คุณภาพน้ำเชื้อปลาสวายที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้ง

Sperm Quality of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) milt cryopreserved with liquid nitrogen vapor and dry ice

ภาวิณี ช่วยนุกูล[1], สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2], วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[3]

Pavinee Chuynukoon[1], Subuntith Nimrat[2], Verapong Vuthiphandchai[3]

Received: 25 February 2019; Revised: 26 April 2019; Accepted: 24 May 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย *(Pangasianodon hypophthalmus)* ด้วยไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้ง ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 1 เจือจางน้ำเชื้อปลาสวายในสารละลาย calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ที่ปริมาตร 1:3 และผสมด้วย 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) วางเหนือผิวไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร จากผิวหน้าไนโตรเจนเหลว พบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อปลาสวายที่วางไว้เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 วัน น้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ดีที่สุด 76.6±8.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ระยะเวลา 120 วัน น้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 75.5±3.8 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่ 2 แช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยน้ำแข็งแห้งโดยใช้วัสดุห่อหุ้มและไม่ห่อหุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อ พบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ไม่ห่อหุ้มวัสดุวางไว้บนน้ำแข็งแห้ง 20 นาที ทำการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 2 วัน น้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีที่สุด 60.0±0.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ระยะเวลา 120 วันน้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 26.6±6.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งกับไอไนโตรเจนเหลว แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาสวายที่ลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว และวิธีที่แช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยไอไนโตรเจนเหลวคือวิธีที่ดีที่สุด

คำสำคัญ : ปลาสวาย น้ำแข็งแห้ง แช่แข็ง น้ำเชื้อปลา สารไครโอโพรเทคแทนท์

Abstract

The objective of this study was to develop a protocol for cryopreservation of *Pangasianodon hypophthalmus* milt based on using liquid nitrogen vapor and dry ice. The experiments were divided into two parts. In the first experiment; milt was diluted 1:3 in calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and sperm solution were kept in straw tubes and allowed to freezeat 2, 4 and 6 cm above the surface of liquid nitrogen (LN_2) vapor then cryostored in liquid nitrogen (-196 °C) for 2 days. Highest post-thawed sperm motilities after freezing with LN_2 vapor were observed at 6 cm above LN_2 with the average values of 76.6±8.2%. In the second experiment, milt was diluted the same as the experiment 1. But under 2 subset conditions with and without insulator

[1] *นิสิตปริญญาโท ภาควิชาวาริชศาสตร์,* [3]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์,* [2]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131*

[1,3]*Dept. of Aquatic Science, Faculty of Science,* [2]*Dept. of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131*

Corresponding author; Verapong Vuthiphandchai, Dept. of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131 Thailand. verapong@buu.ac.th

wrapping, were assigned to storage containers. Highest post-thawed sperm motilities (60.0±0.0%) after freezing with dry ice and cryostorage for 2 days were found in the treatment without wrapping with insulator materials. After cryostorage in liquid nitrogen for 120 days, sperm frozen with dry ice had average motility of 26.6±6.7%. Sperm frozen with dry ice after cryostorage showed a significantly lower percentage of post-thawed sperm motility compared to LN_2 vapor. The method of freezing with LN_2 vapor is supposed to be the best method.

Keywords: *Pangasianodon hypophthalmus*, striped catfish, dry ice, cryopreservation, cryoprotectant,

