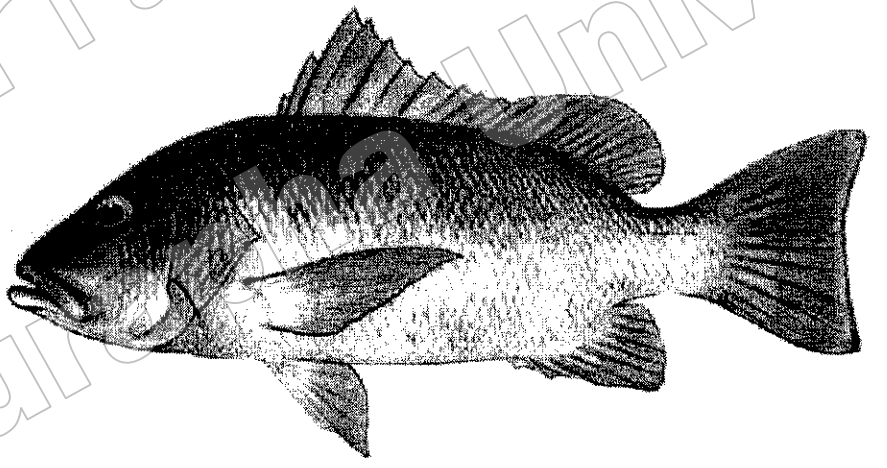
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของปลากะพงแดง

ปลากะพงแดง (*L. argentimaculatus*) Red Snapper หรือ Mangrove Snapper เป็นปลาทะเลจำพวกหนึ่งที่มีขนาดใหญ่ เลี้ยงง่าย โตเร็ว แข็งแรง ทนทานต่อโรค เจริญเติบโตค่อนข้างเร็ว อัตรารอดตายสูง และราคาดีพอสมควร ที่พบทั่วไปในบริเวณทะเลชายฝั่ง ทางอ่าวไทยตอนใต้ ตั้งแต่ชุมพรถึงนราธิวาส และฝั่งมหาสมุทรอินเดีย ตั้งแต่ระนองถึงสตูล สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ได้ตามแหล่งน้ำบริเวณป่าชายเลน ตลอดจนแหล่งน้ำกร่อย ปลากะพงแดงที่นิยมเลี้ยงมี 2 ชนิด คือ *L. johni* และ *L. argentimaculatus* เป็นปลาที่ได้จากการรวบรวมลูกพันธุ์จากธรรมชาติอย่างเดียว โดยเฉพาะ *L. johni* สามารถรวบรวมได้ตั้งแต่ขนาดความยาว 2-3 นิ้วขึ้นไป การเลี้ยงปลาชนิดนี้ในปัจจุบันนิยมเลี้ยงกันในกระชังเท่านั้น (อิทธิพร จันทร์เพ็ญ, 2531)



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลากะพงแดง (*L. argentimaculatus*) (FAO Corporate Document Repository, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปลากะพงแดงน้ำกร่อยมีรูปร่างและลำตัวคล้ายปลากะพงขาวทั่วไปในวงศ์เดียวกัน ซึ่งขากรรไกรตอนหน้าเป็นฟันเขี้ยวมี 2 ซี่ ส่วนฟันบนขากรรไกรล่างเป็นฟันเล็กคม เกล็ดค่อนข้างโต เกล็ดที่บริเวณแก้มมี 7-8 แถว ส่วนเกล็ดบนที่เส้นข้างตัวมีจำนวน 40-47 เกล็ด ครีบหลังเป็นครีบเดี่ยว ครีบตอนหน้าเป็นด้านครีบแข็งมี 10-12 อัน ถัดไปเป็นก้านครีบอ่อน ครีบหางเว้าเล็กน้อย สำหรับปลาขนาดเล็กที่ยาวประมาณไม่เกิน 10 เซนติเมตร จะมีแถบลายขวาง 6-7 แถบ และแถบจะจางหายไปเมื่อปลาโตขึ้นกลายเป็นลำตัวสีแดงคล้ำ หรือน้ำตาลอมเทา บริเวณใต้ครีบตา และสันท้องเป็นสีชมพูอมม่วง บริเวณแก้มเป็นสีส้ม ครีบอกสีขาวเหลือง ส่วนครีบอื่น ๆ มีสีน้ำตาลแดง เป็นปลาที่อยู่ตามหน้าดินและกองหินใต้น้ำในเขตทะเลตื้น ๆ ทางชายฝั่งทะเล (อิทธิพร จันทร์เพ็ญ, 2531)

