บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง โดยทำการศึกษาถึงสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง อัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยและอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม ได้ผลการทดลองดังนี้

1. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

จากการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (Percentage of sperm viability) ของถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิด คือ Mineral oil, Ringer solution, Phosphate buffer, Ca-F-Saline และ 0.8% NaCl เป็นระยะเวลา 28 วัน ในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้ผลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมากที่สุดเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 วัน เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ Mineral oil > Ringer solution > Ca-F-Saline > Phosphate buffer และ 0.8% NaCl โดย Mineral oil มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 89.10 ± 0.81% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อสดที่มีค่าเท่ากับ 91.81 ± 1.15% แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ Ringer solution และ Ca-F-Saline ที่มีค่าเท่ากับ 67.86 ± 1.66% และ 56.39 ± 5.74% ตามลำดับ ในขณะที่ Phosphate buffer และ 0.8% NaCl ให้ผลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 0% แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งทะเลแบบแช่แข็งประสบความสำเร็จเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด ดังนั้นการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ Ca-Free Saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดนี้ปราศจากแคลเซียมซึ่งเป็นแร่ธาตุที่มีผลต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งทะเล

2. ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง

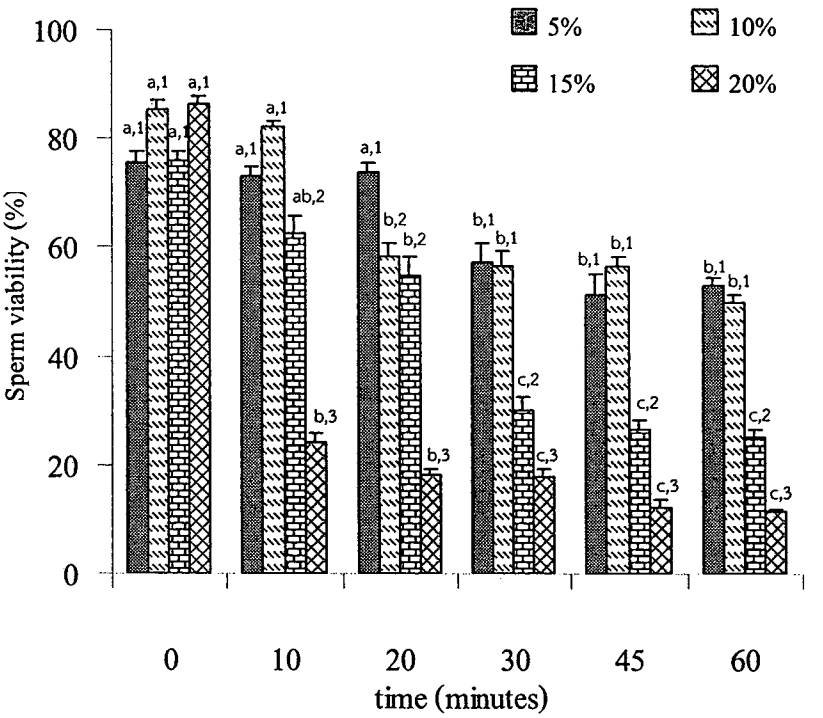
จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 ชนิด คือ DMSO, Methanol, Glycerol, Ethanol, Formamide, Propylene glycol, Ethylene glycol, Acetamide, Trehalose และ Sucrose โดยแต่ละชนิดทดลองที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองในเวลาต่าง ๆ กันเริ่มตั้งแต่ 0 (ชุดควบคุม), 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ผลการทดลองเป็นดังนี้

2.1 DMSO

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ DMSO10 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่แตกต่างกับ DMSO 15 % และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย DMSO ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 45 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 60 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร DMSO ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ DMSO 5% หรือ DMSO 10% แทนกันได้ โดยไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกัน เมื่อเลือกใช้ DMSO 5% ไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายเกิน 20 นาที และเมื่อใช้ DMSO 10% ไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายเกิน 10 นาที ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่แตกต่างกับสเปิร์มสด (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