บทนำ

ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พบมากในแม่น้ำเจ้าพระยา ท่าจีน และแม่น้ำโขง จัดเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี และเนื้อปลามีปริมาณมาก สามารถนำไปบริโภคได้ทั้งปลาสดและแปรรูป เช่น ปลาร้า ปลาแห้งรมควัน และเนื้อปลาสวายแช่แข็งยังเป็นที่นิยมในแถบยุโรป ปลาสวายจัดเป็นปลาที่นิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย โดยส่วนมากชาวประมงจะนิยมเลี้ยงปลาสวายในบ่อหรือกระชัง ปลาสวายจะไม่ผสมพันธุ์วางไข่ในบ่อหรือกระชังที่เลี้ยง[8] ปลาสวายเป็นปลาที่ผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล แต่บางครั้งพ่อพันธุ์ไม่มีน้ำเชื้อโดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ จึงต้องใช้วิธีฉีดฮอร์โมนผสมเทียมแม่พันธุ์ปลา[10] ในการผสมเทียมต้องผสมไข่และน้ำเชื้อทันที ไม่สามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะจะทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อลดลง ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์ เพื่อช่วยให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่มีคุณภาพเอาไว้และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะพันธุ์ได้ภายหลัง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง เป็นวิธีการเก็บในระยะยาวโดยนำน้ำเชื้อไปแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งใช้วิธีการนำน้ำเชื้อปลามาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์และใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่จะป้องกันไม่ให้เซลล์เสียหายระหว่างแช่แข็งบรรจุน้ำเชื้อในหลอดสำหรับแช่แข็ง จากนั้นลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม หลังจากนั้นก็นำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว-196 °C ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานเป็นปี[9] โดยทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสามารถทำได้ 2 แบบ คือการแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Controlled – rate Programmable Freezer) และการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว (Liliquid Nitrogen Vapor) ในกล่องโฟม การใช้เครื่องมืออัตโนมัติหรือใช้ไอไนโตรเจนเหลวต่างก็ใช้ไนโตรเจนเหลว เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อให้ลดอุณหภูมิต่ำลงจนแข็งตัว แต่ในบางพื้นที่ไม่สามารถหาไนโตรเจนเหลวมาใช้ในการแช่แข็งได้ จึงควรพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเทคนิคที่ใช้แหล่งความเย็นในการลดอุณหภูมิที่หาได้ทั่วไป ด้วยเหตุที่น้ำแข็งแห้งซึ่งมีความเย็นจัด มีอุณหภูมิคงที่ (-79 °C) สามารถจัดหาได้ในทุกพื้นที่ และราคาไม่แพง จึงควรพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและประหยัดเหมาะสมสำหรับเกษตรกรที่มีต้นทุนต่ำ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาเกี่ยวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยไอไนโตรเจนเหลว เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะพันธุ์ในภายหลังต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมต่อน้ำเชื้อปลาสวาย
2. เปรียบเทียบประสิทธิผลของน้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลายที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวกับน้ำแข็งแห้ง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ 1 ศึกษาการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยไนโตรเจนเหลว และ 2 ศึกษาการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยน้ำแข็งแห้ง

ดำเนินการทดลองที่โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2560 ถึงเดือนมกราคม 2561 โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์มีกระดูกสันหลัง มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่การรับรอง 42/2559

วิธีการศึกษา

1. รวบรวมน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาสวายที่มีอายุประมาณ 1.5-2 ปี น้ำหนักประมาณ 2-4 กิโลกรัม จำนวน 20 ตัว จากฟาร์มปลาเอกชนในจังหวัดอยุธยา นำมาพักเพื่อทดลองที่โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อน้ำเชื้อสดก่อนเริ่มการทดลอง ด้วยการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม คือ น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

เท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% โดยหยดน้ำเชื้อสด 1 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ แล้วใช้น้ำสะอาด หยดลงไป 50 ไมโครลิตร แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 นาที[12]

2. การเตรียมสารละลาย

สารละลายมี 2 ชนิดคือ สารบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนต์

ก) สารบัฟเฟอร์ คือ Calcium Free Hank's balanced salt solution

(Ca-F HBSS) ประกอบด้วย NaCl 0.8890 g, KCl 0.0440 g, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0130 g, $NaHCO_3$ 0.0390 g, KH_2PO_4 0.0070 g, $MgSO_4$ 0.0220 g และ Glucose 0.1110 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml และปรับ pH 7.6[13]

ข) สารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

3. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว นำน้ำเชื้อปลาสวายเจือจางใน Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ในอัตราส่วน 1:3 ผสมกับ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% ดูดน้ำเชื้อที่ผสมเข้ากันกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ใส่หลอดฟาง ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ในปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร วางไว้ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลาย (equilibration) 10 นาที แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปทำการลดอุณหภูมิในกล่องโฟมขนาด 22x33.5x27 บรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 3 เซนติเมตรลงไปในกล่องโฟม แล้ววางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยทุกชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ระยะเวลาแช่แข็งนาน 10 และ 20 นาที ปิดฝากล่องโฟมให้สนิท เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วจึงเขี่ยหลอดฟาง ลงไปในไนโตรเจนเหลวที่อยู่ในกล่อง[12] นำหลอดที่มีน้ำเชื้อปลาสวายที่ทำการแช่แข็งเสร็จแล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) ระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายโดยการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 6 วินาที นำผลของวิธีที่น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีที่สุดมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย แล้วนำมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 30 วัน 60 วัน 90 วัน และ 120 วัน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยน้ำแข็งแห้ง นำน้ำเชื้อปลาสวายเจือจางใน Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ในอัตราส่วน 1:3 ผสมกับ ผสมกับ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% ดูดน้ำเชื้อที่ผสมเข้ากันกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ใส่หลอดฟาง ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ในปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร วางไว้ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลาย (equilibration) 10 นาที แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปทำการลดอุณหภูมิในกล่องโฟมขนาด 22x33.5x27 บรรจุน้ำแข็งแห้งบดหยาบครึ่งกล่อง โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ

1 วางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไว้บนน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 10 และ 20 นาที

2 วางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไว้ใต้น้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 10 และ 20 นาที

3 หุ้มหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อด้วยสายไฟ วางไว้บนน้ำแข็งแห้ง 10 และ 20 นาที

4 หุ้มหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อด้วยสายไฟ วางไว้ใต้น้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 10 และ 20 นาที โดยทุกชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ[13] นำหลอดที่มีน้ำเชื้อปลาสวายที่ทำการแช่แข็งเสร็จแล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ระยะเวลา 2 วัน แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการทำละลายโดยการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิละลาย 40 °C เป็นเวลา 6 วินาที นำวิธีการแช่แข็งที่ให้ผลน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีที่สุดมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย โดยนำมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 30 วัน 60 วัน 90 วัน และ 120 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1 ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองด้วยวิธีของ Turkey's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ MINITAB Version 17 2017

2 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน One-Way ANOVA

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยไนโตรเจนเหลว

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด (freshly collected milt) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% และจากการทดลองวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อปลาสวายเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 เซนติเมตรเป็นเวลา 10 และ 20 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาใน

ถังไนโตรเจนเหลว -196 °C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อวางที่ความสูงเหนือผิวไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที และ 20 นาที สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเฉลี่ย 76.6±8.2 และ 63.3±10.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการทดลองชุดอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนที่เฉลี่ยระหว่าง 40-53.3 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) เมื่อนำเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว -196 °C เป็นเวลา 120 วัน พบว่าตั้งแต่วันที่ 1 สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย 93.3±3.8 เปอร์เซ็นต์ และวันที่ 30, 60, 90 และ 120 สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย80.0±0.0, 77.7±3.8, 80.0±0.0, 75.5±3.8 ตามลำดับ (Figure 3)

2. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยน้ำแข็งแห้ง

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด (freshly collected milt) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% และจากการทดลอง นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อปลาสวายมาลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำแข็งแห้งโดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ 1. วางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไว้บนน้ำแข็งแห้ง 2. วางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไว้ใต้น้ำแข็งแห้ง 3. หุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อด้วยสายไฟและนำไปวางไว้บนน้ำแข็งแห้ง 4. หุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อด้วยสายไฟและนำไปวางไว้ใต้น้ำแข็งแห้ง ในทั้ง 4 ชุดการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นเวลา 10 และ 20 นาที นำไปเก็บรักษาในถัง

ไนโตรเจนเหลว -196 °C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่วางบนน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 20 นาที สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเฉลี่ย 60.0±0.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับการทดลองชุดอื่นๆ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 43.3-46.6 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) เมื่อนำเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว -196 °C เป็นเวลา 120 วัน พบว่าตั้งแต่วันที่ 1 สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย 80.0±0.0 เปอร์เซ็นต์ และวันที่ 30, 60, 90 และ 120 สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย 68.8±10.2, 62.2±3.8, 55.5±3.8, 26.6±6.7 ตามลำดับ (Figure 3)