ระบบทางเดินอาหารของลูกปลากะพงแดงวัยอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วหลังจากเพาะฟัก 1 วัน ซึ่งลักษณะทางเดินอาหารจะมีลักษณะเป็นเส้นตรงแต่อวัยวะนี้ยังไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร เมื่อลูกปลามีอายุได้ 2 วันอวัยวะที่เป็นเส้นตรงนี้จะโค้งลงทางช่องท้องเป็นส่วนของหลอดอาหารและลำไส้ใหญ่ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันออกไป ขณะเดียวกันในระยะนี้จะสังเกตเห็นถุงลม (Air Bladder) และตับ (Liver) โดยลำไส้ส่วนกลางนี้มีความยาว 2.95 มิลลิเมตร และตับนั้นจะครอบคลุมจนถึงบริเวณส่วนหน้าของลำไส้และหลอดอาหาร เมื่อปลามีอายุได้ 5-6 วันพบว่าลักษณะโครงสร้างทางลำไส้ได้มีการเปลี่ยนแปลง โดยมีลักษณะม้วนเป็นวงกลม ซึ่งมีความยาว 2.75-3.17 มิลลิเมตร และในวันที่ 9 พบการเกิดขึ้นของกระเพาะอาหาร ซึ่งมีความยาว 3.98 มิลลิเมตร และส่วนทางด้านหลังปลายสุดของกระเพาะอาหารมีลักษณะเป็นกรวยซึ่งมีความยาว 7.04-7.35 มิลลิเมตร เมื่อเข้าสู่ระยะ Juvenile จะพบการเชื่อมต่อกันทั้งหมดระหว่างกระเพาะอาหารกับทางเดินอาหาร โดยมีความยาวรวม 10.14 มิลลิเมตร และจะมีการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งมีความยาวของระบบทางเดินอาหารประมาณ 40 มิลลิเมตร ถือได้ว่าระบบทางเดินอาหารนั้นมีความสมบูรณ์ (Masanori & Singhagraiwan, 1993)

โดยธรรมชาติปลากะพงแดงเป็นปลาที่ว่ายน้ำรวดเร็วในระยะสั้น ๆ ทั้งปลาขนาดเล็กและปลาใหญ่ แต่เมื่อตกใจจะมุดซ่อนตัวตามมุมกระชังหรือซอกหิน มีนิสัยดุเมื่อยังเป็นปลาวัยรุ่น ฉะนั้นถ้านำลูกปลาเล็กที่มีขนาดไม่เท่ากันมาเลี้ยงไว้ในที่เดียวกัน ปลาตัวใหญ่จะกินปลาตัวเล็ก ถึงแม้ว่าจะให้อาหารพอเพียงแล้วก็ตาม แต่นิสัยดังกล่าวจะหายไปเมื่อปลาโตขึ้น (อิทธิพร จันทร์เพ็ญ, 2531) ทนต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้สูง ฉะนั้น จึงพบว่าสามารถเลี้ยงปลาชนิดนี้ได้ในช่วงความเค็ม 0 - 35 ส่วนในพันส่วน ปลากะพงแดงจะเริ่มผสมพันธุ์วางไข่เมื่อมีอายุได้ประมาณ 4 ปี หรือมีน้ำหนักตั้งแต่ 4 กิโลกรัมขึ้นไป ในช่วงอายุ 2-3 ปีแรกจะพบว่าปลาจะอ้วนมากโดยจะสะสม

ไขมันในช่องท้องจนดูคล้ายกับว่ากำลังมีไข่ สำหรับปลาชนิดนี้ตามธรรมชาติจะไม่มีการเปลี่ยนเพศ (Reverse Sex) เหมือนปลากะรัง จึงไม่พบปัญหาการขาดเพศใดเพศหนึ่ง ส่วนในด้านการผสมพันธุ์วางไข่นอกจากพ่อแม่ปลาจะต้องมีสมบูรณ์เพศเต็มที่แล้วยังจะต้องขึ้นอยู่กับฤดูกาลอีกด้วย ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาถึงฤดูการวางไข่ เช่น ศึกษาการตรวจวัดสเตอรอยด์ฮอร์โมน (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น, 2539)

