รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืนเพื่อการค้าและการอนุรักษ์

(Sustainable Development of Storage Technology of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) Milt for Commercial and Conservation)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802278
สัญญาเลขที่ 67/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืนเพื่อการค้าและการอนุรักษ์

Sustainable Development of Storage Technology of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) Milt for Commercial and Conservation

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 67/2558

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 67/2558)

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืนเพื่อการค้าและการอนุรักษ์ ในปีที่ 2 ได้ทำการศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด คือ Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ในน้ำยา Extender 7 และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer) ด้วยการลดอุณหภูมิแบบ Two-step freezing จากอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ไปจนถึง 0 องศาเซลเซียส และจาก 0 องศาเซลเซียส ไปจนถึงอุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที ผลการศึกษาพบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้สารละลาย Extender 7 เป็นน้ำยาบัฟเฟอร์และสารสะลาย DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 9% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -3 องศาเซลเซียสต่อนาที มีความเหมาะสมในการรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาถึงการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งด้วยเทคนิคอย่างง่ายในกล่องโฟม ผลการศึกษาพบว่าการใช้น้ำยา Extender 7 และ 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อร่วมกับการลดอุณหภูมิที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 15 นาที มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายเมื่อประเมินจากอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการมีชีวิตของสเปิร์ม โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในไนโตรเจนเหลวได้นาน 4 เดือน

คำสำคัญ: การแช่แข็ง; ปลาสวาย; น้ำเชื้อ; สารไครโอโพรเทคแทนท์

ABSTRACT

Research entitled “Sustainable development of storage technology of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt for commercial and conservation)” in the second year was designed to evaluate the effects of type and concentration of four cryoprotectants (glycerol, dimethylsulfoxide; DMSO, propylene glycol and sucrose) at five concentration levels (3, 6, 9, 12 and 15%) on cryopreservation of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt. Freezing of milt was performed in the controlled-rate programmable freezer with two-step freezing protocol from 25 °C to 0 °C and 0 °C to 40 °C using various freezing rates at -3, -5 and -10 °C/min. Appropriate cryopreservation protocol was obtained from a treatment using extender 7 and 9% DMSO under a freezing rate -3°C/min with optimal thawing temperature of 40°C. Development of cryopreservation protocol of *P. hypophthalmus* milt was also performed by simple freezing in a styrofoam box. Freezing of milt at the height of 6 cm above liquid nitrogen surface for 15 min was an effective protocol based on evaluation of sperm motility and sperm viability. Cryopreserved milt was successfully stored in liquid nitrogen for 4 months.

Key words: Cryopreservation; Striped Catfish; Semen; Cryoprotectant

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ........ I
บทคัดย่อ........ III
Abstract........ IV
สารบัญ........ V
สารบัญตาราง........ VI
สารบัญภาพ........ VII

บทที่

1 บทนำ........ 1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง........ 7
3 วิธีดำเนินงานวิจัย........ 22
4 ผลการทดลอง........ 30
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง........ 47
เอกสารอ้างอิง........ 50
ผลผลิต (Output)........ 55
รายงานสรุปการเงิน........ 56
ประวัติคณะผู้วิจัย........ 57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ 100 มิลลิลิตร) ของสารอินทรีย์บางอย่างในของเหลวในน้ำเชื้อปลาบางชนิด	9
2	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอโรโมแนส	12
3	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการผสมน้ำเชื้อด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด	32
4	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิและการละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ	36
5	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็งในสูตรน้ำยา Ca-F HBSS และ Extender 7 ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยใช้ระยะเวลาในการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 นาที	44
6	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที เป็นเวลา 6 เดือน	45
7	อัตราการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที เป็นเวลา 6 เดือน	46

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปลาสวาย	8
2	ตัวสเปิร์มปลาสวาย	10
3	ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (a) การติดสีแกรมของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (b) รูปร่างของแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส	11
4	แหล่งที่พบแบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (a) แม่น้ำ (b) น้ำเสีย	11
5	อาการติดเชื้อจาก *A. hydrophila* ที่บริเวณผิวหนัง	12
6	ลักษณะของปลาที่เป็นโรค MAD (a) อาการท้องบวม (b) เลือดออกบริเวณเหงือกและผิวหนัง (c) ผิวหนังและเกล็ดหลุดออก	14
7	(a) ลักษณะรูปร่างของ *Pseudomonas* spp. (b) ลักษณะรูปร่างของ *Leucothrix* spp.	16
8	(a) การจับพ่อพันธุ์ปลาสวาย (b) พ่อพันธุ์ปลาสวาย	23
9	การปรับสภาพแวดล้อมพ่อพันธุ์ปลาสวาย ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	24
10	การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาสวาย	24
11	การดูดตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมสารไครโอโพรเทคแทนท์บรรจุลงในหลอดฟาง	27
12	การนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer)	27
13	(a) การเก็บตัวอย่างหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อมาละลาย (b) การละลายน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง	28
14	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการผสมน้ำเชื้อด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ตลอดระยะเวลา 120 นาที	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

15 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม DMSO ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส............ 39

16 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม Propylene glycol ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส............ 40

17 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม Glycerol ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส............ 41

18 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม Sucrose ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส............ 42

19 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที............ 45

20 อัตราการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที............ 46

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ปลาน้ำจืดมีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม และโภชนาการของประเทศอย่างมาก เนื่องจากปลาเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ตลอดจนงานในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังช่วยให้ตลาดแรงงานขยายตัว รัฐบาลจึงได้ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดี เพื่อเป็นการทดแทนการประมงจากแหล่งธรรมชาติที่ให้ผลผลิตลดลงจากการทำประมงอย่างผิดกฎหมาย เช่น การจับปลาในฤดูวางไข่ การระเบิดปลา เป็นต้น และโอกาสที่การเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดจะขยายตัวได้ยังมีอีกมาก เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ที่สามารถนำมาทำฟาร์มเพาะเลี้ยงได้หลายแห่ง และยังมีเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะรองรับการขยายพันธุ์และการอนุบาลปลาได้ (ศักดิ์ชัย, 2536)

จากสถิติและผลการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของกรมประมงในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้รายงานว่า ปริมาณและมูลค่าสัตว์น้ำที่สำคัญของไทย 10 อันดับ ได้แก่ ปลานิล ปลาไน ปลาตะเพียน ปลาสลิด ปลาจีน ปลาดุกและปลาช่อน อยู่ในลำดับที่ 1 ถึง 7 ส่วนปลาสวาย อยู่ในลำดับที่ 8 กุ้งก้ามกราม และปลาหมอเทศ อยู่ในลำดับที่ 9 และ 10 ตามลำดับ โดยมีปริมาณผลผลิตปลาสวายรวมทั้งประเทศ 7,678.01 ตัน คิดเป็นมูลค่า 138 ล้านบาท และมีการเลี้ยงอยู่ในทุกภูมิภาคของประเทศ โดยเฉพาะภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลางและภาคตะวันออก จากมากไปหาน้อย ตามลำดับ (กองเศรษฐกิจการประมง, 2541) แสดงให้เห็นว่าปลาสวายเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย และเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยทั่วไป เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี สามารถนำไปบริโภคได้ทั้งปลาสดและทำเป็นปลาแปรรูปได้หลายชนิด เช่น ปลาแห้งรมควัน ปลาร้า ปลาส้มและอื่น ๆ นอกจากนี้ตลาดปลาสวยงามในต่างประเทศ เช่น ฮ่องกง สิงคโปร์ และประเทศในแถบยุโรป ได้ให้ความสนใจกับลูกปลาสวายขนาดเล็กเป็นอย่างมาก และเนื้อปลาสวายลอกหนังแช่แข็งก็เป็นที่น่าสนใจเช่นกัน (สมปอง, 2523)

ในอดีตลูกปลาสวายจะถูกรวบรวมจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติเพื่อส่งขายต่อผู้เลี้ยงปลา ทั้งนี้เพราะปลาสวายเป็นปลาที่ไม่แพร่พันธุ์วางไข่ในบ่อหรือในกระชังที่กักขัง จนกระทั่งกรมประมงประสบผลสำเร็จในการผสมเทียมปลาสวายในปี พ.ศ. 2509 อย่างไรก็ตาม ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายนของทุกปี มักประสบปัญหาการขาดแคลนลูกปลา เนื่องจากอยู่นอกช่วงฤดูผสมพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมในแต่ละท้องถิ่น และความช้าเร็วของฤดูฝนในแต่ละปีด้วย (สมปอง, 2523) ในขณะที่ปลาสวายทางภาคใต้สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดทั้งปี ผู้เลี้ยงปลาสวายบางรายจึงต้องสั่งซื้อลูกพันธุ์ปลาจากทางภาคใต้โดยการลำเลียงขนส่งลูกปลาทางรถยนต์และทางอากาศ (กาญจนรี และคณะ, 2539) เนื่องมาจากแรงจูงใจเรื่องราคาของผลผลิตปลาสวายในช่วงนอกฤดูเก็บเกี่ยวที่อาจมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 50-70 บาท ในบางพื้นที่ เช่น จ. เชียงใหม่ และ จ. ขอนแก่น (กองเศรษฐกิจการประมง, 2541) ดังนั้นหากมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลาสวายให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การนำน้ำเชื้อแช่เย็นหรือแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์ เพื่อลดต้นทุนในการเลี้ยง จับ และรีดน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียมก็จะสามารถลดต้นทุนทั้งในส่วนของการเพาะพันธุ์ลูกปลาของผู้เพาะลูกปลาขาย และต้นทุนค่าลูกพันธุ์ปลาของผู้เลี้ยงปลาเนื้อได้ ซึ่งการพัฒนาเทคโนโลยีเหล่านี้จำเป็นต้องมีการ

ประเมินความเสี่ยงของอุบัติการณ์ในการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้นมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ

อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่ประสบอยู่ขณะนี้ของการเลี้ยงปลาสวายก็คือ การขาดแคลนลูกพันธุ์ปลาสวายที่จะนำมาเลี้ยง อันเนื่องจากไม่สามารถควบคุมการผลิตเพาะพันธุ์ปลาได้ตามที่ต้องการ เพราะว่าปลาสวายแม้ว่าจะผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล แต่ก็บ่อยครั้งที่ความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์เกิดไม่พร้อมกัน เช่น บางครั้งแม่พันธุ์มีไข่แก่แต่พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อน้อยมาก หรือพ่อพันธุ์มีความพร้อมแต่แม่พันธุ์มีไข่ที่ไม่สุกเต็มที่ เป็นต้น รวมทั้งน้ำเชื้อที่รีดได้มักมีปัสสาวะปนออกมาด้วยทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสดได้นาน เนื่องจากคุณภาพสเปิร์มจะลดลงเมื่อมีการปนเปื้อนด้วยปัสสาวะ ปัญหานี้แม้ว่าจะเกิดขึ้นในพ่อแม่พันธุ์ปลาชนิดอื่นๆ แต่ก็ไม่มีความรุนแรงมากเหมือนปลาสวายในประเด็นที่พ่อแม่พันธุ์ปลาสวายมักมีขนาดใหญ่กว่าพ่อแม่พันธุ์ปลาทั่วไป โดยมีขนาดอย่างน้อย 4 กิโลกรัมขึ้นไป ทำให้เมื่อจับหรือลำเลียงปลาสวาย ปลาจะมีความเครียดมาก และมีผลต่อคุณภาพไข่ และคุณภาพน้ำเชื้อ ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จ ในปัจจุบันการเพาะพันธุ์ปลาสวายนิยมเพาะพันธุ์ด้วยการผสมเทียมโดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ แล้วรีดน้ำเชื้อผสมกับไข่ หรืออาจทำโดยปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ผสมพันธุ์กันเองภายในบ่อ แล้วทำการเก็บไข่ไปฟักและอนุบาลต่อไป อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเพาะพันธุ์ปลาสวายด้วยวิธีไหนก็จะเจอปัญหาความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ที่มักไม่พร้อมกัน หรือปัญหาปริมาณน้ำเชื้อที่พ่อพันธุ์มีน้อยดังที่กล่าวมาแล้ว

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีความเจริญก้าวหน้าอยู่ในแนวหน้าของโลก ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคการเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องและยาวนาน แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดก็คือ พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Spawning season) พ่อพันธุ์จะมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนให้ปลาสร้างน้ำเชื้อแต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เพราะโดยทั่วไปแล้วช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศมักจะเกิดก่อนแต่จะยาวนานกว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศ นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (Sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (Egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรือเกิดจากความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว (Individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (Freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมนั้นก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้ผสมเทียมทันที ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผสมพันธุ์ไม่ติด (วีรพงศ์, 2536) ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อที่พร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เมื่อแม่ปลามีความพร้อมในการเพาะขยายพันธุ์

ด้วยเหตุที่การเพาะพันธุ์ปลาสวายด้วยการผสมเทียมเป็นวิธีที่ควบคุมผลผลิตลูกปลาได้ตามความต้องการของตลาด และทำให้การจัดการภายในฟาร์มมีความสะดวก แต่การที่พ่อพันธุ์ปลาสวายมีน้ำเชื้อน้อย ทำให้ต้องรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวเพื่อผสมเทียมกับไข่ หรือบ่อยครั้งที่แม่พันธุ์ปลาสวายที่ทำการเพาะมีการตกไข่ไม่พร้อมกัน ทำให้การผสมเทียมต้องจับพ่อปลาบ่อยครั้งมากขึ้นเพื่อผสมเทียม ซึ่งต้องใช้แรงงานมากขึ้นในการจับพ่อพันธุ์และปลามีความเครียด สภาพการณ์เช่นนี้เป็นปัญหาที่พบบ่อย ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาสวายไม่สามารถผลิตลูกปลาได้ตามความต้องการของตลาดหรือมีผลผลิตต่ำ แนวทางที่เหมาะสมในการแก้ปัญหาดังกล่าวแนวทางหนึ่งก็คือ เมื่อจับพ่อพันธุ์ปลาสวายมารีดน้ำเชื้อก็ควรรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวในเวลาเดียวกัน เพื่อให้ได้น้ำเชื้อปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ และเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำสามารถเก็บได้ใน 2 ลักษณะ ได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น (Short-term storage) โดยเก็บรักษาในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียส เล็กน้อย (0-4 องศาเซลเซียส) ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (Long-term storage) โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นปี และน้ำเชื้อที่ได้ก็มีคุณภาพดีเหมือนน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ (Freshly collected milt) การพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายให้มีชีวิตยืนยาวและใช้ประโยชน์ได้นานที่สุด จะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาสวายให้ดีขึ้น และควบคุมการผลิตได้ตามที่ต้องการ กล่าวคือเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อมก็รีดไข่ แล้วนำน้ำเชื้อแช่เย็นที่อยู่ใน Tissue culture flask หรือน้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟาง (Straw) มาผสมเทียมกับไข่ทันทีโดยไม่ต้องจับพ่อพันธุ์ขึ้นจากบ่อเพื่อรีดน้ำเชื้อ ซึ่งจะลดการใช้พื้นที่ในฟาร์มที่ต้องขังพ่อพันธุ์ ทำให้ประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ดีขึ้น และยังสามารถนำน้ำเชื้อแช่เย็นหรือน้ำเชื้อแช่แข็งจากที่อื่น ๆ มาผสมเทียมกับไข่ได้ทันทีเมื่อแม่พันธุ์มีการตกไข่

อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดในระหว่างเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำคือการเจริญของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อ ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากแบคทีเรียที่อยู่บนผิวตัวปลา แบคทีเรียที่ปนเปื้อนนี้สามารถเจริญในระหว่างเก็บน้ำเชื้อได้ เพราะแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเลือดหรือมีอาหารโดยเฉพาะของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์ม ซึ่งมีธาตุอาหารหลายชนิดที่แบคทีเรียชอบ ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี ซึ่งการปนเปื้อนนี้มีผลทำให้การปฏิสนธิและคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาลดลง (Sadd et al., 1988) การป้องกันการปนเปื้อนอาจทำได้โดยการใส่ยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกับการเก็บรักษาสเปิร์มของสัตว์บกเศรษฐกิจหลาย ๆ ชนิด แต่การใช้ยาปฏิชีวนะจะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะอาจมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำและการพัฒนาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำและมนุษย์

