึงควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อที่จะได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพสูง ลดการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรค และเพิ่มศักยภาพในการปรับปรุงสายพันธุ์และเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงให้ปลอดโรคเพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียมให้ได้ลูกพันธุ์ที่แข็งแรงไม่เป็นโรคต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

บทความวิชาการเรื่องนี้ได้รวบรวมองค์ความรู้มาจากผลงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ของ ดร.ไตรมาศ บุญไทย และ รศ.ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุน สถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

1. Fisheries development policy and strategy division. (2016). Fisheries statistics of Thailand. 56th Edition. Bangkok. Department of Fisheries. p. 9-19. (in Thai)
2. Kilavanit, A., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2017). Cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm with dry ice. *Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Journal*, *10*(2), 84-91. (in Thai)
3. Anusorn, T. (2011). Mangsapochana: meat for healthy. Bangkok. Matichon, Inc. p. 168. (in Thai)
4. Kilavanit, A., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2017). Development of cryopreservation technique of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm frozen in the straw using dry ice. Proceedings of the 2nd Rajabhat Maha Sarakham University Graduate Reserach Conference (RMU GRC 2nd); 20 January 2017. Maha Sarakham. Thailand. p. 607-612. (in Thai)
5. Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T., & Nimrat, S. (2015). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research*, *46*, 2443–2451.
6. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2016). Evaluation of the potential source of bacterial contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Aquaculture Research*, *47*, 2101–2113.
7. Nimrat, S. Sunjondee, A., & Vuthiphandchai, V. (2011). Effect of *Capsicum annuum* Linn. extract and antibiotics on sperm motility rate and total heterotrophic bacteria in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Naresuan University Science Journal*, *8*(1), 57-71. (in Thai)
8. Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2014). Sustainabte devetopment of storage technotogy of striped catfish (*Pongasianodon hypophtholmus*) mitt for commerciai and conservation. Chonburi. Thailand. p. 37. (in Thai)
9. Bielanski, A., & Vajta, G. (2009). Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, *24*, 2457–2467.
10. Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish. *The Scientific World Journal*, *6*, 931–945.

11. Olojo, E. A. A., Amusa, N. A., Osho, A., & Badejo, V. O. (2010). Commensal bacterial flora of *Synodontis nigrita* and *Clarias gariepinus* from river Osum, southwest Nigeria, Nigeria. *Research Journal of Applied Sciences, 5*, 231–235.
12. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*, 35–73.
13. Khalil, S. A., Khalil, R. H., Saad, T. T., & Safaa, M. H. (2010). Studies on pseudomonas septicemia among cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Arabian Aquaculture Society, 5*, 55–64.
14. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2016). Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. *Animal Reproduction Science*, *166*, 36–46.
15. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2018). *In vitro* Inoculation of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* in cryopreserved silver barb (*Barbodes gonionotus*) milt: effect on fertilization capacity and transmission potential to embryos. *Theriogenology*, *108*: 1-6.
16. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2016). Influence of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* on motility, viability and morphometry of cryostored silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Cryobiology*, *73*: 140-146.
17. Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Schroeder-Printzen, I., Michelmann, H. W., Schiefer, H. G., & Weidner W. (2003). Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters *in vitro*. *Andrologia*, *35*: 100–105.
18. Diemer, T., Huwe, P., Michelmann, H. W., Mayer, F., Schiefer, H. G., & Weidner, W. (2000). *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *International Journal of Andrology, 23*(3): 178-186.
19. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2016). Semen collection methods affect the bacterial composition of post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Animal Reproduction Science*, *166*: 90–98.
20. Glogowski, J., Kwasnik, M., Piros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., & Ciereszko, A. (2000). Characterization of Rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*, *31*: 289–296.
21. Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Le Delliou, H., & Billard, R. (1998). Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, *169*: 247–262.
22. Viveiros, A. T. M., Isau, Z. A., Figueiredo, H. C. P., Leite, M. A. S., & Maria, A. N. (2010). Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *Journal of the World Aquaculture Society, 41*: 57–65.

23. Saad, A., Billard, R., Theron, M. C., & Hollebecq, M. G. (1988). Short-termpreservation of carp, *Cyprinus carpio*, semen. *Aquaculture, 71*: 133–150.
24. Stoss, J., & Refstiea, T. (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, *30*(1–4): 229-236.
25. Christensen, J. M., & Tiersch, T. R. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society, 27*: 340–346.
26. Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2016). Morphological and morphometric evaluation of silver barb, *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1849) sperm supplemented with antibiotics. *Journal of Applied Ichthyology*, *32*: 480-485.