รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ

Development of cryopreservation and cryostorage technology of fish sperm by liquid nitrogen dry shipper for aquaculture and conservation

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080040
สัญญาเลขที่ 39/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ

Development of cryopreservation and cryostorage technology of fish sperm by liquid nitrogen dry shipper for aquaculture and conservation

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

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

กุมภาพันธ์ 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 39/2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลา และพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ เปรียบเทียบกับการแช่แข็งวิธีอื่นๆ โดยนำน้ำเชื้อปลามาเจือจางในสารละลาย Calcium-free Hanks's balanced solution ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 4 ความเข้มข้น (5, 10, 15 และ 20%) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลาตะเพียนขาวและสเปิร์มปลาสวาย การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ เปรียบเทียบกับการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม หรือการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวาย โดยนำน้ำเชื้อปลามาเจือจางใน Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO พบว่าน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ หรือน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับแม้ว่าจะให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายประมาณ 20-40% แต่ก็ได้แสดงให้เห็นถึงการนำถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับมาใช้ประโยชน์สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ

คำสำคัญ: ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ, น้ำเชื้อ, สเปิร์มมาโทซัว, คุณภาพสเปิร์ม, การแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

ABSTRACT

The research project entitled “Development of cryopreservation and cryostorage technology of fish sperm by liquid nitrogen dry shipper for aquaculture and conservation” was aimed to investigate the effects of cryoprotectant toxicity on sperm motility and the application of liquid nitrogen dry shipper on freezing of fish sperm for aquaculture and conservation. Fish milt were diluted in different cryoprotectants at four concentration levels (5, 10, 15 and 20%) at 4°C. Dimethylsulfoxide (DMSO) was found to be the least toxic cryoprotectant for silver barb (*Barbodes gonionotus*) and striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt. Development of fish sperm cryopreservation of the two fish species with liquid nitrogen dry shipper was investigated in comparison with the other two freezing protocols (liquid nitrogen vapor in Styrofoam box and dry ice in Styrofoam box). Fish sperm cryopreserved with the dry shipper or dry ice had significantly lower ($P<0.05$) post-thawed sperm motilities than those of frozen with liquid nitrogen vapor in styrofoam box. Despite relatively low post-thawed sperm motility at about 20-40%, the use of liquid nitrogen dry shipper on freezing fish sperm was useful for aquaculture and conservation.

Keywords: Liquid nitrogen dry shipper, Semen, Spermatozoa, Sperm quality, Cryopreservation and Cryostorage

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อ		ii
Abstract		iii
สารบัญ		iv
สารบัญตาราง		v
สารบัญรูป		vi
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	14
4	ผลการทดลอง	22
5	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง		49
ผลผลิต (Output)		54
ประวัติคณะผู้วิจัย		55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	23
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	25
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	27
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	29
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	31
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	33
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	35
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	38
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	38
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	39
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	39
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	40
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Dimethylacetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	40
14	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งด้วยวิธีการต่างๆกัน.....	42
15	ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็งด้วยวิธีการต่างๆกัน.....	42

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ภาพตัดขวางถังไนโตรเจนเหลว (ซ้าย) และถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ (ขวา).....	10
2	น้ำเชื้อปลาที่ถูกเจือจางด้วยสารละลาย Ca-F HBSS ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ.....	21
3	ถังไนโตรเจรเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับที่ใช้ในการทดลอง.....	21

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำไม่ว่าจะเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น (chilled storage of semen) หรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (cryopreservation of semen) ยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยมากในประเทศไทย เมื่อเทียบกับการศึกษาวิจัยด้านดังกล่าวในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำที่พบในประเทศไทยมักมีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) และหาได้ง่ายตามความเข้าใจทั่วไป อันเนื่องจากสภาพอากาศของประเทศไทยในเขตร้อน ทำให้พ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำสมบูรณ์เพศเร็วกว่าในเขตหนาว ดังนั้นผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำนิยมใช้น้ำเชื้อสด (fresh semen) ในการเพาะพันธุ์ โดยไม่นิยมเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีเอาไว้ที่อุณหภูมิต่ำระยะเวลาหนึ่งเพื่อนำมาใช้ในภายหลัง แต่ในความจริงแล้วปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อของสัตว์น้ำของประเทศไทย ยังคงมักพบอยู่บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำหลายๆชนิดโดยเฉพาะการเพาะพันธุ์ปลาต่างชนิดกัน (hybridization) ซึ่งอาจมีช่วงเวลาที่ไข่และสเปิร์มอาจสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกันของพ่อแม่พันธุ์ปลา หรือแม้แต่ในสัตว์น้ำชนิดเดียวกัน ก็ยังพบว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์มีไข่ที่แก่ หรือพ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อก็อาจเกิดไม่พร้อมกัน เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ที่พบว่าแม่พันธุ์ปลาหลายๆชนิดยังคงมีไข่ที่มีคุณภาพดี แต่พ่อพันธุ์ปลาไม่มีน้ำเชื้อ ทำให้ไม่สามารถเพาะพันธุ์ปลาได้ (Tiersch et al., 1994; Irawan et al., 2010) นอกจากนี้ในบางครั้งการจับพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้ปลาเพศผู้และปลาเพศเมียไม่พร้อมกัน ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟักระหว่างการเพาะพันธุ์ เช่น ตัวเมียที่จับได้ก่อนมีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ต้องใช้ฮอร์โมนฉีดกระตุ้นซึ่งต้องขังตัวผู้ไว้หลายวันทำให้พ่อพันธุ์ปลาอาจช้ำและตายได้ (วีรพงศ์ 2535) นอกจากนี้ปลาหลายชนิดในประเทศไทยได้อยู่ในภาวะคุกคามจากการสูญพันธุ์ หรือมีการกลายเพศ (sex reversal) ซึ่งการแก้ปัญหาดังกล่าวส่วนหนึ่งสามารถทำได้ด้วยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา แล้วนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งเหล่านั้นมาเก็บรักษาเอาไว้ช่วงเวลาหนึ่งในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) แล้วนำมาผสมเทียมกับไข่ปลาในภายหลัง ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสามารถทำได้ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพง และมักมีขนาดใหญ่ ไม่สามารถนำไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาในภาคสนาม หรือแหล่งน้ำธรรมชาติได้ ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเครื่องมือที่ไม่แพง แต่มีศักยภาพสูงที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามเพื่อการอนุรักษ์ (Orfao et al., 2011) หรือในฟาร์มเพาะพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Nahiduzzamana et al., 2012) จึงมีประโยชน์โดยตรงต่อการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลา และส่งผลดีต่อการเพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์และการเพาะพันธุ์ปลาเชิงอนุรักษ์ (Scott and Baynes, 1980; Vuthiphandchai et al., 2009a, b)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (fish sperm cryopreservation) โดยสรุป ทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) ที่เหมาะสมพร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง ซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ในระดับที่เหมาะสมแล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อ เช่น หลอดฟาง (French starw) หลอด cryovial เป็นต้น แล้วทำการลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่

เหมาะสม (optimim freezing rate) ซึ่งอาจลดอุณหภูมิด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติหรือแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ก่อนที่จะเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) โดยสามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาเป็นปี (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) เพราะน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่คุณภาพดีที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว จะมีคุณภาพน้ำเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา (cryostorage) (Irawan et al., 2010) เนื่องจากน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีระดับเมตะบอลิซึมที่ต่ำมีค่าเป็นศูนย์ ทำให้เก็บรักษาได้นาน (Tiersch, 2000) นอกจากนี้การนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็ยังทำได้สะดวกขึ้นเช่นกัน โดยสามารถลำเลียงหลอดฟาง หรือหลอด cryovial ที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว แล้วทำการละลาย (thawing) ด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม (thawing temperature) จนน้ำเชื้อละลายหมดแล้วนำมาผสมเทียมกับไข่ได้ในภายหลัง โดยทางทฤษฎีน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 200-32,000 ปีโดยสเปิร์มยังคงมีชีวิตรอด (Ashwood-Smith, 1980) ดังนั้นความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง ก็ขึ้นอยู่กับว่าสามารถควบคุมตัวแปรที่เกี่ยวข้องเหล่านี้ได้มีประสิทธิภาพเพียงไร เช่น คุณภาพน้ำเชื้อสด ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ระยะเวลาสมดุล อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลาย (Nahiduzzaman et al., 2011; กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536; พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข, 2546)

ข้อดีของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ทำให้ง่ายแก่การจัดการขณะนำมาผสมไข่ในระหว่างขั้นตอนการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อแช่แข็งได้ถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะนำมาใช้ผสมเทียมได้ในภายหลังเมื่อมีแม่พันธุ์ที่มีความพร้อม ทำให้การผสมเทียมทำได้สะดวก และรวดเร็วขึ้นโดยเฉพาะในกรณีที่แม่พันธุ์ตกไข่ (ovulation) ไม่พร้อมกัน ก็สามารถใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้นำมาผสมกับไข่ได้ทันที โดยไม่ต้องรีดเอาน้ำเชื้อสด (fresh semen) จากพ่อพันธุ์หลายครั้ง ซึ่งอาจจะทำให้ปลาเครียดและอาจเป็นโรคได้ง่าย นอกจากนี้พ่อพันธุ์ปลาก็ไม่จำเป็นที่จะต้องเก็บไว้ในโรงเพาะพักในจำนวนมาก เช่นเดียวกับแม่พันธุ์ขณะเพาะพันธุ์ที่ต้องใช้จำนวนมาก เนื่องจากน้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณมากสามารถจัดเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวโดยใช้พื้นที่ในโรงเพาะฟักเล็กน้อย และยังสามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาใช้เมื่อไรก็ได้ที่มีแม่พันธุ์ที่พร้อม อีกทั้งถังไนโตรเจนเหลว ยังสามารถลำเลียงทางรถยนต์ไปได้ทุกที่ทั้งในประเทศ ซึ่งง่ายกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์จำนวนมากมาใช้เพาะพันธุ์ ซึ่งจะความยุ่งยากมากกว่า และเสียค่าใช้จ่ายดูแลพ่อพันธุ์มากกว่า (Cabrita et al., 2010) อย่างไรก็ตามการลำเลียงน้ำเชื้อปลาแช่แข็งไปใช้ในบริเวณไกลๆ ก็ยังมีข้อจำกัดตรงที่อาจเกิดอันตรายจากไนโตรเจนเหลว ไหลหกออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวหากเกิดอุบัติเหตุขณะลำเลียง ซึ่งจะมีความอันตรายมาก เพราะไนโตรเจนเหลวมีอุณหภูมิที่เย็นจัดมากถึง -196 องศาเซลเซียส

วิธีที่เหมาะสมในการลำเลียงน้ำเชื้อปลาแช่แข็งระยะทางไกลๆในปัจจุบัน อาจลำเลียงด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงและไม่เกิดอันตรายจากไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่อาจกระเด็นหกขณะลำเลียง เนื่องจากถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับแม้ว่าจะมีลักษณะเช่นเดียวกับถังไนโตรเจนเหลว แต่จะมีตัวดูดซับ (adsorbant) อยู่ในถัง ทำให้เมื่อเทไนโตรเจนเหลวลงในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ จะมีผลทำให้ไนโตรเจนเหลวทั้งหมดถูกดูดซับเข้าไปเก็บไว้ในตัวดูดซับ (absorbant) หลังจากปล่อยทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง ดังนั้นไนโตรเจนเหลวจึงไม่มีโอกาสเลยที่จะไหลหกออกจากถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ

ขณะลำเลียง จึงมีความปลอดภัยสูงมากในการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับในการลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็ง อีกทั้งถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ ก็ยังมีศักยภาพในการแช่แข็ง (freezing) น้ำเชื้อได้ดีถ้ามีการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับอย่างเหมาะสม เนื่องจากใช้หลักการของไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ เป็นแหล่งความเย็นในระหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อที่ใส่ลงไปในถังที่ระดับความสูงต่างๆ อย่างไรก็ตามแม้ว่าอุณหภูมิของไอไนโตรเจนเหลวในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ จะไม่ใช่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสก็ตาม แต่ก็มีอุณหภูมิลดต่ำลงถึง -180 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งความเย็นในการแช่แข็งน้ำเชื้อและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ดี (cryostorage) อีกทั้งถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ ยังสามารถลำเลียงไปได้บนเครื่องบินตามมาตราฐานความปลอดภัยของ IATA Dangerous Goods Regulation ทำให้การนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ทำได้อย่างสะดวก รวดเร็วและปลอดภัย เนื่องจากถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ มีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา ราคาไม่แพง ทำให้สามารถมีศักยภาพในการนำไปใช้การแช่แข็ง และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาชนิดต่างๆที่มีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ทั้งภายในฟาร์มและภายนอกฟาร์ม ซึ่งถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับในทางปฏิบัติแล้วทั่วโลกนิยมใช้ในการลำเลียงตัวอย่างชิ้นเนื้อ เลือด หรือเซลล์ชนิดต่างๆที่มีการศึกษาวิจัยหรือต้องการตรวจสอบทางด้านชีววิทยาโมเลกุล จุลชีววิทยาและทางการแพทย์และสาธารณสุข ระหว่างห้องปฏิบัติการวิจัยเฉพาะด้านหรือโรงพยาบาล เพื่อตรวจการติดเชื้อ และการปนเปื้อนของสารชีวภาพชนิดต่างๆเพราะอุณหภูมิที่เย็นจัดทำให้รักษาเซลล์หรือชิ้นเนื้อคงสภาพอยู่ได้ แต่ด้วยเหตุที่ยังมีงานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการประยุกต์ใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ ค่อนข้างมีจำกัดมาก ไม่เคยมีรายงานการศึกษาในประเทศไทย และจุดเด่นของถังชนิดนี้มีน้ำหนักเบาประมาณ 2-4 กิโลกรัม (ขึ้นกับขนาด) ราคาไม่แพง และมีความเย็นจัด จึงควรพัฒนางานวิจัยเชิงลึกด้วยการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ เพื่อพัฒนานวัตกรรมการวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้แหล่งความเย็นในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับทั้งเพื่อการแช่แข็ง (freezing) และเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (cryostorage) ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ และยังสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลา หรือผู้ที่เกี่ยวข้องนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่ต่างๆได้ต่อไป

การเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืดหลายชนิดในประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นวิธีการเพาะพันธุ์แบบเลียนแบบธรรมชาติ หรือการผสมเทียม บ่อยครั้งที่มักพบปัญหาบ่อยครั้งที่พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อน้อย โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ทำให้ต้องใช้พ่อพันธุ์จำนวนมากขึ้น หรือต้องรีดน้ำเชื้อด้วยการกดรอบๆท้องแรงขึ้น ซึ่งแม้ว่าจะฉีดฮอร์โมนกระตุ้นได้ แต่คุณภาพน้ำเชื้อก็ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงต้น หรือช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่ที่น้ำเชื้อมีคุณภาพดี พ่อพันธุ์ปลาน้ำจืดหลายชนิดมักที่จะมีปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อในบางช่วง และคุณภาพสเปิร์มที่ลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ทำให้การใช้น้ำเชื้อปลาที่ได้มาจากการรีดในแต่ละครั้งควรใช้ให้คุ้มค่าที่สุด ถ้ามีน้ำเชื้อเหลือก็ควรมีการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) เอาไว้ใช้ในครั้งต่อไป เนื่องจากน้ำเชื้อสดของปลาน้ำจืดที่เหลือจากการรีดน้ำเชื้อจะมีชีวิตได้ไม่นาน (Irawan et al., 2009) อีกทั้งการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดก็ประสบปัญหาที่พ่อพันธุ์ไม่มีน้ำเชื้อ หรือมีน้ำเชื้อคุณภาพต่ำในขณะที่แม่พันธุ์มีไข่แก่เต็มที่ ทำให้ประสบปัญหาเช่นกัน หรือพ่อแม่พันธุ์มีการกลายเพศ (sex reversal) หรือต้องผ่าเอาถุงอัณฑะ (testis) ออกมาผสมเทียม ทำให้จำเป็นต้องมีการแช่แข็งน้ำเชื้อ

ปลาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในภายหลัง โดยทั่วไปแล้วในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาหลายชนิด พ่อพันธุ์ปลาสามารถสร้างน้ำเชื้อได้ตลอดเวลา เมื่อน้ำเชื้อบางส่วนถูกรีดออกไป ก็สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ทันทีในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Jackson and Sullivan, 1995; Shangguan and Crim, 1995; Mylonas et al., 1997) และก็มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าพ่อพันธุ์ปลาหลายชนิดที่มีน้ำเชื้อจำนวนมาก แต่ถ้าไม่ได้นำพ่อพันธุ์ปลาตัวนั้นมาเพาะพันธุ์ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ก็จะทำให้น้ำเชื้อหมดหายไปจากตัวพ่อพันธุ์ปลาในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ทันที เช่นปลา trout ปลา turbot ปลา seabass (Büyükhatipoglu and Holtz, 1984; Zohar et al., 1984; Suquet et al., 1992) ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาให้มีคุณภาพดีไว้ช่วงหนึ่ง แล้วนำมาใช้ผสมเทียมภายหลังเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปลาบางชนิด แม้ว่าพ่อแม่พันธุ์ปลาในประเทศไทยจะมีมาก หาได้ง่าย แต่ปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดี โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ก็พบในปลาหายชนิด และจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีมาใช้ประโยชน์ในภายหลังเพื่อสร้างศักยภาพการวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศ และส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ รวมทั้งการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาที่มีคุณค่าสูง หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ในลักษณะงานวิจัยเชิงรุก

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพ จะสามารถทำให้น้ำเชื้อเก็บรักษาได้นานเป็นปี มีผลดีต่อการเพาะพันธุ์ปลาที่จะมีผลผลิตได้ตลอดปี และทำให้การขาดแคลนน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีไม่เป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) อีกต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการจัดการฟาร์มของเกษตรกร และการรักษาสายพันธุ์ปลาที่ดีให้คงอยู่ ซึ่งถ้าได้มีการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่อุณหภูมิต่ำด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation) และยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในรูปของธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) ก็จะช่วยทำให้มีน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีอยู่ตลอดเวลา พร้อมที่จะใช้ปฏิสนธิกับไข่ปลา การพัฒนางานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยได้เพิ่งอยู่ในระยะเริ่มต้นการพัฒนางานวิจัยโดยนักวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ทำการศึกวิจัยพื้นฐานและเชิงประยุกต์อย่างสม่ำเสมอ ด้วยการบูรณาการองค์ความรู้ด้านเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา วาริชศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ตลอดระยะเวลาประมาณ 14 ปีที่ผ่านมา โดยได้วิจัยในสัตว์น้ำหลายชนิด มีบทความวิจัยที่ตีพิมพ์ทั้งในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และระดับชาติ มาอย่างต่อเนื่องตลอดมา โดยงานวิจัยเหล่านั้นได้แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ซึ่งมีราคาแพงตั้งแต่สี่แสนบาท ถึงล้านบาท และเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เช่นปลาไน (Irawan et al., 2010) ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลาตะเพียนขาว (Vuthiphandchai et al., 2014) เป็นต้น อย่างไรการนำเอาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไปใช้ในขณะนี้ได้มีบริษัทเอกชนขนาดใหญ่บางแห่ง นำเอาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีไปใช้แล้ว แต่ผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลางก็ยังไม่สามารถนำเอาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไปใช้ประโยชน์ เพราะข้อจำกัดของเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติมีราคาแพง ซึ่งแนวทางหนึ่งของการแก้ปัญหาลดต้นทุนการแช่แข็งน้ำเชื้อ สามารถทำได้โดยการนำเอาน้ำเชื้อปลามาแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ที่อยู่ภายในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) หรือกล่องโฟม (styrofoam box) แต่การแช่แข็งด้วยถังไนโตรเจนเหลว หรือกล่องโฟม มีข้อจำกัดที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในพื้นที่ต่างๆนอกฟาร์มเพาะเลี้ยงทำได้ยาก ไม่ปลอดภัย เพราะไนโตรเจนเหลวอาจหลุดออกมาจากภาชนะเก็บรักษาระหว่างการลำเลียงถังไนโตรเจนเหลวไปใช้บริเวณนอกฟาร์ม หรือสถานที่ไกลๆที่ต้องเดินทางด้วยรถยนต์จาก

อุบัติเหตุที่อาจเกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) เท่านั้นตามที่กล่าวมา เพราะมีปลอดภัยสูงมาก อีกทั้งถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับมีราคาไม่แพง มีขนาดเล็ก สะดวกในการใช้ และการลำเลียง และยังสามารถทำหน้าที่ได้ทั้งการแช่แข็ง (freezing of sperm) และการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (cryostorage of sperm) ได้ดีตามที่กล่าวมาแล้ว จึงควรพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ เพราะยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของน้ำเชื้อในธนาคารน้ำเชื้อ (gene bank or sperm bank) ของสายพันธุ์ปลาที่ดีที่ได้คัดพันธุ์ไว้แล้ว

ด้วยเหตุที่ปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อปลา ยังคงมักพบอยู่บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิด ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว มีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะขยายพันธุ์ปลา ทั้งปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ หรือปลาที่มีการกลายเพศซึ่งเพศผู้และเพศเมียจะพัฒนาถึงวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน ซึ่งการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ มีข้อดีทั้งในเรื่องใช้วัสดุอุปกรณ์ราคาไม่แพง น้ำหนักเบา ใช้สะดวก มีความปลอดภัยสูงในการใช้และลำเลียง และสามารถใช้ในลักษณะ 2 in 1 กล่าวคือสามารถใช้ทั้งการแช่แข็ง และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง จึงควรพัฒนางานวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ ตามนโยบายของรัฐบาลเรื่องการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์ ประเทศไทย 4.0 โดยตรง เพื่อก่อให้เกิดอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความยั่งยืนแก่เกษตรกรหรือผู้ประกอบการ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับกับการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวรูปแบบอื่นๆ

ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ โดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว/ปลาสวายมาแช่แข็งด้วยถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อกับวิธีการแช่แข็งอื่นๆ ได้แก่ การแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งมีหลักการทำงานที่คล้ายกันแต่ความสำเร็จที่ได้ส่วนมากแล้วมีความแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ น่าจะมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ซึ่งมีความเที่ยงตรงสูงมาก เพราะต่างก็ใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นแหล่งของความเย็นในการลดอุณหภูมิเช่นกัน เพียงแต่ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูด

ซับมีราคาถูกกว่าเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติค่อนข้างมาก มีน้ำหนักเบา และมีประโยชน์ทั้งในแง่ที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อได้ และลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปที่อื่นได้อย่างปลอดภัย การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ น่าจะมีประสิทธิภาพเหมือนกับการแช่แข็งด้วยถังไนโตรเจนเหลว หรือการแช่แข็งด้วยกล่องโฟม เพราะต่างก็ใช้ไอไนโตรเจนเหลวเหมือนกันในการลดอุณหภูมิ เพียงแต่การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ของถังไนโตรเจนเหลว หรือกล่องโฟม มีข้อจำกัดเรื่องความปลอดภัย เพราะมีโอกาสสูงมากที่ไนโตรเจนเหลวจะหกออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว ทำอันตรายได้มาก ในขณะที่กล่องโฟม สามารถใส่ไนโตรเจนเหลวได้ในปริมาณน้อยมาก และระเหยหมดอย่างรวดเร็วในเวลาไม่กี่ชั่วโมง แต่การแช่แข็งด้วยถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับจะมีความปลอดภัยสูงมาก และมีประสิทธิภาพการแช่แข็งที่ดีเช่นกัน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับปลาแต่ละชนิดซึ่งต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วย cryoprotectants ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกันเพื่อดูความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและระดับของ cryoprtectants ที่เหมาะสม รวมทั้งการลดหรือเพิ่มอุณหภูมิอย่างเหมาะสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็ง และเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติที่มีราคาแพงในการแช่แข็ง โดยข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาน้ำจืดในอนาคต เช่น ปลาดุกอุย ปลานวลจันทร์น้ำจืด ปลาหมูอารีย์ เป็นต้น และยังสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาที่จับจากบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาในธรรมชาติ (remote areas) ด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ โดยไม่ต้องลำเลียงน้ำเชื้อกลับมาแช่แข็งในห้องปฏิบัติการ