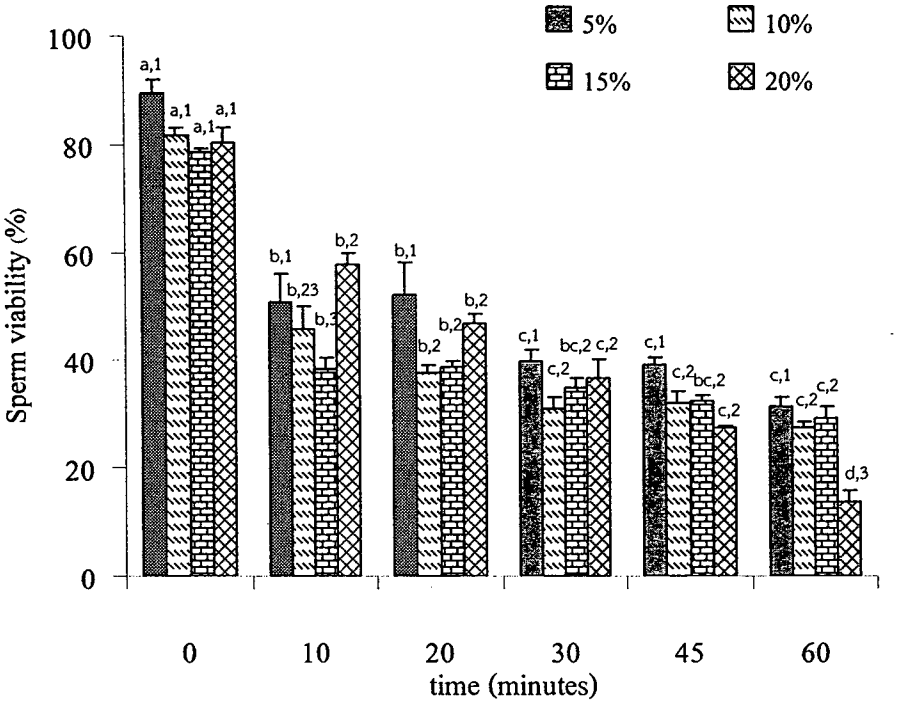
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.2 Methanol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Methanol 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Methanol 10% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Methanol 15% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) Methanol 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Methanol 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Methanol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 10 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 20 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และที่เวลา 30 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่แตกต่างกับที่เวลา 45 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Methanol ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ถ้าใช้ Methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ไม่ควรใช้เกิน 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

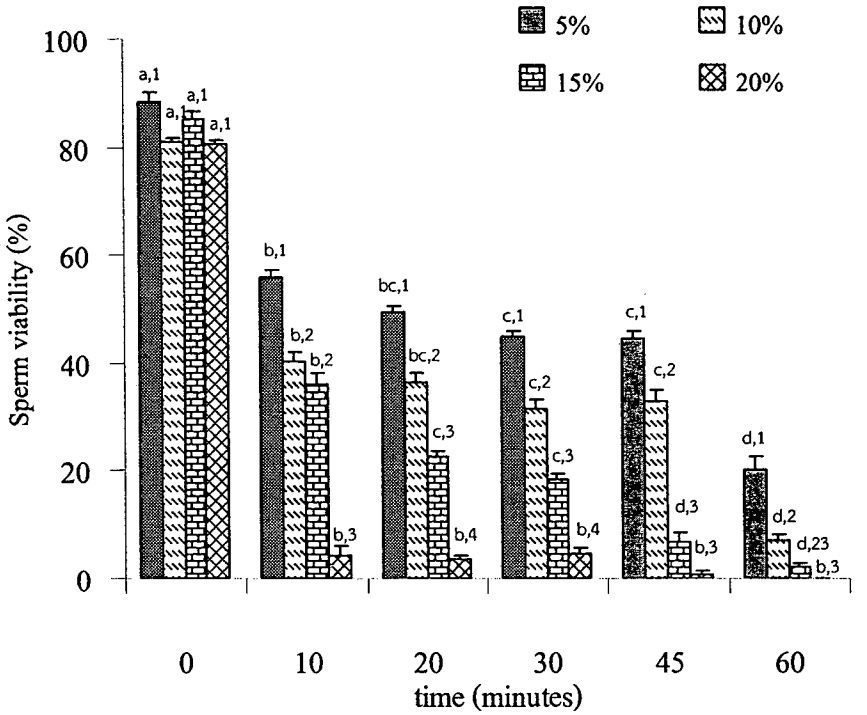
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.3 Glycerol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Glycerol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Glycerol 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Glycerol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 20 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Glycerol ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ควรใช้ Glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ไม่ควรใช้เกิน 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