ปลากะพงแดงเป็นปลาที่สามารถกินอาหารได้หลายชนิด ในขณะที่ยังมีขนาดเล็กในระยะเป็นลูกปลาจะกินอาหารจำพวกแพลงก์ตอนสัตว์ (Zooplankton) และเมื่อโตขึ้นมาอีกระยะหนึ่งจะเปลี่ยนอาหารไปเป็นพวกสัตว์หน้าดินขนาดเล็ก เช่น ลูกกุ้ง เคย ลูกปู ลูกปลาหมึก และเมื่อปลาโตเข้าระยะเต็มวัย มันสามารถกินปลาตายและปลาขนาดเล็กชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยอยู่ตามพื้นท้องทะเล ดังนั้น อาหารที่ผู้เลี้ยงสามารถนำมาให้ปลากะพงแดงที่เลี้ยง ในกระชังคือ ปลาสด และอาหารสำเร็จรูป ปลาสดที่ใช้เป็นอาหาร ได้แก่ ปลาลิง ปลาหลังเขียว ปลากะตัก และปลาชนิดอื่น ๆ ที่ราคาไม่สูง บางครั้งอาจใช้ปลาแช่แข็ง แต่ต้องนำมาล้างด้วยน้ำทะเล 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำมันตามผิวตัวปลาออกก่อน นำไปบดให้ปลากิน กรณีที่ใช้อาหารสำเร็จรูปจะเน้นความสำคัญ ในการเลือกอาหารที่มีอัตราของส่วนผสมวัตถุดิบอาหาร โดยมีส่วนผสมโปรตีน 40-45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 3-6 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินแร่ธาตุอีกหลายตัวเป็นส่วนผสมอยู่ด้วย (อิทธิพร จันทร์เพ็ญ, 2531)

ข้อดีของการเลี้ยงปลากะพงแดง

1. เลี้ยงง่าย โตเร็ว ราคาดีกว่าปลากะพงขาว ทนทานต่อโรค
2. ทนทานต่อความเค็มในช่วงกว้างกว่าปลากะรัง

ข้อเสียของการเลี้ยงปลากะพงแดง

ปลากะพงแดงหาพันธุ์ได้ยาก เนื่องจากการเพาะพันธุ์ยังมีอัตราการรอดต่ำต้องรวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ

ลักษณะรูปร่างของสเปิร์ม

สเปิร์มของปลามีขนาดเล็กมาก เนื่องจากไม่มีอาหารสะสม มีลักษณะข่นขาว คล้ายน้ำนม ที่เรียกว่า Milt สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่โดยอาศัยการโบกของหาง สเปิร์มของสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้ระยะเวลาการเคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน สเปิร์มแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

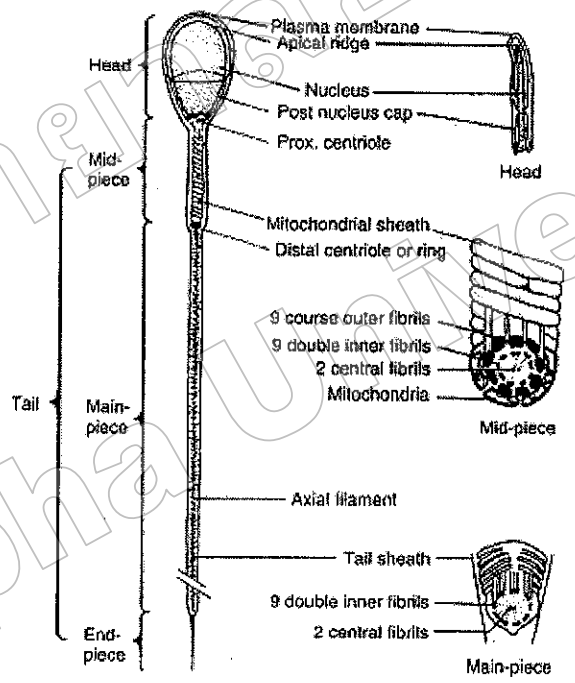
1. ส่วนหัว (Head) อาจมีลักษณะเป็นรูปไข่ หยัก หรือเป็นแท่งรี ๆ ก็ได้ ขึ้นกับชนิดของปลา ภายในส่วนหัวจะมีนิวเคลียสบรรจุอยู่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ส่วนกลาง (Middle Piece) เป็นส่วนที่ใช้เชื่อมระหว่างส่วนหัวกับส่วนหาง มีระยะสั้นมาก และเป็นส่วนที่เก็บฮอร์โมน

3. ส่วนหาง (Tail) เป็นเส้นขนขนาดเล็กมาก และยาว ทำหน้าที่โบกพัดช่วยในการเคลื่อนไหว (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์, 2530)

ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (Spherical) หรือทรงรี (Ovate) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และความยาวของสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางประมาณ 40-60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็ก และส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)



ภาพที่ 2 โครงสร้างและลักษณะรูปร่างของสเปิร์มปลา (Structural diagram of spermatozoon, n.d.)

