

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2

เรื่อง
การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำ
ในถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย
Application of Thai medicinal plants for removal of human and
aquatic animal pathogenic bacteria in Banana prawn (*Penaeus
merguiensis*) spermatophores

โดย
สุบัณฑิต นิมรตน¹
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย²

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

016 05 91
20 พ.ย. 2556

329339

เริ่มบริการ

-4 ก.พ. 2557

เสนอต่อ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำใน
ถุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย (Application of Thai medicinal plants for removal of human and
aquatic animal pathogenic bacteria in Banana prawn (*Penaeus merguensis*)
spermatophores) สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการ
วิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 ข้าพเจ้าและคณะผู้ทำงานขอขอบคุณภาควิชาวชิ-
ศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกในการ
ทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ

สุบัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ตุลาคม 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำใน ถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในปีที่ 2 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถู้งน้ำเชื้อ กุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ตอน ได้แก่ 1) การศึกษาถึงสารละลาย บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง 2) ความเป็นพิษของสารไครโอ- โพรเทคแทนท์ต่อถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง 3) อัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถู้งน้ำเชื้อ กุ้งแชบ๊วยและ 4) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม จากการศึกษพบว่า Ca-Free saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถู้งน้ำเชื้อ กุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง ส่วนความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาถู้งน้ำเชื้อ กุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง พบว่า Sucrose และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 10 % มีความเป็น พิษต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยต่ำ เนื่องจากรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถู้งแชบ๊วยสูงกว่าสารไครโอ- โพรเทคแทนท์ชนิดอื่น สำหรับอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยพบว่าการ เติมน้ำ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline โดยใช้อัตรา การลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มถู้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ได้สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาผลของอุณหภูมิใน การละลายต่อสเปิร์มที่มีชีวิตของถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศา- เซลเซียส นาน 5 นาที มีความเหมาะสมในการละลายถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่าวิธีการแช่แข็งถู้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติมน้ำ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ส่วน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

คำสำคัญ: การแช่แข็ง; กุ้งแชบ๊วย; ถู้งน้ำเชื้อ; DMSO

ABSTRACT

The purpose of research work entitle “application of Thai medicinal plants for removal of human and aquatic animal pathogenic bacteria in banana prawn (*Penaeus merguensis*) spermatophores” in the second year was to optimize cryopreservation protocol of banana prawn spermatophore. The experiment was divided to 4 phases including determination of 1) suitable buffer solution for cryogenic storage of banana prawn spermatophore, 2) cryoprotectant cytotoxicity on banana prawn sperm, 3) suitable cooling rate for cryostorage and 4) suitable temperature for thawing cryopreserved spermatophore of banana prawn. Results showed that Ca-Free saline was the suitable buffer solution for cryopreservation of banana prawn spermatophore. For toxicity test of cryoprotectants on banana prawn spermatophore, sucrose and DMSO at 5% and 10% exhibited relatively less toxic because of retaining the significant percentage ($P < 0.05$) of viable sperm, compared to other cryoprotectants. In case of cooling-rate effect on cryostored banana prawn spermatophore, successful cryopreservation of spermatophores in liquid nitrogen was achieved by incorporation of 5% DMSO into Ca-Free saline following use a cooling rate of 1 °C/min between 25 and -80 °C before storing in liquid nitrogen tank due to sustaining the higher percentage ($P < 0.05$) of sperm viability than that of other cooling rates. Finally, for the effect of thawing temperature on viable sperm of banana prawn, optimal thawing was at 30 °C for 5 min. This study could be concluded that the most efficacious protocol for cryostorage of banana prawn spermatophore in 1.5-mL cryotube included dilution of the spermatophore in Ca-Free saline containing 5% DMSO as a cryoprotectant with use a one-step cooling rate of 1 °C/min between 25 and -80 °C prior to submerging in liquid nitrogen and thawing cryostored spermatophore at 30 °C for 5 min.

Key words: Cryostorage; banana prawn; Spermatophore; DMSO

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อ.....	iii
Abstract.....	iv
สารบัญ.....	v
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญภาพ.....	vii
บทที่	
1 ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
4 ผลการทดลอง.....	27
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	44
เอกสารอ้างอิง.....	48
Output จากโครงการวิจัย.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แบบที่เรียกกลุ่มไวรัสโอที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์.....	8
2	ปริมาณแบบที่เรียกกลุ่มไวรัสโอที่พบในหอยแมลงภู่งจากทะเล Adriatic ประเทศ อิตาลี.....	10
3	แบบที่เรียกกลุ่มไวรัสโอที่พบในตัวอย่างจากปลาทะเล กุ้ง และหอย.....	10
4	แบบที่เรียกกลุ่มไวรัสโอที่แยกได้จากสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ.....	12
5	แบบที่เรียกกลุ่มไวรัสโอที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งในประเทศอิหร่าน.....	13
6	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอโรโมแนส.....	15
7	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังจากการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส โดยใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลด อุณหภูมิแตกต่างกัน.....	40
8	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังจากตั้งไว้ 5 นาที หลังการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิ จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส และใช้สารโครีโอโพรเทค แทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน.....	41
9	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส และใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิ แตกต่างกัน และเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง.....	42
10	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ - 1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศา เซลเซียส.....	43
11	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ละลายที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ กัน.....	43

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กุ้งแชบ๊วย.....	5
2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar.....	7
3 ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส.....	14
4 แหล่งที่พบแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส.....	14
5 อาการติดเชื้อจาก <i>A. hydrophila</i> ที่บริเวณผิวหนัง.....	15
6 ลักษณะของปลาที่เป็นโรค MAD.....	17
7 (a) ลักษณะรูปร่างของ <i>Pseudomonas</i> spp. (b) ลักษณะรูปร่างของ <i>Leucothrix</i> spp.....	18
8 พืชพันธุ์กุ้งแชบ๊วย.....	22
9 การดองน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย.....	23
10 ดองน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วย.....	23
11 การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย.....	24
12 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	28
13 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	30
14 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	31
15 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	32
16 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	33
17 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	34
18 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	35
19 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	36
20 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Trehalose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	37
21 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ.....	38

บทที่ 1

ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจเป็นอุตสาหกรรมที่มีการขยายตัวอย่างกว้างขวางทั่วโลก เนื่องจากสัตว์น้ำจากธรรมชาติไม่สามารถสนองความต้องการของประชากรที่กำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจึงทำให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นทั่วโลก การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในแต่ละประเทศจะมีลักษณะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันตามภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสม ในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญ คือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งขาววานาไม (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งขาวอินเดีย (*L. indicus*) และกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) (ประจวบ, 2527) การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอาชีพที่มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะผลผลิตกุ้งที่มีอยู่ในประเทศสามารถสร้างมูลค่าในการส่งออก และยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย อีกทั้งความต้องการบริโภคกุ้งทะเลเศรษฐกิจในตลาดโลกที่สูงขึ้นเป็นผลให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างรวดเร็ว (Nimrat et al., 2005; 2008; Vuthiphandchai et al., 2007) ซึ่งจะเห็นได้จาก ในปี พ.ศ. 2548 ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งทะเลจากฟาร์มเลี้ยงทั่วประเทศปริมาณรวม 401,250 ตัน มูลค่า 45,978.7 ล้านบาท

แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้อุตสาหกรรมกุ้งเป็นอุตสาหกรรมต่อเนื่อง จึงควรมียุทธศาสตร์กุ้งทะเลในเชิงรุก โดยประเทศไทยในปัจจุบันมีการส่งออกกุ้งขาวเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาคือ กุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย แต่อุตสาหกรรมกุ้งทะเลของไทยนั้นยังมีความมั่นคงเท่าที่ควร เนื่องจากกุ้งขาวที่เป็นกุ้งส่งออกอันดับหนึ่งนั้นเป็นกุ้งนำเข้า ไม่ได้มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคของเราและมีประวัติในการประสบปัญหาโรคระบาดในหลายประเทศก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในประเทศไทย ยกตัวอย่างเช่น ประเทศไต้หวัน เป็นต้น ส่วนกุ้งกุลาดำในปัจจุบันประสบปัญหาในการเลี้ยงไม่ว่าจะเป็นปัญหาทางด้านราคาตกต่ำ โรคระบาดค่อนข้างรุนแรงโดยเฉพาะในช่วงฤดูหนาว กุ้งแคะแกรน เป็นต้น ทำให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำลดลง เกษตรกรหลายรายถึงกับต้องหยุดหรือพักบ่อ บางรายหันมาเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยทดแทน เพราะเห็นว่าราคาลูกพันธุ์ไม่แพง วิธีการเลี้ยงก็ไม่แตกต่างจากกุ้งกุลาดำ (ไชยา อัยสุนเนิน, 2532)

ในปัจจุบันกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) ก็เป็นกุ้งทะเลอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ตลาดมีความต้องการทั้งภายในและภายนอกประเทศ เพราะกุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่มีเปลือกบาง เนื้อมาก รสชาติดีไม่น้อยไปกว่ากุ้งกุลาดำ นอกจากนี้กุ้งแชบ๊วยยังเป็นกุ้งที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงน้อย ราคาสูง เจริญเติบโตได้ดีถึงขนาดที่ตลาดต้องการได้แม้ว่าจะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงซึ่งมีพื้นที่จำกัด มีอัตราการรอดตายของลูกกุ้งในระยะ 3 เดือนแรกสูง จึงมีการสูญเสียน้อย ถึงแม้ว่ากุ้งแชบ๊วยจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในบ่อแต่ยังพบการระบาดของโรคไม่มากนัก (สุวิทย์ ชื่นสินธุ์, 2531)

ในปัจจุบันแบคทีเรียก่อโรคต่อมนุษย์นั้นสามารถติดต่อมาจากกุ้งทะเลรวมทั้งกุ้งแชบ๊วย ยกตัวอย่างเช่น *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* และในปัจจุบันมีการขนส่ง กุ้งแชบ๊วยด้วยวิธีการทั้งแช่เย็นและแช่แข็งเพื่อการพัฒนาศักยภาพของอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อแก้ปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นและพัฒนาภาคเกษตรให้มีความเข้มแข็ง โดยสร้างและพัฒนา คุณภาพเกษตรกรรุ่นใหม่ให้มีความสามารถในการบริหารจัดการผลผลิตและการบริหารองค์กร รูปแบบ ต่าง ๆ ด้วยองค์ความรู้จากนวัตกรรม ภูมิปัญญาท้องถิ่นและเทคโนโลยีที่เหมาะสม ผ่านระบบการเรียนรู้ทั้งในและนอกระบบการศึกษา รวมทั้งเพื่อเสริมสร้างความมั่นคงภาคเกษตร และสังคมไทยตามนโยบายของรัฐบาล จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิจัยเชิงรุกเพื่อเป็นการ เตรียมการล่วงหน้าในการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับกุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นกุ้งของไทยที่อาจจะช่วยเสริม ความเข้มแข็งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลไทยและทำให้กุ้งแชบ๊วยสามารถทดแทนการ เพาะเลี้ยงกุ้งขาวในกรณีกุ้งขาวเกิดวิกฤตการณ์ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ โดยในการศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้น ศึกษาอุบัติการณ์แบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในกุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยภายใต้สภาวะการเก็บรักษา กุ้งน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบระยะสั้น คือ การแช่เย็น และการเก็บรักษาระยะยาว คือ การแช่แข็ง เพื่อนำกุ้งน้ำเชื้อของกุ้งแชบ๊วยเหล่านี้มาใช้ผสมกับแม่พันธุ์กุ้งแชบ๊วยต่อไป ในประเทศไทย การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียก่อโรคต่อมนุษย์และสัตว์น้ำภายใต้การเก็บน้ำเชื้อ (milt) หรือกุ้งน้ำเชื้อ (spermatophores) ของสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำยังมีอยู่น้อยมากจึงทำให้มีข้อมูลที่จะป้องกันการแพร่ ระบาดของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 กลุ่ม ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นถ้ามีข้อมูลดังกล่าวจะสามารถป้องกันการแพร่ระบาดของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ก่อนนำ กุ้งน้ำเชื้อไปใช้หรือขณะที่ต้องมีการเก็บรักษาทั้งระยะสั้นและระยะยาวด้วยเทคนิคการเก็บรักษา กุ้งน้ำเชื้อด้วยการแช่เย็นและแช่แข็งก็จะสามารถนำกุ้งน้ำเชื้อเหล่านั้นมาใช้ในการผลิตลูกกุ้งได้ตาม ต้องการ พร้อมทั้งการลดอุบัติการณ์เกิดโรคระบาดที่เกิดจากกุ้งแชบ๊วย

นอกจากนี้ในการศึกษาของชุดโครงการวิจัยนี้จะมีการประยุกต์ใช้สารประกอบสมุนไพร ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อก่อโรคควบคู่กับการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยทั่วไปสมุนไพร จะถูกนำไปใช้เป็นยาต้านจุลชีพในรูปของสารสกัดและรูปของผง ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญ ของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเมล็ดพริกไทย (*Xylopi aethiopica*) ด้วย เอทานอลถูกนำไปใช้ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Salmonella typhi* และ *Proteus vulgaris* (Okeke et al., 2001) สารสกัด จากใบสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) กระเพรา (*Ocimum sanctum*) และหน่อขิง (*Zingiber officinalis*) มีผลในการยับยั้ง *Alternaria tritricina* (Parveen and Kumar, 2000) และ สารสกัดจากสาหร่ายท่อนและสาหร่ายสีแดงมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้เช่นกัน (Booma Kasthuri, 1998)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งในสภาพที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้แช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง และปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อ
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารโคริโอโพรเทคแทนท์ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแบบแช่แข็ง
4. เพื่อศึกษาถึงผลของอัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง
5. เพื่อศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแช่แข็ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องประกอบด้วยหัวข้อดังนี้

1. กุ้งแชบ๊วย
2. แบคทีเรียที่พบในกุ้ง
3. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่เย็น-แช่แข็งน้ำแข็งสัตว์น้ำ

1. กุ้งแชบ๊วย

1.1 ลักษณะอนุกรมวิธาน

กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) มีชื่ออื่นว่า กุ้งแชบ๊วยขาว กุ้งหางแดง กุ้งหางดอก กุ้งกะทิ กุ้งขาว มีชื่อสามัญ คือ Banana prawn หรือ White prawn (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544) มีอนุกรมวิธาน ดังนี้ (ประจวบ หล้าอุบล, 2525)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Natantia