2. ได้องค์ความรู้ใหม่จากการวิจัยที่มีผลต่อความก้าวหน้าในเชิงวิชาการของสาขาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะสามารถพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ มาแก้ปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาได้แล้ว ยังทำให้งานวิจัยด้านนี้ที่ได้รับการพัฒนาเทียบเท่าต่างประเทศ อีกทั้งองค์ความรู้ใหม่ที่ได้นี้ยังสามารถพัฒนาต่อไปเพื่อปรับประยุกต์ใช้กับปลาชนิดอื่นๆที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือหาได้ยาก หรือใกล้สูญพันธุ์ต่อไป เพราะข้อมูลที่ได้จากการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดหนึ่งที่อุณหภูมิต่ำสามารถนำเทคนิควิธีการนั้นๆไปประยุกต์ใช้ได้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอีกชนิดหนึ่งได้ทันที เพียงแต่อาจต้องปรับเปลี่ยน protocol ให้เหมาะสม และจะยังเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาการแช่แข็งตัวอ่อน หรือไข่ของสัตว์น้ำของประเทศไทยต่อไปในอนาคตที่ต้องการตัวอย่างสัตว์น้ำเหล่านั้นสำหรับการศึกษาด้าน molecular biology หรือ gene expression ในสเปิร์ม ไข่ หรือตัวอ่อนสัตว์น้ำต่อไป

3. ได้พัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อการผสมเทียมไข่ปลา โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นเป็นปีเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมปลา รวมทั้งเป็นการเพิ่มศักยภาพในการปรับปรุงพันธุ์ หรือการคัดเลือกพันธุ์ โดยความสำเร็จในการแช่แข็งและการเก็บน้ำเชื้อที่ดีไว้ในลักษณะ sperm bank ด้วยถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลาต่อไป ทำให้การแช่แข็ง

น้ำเชื้อปลาทำได้สะดวกขึ้นด้วยเทคโนโลยีที่ไม่แพง ไม่สลับซับซ้อน และทำในฟาร์มต่างๆ หรือแหล่งน้ำธรรมชาติได้ทันที

4. ได้สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ในระดับระดับบัณฑิตศึกษา ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการที่จะได้เรียนรู้เทคนิค และประสบการณ์โดยตรงจากคณะผู้วิจัย โดยนักวิจัยรุ่นใหม่จะเป็นนิสิตที่วิจัยเกี่ยวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อและการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นวิธีการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ต้องการแช่แข็งและทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (Seidel, 1984) ซึ่งถ้าแช่แข็งอย่างถูกวิธีจะสามารถเก็บรักษาเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะแช่แข็งเหล่านั้นได้เป็นเวลานาน เนื่องจากในสภาวะที่เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะอยู่ในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของขบวนการเมทาบอลิซึม หรือปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีใดๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะเหล่านั้น ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานหลายสิบปี ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วสามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยคุณภาพเซลล์ยังคงเดิมได้นานถึง 2,000-32,000 ปี (Ashwood-Smith, 1980) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการแช่แข็งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเพาะพันธุ์ปลาและการอนุรักษ์พันธุ์ปลา เนื่องจากปลาบางชนิดพ่อแม่พันธุ์อาจมีความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์ที่ไม่พร้อมกัน หรือปลาบางชนิดมีการกลายเพศ (sex reversal) ก็สามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้มาใช้ผสมเทียม อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายังมีประโยชน์ในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาที่เจริญเติบโตเร็ว มีความต้านทานต่อโรค โดยนำน้ำเชื้อของสายพันธุ์ปลาเหล่านี้มาเก็บรักษาในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) และยังสามารถใช้ในการผสมพันธุ์ปลาข้ามชนิดเพื่อให้ได้ปลาลูกผสม

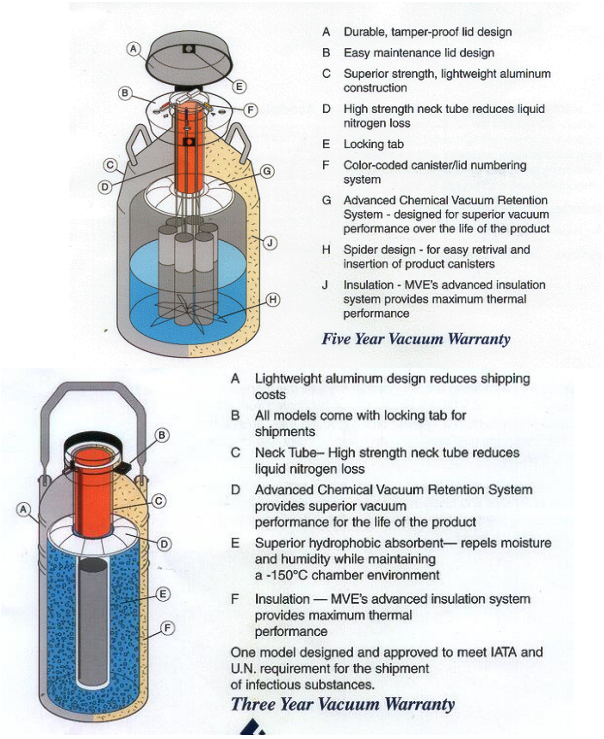
การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีมานานกว่า 60 ปีแล้วและในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีความสนใจจากหลายภาคส่วนในการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ปลามากขึ้น โดยเฉพาะในปลาที่มีมูลค่าเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ และปลาบางชนิดที่หาได้ยากใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) ประกอบกับการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ทำได้ง่ายขึ้น ไม่สลับซับซ้อน และเป็นเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีราคาถูก ก็จะช่วยทำให้มีความสนใจในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากขึ้น เนื่องจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้เพาะขยายพันธุ์ปลาสามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงพ่อพันธุ์ปลา โดยน้ำเชื้อจะถูกรีดจากพ่อพันธุ์ปลาและนำมาแช่แข็ง ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ปลา และยังสะดวกต่อการขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งระหว่างโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (กฤษณ์ มงคลปัญญา และนิศา ไชยรักษ์, 2539)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสาขาหนึ่งที่ช่วยในการเพิ่มผลผลิตหรือประสิทธิภาพการผลิตลูกปลา โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาทั้งเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ การศึกษาวิจัยด้านนี้ส่วนใหญ่นิยมศึกษาในต่างประเทศ ทั้งในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากะพงขาว ปลากะพงแดง ปลา rainbow trout ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา Perch ปลา sea bream ปลา cod และปลา Atlantic croaker เป็นต้น โดยในปัจจุบันได้มีรายงานความสำเร็จเกี่ยวกับการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำทั่วโลกมากกว่า 200 ชนิด (Martínez-Páramo et al., 2017) แต่การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยมากขึ้นในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาแม้ว่าการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ยังไม่ได้รับความ

นิยมเท่าที่ควร น้ำเชื้อปลาเมื่อถูกแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (freezing rate) ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวสำหรับการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลาย (thawing) โดยการเพิ่มอุณหภูมิในอัตราที่เหมาะสม (thawing rate) แล้วนำน้ำเชื้อปลาที่ถูกละลายไปผสมเทียมกับไข่ (Horváth and Urbanyi, 2000; Vuthiphandchai et al., 2009a) ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างในกระบวนการแช่แข็ง เช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ (Sansone et al., 2002; Irawan et al., 2010) ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) (Rana and McAndrew, 1989; Rideout et al., 2003; Basavaraja and Hegde, 2004) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (Sansone et al., 2002; Vuthiphandchai et al., 2009a) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Mansour et al., 2006; Yavas and Bozkurt, 2011) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การปนเปื้อนของแบคทีเรียและการใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำเชื้อแช่แข็ง รวมทั้ง เทคนิคของการแช่แข็งน้ำเชื้อ ต่างก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อแตกต่างกันไป (Boonthai et al., 2016a; Boonthai et al., 2016b)

2. ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) คือก๊าซไนโตรเจนที่มีในธรรมชาติ แต่เมื่อนำมาสู่กระบวนการผลิตไนโตรเจนเหลว โดยการล ดอุณหภูมิ และเพิ่มความดันมากขึ้น ทำให้ก๊าซไนโตรเจนมีสถานะเป็นของเหลว แต่ถ้าปลดปล่อยสู่บรรยากาศ ซึ่งมีความดันปกติ ไนโตรเจนเหลวจะเปลี่ยนสถานภาพกลับเป็นก๊าซไนโตรเจนอย่างรวดเร็ว ด้วยการกลายเป็นไอ ไนโตรเจนเหลวมีอุณหภูมิต่ำมาก (-196 องศาเซลเซียส) จึงได้นำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ที่เกี่ยวกับความเย็นต่ำมาก เช่นแช่เข็งน้ำเชื้ออสุจิ แช่แข็งเอ็มบริโอ แช่แข็งเซลล์ไขกระดูก แช่แข็งเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะบางส่วนของร่างกาย รวมทั้งแช่แข็งอาหาร และยังมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ การเก็บรักษาไนโตรเจนเหลว ทำโดยนำเอาไนโตรเจนเหลวเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen dewar หรือ liquid nitrogen tank) ซึ่งเป็นถังที่ถูกสร้างขึ้นมา ประกอบด้วยชั้นนอกและชั้นใน มีชั้นสุญญากาศอยู่ตรงกลาง ทำให้การเก็บรักษาไนโตรเจนเหลวมีความปลอดภัย เพราะการมีชั้นสุญญากาศทำให้ความเย็นไม่ถ่ายออกมายังชั้นนอก จึงสามารถจับ หรือเคลื่อนย้ายถังไนโตรเจนได้ง่าย (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามการลำเลียงถังไนโตรเจนเหลวไประหว่างสถานที่ต่างๆมีอันตรายจากการขนส่งที่ถังไนโตรเจนเหลวอาจพลิกคว่ำ ทำให้ไนโตรเจนเหลวไหลออกมา และเกิดอันตรายอย่างมาก จึงทำให้มีการพัฒนาวัสดุดูดซับ (absorbant) ขึ้นมาติดตั้งภายใน chamber ของถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งเมื่อเทไนโตรเจนเหลวลงไป จะทำให้ไนโตรเจนเหลวทั้งหมดถูกดูดซับไว้ใน absorbant จึงทำให้การลำเลียงถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) ไปยังที่ต่างๆทั่วโลกมีความปลอดภัยสูง โดยสามารถเก็บรักษาเซลล์ต่างๆที่ถูกแช่แข็งได้นานหลายอาทิตย์ขึ้นกับ specification ของผู้ผลิต



รูปที่ 1 ภาพตัดขวางถังไนโตรเจนเหลว (ซ้าย) และถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ (ขวา)
ที่มา: http://www.majesticgaits.com/mve.htm

อย่างไรก็ตามไนโตรเจนเหลวก็มีอันตรายที่อุณหภูมิต่ำมาก ซึ่งถ้าหกกระเด็นออกมาระหว่างการใช้และสัมผัสร่างกาย จะทำให้เกิดอาการบาดเจ็บปวดบวมจากความเย็น (frostbite) ได้ และถ้าก๊าซไนโตรเจนระเหยออกมาในปริมาณมากเกินไป จะทำให้อากาศมีน้อยลง ทำให้เกิดภาวะขาดอากาศหายใจได้ถ้าไม่มีการระบายอากาศดีพอ

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาไน (Linhart et al., 2000) ปลา striped bass (He and Woods, 2003) ปลา sea bream (Fabbrocini et al., 2000) และปลา Atlantic croaker (Gwo and Arnold, 1992) เป็นต้น น้ำเชื้อแช่แข็งนิยมเก็บรักษาในหลอดฟาง (straw) และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็สามารถนำหลอด บรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana and McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการแช่แข็ง และวิธีการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อแต่ละครั้งแตกต่างกันไป กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarlity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa et al., 1983) ดังนั้นการใช้สารละลาย

บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพราะถ้าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ก่อนจะถูกแช่แข็ง ก็จะมีผลทำให้ประลบความล้มเหลวในการแช่แข็งทันที

การเก็บรักษาสเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บเซลล์แช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ – 196 องศาเซลเซียส ซึ่งขบวนการเมตะบอลิซึมของเซลล์จะเป็นศูนย์ ทำให้เซลล์สามารถเก็บรักษาให้มีคุณภาพดีได้นานเป็นปี ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้มีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรต่อไปนี้ได้แก่ การเลือกใช้สูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไคโอโพรเทคแทนท์ (สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะ equilibration time (ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไคโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้ตัวแปรอย่างถูกต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี เมื่อจะนำมาใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำให้ผลการเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 30 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อปลาหลายๆชนิด ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด แม้ว่างานวิจัยส่วนมากได้ศึกษาในปลาน้ำจืด โดยมีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาทะเลน้อยมาก เช่น