นอกจากนั้นในปัจจุบันพบว่าเกิดภัยพิบัติจากน้ำท่วมทั่วประเทศจึงทำให้ตระหนักถึงประโยชน์ของการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ เนื่องจากน้ำท่วมจากน้ำหลากหรือน้ำเอ่อล้นจากแม่น้ำหรือทะเลสามารถทำให้บ่อเลี้ยงพ่อพันธุ์เกิดความเสียหายและทำให้เกิดการสูญเสียพ่อพันธุ์อย่างมาก ดังนั้นการเก็บน้ำเชื้อโดยเฉพาะการเก็บรักษาแบบแช่แข็งซึ่งในต่างประเทศ ยกตัวอย่างเช่น ประเทศญี่ปุ่นและประเทศไต้หวันได้มีการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจอย่างเป็นระบบทำให้สามารถอนุรักษ์น้ำเชื้อและสามารถนำน้ำเชื้อมาใช้ได้ตลอดเวลาโดยไม่ต้องคำนึงถึงฤดูกาลที่มีน้ำเชื้อหรือช่วงที่มี

น้ำเชื้อไม่สมบูรณ์ จึงเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจได้อย่างครอบคลุมทั้งประโยชน์ทางการค้าและประโยชน์ทางด้านการอนุรักษ์

ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งให้มีคุณภาพดี และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ได้เหมือนการใช้น้ำเชื้อสด เพื่อให้มั่นใจได้ว่าเทคโนโลยีการแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายเมื่อนำมาใช้เพาะพันธุ์จะมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคปลาในภายหลัง รวมทั้งลดอัตราการเกิดโรคระบาดที่สืบเนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อนั่นเอง และสามารถทำการอนุรักษ์น้ำเชื้อปลาสวายได้ เนื่องจากในทางทฤษฎีแล้วน้ำเชื้อสัตว์น้ำสามารถเก็บได้ตลอดไป หากมีเทคโนโลยีการเก็บรักษาที่เหมาะสม (Ashwood-Smith, 1980; Suquet et al., 1998)

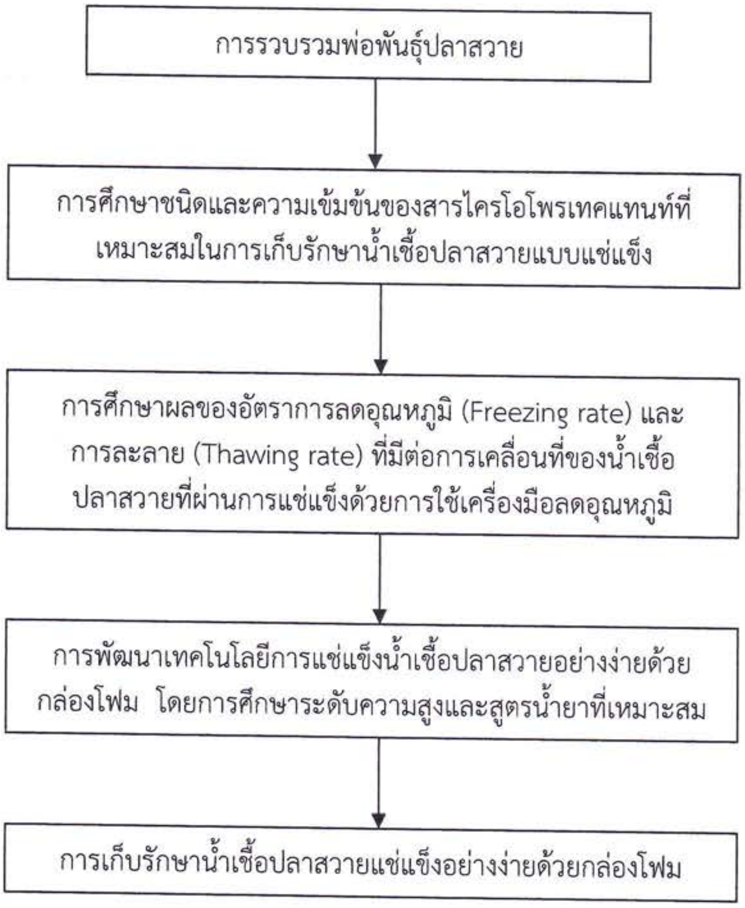
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย และปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ
2. เพื่อศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย
3. เพื่อพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งด้วยเทคนิคอย่างง่ายในกล่องโฟม

ขอบเขตของการวิจัย

การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิต่ำ โดยการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) ในสภาพที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม เพื่อให้ทราบถึงแนวทางที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสเปิร์มแบบแช่แข็ง

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย


การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาสวาย
การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง
การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) และการละลาย (Thawing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิ
การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม โดยการศึกษาระดับความสูงและสูตรน้ำยาที่เหมาะสม
การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ใช้การเพาะขยายพันธุ์ปลาสวายได้โดยตรง ทำให้การจัดการฟาร์มและการเพาะพันธุ์ปลาสวายมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพดีขึ้น และยังเป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึกซึ่งเป็นปลาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและเป็นปลาที่อยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์

2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งสามารถที่จะแนะนำและส่งเสริมการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ให้แก่ผู้ที่สนใจ และเกษตรกรในการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายต่อไป นอกจากนี้การที่ทราบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดที่ดีก็สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดอื่น ๆ ได้เช่นกัน

3. ได้พัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียมปลาสวาย โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมปลาสวาย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องประกอบด้วยหัวข้อดังนี้

1. ปลาสวาย
2. น้ำเชื้อปลา
3. แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลา
4. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่เย็น-แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

1. ปลาสวาย

ปลาสวายเป็นปลาพื้นเมืองของไทย พบได้ทั่วไปในแม่น้ำเจ้าพระยา ท่าจีน ป่าสัก และแม่น้ำโขง เป็นปลาที่กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ แต่จะชอบกินเนื้อสัตว์มากกว่าโดยจะชอบกินอาหารบริเวณก้นบ่อ นอกจากนี้แล้วปลาสวายยังเป็นปลาที่เลี้ยงได้ผลดีทั้งในกระชังและในบ่อ โดยตามธรรมชาติของปลาสวายจะวางไข่ในแหล่งน้ำไหล โดยจะวางไข่ในฤดูฝน (สมปอง, 2523)

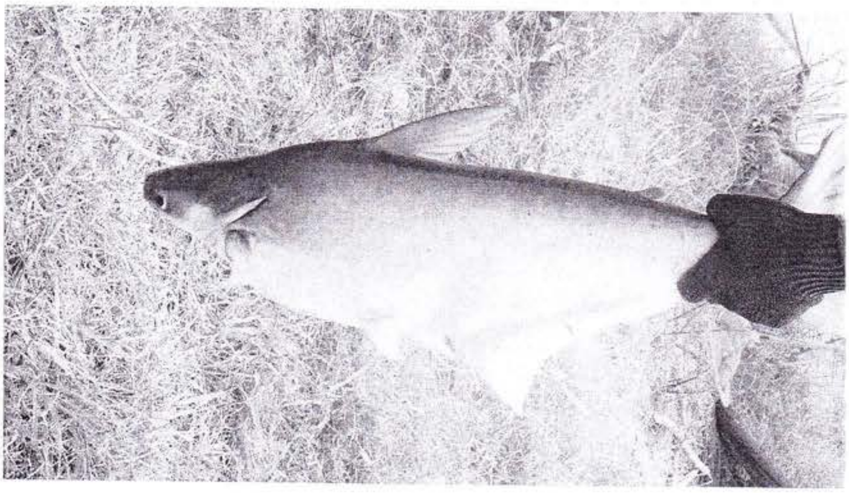
ปลาสวายมีชื่อสามัญว่า Striped catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon hypophthalmus* มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

- Phylum Vertebrata
  - Class Pisces
    - Subclass Teleostomi
      - Order Cyprinifformes (Ostariphysi)
        - Suborder Siluroidei (Nematogathi)
          - Family Pangasiidae
            - Genus *Pangasianodon*
              - Species *Pangasianodon hypophthalmus*

1.1 ลักษณะทั่วไป

ปลาสวายเป็นปลาน้ำจืดที่ไม่มีเกล็ด ลำตัวเรียวยาว ลักษณะด้านหน้าค่อนไปทางอ้วนกลม มีหลังค่อนข้างตรง ส่วนหน้าลาดลงถึงปาก ปากกว้างทู่ มีหนวดสั้นๆ 2 คู่ มีกระโดงครีบหลัง 2 ครีบไม่ติดต่อกัน ครีบอันหลังเล็กมาก เป็นครีบไขมัน (Adipose Fin) นอกจากนี้ยังมีครีบอก 1 คู่ ปลายหางยาวและเว้าลึกเป็นแฉก หลังมีสีหม่นเข้ม ตามครีบมีสีเหลืองค่อนข้างดำ (ภาพที่ 1) ปลาสวายมีลักษณะส่วนสัดคล้ายปลาเทโพ แต่แตกต่างกันโดยใช้จุดเป็นเครื่องสังเกตได้ง่ายๆ คือ ปลาเทโพจะมีจุดกลมดำที่เหนือโคนครีบหู หรือที่ชาวบ้านเรียกว่า “หู” อีกข้างละหนึ่งจุด (ดีพร้อม, 2529) โดยเฉลี่ยปลาสวายอายุ 1 ปี จะมีน้ำหนัก 2 กิโลกรัมต่อตัวขึ้นไป ส่วนความยาววัดจากปากไปถึงปลายหางประมาณ 30-45 เซนติเมตร แต่เคยมีการพบปลาสวายขนาดใหญ่ในแหล่งน้ำธรรมชาติมีความยาว 88.5 เซนติเมตร และมีน้ำหนักมากถึง 9 กิโลกรัมเศษ ซึ่งปลาสวายเป็นสัตว์น้ำที่ให้เนื้อใน

ปริมาณค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืดด้วยกัน ข้อเด่นของปลาชนิดนี้ก็คือ ในส่วนที่เป็นเนื้อจะไม่มีก้างแทรกเหมือนปลาตะเพียน ดังนั้นจึงมีผู้นิยมรับประทานปลาชนิดนี้กันอยู่ไม่น้อย (สมควร, 2542)



ภาพที่ 1 ปลาสวาย

1.2 แหล่งอาศัย

ปลาสวายมักจะว่ายรวมกันไปเป็นฝูง ๆ อาศัยอยู่ในน้ำลึก ซึ่งมีกระแสน้ำไหลถ่ายเทได้ ชอบรวมกลุ่มพักอยู่ในร่มใกล้พันธุ์ไม้น้ำ เช่น ตามใต้แพผักบุ้ง หรือใต้กอผักตบชวา ปลาสวายเป็นปลาที่ตื่นตกใจง่ายเมื่อถูกรบกวนหรือถูกทำอันตราย (อดุลย์, 2532)

1.3 ลักษณะเพศ

ลักษณะเพศของปลาสวายนั้น ตัวผู้มีท้องเรียบไม่นูน พื้นท้องแข็งกว่าตัวเมีย ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี แคบเล็ก มีสีแดงอ่อน เมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมาให้เห็นได้ชัด ส่วนตัวเมียมีลักษณะที่พอจะสังเกตได้ชัดคือ บริเวณส่วนท้องอูมเป่ง กลมนูนออกมาเห็นได้ถนัด พื้นท้องมีผิวเนียนนิ่ม ลักษณะของช่องเพศเป็นรูปรีมีขนาดกว้างใหญ่กว่าของตัวผู้ นอกจากนั้นตรงบริเวณช่องเพศยังมีลักษณะพองเป่งปรากฏเป็นสีแดงเข้ม (เอกสารคำแนะนำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550)

2. น้ำเชื้อปลา

น้ำเชื้อปลามีชื่อที่ใช้เรียกเหมือนน้ำเชื้อสัตว์ตัวผู้ทั่วไปคือ คำว่า “ซีเมน” (Semen) และคำว่า มิลท์ (Milt) ซึ่งใช้เรียกน้ำเชื้อของปลาโดยเฉพาะ โดยน้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอัณฑะหรือที่รีดออกมาสด ๆ และสะอาดจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาวจัด โดยลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อออกมา โดยควรสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตรและสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งน้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่นและไม่ควรมีสีอื่นเจือปน (วีรพงศ์, 2535) ข้อมูลเกี่ยวกับ

เรื่องน้ำเชื้อปลานี้ มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการคิดค้นพัฒนาสูตรน้ำยาสำหรับเก็บรักษาตัวสเปิร์มปลาไว้เพื่อการขยายพันธุ์ปลา เพราะองค์ประกอบทางเคมี และฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลาย่อมมีความแตกต่างกันไปตามกลุ่มหรือชนิดของปลา ดังนั้นการเตรียมน้ำยาที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่มต้องใช้สารเคมีที่เมื่อละลายน้ำเชื้อแล้วให้อิออนชนิดที่เหมาะสม และน้ำยานั้นควรจะมีออสโมลาลิตี (Osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของตัวสเปิร์มตลอดจนการรักษาให้ตัวสเปิร์มคงรูป และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษาไว้เพื่อการเพาะขยายพันธุ์ และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา จึงได้มีการแสดงส่วนประกอบของสารอินทรีย์บางชนิดไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1 (กฤษณ์, 2536)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ของสารอินทรีย์บางอย่างในของเหลวในน้ำเชื้อปลาบางชนิด (กฤษณ์, 2536)

ชนิดปลา	ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในของเหลวในน้ำเชื้อปลา (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)				
	กลูโคส	ฟรุคโตส	กรดซิตริก	กลีเซอรอล	ไขมัน
Rainbow trout	2.4-22.2	0-0.8	4.4-93.7	0.3-3	3.4-37.3
Perch	0.6-15.7	0-1.2	16.8-46.6	1.0-6.3	55.8-148.8
Brown trout	0-25.7	0-0.6	5.0-25.0	0.4-4.4	27.1-82.5
Salmon	7.2-39.3	0-1.3	0.9-12.8	0.6-2.7	28.6-40.7
Whitefish	0.7-21.8	0-0.1	5.0-33.6	3.5-39.1	-
Burbot	1.9-7.8	0.4-1.4	20.4-56.7	2.6-4.5	45.6-616

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่วัดได้มีความแปรปรวนสูงและยากที่จะอธิบายถึงสาเหตุได้ ยิ่งไปกว่านั้นความสำคัญหรือหน้าที่ของสารอินทรีย์เหล่านี้ในน้ำเชื้อปลาก็ไม่มีใครบอกได้แน่ชัด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นที่ทราบกันดีว่าสารอินทรีย์ เช่น น้ำตาล ตัวสเปิร์มจะใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่ในปลาไม่น่าจะมีการใช้พลังงานจากนอกเซลล์ภายหลังเมื่อถูกขับออกจากร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ เพราะจะถูกเจือจางและมีอายุอยู่ได้ไม่นานเกิน 1 นาที ตัวสเปิร์มปลาขณะที่มีการเคลื่อนไหวคงมีโอกาสใช้แต่พลังงานที่สะสมไว้ในเซลล์เท่านั้น ดังนั้นสารอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส คงสะท้อนให้เห็นการใช้พลังงานของอัณฑะปลาเท่านั้น อย่างไรก็ตามกรดซิตริกอาจมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนไหวของตัวสเปิร์มปลาเพราะสามารถจับ (Binding) กับอิออนต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียมและโพแทสเซียม ความสมดุลของอิออนต่างๆ เหล่านี้ช่วยป้องกันไม่ให้ตัวสเปิร์มมีการเคลื่อนไหวจนกว่าจะถูกขับออกนอกร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ (กฤษณ์, 2536)