Section Penaeidea

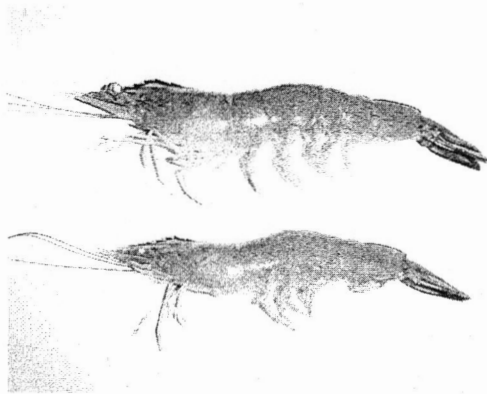
Genus *Penaeus*

Species *merguensis*

1.2 ลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะของกุ้งแชบ๊วย คือ ลำตัวจะเป็นข้อปล้อง มีทั้งหมด 19 ปล้อง แต่ละปล้องจะมีรูปร่างอยู่หนึ่งคู่ แต่ละคู่มีหน้าที่แตกต่างกันไป ลำตัวกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ หัว ออกและส่วนท้อง (ภาพที่ 1) ส่วนหัวจะมี 5 ปล้อง แต่จะมีเปลือกหุ้มรวมเป็นปล้องเดียวกัน ที่ปล้องแรกหน้าสุดของเปลือกหุ้มจะมีฟันแหลมยื่นออกมา ที่เรียกว่า กริ (rostrum) (ไชยา อัยสุนเนิน, 2532) โดยกริมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายกริจะยาวเลยปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 เล็กน้อย (ในกุ้งขนาดเล็กกริจะมีขนาดยาวมากและโค้งเรียว โคนกริไม่ยกสูงขึ้นเป็นรูปสามเหลี่ยม) ขอบด้านบนมีฟัน 7-8 ซี่ ขอบด้านล่างมีฟัน 4-5 ซี่ สันและร่องข้างกริยาวไม่ถึงฟันกริที่อยู่เหนือกระเพาะอาหาร ที่ได้กริจะมีตา 1 คู่ ทั้งกุ้งเพศผู้และเพศเมียจะมีความยาวของแดกทิลลัส (dactylus) ประมาณ 0.5-0.6 เท่าของโปรโตดัส (protodus) แต่ในกุ้งเพศผู้จะมีกลุ่มขนที่บริเวณโคนของแดกทิลลัส ส่วนอกมี 8 ปล้อง และส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง ซึ่งลำตัวจะมีสีครีมปนเหลืองมีจุดสีน้ำตาล เขียวแก่และเขียวอ่อนกระจายอยู่ประปราย สันบนปล้องท้องและกริมีสีน้ำตาลปนแดง หนวดคู่ที่ 1 มีสีน้ำตาล หนวดคู่ที่ 2 มีสีน้ำตาล

ไม่มีลาย ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีเหลืองบางครั้งมีสีน้ำตาลหรือสีชมพู แพนหางและรยางค์ว่ายน้ำมีสีแดง โดยทั่วไปกุ้งชนิดนี้เมื่อโตเต็มวัยจะมีความยาวลำตัวประมาณ 7.1-16.8 เซนติเมตร และกุ้งชนิดนี้มีอายุขัยประมาณ 3 ปี (มานิช รุ่งราตรี, 2535)



ภาพที่ 1 กุ้งแชบ๊วย

(<http://www.fisheries.go.th>)

1.3 ลักษณะและความแตกต่างระหว่างเพศ

ลักษณะและความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียของกุ้งแชบ๊วยสามารถดูได้จากอวัยวะเพศเหมือนกับกุ้งกุลาดำ คือเพศเมียมีอวัยวะที่เรียกว่า ทิโลกัม (thelycum) อยู่ระหว่างโคนขาคู่ที่ 5 และขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 ในเพศผู้มีอวัยวะที่เรียกว่า พีแทสมา (petasma) ลักษณะเป็นติ่งอยู่ระหว่างโคนขาเดินคู่ที่ 1 (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544)

1.4 ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือสเปิร์ม

ลักษณะสเปิร์มของกุ้งแชบ๊วย คือ มีส่วนหัวขนาดใหญ่รูปร่างค่อนข้างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 ไมโครเมตร และส่วนหางมีลักษณะสั้นหนา

1.5 การผสมพันธุ์และวางไข่

ภายหลังจากที่กุ้งเพศผู้กับเพศเมียผสมพันธุ์แล้ว กุ้งเพศผู้จะสอดถุงเก็บน้ำเชื้อไปเก็บไว้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย เมื่อกุ้งเพศเมียมีการพัฒนาการของรังไข่เต็มที่จะมีการวางไข่ พฤติกรรมการวางไข่ของกุ้งเพศเมียนั้นกุ้งจะว่ายวนไปรอบ ๆ บ่อเพาะฟักในระดับกลางน้ำ บางครั้งจะว่ายต่ำกว่าระดับผิวน้ำเล็กน้อย และว่ายไปอย่างช้า ๆ ก่อนที่จะวางไข่นั้นจะแสดงอาการกระวนกระวายหรือจะว่ายน้ำไปมาสักครู่จะวางไข่ ขณะที่กำลังวางไข่จะจ่อส่วนหางเข้าหาลำตัวทางด้านหน้าท้องจนกระทั่งถึงลำตัวปล้องที่ 4 ขาเดินทั้ง 5 คู่ จะจ่อและกดส่วนนอกแน่น ในเวลาเดียวกันขาว่ายน้ำจะโบกไปข้างหน้าและหลังอย่างสม่ำเสมอ ส่วนปลายขาเดินคู่ 3 คู่หลัง จะเคลื่อนไหวไปทางซ้ายและขวาอย่างช้า ๆ น้ำจะเกิดการหมุนเวียนเนื่องจากการโบกของขาว่ายน้ำ ทำให้ไข่ถูกปล่อยออกมา

ทางช่องเปิดซึ่งอยู่ทางช่องขาคู่ที่ 3 กระจัดกระจายเป็นสายออกไปทางด้านหลังและค่อยๆ จมลงสู่พื้น บ่อและมีการพัฒนาของคัพภะต่อไป (บุญชู จงอ่อน, 2548)

1.6 การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อมีความสำคัญในระบบการเพาะเลี้ยง รวมทั้งกระบวนการแช่เย็นเป็นอย่างมาก เพราะการประเมินน้ำเชื้อนั้นจะทำให้คาดการณ์ได้ล่วงหน้าถึงความสามารถของน้ำเชื้อในการปฏิสนธิกับไข่ ซึ่งการแช่เย็นนั้นจะต้องทำการทดสอบน้ำเชื้อก่อนว่ามีคุณภาพหรือไม่ เพราะถ้าใช้น้ำเชื้อที่ไม่มีคุณภาพตั้งแต่เริ่มต้นแล้ว ผลการแช่เย็นน้ำเชื้อก็จะได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีความสำคัญเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการศึกษาวิจัยผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและเพื่อเป็นการหาข้อมูลสำหรับกำหนดอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางที่เหมาะสมให้น้ำเชื้อที่จะใช้ในการผสมเทียมมีจำนวนสเปิร์มมากพอที่จะกระทบกระเทือนต่ออัตราการปฏิสนธิ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) การประเมินน้ำเชื้อโดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้วิธีการประเมินโดยดูการเคลื่อนที่ แต่พบว่าสเปิร์มของพวกครัสเตเชียนหลายชนิด เช่น กุ้ง และพวกเตคาปอด (decapod) อื่นๆ ไม่มีการเคลื่อนที่ทำให้การประเมินโดยใช้การเคลื่อนที่กับสัตว์เหล่านี้จึงไม่สามารถทำได้เลย (Lezcano, Granja and Salazar, 2004) เห็นได้ว่าการประเมินน้ำเชื้อโดยดูการเคลื่อนที่ไม่สามารถประเมินกับสัตว์ทุกชนิด อย่างไรก็ตามกุ้งทะเลหลายชนิดรวมทั้งกุ้งแชบ๊วยนั้นสเปิร์มจะไม่มี การเคลื่อนที่เมื่อปล่อยออกมาจากตัว จึงต้องใช้การประเมินด้วยวิธีอื่นซึ่งวิธีหนึ่ง คือ การย้อมสีเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

การย้อมสีสเปิร์มเป็นการตรวจสอบสเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มไม่มีชีวิต (live-dead stain) โดยวิธีการนี้มีหลักการ คือ สเปิร์มบางชนิดเมื่อนำมาย้อมแล้ว สเปิร์มตายจะดูดซับสี ในขณะที่สเปิร์มมีชีวิตจะไม่ติดสี อันเนื่องมาจากความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะมีกลไกป้องกันไม่ให้สีผ่านเข้ามาในเยื่อหุ้มเซลล์ได้เซลล์ที่มีชีวิตจึงไม่ติดสี ย้อม โดยสีย้อมที่ใช้กันมีอยู่หลายชนิด โดยทั่วไปนิยมใช้สี eosin-nigrosin นำมาใช้ได้ผลดีสำหรับน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาที่ไม่มีไขมัน เป็นองค์ประกอบ สำหรับน้ำยาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เช่น มีไข่แดงหรือนมผง ไขมันในน้ำยาจะทำให้เกิดการติดสีไม่สม่ำเสมอทำให้การนับสเปิร์มที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตจะทำได้ไม่ถูกต้อง การย้อมสีสเปิร์มโดยใช้สี eosin-nigrosin สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีเห็นเป็นสีขาว ส่วนสเปิร์มที่ตายแล้วจะติดสี (Fribourgh, 1966)

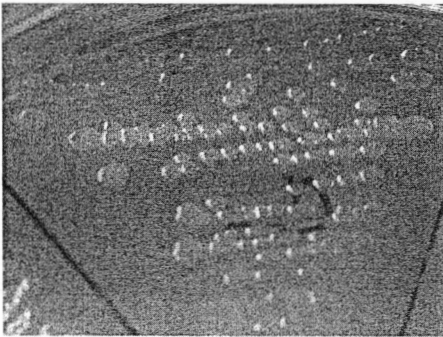
2. แบคทีเรียที่พบในสัตว์น้ำทะเล

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนและปลาเป็นอาชีพหลักที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและอุตสาหกรรมส่งออกอาหารเป็นอย่างมาก แต่ในช่วง 2 – 3 ปีที่ผ่านมาปริมาณการส่งออกสัตว์น้ำเหล่านี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำเหล่านี้ โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัวและปรสิตหลายชนิด โรคที่มักพบได้บ่อยและสร้างปัญหาให้กับผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ยกตัวอย่างเช่น โรคไวรัสโอซิส (Vibriosis) เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรียในกลุ่ม Vibrion (Vibrio) และโรคฟูรังกูโลซิส (Furunculosis) เกิดจากการติดเชื้อ Aeromonas sp. เป็นต้น แบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง

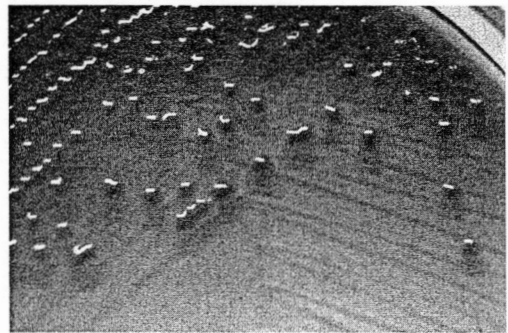
ดินในบ่อเพาะเลี้ยง (ในกรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงในบ่อดิน) และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่นแต่มีปริมาณไม่มากนัก เช่น ปนเปื้อนมาจากมูลนกพิราบ (Al-Harbi, 2003) โดยแบคทีเรียก่อโรคที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำและดินในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยน้ำกร่อยหรือน้ำเค็ม ได้แก่

2.1 แบคทีเรียกลุ่ม vibrio

แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคต่อสัตว์น้ำกลุ่มหนึ่ง แบคทีเรียกลุ่ม vibrio เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในทะเล มหาสมุทรและบริเวณปากแม่น้ำที่มีรอยต่อระหว่างน้ำเค็มและน้ำจืด แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะโคโลนี 2 สืบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar ดังแสดงในภาพที่ 2



(a)



(b)

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

(a) โคโลนีสีเหลือง (b) โคโลนีสีเขียว

(สัณติต นิมรัตน์ และวิรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

แบคทีเรียกลุ่ม vibrio มักพบปนเปื้อนอยู่ในสัตว์ทะเล ยกตัวอย่างเช่น กุ้ง หอย ปู และปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์น้ำที่มีการกินอาหารด้วยวิธีการกรองและมีการเคลื่อนย้ายถิ่นไม่มากนัก เช่น หอยนางรม จึงทำให้มีการสะสมแบคทีเรียกลุ่ม vibrio มากกว่าสัตว์น้ำที่สามารถเคลื่อนที่ไปมา เช่น กุ้ง ปู และปลา (Hoeplich et al., 1994; Rippey, 1994; Collin et al., 1995; Ripabelli et al., 1999) นอกจากนั้น Wittman and Flick (1995) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม vibrio เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คนเกิดอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงจากการรับประทานอาหารทะเลสด

แบคทีเรียกลุ่ม vibrio เป็นแบคทีเรียก่อโรค Vibriosis ในกุ้ง ปลา หอย และปูที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม (Rheinheimer, 1992; Meunpol et al., 2003) ประเทศฟิลิปปินส์มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างแพร่หลายตั้งแต่ทศวรรษที่ 1980 และเริ่มมีการเพาะเลี้ยงลดลงในช่วงกลางทศวรรษที่ 1990 เนื่องจากมีการระบาดของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio (Tendencia and de la Peña, 2001) นอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ยังก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์อีกหลายโรคดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ (สุบัญญัติ นิมรัตน์ และคณะ, 2548)

แบคทีเรีย	โรคในคน	โรคในสัตว์
<i>V. cholerae</i>	โรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง (Wittman and Flick, 1995)	ก่อโรคในกุ้ง (Gopal et al., 2005)
<i>V. parahaemolyticus</i>	โรคอาหารเป็นพิษ (Wittman and Flick, 1995)	-
<i>V. vulnificus</i>	ติดเชื้อที่กระแสน้ำเลือด (Wittman and Flick, 1995)	ก่อให้เกิดโรคเสียน้ำ โรคจุดดำในกุ้งกุลาดำ
<i>V. alginolyticus</i> *	โรคติดเชื้อที่บาดแผล หูและตาในผู้ที่มีประวัติสัมผัสกับน้ำทะเล (Braude et al., 1986)	ก่อโรคในกุ้ง (Costa et al., 1998)
<i>V. carchariae</i>	ก่อโรคในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. cincinnatiensis</i>	ก่อโรคในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. damsela</i>	ก่อโรคในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. fluvialis</i>	โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. furnissii</i>	โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. hollisae</i>	ก่อโรคในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. metschnikovii</i>	ก่อโรคในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. mimicus</i>	ก่อโรคในคน (Braude et al., 1986)	-
<i>V. anguillarum</i>	-	ก่อโรคในปลา ตัวอ่อนของหอยพัด <i>Argopecten irradians</i> (Lu et al., 2007) และหอย เป่าฮื้อ (<i>Haliotis midae</i>) (Coyne and Harding, 2007)
<i>V. harveyi</i>	-	ก่อให้เกิดโรคกุ้ง เรืองแสง
<i>V. splendidus</i>	-	สัตว์น้ำหลายชนิดและ หอยนางรม (<i>Crassostrea</i> <i>gigas</i>) ก่อให้เกิดโรค Summer syndrome (Le Roux et al., 2007)

ตารางที่ 1 แบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ (สุบัณฑิต นิมรรัตน์ และคณะ, 2548) (ต่อ)

แบคทีเรีย	โรคในคน	โรคในสัตว์
<i>V. shiloi</i>	-	ฟองน้ำทะเล (<i>Oculina patagonica</i>) เกิดโรคฟอกขาว**
<i>V. carallilyticus</i>	-	ฟองน้ำทะเล (<i>Pocillopora damicornis</i>) เกิดโรคฟอกขาว

หมายเหตุ: * เป็นแบคทีเรียกลุ่มไวรัสที่พบได้มากที่สุดหลายประเทศในทวีปยุโรปและทวีปอเมริกา (Matte et al., 1994; Sunen et al., 1995)

** หนอน fireworm (*Hermodice carunculata*) ซึ่งเป็นหนอนที่กินฟองน้ำชนิด *O. patagonica* เป็นพาหะของ *V. shiloi*

2.1.1 การแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในสัตว์ทะเลที่มาจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง

การแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในสัตว์ทะเลที่อาศัยอยู่ในท้องทะเลหรือแหล่งน้ำเค็ม รวมทั้งสัตว์ที่มาจากการเพาะเลี้ยงได้มีการศึกษามานานเพื่อทำให้ทราบถึงแหล่งที่มาและปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ ยกตัวอย่างเช่น Ripabelli et al. (1999) ได้ศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มไวรัสในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) จากทะเล Adriatic ประเทศอิตาลี พบว่าหอยแมลงภู่จำนวน 62 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มไวรัส ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มวibriโอที่พบในหอยแมลงภู่งจากทะเล Adriatic ประเทศอิตาลี (สุบัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

แบคทีเรียกลุ่มวibriโอ	จำนวนตัวอย่างที่พบแบคทีเรียกลุ่มวibriโอ	
	จำนวน	ร้อยละ
<i>Vibrio</i> spp.	30	48.4
<i>V. alginolyticus</i>	14	22.6
<i>V. vulnificus</i>	7	11.3
<i>V. alginolyticus</i> และ <i>V. vulnificus</i>	4	6.4
<i>V. cincinnatiensis</i>	2	3.2
<i>V. parahaemolyticus</i> และ <i>V. alginolyticus</i>	1	1.6
<i>V. fluvialis</i> และ <i>V. alginolyticus</i>	1	1.6
<i>V. cholerae</i> non-01	1	1.6

Davis et al. 2001) รายงานว่าบางประเทศในทวีปยุโรปพบการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* ในปลา ส่วน *V. damsela*, *V. alginolyticus* และ *V. fluvialis* จัดว่าเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทางทะเลและกุ้ง (Hosseini et al., 2003) Jaksic et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มวibriโอในปลาทะเล กุ้งและหอยจำนวน 117 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากตลาด 3 แห่ง (100 ตัวอย่าง) และโรงแรม 4 แห่ง (17 ตัวอย่าง) ที่ตั้งอยู่บริเวณทะเล Adriatic ประเทศอิตาลีสามารถแยกแบคทีเรียกลุ่มวibriโอได้ 3 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* โดยพบ *V. parahaemolyticus* 11 ตัวอย่าง จากการแยกจากตัวอย่างที่เก็บจากโรงแรม 4 ตัวอย่าง และตลาด 7 ตัวอย่าง พบ *V. vulnificus* 8 ตัวอย่าง จากการแยกจากตัวอย่างที่เก็บจากโรงแรม 1 ตัวอย่าง และตลาด 7 ตัวอย่าง และพบ *V. alginolyticus* 4 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่เก็บจากโรงแรม 1 ตัวอย่างและตลาด 3 ตัวอย่าง โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบคทีเรียกลุ่มวibriโอที่พบในตัวอย่างจากปลาทะเล กุ้ง และหอย (สุบัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มวibriโอ		โรงแรม (17 ตัวอย่าง)			ตลาด (100 ตัวอย่าง)		
		ปลาทะเล (n=10)	กุ้ง (n=3)	หอย (n=4)	ปลาทะเล (n=50)	กุ้ง (n=25)	หอย (n=25)
<i>V. vulnificus</i>	8	0	0	1	2	3	2
<i>V. parahaemolyticus</i>	11	1	1	2	3	1	3
<i>V. alginolyticus</i>	4	0	0	1	1	1	1

จากผลการศึกษาของ Jaksic et al. (2002) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ได้ 23 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 117 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 19.65 โดยแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่พบ คือ *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 9.4 *V. vulnificus* ร้อยละ 6.84 และ *V. alginolyticus* ร้อยละ 3.42 ตัวอย่างที่เก็บจากโรงแรมพบแบคทีเรียกลุ่ม vibrio คิดเป็นร้อยละ 35.29 ส่วนตัวอย่างที่เก็บจากตลาดพบแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ร้อยละ 17 โดยแบคทีเรียกลุ่ม vibrio แต่ละชนิดสามารถพบได้ในสัตว์ทะเลทั้ง 3 ชนิด ต่อมา Vandenberghe et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio จากตัวอย่างหอยที่ตายแล้ว กุ้งจากการเพาะเลี้ยง กุ้งทะเล ปลา อาหารสดและสาหร่ายทะเล ผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำเหล่านี้สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ได้ทั้งหมด 1,473 ไอโซเลท และจัดจำแนกได้ 33 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่แยกได้จากสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ (สุบัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

ชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio	ไอโซเลท	แหล่งที่แยกเชื้อได้
<i>V. harveyi</i>	364	กุ้งที่เป็นโรค หอย ปลา อาหารสดและน้ำทะเล
<i>V. aestuarianus</i>	5	กุ้งที่เป็นโรค หอย ปลา อาหารจากสิ่งมีชีวิตและน้ำทะเล
<i>V. vulnificus</i>	25	ปลาไหลและคนที่ติดเชื้อ
<i>V. mediterranei</i>	46	ตัวอ่อนของปลา turbot ปลาและหอยชนิดต่างๆ
<i>V. campbellii</i>	21	ปลาและอาหารสด
<i>V. parahaemolyticus</i>	35	กุ้งที่เป็นโรค
<i>V. splendidus</i>	21	ปลา กุ้งและหอย
<i>V. neresis</i>	2	ปลาชนิดต่างๆ
<i>V. scophthalmi</i>	6	-
<i>V. mimicus</i>	15	ปลาชนิดต่างๆ และกุ้งที่เป็นโรค
<i>V. nigripulchritudo</i>	5	-
<i>V. orientalis</i>	8	-
<i>V. diazotrophicus</i>	12	อาหารสด
<i>V. gazogenes</i>	4	-
<i>V. mytili</i>	3	-
<i>V. ordalii</i>	11	ปลาชนิดต่างๆ
<i>V. tubiashii</i>	6	-
<i>V. alginolyticus</i>	332	-
<i>V. hollisae</i>	7	-
<i>V. proteolyticus</i>	7	-
<i>V. furnissii</i>	5	-
<i>V. flavialis</i>	9	-
<i>V. metschnikovii</i>	6	-
<i>V. logei</i>	2	-
<i>V. pectenica</i>	4	-
<i>V. pelagia</i>	3	-
<i>V. haliotocoli</i>	2	-
<i>V. fisheri</i>	5	-
<i>V. cholerae</i>	3	-
<i>V. anguillarum</i>	214	-
<i>V. costicola</i>	6	-
<i>V. ichthyenteri</i> / <i>V. penaeicida</i>	26	-
<i>V. salmonicida</i>	5	-
จำแนกชนิดไม่ได้	248	-

จากการศึกษาของ Vandenberghe et al. (2002) สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ได้ 33 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุด คือ *V. harveyi* รองลงมา คือ *V. alginolyticus* โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เก็บมาจากหลายทวีป ซึ่งแต่ละทวีปอาจจะมีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ได้หลายชนิดแตกต่างกัน เพราะแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและความเหมาะสมในการอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (พิพัฒน์ และอรุณลักษณ์, 2540)

Hosseini et al. (2003) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio จากตัวอย่างกุ้งสดที่ได้จากทะเลและฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศอิหร่าน เนื่องจากการรายงานจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ว่าเกิดโรคอหิวาตกโรคระบาดในประเทศอิหร่านในปี ค.ศ. 1990 ซึ่งตัวอย่างที่เก็บมาจากบริเวณต่างๆ ในประเทศอิหร่านจำนวน 770 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียกลุ่ม vibrio 16 ตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

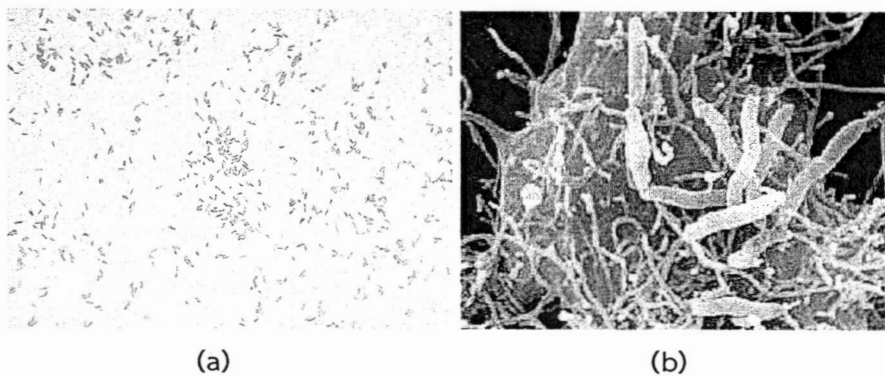
ตารางที่ 5 แบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งในประเทศอิหร่าน (สุบัติต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

แบคทีเรียกลุ่ม vibrio	พื้นที่ศึกษา	แหล่งที่มาของกุ้ง
<i>V. parahaemolyticus</i>	Helleh	การเพาะเลี้ยง
<i>V. parahaemolyticus</i>	Delvar	การเพาะเลี้ยง
<i>V. parahaemolyticus</i>	Tiab	การเพาะเลี้ยง
<i>V. parahaemolyticus</i>	Kolahi	การเพาะเลี้ยง
<i>V. damsela</i>	Jofreh	ทะเล
<i>V. alginolyticus</i>	Helleh	การเพาะเลี้ยง
<i>V. alginolyticus</i>	Delvar	การเพาะเลี้ยง
<i>V. alginolyticus</i>	Bandarabbas	ทะเล
<i>V. fluvialis</i>	Choebdeh	ทะเล
<i>V. fluvialis</i>	Bohsheer	การเพาะเลี้ยงและทะเล

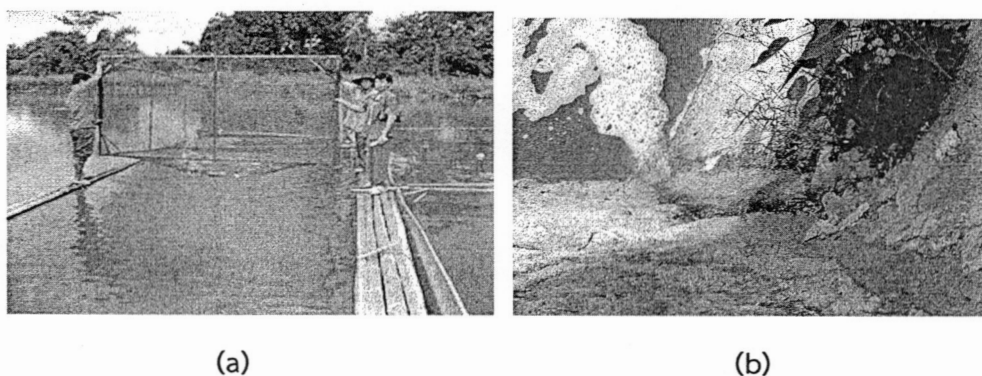
จากผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ได้ 16 ตัวอย่าง จากตัวอย่างกุ้งทั้งหมด 770 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.1 และแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่พบ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* โดยไม่พบ *V. cholerae*

2.2 แบคทีเรียกลุ่มแอโรโมนาส (*Aeromonas* spp.)

แอโรโมนาสเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน (ภาพที่ 3) พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น แม่น้ำ ลำคลอง น้ำเสีย (ภาพที่ 4) โดยมีคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 6 แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถก่อโรคในคน เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ โรคอาหารเป็นพิษและติดเชื้อที่ผิวหนัง (ภาพที่ 5) เป็นต้น



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

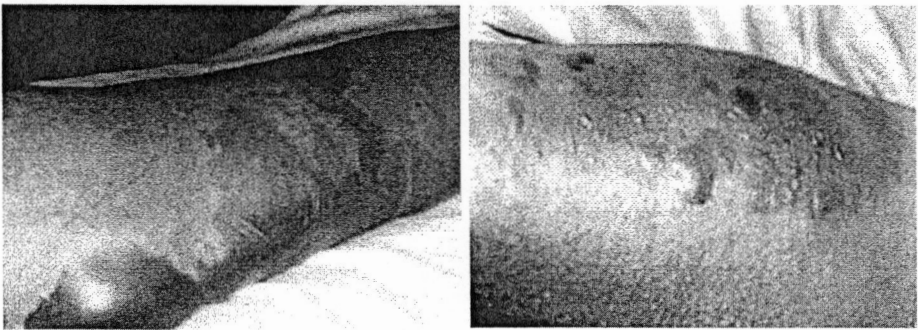


ภาพที่ 4 แหล่งที่พบแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส
 (a) แม่น้ำ
 (b) น้ำเสีย
 (สุบัณฑิต นิมรรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอโรโมแนส (สุบัติต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

การทดสอบ	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>
Cytochrome oxidase test	+	+	+
D-glucose fermentation test	+	+	+
Arginine dihydrolase test	+	+	-
Ornithine decarboxylase test	-	-	-
Lysine decarboxylase test	+	-	+, weak
H ₂ S from cysteine test	+	+	ND
Gas from glucose	+	+	+
Indole production test	+	+	+
Esculin hydrolysis test	+	+	-

หมายเหตุ weak ปฏิกริยาเกิดขึ้นได้ช้า
ND ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 5 อาการติดเชื้อจาก *A. hydrophila* ที่บริเวณผิวหนัง (สุบัติต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

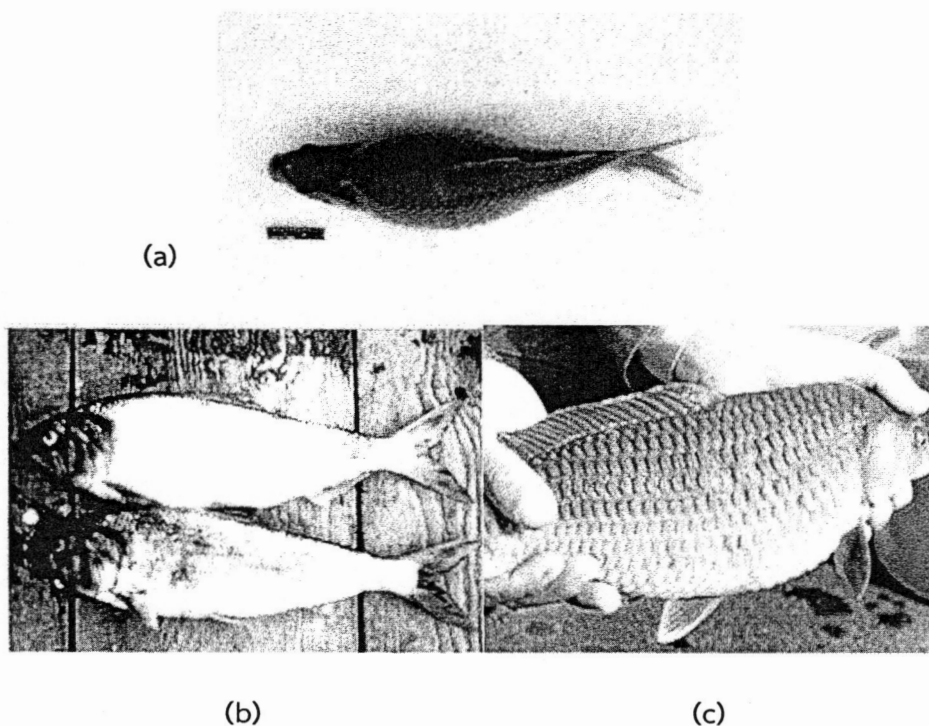
แบคทีเรียกลุ่มแอโรโมนัสสามารถก่อโรคในสัตว์ เช่น ปลาและกบ เป็นต้น โดยชนิดที่สามารถก่อโรคในสัตว์ ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. caviae* และ *A. veronii* (Noga, 2000; Soo et al., 2007)