นลินี มารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี lecithin และ mannitol เป็นองค์ประกอบ ปรากฏว่าประสบความล้มเหลว

เสน่ห์ และคณะ (2536) รายงานการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกในสารละลายที่มี 125 มิลลิโมล $NaHCO_3$, 250 มิลลิโมล Sucrose, 9.75 มิลลิโมล Glutathione และ 8 เปอร์เซ็นต์ Dimethysulfuoxide (DMSO) อัตราการปฏิสนธิของอสุจิในหลอดฟางฆ่าเชื้อ 67 เปอร์เซ็นต์ ไม่ฆ่าเชื้อมีอัตราปฏิสนธิ 11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราปฏิสนธิเฉลี่ย 31 เปอร์เซ็นต์

Gwo et al. (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker แบบแช่แข็ง พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ –10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง –150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่

Rana and McAndrew (1989) รายงานการทำน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotactant ที่ระดับต่างๆกัน ในหลอดฟางขนาด 0.5 ml. พบว่า การใช้ methanol 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดในการปกป้องเซลล์ และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งในอัตราที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 50 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

Conget et al. (1996) ใช้ cryoprotectant ต่างๆชนิด ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อใน cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

Tiersch et al. (1994) ได้นำน้ำเชื้อปลา channel catfish มาแช่แข็งโดยผสม cryoprotectant ต่างๆชนิด และ Hank's balanced salt solution ลงไปในน้ำเชื้อ พบว่า methanol ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่เทียบเท่ากับ การใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ

Suquet et al. (1998) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) โดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 9 เดือน พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ในช่วง 60 - 90%

Linhart et al. (2000) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อของปลาไนโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส/นาที จาก 4 องศาเซลเซียส ถึง -9 องศาเซลเซียส แล้วใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส/นาที จาก -9 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งมีความแตกต่างกันโดยน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 78 $\pm$ 18% และน้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 69 $\pm$ 14%

Ji et al. (2004) ได้ทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) โดยใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรแทคแทนต์ที่ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% นำไปลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลว โดยวางไว้สูงเหนือผิวหน้าสารไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2 6 และ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวางเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาที จึงแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่าการใช้สารละลาย DMSO 10% ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าสารไนโตเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 73.3 $\pm$ 5.7% รองลงมาคือที่ระดับความสูง 13 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.3 $\pm$ 2.9% และที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำสุดเท่ากับ 41.7 $\pm$ 10.6%

Vuthiphandchai et al. (2009a) ได้พัฒนาวิธีการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยการใช้สาร cryoprotectants 10 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้นโดยลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 รูปแบบด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ พบว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration period) ใน dimethylsulfoxide 10% นาน 10 นาทีเมื่อลดอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -80 องศาเซลเซียสแล้วใส่ในไนโตรเจนเหลวจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (post-thaw sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (post-thaw sperm viability) มีค่าสูงสุด (>90%) หลังการละลายน้ำเชื้อ (thawing) และน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งเหล่านี้สามารถปฏิสนธิกับไข่ปลากะพงแดงให้ค่าปฏิสนธิมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสด

Irawan et al. (2010) ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์และวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 6 ชนิด และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนเก็บในไนโตนเจนเหลว พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย common carp sperm extender (CCSE2) และ DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และยังพบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่าย โดยนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร นาน 10 นาทีมีผลทำให้สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 90% หลังการละลาย (post-thaw sperm motility)

Yavas and Bozkurt (2011) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20, 30 วินาที ปรากฏว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลายเมื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

- ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (รุ่น CX100; Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
- ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen dewar; Worthington 35LDB, Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
- กล่องโฟม (Styrofoam box)
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต และ pipette tip
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เข็มเขี่ย
- ฟอร์เซป (Forcep)
- กระจกสไลด์และ Cover glass
- กระดาษกรอง
- เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
- กล้องจุลทรรศน์
- Haemacytometer
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Incubator)
- Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
- หลอดฟาง (French straw) ขนาด 250 ไมโครลิตร
- Canister
- Aluminium canes
- Goblets
- Vial tubes
- Hot plate
- Thermometer
- Tissue culture flasks
- Thermocouple-probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)
- Water bath
- Racks

- Eppendorf tubes
- พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว/ปลาสวาย
- สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสีน้ำเชื้อปลา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลา</u>

พ่อพันธุ์ปลาถูกรวบรวมจากฟาร์มเลี้ยง หรือรวบรวมน้ำเชื้อปลา (milt) จากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลา แล้วนำมาศึกษาต่อที่ห้องปฏิบัติการแช่แข็งน้ำเชื้อ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีการเลี้ยงพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวบางส่วนไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ให้มีน้ำเชื้อเพื่อสามารถใช้ในการทดลองได้ตลอดเวลาที่ต้องการ พ่อพันธุ์ปลาที่ได้ถูกชั่งน้ำหนัก วัดความยาวก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) การมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) และ แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (osmolality) โดยทดลอง 3 ซ้ำ พ่อพันธุ์ปลาถูกนำมาเช็ดบริเวณช่องท้องให้แห้งสนิทเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อออกมาด้วย syringe ขนาด 1 ซีซี น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาถูกรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled milt samples) ในแต่ละครั้งเพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) สำหรับนำไปใช้ในแต่ละชุดการทดลอง ในระหว่างการรีดน้ำเชื้อต้องกดบริเวณช่องเพศเพื่อให้ปัสสาวะทั้งหมดออกมาก่อนการรีดน้ำเชื้อ เพราะว่าปัสสาวะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ทำให้เมื่อนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งจะประสบความล้มเหลว เพราะน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำตั้งแต่เริ่มการทดลอง โดยที่สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ จึงไม่มีพลังงานเหลืออยู่ที่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งมีสเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้หลังการละลาย (thawing)

น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80เปอร์เซ็นต์) น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ไม่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว/ปลาสวายที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้จะถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยการใช้หลอด syringe รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน tissue culture flask แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพ สเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงก่อนเริ่มการแช่แข็ง น้ำเชื้อเหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาทีในระหว่างขั้นตอนการศึกษา

2. <u>การประเมินคุณภาพสเปิร์มในน้ำเชื้อปลา</u>

ความหนาแน่นของสเปิร์มประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% saline โดยเจือจาง 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำกลั่นลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ประเมินจากจำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยกลั่น โดยแบ่งระดับที่สเปิร์ม

เคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิตทำโดยนำเอาน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) แล้วจึงสุ่มนับสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (Fribourgh, 1966) สำหรับการเช็ค osmolarity ทำโดยนำน้ำเชื้อมา centrifuge ด้วยความเร็วสูง x5000g นาน 15 นาที เพื่อแยก seminal fluid ออกจากสเปิร์ม จากนั้นนำ seminal fluid ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวัดความดันออสโมติก (osmotic pressure หรือ osmolarity) โดยการใช้เครื่อง osmometer

3. <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ</u>

3.1 <u>การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมก่อนที่จะทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยการประเมินความเป็นพิษ (toxicity test) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่รวบรวมมาใหม่ (freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS (Calcium free Hank's Balanced Salt Solution) ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด (Mongkonpunya et al., 1995) โดยที่ Ca-F HBSS จะไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะเดียวกันสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 7 ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ ถูกเตรียมขึ้นมาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS แล้วจึงผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ cryoprotectants ตามที่ต้องการ การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และสาร cryoprotectants ชนิดต่างๆในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ: สารละลายบัฟเฟอร์ : สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เจือจาง เท่ากับ 1:1:1 ภายใน tissue culture flask (รูปที่ 2) และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่างๆกันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ ได้แก่ ethylene glycol, propylene glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), sucrose, acetamide, formamide และ methanol สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็น 5%, 10%, 15% และ 20% การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้ทำในระยะเวลาต่างๆกันหลังจากใส่ cryoprotectant ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ตั้งแต่เวลา 10, 20, 30, 60, 90 นาทีหรือจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS เท่านั้น การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใด และความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษหรือทำให้สเปิร์มตาย

ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประกอบในการ design protocol ระหว่างการแช่แข็งต่อไป

3.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ

การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำโดยนำน้ำเชื้อสดปลาสวายที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS จากนั้นใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิดได้แก่ DMSO, propylene glycol, ethylene glycol, formamide, sucrose และ dimethylacetamide โดยใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่เวลาต่างๆกันทุก 10 นาทีจนครบ 60 นาที โดยใช้น้ำกลั้นกระตุ้นสเปิร์มให้เคลื่อนที่ และประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามที่กล่าวมา โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อสดเจือจางด้วย Ca-F HBSS

3.3 การศึกษาการพัฒนาการแช่แข็งด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ และศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาที่ผ่านการแช่แข็ง

3.3.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม

การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลาสด (fresh milt) มาเจือจางในสารละลาย Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ที่มี DMSO ในระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วบรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางลงไปในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดฟาง ปล่อยน้ำเชื้อปลาไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibration period) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงทำการแช่แข็งน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ โดยเปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และแช่แข็งด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การเตรียมถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับให้พร้อมใช้งาน ทำโดยเติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนเต็มถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับขนาด 10 ลิตร (รุ่น CX100; Taylor Wharton) (รูปที่ 3) แล้วปล่อยค้างคืนให้ไนโตรเจนเหลวทั้งหมดถูกดูดซับเข้าไปใน absorbent ก่อนเริ่มการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวทำโดยนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้ออยู่ในสารละลาย Ca-F HBSS และ 10% DMSO ใส่ไปใน canister และเมื่อครบเวลาสมดุลนาน 10 นาที นำ canister ที่มีหลอดฟางไปใส่ใน chamber ของในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ โดยปล่อยหลอดฟางไว้ใน chamber ของถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับเพื่อลดอุณหภูมิแช่แข็งเป็นเวลานาน 10 และ 15 นาที (รูปที่ 3) พร้อมกับใช้ thermocouple probe thermometer type K ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายใน chamber ทุกๆ 2 วินาทีจนครบเวลาที่กำหนด เพื่อทราบอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) แล้วนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ภายในไปเก็บรักษาในถัง

ไนโตรเจนเหลว (Worthington 35LDB, Taylor Wharton, Theodore, AL, USA) ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำหลอดฟางที่แช่แข็งออกมาละลาย (thawing) ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำเชื้อแช่แข็งละลาย ยกหลอดฟางขึ้นมาทันทีเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามที่กล่าวมาแล้ว สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น โดยนำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในระยะเวลาสมดุลครบ 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียสมาวางในแนวนอนในไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซ็นติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ซึ่งบรรจุในกล่องโฟม โดยใช้เวลาแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 10 และ 15 นาที ก่อนนำหลอดฟางไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวและละลายน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว ในทำนองเดียวกันน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อแล้วนำมาบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลครบ 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส จึงนำหลอดฟางมาวางบนน้ำแข็งแห้งบดละเอียดที่อยู่ในกล่องโฟม โดยใช้เวลาแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง 10 และ 15 นาที จึงนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว แล้วนำออกมาละลายใน water bath ที่มีอุณหภูมิน้ำ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งในชุดการทดลองเหล่านี้หลังการละลายได้นำมาเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดก่อนการแช่แข็ง โดยประเมิน 3 ครั้งต่อสไลด์ จำนวน 3 ซ้ำ (9 pseudoreplicates)