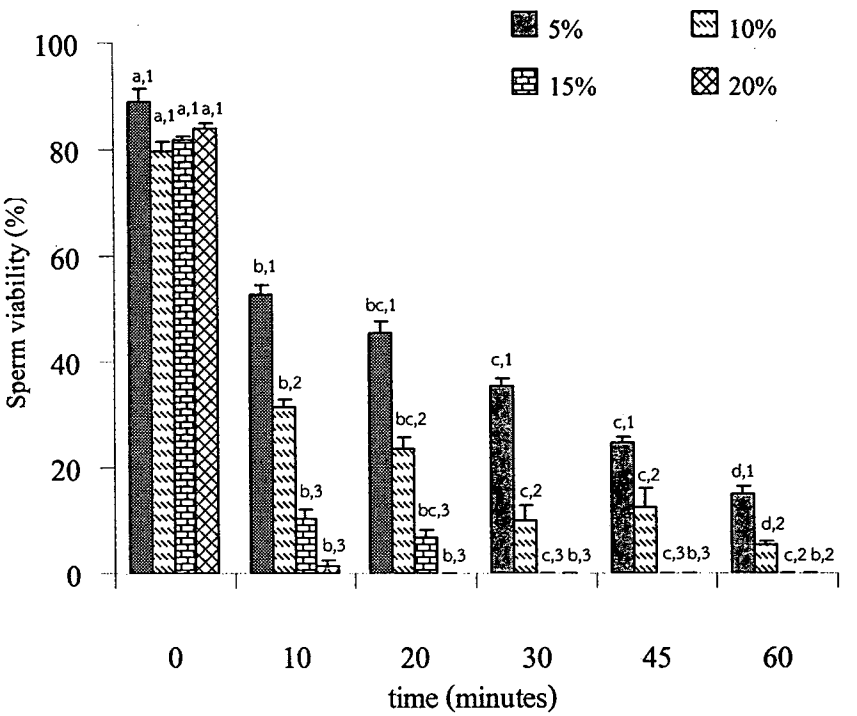
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.4 Ethanol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Ethanol 10 %, 15%, 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Ethanol 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Ethanol 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Ethanol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต แตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Ethanol ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Ethanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

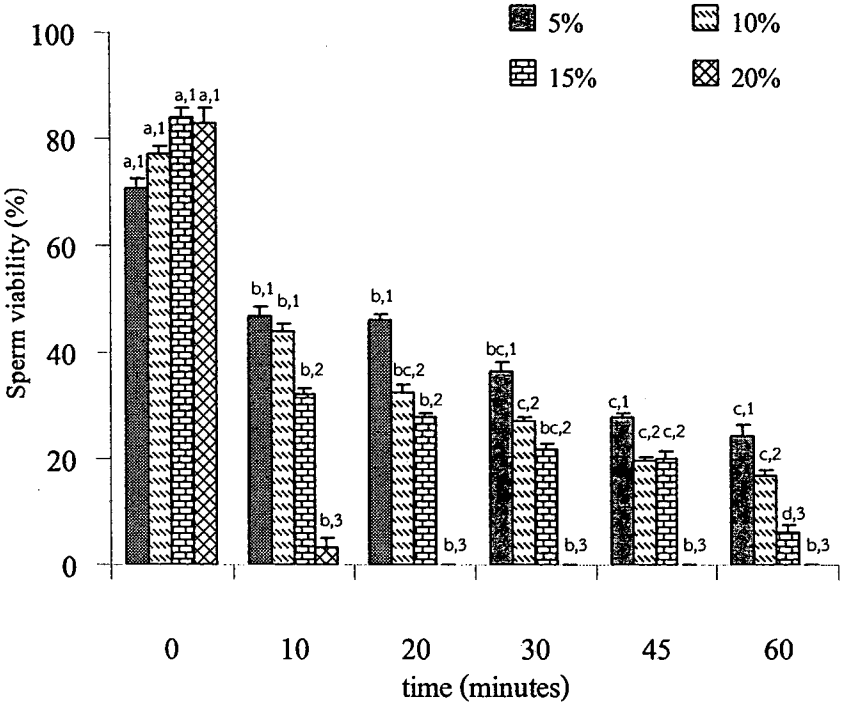
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.5 Formamide

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Formamide 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Formamide 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Formamide ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Formamide ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Formamide เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