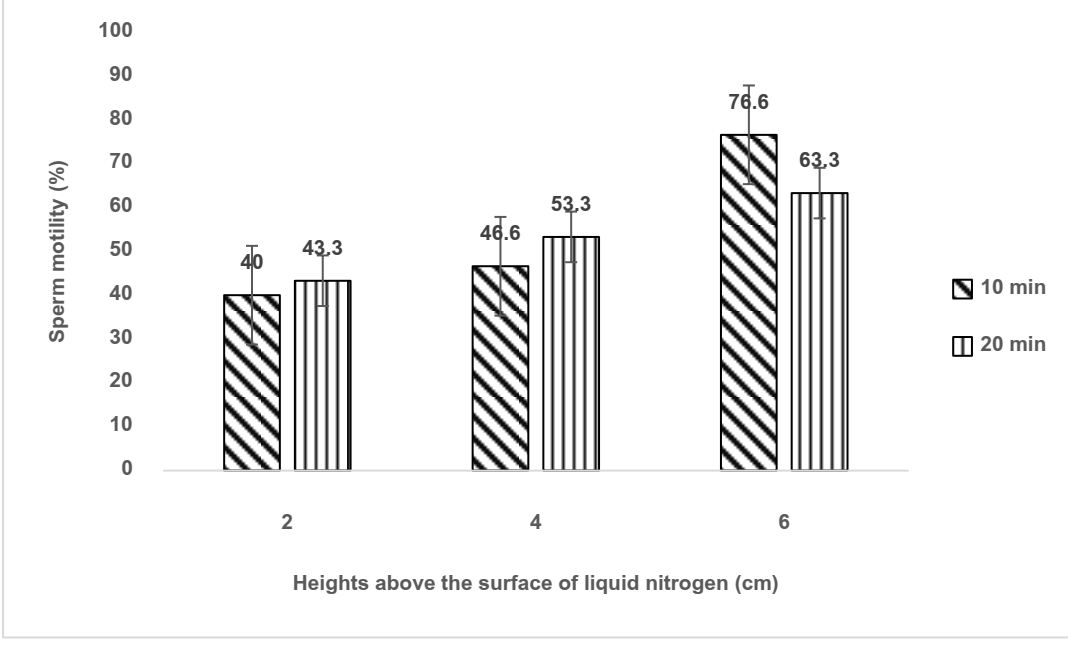

Figure 1 Post-thawed sperm motility (%) of *Pangasianodon hypophthalmus* frozen at 2, 4 and 6 cm above the surface of liquid nitrogen for 10 and 20 minutes.

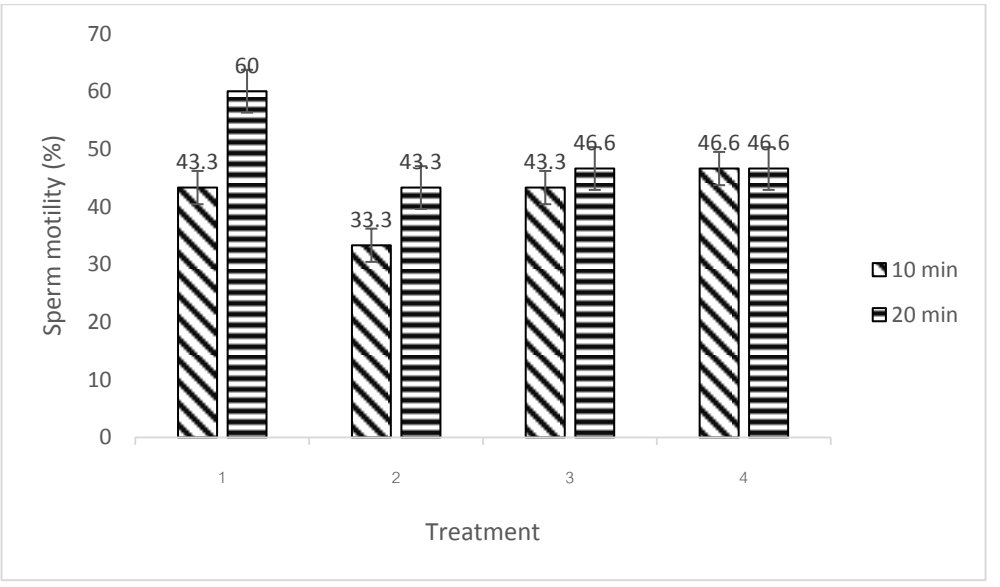

Figure 2 Post-thawed sperm motility (%) of *Pangasianodon hypophthalmus* frozen with dry ice for 10 and 20 minutes.
* Treatment 1 Put the straw on dry ice, Treatment 2 Put the straw beneath dry ice, Treatment 3 Put wrapped straw on dry ice, Treatment 4 Put wrapped straw beneath dry ice

