บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยเพื่อการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในคนและสัตว์น้ำในถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยในปีที่ 2 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ตอน ได้แก่ 1) การศึกษาถึงสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง 2) ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง 3) อัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและ 4) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม จากการศึกษาพบว่า Ca-Free saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง ส่วนความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง พบว่า Sucrose และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 10 % มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยต่ำ เนื่องจากรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยสูงกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น สำหรับอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยพบว่าการเติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายต่อสเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที มีความเหมาะสมในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าวิธีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อถุงแชบ๊วยในหลอด Cryovial tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free saline ที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

คำสำคัญ: การแช่แข็ง; กุ้งแชบ๊วย; ถุงน้ำเชื้อ; DMSO

ABSTRACT

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

Key words: Cryostorage; banana prawn; Spermatophore; DMSO