น้ำเชื้อปลา

น้ำเชื้อที่อยู่ในอัณฑะ หรือที่รีดออกมาสด ๆ และสะอาดจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม ข้นเหนียว และมีกลิ่นคาว ถ้าน้ำเชื้อที่รีดได้มีสิ่งเจือปน เช่น สีคล้ายน้ำเลือดหรือเหลือง แสดงว่า น้ำเชื้อนั้นปนเปื้อนด้วยเลือดหรือสิ่งขับถ่ายอื่น ๆ และเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพไม่ดีนักไม่เหมาะแก่การเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และหากใช้น้ำเชื้อนั้นผสมกับไข่เพื่อการเพาะขยายพันธุ์ก็อาจเป็นเหตุให้ไข่ปลานั้นมีอัตราการผสมและการฟักเป็นตัวได้น้อยกว่าการใช้น้ำเชื้อปลาที่ไม่มีการปนเปื้อน ปริมาณของน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาตัวหนึ่งในแต่ละครั้ง และความหนาแน่นของตัวสเปิร์ม จะมีความผันแปรไปตามฤดูกาลและช่วงเวลาในฤดูผสมพันธุ์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อตัวผู้ สรุปได้ 3 วิธี (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) คือ

1. รีดโดยตรงจากตัวปลา โดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อจะไหลออกมา

2. โดยใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (Urogenital Pore)

3. โดยการผ่าท้อง เพื่อนำอัณฑะ (Testis) ไปบดแยกเอาน้ำเชื้อออกไปผสมเทียม ซึ่งมักปฏิบัติกับปลาซึ่งมีน้ำเชื้อน้อย หรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

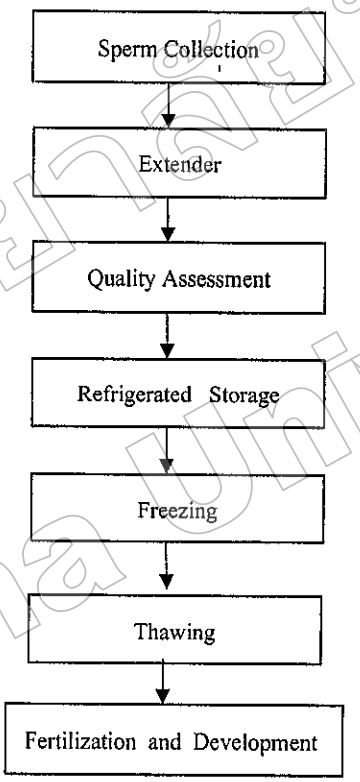
1. การเก็บระยะสั้น (Chilled Storage) เป็นการเก็บน้ำเชื้อในตู้เย็น ในอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียส เล็กน้อย สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่เหมาะสมกับปลาแต่ละชนิด การเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะนี้สามารถเก็บได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้ ชนิดปลา คุณภาพน้ำเชื้อ และเทคนิคในการเก็บรักษา

2. การเก็บระยะยาวโดยวิธีแช่แข็ง (Cryopreservation) เป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส การเก็บโดยวิธีนี้ต้องใช้น้ำยา (Extender) เจือจางน้ำเชื้อซึ่งผสมสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ สารเหล่านี้เรียกว่า "ไครโอโพรเทคแทนท์" (Cryoprotectant) ได้แก่ กลีเซอรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ แอลอลฮอล์ และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นต้น สารเหล่านี้จะช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ป้องกันเซลล์เหี่ยว ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการเสียสมดุลของเกลือแร่และอิเล็คโตรไลท์ และยังสามารถช่วยคงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออแกเนล การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งต้องกำหนดระยะเวลาให้เซลล์ปรับตัวกับสารละลาย (Equilibration) กำหนดอัตราการลดอุณหภูมิ ลักษณะหลอดแช่แข็ง ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติถูกต้องและเหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิดจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานหลายปี (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536; นลินี มารคแมน, 2527)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลานานโดยวิธีแช่แข็ง

ตั้งแต่ปี 1953-1996 มีรายงานการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งรวม 185 เรื่อง ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 60 ฉบับ เป็นรายงานที่ครอบคลุมการทดลองเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