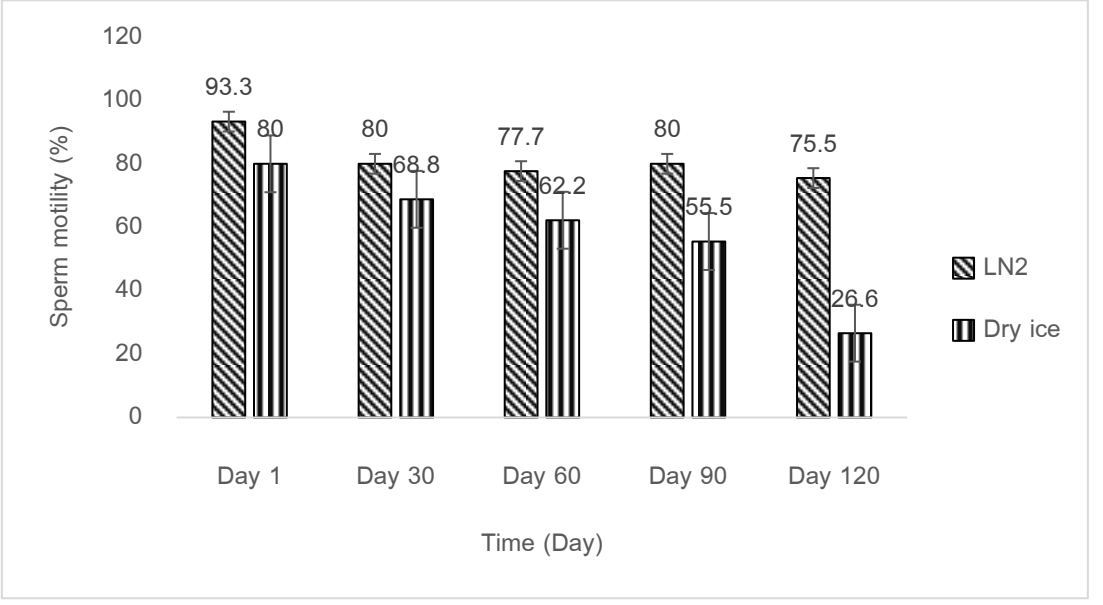

Figure 3 Effect of storage period (day) on post-thawed sperm motility of *Pangasianodon hypophthalmus* frozen by the use of liquid nitrogen vapor and dry ice

วิจารณ์และสรุปผล

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว โดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 เซนติมตร ภายในกล่องโฟมเป็นเวลา 10 และ 20 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว -196 °C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แตกต่างกันตามระยะห่างที่อยู่เหนือผิวหน้าไนโจรเจนเหลว เนื่องจากระยะเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ต่างกัน จะมีอุณหภูมิที่สัมผัสกับหลอดบรรจุน้ำเชื้อแต่ละระดับไม่เท่ากัน โดยที่ระดับ 2 และ 4 เซนติเมตร มีอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ที่ระดับ 6 เซนติเมตร น้ำเชื้อในหลอดจึงมีการแข็งตัวเร็วเกินไป และการที่น้ำเชื้อแข็งตัวเร็วเกินไปจะก่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์ทำให้

เซลล์เกิดอันตราย[2] และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปประเมินคุณภาพหลังการละลายจึงทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าต่ำ ส่วนระยะเวลาในการลดอุณหภูมิ จะมีผลทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์สู่ภายนอกเซลล์แตกต่างกัน โดยถ้าใช้ระยะเวลาแช่แข็งที่เหมาะสมจะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์สู่ภายนอกน้อยลง จะคงความสมบูรณ์ของเซลล์ไว้ อย่างไรก็ตามการแช่แข็งจะมีระยะเวลาสมดุล (Equilibration Time) และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์[2] ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาเรื่องการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวของน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลาดุกอุย[12] ปลาในตระกูลปลาลิ้นหมา[1] ปลาไน[5] เมื่อนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วัน พบว่าน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งหลังการละลายของวันที่ 1 และวันที่ 120 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วยไอไนโตรเจนเหลวมีผลทำให้สเปิร์มหลังการละลาย ยังคงมีคุณภาพดี แม้ว่าจะเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 120 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเรื่องการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลาย ๆชนิด เช่น ปลาตะเพียนขาว[11] ปลาบึก[7]

จากการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในกล่องโฟมด้วยน้ำแข็งแห้ง โดย แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ 1. วางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไว้บนน้ำแข็งแห้ง 2. วางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไว้ใต้น้ำแข็งแห้ง 3. หุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อด้วยสายไฟแล้วนำไปวางไว้บนน้ำแข็งแห้ง 4. หุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อด้วยสายไฟแล้วนำไปวางไว้ใต้น้ำแข็งแห้ง ภายในกล่องโฟมเป็นเวลา 10 และ 20 นาที เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว -196 °C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แตกต่างกันตามชุดการทดลอง และระยะเวลาในการลดอุณหภูมิ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาเรื่องการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งของน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลาตะเพียนขาว[13] ปลาม้าลาย[4] เมื่อนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นเวลา 120 วัน พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ช่วงเวลา 30 และ 60 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงหลังการละลาย แต่เมื่อระยะเวลาเก็บรักษาผ่านไป 90 และ120 วัน น้ำเชื้อปลาสวายมีการเคลื่อนที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวายที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำแข็งแห้งมีอุณหภูมิสูงกว่าไนโตรเจนเหลว น้ำเชื้อปลาสวายที่ลดอุณหภูมิด้วยน้ำแข็งแห้งแล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวทันที จะมีอุณหภูมิที่ต่างกันซึ่งอาจจะส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย ซึ่งสอดคล้องกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวในการทดลองนี้ที่คุณภาพสเปิร์มลดลง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น ปลาม้าลาย[3] ปลากด[6] เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

หลอดบรรจุน้ำเชื้อ ที่วางไว้เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที แล้วเก็บรักษาในถังไนโจรเจนเหลว เป็นเวลา 2 วัน น้ำเชื้อหลังการละลายสเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด และหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ที่วางไว้บนน้ำแข็งแห้ง 20 นาที ที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจน เป็นเวลา 2 วัน น้ำเชื้อหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด เมื่อนำไปเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 120 วัน น้ำเชื้อปลาสวายที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว แต่น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งก็ยังมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หลังการละลายที่ค่อนข้างสูงในระยะแรก ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ง่าย และไม่ซับซ้อน ใช้เวลาไม่นาน ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือภาชนะจำเพาะเหมือนไนโตรเจนเหลว อีกทั้งน้ำแข็งแห้งยังหาได้ง่าย และราคาไม่แพง เหมาะสำหรับหน่วยงานหรือเกษตรกรที่ต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งในระยะเวลาหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ของมหาวิทยาลัยบูรพา (grant no. 37/2561)

เอกสารอ้างอิง

1. Chereguini, O., De la Banda, I. G., Herrera, M., Martinez, C., & De la Hera, M. Cryopreservation of tubot Scophthalmus maximus (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Aquacult. Res., 34, 2003. 739-747
2. Denniston, R.S., Michelet, S., & Godke, R.A. Principle of cryopreservation. In Cryopreservation in Aquatic Species, Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editor. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lusiana, 2000. 56-74.
3. Draper, B. W., Stout, J., Hernandez, R., & Moens, C.. A High- throughput sperm freezing protocol for zebra fish cryopreservation. Journal Visualized Experiments, 29, 2009. 1395

4. Harvey, B., Kelley, R. N., & Ashwood-Smith, M. J. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. CAN. J ZOOL, 60, 1982. 1867-1870
5. Horvath, A., Miskolczi, E., and Urbanyi, B. Cryo-preservation of common carp sperm. Aquat. Living Resour. 16, 2003. 457-460
6. Muchlisin, Z. A., Hashim, R., & Chong, A. S. C. 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, 2004. 25-34
7. เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ชนกันต์ จิตมนัส. ปัจจัยพื้นฐานบางประการในการเก็บน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.d กรุงเทพฯ; 2549. หน้า 438-444
8. กรมประมง. คู่มือการเลี้ยงปลาน้ำจืด.กรุงเทพฯ: กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 2536
9. กฤษณ์ มงคลปัญญา. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2536. หน้า 128
10. ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ. การเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืด. กรุงเทพฯ; 2532. หน้า 196
11. ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย.การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (Barbodes gonionotus) อย่างง่าย. ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.d กรุงเทพฯ; 2551. หน้า 236-242
12. ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมาก. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. มหาสารคาม; 2560. หน้า 600-606
13. อมรรัตน์ กิระวานิชย์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก 2560;10(2) : 84-91