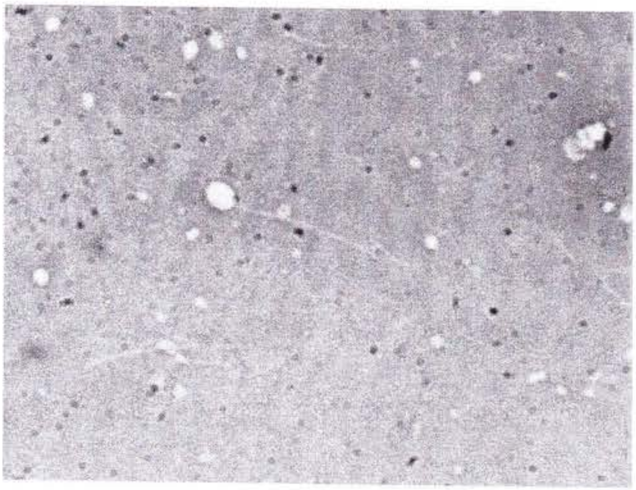
ลักษณะสเปิร์มของปลาต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เพราะไม่มีส่วนอะโครโซม (Acrosome) ทั้งนี้เป็นเพราะไข่ปลามีไมโครไพล์ซึ่งเป็นทางผ่านของเชื้อตัวผู้อยู่แล้ว อะโครโซมจึง

ไม่จำเป็นสำหรับปลา โดยเชื้อตัวผู้ของปลามีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วนคือ หัว มิดพีซและหาง (ภาพที่ 2)

1) หัว คือ ส่วนของนิวเคลียส ซึ่งมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด นิวเคลียสนี้มีไซโตพลาสซึมหุ้มอยู่เพียงบาง ๆ โดยรูปร่างลักษณะและขนาดของส่วนหัวนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา

2) มิดพีซ (Mid piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากส่วนหัวและมีรูปร่างต่าง ๆ กันไปตามชนิดของปลา ลักษณะทั่วไปประกอบด้วย ส่วนไมโครทุบุล (Microtubule) ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนหางล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมซึ่งภายในมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเซ็นตริโอล (Centriole)

3) หาง ประกอบด้วย ไมโครทุบุลที่เรียงกันเป็นวงรอบ ๆ แกนกลาง 1 คู่ และเรียงเป็นวงรอบแกนกลางอีก 9 คู่ ซึ่งลักษณะเช่นนี้เองที่ทำให้ส่วนหางสามารถเคลื่อนไหวได้ (อุทัยรัตน์, 2531)



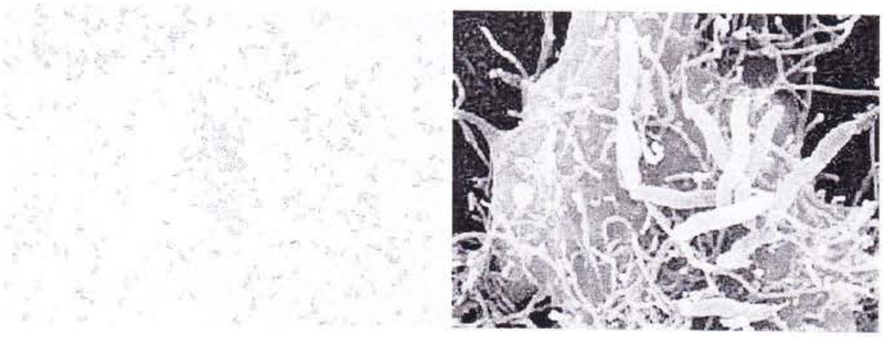
ภาพที่ 2 ตัวสเปิร์มปลาสวาย

3. แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในปลา

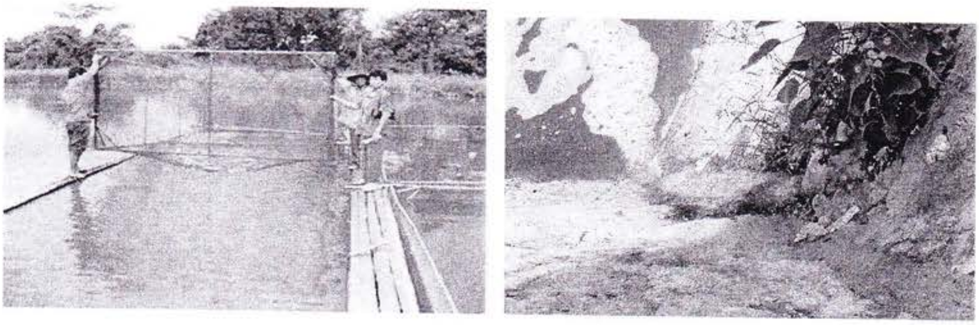
ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาเป็นอาชีพหลักที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและอุตสาหกรรมการส่งออกอาหารเป็นอย่างมาก แต่ในช่วง 2 – 3 ปีที่ผ่านมา ปริมาณการส่งออกสัตว์น้ำเหล่านี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากมีการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำเหล่านี้ โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ไวรัส โพรโทซัวและปรสิตหลายชนิด โรคที่มักพบได้บ่อยและสร้างปัญหาให้กับผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยกตัวอย่างเช่น โรควิบริโอซิส (Vibriosis) เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio*) และโรคฟูรังคูโลซิส (Furunculosis) เกิดจากการติดเชื้อ *Aeromonas* sp. เป็นต้น แบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง ดินในบ่อเพาะเลี้ยง (ในกรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงในบ่อดิน) และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่นแต่มีปริมาณไม่มากนัก เช่น ปนเปื้อนมาจากมูลนกพิราบ (Al-Harbi, 2003) โดยแบคทีเรียก่อโรคที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำและดินในบ่อเพาะเลี้ยงปลา ได้แก่

3.1 แบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนส (*Aeromonas* spp.)

แอโรโมแนสเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน (ภาพที่ 3) พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น แม่น้ำ ลำคลอง น้ำเสีย (ภาพที่ 4) โดยมีคุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 2 แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถก่อโรคในคน เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอักเสบ โรคอาหารเป็นพิษ และติดเชื้อที่ผิวหนัง (ภาพที่ 5) เป็นต้น



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



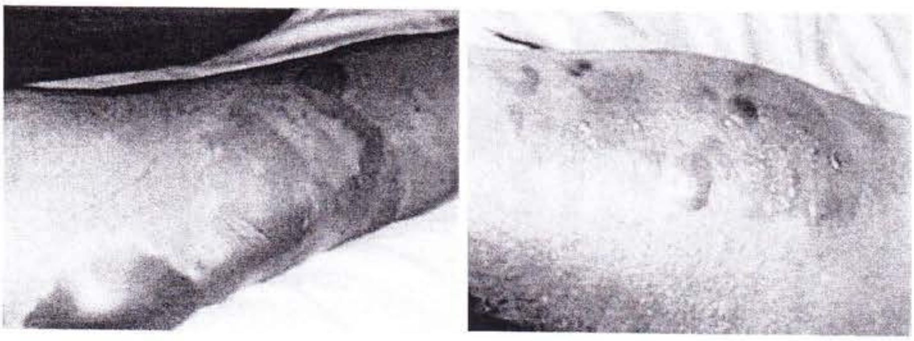
(a) (b)

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

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอโรโมแนส (สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

การทดสอบ	*A. hydrophila*	*A. caviae*	*A. sobria*
Cytochrome oxidase test	+	+	+
D-glucose fermentation test	+	+	+
Arginine dihydrolase test	+	+	-
Ornithine decarboxylase test	-	-	-
Lysine decarboxylase test	+	-	+, weak
H_2S from cysteine test	+	+	ND
Gas from glucose	+	+	+
Indole production test	+	+	+
Esculin hydrolysis test	+	+	-

หมายเหตุ weak ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ช้า
ND ไม่มีข้อมูล



ภาพที่ 5 อาการติดเชื้อจาก *A. hydrophila* ที่บริเวณผิวหนัง
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

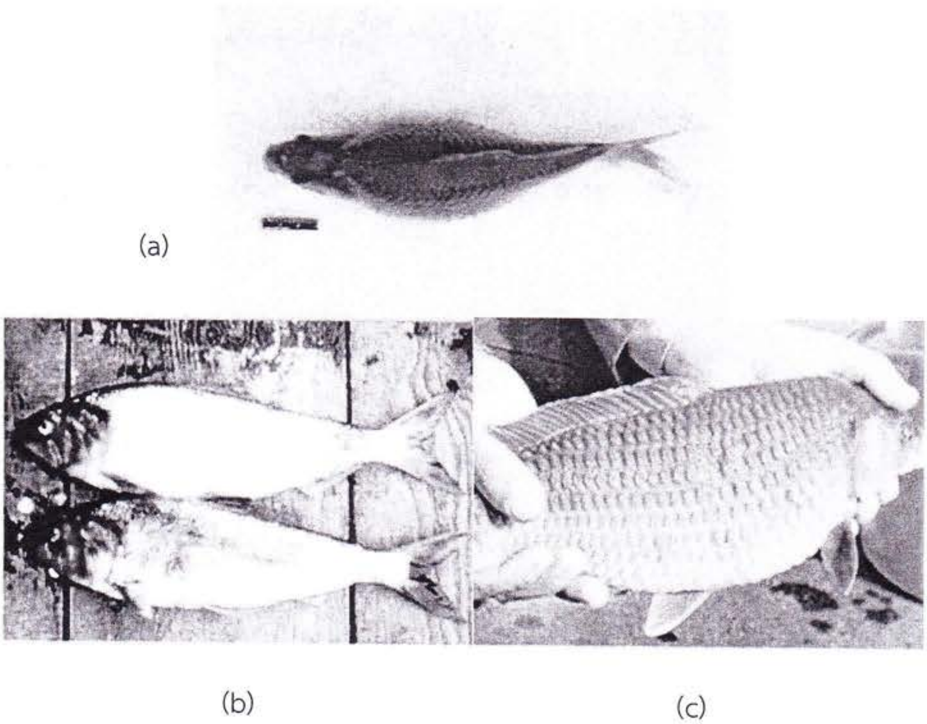
แบคทีเรียกลุ่มแอโรโมแนสสามารถก่อโรคในสัตว์น้ำ เช่น ปลาและกบ เป็นต้น โดยชนิดที่สามารถก่อโรคในสัตว์ ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. caviae* และ *A. veronii* (Noga, 2000; Soo et al., 2007)

3.1.1 *A. hydrophila*

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

การวินิจฉัยโรค MAD กระทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากตัวอย่างปลามักปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียชนิดอื่น อวัยวะที่เหมะสมต่อการนำมาวินิจฉัยโรค คือ ไต ซึ่งการวินิจฉัยต้องใช้การเพาะเชื้อร่วมกับการสังเกตอาการของปลาที่เป็นโรคจึงจะทำให้รักษาเป็นไปอย่างถูกต้องและแม่นยำ ปลาที่ติดเชื้อในระยะแรกอาจจะตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะและการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงได้ดี ช่วงเริ่มต้นการรักษาควรใช้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์รักษากว้าง (Broad spectrum) และไม่ควรปล่อยไว้นานยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ได้แก่ Enrofloxacin, Trimethoprin-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
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

3.1.2 *A. salmonicida*

A. salmonicida เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้นจนถึงกลมหรือรี มีความกว้างของเซลล์ประมาณ 1 ไมโครเมตร ยาว 1.7 – 2 ไมโครเมตร บางสายพันธุ์จะมีรูปร่างกลมหรือรี เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีโคโลนีกลม 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 จะเชื่องช้าโดยเฉพาะเมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้น ปลาที่ติดเชื้อจะมารวมกันแน่นบริเวณขอบบ่อหรือผิวน้ำ ลำตัวมีสีเข้มขึ้น เบื่ออาหาร ถ้าปลามีอาการหนักจะไม่กินอาหาร อาการภายนอกพบว่าบริเวณโคนครีบและในปากมีสีแดง เกิดแผลเปื่อยบริเวณผิวหนังหรือเกล็ด ตาโปน มีอาการห้อเลือดและท้องบวม อวัยวะภายใน เช่น เนื้อเยื่อไขมัน รังไข่ ผนังกระเพาะอาหาร เยื่อหุ้มหัวใจและกล้ามเนื้อจะมีเลือด รวมทั้งอาจพบฝีในตับ ไต ม้ามและกล้ามเนื้อ ปลาที่มีอาการขั้นเรื้อรังอาจเกิดเป็นแถบสีเทาในตับและไต ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อถูกทำลาย เมื่อปลาอ่อนแอลงจะทำให้จุลินทรีย์อื่นฉวยโอกาสก่อโรค เช่น แบคทีเรียชนิดอื่น เชื้อรา โพรโตซัว ไวรัส เป็นต้น ปลาไม่ได้รับการรักษาจะตายในที่สุด (ชลอ, 2528; Wiklund and Dalsgaard, 1998; Lewbert, 2001)

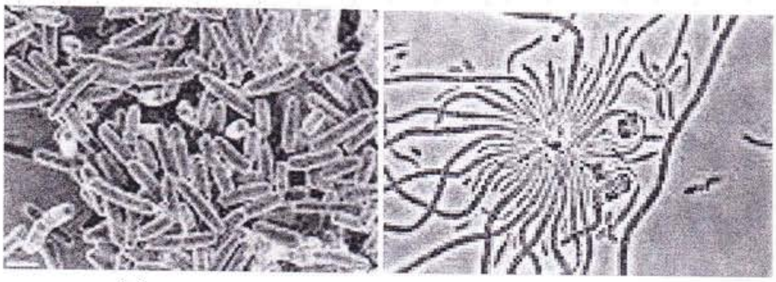
3.2 แบคทีเรียสกุล *Edwardsiella*

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

3.3 แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ

นอกจากแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม *Aeromonas* และ *Edwardsiella* แล้ว ยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ยกตัวอย่าง เช่น *Pseudomonas* sp. และ *Leucothrix* sp. โดย *Pseudomonas* sp. (ภาพที่ 7a) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและในคน เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคได้ในคน รวมไปถึงพืชและสัตว์ (Pelczar et al., 1986) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pseudomonas fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่มักก่อให้เกิดโรคในปลาสวยงามที่เลี้ยงอยู่ในตู้ปลา อาการของปลาที่ติดเชื้อเช่นเดียวกัน จะมีอาการตกเลือดและเป็นแผลตามลำตัวแต่อาจจะเล็กกว่า อวัยวะภายในมีอาการตกเลือด ตาบวม ท้องบวม ส่วน *Leucothrix* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายแสดงดังภาพที่ 7b นอกจากนั้น *Flexibacter columnaris* บางทีเรียกว่า โรคตัวด่างหรือโรคคอลัมนาริส เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ปลาที่เป็นโรคนี้จะมีแผลด่างขาวตามลำตัว ซึ่งถ้าปล่อยไว้นานอาจกลายเป็นแผลลึกได้ มักเกิดกับปลาที่บอบช้ำจากการลำเลียงขนส่งในช่วงฤดูที่อุณหภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงจากสูงไปหาต่ำ ปลาจะมีอาการตัวด่างซีดเป็นแถบ ครีบเปื่อย กร่อน กระสับกระส่าย และตายเป็นจำนวนมาก และวัณโรคปลา (Fish tuberculosis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium* sp. ซึ่งพบได้เสมอในปลาสวยงามที่กินเนื้อที่

เลี้ยงอยู่ในตู้กระจก เช่น ปลากัด ปลาเทวดา เป็นต้น ปลาอาจจะไม่แสดงอาการให้เห็นหรือมีอาการให้เห็น คือ น้ำหนักตัวลดลง ไม่กินอาหาร เกล็ดหลุด มีแผล ตาโปน ว่ายน้ำผิดปกติ และมีจุดขาวเกิดขึ้นตามอวัยวะภายใน เป็นต้น (โชคชัย, 2548)



(a) (b)

ภาพที่ 7 (a) ลักษณะรูปร่างของ *Pseudomonas* spp.
(b) ลักษณะรูปร่างของ *Leucothrix* spp.
(สุบัณฑิต และวีรพงศ์, 2552)