อย่างน้อย 85 ชนิด จาก 35 วงศ์ ซึ่งเป็นตัวแทน 12 อันดับ จากทั้งหมดประมาณ 60 อันดับในปลา ส่วนใหญ่เน้นไปที่ปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นปลากลุ่ม Salmonids ประมาณ 12 ชนิด ปลากลุ่ม Cyprinids 12 ชนิด และกลุ่ม Catfish 8 ชนิด ในวงศ์ Clariidae, Heteropneustidae, Ictaluridae, Pangasiidae และ Siluridae การศึกษาทั้งหมดยังแบ่งได้เป็นกลุ่มปลาน้ำจืด 49 เปอร์เซ็นต์ ปลาทะเล 31 เปอร์เซ็นต์ ปลาน้ำกร่อย 7 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่อพยพระหว่างน้ำจืดกับน้ำทะเล 13 เปอร์เซ็นต์ (Tiersch, 2000) การเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลานานโดยวิธีแช่แข็งมีรายละเอียดและขั้นตอนการเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งดังนี้



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง (Tiersch, 2000)

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลา (Sperm Collection) สำหรับการรีดน้ำเชื้อ โดยทั่วไปนิยมรีดด้วยมือ โดยใช้มือบีบหรือกด รีดส่วนท้องของปลา สำหรับภาชนะที่ใช้รองรับน้ำเชื้อต้องสะอาดและเช็ดให้แห้ง และควรเป็นภาชนะที่มีขีดบอกปริมาตรเพื่อสะดวกในการอ่านและบันทึกปริมาตรทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อแล้ว (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา (Extender) มีผู้คิดสูตรน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาไว้มากมาย ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำยาเหล่านี้มีคุณสมบัติที่สำคัญ คือมีคุณสมบัติเป็น Isotonic กับน้ำเชื้อ มีบัฟเฟอร์ (Buffer) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเกิดจาก Metabolite ของตัวสเปิร์ม มีอาหาร (Nutrient) เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และอิออนบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมียาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และมี Protective Agent เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์สเปิร์มในขบวนการแช่แข็งและการทำลาย (นลินี มารคแมน, 2527)

3. การเก็บรักษาแบบแช่เย็น (Refrigerated Storage หรือ Short-Term Storage) น้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองต้องได้รับการรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในน้ำแข็งหรือตู้เย็นและควบคุมไม่ให้น้ำเชื้อแข็งตัว โดยผสมน้ำเชื้อกับ Extender ในอัตราส่วนต่าง ๆ และบรรจุลงในภาชนะ ภาชนะที่บรรจุน้ำเชื้อควรมีลักษณะที่เป็นภาชนะทรงตื้น มีฝาปิด และมีออกซิเจนเพียงพอต่อตัวสเปิร์มขณะทำการเก็บรักษาและทำการตรวจสอบดูไม่ให้น้ำเชื้อตกตะกอน อันเป็นสาเหตุให้เซลล์ที่อยู่ข้างล่างไม่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ จึงต้องทำการเขย่าเบา ๆ ทุกวัน (Wayman & Tiersch, 2000)

4. การแช่แข็ง (Freezing) ภายหลังผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีการเก็บรักษาแบบแช่เย็นแล้ว ก็จะเข้าสู่การทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย ดังนี้

4.1 สารไครโอโพรเทคแทนท์ เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง เนื่องจากสารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถป้องกันการแข็งตัวของน้ำภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งจะทำให้เสียคุณสมบัติ Permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความเป็นกรด-ด่าง สารไครโอโพรเทคแทนท์มีหลายชนิด สารเคมีเหล่านี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตของตัวอย่างที่เก็บแช่แข็ง (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2541)

การจำแนกประเภทสารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถจำแนกประเภทออกเป็น 2 ประเภท คือ

4.1.1. ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็งและละลาย สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตราย ได้ดีเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 โมล) แต่สารเคมีในกลุ่มนี้ก็มีข้อเสียอยู่คือมีความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.1.2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (0.01-0.2 โมล) และ เป็นพิษน้อยกว่าด้วย (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4.2 ช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารป้องกันอันตรายของเซลล์ เพื่อให้เซลล์ปรับตัวก่อนทำการแช่แข็ง (Equilibration Time) ในสมัยก่อน การทดลองต้องนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อกับ Protective Agent เก็บไว้ในตู้เย็นระยะหนึ่งซึ่งจะแตกต่างกัน ในแต่ละการทดลอง การทดลองส่วนใหญ่มักจะแสดงถึงความสัมพันธ์ของ Equilibration Time กับระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ เมื่อบรรจุน้ำเชื้อในหลอดเก็บน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร บางการทดลองกล่าวว่า Equilibration Time ในช่วงสั้นให้ผลการทดลองที่ดี บางการทดลองกลับให้ผลที่ตรงกันข้าม แต่ส่วนใหญ่อ้างว่าขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (พัชรี มงคลวัย, 2546)