2.2.1 *A. hydrophila*

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

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

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



ภาพที่ 6 ลักษณะของปลาที่เป็นโรค MAD

(a) อาการท้องบวม

(b) เลือดออกบริเวณเหงือกและผิวหนัง

(c) ผิวหนังและเกล็ดหลุดออก

(สุภณัติ นิมรรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

2.2.2 *A. salmonicida*

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

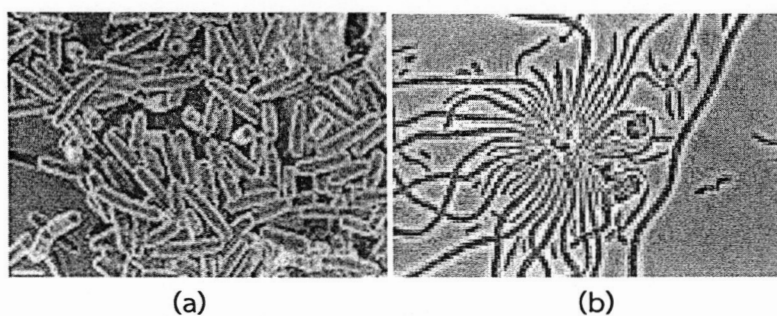
ปลาที่เป็นโรค Furunculosis จะเชื้อง้ำโดยเฉพาะเมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้น ปลาที่ติดเชื้อจะมารวมกันแน่นบริเวณขอบบ่อหรือผิวน้ำ ลำตัวมีสีเข้มขึ้น เบื่ออาหาร ถ้าปลามีอาการหนักจะไม่กินอาหาร อาการภายนอกพบว่าบริเวณโคนครีบและในปากมีสีแดง เกิดแผลเปื่อยบริเวณ

ผิวหนังหรือเกล็ด ตาโปน มีอาการห่อเลือดและท้องบวม อวัยวะภายใน เช่น เนื้อเยื่อไขมัน รังไข่ ผังกระดูกอาหาร เยื่อหุ้มหัวใจและกล้ามเนื้อจะมีเลือด รวมทั้งอาจพบฝีในตับ ไต ม้ามและกล้ามเนื้อ ปลาที่มีอาการเช่นนี้อาจเกิดเป็นแบคทีเรียในตับและไต ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อถูกทำลาย เมื่อปลาอ่อนแอลงจะทำให้จุลินทรีย์อื่นฉวยโอกาสก่อโรค เช่น แบคทีเรียชนิดอื่น เชื้อรา โปรโตซัว ไวรัส เป็นต้น ปลาไม่ได้รับการรักษาจะตายในที่สุด (ชโล, 2528; Wiklund and Dalsgaard, 1998; Lewbert, 2001)

2.3 แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ

นอกจากแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม vibrio และ aeromonas แล้ว ยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ยกตัวอย่าง เช่น *Pseudomonas* sp. และ *Leucothrix* sp. โดย *Pseudomonas* sp. (ภาพที่ 7a) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและในคน เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคได้ในคน รวมไปถึงพืชและสัตว์ (Pelczar et al., 1986) สำหรับกุ้งนั้นเมื่อกุ้งติดเชื้อ *Pseudomonas* อาการที่พบ คือ มีลักษณะลำตัวสีขาวขุ่น ลูกกุ้งจะไม่ค่อยกินอาหาร ภูมิคุ้มกันอ่อนแอและตายไปในที่สุด (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 13, 2540) ส่วน *Leucothrix* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายแสดงดังภาพที่ 7b

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



ภาพที่ 7 (a) ลักษณะรูปร่างของ *Pseudomonas* spp.

(b) ลักษณะรูปร่างของ *Leucothrix* spp.

(สุภณจิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552)

แบคทีเรียก่อโรคมักจะปนเปื้อนมากับน้ำ ดินพื้นบ่อและอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ และแบคทีเรียก่อโรคยังสามารถปนเปื้อนมาทางอากาศ นั่นคือ มุลนจากนกที่บินผ่านบ่อเพาะเลี้ยงนั่นเอง ดังการศึกษาของ Al-Harbi (2003) พบว่าแบคทีเรียฟิซิลโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในบ่อเพาะเลี้ยงปลานิลลูกผสมและทางเดินอาหารของปลานิลลูกผสม (Red tilapia; *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) ในประเทศซาอุดีอาระเบียมีการปนเปื้อนมาจากมูลนกพิราบที่อาศัยในบริเวณดังกล่าว

จุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกุ้งนอกจากแบคทีเรียแล้วนั้น จุลินทรีย์กลุ่มอื่นก็สามารถก่อโรคได้เช่นกัน อันได้แก่ โพรโทซัว เช่น *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Acianta* sp., *Tokophrya* sp. เชื้อรา เช่น *Leginidium* sp., *Fusarium* sp. และไวรัส เช่น Murine leukemia virus (MBV), Baculovirus penaei (BP) และ Brome mosaic virus (BMN; สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2548) รวมถึงไวรัสชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อนเรียกกันว่า Infectious Myonecrosis Virus หรือเรียกย่อว่า IMNV ซึ่งเป็นไวรัสชนิดที่เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ (Double strand RNA) สามารถก่อโรคในกุ้งโดยจะสังเกตพบกล้ามเนื้ออักเสบเป็นสีขาวขุ่นบริเวณปลายหาง แพนหางและลำตัวตอนท้าย กุ้งจะอ่อนแอมีการติดตัวน้อยลง ว่ายลอยตัวอยู่ที่ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อ แต่จะมีการกินอาหารปกติ จนเมื่ออาการมากขึ้นจะพบกุ้งลอยตัวที่ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อมากขึ้น เริ่มมีกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวขุ่นขาวร่วมด้วย แต่ไม่มีลักษณะขุ่นขาวแบบต่อเนื่องจากส่วนหาง (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา, ม.ป.ป.)

3. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่เย็น-แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

ปัญหาหนึ่งที่สามารถเกิดในระหว่างเก็บเซลล์แบบแช่เย็นและแช่แข็ง คือการเจริญของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมถุงน้ำเชื้อ อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวหนัง หรืออาจมีแบคทีเรียปนอยู่ในถุงน้ำเชื้อตั้งแต่แรกขณะที่ถุงอยู่ในน้ำ หรือสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บถุงน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็งจึงต้องควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญในระหว่างที่ถุงน้ำเชื้อได้ถูกแช่เย็นและแช่แข็งเอาไว้ เพราะแบคทีเรียจะทำให้คุณภาพสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็ว (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) โดยทั่วไปแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเลือด หรือมีอาหารโดยเฉพาะน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal plasma) ซึ่งมีธาตุอาหารหลายชนิดที่แบคทีเรียชอบ ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี ดังนั้นการศึกษากการควบคุมเจริญของแบคทีเรียขณะแช่เย็นและแช่แข็งถุงน้ำเชื้อด้วยการใช้สารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องพัฒนาเทคโนโลยีควบคู่กับการพัฒนา protocols แช่เย็นและแช่แข็งของถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็ง

โดยทั่วไปการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำระหว่างการเก็บรักษาแช่เย็นมีผลต่อคุณภาพสเปิร์ม การเคลื่อนที่หรือการมีชีวิตของสเปิร์ม และระยะเวลาเก็บรักษา (Jenkins and Tiersch, 1997; Nimrat et al., 2005, Nimrat et al., 2006) ซึ่งเป็นปัญหาที่พบในระหว่างการแช่เย็นน้ำเชื้อของสัตว์บกเช่นกัน (Shin et al., 1988; Jasko et al., 1993) นอกจากนี้มีรายงานแสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิกับไข่ลดต่ำลงเมื่อนำมาผสมเทียมกับไข่ (Stoss and Refstie, 1983; Saad et al., 1988) จึงได้มีการนำเอาสาร

ปฏิชีวนะมาใช้เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นได้นานขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียได้ แต่ก็ยังมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ เช่น penicillin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยการทำหน้าที่เป็น cell wall synthesis inhibitor ในขณะที่ oxytetracycline และ gentamycin ทำหน้าที่เป็น protein synthesis inhibitor หรือ enrofloxacin ทำหน้าที่เป็น nucleic acid synthesis inhibitor เป็นต้น (Walsh, 2000; Todar, 2003) ดังนั้นการใช้สารปฏิชีวนะจึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นได้

งานวิจัยที่ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้สารปฏิชีวนะในการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น Holcomb et al. (2005) ได้ทำการศึกษายาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin-streptomycin ที่ความเข้มข้น 0.1 % สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total heterotroph ในไข่ปลา rainbow trout ที่แช่เย็นในอุณหภูมิ 0 และ 10 องศาเซลเซียส ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะดังกล่าว รวมทั้งยังพบว่ายา gentamicin สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total heterotroph ในไข่ปลา rainbow trout ที่แช่เย็นในอุณหภูมิ 0 และ 10 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าชุดควบคุมเช่นกัน

Nimrat et al. (2005) ได้รายงานการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ปรากฏว่า mineral oil เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำ และไม่พบแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ในถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียที่พบคือ *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1, 1, 2 และ 3% ในการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำต่างก็ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต แต่มีผลทำให้แบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มนั้นมีปริมาณลดลงสู่ undetectable level ภายใน 14 วันหลังการแช่เย็น และถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำที่แช่เย็นยังคงมีคุณภาพสูง สามารถปฏิสนธิได้กับไข่เช่นเดียวกับถุงน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ

Nimrat et al. (2006) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่ในถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวระหว่างการเก็บรักษาประกอบด้วย *Bacillus circulans*, *Staphylococcus hominis*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* และ *Micrococcus* spp. ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถควบคุมให้มีค่าเป็น undetectable level ในระหว่างการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวด้วยการใส่ยาปฏิชีวนะสมทบเพิ่มเข้าไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. พืชพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

พืชพันธุ์กุ้งแชบ๊วยสมบูรณ์เพศที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 27.8 ± 6.21 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.18 ± 3.39 เซนติเมตร

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.1 จานเพาะเชื้อ
- 2.2 หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร
- 2.3 หลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร
- 2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.5 หลอดเก็บรักษา (eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.6 เครื่องชั่ง
- 2.7 กล้องโพร
- 2.8 ไมโครปิเปต
- 2.9 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
- 2.10 กล้องจุลทรรศน์
- 2.11 คีมคีบ
- 2.12 โกร่งบด
- 2.13 กรรไกรสแตนเลส
- 2.14 Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.15 คอมพิวเตอร์และซอฟต์แวร์สำหรับการแช่แข็ง
- 2.16 ไนโตรเจนเหลวและถังเก็บไนโตรเจนเหลว
- 2.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3. สารเคมี

- 3.1 สีย้อม Eosin 0.5%
- 3.2 สีย้อม Nigrosin 10%
- 3.3 DMSO (dimethyl sulfoxide)
- 3.4 Methanol
- 3.5 Glycerol
- 3.6 Ethanol
- 3.7 Formamide
- 3.8 Propylene glycol
- 3.9 Ethylene glycol

3.10 Acetamide

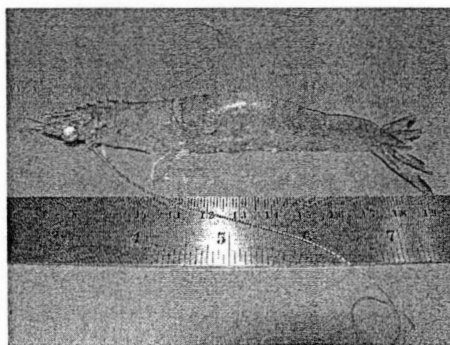
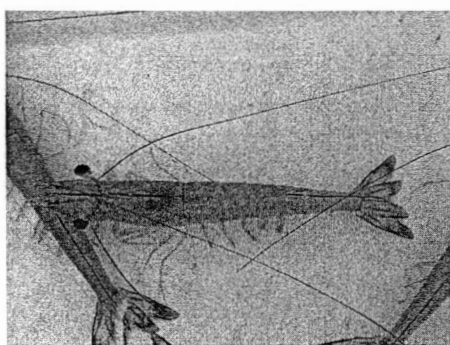
3.11 Trehalose

3.12 Sucrose

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

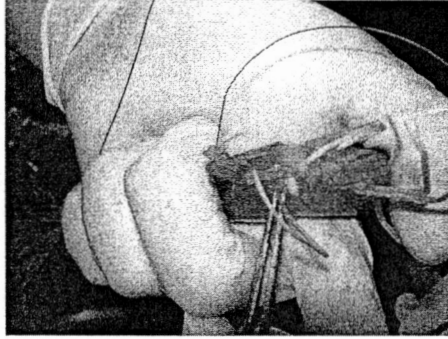
ฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศ (ภาพที่ 8) ซึ่งพิจารณาจากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อ (spermatophores) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ บริเวณเกาะสีชัง จ. ชลบุรี หรือบริเวณแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ใกล้เคียงในช่วงเวลาต่าง ๆ กันในรอบปี โดยฟอพันธุ์จะถูกชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวของลำตัว โดยพ่อแม่พันธุ์จะถูกเลี้ยงในบ่อขนาด $3 \times 4 \times 1.5$ เมตร ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา การให้อาหารแก่ฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจะให้หมึกและแม่เพรียงวันละ 2 ครั้งประมาณ 10% น้ำหนักตัวต่อวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลที่สะอาดในบ่อพักฟอพันธุ์ประมาณ 30% ทุก ๆ วัน ฟอพันธุ์จะถูกเลี้ยงให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5-7 วัน และวัดคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงฟอพันธุ์ ฟอพันธุ์ที่มีถุงน้ำเชื้อที่ยังพัฒนาไม่มากนัก เช่น มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย หรือยังไม่มีถุงน้ำเชื้อจะไม่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าฟอพันธุ์ทุกตัวที่ใช้ในการทดลองมีคุณภาพสเปิร์มดี ซึ่งสังเกตเบื้องต้นได้จากความขาวขุ่นของถุงน้ำเชื้อที่ยังขาวขุ่นมากแสดงถึงคุณภาพสเปิร์มที่ดี ในขณะที่ถุงน้ำเชื้อที่ขาวขุ่นเล็กน้อย แสดงว่าสเปิร์มมีคุณภาพต่ำ



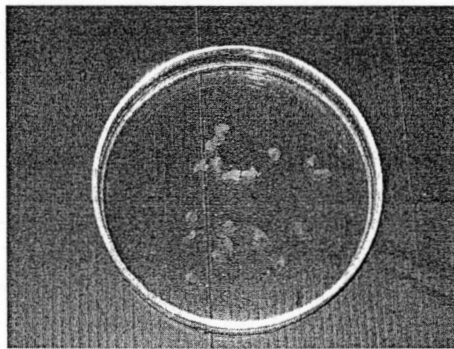
ภาพที่ 8 ฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วย

2. การรวบรวมถุงน้ำเชื้อ

การรวบรวมถุงน้ำเชื้อจากกุ้งแชบ๊วยทำโดยการใช้มือกดเบา ๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ข้างซึ่งมี petasma อยู่บริเวณนั้น เมื่อเริ่มเห็นถุงน้ำเชื้อโผล่ออกมาจึงใช้คีมคีบ (forcep) ที่สะอาดปราศจากเชื้อดึงเอาถุงน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อนำไปทดลองต่อไป (ภาพที่ 9 และ 10)



ภาพที่ 9 การดึงถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วย



ภาพที่ 10 ถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วย

3. การศึกษาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วยแบบแช่แข็ง

การศึกษาศาหารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วยแบบแช่แข็ง ทำการทดสอบด้วยกระบวนการเดียวกับการแช่เย็น เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกับกรรมวิธีการหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วย โดยเริ่มต้นจากการรวบรวมถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ตั้งแต่ล้างตัวกักให้สะอาด แล้วใช้เข็มคีบที่สะอาดปราศจากเชื้อรวบรวมถุงน้ำเชื้อมาใส่ใน eppendorf tubes ที่ได้ทำการฆ่าเชื้อและมีสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ อยู่ภายใน eppendorf tubes ในการทดลองจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิด ได้แก่ Mineral oil, Ringer solution, Phosphate buffer, Ca-F-Saline และ 0.8% NaCl ใส่ลงในหลอดเก็บรักษา (eppendorf tube) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยในแต่ละสูตรน้ำยา ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