3.3.2 <u>การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม</u>

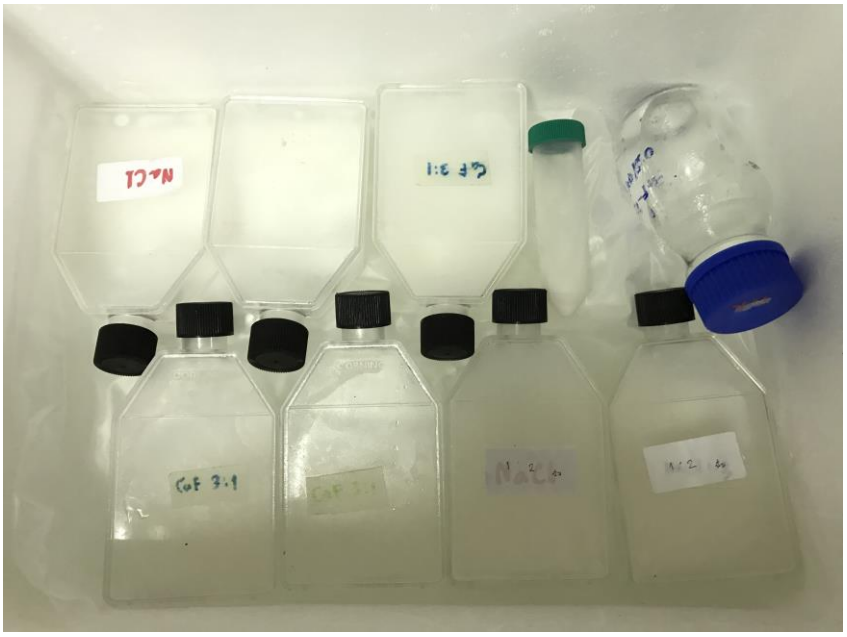
การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย ทำโดยนำเอาน้ำเชื้อสดของปลาสวายที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO วางบนน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดน้ำเชื้อที่ผสมเข้ากันดีในปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใส่หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรใน ปิดปลายหลอดฟาง วางหลอดฟางไว้ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลาย (equilibration) ระยะเวลา 10 นาทีก่อนการนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อไปทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งในรูปแบบต่างๆ 3 วิธี ได้แก่ 1. การใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ 2. การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และ 3. การใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับทำการแช่แข็งด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 โดยแช่แข็งใน chamber ของถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (รูปที่ 3) นาน 10 และ 15 นาทีก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม ทำโดยวางหลอดฟางในแนวนอนเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมขึ้นมา 6 เซนติเมตร ใช้ระยะเวลาแช่แข็งนาน 10 และ 15 นาทีในการลดอุณหภูมิ ปิดฝากล่องโฟมให้สนิท เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เขี่ยหลอดฟางลงไปในไนโตรเจนเหลวที่อยู่ในกล่องโฟม แล้วนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเช่นกัน การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยน้ำแข็งแห้งหลังจากปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลครบ 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นำหลอดฟางมาวางบนน้ำแข็งแห้งบดละเอียดที่อยู่ในกล่องโฟม โดยใช้เวลาแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง 10 และ 15

นาที แล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว และละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยนำหลอดฟางมาแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาทีเช่นกัน โดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยประเมิน 3 ครั้งต่อสไลด์ จำนวน 3 ซ้ำ (9 pseudoreplicates)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายของแต่ละชุดการทดลอง และเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด ถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS โดยข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)



รูปที่ 2 น้ำเชื้อปลาที่ถูกเจือจางด้วยสารละลาย Ca-F HBSS ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ

รูปที่ 3 ถังไนโตรเจรเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับที่ใช้ในการทดลอง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ตอนดังนี้

1. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ
2. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายสวายถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ
3. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม

4.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ

4.1.1 Ethylene glycol

การนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ที่มี ethylene glycol มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพียงเล็กน้อย โดยเมื่อน้ำเชื้ออยู่ในสารละลาย ethylene glycol ทั้ง 4 ความเข้มข้น (5, 10, 15, 20%) นานถึง 60 นาที พบว่าสเปิร์มยังคงมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ดีมีค่ามากกว่า 80% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสดเจือจางใน Ca-F HBSS เท่านั้นที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100% (ตารางที่ 1) ดังนั้นหากใช้ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรแทคแทนท์ที่สี่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถแช่สเปิร์มไว้ไม่ควรเกิน 60 นาทีก่อนนำมาแช่แข็ง เนื่องจากมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวยังมีค่าสูง อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเมื่ออยู่ในสารละลาย ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (5-20%) หรือระยะเวลาทดสอบนานขึ้น (0-180 นาที) มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 20% ethylene glycol ยังมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ต่ำประมาณ 20% (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Ethylene glycol			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	96.66±3.33^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	96.66±3.33^{a,1}	96.66±3.33^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	97.78±2.22^{a,1}	93.33±0.00^{b,12}	93.33±0.00^{ab,12}	88.89±2.22^{b,2}
20	100.00±0.00^{a,1}	93.33±0.00^{ab,1}	88.89±2.22^{bc,12}	88.89±2.22^{bc,12}	84.45±2.22^{bc,2}
30	100.00±0.00^{a,1}	91.11±2.22^{bc,1}	86.67±0.00^{cd,12}	86.67±0.00^{c,12}	82.22±2.22^{c,2}
60	100.00±0.00^{a,1}	86.67±0.00^{cd,1}	84.45±2.22^{cd,12}	84.45±2.22^{c,12}	80.00±0.00^{c,2}
90	100.00±0.00^{a,1}	84.45±2.22^{de,1}	82.22±2.22^{d,12}	77.78±2.22^{d,23}	73.33±0.00^{d,3}
120	100.00±0.00^{a,1}	82.22±2.22^{de,1}	73.33±0.00^{e,2}	68.89±2.22^{e,2}	53.33±0.00^{e,3}
150	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{e,1}	66.67±0.00^{f,1}	57.78±2.22^{f,2}	35.55±2.22^{f,3}
180	100.00±0.00^{a,1}	73.33±0.00^{f,1}	57.78±2.22^{g,2}	42.22±2.22^{g,3}	20.00±0.00^{g,4}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.1.2 Propylene glycol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดผสมกับสารละลาย Ca-F-HBSS เท่านั้นหรือน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (Sperm extender) ในชุดควบคุม พบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 100% ในช่วงเวลาทดสอบตั้งแต่เวลาที่ 0-180 นาที สำหรับน้ำเชื้อที่เจือจางใน propylene glycol ความเข้มข้น 5-20% พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในทุกชุดการทดลองยังคงมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่มีค่าสูงมากกว่า 80% เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที (ตารางที่ 2) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 20% propylene glycol ยังมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีค่าสูงประมาณ 67% (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าดังนั้นหากใช้ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรแทคแทนท์ที่สี่ความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ควรแช่น้ำเชื้อไว้ไม่เกิน 120 นาทีก่อนนำมาแช่แข็ง

การทดสอบทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol 5% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันจนถึงนาที่ 90 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และไม่แตกต่างกับความเข้มข้นที่ 10%, 15% และ 20% จนถึงนาที่ 30 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Propylene glycol			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	93.33±3.85^{b,2}	93.33±3.85^{b,2}
20	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	91.11±2.22^{b,2}
30	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	91.11±2.22^{b,2}
60	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	93.33±3.85^{b,2}	84.44±2.22^{c,3}	80.00±0.00^{c,4}
90	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	97.77±2.22 ^{ab,1}	80.00±0.00^{cd,2}	77.78±2.22^{c,2}
120	100.00±0.00^{a,1}	99.26±0.74^{a,1}	80.00±3.85^{c,2}	82.22±3.85^{cd,2}	80.00±0.00^{c,2}
150	100.00±0.00^{a,1}	84.44±2.22^{b,2}	82.22±2.22^{cd,23}	77.78±3.85^{d,34}	73.33±3.85^{d,4}
180	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{c,2}	75.55±2.22^{d,23}	71.11±3.85^{e,34}	66.67±0.00^{e,4}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.1.3 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เจือจางด้วย DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น (5-20%) หรือระยะเวลาทดสอบนานขึ้น (0-180 นาที) มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อน้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูงมากกว่า 80% เมื่อเวลาทดสอบผ่านไป 180 นาที (ตารางที่ 3) น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10% ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูงมากกว่า 73% เมื่อเวลาทดสอบผ่านไป 180 นาที ในขณะที่น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% และ 20% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเหลือประมาณ 60% และ 50% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับขุดควบคุมที่สเปิร์มยังเคลื่อนที่ 100% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าหากใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรแทคแทนท์ในทุกความเข้มข้น (5-20%) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ควรเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน DMSO ในระยะเวลาไม่ควรเกิน 30 นาที เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาก่อนการแช่แข็งยังคงมีค่าสูง

การทดสอบทางสถิติ พบว่าที่ความเข้มข้น 5% DMSO เวลาที่ 0, 10, 20 และ 30 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ความเข้มข้น 10% และ 15% ของ DMSO เวลาที่ 0 และ 10 นาทีมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาแตกต่างกับเวลาที่ 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ความเข้มข้น 20% DMSO เวลาที่ 0 นาทีมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร DMSO			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	97.77±2.22 ^{a,1}	95.55±2.22^{ab,1}	88.89±2.22^{b,2}
20	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	93.33±0.00^{b,2}	91.11±2.22^{bc,2}	86.67±0.00^{b,3}
30	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	88.89±2.22^{c,12}	86.67±0.00^{cd,2}	75.55±2.22^{c,3}
60	100.00±0.00^{a,1}	93.33±0.00^{b,2}	86.67±0.00^{c,23}	82.22±2.22^{de,3}	73.33±3.85^{cd,4}
90	100.00±0.00^{a,1}	91.11±2.22^{b,2}	80.00±0.00^{d,3}	75.55±2.22^{ef,34}	71.11±2.22^{cd,4}
120	100.00±0.00^{a,1}	88.67±0.00^{c,2}	77.78±2.22^{d,23}	73.33±3.85^{f,34}	66.67±3.85^{de,4}
150	100.00±0.00^{a,1}	88.67±0.00 ^{c,2}	73.33±0.00 ^{e,3}	68.89±2.22 ^{f,4}	60.00±0.00 ^{e,5}
180	100.00±0.00^{a,1}	84.45±2.22 ^{c,2}	73.33±0.00 ^{e,3}	60.00±3.85 ^{g,4}	50.00±3.33 ^{f,5}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.1.4 Sucrose

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในชุดควบคุมที่นำน้ำเชื้อสดผสมกับสารละลาย Ca-F-HBSS เท่านั้น เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที พบว่าสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่ 100% น้ำเชื้อที่เจือจางใน Sucrose ความเข้มข้น 5-20% เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที พบว่าสเปิร์มยังคงมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่มีค่าสูงกว่า 80% (ตารางที่ 4) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 20% Sucrose มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเหลือประมาณ 57% (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่า การใช้ sucrose เป็นสารไครโอโพรแทคแทนท์ที่ความเข้มข้น 5-20% ควรแช่สเปิร์มไว้ไม่เกิน 90 นาทีก่อนการแช่แข็ง

การทดสอบทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น 5% การใช้ sucrose เวลาที่ 0, 10, 20, 30 และ 60 นาทีมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 90, 120, 150 และ 180 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ความเข้นข้น 10% ของ sucrose เวลาที่ 0, 10, 20 และ 30 นาทีมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ความเข้มข้น 15% ของ sucrose ที่เวลา 0 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ความเข้มข้น 20% ของ sucrose เวลาที่ 0 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แตกต่างกับเวลาที่ 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Sucrose			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	97.78±2.22 ^{a,1}	95.55±2.22^{ab,1}	88.89±2.22^{b,2}
20	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	97.78±2.22 ^{a,1}	91.11±2.22^{abc,2}	86.67±0.00^{bc,2}
30	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	97.78±2.22 ^{a,12}	86.67±6.67^{bc,23}	84.45±2.22^{c,3}
60	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	91.11±2.22^{b,2}	84.44±4.44^{bc,23}	80.00±0.00^{d,3}
90	100.00±0.00^{a,1}	93.33±0.00^{b,2}	88.89±2.22^{bc,23}	84.45±2.22^{bc,34}	80.00±0.00 ^{d,4}
120	100.00±0.00^{a,1}	88.89±2.22^{c,2}	86.67±0.00^{bc,23}	80.00±3.85^{c,34}	73.33±0.00 ^{e,4}
150	100.00±0.00^{a,1}	88.89±2.22 ^{c,2}	84.45±2.22 ^{c,2}	68.89±2.22^{d,3}	66.67±0.00 ^{f,3}
180	100.00±0.00^{a,1}	88.89±2.22 ^{c,2}	84.45±2.22 ^{c,2}	64.45±2.22^{d,3}	56.66±3.33 ^{g,3}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.1.5 Acetamide

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดผสมกับสารละลาย Ca-F-HBSS ในชุดควบคุม พบว่าสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่สูงถึง 100% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที น้ำเชื้อในชุดทดลองที่เจือจางด้วยสารละลาย acetamide ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (5-20%) หรือระยะเวลาทดสอบนานขึ้น (0-180 นาที) มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 20% acetamide มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ต่ำประมาณ 20% (ตารางที่ 5) การใช้ acetamide 5% หรือ 10% แล้วยังคงทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 80% ต้องใช้ระยะเวลาเจือจางที่น้อยกว่า 30 นาทีและ 10 นาทีตามลำดับในขณะที่การใช้ acetamide ความเข้มข้น 15% และ 20% ส่งผลโดยตรงทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 80% ในทุกระยะเวลาที่ทดสอบ (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าการนำ acetamide มาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวควรใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเพียง 5% หรือ 10% เท่านั้น

การทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย acetamide 5% มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันจนถึงนาทีที่ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยที่เวลาที่ 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แตกต่างกันทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่ความเข้มข้น 10% 15% และ 20% เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Acetamide			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	93.33±3.85^{a,2}	80.00±0.00^{a,3}	75.55±2.22^{a,3}
10	100.00±0.00^{a,1}	97.78±2.22^{a,1}	84.45±2.22^{b,2}	73.33±3.85^{b,3}	71.11±2.22^{a,3}
20	100.00±0.00^{a,1}	84.45±2.22^{b,2}	77.78±2.22^{b,3}	60.00±0.00^{c,4}	60.00±0.00^{b,4}
30	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{bc,2}	68.89±2.22^{c,3}	60.00±0.00^{c,4}	53.33±3.85^{c,5}
60	100.00±0.00^{a,1}	73.33±3.85^{cd,2}	66.67±0.00^{c,2}	53.33±3.85^{d,3}	46.67±3.85^{d,3}
90	100.00±0.00^{a,1}	66.67±3.85^{de,2}	57.78±2.22^{d,3}	40.00±0.00^{e,4}	42.22±2.22^{d,4}
120	100.00±0.00^{a,1}	62.22±2.22^{e,2}	51.11±2.22^{d,3}	35.55±2.22^{f,4}	33.33±3.85^{e,4}
150	100.00±0.00^{a,1}	51.11±2.22^{f,2}	37.78±2.22^{e,2}	26.67±3.85^{g,4}	26.67±3.85^{f,4}
180	100.00±0.00^{a,1}	46.66±6.67^{f,2}	28.89±2.22^{f,3}	20.00±0.00^{h,3}	20.00±3.85^{g,3}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.1.6 Formamide

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดผสมกับสารละลาย Ca-F-HBSS ในชุดควบคุม พบว่าสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่สูงถึง 100% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที น้ำเชื้อในชุดทดลองที่เจือจางด้วยสารละลาย formamide ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (5-20%) หรือระยะเวลาทดสอบนานขึ้น (0-180 นาที) มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดย formamide 15% และ 20% ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 10 นาที และทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาทีและ 60 นาทีตามลำดับ (ตารางที่ 6) การใช้ formamide 5% หรือ 10% แล้วยังคงทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 80% ต้องใช้ระยะเวลาเจือจางที่น้อยกว่า 30 นาทีและ 20 นาทีตามลำดับ (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่าการนำ formamide มาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวควรใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเพียง 5% หรือ 10% เท่านั้นและแช่น้ำเชื้อไว้ไม่เกิน 20-30 นาทีก่อนการแช่แข็ง

การทดสอบทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น 5% การใช้ formamide เวลาที่ 0 และ 10 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ความเข้มข้น 10%, 15%, และ 20% ของ formamide เวลาที่ 0 นาทีมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับเวลาที่ 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Formamide			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	97.78±2.22^{a,1}	95.55±2.22^{a,12}	88.89±2.22^{a,12}	86.67±3.85^{a,2}
10	100.00±0.00^{a,1}	93.33±0.00^{ab,2}	86.67±0.00^{b,2}	60.00±3.85^{b,3}	55.55±2.22^{b,3}
20	100.00±0.00^{a,1}	86.67±0.00^{b,2}	77.78±2.22^{c,3}	26.67±3.85^{c,4}	26.67±0.00^{c,4}
30	100.00±0.00^{a,1}	77.78±2.22^{c,2}	51.11±2.22^{d,3}	12.22±2.94^{d,4}	2.22±2.22^{d,5}
60	100.00±0.00^{a,1}	51.11±5.88^{d,2}	22.22±2.22^{e,3}	2.22±2.22^{e,4}	0.00±0.00^{d,4}
90	100.00±0.00^{a,1}	28.89±4.44^{e,2}	2.22±2.22^{f,3}	0.00±0.00^{e,3}	0.00±0.00^{d,3}
120	100.00±0.00^{a,1}	22.22±2.22^{e,2}	0.00±0.00^{f,3}	0.00±0.00^{e,3}	0.00±0.00^{d,3}
150	100.00±0.00^{a,1}	6.67±0.00^{f,2}	0.00±0.00^{f,2}	0.00±0.00^{e,2}	0.00±0.00^{d,2}
180	100.00±0.00^{a,1}	0.00±0.00^{f,2}	0.00±0.00^{f,2}	0.00±0.00^{e,2}	0.00±0.00^{d,2}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.1.7 Methanol

น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย methanol ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น (5-20%) หรือระยะเวลาทดสอบนานขึ้น (0-180 นาที) มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อน้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย methanol ความเข้มข้น 5% ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูงมากกว่า 80% เมื่อเวลาทดสอบไม่เกิน 30 นาที (ตารางที่ 7) น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย methanol ความเข้มข้น 10% ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูงมากกว่า 80% เมื่อเวลาทดสอบต้องไม่เกิน 20 นาทีเท่านั้น ในขณะที่น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย methanol ความเข้มข้น 15% และ 20% เมื่อเวลาทดสอบมากกว่า 20 นาที มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงต่ำกว่า 80% อย่างรวดเร็ว (ตารางที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับขุดควบคุมที่สเปิร์มยังเคลื่อนที่ 100% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที แสดงให้เห็นว่าหากใช้ methanol เป็นสารไครโอโพรแทคแทนท์ในทุกความเข้มข้น (5-20%) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวต้องระวังเลือกใช้เวลาที่เหมาะสมเพื่อป้องกันมิให้สเปิร์มก่อนการแช่แข็งมีค่าต่ำกว่า 80%

การทดสอบทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% การใช้ methanol เวลาที่ 0 นาทีมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับ เวลาที่ 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เวลาที่ 10 นาทีสาร methanol 5% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เวลาที่ 20, 30 และ 60 นาที สาร methanol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกับ 10%, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เวลาที่ 90, 120, และ 150 นาที สาร methanol 5%, 10%, 15% และ 20% มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เวลาที่ 180 นาที สาร methanol 5% และ 10% มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวแตกต่างกับ 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากเจือจางในสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Methanol			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	95.55±2.22^{a,1}	95.55±2.22^{a,1}	93.33±3.85^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	91.11±2.22^{b,2}	86.67±3.85^{b,23}	84.45±2.22^{b,23}	80.00±0.00^{b,3}
20	100.00±0.00^{a,1}	86.67±0.00^{bc,2}	77.78±2.22^{c,3}	73.33±0.00^{c,3}	57.78±2.22^{c,4}
30	100.00±0.00^{a,1}	84.45±2.22^{c,2}	63.33±1.93^{d,3}	64.45±2.22^{d,3}	46.67±0.00^{d,4}
60	100.00±0.00^{a,1}	75.55±2.22^{d,2}	64.45±2.22^{d,3}	57.78±2.22^{e,3}	35.55±2.22^{e,4}
90	100.00±0.00^{a,1}	73.33±0.00^{de,2}	62.22±2.22^{d,3}	48.89±2.22^{f,4}	24.45±2.22^{f,5}
120	100.00±0.00^{a,1}	68.89±2.22^{e,2}	60.00±0.00^{d,3}	44.45±2.22^{fg,4}	22.22±2.22^{f,5}
150	100.00±0.00^{a,1}	62.22±2.22^{f,2}	53.33±0.00^{e,3}	40.00±0.00^{g,4}	20.00±0.00^{f,5}
180	100.00±0.00^{a,1}	55.55±2.22^{g,2}	48.89±2.22^{e,2}	26.67±3.85^{h,3}	4.45±2.22^{g,4}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ

4.2.1 DMSO

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่ผสมในสารละลาย DMSO อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที และที่ความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที แต่สเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย DMSO 5% และ 10% ยังคงมีการเคลื่อนที่ประมาณ 60% เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที (ตารางที่ 8) จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% และ 10% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสาคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 15% และ 20% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ DMSO 5% 10% เวลาที่ใช้ที่ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายกับสารละลาย DMSO มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2.2 Propylene glycol (PG)

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่ผสมในสารละลาย Propylene glycol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที และที่ความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที แต่สเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย PG 5% และ 10% ยังคงมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย PG ทั้ง 4 ความเข้มข้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 9) เวลาที่ใช้ที่ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายกับสารละลาย PG มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2.3 Ethylene glycol (EG)

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่ผสมในสารละลาย Ethylene glycol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ความเข้มข้น 10% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที ที่ความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 40 นาที และที่ความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที แต่สเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย EG 5% ยังคงมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย EG ทั้ง 4 ความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 10) เวลาที่ใช้ที่ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายกับสารละลาย EG มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2.4 Formamide

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่ผสมในสารละลาย Formamide ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มข้น 5%และ 10% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อ เวลาผ่านไป 50 นาที ที่ความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที และที่ความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย formamide ทั้ง 4 ความเข้มข้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่

11) เวลาที่ใช้ที่ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายกับสารละลาย formamide มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.2.5 Sucrose

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่ผสมในสารละลาย Sucrose ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ความเข้มข้น 10% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ที่ ความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที และที่ความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทีแต่สเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย sucrose 5% ยังคงมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ทั้ง 4 ความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 12) เวลาที่ใช้ที่ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายกับสารละลาย sucrose มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.2.6 Dimethylacetamide (DMA)

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายที่ผสมในสารละลาย Dimethylacetamide ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มข้น 5% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที ที่ความเข้มข้น 10% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 40 นาที ที่ความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที และที่ความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 20 นาที จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMA ทั้ง 4 ความเข้มข้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 13) เวลาที่ใช้ที่ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายกับสารละลาย DMA มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร DMSO			
		5%	10%	15%	20%
0	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$80\pm0.00^{a,1}$
10	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$73.33\pm11.56^{b,2}$	$53.33\pm11.56^{b,3}$
20	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$80\pm0.00^{a,1}$	$80\pm0.00^{a,1}$	$40.00\pm0.00^{c,3}$	$33.33\pm11.56^{c,3}$
30	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$66.6\pm11.5^{b,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$40.00\pm0.00^{c,2}$	$20.00\pm0.00^{d,3}$
40	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$33.33\pm11.56^{c,2}$	$13.33\pm11.56^{d,3}$
50	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$20.00\pm0.00^{d,2}$	$0.00\pm0.00^{d,3}$
60	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,2}$	$60.00\pm0.00^{b,2}$	$0.00\pm0.00^{d,4}$	$0.00\pm0.00^{d,4}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Propylene glycol			
		5%	10%	15%	20%
0	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$86.67\pm11.56^{a,1}$	$80\pm0.00^{a,1}$
10	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$80.00\pm0.00^{a,1}$	$80.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,2}$	$60.00\pm0.00^{b,2}$
20	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$80.00\pm0.00^{a,1}$	$80.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,2}$	$53.33\pm11.56^{b,2}$
30	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$40.00\pm0.00^{c,2}$	$26.67\pm11.56^{c,3}$
40	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$46.67\pm11.56^{bc,2}$	$26.67\pm11.56^{cd,3}$	$20.00\pm0.00^{c,3}$
50	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$60.00\pm0.00^{b,1}$	$33.33\pm11.56^{c,2}$	$13.33\pm11.56^{d,3}$	$0.00\pm0.00^{c,3}$
60	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$40.00\pm0.00^{c,1}$	$20.00\pm0.00^{d,2}$	$0.00\pm0.00^{d,2}$	$0.00\pm0.00^{c,2}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Ethylene glycol			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}	80±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	60.00±0.00^{b,1}	46.67±11.56^{b,2}	40.00±0.00^{b,2}	33.33±11.56^{b,2}
20	100.00±0.00^{a,1}	53.33±11.56^{b,1}	40.00±0.00^{b,2}	26.67±11.56^{c,3}	20.00±0.00^{c,3}
30	100.00±0.00^{a,1}	40.00±0.00^{c,1}	26.67±11.56^{c,12}	6.67±6.67^{c,3}	0.00±0.00^{c,3}
40	100.00±0.00^{a,1}	40.00±0.00^{c,1}	20.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{c,2}
50	100.00±0.00^{a,1}	26.67±11.56^{cd,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}
60	100.00±0.00^{a,1}	20.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Formamide			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	93.33±11.56^{a,1}	93.33±11.56^{a,1}	86.67±11.56^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}	53.33±11.56^{b,2}	33.33±11.56^{b,3}	0.00±0.00^{b,4}
20	100.00±0.00^{a,1}	73.33±11.56^{ab,1}	46.67±11.56^{c,2}	26.67±11.56^{c,3}	0.00±0.00^{b,3}
30	100.00±0.00^{a,1}	66.67±11.56^{b,1}	40.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{c,3}	0.00±0.00^{b,3}
40	100.00±0.00^{a,1}	40.00±0.00^{c,1}	20.00±0.00^{d,2}	0.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{b,2}
50	100.00±0.00^{a,1}	0.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{b,1}
60	100.00±0.00^{a,1}	0.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{b,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Sucrose			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	73.33±11.56^{b,2}	53.33±11.56^{b,3}	40.00±0.00^{b,3}
20	100.00±0.00^{a,1}	86.67±11.56^{a,1}	60.00±0.00^{b,2}	40.00±0.00^{c,3}	26.67±11.56^{bc,34}
30	100.00±0.00^{a,1}	66.67±11.56^{b,1}	33.33±11.56^{c,2}	26.67±11.56^{cd,23}	0.00±0.00^{d,4}
40	100.00±0.00^{a,1}	60.00±0.00^{b,1}	20.00±0.00^{d,2}	20.00±0.00^{d,2}	0.00±0.00^{d,3}
50	100.00±0.00^{a,1}	60.00±0.00^{b,1}	6.67±6.67^{d,2}	0.00±0.00^{d,2}	0.00±0.00^{d,2}
60	100.00±0.00^{a,1}	60.00±0.00^{b,1}	0.00±0.00^{d,2}	0.00±0.00^{d,2}	0.00±0.00^{d,2}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย หลังจากเจือจางในสารละลาย Dimethylacetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Equilibration Time (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของสาร Dimethylacetamide			
		5%	10%	15%	20%
0	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}
10	100.00±0.00^{a,1}	80.00±0.00^{a,1}	60.00±0.00^{b,2}	46.67±11.56^{b,3}	20.00±0.00^{c,4}
20	100.00±0.00^{a,1}	60.00±0.00^{b,1}	20.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{c,2}
30	100.00±0.00^{a,1}	40.00±0.00^{c,1}	13.33±11.56^{c,2}	0.00±0.00^{c,2}	0.00±0.00^{c,2}
40	100.00±0.00^{a,1}	26.67±11.56^{cd,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}
50	100.00±0.00^{a,1}	0.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}
60	100.00±0.00^{a,1}	0.00±0.00^{d,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}	0.00±0.00^{c,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาที่ใช้
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างความเข้มข้น