4.3 ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ มีหลายขนาด ได้แก่ 0.25 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาควรใช้หลอดที่มีความจุอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร ขึ้นไปเพราะต้องผสมกับไข่ปลาจำนวนมากภายหลังการละลาย จึงต้องให้มีจำนวนสเปิร์มมากพอต่อการผสม หลอดบรรจุน้ำเชื้อมีหลายแบบ ได้แก่ หลอดฟาง (French Straw) หลอดฉีดยา (Ampoule) และหลอดไครโอ (Cryotube) เป็นต้น ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไป ผู้ใช้จึงต้องเลือกใช้ตามความเหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บ และวิธีการเก็บรักษา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

5. อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing Rate) เมื่อมีการลดอุณหภูมิลงต่ำถึง 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย (ประมาณ -0.5 องศาเซลเซียส) ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว ดังนั้นของเหลวรอบเซลล์และเซลล์จะอยู่ในสภาพที่เย็นจัดตามปกติเซลล์จะคงอยู่ในสภาพเย็นจัดได้นานต่อไป ขณะที่ของเหลวรอบ ๆ เซลล์เริ่มมีเกล็ดน้ำแข็ง หรืออีกนัยหนึ่งก็คือการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์เกิดขึ้นช้ากว่าการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในของเหลวรอบ ๆ เซลล์ ผลต่อเนื่องมาจากปรากฏการณ์นี้ก็คือ

5.1 ตัวถูกละลายในของเหลวรอบ ๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามปริมาณการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในขณะที่ยังไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงสูญเสียน้ำเพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก

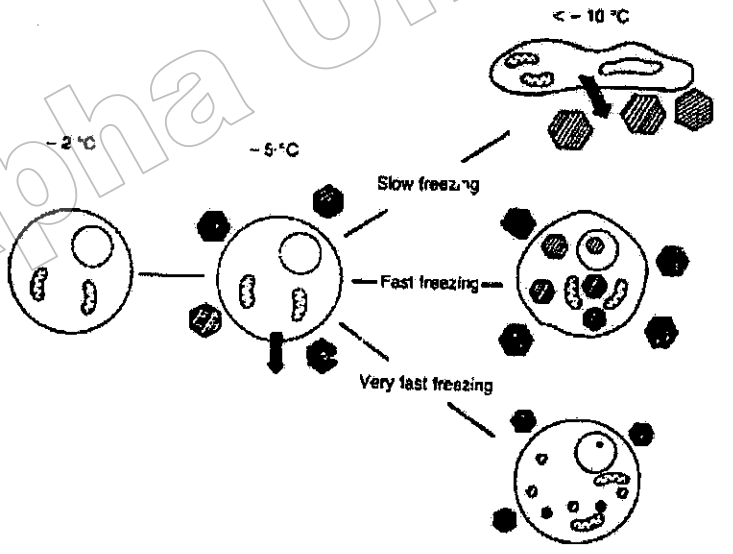
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2 ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างช้า ๆ เซลล์ก็จะสูญเสียน้ำเพียงพอที่จะทำให้แรงดันออสโมติกมีความสมดุลได้ และเซลล์จะมีขนาดเล็กลง วิธีหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำมากเกินไป อาจทำได้โดยการชักนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเร็วขึ้น (Seeding)

5.3 ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็ว ความสมดุลของแรงดันออสโมติกก็เกิดขึ้นได้ เพราะการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และเยื่อหุ้มออแกเนลถูกทิ่มแทงโดยเกล็ดน้ำแข็ง

จะเห็นได้ว่า เมื่อทำการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าหรือเร็วต่างก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ทั้งนั้น ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมย่อมจะทำให้ตัวอย่างเซลล์แช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นได้

อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คือ อัตราการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือถ้าเกิดขึ้นก็ให้มีน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ แต่ขณะเดียวกันอัตราการลดอุณหภูมิที่ว่าเหมาะสมดังกล่าวนั้นก็ยังเป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วพอที่จะไม่ทำให้เซลล์เป็นอันตรายเนื่องจากการสูญเสียน้ำ และการตกผลึกของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม ปัญหาเหล่านี้พอจะแก้ไขให้เบาลงได้ด้วยการเติมสารเคมีบางอย่างลงไปในของเหลวที่อยู่นอกเซลล์หรือน้ำยาที่ใช้เจือจางเซลล์ (Extender หรือ Diluent) สารเคมีดังกล่าวมีหลายชนิดแต่เรียกรวม ๆ ว่า ไครโอโพรเทคแทนท์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในขณะการลดอุณหภูมิในวิธีการแช่แข็ง (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัจจุบันมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิเพื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่ใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมการลดอุณหภูมิ เช่น Computerized Presetting Freezing Unit และ Programmed Freezing Unit เป็นต้น แต่อุปกรณ์นี้มีราคาแพงมากและเหมาะกับใช้ในการทดลองเท่านั้น อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิกับไข่ลดลงเล็กน้อย (นลินี มารคแมน, 2527) อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วให้ผลดีกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เพราะจะทำให้สเปิร์มมีอัตราการรอดสูงขึ้น (พัชรี มงคลวัย, 2546)

6. อัตราการละลาย (Thawing Rate) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อขึ้นกับอัตราการแช่แข็ง ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ องค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้เจือจาง และ Equilibration Time โดยทั่วไปจะทำการละลายน้ำเชื้อโดยแช่น้ำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือทำการละลายโดยการอุ่นใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 32-38 องศาเซลเซียส (นลินี มารคแมน, 2527)

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา สามารถบอกความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อที่จะนำมาเพาะพันธุ์ โดยมีวิธีการประเมิน 5 วิธี ดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยดูสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่มีสิ่งเจือปน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

2. การนับจำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร (Sperm Concentration) ปฏิบัติเฉพาะน้ำเชื้อสด เพื่อให้ทราบจำนวนสเปิร์มก่อนดำเนินการในเรื่องอื่น ๆ ต่อไป โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 9 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ เขย่าให้ทั่ว ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วใส่อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดโลหิตแดง (RBC Counting Chamber หรือ Haemacytometer) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำมานับจำนวนสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x (อนงคณ์ หัมพานนท์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา, 2538)

3. การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Percentage of Motile Sperm) ทำโดยสุ่มดูสเปิร์มในกล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 0-5 ดังนี้

0 = ไม่มีการเคลื่อนที่

1 = เคลื่อนที่ 20 เปอร์เซ็นต์

2 = เคลื่อนที่ 40 เปอร์เซ็นต์

3 = เคลื่อนที่ 60 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4 = เคลื่อนที่ 80 เปอร์เซ็นต์

5 = เคลื่อนที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (Vuthiphandchai & Zohar, 1999)

แต่การทดลองของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540) ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x โดยดูการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทั้งหมด และระยะเวลาการเคลื่อนที่เมื่อสเปิร์มถูกกับน้ำ โดยแบ่งเกณฑ์การประเมินออกเป็น 10 ระดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ระดับที่	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
1	0 < 10
2	10 < 20
3	20 < 30
4	30 < 40
5	40 < 50
6	50 < 60
7	60 < 70
8	70 < 80
9	80 < 90
10	90 < 100

4. การย้อมสีตัวเป็นตัวตาย (Live-Dead Stain) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มที่ผิดปกติ

5. การตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิ (Fertilization Ability) โดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ผสมติดโดยผสมน้ำเชื้อกับไข่สด วิธีนี้จะให้ผลแน่นอนและแม่นยำกว่าการตรวจคุณภาพด้วยวิธีอื่น แต่ต้องใช้เวลามาก และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาแช่แข็งกันอย่างแพร่หลาย (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประโยชน์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง (พลชาติ ผิวเณร และพนม กระจ่างพจน์ สอดศุข, 2546)

1. ประหยัดค่าใช้จ่ายและพื้นที่ในการเลี้ยงพ่อพันธุ์
2. น้ำเชื้อแช่แข็งมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์
3. ใช้ในการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล
4. มีความจำเป็นในการผสมเทียมสัตว์น้ำที่มีข้อจำกัดบางประการซึ่งทำให้ไม่สามารถผสมพันธุ์ตามธรรมชาติได้
5. เป็นประโยชน์ในการเพาะพันธุ์ปลาที่ใกล้สูญพันธุ์
6. สะดวกในการขนส่ง การศึกษาวิจัยที่เป็นโครงการระหว่างประเทศ โดยใช้การขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งแทนการส่งตัวปลา