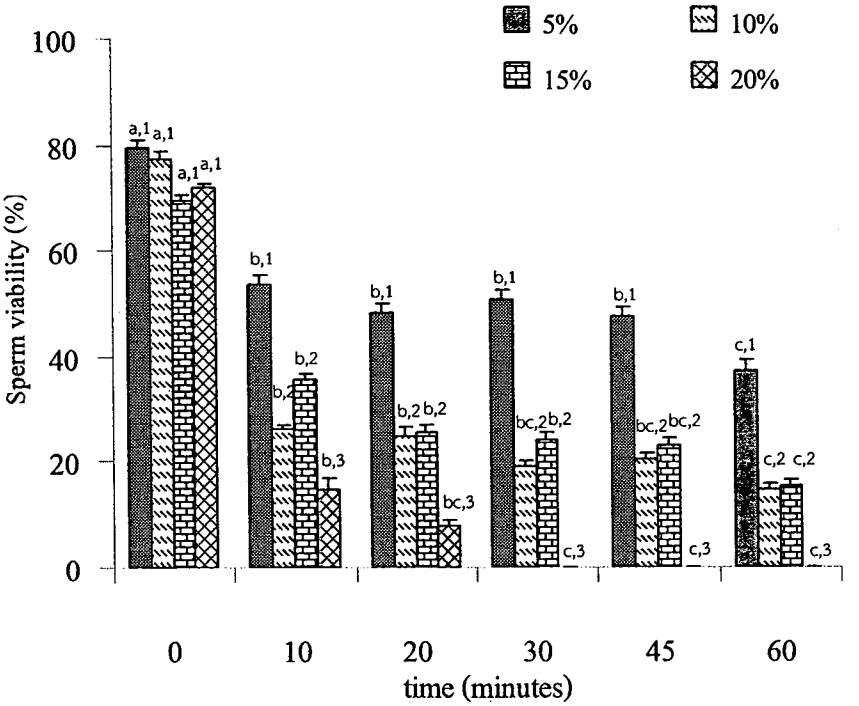
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.6 Propylene glycol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Propylene glycol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Propylene glycol 10 %, 15%, 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Propylene glycol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 20 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 30 และ 45 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Propylene glycol ที่มีต่อสเปิร์มกุ้ง สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

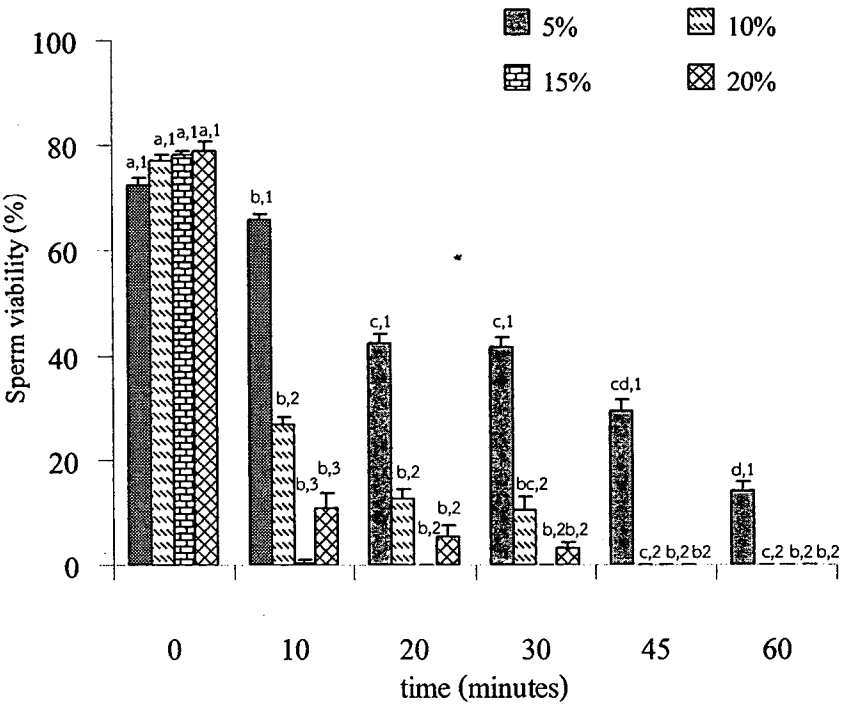
2.7 Ethylene glycol

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene glycol 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Ethylene glycol 10 %, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Ethylene glycol 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Ethylene glycol 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Ethylene glycol ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 20 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Ethylene glycol ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทค

แทนท์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

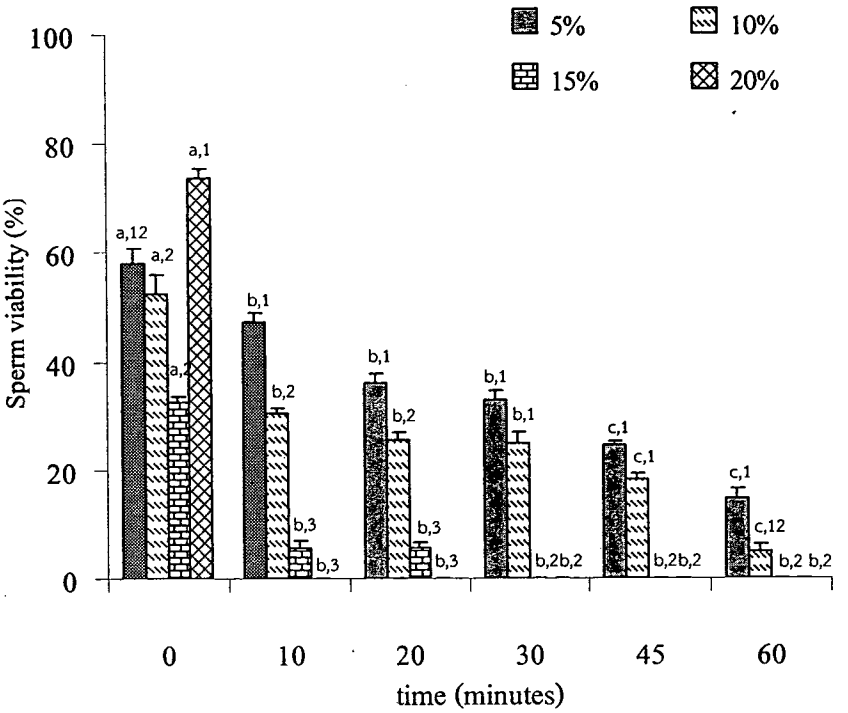
2.8 Acetamide

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Acetamide 10%, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Acetamide ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Acetamide ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ ไม่ควรใช้ Acetamide เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความ

เข้มข้นสูงกว่า 5% และไม่ควรแช่ถุงเก็บน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 10 นาที (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

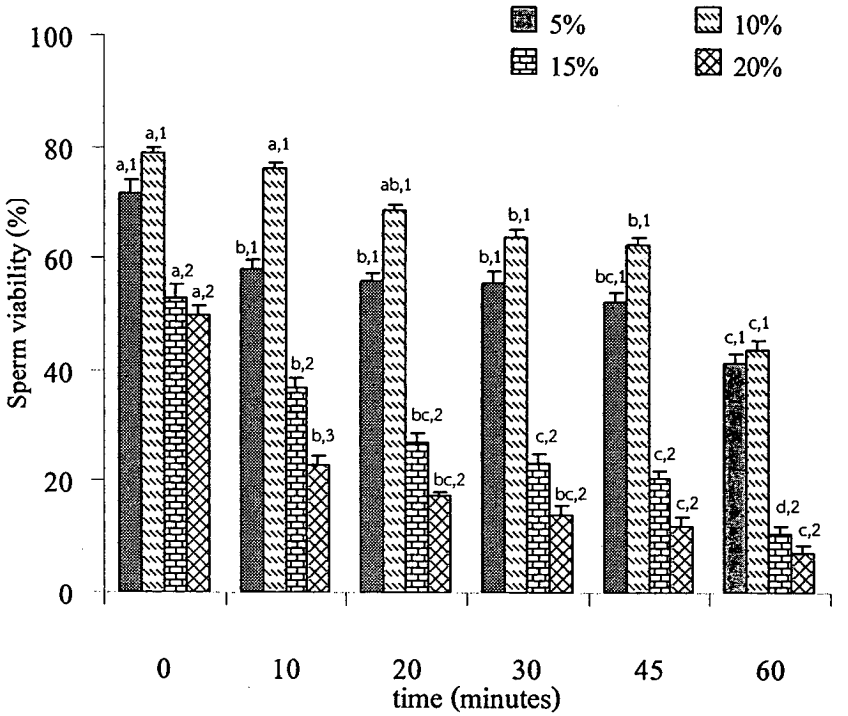
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.9 Trehalose