4.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเมื่อทำการแช่แข็งนาน 10 และ 15 นาที ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่เท่ากับ 36.67±4.61% และ 23.33±5.80% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 14) ในทางตรงกันข้ามน้ำเชื้อปลาตะพียนขาวที่แช่แข็งที่ความสูง 6 เซ็นติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมเป็นระยะเวลานาน 10 และ 15 นาที ให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเฉลี่ย 63.41-77.67% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเป็นระยะเวลา 10 และ 15 นาที ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าลดเหลือ 23.67±6.67% และ 33.33±6.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 14) ในขณะที่น้ำเชื้อสดมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ย 100%

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเมื่อทำการแช่แข็งนาน 10 และ 15 นาที ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 43.41% และ 37.48% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่น้ำเชื้อสดปลาสวายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ย 100% (ตารางที่ 15) ในทางตรงกันข้ามน้ำเชื้อปลาสวายที่แช่แข็งที่ความสูง 6 เซ็นติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมเป็นระยะเวลานาน 10 และ 15 นาที มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมากที่สุดเฉลี่ย 67.67-81.27% ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเป็นระยะเวลา 10 และ 15 นาที ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าต่ำอยู่ในช่วง 16.67±6.67% และ 23.67±6.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งด้วยวิธีการต่างๆกัน

วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว	ระยะเวลาการแช่แข็งน้ำเชื้อ	
	10 นาที	15 นาที
1. ใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ	36.67±4.61^{b,1}	23.33±5.80^{b,2}
2. ใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม	77.67±3.21^{a,1}	63.41±8.12^{a,1}
3. ใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม	23.67±6.67^{c,1}	33.33±6.67^{b,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างวิธีการแช่แข็ง

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายหลังการแช่แข็งด้วยวิธีการต่างๆกัน

วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย	ระยะเวลาการแช่แข็งน้ำเชื้อ	
	10 นาที	15 นาที
1. ใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ	43.41±3.51^{b,1}	37.48±3.81^{b,1}
2. ใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม	81.27±5.21^{a,1}	67.67±4.29^{a,2}
3. ใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม	16.67±6.67^{c,1}	23.67±6.67^{b,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างวิธีการแช่แข็ง

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ

การใช้ 10% PG, 10% DMSO และ 10% sucrose ในการเจือจางน้ำเชื้อปลาและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานถึง 180 นาที ยังคงทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่ามากกว่า 70% แสดงให้เห็นว่า 10% PG, 10% DMSO และ 10% sucrose น่าจะมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) แม้ว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกริยาร่วม (interaction) ระหว่างอัตราการลดอุณหภูมิและชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการละลายที่เหมาะสม (Vuthiphandchai et al., 2009a; Irawan et al., 2010) เป็นต้น สาเหตุที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับจะมีไอไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำมากประมาณ -170 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อนำน้ำเชื้อปลาไปแช่แข็งอาจทำให้สเปิร์มได้รับอันตราย (cell injury) จากความแตกต่างของการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไป ดังนั้นการนำน้ำเชื้อปลาให้อยู่ในสภาพสมดุลที่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพร้อมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนการลดอุณหภูมิแช่แข็ง (equilibration time) จะทำให้ความเป็นพิษของสารเคมีลดลง ซึ่งยังจะทำให้น้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับจะมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มาก (cold shock) เมื่อแช่แข็งเหมือนกับการปล่อยให้น้ำเชื้อปลาอยู่ในสภาพสมดุลที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียสก่อนแล้วนำมาแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเพื่อให้การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับให้เหลือเฉพาะปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อ (freezing rate) และอัตราการละลายเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing rate) ในช่วงแรกของการพัฒนางานวิจัย จึงได้เลือกเอาเฉพาะ 10% DMSO มาใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการพัฒนารูปแบบการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เนื่องจากการใช้ 10% DMSO เจือจางน้ำเชื้อปลาชนิดต่างๆแม้ว่าจะปล่อยให้น้ำเชื้อปลาอยู่ในสภาพสมดุลที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียสก่อนการแช่แข็ง ก็ยังทำให้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงประมาณ 80% (Irawan et al., 2010; Vuthiphandchai et al., 2009a; Vuthiphandchai et al., 2014)

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆที่ 4 ความเข้มข้น ที่มีต่อน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีค่าลดลงเมื่อเวลาและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษของน้ำเชื้อปลาหลายๆชนิด เช่น ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii* ; ศิริพร คชรัตน์ และคณะ, 2548) และปลากระพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*; Chomphuthawach et al., 2009a) เป็นต้น

5.2 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ

การใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5-10% ในการเจือจางน้ำเชื้อปลาและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที ยังคงทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสวายมีค่าประมาณ 60% ในขณะที่การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ระดับความเข้มข้น 5-10% พบว่า propylene glycol ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่อยู่ในช่วงประมาณ 20-40% และ ethylene glycol ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ประมาณ 0-20% แต่การใช้ 10% sucrose ทำให้สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ เช่นเดียวกับการใช้ formamide และ dimethylacetamide ที่ระดับความเข้มข้น 5-10% ต่างก็ทำให้สเปิร์มปลาสวายไม่เคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำกลั้น แสดงให้เห็นว่า การใช้ 10% DMSO น่าจะมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) ต่อไป

โดยทั่วไปชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดปลา ซึ่งการประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะทำให้ทราบฐานข้อมูลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา อย่างไรก็ตามสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำ ก็อาจไม่สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้มีการเคลื่อนที่ที่ดีหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะการใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อาจไม่สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ระหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อได้ ทำให้เซลล์สเปิรมได้รับบาดเจ็บ (cell injury) อีกทั้งกระบวนการแช่แข็งยังมีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายขั้นตอนที่จะต้องมีความเหมาะสมถึงจะทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีหลังการละลาย (Tiersch et al., 1994; Viveiros, et al. (2009)

การวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิดส่วนใหญ่พบว่า DMSO เป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลา turbot (Dreanno et al., 1997) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาดุกยุโรป (Linhart et al., 1993) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม DMSO ก็ไม่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด (Mansour et al., 2006) สำหรับ methanol จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Arctic char (Mansour et al., 2006, ปลาดุกเทศ (Viveiros et al., 2000) และ ปลา salmon (Lahnsteiner et al., 1997) เป็นต้น Rideout et al. (2003) ได้รายงานการแช่น้ำเชื้อปลาซีกเดียว (winter flounder) ว่า propylene glycol ให้ผลการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดีกว่าการใช้ DMSO และ glycerol อย่างไรก็ตาม sucrose มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด เช่นปลาสลิด (Abinawanto et al., 2012) นอกจากนี้ Tiersch et al. (1994) ได้นำน้ำเชื้อปลา channel catfish มาแช่แข็งโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างๆชนิดกันร่วมกับการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Hank's balanced salt solution (HBSS) พบว่า methanol ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยสเปิร์มหลังการแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด

5.3 ประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดดูดซับ การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และการใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวายด้วยการใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ (liquid nitrogen dry shipper) นาน 10 และ 15 นาที หลังการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าต่ำกว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการแช่แข็งอย่างง่ายๆด้วยการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาเบื้องต้นในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะพียนขาวและปลาสวายภายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับสามารถทำได้แม้ว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายด้วยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนชนิดมีวัสดุดูดซับมีค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มาก อย่างไรก็ตามการศึกษาในด้านที่เกี่ยวกับผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากการพัฒนาวิธีการแช่แข็งในรูปแบบต่างๆที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลา ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อยอดเพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ ซึ่งมีความจำเป็นต้องพัฒนาศักยภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในแต่ละครั้งของการแช่แข็งให้สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ได้ปริมาณมากขึ้นในภาชนะที่บรรจุ เพราะการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง มีความจำเป็นต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณมากสำหรับผสมเทียมกับไข่ เพื่อทำให้การบริหารและการจัดการระหว่างการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทำได้สะดวกขึ้น (Basavaraja and Hegde, 2004; Lanhsteiner et al., 1997)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับสามารถทำได้โดยนำเอาน้ำเชื้อมาแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และนำไปแช่แข็งในchamber ของถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับนาน 10-15 นาที ซึ่งเมื่อนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาทั้งสองชนิดมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ในช่วงประมาณ 20-40% เปรียบเทียบกับสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 100% ในน้ำเชื้อสด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับการนำมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแทนที่การใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติที่มีราคาสูงแม้ว่าสเปิร์มหลังการละลายของการศึกษาในครั้งนี้ยังมีค่าต่ำ แต่ก็น่าจะสามารถพัฒนารูปแบบการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีขึ้นด้วยการใช้ฉนวนมาหุ้มรอบหลอดฟางเพื่อควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิให้เหมาะสม เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้หลอดฟางที่มีน้ำเชื้ออยู่ภายในถูกลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -170 องศาเซลเซียสในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ ซึ่งสเปิร์มอาจไม่ปรับตัวต่อการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายยังคงมีค่าต่ำ อย่างไรก็ตามการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ได้ปริมาณที่มากขึ้นในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องเพื่อให้สามารถนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งสามารถนำมาใช้ผสมเทียมกับไข่ปลาให้มีคุณภาพดีไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับยังไม่มีรายงานการศึกษาในประเทศไทย แต่ในต่างประเทศได้มีผลการศึกษาในปลาหลายชนิดเช่น

Velasco-Santamaría et al. (2006) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา yamú (*Brycon amazonicus*) โดยศึกษาผลของขนาดหลอดฟาง และอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยการใช้ถัง

ไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ โดยนำน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์กลูโคส ไข่แดง และ DMSO ทำการบรรจุน้ำเชื้อใส่ในหลอดฟางขนาดต่างๆกัน (0.5, 1.8, 2.5 and 4.0 มิลลิลิตร) ทำการแช่แข็งใน chamber ของถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 หรือ 80 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พบว่าในหลอดฟางทุกชุดการทดลอง สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายสามารถปฏิสนธิไข่ได้แม้ว่าจะมีค่าอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด

Viveiros, et al. (2009) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา curimba (*Prochilodus lineatus*) ในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ โดยใช้สารละลาย 8 ชนิด (factorial design) ที่ประกอบด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 2 ชนิด (DMSO และ methylene glycol) และสารละลายบัฟเฟอร์ 4 ชนิด (0.9% NaCl, 5% glucose, BTSTM และ M IIITM) ในการเจือจางน้ำเชื้อสด บรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ แล้วนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว จึงนำมาละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยสารละลายต่างๆกัน (น้ำกลั่น, 0.15% NaCl, 0.29% NaCl หรือ 1% NaHCO3) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลา curimba ในหลอดฟาง 0.5 มิลลิลิตรที่แช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับเฉพาะในชุดการทดลองที่เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสารละลายกลูโคสที่มี methylglycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงเฉลี่ย 86-95% และยังสามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ระหว่าง 47-83%

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและสวายในกล่องโฟมด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้สาร Ca-F HBSS เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เมื่อวางหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อปลาไว้เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร 10-15 นาทีแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสก่อนการนำมาละลาย ต่างก็มีผลทำให้น้ำเชื้อปลาทั้งสองชนิดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงหลังการละลายอยู่ในเกณฑ์ที่ดี แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งที่ระยะเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร โดยใช้ DMSO เป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาหลายๆ ชนิดที่พบว่า DMSO ให้ผลที่ดีในการนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เช่น ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*; Vuthiphandchai et al., 2014) และปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*; Vuthiphandchai et al., 2009a) เป็นต้น

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวายในกล่องโฟมด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยใช้สาร Ca-F HBSS เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ วางหลอดไว้บนน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 10-15 นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาทั้งสองชนิดมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับหลอดฟางเมื่อสัมผัสกับผิวหน้าน้ำแข็งแห้งที่มีอุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส อาจมีผลทำให้น้ำเชื้อถูกลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไป ซึ่งการนำฉนวนมาใช้ในการหุ้มหลอดฟางก่อนแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งน่าจะทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีคุณภาพดีขึ้น การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆที่พบว่าน้ำแข็งแห้งก็สามารถนำมาใช้เพื่อลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อปลาและได้ผลดีมีในปลาหลายชนิด เช่น

ปลา loach (*Misgurnus anguillicaudatus*; Yasui et al. (2008) และปลาม้าลาย (Carmichael et al., 2009) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ประสบผลสำเร็จ มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่ดี ยังมีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรจำนวนมากเริ่มตั้งแต่ คุณภาพสเปิร์มนำมาใช้ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม รวมทั้งอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่เหมาะสม รวมทั้งปฏิกริยาร่วม (interaction) ระหว่างชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการแช่แข็ง หรือปฏิกริยาร่วม (interaction) ระหว่างชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็ง (Velasco-Santamaría et al., 2006) เป็นต้น ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ประสบผลสำเร็จอาจสามารถเลือกใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ได้มากกว่า 1 ตัว (Vuthiphandchai et al., 2009a; Muchlisin et al., 2004; Tiersch et al., 2004) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ประสบผลสำเร็จทั้งแบบแช่แข็งด้วยการใช้ถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ การใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม การใช้น้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม หรือการแช่แข็งด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ได้มีรายงานการศึกษาในปลาเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น

Ji et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) โดยใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรแทคแทนท์ที่ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% โดยนำไปลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลว โดยวางไว้สูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2, 6 และ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที ก่อนการนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าการใช้สารละลาย DMSO 10% ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงที่สุดประมาณ 73% รองลงมาคือที่ระดับความสูง 13 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 48% และที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำสุดประมาณ 42%

Vuthiphandchai et al. (2009a) พัฒนาวิธีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยการใช้สาร cryoprotectants 10 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้น โดยลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 รูปแบบมาที่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน (final temperatures) ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ พบว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่อยู่ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรหลังจากอยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration time) ใน DMSO 10% นาน 10 นาทีเมื่อลดอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -80 องศาเซลเซียสแล้วใส่ในไนโตรเจนเหลวจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย และการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย มีค่าสูงสุด (>90%)

Irawan et al. (2010) ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์และวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 6 ชนิด และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนเก็บในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าน้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางด้วย common carp sperm extender (CCSE2) และ DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม โดยนำน้ำเชื้อปลาไนมาแช่แข็งที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร นาน 10 นาทีมีผลทำให้สเปิร์มปลาไนยังคงมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 90% หลังการละลาย

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้นำน้ำเชื้อปลาที่ได้แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเท่านั้น ซึ่งการเลือกใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ก็มีรายงานถึงผลของอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลายในปลาหลายชนิดเช่น

Yavas and Bozkurt (2011) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20, 30 วินาที ปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลายเมื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที

Bolla et al. (1987) ทำการประเมินผลของอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา Atlantic halibut ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็งมีค่าอยู่ในอัตราที่มีค่าช่วงกว้างตั้งแต่ 10-40 องศาเซลเซียส/นาที

สรุปผลการทดลอง

1. ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวและปลาสวายเมื่อนำมาทดสอบที่ 4 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่น้ำเชื้อสัมผัสกับสารไครโอโพรเทคแทนท์

2. DMSO 10% มีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทน์ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวาย

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียวขาวและปลาสวายในถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับทำโดยนำน้ำเชื้อปลามาเจือจางใน Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน chamber ของถังไนโตรเจนเหลวชนิดมีวัสดุดูดซับ นาน 10 นาทีและทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 70 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 5 วินาที จะได้สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ดีหลังการละลาย

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. กรุงเทพ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กฤษณ์ มงคลปัญญา และนิศา ไชยรักษ์. 2539. สารไครโอโพรเทคแทนท์กับความเป็นพิษต่ออสุจิปลาดุกอุย. วารสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 หน้า 339-345.

นลินี มารคแมน, กฤษณ์ มงคลปัญญา, อุทัยรัตน์ ณ นคร, และ ประวิทย์ สุรนีรนาถ. 2526. ความล้มเหลวในการพยายามเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2551. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) อย่างง่าย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. กรุงเทพฯ. หน้า 236-242.

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. ปทุมธานี: สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.

เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ , ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และ กฤษณ์ มงคลปัญญา . 2536. การเพาะขยายพันธุ์ปลาบึก. วารสารการประมง 46(5) : 399-415

ศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2548. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แบบแช่แข็ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. กรุงเทพฯ. หน้า 82-89.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2535. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 194 หน้า.

Abinawanto, A., Nurman, K. and Lestari, R. 2012. The effect if sucrose on sperm quality of *Osphronemus goramy* two days post-crypreservation. International Journal of Aquatic Science. 3(1): 23-28.

Ashwood-Smith M.J. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology* (ed. by M.J. Ashwood-Smith & J. Farrant), pp.19-44. Pitman Medical, Tunbridge Wells, UK.

Basavaraja, N. and Hegde, S.N. 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. Cryobiology 49: 149-156.

Bolla, S., Holmeljord, I. And Refstie, T. 1987. Cryologic preservation of Atlantic salmon sperm. Aquaculture 65:371-374.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016a. Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. Animal Reproduction Science 166: 36-46.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016b. Morphological and morphometric evaluation of silver barb, *Barbodes*

gonionotus (Bleeker, 1849) sperm supplemented with antibiotics. Journal of Applied Ichthyology 32: 480-485.

Büyükhatipoglu, S. and Holtz, W. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)-Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. Aquaculture 37: 63-71.

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-Paramo, S., Robles, V., Beirao, J., Perez-Cerezales, S. and Herraez, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology 26:623-635.

Carmichael, C., Westerfield, M. and Varga, Z.M. 2009. Cryopreservation and in vitro fertilization at the Zebrafish International Resource Center. Methods in Molecular Biology 546: 45–65. doi:10.1007/978-1-60327-977-2_4.

Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 143: 319-329.

Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. and Billard, R. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. Theriogenology 48: 589-603.

Fabbrocini, A., Lavendera, S.L., Rispoli, S. and Sansone, G. 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology 40: 46-53.

Gwo, J.H., Strawn, K., Longnecker, M.T. and Arnold, C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94: 355-375.

He, S. and Woods III, L.C. 2003. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. Cryobiology 46: 17-25.

Horváth, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research 31: 317-324.

Irawan H., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Animal Reproduction science 122: 236-243.

Jackson, L.F. and Sullivan, C.V. 1995. Reproduction of white perch: The annual gametogenic cycle. Transactions of the American Fisheries Society 124: 563-577.

Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang, S.C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. Aquaculture 241:517-528.

Lahnsteiner, F., Weismann, T. And Patzner RA. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquacult Res. 28:471-479.

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

Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology 41: 241-250.

Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. Aquaculture Research 37: 862-868.

Martínez-Páramo, S., Horváth, A., Labbe, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Ada, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R. and Cabrita, E. 2017. Cryobanking of aquatic species. Aquaculture 472: 156-177.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of mekhong giant catfish sperm. Asian Fisheries Science8: 211-221.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology 107: 95-103.

Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa: the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. Theriogenology 62: 25-34.

Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y. and Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture 153: 301-313.

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

Nahiduzzaman, M., Hassan, M.M., Khanam, U.H., Mamuna, S.N.A., Hossain, M.A.R. and Tiersch, T.R. 2011. Sperm cryopreservation of the critically endangered olive barb (Sarpunti) *Puntius sarana* (Hasemenon, 1822). Cryobiology 62, 62-67.

Nahiduzzamana, M., Hassan, M.M., Roy, P.K., Hossain, M.A., Hossain M.A.R. and Tiersch, T.R. 2012. Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. Animal Reproduction Science 136: 133-138.

Orfao, L.H., Nascimento, A.F., Correa, F.M., Cosson, J. and Viveiros, A.T.M. 2011. Extender composition, osmolarity and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* 311, 241-247.

Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture 76: 335-345.

Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. Aquaculture Research 34: 653-659.

Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A.L., Occidente, M. and Matassino, D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology 44: 229-239.

Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. Journal of Fish Biology 17: 707-739.

Shangguan, B. and Crim, L.W. 1995. The effect of stripping frequency on sperm quantity and quality in winter flounder (*Pleuronectus americanus* Walbaum). In: Proceeding of the fifth international symposium on the reproductive physiology of fish. Edited by F.W. Goetz and P. Thomas. Texas, U.S.A. pp. 142.

Suquet, M., Omnes, M.H., Normant, Y. and Fauvel, C. 1992. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophtalmus maximus* L. Aquaculture and Fisheries Management 23: 217-225.

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

Tiersch, T.R. 2000. Introduction. In: Cryopreservation in Aquatic Species (ed. by T.R. Tiersch and P.M. Mazik), pp. xix–xxvi. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Tiersch, T.R., Goudie, C.A. and Carmichael, G.I. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. Transactions of the American Fisheries Society 123: 580-586.

Velasco-Santamaría, Y.M., Medina-Robles, V.M. and Cruz-Casallas, P.E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture 256: 264-271.

Viveiros, A.T.M., So, N. and Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryopreservation, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. Theriogenology 54:1395-1408.

Viveiros, A.T.M., Orfao, L.H., Maria, A.N. and Allaman, I.B. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* Characiformes) semen. Animal Reproduction Science 112: 293-300.

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., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009a. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 72(1):129-138.

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

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2014. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. Aquaculture Research, 2014, 1–9 doi:10.1111/are.12396.

Yasui, G.S., Arias-Rodriguez, L., Fujimoto, T. and Arai, K. 2008. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. CryoLetters 29 (5): 383-390.

Yavas, I. and Bozkurt, Y. 2011. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. Biotechnology and Biotechnological Equipment. doi:10.5504/ BBEQ.2011.0018.

Zohar, Y., Billard, R. and Weil, C. 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrux*): Connaissance du cycle sexuel et control de la gamétogenèse et de la ponte. In: L'Aquaculture du Bar et des Sparidés. Edited by G. Barnabé and R. Billard. INRA publications, Paris, pp. 3-24.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. ภาวิณี ช่วยนุกูล, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2560. การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม หน้า BI352-BI358.

.

2. การจดสิทธิบัตร

-

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

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-