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ji et al. (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Sea Perch (*Lateolabrax japonicus*) ซึ่งทำในเชิงการค้า ด้วย Extender 3 สูตร คือ MPRS, D-15 และ MMM ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ: น้ำยา เท่ากับ 1: 1 โดยใช้หลอดฟางขนาด 1.8 ml และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ คือ DMSO, DMF, Glycerol และ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 14 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารประกอบที่เหมาะสมในการแช่แข็ง ประกอบด้วย MPRS และ DMSO 10% และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน และ 1 ปี ซึ่งให้ผลการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด

Richardson et al. (1999) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตาเดียว (*Pleuronectes ferrugineus*) โดยใช้หลอดฟางที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 0.25 มิลลิลิตร และ 1.7 มิลลิลิตร พบว่าอัตราการปฏิสนธิเมื่อนำน้ำเชื้อสดเทียบกับน้ำเชื้อที่ถูกเก็บไว้ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และหลอดฟางขนาด 1.7 มิลลิลิตร ได้เป็น 59 เปอร์เซ็นต์ 54 เปอร์เซ็นต์และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอัตราการฟักเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด ได้เป็น 52 เปอร์เซ็นต์ 42 เปอร์เซ็นต์และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนของ Zhang et al. (2003) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตาเดียว (*Paralichthys olivaceus*) ด้วย Extender 6 สูตร คือ NaCl, KCl, CaCl, MgCl, $MgSO_4$ และ $NaHCO_3$ และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Glycerol และ Methanol ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ: น้ำยา เท่ากับ 1: 2 โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่สุดท้ายนั้นแตกต่างกันคือ -15, -40, -80, -110 และ -160 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่า Glycerol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และการเพาะฟักดีที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Glogowski et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) แบบแช่แข็ง ด้วยน้ำยา 3 สูตร คือ Tris-Sucrose-KCl, Tris-NaCl และ Tris-Sucrose และผสมด้วย Methanol 10% โดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อ: น้ำยา เท่ากับ 1: 1 พบว่าสารที่เหมาะสมในการแช่แข็ง คือ Tris-Sucrose-KCl และ Tris-NaCl โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 3.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และอุณหภูมิสุดท้ายคือ -15 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที โดยตรวจพบว่าให้อัตราการฟักสูงเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด

Dreanno et al. (1997) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Turbot (*Scophthalmus maximus*) ด้วย Extender 4 สูตร คือ MMM, ASL1, ASL2 และ MRM และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด คือ DMSO, Glycerol, Ethylene Glycol และ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ: น้ำยา เป็น 1: 2 พบว่า MMM เป็น Extender ที่ดีที่สุด โดยที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -46, -99 และ -148 องศาเซลเซียส ซึ่งนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40, 20 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ดีที่สุด คือ DMSO 10%

Muchlisin, Hashim, and Chong (2004) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม Catfish (*Mystus nemurus*) แบบแช่แข็ง ด้วยน้ำยา 3 สูตร คือ Physiological Saline, Saline และ Ringer พบว่า Saline ในอัตราส่วน 1: 20 ผสมกับ Methanol 10% โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งให้อัตราการเคลื่อนที่ดีที่สุด

Bolla, Holmefjord, and Refstie (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic Halibut โดยทดลองทำ การแช่แข็ง 2 ลักษณะ วิธีที่ 1 คือการหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วลงบนก้อนน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะได้ก้อนน้ำแข้งแช่แข็งเป็นก้อนเล็ก ๆ (Pellet) แล้วจึงนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ส่วนวิธีที่ 2 คือบรรจุน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วใส่ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางบนน้ำแข็งแห้งนาน 3 นาที ก่อนจะนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว เมื่อนำน้ำเชื้อที่เก็บทั้ง 2 แบบออกมาละลายที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปผสม กับไข่ พบว่าวิธีทั้ง 2 แบบให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเพาะฟักที่ไม่แตกต่างกัน

เรณู ยาชิโร และคณะ (2542) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาหมอทะเล *(Epinephelus lanceolatus)* โดยวิธีแช่แข็งโดยการนับจำนวนเซลล์และดูเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%LC) ของน้ำเชื้อเข้มข้นไม่ได้เจือจาง และเจือจางด้วยสารละลาย Marine Fish Ringer (MFR) ผสมด้วยกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ Dimethylsulfoxide (DMSO) 10% โดยเก็บน้ำเชื้อครั้งแรกในถังไนโตรเจนเหลว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(-196 องศาเซลเซียส) นาน 43 วัน แล้วนำออกมาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ตัวเป็นกับวันแรกที่เก็บ พบว่าได้ %LC=98.21% ซึ่งไม่แตกต่างจากวันแรก %LC=98.35%

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University