แบคทีเรียก่อโรคมักจะปนเปื้อนมากับน้ำ ดินพื้นบ่อและอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ และแบคทีเรียก่อโรคยังสามารถปนเปื้อนมาทางอากาศ นั่นคือ มูลนกจากนกที่บินผ่านบ่อเพาะเลี้ยงนั่นเอง ดังการศึกษาของ Al-Harbi (2003) พบว่าแบคทีเรียฟีคัลโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในบ่อเพาะเลี้ยงปลานิลลูกผสมและทางเดินอาหารของปลานิลลูกผสม (Red tilapia; *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) ในประเทศซาอุดิอาระเบียมีการปนเปื้อนมาจากมูลนกพิราบที่อาศัยในบริเวณดังกล่าว

3. การปนเปื้อนแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการแช่เย็น-แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

ปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดในระหว่างเก็บเซลล์แบบแช่เย็นและแช่แข็ง คือการเจริญของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อ อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวหนังปลา หรืออาจมีแบคทีเรียปนอยู่ในน้ำเชื้อตั้งแต่แรกขณะที่ปลาอยู่ในน้ำ หรือสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาแช่เย็นและแช่แข็งจึงต้องควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญในระหว่างที่น้ำเชื้อได้ถูกแช่เย็นและแช่แข็งเอาไว้ เพราะแบคทีเรียจะทำให้คุณภาพสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็ว (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) โดยทั่วไปแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเลือด หรือมีอาหารโดยเฉพาะน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (Seminal plasma) ซึ่งมีธาตุอาหารหลายชนิดที่แบคทีเรียชอบ ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดี ดังนั้นการศึกษาการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียขณะแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้สารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องพัฒนาเทคโนโลยีควบคู่กับการพัฒนา Protocols แช่เย็นและแช่แข็งของน้ำเชื้อปลาสวาย

โดยทั่วไปการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำระหว่างการเก็บรักษาแช่เย็น มีผลต่อคุณภาพสเปิร์ม 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) จึงได้มีการนำเอาสารปฏิชีวนะมาใช้เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นได้นานขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียได้ แต่ก็มีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ 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

การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำได้มีการทดลองทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและมีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศ ยกตัวอย่างเช่น

นลินี (2527) ทดลองเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) โดยศึกษาในน้ำยา 16 สูตร อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:3 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าน้ำยาสูตรที่ 16 ซึ่งประกอบด้วย $KHCO_3$ 125 mM, Sucrose 250 mM และ Reduced glutathione 9.75 mM ให้ผลดีกว่าน้ำยาสูตรอื่น ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 76%, 71% และ 67% ตามลำดับ ของระยะเวลาการเก็บรักษา

นิศา (2539) ได้ทดลองเก็บรักษาสเปิร์มของปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ ในตู้เย็นภายใต้อุณหภูมิ 0-6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน แล้วนำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ พบว่า น้ำยาสูตร 0.85% NaCl และ Modified Cortland's #1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดี

ผาณิต และคณะ (2553) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) แบบแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลาย NaCl, KCl, $CaCl_2$, Glucose และ Mannitol ที่ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 และ 300 mM ในทุกสารละลาย พบว่าสเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูง (100%) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ (0, 25 และ 50 mM) และในสารละลายที่ความเข้มข้นสูงขึ้น สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลง ตอนที่ 2 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Ethanol, Propylene glycol และ Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15, และ 20 % ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าการใช้สารละลาย

บัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ผสม 15% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงที่สุด (78.90±1.1 %)

Hulata and Rothbard (1979) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) ในสภาพเข้มข้นและเจือจางในน้ำยา อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส นาน 45 ชั่วโมง เมื่อนำมาผสมกับไข่สด พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นและเจือจางด้วยน้ำยาให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

Stoss et al. (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทราต์สายรุ้ง (Rainbow trout) แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าความสูงของน้ำเชื้อที่เก็บไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร ขณะเก็บแช่เย็นเพื่อให้สเปิร์มได้มีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ

Sadd et al. (1988) ทำการทดลองเก็บรักษาสเปิร์มของปลาไน (*C. carpio*) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการปฏิสนธิกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลอง และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็นศูนย์หลังจากเก็บรักษาไว้นาน 6-8 วัน แต่เมื่อเติมยาปฏิชีวนะ คือ Streptomycin ผสมกับ Penicillin ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในสูตรน้ำยาในเวลา 8 วันของการเก็บรักษา พบว่าสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วัน สเปิร์มยังมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมากกว่า 80% และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ประมาณ 80%

DiLauro et al. (1994) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic sturgeon แช่เย็นโดยไม่เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ ไว้บนน้ำแข็ง และให้ออกซิเจนสมทบทุกวันพบว่า น้ำเชื้อสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยที่คุณภาพของสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

Satterfield and Flickinger (1995) ได้นำน้ำเชื้อปลา Walleye จำนวน 8 ml มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ 1:2 ภายในกล่องแซนวิส (Plastic Rubbermaid sandwich container) ขนาด 11.4 x 10.8 เซนติเมตร แล้วจึงเก็บแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งอัดออกซิเจนสมทบทุกวัน ปรากฏว่าน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บไว้นาน 5 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ดี มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ

Vuthiphandchai et al. (2009) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกแบบแช่เย็นเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพของน้ำเชื้อปลาดุกอุยในช่วงฤดูกาลวางไข่ และการพัฒนาประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นของน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษา ระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2006 โดยพบว่าตลอดระยะเวลาการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจากการศึกษาผลของการใช้บัฟเฟอร์ Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในอัตราส่วนของน้ำเชื้อสดต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:1, 1:2 หรือ 1:4 พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด (10 วัน) โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นที่เวลาสองวันมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาการจัดเก็บมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุย

การเก็บรักษาสเปิร์มที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ได้มีการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศดังนี้

สุบัณฑิต และคณะ (2551) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) แบบแช่เย็น โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยา Extender ที่ไม่เติมและเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2% และเก็บแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส โดยศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มพบว่า น้ำเชื้อที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะมีอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด รองลงมาคือที่เติมยาปฏิชีวนะ 0.1 และ 1% โดยการเคลื่อนที่หยุดในวันที่ 7 และน้ำเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะ 2 % การเคลื่อนที่หยุดในวันที่ 6 และทำการศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotrophic bacteria) เป็นเวลาตั้งแต่วันที่ 0-7 พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และ *Moraxella urethralis* เป็นส่วนใหญ่

สุบัณฑิต และคณะ (2553) ศึกษาถึงผลของสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 2.5 mg/mL และยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% ต่อการเคลื่อนที่และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 วัน ผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันมีอัตราการเคลื่อนที่สูงสุด (17.78±3.80 %) ในชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดขมิ้น และพบว่าสารสกัดขมิ้นที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง ส่วนการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดพบว่า ทุกชุดการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% สามารถลดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้สูงสุด

สุบัณฑิต และคณะ (2554ก) ศึกษาถึงผลการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 2.0% ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) รวมถึงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ณ อุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน จากการศึกษาพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1 % เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่เย็น เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับชุดควบคุม (15.00 ± 10.00%) โดยชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0.00 ± 0.00% ทั้งนี้ชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% ยังสามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียทางทะเลให้ลดลงเหลือ $1.00 \pm 0.63\times10^2$ CFU/ml ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม ($2.00 \pm 1.00\times10^2$ CFU/ml) และสามารถกำจัด *Escherichia adecarboxylata, Bacillus firmus, Bacillus licheniformis, Bacillus polymyxa, Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus varians* ได้รวดเร็วกว่าชุดควบคุม

สุบัณฑิต และคณะ (2554ข) ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงผลของการแช่เย็นและการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin (PS) ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0% ต่อการมีชีวิต ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นเป็นเวลา 9 วัน จากการศึกษาพบว่ายาปฏิชีวนะ PS ความเข้มข้น 0.1% เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาว เนื่องจากมีการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะพงขาวสูงที่สุด (37.17 ± 2.04 %) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ PS 1.0% นอกจากนี้ยังพบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปมีค่าเท่ากับ 2.32 ± 0.04 × 10^3 CFU/mL ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุมที่มีค่ากับ 3.90 ± 0.03 × 10^3 CFU/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลากะพงขาว ยกเว้น *Bacillus mycoides* ได้ภายในวันที่ 7 ของการทดลอง

สุบัณฑิต และคณะ (2554ค) ศึกษาถึงผลของสารสกัดใบมะกรูด 3 ความเข้มข้น (0.1, 0.5 และ 2.5 mg/mL) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น เป็นเวลานาน 10 วัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% โดยมีชุดควบคุม คือ ชุดที่ไม่เติมสารสกัดใบมะกรูดและยาปฏิชีวนะ จากผลการทดลองในวันสุดท้ายของการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% มีการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 17.78 ± 3.80% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดใบมะกรูดที่มีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.00 ± 0.00% ในทุกความเข้มข้น นอกจากนั้นชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะมีการเคลื่อนที่สูงกว่าชุดควบคุม (13.33 ± 2.31%) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% สามารถลดแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดได้สูงสุด (0.02 ± 0.00 ×10^3 CFU/mL) รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมสารสกัดจากใบมะกรูดที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ 0.26 ± 0.09 ×10^3 CFU/mL ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็น ได้แก่ ชุดที่เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1% เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่มากที่สุด และสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีความต้องการในการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ จึงทำให้ในการศึกษาต่อไปจะมีการดำเนินการพัฒนากระบวนการสกัดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบมะกรูด เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็นได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Jenkins and Tiersch (1997) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาสเปิร์มของปลา Channel catfish โดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างสเปิร์มถูกเก็บไว้ในน้ำยาสูตร HBSS แบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile) และในสูตร HBSS ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ จากการทดลองพบว่าสเปิร์มในน้ำยาสูตร HBSS ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่เคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ส่วนสเปิร์มในสูตร HBSS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สเปิร์มทั้งหมดจะหยุดการเคลื่อนที่ภายในเวลา

10 วัน โดยที่การเคลื่อนที่จะลดลงตามการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลา ได้แก่ *Pseudomonas, Streptococcus, Bacillus, Pantoea, Aeromonas* และ *Klebsiella*

Christensen and Tiersch (1996) ทำการทดลองเก็บรักษาสเปิร์มปลา Channel Catfish ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรน้ำยาปกติและสูตรที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Antibiotic/antimycotic (A/AC) ซึ่งมีส่วนผสมของ Penicillin 10,000 ยูนิต, Streptomycin 10 มิลลิกรัม และ Amphotericin 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 0.9% NaCl โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 2 ความเข้มข้นในการทดลอง คือ 0.1% และ 1% จากการทดลองพบว่าสูตรความเข้มข้น 1% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมากกว่า โดยในวันที่ 6 ของการเก็บรักษามีประมาณ 20% ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. พ่อพันธุ์ปลาสวาย

ปลาสวายเพศผู้สมบูรณ์เพศที่เก็บรวบรวมจากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืด อำเภอพนัสนิคม และอำเภอพานทอง จังหวัดชลบุรี

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 จานเพาะเชื้อ
2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์
2.3 หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร
2.4 กล่องโฟม
2.5 ไมโครปิเปต
2.6 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
2.7 กล้องจุลทรรศน์
2.8 คีมคีบ
2.9 กรรไกรสแตนเลส
2.10 คอมพิวเตอร์และซอฟท์แวร์สำหรับการแช่แข็ง
2.11 ไนโตรเจนเหลวและถังเก็บไนโตรเจนเหลว
2.12 อ่างควบคุมอุณหภูมิ
2.13 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3. สารเคมี

3.1 สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ได้แก่ Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose

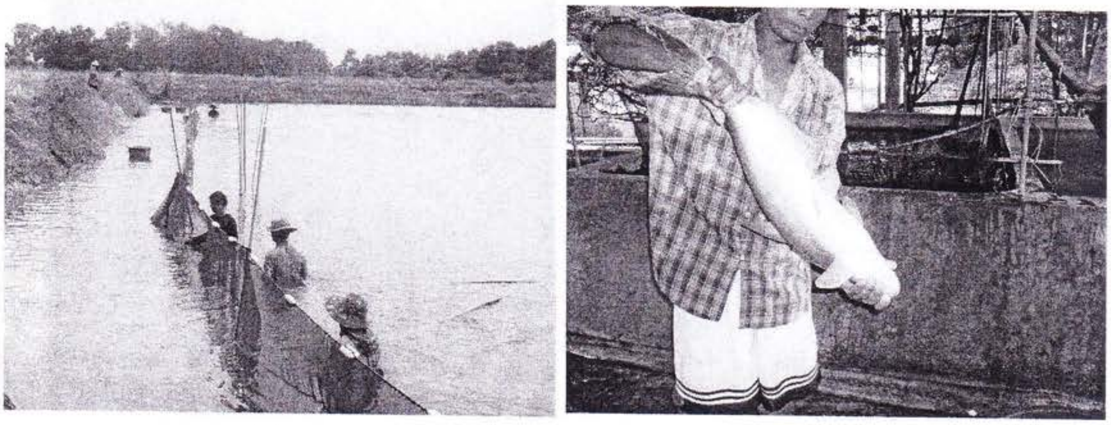
3.2 น้ำยาบัฟเฟอร์ ได้แก่ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ Extender 7

3.3 สีย้อมสเปิร์ม ได้แก่ Eosin – nigrosin

วิธีการดำเนินการวิจัย

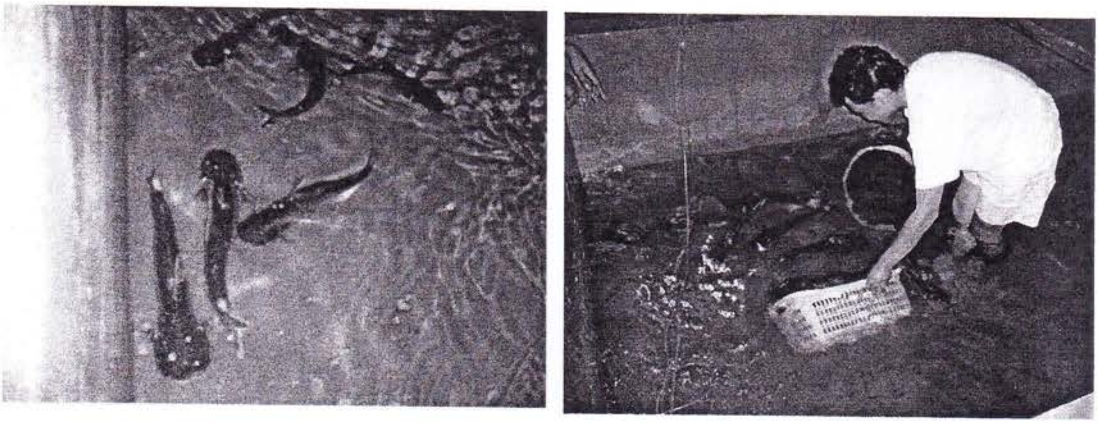
1. การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาสวาย

รวบรวมพ่อพันธุ์ปลาสวายในบ่อดินจากบริเวณอำเภอพนัสนิคม และอำเภอพานทอง จังหวัดชลบุรี (ภาพที่ 8) และนำมาเลี้ยงให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5 วัน ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ภาพที่ 9) จากนั้นฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของสเปิร์มในถุงอัณฑะ โดยใช้ฮอร์โมน Luteinzing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) มีชื่อทางการค้าว่า “Suprefect” ในอัตรา 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone (ชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตราส่วน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนประมาณ 10-12 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Sperm motility) จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต (Sperm viability) โดยเช็ดแอลกอฮอล์บริเวณลำตัวของปลาสวาย จากนั้นรีดน้ำเชื้อปลาสวายลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (ภาพที่ 10) โดยรีดอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเลือด ปัสสาวะหรือน้ำ ลงในน้ำเชื้อซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ แล้วนำน้ำเชื้อปลาสวายที่รีดได้ทั้งหมดมารวมกัน (Pooled milt samples) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (Individual variation) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่นและไม่มีเมือกหรือเลือดปน และจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น เพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดี พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อที่รวบรวมมาจะถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาที ในระหว่างขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง