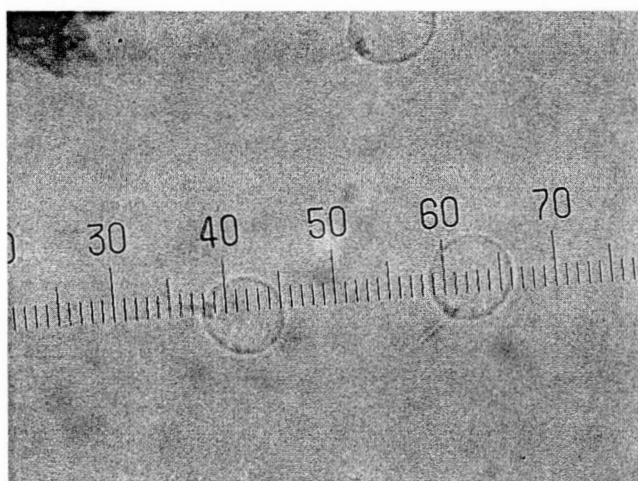
การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อจากงักแขบ้วยแบบแช่เย็นจะใส่ถุงน้ำเชื้อ 1 ถุงต่อหลอดเก็บรักษา 1 หลอด ปิดฝาให้สนิท แล้วนำหลอดไปเก็บรักษาในตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 2-4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน 28 วัน โดยทำการประเมินคุณภาพถุงน้ำเชื้อทุก ๆ 7 วัน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (ประเมินด้วยการย้อมสีสเปิร์มด้วย eosin-nigrosin) และสังเกตการ

329339

615.31
58230
8556
๑ ๙

เปลี่ยนแปลงภายนอก (สี ความหนืดและความชุ่ม) ของน้ำยาในหลอดเก็บรักษา รวมทั้งการบวมของถุงน้ำเชื้อ และสีและรูปร่างของถุงน้ำเชื้อขณะเก็บรักษาว่ามีลักษณะเปลี่ยนแปลงอย่างไร จากนั้นบันทึกผลที่ได้ แล้วประเมินสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาแบบแช่เย็นมากที่สุด

การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแช่แข็งทำโดยนำถุงน้ำเชื้อมาบดเบา ๆ ให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา (glass homogenizer) ที่เติม 0.85% NaCl แล้วทำการย้อมสีเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of sperm viability) โดยการนำเอาสเปิร์มที่ถูกเจือจาง (5 μ l) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin โดยหยด eosin ปริมาตรเท่ากับสารละลายสเปิร์ม ส่วน nigrosin หยดสองเท่าลงไปใ้ในภายหลัง ผสมให้เข้ากันแล้วนำ cover slide มาเกลี่ยบาง ๆ บน slide ทำการ fix ด้วยความร้อนโดยระวังไม่ให้ร้อนเกินไป สุ่มนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (Fribourgh, 1966; Vuthiphandchai and Zohar, 1999) สเปิร์มที่มีชีวิต (viable sperm) จะไม่ดูดซึมสีหรือติดสีย้อม และตัวสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (dead sperm) จะดูดซับสี หรือติดสีย้อมสีม่วงแดง (ภาพที่ 11) โดยสุ่มนับสเปิร์ม 200 ตัว และทำทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต



ภาพที่ 11 การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง

4. การศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแบบแช่แข็ง

เมื่อได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแบบแช่แข็ง ในขั้นตอนต่อมาจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งสารโครีโอโพรเทคแทนท์เป็นสารที่ป้องกันการแข็งตัวของสเปิร์ม ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนนี้จะทำให้ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง การศึกษาในขั้นตอนนี้จะทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 10 ชนิด ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Ethanol, Formamide, Propylene glycol, Ethylene glycol, Acetamide, Trehalose และ Sucrose ต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม ซึ่ง

สารโคริโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดจะถูกเตรียมขึ้นมาโดยการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration) ของสารโคริโอโพรเทคแทนท์เท่ากับ 5%, 10%, 15% และ 20% ในการทดลองครั้งนี้ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

การศึกษาในขั้นตอนนี้เริ่มต้นจากนำฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศมาบิบบริเวณท้องกุ้งและใช้คีมคีบดึงถุงน้ำเชื้อออกมา หลังจากนั้นนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแชในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม นาน 5 นาที และนำมาตัดเยื่อหุ้มรอบนอกถุงออกให้หมดให้เหลือแต่ถุงน้ำเชื้อ ทดสอบความเป็นพิษโดยนำถุงน้ำเชื้อที่ตัดเยื่อหุ้มด้านนอกออกแล้วมาใส่ในโกร่งบดยา (Glass homogenizer) แล้วเติมสารโคริโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการบดถุงน้ำเชื้อเบา ๆ ให้ละเอียด จากนั้นประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มในทุกการทดลองในระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ ภายในเวลา 0, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที เมื่อถึงเวลาตามที่กำหนด นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (% sperm viability) การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยเลือกเฉพาะสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อต่อไป

5. การศึกษาถึงผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

วิธีการศึกษาขั้นตอนของการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยจะเริ่มโดยการเลือกชนิดของสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดมา 2-3 ชนิดที่ทราบจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยนำฟอพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่สมบูรณ์เพศมาบิบเอาถุงน้ำเชื้อ หลังจากนั้นนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแชในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง โดยตัดเยื่อหุ้มออกให้หมดเหลือแต่ถุงน้ำเชื้อ แล้วนำถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมาแชในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารโคริโอโพรเทคแทนท์ ณ ความเข้มข้นที่เหมาะสม นาน 30 นาทีหรือตามระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง นอกจากนี้สารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์จะถูกเลือกและนำมาใช้ร่วมกัน เพื่อศึกษาความเป็นพิษร่วมกันที่มีต่อสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อต่อไป

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในแต่ละชุดการทดลองใช้ 4 ซ้ำ ซึ่งการแช่แข็งใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กันในลักษณะ One-step freezing ดังนี้ อัตราการลดอุณหภูมิ -1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส hold 5 นาที และอัตราการลดอุณหภูมิ -1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส hold 5 นาที จากนั้นนำมาแชในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อในลักษณะเช่นนี้จะมีการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิให้เที่ยงตรง

การทดสอบการมีชีวิตของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวทำโดยนำสารละลายโคริโอโพรเทคแทนท์ออกจากหลอด Cryotube และเติม Ca-Free saline เพื่อล้าง

โครีโอโปรเทคแทนท์ โดยแช่นาน 5 นาที ทำการบดถุงน้ำเชื้อ โดยเอาถุงน้ำเชื้อหลังการละลายมาใส่ในโกร่งบดยาและเติม Ca-Free saline แล้วจึงทำการบดถุงน้ำเชื้อเบา ๆ ให้ละเอียด ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต โดยการย้อมสีสเปิร์ม รวมทั้งประเมินการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มอื่น ๆ

6. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม

นำถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแช่แข็งที่ลดอุณหภูมิด้วยวิธีการทดลองที่ดีที่สุดจากการศึกษาจากข้อ 5 มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง โดยนำถุงน้ำเชื้อมาละลาย (Thawing) ในน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตโดยการย้อมสีสเปิร์มด้วย Eosin-Nigrosin เปรียบเทียบกับการใช้อัตราการละลายถุงน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ The statistical program for the social sciences (SPSS) version 11.5 เปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $P = 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง โดยทำการศึกษาถึงสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง ความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง อัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งและอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม ได้ผลการทดลองดังนี้

1. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง

จากการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (Percentage of sperm viability) ของถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิด คือ Mineral oil, Ringer solution, Phosphate buffer, Ca-F-Saline และ 0.8% NaCl เป็นระยะเวลา 28 วัน ในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้ผลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมากที่สุดเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ Mineral oil > Ringer solution > Ca-F-Saline > Phosphate buffer และ 0.8% NaCl โดย Mineral oil มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ $89.10 \pm 0.81\%$ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อสดที่มีค่าเท่ากับ $91.81 \pm 1.15\%$ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ Ringer solution และ Ca-F-Saline ที่มีค่าเท่ากับ $67.86 \pm 1.66\%$ และ $56.39 \pm 5.74\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ Phosphate buffer และ 0.8% NaCl ให้ผลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 0% แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งทะเลแบบแช่แข็งประสบความสำเร็จเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด ดังนั้นการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ Ca-Free Saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดนี้ปราศจากแคลเซียมซึ่งเป็นแร่ธาตุที่มีผลต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งทะเล

2. ความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง

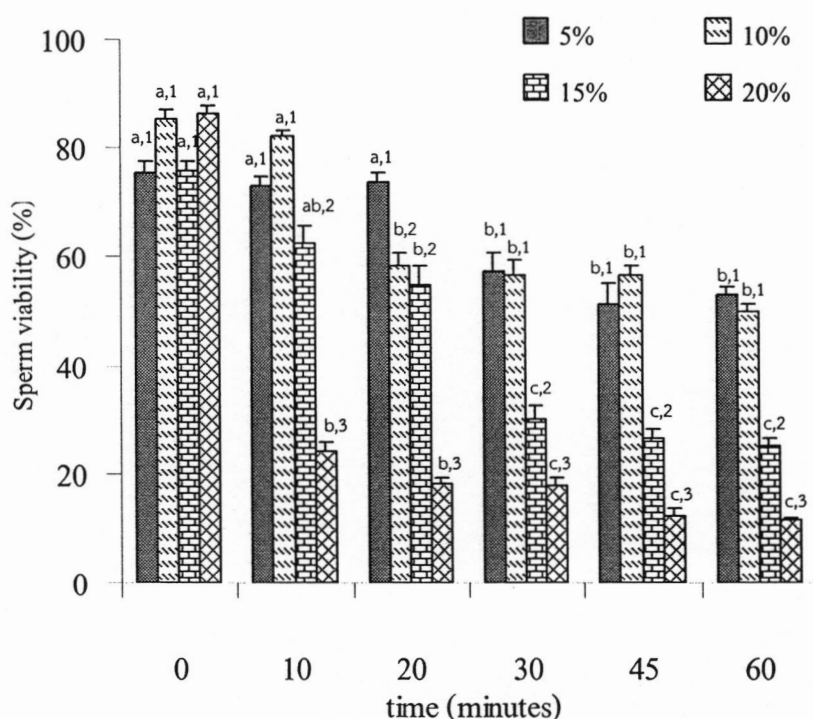
จากการศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 10 ชนิด คือ DMSO, Methanol, Glycerol, Ethanol, Formamide, Propylene glycol, Ethylene glycol, Acetamide, Trehalose และ Sucrose โดยแต่ละชนิดทดลองที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองในเวลาต่าง ๆ กันเริ่มตั้งแต่ 0 (ชุดควบคุม), 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ผลการทดลองเป็นดังนี้

2.1 DMSO

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ DMSO 10 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่แตกต่างกับ DMSO 15 % และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแช่แข็งกับสารละลาย DMSO ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 45 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 60 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร DMSO ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ DMSO 5% หรือ DMSO 10% แทนกันได้ โดยไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกัน เมื่อเลือกใช้ DMSO 5% ไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายเกิน 20 นาที และเมื่อใช้ DMSO 10% ไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายเกิน 10 นาที ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่แตกต่างกับสเปิร์มสด (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งหลังเติม DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

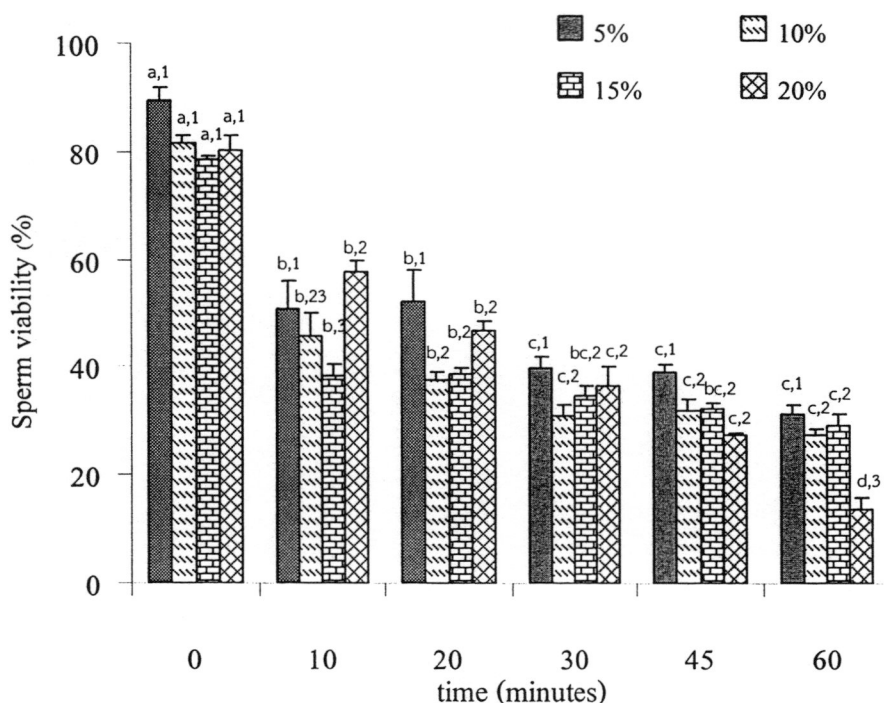
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.2 Methanol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Methanol 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) Methanol 10% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Methanol 15% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) Methanol 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Methanol 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแช่แข็งกับสารละลาย Methanol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 10 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 20 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และที่เวลา 30 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่แตกต่างกับที่เวลา 45 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Methanol ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ถ้าใช้ Methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่ไม่ควรใช้เกิน 5% และไม่ควรร่งแช่แข็งเก็บน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกิ้งก่าเขียวหลังเติม Methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

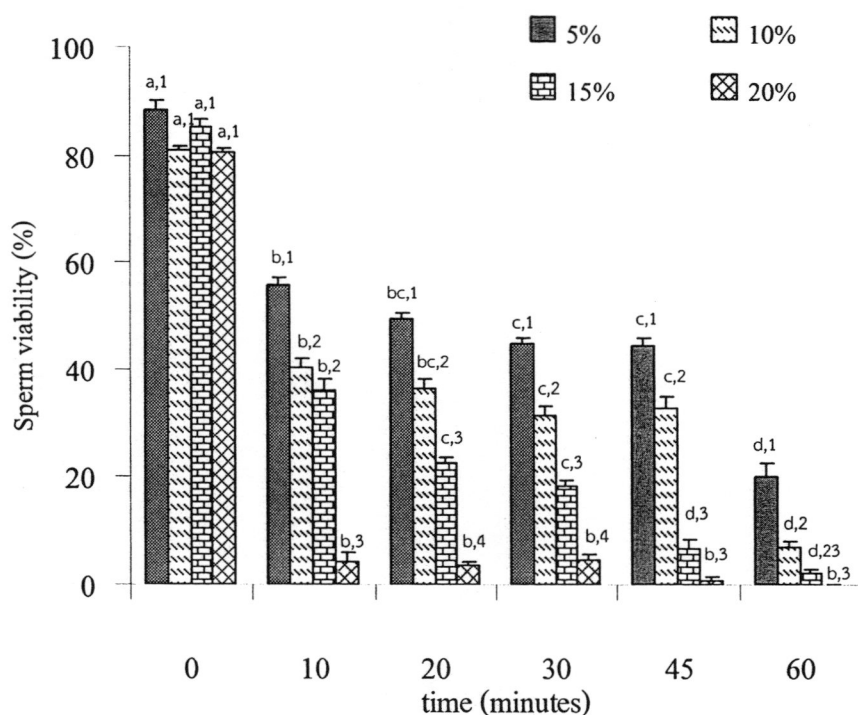
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.3 Glycerol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Glycerol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Glycerol 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกิ้งก่าเขียวกับสารละลาย Glycerol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 20 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Glycerol ที่มีต่อสเปิร์มกิ้งก่าเขียว สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ควรใช้ Glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่ไม่ควรใช้เกิน 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกิ้งก่าเขียวอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 14)