(a) (b)

ภาพที่ 8 (a) การจับพ่อพันธุ์ปลาสวาย
(b) พ่อพันธุ์ปลาสวาย



ภาพที่ 9 การปรับสภาพแวดล้อมพ่อพันธุ์ปลาสวาย ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ภาพที่ 10 การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาสวาย

2. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาสวาย

2.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ

2.1.1 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อสด

(Vuthiphandchai et al., 2009)

ใช้เข็มเขี่ยที่สะอาดเขี่ยน้ำเชื้อสดที่เตรียมได้จากการทดลองแตะลงบนสไลด์ หยดน้ำเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ รีบนำมาดูการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 × 40 เท่า ภายในเวลาไม่เกิน 20 วินาที (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) โดยแบ่งประเมินเป็นระดับดังนี้

- สเปิร์มเคลื่อนที่ 100%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 80%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 60%

- สเปิร์มเคลื่อนที่ 40%
- สเปิร์มเคลื่อนที่ 20%
- สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ 0%

2.2.2 การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็ง

ใช้เข็มเขี่ยที่สะอาดเขี่ยน้ำเชื้อในหลอดฟางหรือ Cryotube ที่เก็บแช่แข็งในชุดการทดลองต่าง ๆ มาแตะลงบนสไลด์ หยดน้ำเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ นำมาดูการเคลื่อนที่ โดยประเมินผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2009) ตามที่กล่าวมาแล้ว

2.2 การประเมินอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อ

2.2.1 การประเมินอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อสด

(Vuthiphandchai et al., 2009)

ใช้เข็มเขี่ยแตะน้ำเชื้อสดลงบนสไลด์ หยดสีย้อม Eosin 1 หยด และ Nigrosin 1 หยด ลงด้านข้างผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้สเปิร์มที่ยังมีชีวิตอยู่เสียชีวิตและ smear บาง ๆ เพื่อให้เห็นได้ชัดเจน นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟให้แห้ง ระวังอย่าให้ร้อนเกินไป ตรวจนับใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 ×100 เท่า โดยกระจายสุ่มนับ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ซึ่งสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมแต่สเปิร์มที่ตายจะติดสีย้อมสีม่วง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

2.2.2 การประเมินอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็ง

(Vuthiphandchai et al., 2009)

ใช้เข็มเขี่ยแตะน้ำเชื้อในหลอดฟางหรือ Cryotube ที่เตรียมได้จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อลงบนสไลด์ หยดสีย้อม Eosin 1 หยด และ Nigrosin 1 หยด ลงด้านข้างผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วเพื่อกันไม่ให้สเปิร์มที่ยังมีชีวิตอยู่เสียชีวิตและ smear บาง ๆ เพื่อให้เห็นได้ชัดเจน นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟให้แห้ง ระวังอย่าให้ร้อนเกินไป ตรวจนับใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 ×100 เท่า โดยกระจายสุ่มนับเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ซึ่งสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมแต่สเปิร์มที่ตายติดสีม่วง โดยในแต่ละครั้งทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยการประเมินความเป็นพิษ (Toxicity test) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวาย การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาสวายที่รวบรวมมาใหม่ (Freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่ได้จากการศึกษาการเก็บรักษาแบบแช่เย็นของโครงการวิจัยปีที่ 1 นั่นคือ Extender 7 โดยที่สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวจะไม่มีผลกระตุ้นให้

สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะเดียวกันสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์จะถูกเตรียมขึ้นมาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเช่นกัน แล้วจึงผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่ต้องการ การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองจะทำ 6 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ : สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เจือจาง เท่ากับ 1:1:1 ภายใน Tissue culture flask ขนาด 25 cm^3 และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่าง ๆ กันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ Glycerol (G), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Propylene glycol (PG) และ Sucrose (S) นำสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดผสมในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (Extender 7) เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการทดลองนี้จะทำในระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังจากใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ตั้งแต่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มนี้จะทำการทดลอง 6 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส)

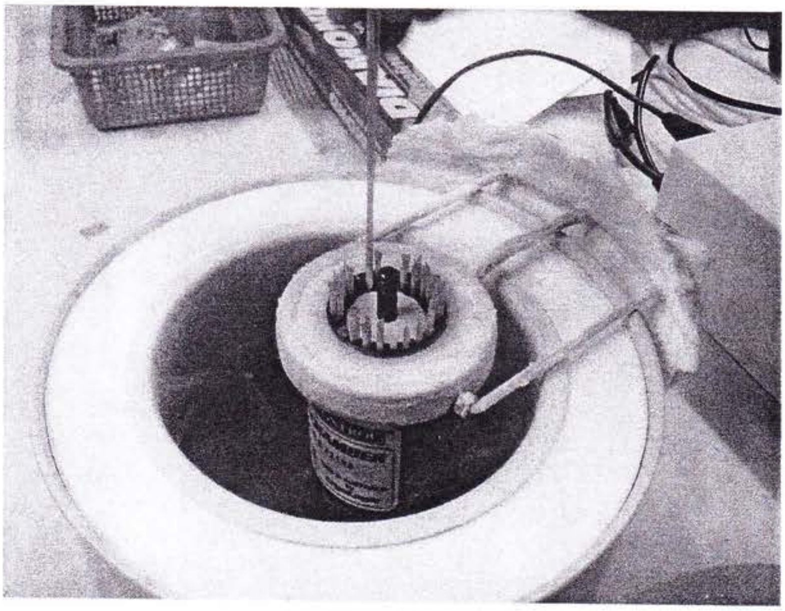
การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดและความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษหรือทำให้สเปิร์มตาย ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป นั่นคือทำให้ทราบถึงอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันก่อนที่จะทำการแช่แข็งว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดและความเข้มข้นใดมีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประกอบในการ Design protocol ระหว่างการแช่แข็งต่อไป

4. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) และการละลาย (Thawing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิ

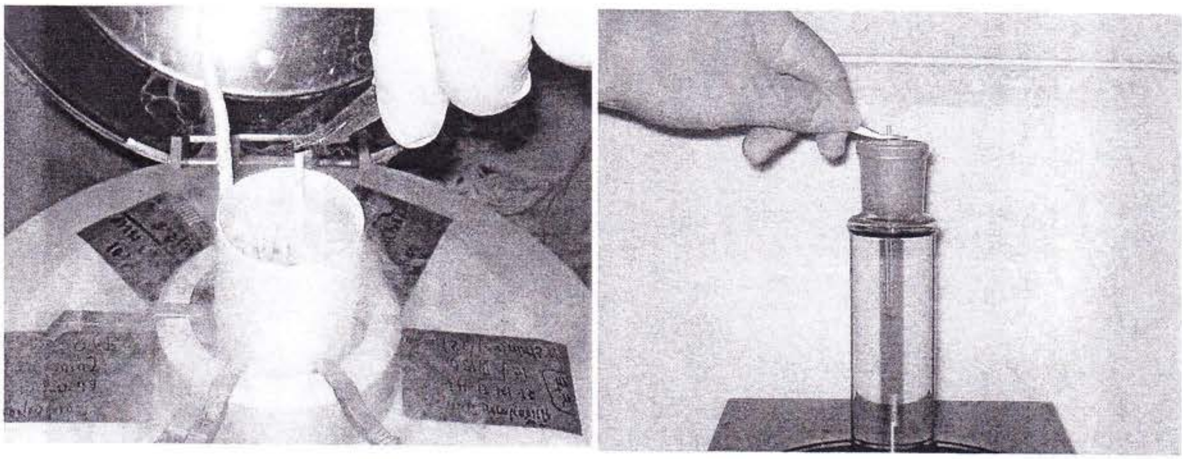
การผลิตน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งเริ่มจากการนำน้ำเชื้อปลาสวายมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (Extender 7) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ได้แก่ Glycerol (G), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Propylene glycol (PG) และ Sucrose (S) ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน ได้แก่ 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration period) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (Straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (ภาพที่ 11) จากนั้นทำการแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer) ดังภาพที่ 12 ด้วยการลดอุณหภูมิแบบ Two-step freezing จากอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ไปจนถึง 0 องศาเซลเซียส และจาก 0 องศาเซลเซียส ไปจนถึงอุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นนำตัวอย่างมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลวเป็น

ระยะเวลา 7 วัน นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาทำการละลายในอ่างปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 3 ระดับคือ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วินาที (ภาพที่ 13) แล้วนำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2009)

ภาพที่ 11 การดูดตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสวายที่เติมสารไครโอโพรเทคแทนท์บรรจุลงในหลอดฟาง



ภาพที่ 12 การนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer)


(a) (b)

ภาพที่ 13 (a) การเก็บตัวอย่างหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อมาละลาย
(b) การละลายน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง

5. การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

5.1 การศึกษาระดับความสูงและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

การศึกษาระดับความสูงและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม เริ่มจากการนำน้ำเชื้อคุณภาพดีที่รวบรวมมาจากพ่อพันธุ์ปลาสวายมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อซึ่งได้จากการศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นในปีที่ 1 ที่ผ่านมา ได้แก่ Ca-F HBSS และ Extender 7 ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:4 ใน Tissue culture flask เขย่าเบา ๆ ให้น้ำเชื้อและน้ำยาผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมที่ได้จากการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิ คือ DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% DMSO แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration period) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (Straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางให้สนิทด้วยครีบหนีบลนไฟ จากนั้นนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อมาอบในไอของไนโตรเจนเหลวที่บรรจุในกล่องโฟมขนาด 17 x 32 x 20 เซนติเมตร ที่ระดับความสูงเหนือผิวบนไนโตรเจนเหลวระดับต่าง ๆ กัน คือ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 และ 15 นาที โดยวางหลอดฟางไว้บนลวดตาข่ายที่สร้างขึ้นมาที่ตั้งอยู่ในกล่องโฟมที่บรรจุไนโตรเจนเหลว โดยให้หลอดฟางสัมผัสไอไนโตรเจนเหลวตามระดับความสูงที่กำหนดไว้ อัตราการลดอุณหภูมิขณะทำการแช่แข็งจะทราบได้โดยการใช้เทอร์โมมิเตอร์ที่สามารถวัดอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Thermocouple probe) ซึ่งต่อไว้บนลวดตาข่ายในระดับความสูงที่ได้กล่าวมาแล้วเพื่อวัดอุณหภูมิเหนือระดับผิวของไนโตรเจนเหลวที่เวลาต่าง ๆ กัน เพื่อคำนวณอัตราการลดอุณหภูมิ เมื่อครบเวลาที่กำหนดเขี่ยหลอดฟางลงในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที จากนั้นนำหลอดฟางมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศา

เซลเซียส) นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2009)

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

จากการศึกษาระดับความสูงและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟมทำให้ทราบถึงระดับความสูงที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟม นั่นคือ 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าผิวไนโตรเจนเหลว ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนนี้จึงออกแบบการทดลองโดยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายที่ระดับ 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าผิวไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 6 เดือน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม โดยมีวิธีการทดลองเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อปลาสวายมาลดอุณหภูมิที่ระดับ 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าผิวไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเขี่ยหลอดฟางลงในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที แล้วนำหลอดฟางมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เพื่อประเมินอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2009) ทุก 30 วัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ The statistical program for the social sciences (SPSS) version 19.0 เปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $P = 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย และการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งด้วยเทคนิคอย่างง่ายในกล่องโฟม ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1. ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อปลาสวาย

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ในน้ำยา Extender 7 โดยทำการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางตั้งแต่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มแตกต่างกัน ดังนี้

1.1 DMSO

จากผลการทดสอบพบว่า หลังเติม DMSO ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางทันที (0 นาที) อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายของทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 120 นาที พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 3%, 6%, 9% และ 12% มีผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับ DMSO 15 % จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร DMSO ที่มีต่อสเปิร์มปลาสวายสามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ DMSO ความเข้มข้นตั้งแต่ 3% ถึง 12% แทนกันได้ โดยไม่ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกัน ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 14

1.2 Glycerol

Glycerol ความเข้มข้น 3% สามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายให้มีค่าสูงกว่า Glycerol ความเข้มข้น 6%, 9%, 12% และ 15% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงหลังการเติม Glycerol เป็นระยะเวลา 120 นาที (ตารางที่ 3 และภาพที่ 14) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเลือกใช้ Glycerol ความเข้มข้น 3% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง เนื่องจากสามารถรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้สูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.3 Propylene glycol

จากการศึกษาความเป็นพิษของ Propylene glycol ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อสเปิร์มปลาสวายพบว่า Propylene glycol ทุกความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ (3%, 6%, 9%, 12% และ 15%)

มีพิษต่อสเปิร์มต่ำ เนื่องจากสเปิร์มปลาสวายยังคงมีอัตราการเคลื่อนที่สูง (100%) ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนถึงหลังการเติม Propylene glycol เป็นระยะเวลา 120 นาที ตารางที่ 3 และภาพที่ 14) แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งสามารถนำ Propylene glycol ความเข้มข้นตั้งแต่ 3-15% มาพัฒนาเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ได้

1.4 Sucrose

จากการศึกษาพบว่า Sucrose ความเข้มข้น 3%, 6% และ 9% มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลาสวายตลอดระยะเวลา 120 นาที โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการเติม Sucrose เป็นระยะเวลา 120 นาที พบว่า Sucrose ความเข้มข้น 3%, 6% และ 9% มีค่าสูงกว่า Sucrose ความเข้มข้น 12% และ 15% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 14 แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของ Sucrose ที่มีต่อสเปิร์มปลาสวาย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ถ้าใช้ Sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ไม่ควรใช้เกินความเข้มข้น 9%

ตารางที่ 3 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการผสมน้ำเชื้อด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด

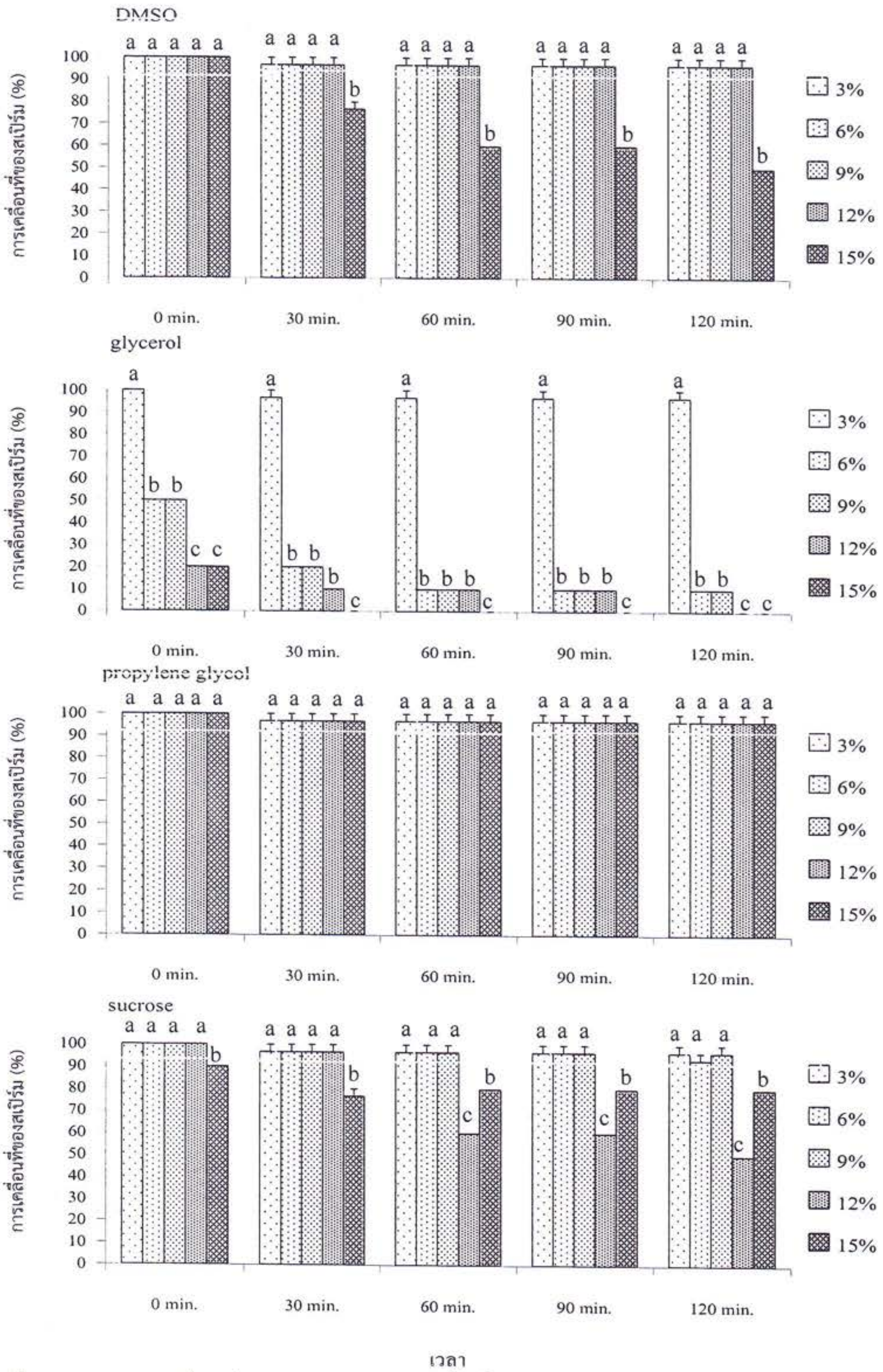
ชนิดของสาร	ระยะเวลา	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ระดับต่าง ๆ				
ไครโอโพรเทคแทนท์	การทดลอง (นาที)	3 %	6%	9%	12%	15%
DMSO	0	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}
	30	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	76.67 ± 3.33 ^{b}
	60	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	60.00 ± 0.00 ^{b}
	90	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	60.00 ± 0.00 ^{b}
	120	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	50.00 ± 0.00 ^{b}
Glycerol	0	100.00 ± 0.00 ^{a}	50.00 ± 0.00 ^{b}	50.00 ± 0.00 ^{b}	20.00 ± 0.00 ^{c}	20.00 ± 0.00 ^{c}
	30	96.67 ± 3.33 ^{a}	20.00 ± 0.00 ^{b}	20.00 ± 0.00 ^{b}	10.00 ± 0.00 ^{b}	0.00 ± 0.00 ^{c}
	60	96.67 ± 3.33 ^{a}	10.00 ± 0.00 ^{b}	10.00 ± 0.00 ^{b}	10.00 ± 0.00 ^{b}	0.00 ± 0.00 ^{c}
	90	96.67 ± 3.33 ^{a}	10.00 ± 0.00 ^{b}	10.00 ± 0.00 ^{b}	10.00 ± 0.00 ^{b}	0.00 ± 0.00 ^{c}
	120	96.67 ± 3.33 ^{a}	10.00 ± 0.00 ^{b}	10.00 ± 0.00 ^{b}	0.00 ± 0.00 ^{c}	0.00 ± 0.00 ^{c}
Propylene glycol	0	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}
	30	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}
	60	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}
	90	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}
	120	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการผสมน้ำเชื้อด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (ต่อ)

ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	ระยะเวลา การทดลอง (นาที)	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ระดับต่าง ๆ				
		3 %	6%	9%	12%	15%
Sucrose	0	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	90.00 ± 0.00 ^{b}
	30	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	76.67 ± 3.33 ^{b}
	60	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	60.00 ± 0.00 ^{c}	80.00 ± 0.00 ^{b}
	90	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	60.00 ± 0.00 ^{c}	80.00 ± 0.00 ^{b}
	120	96.67 ± 3.33 ^{a}	93.33 ± 3.33 ^{a}	96.67 ± 3.33 ^{a}	50.00 ± 0.00 ^{c}	80.00 ± 0.00 ^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 14 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการผสมน้ำเชื้อด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ตลอดระยะเวลา 120 นาที

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่เวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ในน้ำยา Extender 7 มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาสวายแตกต่างกัน โดย Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Sucrose ความเข้มข้น 3%, 3-12%, 3-15% และ 3-9% เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง ซึ่งจำเป็นต้องนำมาศึกษาประสิทธิภาพของความเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายต่อไป โดยการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่ผ่านการแช่แข็งที่มีผลการทดลองดังต่อไปนี้

2. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) และการละลาย (Thawing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่ผ่านการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิ

จากการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่เติม DMSO ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ในน้ำยา Extender 7 โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นนำตัวอย่างมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าการเติม DMSO ความเข้มข้น 9% และลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -3 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายได้ดีที่สุด (60%) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับการเติม DMSO ความเข้มข้นอื่น นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่ออัตราการลดอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายลดลงอย่างมาก ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 15 อีกทั้งจากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการละลายที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วินาที (ตารางที่ 4 และภาพที่ 15)

สำหรับการเติม Propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายพบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายมีค่าน้อยกว่าการเติม DMSO โดยการเติม Propylene glycol ความเข้มข้น 15% และอัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียสต่อนาที มีประสิทธิภาพในการรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้สูงกว่า Propylene glycol ความเข้มข้นอื่นและอัตราการลดอุณหภูมิอื่น ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 16

ในขณะที่การเติม Glycerol และ Sucrose ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายพบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงอย่างมากจนไม่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ในทุกความเข้มข้นและทุกอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 17-18)

ตารางที่ 4 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิและการละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	อัตราการลด อุณหภูมิ (°C/นาที)	การละลาย (°C)	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ระดับต่าง ๆ				
			3 %	6%	9%	12%	15%
DMSO	-3	40	1.67 ± 1.67	40.00 ± 10.00	60.00 ± 20.00	35.00 ± 15.00	26.67 ± 26.67
		60	0	4.00 ± 3.06	12.00 ± 9.07	2.33 ± 1.45	3.33 ± 3.33
		80	0	1.67 ± 1.67	33.33 ± 13.33	7.67 ± 2.33	16.67 ± 12.02
	-5	40	0	21.67 ± 19.22	45.00 ± 21.79	0.67 ± 0.67	0
		60	0	44.00 ± 22.72	20.67 ± 14.85	55.00 ± 25.00	10.00 ± 1.00
		80	0	4.00 ± 1.00	20.00 ± 15.00	33.33 ± 28.33	0
	-10	40	3.33 ± 3.33	8.33 ± 1.67	18.00 ± 16.00	5.00 ± 2.89	0.33 ± 0.33
		60	0	13.33 ± 8.33	26.67 ± 26.67	4.33 ± 0.67	3.33 ± 1.67
		80	0	13.33 ± 3.33	56.67 ± 6.67	10.00 ± 5.77	0
Propylene glycol	-3	40	0	3.33 ± 3.33	6.67 ± 1.67	11.67 ± 4.41	42.50 ± 37.50
		60	0	0	36.50 ± 33.50	30.00 ± 20.00	41.00 ± 39.00
		80	0	0	15.67 ± 12.20	36.67 ± 13.33	43.33 ± 23.33
	-5	40	0	0	3.33 ± 1.67	5.00 ± 2.89	8.33 ± 6.01
		60	0	0	40.00 ± 10.00	20.00 ± 15.00	10.00 ± 5.77
		80	0	1.67 ± 1.67	31.67 ± 24.21	3.33 ± 1.67	5.00 ± 0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน

ตารางที่ 4 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิและการละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	อัตราการลด อุณหภูมิ (°C/นาที)	การละลาย (°C)	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ระดับต่าง ๆ				
			3 %	6%	9%	12%	15%
Propylene glycol	-10	40	0	1.67 ± 1.67	5.67 ± 2.33	4.33 ± 0.67	1.67 ± 1.67
		60	0	0	20.00 ± 10.00	45.00 ± 25.00	0.33 ± 0.33
		80	0	0	16.67 ± 12.02	50.00 ± 25.17	10.00 ± 5.77
Glycerol	-3	40	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	1.67 ± 1.67
		80	0	0	0	0	0
	-5	40	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0.67 ± 0.07	0
		80	0	0	0	0	0
	-10	40	0	0	0	0.67 ± 0.67	0
		60	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0
Sucrose	-3	40	0	2.30 ± 1.67	3.33 ± 3.33	1.67 ± 1.67	1.67 ± 1.67
		60	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0

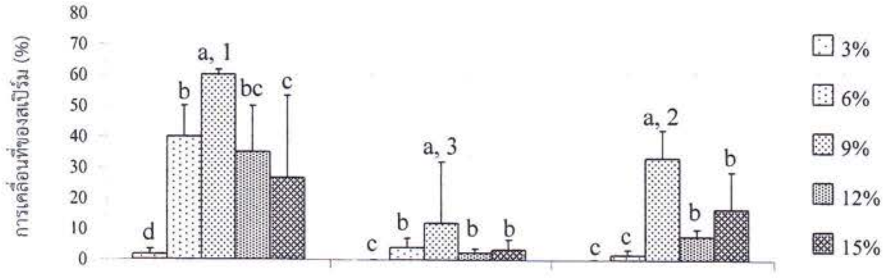
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน

ตารางที่ 4 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิและการละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

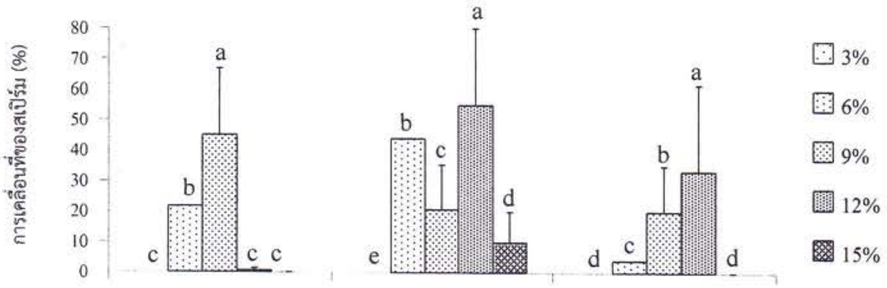
ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	อัตราการลด อุณหภูมิ (°C/นาที)	การละลาย (°C)	อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ระดับต่าง ๆ				
			3 %	6%	9%	12%	15%
Sucrose	-5	40	0	0	1.67 ± 1.67	0	1.00 ± 1.00
		60	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0
	-10	40	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0
		80	0	0	0	0	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน

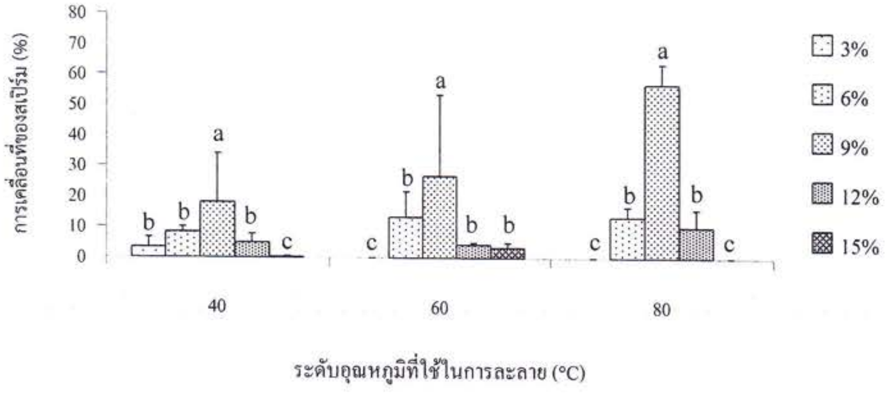
DMSO (อัตราการลดอุณหภูมิ -3 °C/นาที)



DMSO (อัตราการลดอุณหภูมิ -5 °C/นาที)

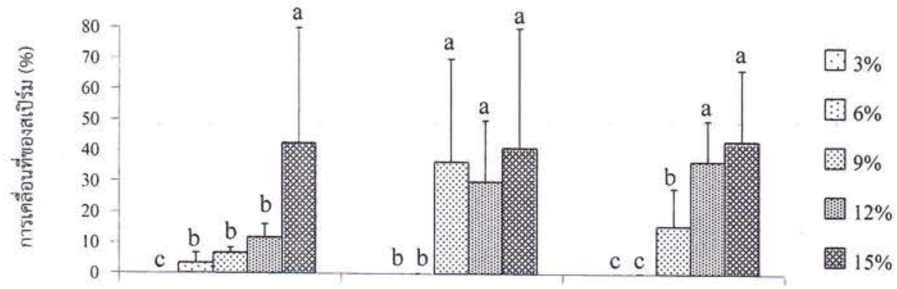


DMSO (อัตราการลดอุณหภูมิ -10 °C/นาที)

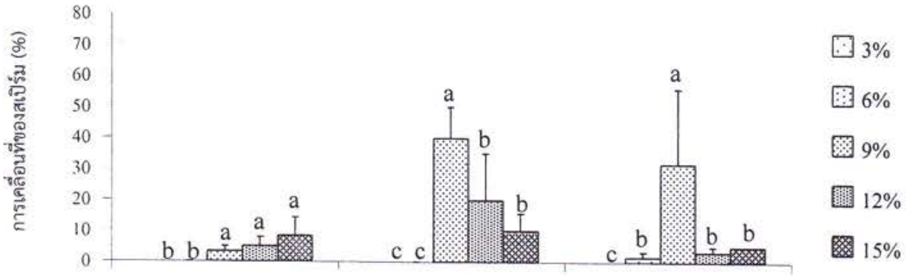


ภาพที่ 15 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม DMSO ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส หมายเหตุ: ตัวอักษรที่อุณหภูมิการละลายเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

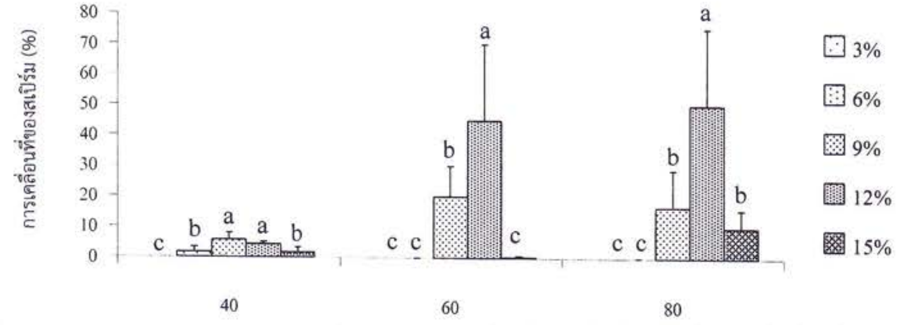
ตัวเลขในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) propylene glycol (อัตราการลดอุณหภูมิ -3 °C/นาที)



propylene glycol (อัตราการลดอุณหภูมิ -5 °C/นาที)



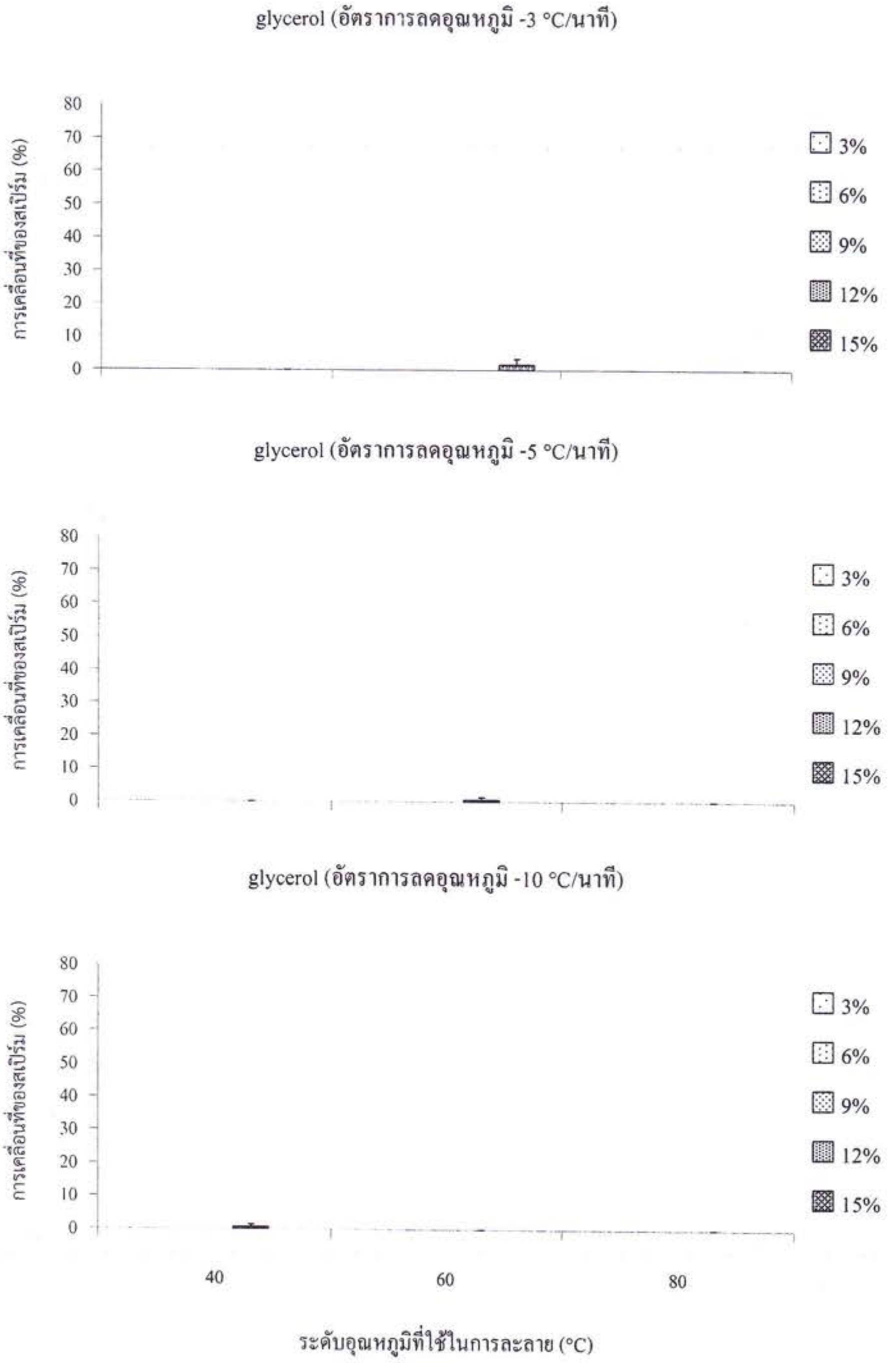
propylene glycol (อัตราการลดอุณหภูมิ -10 °C/นาที)



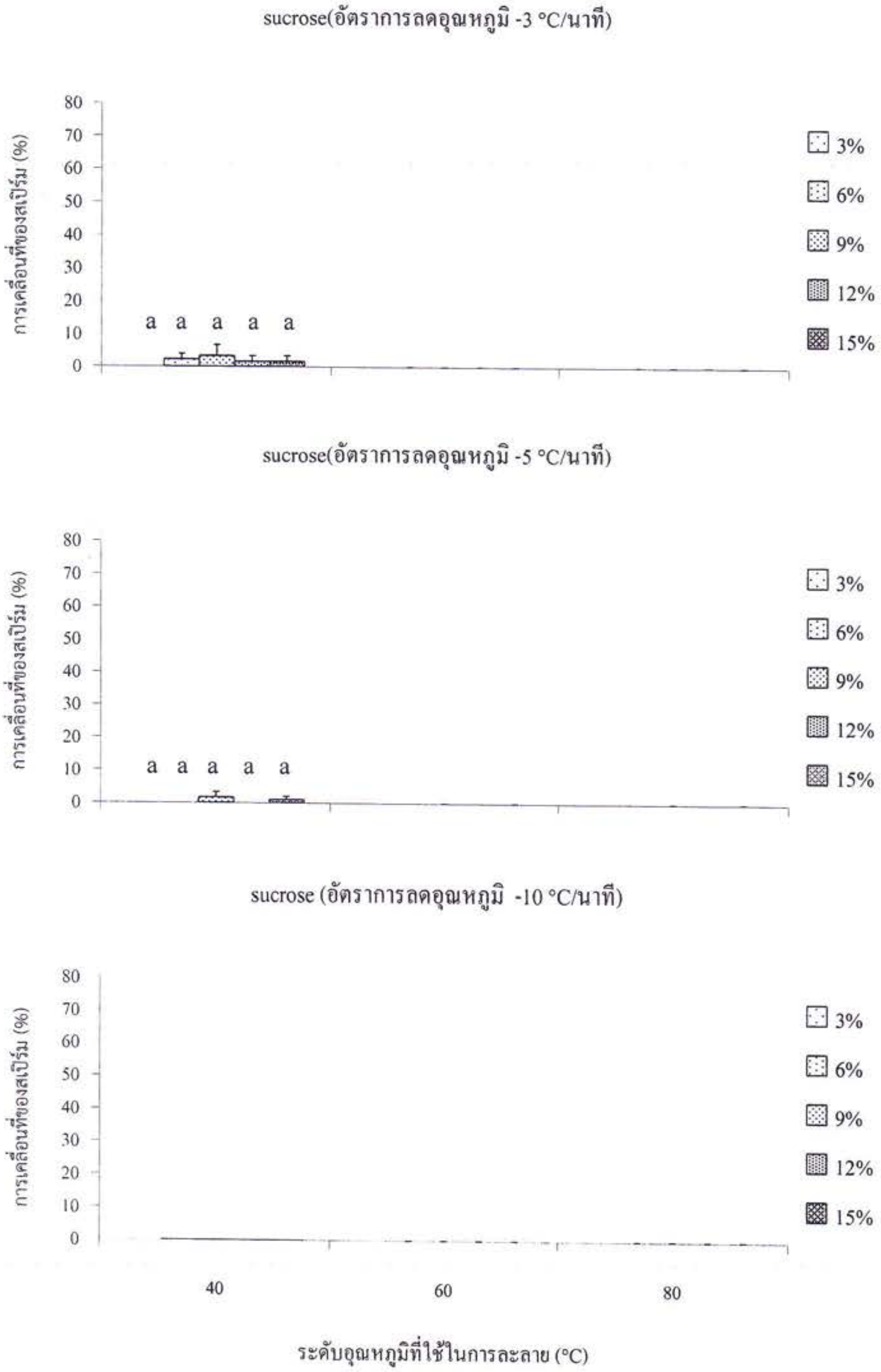
ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย (°C)

ภาพที่ 16 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม Propylene glycol ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่อุณหภูมิการละลายเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 17 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม Glycerol ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 18 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่เติม Sucrose ความเข้มข้น 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียสต่อนาที และละลายที่อุณหภูมิ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส หมายเหตุ: ตัวอักษรที่อุณหภูมิการละลายเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งพบว่า วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 9% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -3 องศาเซลเซียสต่อนาที แบบ Two-step freezing จากอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ไปจนถึง 0 องศาเซลเซียส และจาก 0 องศาเซลเซียส ไปจนถึงอุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

3. การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

3.1 ระดับความสูงและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

จากการศึกษาระดับความสูงที่ระดับ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม โดยใช้น้ำยา Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ Extender 7 พบว่าที่ระดับความสูงในการลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15 นาที มีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับระดับความสูงอื่น คือ 46.67 % และ 48.89 % ตามลำดับ ในขณะที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 และ 4 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15 นาที ไม่มีประสิทธิภาพในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้อยกว่าที่ระดับ 6 เซนติเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่าระยะเวลาในการลดอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวาย โดยระยะเวลาการลดอุณหภูมิเท่ากับ 15 นาที มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงกว่า 10 นาที อย่างชัดเจน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็งในสูตรน้ำยา Ca-F HBSS และ Extender 7 ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยใช้ระยะเวลาในการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 นาที

น้ำยาสูตร	ความสูงเหนือผิวไนโตรเจนเหลว (cm)	ระยะเวลาลดอุณหภูมิ (นาที)	
		10	15
Extender 7	2	20.00 ± 0.00 ^{a}	33.33 ± 3.33 ^{b}
	4	0.00 ± 0.00 ^{c}	0.00 ± 0.00 ^{c}
	6	13.33 ± 3.33 ^{b}	48.89 ± 5.87 ^{a}
Ca-F HBSS	2	2.22 ± 2.22 ^{c}	6.67 ± 3.33 ^{c}
	4	0.00 ± 0.00 ^{c}	2.22 ± 2.22 ^{c}
	6	13.33 ± 3.33 ^{b}	46.67 ± 3.33 ^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

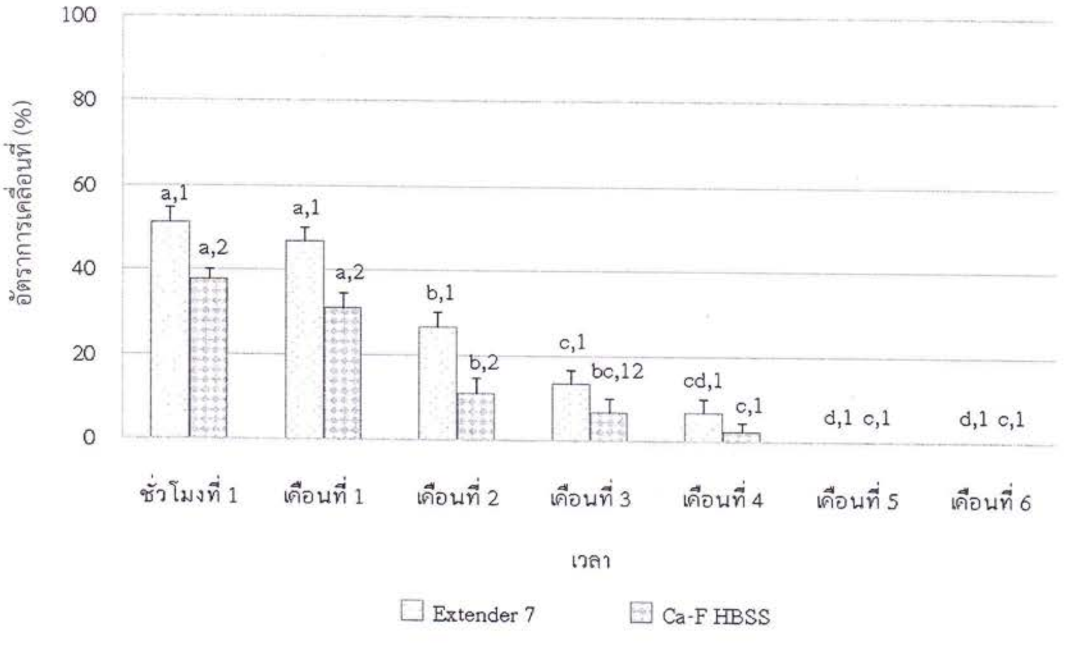
3.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่เติมสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้นสุดท้าย 10% DMSO ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15 นาที มีประสิทธิภาพดีที่สุด การศึกษานี้จึงทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยเทคนิคดังกล่าวเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาสวายมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเริ่มต้นการแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ในน้ำยาสูตร Extender 7 มีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการมีชีวิตของสเปิร์มสูงกว่าน้ำยาสูตร Ca-F HBSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังตารางที่ 6 และ 7 แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้สามารถเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสวายได้เพียง 4 เดือนเท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟมต่อไป เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการแช่แข็งอย่างง่าย ๆ ให้เป็นข้อมูลให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาสามารถไปทำเองได้เองโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาแพงและสลับซับซ้อนเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติใช้ในพื้นที่จริง ซึ่งจะมีเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้และการส่งเสริมการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอย่างง่าย ๆ แก่ผู้สนใจ

ตารางที่ 6 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที เป็นเวลา 6 เดือน

ระยะเวลา (เดือน)	Extender-7	Ca-F HBSS
หลังแช่แข็ง 1 ชั่วโมง	$51.11 \pm 3.51^{a,1}$	$37.78 \pm 2.22^{a,2}$
1	$46.67 \pm 3.33^{a,1}$	$31.11 \pm 3.51^{a,2}$
2	$26.67 \pm 3.33^{b,1}$	$11.11 \pm 3.51^{b,2}$
3	$13.33 \pm 3.33^{c,1}$	$6.67 \pm 3.33^{bc,12}$
4	$6.67 \pm 3.33^{cd,1}$	$2.22 \pm 2.22^{c,1}$
5	$0.00 \pm 0.00^{d,1}$	$0.00 \pm 0.00^{c,1}$
6	$0.00 \pm 0.00^{d,1}$	$0.00 \pm 0.00^{c,1}$

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน
ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

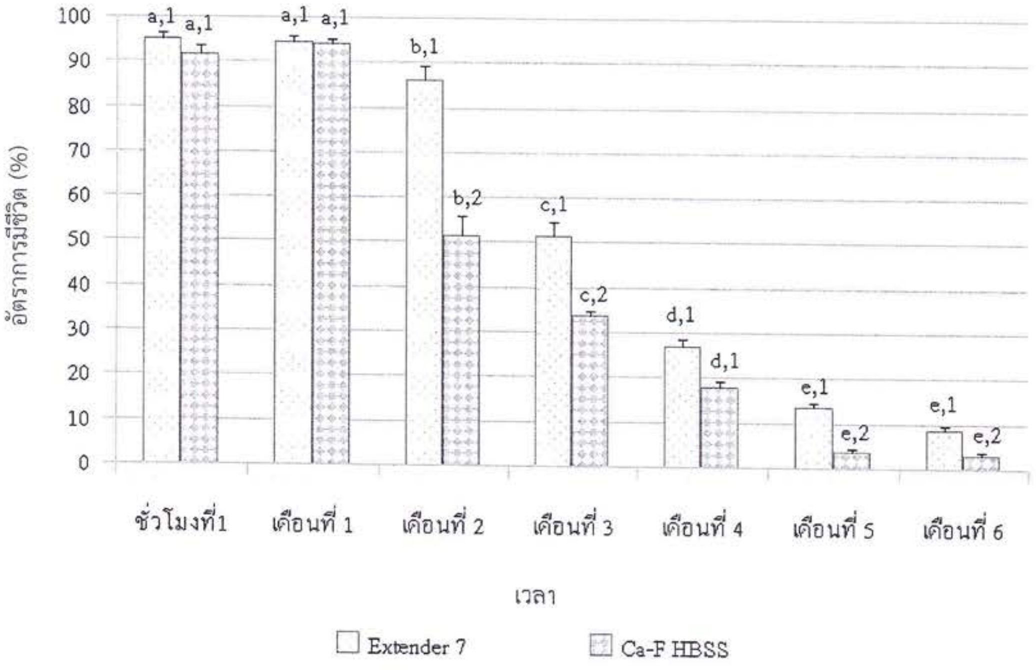


ภาพที่ 19 อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที

ตารางที่ 7 อัตราการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที เป็นเวลา 6 เดือน

ระยะเวลา (เดือน)	Extender-7	Ca-F HBSS
หลังแช่แข็ง 1 ชั่วโมง	94.96 ± 1.40 ^{a,1}	91.78 ± 1.78 ^{a,1}
1	94.56 ± 1.16 ^{a,1}	94.00 ± 1.15 ^{a,1}
2	86.03 ± 3.11 ^{b,1}	51.40 ± 4.48 ^{b,2}
3	51.37 ± 3.25 ^{c,1}	33.74 ± 1.05 ^{c,2}
4	27.00 ± 1.55 ^{d,1}	18.03 ± 1.26 ^{d,2}
5	13.56 ± 1.10 ^{e,1}	3.85 ± 0.41 ^{e,2}
6	8.74 ± 0.92 ^{e,1}	3.18 ± 0.69 ^{e,1}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน
ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลขในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 20 อัตราการมีชีวิตของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. จากการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิ (Controlled-rate programmable freezer) พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย Extender 7 เป็นน้ำยาบัฟเฟอร์และสารสะลาย DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 9% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งมีอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -3 องศาเซลเซียสต่อนาที แบบ Two-step freezing จากอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ไปจนถึง 0 องศาเซลเซียส และจาก 0 องศาเซลเซียส ไปจนถึงอุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

2. การพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่อมโฟม พบว่าการใช้น้ำยา Extender 7 และ 10% DMSO ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ร่วมกับการลดอุณหภูมิที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 15 นาที มีประสิทธิภาพในการรักษาอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการมีชีวิตของสเปิร์ม โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายได้นาน 4 เดือน แต่อย่างไรก็ตามควรมีการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟมต่อไป เพื่อทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนานขึ้นและเป็นข้อมูลให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาสามารถไปทำได้เองโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิที่มีราคาแพงและสลับซับซ้อนเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติใช้ในพื้นที่จริง ซึ่งจะมีเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้และการส่งเสริมการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอย่างง่าย ๆ แก่ผู้สนใจ

อภิปรายผลการทดลอง

1. การพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิ

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเป็นเกณฑ์ในการเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะ Equilibration time เพื่อใช้ในขั้นตอนแช่แข็งพบว่า Glycerol เป็นพิษต่อสเปิร์มปลาสวายที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 6-15% ภายในระยะเวลา 30 นาที จึงไม่ควรนำ Glycerol มาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ หรือควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ และให้มี Equilibration time เพียงช่วงสั้น ๆ 1-2 นาที หรือไม่มีเลย ส่วน Propylene glycol, DMSO และ Sucrose เป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า Glycerol ตามลำดับ คือ ภายใน 30 นาที ยังพบอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตั้งแต่ 77-97% การทดลองครั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายกับสเปิร์มระหว่างกระบวนการแช่แข็ง สะดวกต่อการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอด และขั้นตอนในการลดอุณหภูมิ ที่ต้องการลดอุณหภูมิของทุกระดับความเข้มข้นพร้อมกันในคราวเดียวต่อหนึ่งโปรแกรม จึงกำหนดให้มี Equilibration time ที่ 10 นาที ซึ่งน่าจะเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์แล้ว และเพื่อขจัดความแปรปรวนจากปัจจัยร่วมของชนิดและ

ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ จึงทำการทดสอบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ที่ทุกระดับความเข้มข้นในขั้นตอนการลดอุณหภูมิ

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลาย DMSO มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง เนื่องจากการเติม DMSO ความเข้มข้น 9% และลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -3 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายได้ดีที่สุด (60%) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับการเติม DMSO ความเข้มข้นอื่นและสารละลายชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าสารละลาย DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งและให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งดีที่สุด (นลินี, 2527; นิศา, 2539; Mongkonpunya et al., 2000) โดยระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 8-10% (นิศา, 2539) โดยปกติแล้วชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะ Equilibration time มีผลต่อสเปิร์มปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) พบว่าเมื่อใช้ Glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5% ระยะ Equilibration time นาน 60 นาที สเปิร์มภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ย 40% ในขณะที่การใช้ Glycerol ระดับความเข้มข้น 11% และระยะ Equilibration time 20 นาที สเปิร์มภายหลังการละลายมีอัตราการฟัก 51.2% ซึ่งสูงกว่าการใช้ DMSO และ Methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Steyn et al., 1985; Steyn and Vuren, 1987) ส่วนการศึกษาของ Linhart et al. (1993) พบว่าการใช้ Glycerol ระดับความเข้มข้น 10% ระยะ Equilibration time นาน 20 นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) พบอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพียง 15% นอกจากนั้น Mongkonpunya et al. (2000) ได้เจือจางน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianadon gigas* Chevey) ในน้ำยา Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution ที่มี DMSO หรือ Methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าที่ 5% DMSO สเปิร์มปลาบึกมีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 72 ชั่วโมง ขณะที่ 5% Methanol มีการเคลื่อนที่ลดลงเร็วกว่ามาก คือมีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 48 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับ 14% ทั้ง DMSO และ Methanol ไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายใน 20 นาที

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายพบว่า การเติม DMSO ความเข้มข้น 9% และลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -3 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพภายหลังการละลายน้ำเชื้อ ในขณะที่การเติม Sucrose ทุกความเข้มข้นและ Propylene glycol ความเข้มข้น 3% และ 6 % มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำเชื้อภายหลังการละลาย โดยน้ำเชื้อมีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน ๆ หนึ่งเป็นน้ำใส อีกส่วนหนึ่งข้นเหนียว สอดคล้องกับ Mongkonpunya et al. (2000) ที่รายงานว่าเมื่อใช้ 5% Propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการทำน้ำเชื้อปลากลุ่ม Pangasiidae พบว่าภายหลังการละลายน้ำเชื้อ มีลักษณะเป็นวุ้น (Jelled semen) เป็นที่น่าสังเกตว่าในการทดลองครั้งนี้เมื่อใช้ Propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ไม่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายมีลักษณะเป็นวุ้นเหมือนที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังไม่ทราบว่าเกิดจากสาเหตุใด ซึ่งควรจะได้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

2. การพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาสวายอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม ในน้ำยา 2 สูตร คือ Ca-F HBSS และ Extender 7 ที่เติมสารละลายไครโอโพรเทคแทนต์ความเข้มข้นสุดท้าย 10% DMSO พบว่า การลดอุณหภูมิที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร นาน 15 นาที ได้ผลดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในสูตรน้ำยา Extender 7 สอดคล้องกับการทดลองของปฏิญญา (2549) ที่ทำการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) อย่างง่ายโดยลดอุณหภูมิที่ระดับความสูงเหนือไอผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร พบว่าสเปิร์มปลาตะเพียนขาวมีอัตราการเคลื่อนที่ดีที่สุดเท่ากับ 95.56% นอกจากนั้นอัญชลี (2548) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย โดยใช้สูตรน้ำยา Extender 7 และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 9% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 9 เดือน โดยทั่วไปการลดอุณหภูมิทำให้ของเหลวภายนอกเซลล์เปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งและมีของเหลวบางส่วนแพร่ออกนอกเซลล์เพื่อปรับสมดุล หากอัตราลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ปรับตัวนานเกินไป ส่งผลให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำและความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงเกินไป รวมทั้งอาจทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ทำให้เซลล์ได้รับอันตราย อย่างไรก็ตามการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไปจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เช่นกัน (Denniston et al., 2000) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการลดอุณหภูมิและระยะเวลา รวมถึงความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนต์ที่จะต้องมีความเหมาะสมต่อน้ำเชื้ออันจะทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความสำเร็จ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ได้เป็นระยะเวลานาน และน้ำเชื้อยังมีคุณภาพดีสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต เพราะการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ที่มีการเติมไนโตรเจนเหลวอย่างสม่ำเสมอจะสามารถเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ไม่ทำให้เซลล์สเปิร์มเกิดอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ สภาพทางชีวเคมีและกายภาพ โดยการทำงานของเซลล์มีอัตราเป็นศูนย์ (Wolf and Bryant, 2000) จึงทำให้น้ำเชื้อที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) มีคุณภาพดี

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่ทำให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยไม่จำเป็นต้องซื้อเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติซึ่งมีราคาแพงมากและสลับซับซ้อน และมีความสะดวกในการปฏิบัติใช้ในพื้นที่จริง ซึ่งจะมีเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้และการส่งเสริมการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอย่างง่าย ๆ แก่ผู้สนใจ

เอกสารอ้างอิง

กาญจนรี พงษ์ฉวี, สนธิพันธุ์ ผาสุขดี, วสันต์ ศรีวัฒนะ, วิชัย ก้องรัตนโกศล และสมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. (2539). การลำเลียงพันธุ์ปลาสวาย โดยการขนส่งทางอากาศ. *วารสารการประมง*, 49(6), 515-520.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์.* ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กองเศรษฐกิจการประมง. (2541). สถิติสัตว์น้ำจืด. กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ: กรมประมง.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2528). โรคปลา. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. (2548). *หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โฟร์เพซ.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. (2529). *การเลี้ยงปลา* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์.

นลินี มารคแมน. (2527). *การศึกษาเบื้องต้นของกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่เย็น.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิศา ไชยรักษ์. (2539). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกโดยวิธีการแช่แข็ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ผาณิต จันโอกุล วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) แบบแช่แข็ง. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3 ณ อาคาร 28 ชั้น 3 มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม วันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2553

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง. (2549). *การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวอย่างง่าย*. ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต, ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2535). *การผสมพันธุ์สัตว์น้ำ.* ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). *การเพาะพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. (2536). *การเลี้ยงปลาน้ำจืด.* กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กนกพร อุ่มแสง และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2551) ผลของยาปฏิชีวนะและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่เย็นต่อประมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total heterotroph. การประชุมทางวิชาการ “วิจัยบูรพา ครบรอบวันสถาปนา 58 ปี” มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี วันที่ 7 กรกฎาคม 2551.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2552). การเพาะลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ พนัส นันติ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2553). ผลของสารสกัดขมิ้นต่อการเคลื่อนที่และปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) แช่เย็น. การประชุมระดมสมองการสร้างเครือข่ายความร่วมมือด้านวิจัย ทอมก: วิถีวิจัยและการพัฒนาประเทศ. ณ โรงแรมเอเชีย กรุงเทพฯ วันที่ 25 มิถุนายน 2553.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กนิษฐา ตั้งชั่ว ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554ก) ผลของยาปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทางทะเลและการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 39(2): 252-262.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ กุลวดี พิมพ์นวลศรี ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554ข) ผลของยาปฏิชีวนะและการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดและอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อ. วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 43(1): 13-25.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ พนัส นันติ พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554ค). ผลของสารสกัดใบมะกรูดต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) แช่เย็น. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 30(4): 386-394.

สมควร ดีรัศมี. (2542). *การเลี้ยงปลาเบญจพรรณ.* กรุงเทพฯ: แสงปัญญาเลิศจำกัด.

สมปอง หิรัญวัฒน์. (2523). *ชีวประวัติของปลาสวาย (เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2523).* กรุงเทพฯ: สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง.

อัญชลี สุขีรัตน์. (2548). *การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายโดยเก็บรักษาในระยะยาว.* ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต, ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

อดุลย์ พงศ์สุวรรณ. (2532). *ปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย.* กรุงเทพฯ : บริษัทสามัคคีสาสน์จำกัด.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2531). *การเพาะขยายพันธุ์ปลา.* ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารคำแนะนำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2550). การเพาะเลี้ยงปลาสวาย. เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/if-phayao/cultivate/c_savai.htm

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.

Ashwood-Smith, M. J. (1980). Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: M. J. Ashwodd-Smith and J. Farrant (eds), Low temperature preservation in medecine and biology, (pp. 19-44). Turnbridge Wells: Pitman Medical Ltd.

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.

Christensen, J.M. and Tiersch, R.T. (1996). Refrigerated storage of channel catfish sperm. Journal of The World Aquaculture Society 27: 340-346.

Denniston, R.S., Michelet, S. and Godke, R.A. (2000) Principles of cryopreservation. In: Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in aquatic species (pp. 59-79). Baton Rouge: World Aquaculture Society.

DiLauro, M.N., Krise, W.F., Hendrix, M.A. and Baker, S.E. (1994). Short-term storage of Atlantic sturgeon sperm. The Progressive Fish-culturist. 56: 143–144.

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.

Hulata, G. and Rothbard, S. (1979). Cold storage of carp semen for short period. Aquaculture 16: 267-269.

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 conchonius,* respectively: Isolation and quarantine significance. Australian Veterinary Journal 63: 369-371.

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, A and Tiersch, R.T. (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.

Lewbart, G.A. (2001). Bacteria and ornamental fish. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 10 (1): 48-56.

Linhart, O., Billard, R. and Proteau, J.P. (1993). Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture 115: 347–359.

Mongkonpunya, K., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. (2000). Cryopreservation for sperm of the Mekong giant catfish. In: Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in aquatic species (pp. 290-291). Baton Rouge: World Aquaculture Society.

Munn, C.B. (2004). Marine microbiology. BLOS Sciencetific Publisher, London.

Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. (2008). Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In S. H. Schwartz (Ed.), *Aquaculture Research Trends* (pp. 149-184). New York: Nova Science Publishers.

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

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

Noga, E.J. (2000). Fish Disease, Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

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.

Sadd, A., Billard, R., Theron, M.C. and Hollebecq, M.G. (1988). Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. Aquaculture 71: 133-150.

Satterfield, J.R., Jr. and Flickinger, S.A. (1995). Field Collection and short-term storage of walleye semen. *The Progressive Fish-Culturist* 57(3): 182-187.

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 atudy 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.

Steyn, G.J., Schoonbee, H.J. and Chao, N.H. (1985). Preliminary investigation on the cryopreservation of *Clarias garipinus* (Clariidae: Pisces) sperm. Water S.A 11(1): 15–18.

Steyn, G.J. and Van Vuren, J.H.J. (1987). The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. Aquaculture 63: 187–193.

Stoss, J. and Refstie, T. (1983). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30(1-4): 229-236.

Stoss, J., Geries, L. and Holtz, W. (1987). The role of spermatozoa depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. Aquaculture 61: 275-279.

Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M. H. and Billard, R. (1998). Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquatic Living Resources 11: 45-48.

Todar, K. (2003). Antibiotics. Todar's Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net.

Vandepitte, J., Lemmens, P. and De Swert. (1983). Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. Journal of Clinical Microbiology 17:165-167.

Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. (1999). Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society 30: 65-72.

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I., and Nimrat, S. (2009). Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. Aquaculture 296: 58-64.

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. Disesses of Aquatic Organism 32: 49-69.

Wolf, J. and Bryant, G. (2000). Cellular Cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. Internal Journal of Refrigeration 24: 438-450.

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.

ผลผลิต (Output)

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

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ตรีรัตน์ สุขสวัสดิ์ ณัฐติกา พัวพันธุ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2558) ผลของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น. การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 7. มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 30-31 มีนาคม 2558.

2. **การจดสิทธิบัตร**

-

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

-

4. **ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)**

ผลงานวิจัยเรื่องนี้สามารถนำไปต่อยอดในภาคการผลิตของผู้ประกอบการ โดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะโดยการสนับสนุนและส่งเสริมข้อมูลเชิงวิชาการการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย โดยเฉพาะการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายในกล่องโฟม เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่มีราคาไม่แพง สามารถทำได้ง่าย ๆ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือแช่แข็งที่มีความสลับซับซ้อนและมีราคาแพง อีกทั้งสามารถนำผลงานวิจัยไปต่อยอดสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาพื้นเมืองของไทยที่หาได้ยากและใกล้สูญพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802278 สัญญาเลขที่ 67/2558
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบยั่งยืนเพื่อการค้าและการอนุรักษ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 **ถึงวันที่** 30 กันยายน พ.ศ. 2558

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	380,000 บาท	เมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2557
งวดที่ 2 (40%)	304,000 บาท	เมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม พ.ศ. 2558
งวดที่ 3 (10%)	76,000 บาท	เมื่อวันที่..........เดือน......................พ.ศ. 2558

รวม 760,000 บาท (เจ็ดแสนหกหมื่นบาทถ้วน)

รายจ่าย

รายการ	**งบประมาณที่ตั้งไว้ (บาท)**	**งบประมาณที่ใช้จริง (บาท)**	**จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน (บาท)**
1. ค่าตอบแทน	150,000	150,000	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	299,000	299,000.17	เกิน 0.17
4. ค่าใช้สอย	235,000	235,000	-
5. เงินทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยเป็นค่าสาธารณูปโภค ร้อยละ 10	76,000	76,000	-
รวม	**760,000**	760,000.17	**เกิน 0.17**

....

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
ประวัติการศึกษา	Ph.D. (Environmental Sciences), Rutgers, the state University of New Jersey วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต. แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131

ผู้ร่วมโครงวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ประวัติการศึกษา	Ph.D. (Marine Estuarine and Environmental science), University of Maryland, College Park M.Sc. (Aquaculture) สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (A.I.T.) วท.บ. ประมง (เกียรตินิยม) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต. แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131