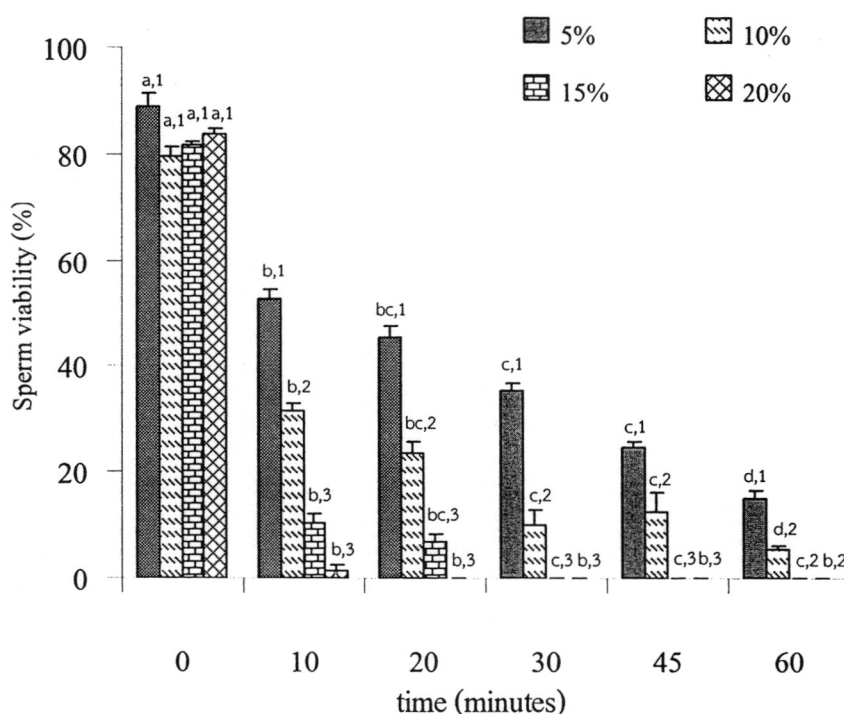
ภาพที่ 14 เพอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกึ่งแซบวัยหลังเติม Glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
 ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.4 Ethanol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Ethanol 10 %, 15%, 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) Ethanol 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Ethanol 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแซบวัยกับสารละลาย Ethanol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต แตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Ethanol ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแซบวัย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Ethanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรถ่ายเก็บน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 เปอร์เซนต์สเปิร์มมีชีวิตของกึ่งแซบวัยหลังเติม Ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

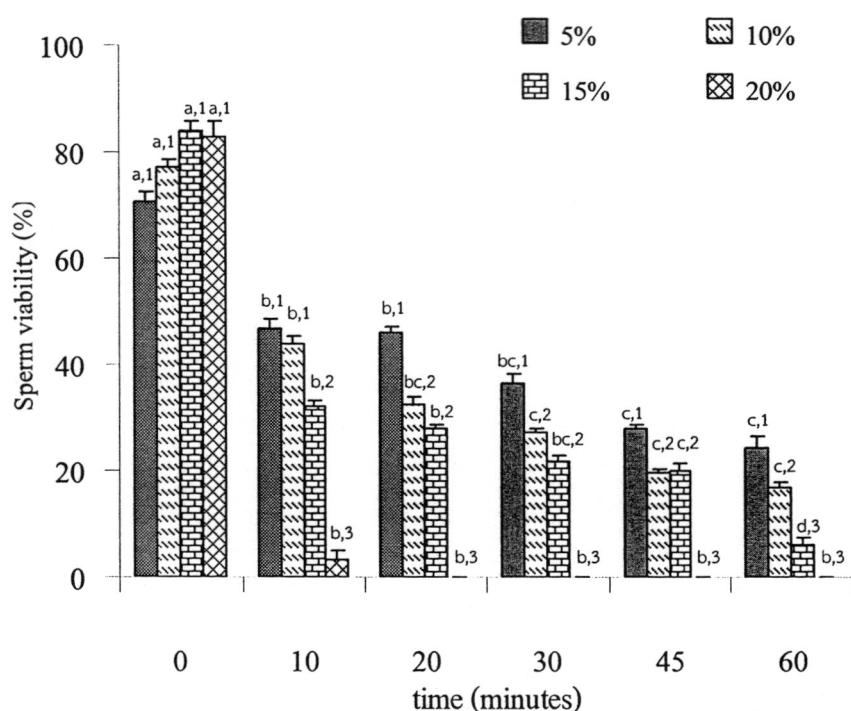
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.5 Formamide

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Formamide 5% มีผลให้เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Formamide 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแซบวัยกับสารละลาย Formamide ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Formamide ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแซบวัย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Formamide เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรถ่ายเก็บน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกิ้งแกบวัยหลังเติม Formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

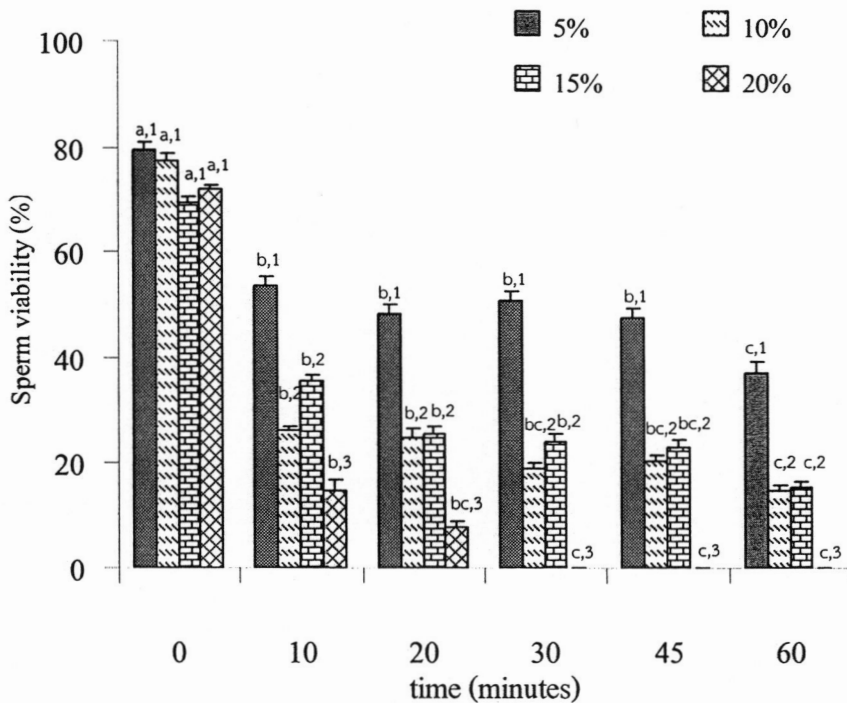
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.6 Propylene glycol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Propylene glycol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Propylene glycol 10 %, 15%, 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกิ้งแกบวัยกับสารละลาย Propylene glycol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 20 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 30 และ 45 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Propylene glycol ที่มีต่อสเปิร์มกิ้งแกบวัย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรรักษาแช่แข็งเก็บน้ำเชื้อกิ้งแกบวัยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกึ่งแซบวียหลังเติม Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

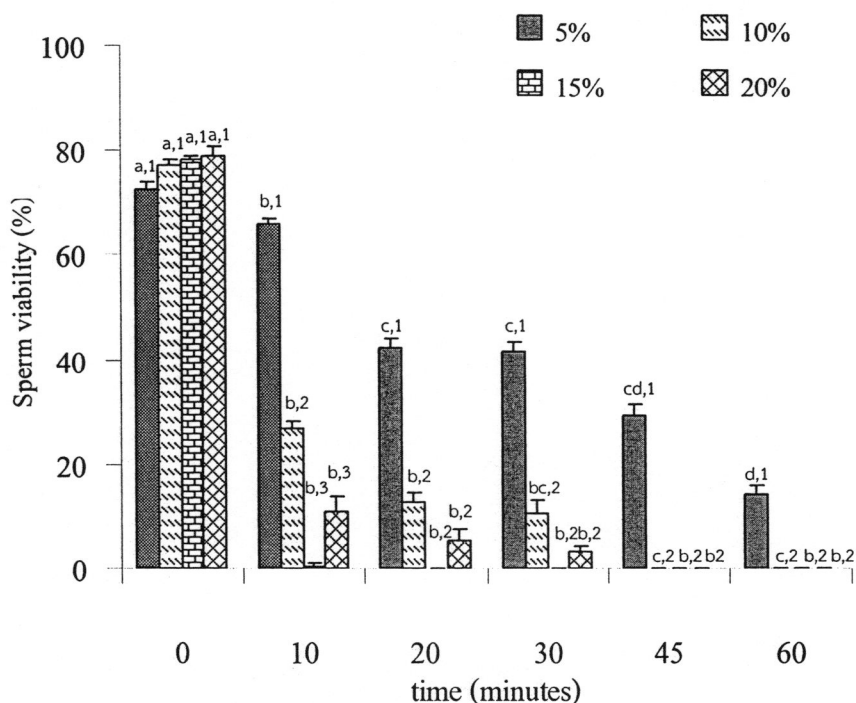
2.7 Ethylene glycol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene glycol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Ethylene glycol 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) Ethylene glycol 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Ethylene glycol 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแซบวียกับสารละลาย Ethylene glycol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 20 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Ethylene glycol ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแซบวียสามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทค

แทนที่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรถ่ายงูเก็บน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 เปอร์เซนต์สเปิร์มมีชีวิตของกึ่งแซบวัยหลังเติม Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

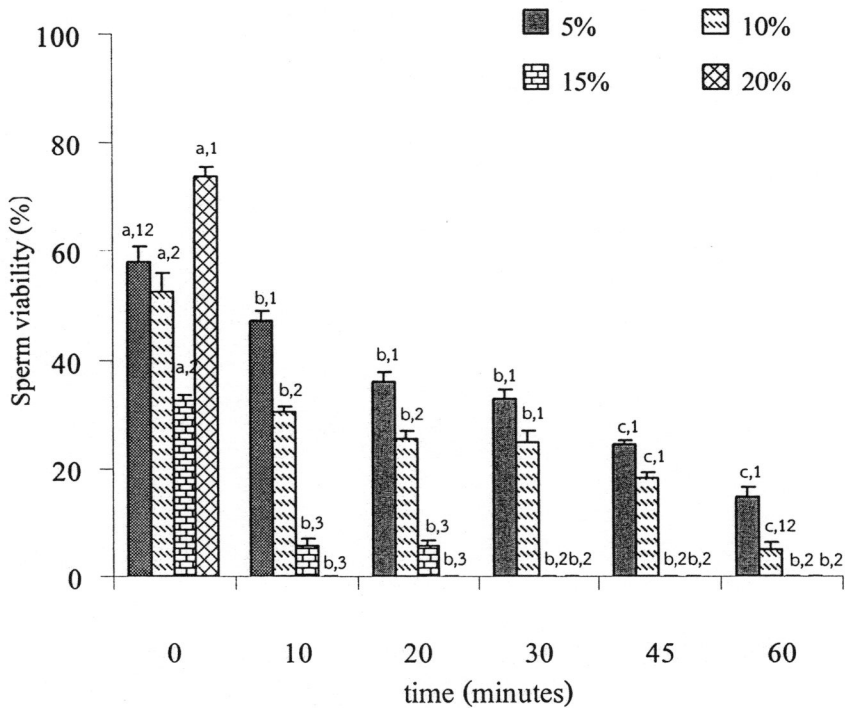
2.8 Acetamide

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide 5% มีผลให้เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Acetamide 10%, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแซบวัยกับสารละลาย Acetamide ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Acetamide ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแซบวัย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Acetamide เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนที่ที่ความ

เข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกึ่งแช่แข็งหลังเติม Acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

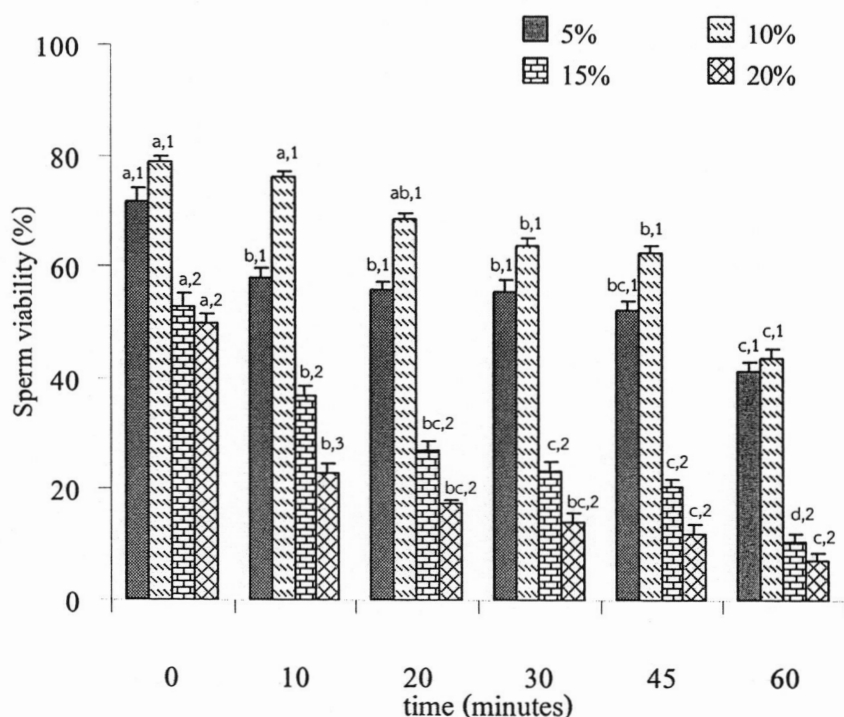
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.9 Trehalose

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Trehalose 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Trehalose 10%, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแช่แข็งกับสารละลาย Trehalose ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 10 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 20 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Trehalose ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ Trehalose 5% ได้โดยไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายเกิน 10 นาที และเมื่อใช้ Trehalose 10% ไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายเกิน 20 นาทีเช่นกัน จึงจะไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับสเปิร์มสด (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 เปอร์เซนต์สเปิร์มมีชีวิตของกึ่งแช่แข็งหลังเติม Trehalose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

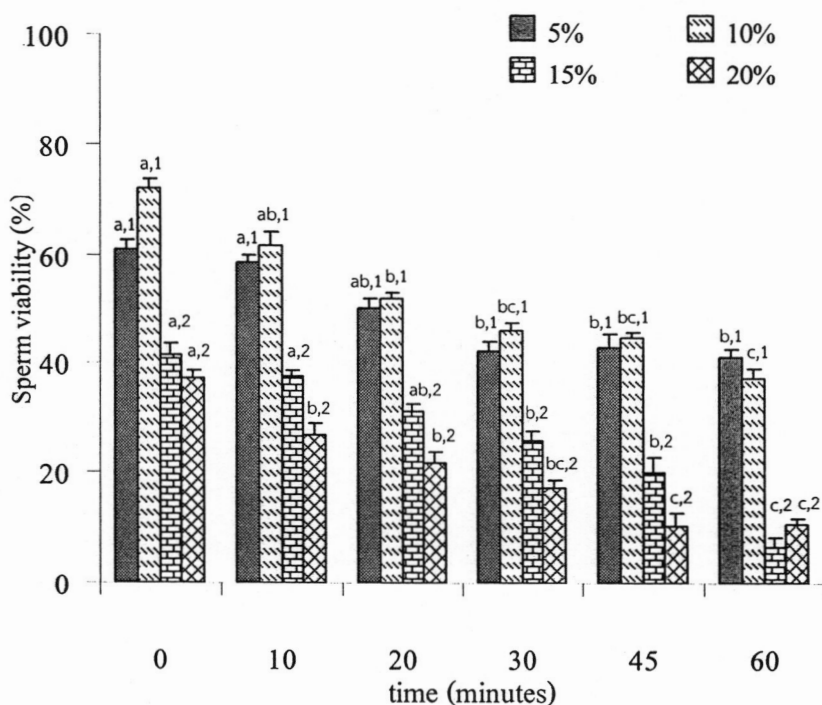
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2.10 Sucrose

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Sucrose 5% มีผลให้เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Sucrose 10 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) Sucrose 15% มีผลให้เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Sucrose 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกึ่งแช่แข็งกับสารละลาย Sucrose ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 10, 20 และ 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่เวลา 45 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 60 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Sucrose ที่มีต่อสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ Sucrose 5% หรือ Sucrose 10% แทนกันได้ โดยไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกัน และไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายนานเกิน 20 และ 30 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งหลังเติม Sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในช่วงการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
 ตัวเลขที่ต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแบบแช่แข็ง พบว่าสารโครีโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดมีความเป็นพิษและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแตกต่างกัน กล่าวคือ สารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ Sucrose < DMSO < Methanol < Trehalose < Propylene glycol < Formamide < Glycerol < Acetamide < Ethanol < Ethylene glycol ตามลำดับ โดยที่การใช้ Sucrose 5% และ 10% และการใช้ DMSO 5% และ 10% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุด คือ 5%, 10%, 15%, 20% ตามลำดับ และเวลาที่ปล่อยให้สเปิร์มกึ่งแช่แข็งอยู่ในสารละลายที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า Sucrose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกึ่งแช่แข็งต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารโครีโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งต่อไป

3. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง

จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งแบบแช่แข็ง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารทั้งสองชนิดนี้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ 1) เติม DMSO 5% 2) เติม Sucrose 5% 3) เติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และ 4) เติม Sucrose 5% หลังจากนั้น 10 นาที เติม DMSO 5% ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 4 ชุดการทดลองมาแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิ -1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตได้ผลการศึกษาดังนี้

3.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส

น้ำเชื้อสดของกึ่งแช่แข็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ $90.11 \pm 2.63\%$ หลังจากนั้นนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free Saline ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้ Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% และสารผสมทั้งสองชนิดพบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส สามารถรักษาสเปิร์มที่มีชีวิตได้สูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยอัตราอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งการเติม Sucrose 5%, DMSO 5% และการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ที่อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังจากการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส โดยใช้สารโคริโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน

อัตราการลดอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)			
	5% DMSO	5% Sucrose	เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	5% Sucrose ก่อนเติม 5% DMSO
-1 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	84.79 $\pm$ 0.37 ^{a,1}	78.76 $\pm$ 8.45 ^{a,1}	84.02 $\pm$ 3.13 ^{a,1}	64.18 $\pm$ 5.24 ^{b,1}
-2 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	47.15 $\pm$ 2.35 ^{b,2}	29.18 $\pm$ 5.26 ^{c,3}	43.16 $\pm$ 3.08 ^{b,2}	68.97 $\pm$ 0 ^{.00 a,1}
-3 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	47.11 $\pm$ 0.00 ^{b,2}	57.17 $\pm$ 1.41 ^{a,2}	13.56 $\pm$ 2.31 ^{c,3}	20.53 $\pm$ 1.11 ^{c,2}
-4 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	2.25 $\pm$ 0.55 ^{b,3}	16.00 $\pm$ 0.00 ^{a,4}	1.55 $\pm$ 0.77 ^{b,4}	2.76 $\pm$ 1.41 ^{b,3}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส โดยใช้ Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% และสารผสมทั้งสองชนิดเป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ยังมีประสิทธิภาพไม่สูงมากนักในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแช่แข็ง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการลดอุณหภูมิด้วยอัตราเดิม คือ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที แต่เปลี่ยนจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส แทนอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม ได้ผลการศึกษาดังนี้

น้ำเชื้อสดของกึ่งแช่แข็งมีสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ $91.75 \pm 0.59\%$ เมื่อนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free Saline ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้ Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% และสารผสมทั้งสองชนิด แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หลังการแช่แข็งพบว่าการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ณ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 และ -2 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแช่แข็งได้ดีและสูงกว่าการเติมสารโคริโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นการเติม 5% DMSO ณ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -2 องศาเซลเซียสต่อนาที ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังจากตั้งไข่ 5 นาที หลังการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส และใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน

อัตราการลดอุณหภูมิ (⁰ C/นาที)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)			
	5% DMSO	5% Sucrose	เดิม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	5% Sucrose ก่อนเดิม 5% DMSO
-1 ⁰ C/นาที	63.05 ± 1.87 ^{b,2}	50.41 ± 2.61 ^{c,2}	86.23 ± 7.7 ^{a,1}	68.04 ± 0.93 ^{b,1}
-2 ⁰ C/นาที	89.87 ± 2.47 ^{a,1}	79.56 ± 3.59 ^{b,1}	82.98 ± 3.68 ^{a,1}	47.07 ± 3.5 ^{c,3}
-3 ⁰ C/นาที	26.15 ± 4.01 ^{b,3}	3.54 ± 0.41 ^{c,3}	65.28 ± 10.36 ^{a,2}	55.87 ± 0.67 ^{a,2}
-4 ⁰ C/นาที	2.67 ± 1.01 ^{c,4}	38.38 ± 5.90 ^{b,23}	1.68 ± 0.12 ^{c,3}	57.89 ± 8.82 ^{a,2}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแซบวัยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเดียวกัน แต่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน (-30 และ -80 องศาเซลเซียส) พบว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ -80 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำเชื้อกึ่งแซบวัยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่าอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ดังนั้นการศึกษาต่อมาจึงเป็นการศึกษาถึงการลดอุณหภูมิด้วยอัตราเดิม คือ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำมาแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม ได้ผลการศึกษาดังนี้

น้ำเชื้อสดของกึ่งแซบวัยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 93.78 ± 2.89% เมื่อนำมาแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันและเก็บในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาสเปิร์มที่มีชีวิตได้สูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยอัตราอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) รวมทั้งการเติม DMSO 5% และการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ที่อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแซบวัยอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส และใช้สารโคริโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน และเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง

อัตราการลดอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)			
	5% DMSO	5% Sucrose	เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	5% Sucrose ก่อนเติม 5% DMSO
-1 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	73.37 $\pm$ 2.10 ^{a,1}	61.83 $\pm$ 0.32 ^{ab,1}	67.67 $\pm$ 0.94 ^{a,1}	52.72 $\pm$ 2.02 ^{b,1}
-2 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	28.68 $\pm$ 2.99 ^{c,2}	70.67 $\pm$ 1.44 ^{a,1}	16.6 $\pm$ 2.72 ^{c,3}	41.93 $\pm$ 5.67 ^{b,2}
-3 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	23.25 $\pm$ 0.61 ^{b,2}	37.59 $\pm$ 3.99 ^{a,2}	40.60 $\pm$ 0.00 ^{a,2}	8.86 $\pm$ 2.66 ^{c,3}
-4 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	7.17 $\pm$ 1.07 ^{b,3}	24.06 $\pm$ 6.62 ^{a,2}	2.16 $\pm$ 0.26 ^{b,4}	6.53 $\pm$ 0.41 ^{b,3}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงเลือก DMSO 5% และการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน มาทำการทดลองเปรียบเทียบอีกครั้งหนึ่งเพื่อยืนยันและเลือกสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งต่อไป โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาท จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็ง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาท แล้วนำมาแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแช่แข็งที่เติม 5% DMSO ก่อนการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวและหลังการแช่แข็งเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $90.23 \pm 1.07\%$ และ $83.45 \pm 2.72\%$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ที่มีค่าเท่ากับ $83.03 \pm 1.23\%$ และ $61.36 \pm 1.15\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกึ่งแซบวัยแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส

สารโคริโอโพรเทคแทนท์	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)	
	ไม่แช่ในถังไนโตรเจนเหลว	แช่ในถังไนโตรเจนเหลว
5% DMSO	90.23 ± 1.07 ^{a,1}	83.45 ± 2.72 ^{a,1}
เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	83.03 ± 1.23 ^{a,1}	61.36 ± 1.15 ^{b,2}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

4. ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายที่เหมาะสมต่อสเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าเท่ากับ 85.1±1.4%, 61.6±0.8%, 25.3±1.2% และ 15.8±1.8% เมื่อละลายที่อุณหภูมิ 30, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งชุดการทดลองที่ละลายด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับการละลายที่อุณหภูมิอื่น (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยแช่แข็งที่ละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิที่ใช้ละลาย (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต
กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)	88.4 ± 0.8 ^a
30	85.1 ± 1.4 ^a
50	61.6 ± 0.8 ^b
70	25.3 ± 1.2 ^c
90	15.8 ± 1.8 ^d

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยแบบแช่แข็งพบว่าวิธีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกึ่งแซบวัยในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. Ca-Free saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง

2. ความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง พบว่าสารโครีโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดมีความเป็นพิษและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแตกต่างกัน กล่าวคือ สารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ Sucrose < DMSO < Methanol < Trehalose < Propylene glycol < Formamide < Glycerol < Acetamide < Ethanol < Ethylene glycol ตามลำดับ โดยที่ใช้ Sucrose 5% และ 10 % และการใช้ DMSO 5% และ 10 % มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุด คือ 5%, 10%, 15%, 20% ตามลำดับ และเวลาที่ปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแช่แข็งอยู่ในสารละลายที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ จากการทดลองเห็นได้ว่า Sucrose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งแช่แข็งต่ำ แสดงให้เห็นว่าสารโครีโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิดนี้เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งต่อไป

3. การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งพบว่า การเติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายที่เหมาะสมต่อสเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที มีความเหมาะสมในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็ง เนื่องจากมีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงที่สุดอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับการละลายที่อุณหภูมิอื่นและไม่แตกต่างน้ำเชื้อสดกุ้งแช่แข็ง

5. จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็งสามารถสรุปได้ว่าวิธีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

อภิปรายผลการทดลอง

Ca-Free saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่แข็ง โดยปกติแล้วสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้นมีความสำคัญที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จในการเก็บรักษา เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์นั้นมีคุณสมบัติดังนี้ 1) เป็นน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น 2) มีค่าออสโมลาริตีใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม 3) มีสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงานของสเปิร์ม และ 4) มีความสามารถในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) โดยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการเก็บรักษาสเปิร์มของสัตว์น้ำแบบแช่แข็งแตกต่างกันออกไป เช่น Ca-free saline สำหรับถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ, *Penaeus monodon* (Vuthiphandchai et al., 2007) และน้ำทะเลสำหรับถุงน้ำเชื้อกุ้งขาวอินเดีย, *Penaeus indicus* (Diwan and Joseph, 1999) เป็นต้น

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 10 ชนิด เห็นได้ว่า Sucrose, DMSO, Methanol และ Trehalose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งแช่แข็งต่ำ แสดงให้เห็นว่า Sucrose และ DMSO เหมาะสมที่จะใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็ง สอดคล้องกับการศึกษาของไชยทัต (2545) ที่รายงานความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงสเปิร์มกุ้งกุลาดำพบว่า Sucrose, Trehalose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อถุงสเปิร์มน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นที่ใช้ในการศึกษา จากการรายงานของ Lezcano et al. (2004) ที่ศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ผสมในน้ำทะเลที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ พบว่าสาร Ethylene glycol และ Methanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก โดย DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งขาวน้อยที่สุด รวมทั้ง Vuthiphandchai et al. (2007) ศึกษาการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในไนโตรเจนเหลวโดยใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ DMSO, Ethylene glycol, 1,2-Propylene glycol, Formamide และ Methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% เติมนลงใน Ca-free saline ที่ใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า 5% DMSO มีผลกระทบต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำน้อยที่สุด ซึ่งสามารถเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อได้กว่า 210 วัน นอกจากนั้นพลชาติและพนม (2546) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่เติมในสารละลายบัฟเฟอร์ Modified Cortland พบว่า Glucose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด รองลงมา คือ DMSO, Methanol และ Glycerol ตามลำดับ ซึ่ง ณ ความเข้มข้น 5%, 8% และ 10 % ของสารเหล่านี้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน และที่ระยะเวลา Equilibrium time ที่ 0, 15 และ 30 นาที ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความเป็นพิษของสาร DMSO ที่มีผลต่อสเปิร์มกุ้งแช่แข็ง ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน แต่ระยะเวลาที่ปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแช่แข็งอยู่ในสารละลายที่เวลา 0 นาที ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มแตกต่างกับที่เวลา 10, 15, 20 และ 30 นาที ความแตกต่างของผลการทดลองที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความไวต่อสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่ต่างกันของสเปิร์มสัตว์น้ำแต่ละชนิด (Vuthiphandchai et al., 2005) Conget et al. (1996) รายงานว่าการเติมสารโครีโอโพรเทคแทนท์ผสมระหว่าง DMSO และ Sucrose ร่วมกัน ทำให้การแช่แข็ง

สเปิร์มปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) มีประสิทธิภาพในการรักษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตามปกติแล้วการแช่แข็งเป็นการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่ภายในและล้อมรอบเซลล์ ทำให้น้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นนี้มีผลทำให้เซลล์สเปิร์มได้รับบาดเจ็บและตายได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จึงเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ดีนั้นต้องละลายน้ำได้ดีเพื่อเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำ และต้องมีความเป็นพิษต่ำ (Tiersch and Mazik, 2000) การศึกษาในครั้งนี้พบว่า DMSO มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งแช่แข็งเมื่อเปรียบเทียบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากกลไกที่แตกต่างกันของสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดย DMSO สามารถแทรกเข้าไปภายในเซลล์สเปิร์มทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์ทำให้ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้สเปิร์มได้รับอันตรายจากการแช่แข็งลดลง โดยปกติแล้วสเปิร์มของสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความไวและตอบสนองต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่แตกต่างกัน เช่น DMSO เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำ (Vuthiphanchai et al., 2007) รวมทั้งน้ำเชื้อปลากระพงแดง (Vuthiphanchai et al., 2009) และปลาตะเพียน เป็นต้น (Routray et al., 2008) นอกจากนั้น Glycerol เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งก้ามกราม (Chow et al., 1985; Akarasanon et al., 2004) และ Methanol เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอ่อนกึ่งชาวญี่ปุ่น, *Penaeus japonicas* (Gwo and Lin, 1998)

การศึกษ้อัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็งในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ คือ Ca-Free saline และเติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งแช่แข็ง การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Vuthiphanchai et al. (2007) พบว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำแบบแช่แข็งประสบความสำเร็จเมื่อเก็บรักษาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -2 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส

การแช่แข็งน้ำเชื้อทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์และล้อมรอบเซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งขนาดและการเรียงตัวของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นนี้ขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิ การลดอุณหภูมิช้าทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก แต่ก็จะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไป ส่วนอัตราการลดอุณหภูมิสูงพอเหมาะจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ขึ้นและลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ได้ รวมทั้งยังลดระยะเวลาที่ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียด ส่งผลให้เซลล์สเปิร์มรอดชีวิตสูงขึ้น (Andrabi, 2009) โดยน้ำเชื้อของสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป (Suquet et al., 2000; Gwo, 2000) เช่น 3.5-5 °C/min จาก 2 °C ถึง -14 °C แล้วเพิ่มเป็น 15-20 °C/min จนถึงอุณหภูมิ -70 °C สำหรับน้ำเชื้อปลาเตอร์เจียน (Billard et al., 2004) 5 °C/min จาก 4 °C ถึง -120 °C สำหรับน้ำเชื้อปลา Atlantic cod (Butts et al., 2011)

10 °C/min จาก 25 °C ถึง -80 °C สำหรับน้ำเชื้อปลากระพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009) 16 °C/min จาก 4 °C ถึง -80 °C สำหรับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (Routray et al., 2008) เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อและถุงน้ำเชื้อของสัตว์น้ำกลุ่ม Decapod หลายชนิด เช่น กุ้งขาวแวนนาไม (Lezcano et al., 2004), ปูทะเล, *Scylla serrata* (Billard et al., 1995), กุ้งทะเล, *Sicyonia ingentis* (Anchordoguy et al., 1988), horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. (Behlmer and Brown, 1984) และกุ้งก้ามกราม (Chow et al., 1985; Akarasanon et al., 2004)

อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ผ่านการแช่แข็งในการทดลองครั้งนี้มีค่าที่เหมาะสมเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปัจจัยที่อาจทำให้การละลายถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองที่ดีส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับขนาดของถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งที่ใหญ่ (ขนาดกว้างประมาณ 0.4-0.6 เซนติเมตร) ทำให้การละลายเนื้อเยื่อขนาดใหญ่จากอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ให้กลับสู่สภาพของเหลว ต้องใช้อุณหภูมิการละลายที่ต่ำ เพื่อให้สเปิร์มทั้งหมดที่อยู่ภายในถุง (Sperm mass) ได้กลับเข้าสู่สภาวะเหลว โดยไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งซ้ำอีกครั้ง (Recrystallization) เพราะสภาวะ Recrystallization ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (Intracellular ice crystal) และเซลล์ได้รับบาดเจ็บและรอดชีวิตน้อยลงขณะละลาย (Denniston et al., 2000) โดยทั่วไปถ้าระหว่างการแช่แข็งเซลล์ แล้วเซลล์ยังคงมีน้ำเหลือเล็กน้อยภายในเซลล์ (Intracellular water) ก่อนที่เซลล์จะถูกแช่ในไนโตรเจนเหลว จะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็ก (Ice crystal) เกิดภายในเซลล์ได้ขณะแช่แข็ง ซึ่งในสภาวะนี้เมื่อนำเซลล์นี้มาละลายที่อุณหภูมิต่ำ จะยังเพิ่มโอกาสในการที่น้ำภายในเซลล์แข็งตัว (Intracellular ice formation) ขณะละลายที่อุณหภูมิต่ำ (Slow thawing) เพราะการละลายที่อุณหภูมิต่ำจะมีเวลาในการทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็ก (Small ice crystal) พัฒนาเป็นเกล็ดน้ำแข็งขนาดใหญ่ และทำอันตรายเซลล์ได้ (Fabbri et al., 2000) ในทางตรงกันข้ามขนาดของถุงน้ำเชื้อที่ใหญ่ของกุ้งแช่แข็งในการทดลองนี้ เมื่อละลายด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้น แม่น้ำภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว แต่สภาวะการละลายที่ใช้อุณหภูมิต่ำ อาจมีผลทำให้สเปิร์มทั้งหมดที่อยู่ภายในถุง (Sperm mass) หนีไม่ได้กับอุณหภูมิต่ำ อีกทั้งขนาดของถุงน้ำเชื้อที่มีขนาดใหญ่ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการละลายถุงน้ำเชื้อทั้งถุง ทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าต่ำลง อย่างไรก็ตามการละลายถุงน้ำเชื้อแช่แข็งของการศึกษาครั้งนี้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ยังมีความเหมาะสม เพราะทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ ผลการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานโดย Vuthiphandchai et al. (2007) ที่ได้ทำการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำด้วยการใช้ Ca-F saline และ 5% DMSO และแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการแช่แข็งต่าง ๆ กัน โดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C จนถึงอุณหภูมิต่ำสุด -80°C ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว พบว่าการแช่แข็งดังกล่าวได้ผลดีเมื่อแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าสูงสุด หลังจากการละลาย (Thawing) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลีมสุวรรณ. (2528). โรคปลา. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไชยา อัยสุนนิน. (2532). การเลี้ยงกุ้งทะเล. กรุงเทพฯ: เรื่องแสงการพิมพ์.
- ไชยทัต มนต์วิจิตรกุล. (2545). การทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อungg สเปิร์มกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญชู จงอ่อน. (2548). การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแช่แข็งแบบแช่เย็น. ภาควิชาวิทยาศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2544). เอกสารประกอบการสอนวิชาการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ประจวบ หล้าอุบล. (2527). กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์ และอรุณลักษณ์ ลุดินานนท์. (2540). แบคทีเรียวิทยาคลินิก. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พลชาติ ผิวเณร และพนม กระจำพจน์สอดสุข. (2546). การเก็บรักษาเชื้อพันธุสัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มานิช รุ่งราตรี. (2535). ถดว้างไข่และชีววิทยาบางประการของกุ้งแช่แข็งบริเวณชายฝั่งตะวันออก. ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. (2548). กุ้งก้ามกราม. เข้าถึงได้จาก http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=12
- สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา. (ม.ป.ป.). กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เข้าถึงได้จาก <http://www.aquathai.org>
- สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 13. (2540). การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. เข้าถึงได้จาก <http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK13/chapter10/t13-10-l1.htm#sect4>
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2552). การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวิทย์ ชินสินธุ์. (2531). การเลี้ยงกุ้งแช่แข็งและกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: เรื่องแสงการพิมพ์.
- Akarasanon, K., Damrongphol, P. and Poolsanguan, W. (2004). Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35: 1415–1420.
- 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.

- Andrabi, S.M.H. (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 552–569.
- Al-Harbi, A.H. (2003). Faecal coliforms in pond water, sediments and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus* in Saudi Arabia. *Aquaculture Research* 34: 517-524.
- Behlmer, S.D. and Brown, G. (1984). Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 7: 193–199.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. and Suquet, M. (1995). Sperm physiology and quality. In: Bromage, N., Roberts, R.J. (ed). *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science, pp. 25–52.
- Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B. and Pourkazemi, M. (2004). Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm: A review. *Aquaculture* 236: 1-9.
- Blazer, V.S., Shotts, E.B. and Waltman, W.D. (1985). Pathology associated with *Edwardsiella ictaluri* in catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, and *Danio devario* (Hamilton-Buchanan, 1822). *Journal of Fish Biology* 27:167-175.
- Booma Kasthuri, R. (1998). Antimicrobial activity of selected species of seaweeds on pathogenic and non pathogenic bacteria. M. Sc. Dissertation. M.S. University, Tirunelveli, Tamilnadu, India.
- Braude, A.I., Davis, C.E. and Joahua, F. (1986). *Infectious disease and medical microbiology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders company.
- Butts, I.A.E., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M.K., Slowinska, M., Soler, C. and Trippel, E.A. (2011). Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L.. *Theriogenology* 75: 1290-1300.
- Chow, S., Taki, Y. and Ogasawara, Y. (1985). Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biological Bulletin* 168: 471–475.
- Conget, F.M., Herrera, G. and Minguell, J.J. (1996). Cryopreservation of rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture* 143: 319-329.
- Collin, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. (1995). *Microbiology methods*. Great Britain: ButterWorth HeineMann.

- Coyne, V.E. and Harding, D. (2007). Identification of genes expressed in response to bacterial infection of the commercially-important South African abalone *Haliotis midae*. International marine biotechnology conference, Dan hotel, Eilat, Israel, March 11-13, 2007.
- Davis, A.R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J. and Kirby, R.M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control* 12: 67-71.
- Denniston, R., Michelet, S. and Godke, R.A. (2000). Principles of cryopreservation. In: Tiersch T.T. and Mazik P.M. (ed). *Advances in World Aquaculture, Volume 7: Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, pp. 59-74.
- Diwan, A.D. and Joseph, S. (1999). Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian Journal of Fisheries* 46(2): 159-166.
- Elliott, D.G. and Shotts, E.B. (1980). Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): Microbiological examination of diseases fish from seven locations. *Journal of Fish Disease* 3: 133-143.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M.R., Rocchetta, G., Ciotti, P.M., Magrini, O., Seracchioli, R., Venturoli, S. and Flamigni, C. (2000). Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 169: 39-42.
- Fribourgh, J. H. (1966). The application of the differential staining method to low temperature studies on goldfish spermatozoa: *Progressive Fish-culturist*. 28: 227-231.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumara, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 102: 151-159.
- Gwo, J.C. (2000). Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: A review. *Aquaculture Research* 31: 259-271.
- Gwo, J.C. and Lin, C.H. (1998). Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. *Theriogenology* 49: 1289-1299.
- Hoeprich, P.D., Colin, J.M. and Ronald, A.R. (1994). *Infectious diseasea*. 5th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott company.
- 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.

- Hosseini, H., Cheraghali, A.M., Yalfani, R. and Razavilar, V. (2003). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control* 15: 187-190.
- Humphrey, J.D., Lancaster, C. and Gudkovs, N. (1986). Exotic bacterial pathogens *Edwardsiella tarda* and *Edwardsiella ictaluzg* from imported ornamental fish *Betta splendens* and *Puntius conchoni*, respectively: Isolation and quarantine significance. *Australian Veterinary Journal* 63: 369-371.
- Jaksic, S., Uhtil, S., Petrak, T., Bazulic, D. and Karolyi, L.G. (2002). Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control* 13: 491-493.
- Jasko, D.J., Bedford, S.J., Cook, N.L., Mumford, E.L., Squires, E.L., and Pickett, B.W. (1993). Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 40: 885-893.
- Jenkins, 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.
- Kent, M.L. and Lyons, J.M. (1982). *Edwardsiella ictaluri* in the green knife fish, *Eigenmania virescens*. *Fish Health News* 11(1-2): ii.
- Le Roux, F., Binesse, J., Zouine, M., Chakroun, N., Saulnier, D., Bouchier, C., Zidane, N., Ma, L., Rusniok, C., Buchrieser, C. and Mazel, D. (2007). Complete genome sequence of *Vibrio splendidus*: a pathogenic bacterium for a wide range of marine animals. Poster presentation in: 8th International Marine Biotechnology Conference, Eilat, Israel, March 11-16.
- Lewbart, G.A. (2001). Bacteria and ornamental fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10 (1): 48-56.
- Lezcano, M., Granja, C., and Salazar, M. (2004). The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology* 48: 349-356.
- Matte, G.R., Matte, M.H., Sato, M.I.Z., Sanchez, P.S., Rivera, I.G. and Martins, M.T. (1994). Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 281-287.
- Munn, C.B. (2004). *Marine microbiology*. BLOS Scientific Publisher, London.
- Nimrat, S., Sangnawakij, T. and Vuthiphandchai, V. (2005). Preservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatozoa 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.
- Nimrat, S. Suksawat, S., Maleeweatch, P. and Vuthiphandchai, V. (2008). 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. and Vuthiphandchai, V. (2008). Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In: *Aquaculture Research Trends*. Edited by Stephen H. Schwartz. Nova Science Publishers, Inc. pp. 149-184.
- Noga, E.J. (2000). *Fish Disease, Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Okeke, M.I., Iroegbu, C.V.J., Jideofor, C.O., Okoli, A.S. and Esimore, C.O. (2001). Antimicrobial activity of ethanol extracts of two indigenous Nigerian spices. *Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants* 8: 39- 46.
- Parveen, S. and Kumar, V.R. (2000). Effects of extracts of some medicinal plants on the growth of *Alternaria triticina*. *Indonesian Journal of Phytology Research* 13: 19-196.
- Pelczar, Jr.M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. (1986). *Microbiology*. 5th ed. Singapore: Mc Graw-Hill Book Company.
- Popoff, M. (1984). Genus III *Aeromonas*. In: Krieg, N.R. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Rheinheimer, G. (1992). *Aquatic Microbiology*. London: Wiley.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A. and Luzzi, I. (1999). Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology* 49: 43-48.
- Rippey, S.R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Review* 4: 419-425.
- Routray, P., Dash, S.N., Dash, C., Swain, P., Sarkar, S.K. and Sarangi, N. (2008). Cryopreservation of silver barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) spermatozoa: Effect of extender composition, cryoprotective agents and freezing rate on their postthawing fertilization ability. *Aquaculture Research* 39: 1597-1605.
- Saad, A., Billard, R. and Theron, M.G. (1988). Short-term storage of milt from common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 71: 133-150.

- Shin, S.J., D.H. Lein, V.H. Patten, and H.L. Ruhnke. (1988). A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* 29: 577-591.
- Shotts, E.B. and Talkington, F.D. (1980). Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, *Carassius auratus* (L.): Characterization of the causative agent. *Journal of Fish Diseases* 3: 181-186.
- Soo, E.C., Huenupi, E., Alfonso, L.O.B. and Hui, J.P.M. (2007). HPLC-MS-based metabolomic study of the effect of acute handling stress in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*). Poster presentation in: 8th International Marine Biotechnology Conference, Eilat, Israel, March 11-16.
- Stoss, J. and Refstie, T. (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30: 229-236.
- Sunen, E., Acebes, M. and Fernandez-Astorga, A. (1995). Occurrence of potentially pathogenic vibrios in bivalve mollusks (mussels and clams) from the retail outlets in the north of Spain. *Journal of Food Safety* 15: 275-281.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. and Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31: 231-243.
- Tendencia, E.A. and de la Peña, L.D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 195 (3-4): 193-204.
- Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (2000). Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- Todar, K. (2003). Antibiotics. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. www.textbookofbacteriology.net.
- Vandenberghe, J., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B. and Swings, J. (2002). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219: 9-20.
- Vandepitte, J., Lemmens, P. and De Swert. (1983). Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. *Journal of Clinical Microbiology* 17:165-167.
- Vuthiphandchai, V., Pengpun, B. and Nimrat, S. (2005). Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 246: 275-284.
- 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.

- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* 72: 129-138.
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- Wiklund, T. and Dalsgaard, I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: A review. *Diseases of Aquatic Organism* 32: 49-69.
- Wittman, R.J. and Flick, G.J. (1995). Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. *Annual Review of Public Health* 16: 123-140.
- Zhaolan, M., Peng, X., Yunxiang, M., Zhifeng, Z. and Jie, L. (2007). An ESRB mutant of fish pathogenic *Edwardsiella tarda* is attenuated and effective as a live vaccine against the haemorrhagic septicemia in turbot *Scophthamus maximus* (L.). International marine biotechnology conference, Dan hotel, Eilat, Israel, March 11-13, 2007.

329339

Output จากโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

สุบัณฑิต นิมรต์น์ บุญชู จงอ่อน และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2556) การพัฒนาสูตรน้ำยาสำหรับ
วิธีการเก็บรักษาถ้ำน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) แบบแช่เย็น. การประชุม
วิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 9 ความรู้สู่เชิงพาณิชย์ นำเศรษฐกิจไทยก้าวไกลอาเซียน.
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2556.