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Trehalose 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับ Trehalose 10%, 15% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Trehalose ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับทุกระยะเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 10 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 20 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Trehalose ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ Trehalose 5% ได้โดยไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายเกิน 10 นาที และเมื่อใช้ Trehalose 10% ไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายเกิน 20 นาทีเช่นกัน จึงจะไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกับสเปิร์มสด (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Trehalose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

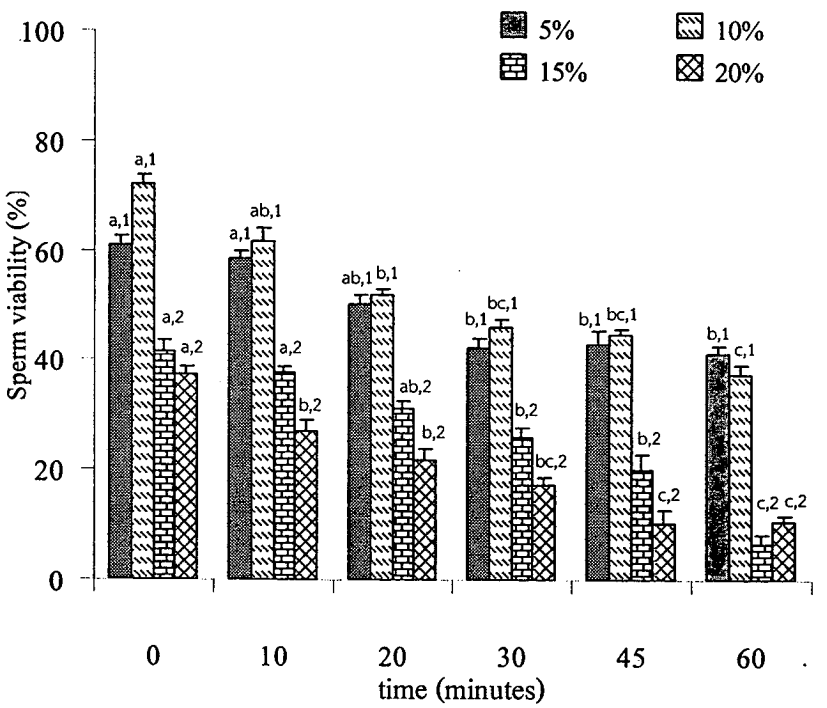
ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.10 Sucrose

จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Sucrose 5% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Sucrose 10 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) Sucrose 15% มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับ Sucrose 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยกับสารละลาย Sucrose ที่ 0 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 10, 20 และ 30 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ที่เวลา 45 นาที มีผลให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับที่เวลา 60 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร Sucrose ที่มีต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย สามารถนำไปเป็นแนวทางพัฒนาการแช่แข็งคือ สามารถเลือกใช้ Sucrose 5% หรือ Sucrose 10% แทนกันได้โดยไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตแตกต่างกัน และไม่ควรปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายนานเกิน 20 และ 30 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยหลังเติม Sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในชุดการทดลองเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง พบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดมีความเป็นพิษและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งแตกต่างกัน กล่าวคือ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ Sucrose < DMSO < Methanol < Trehalose < Propylene glycol < Formamide < Glycerol < Acetamide < Ethanol < Ethylene glycol ตามลำดับ โดยที่การใช้ Sucrose 5% และ 10 % และการใช้ DMSO 5% และ 10 % มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุด คือ 5%, 10%, 15%, 20% ตามลำดับ และเวลาที่ปล่อยให้สเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอยู่ในสารละลายที่มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุดคือ 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า Sucrose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อไป

3. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วย

จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็ง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารทั้งสองชนิดนี้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ 1) เติม DMSO 5% 2) เติม Sucrose 5% 3) เติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที และ 4) เติม Sucrose 5% หลังจากนั้น 10 นาที เติม DMSO 5% ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 4 ชุดการทดลองมาแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิ –1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตได้ผลการศึกษาดังนี้

3.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส

น้ำเชื้อสดของกุ้งแชบ๊วยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 90.11 ± 2.63% หลังจากนั้นนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free Saline ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้ Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% และสารผสมทั้งสองชนิดพบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส สามารถรักษาสเปิร์มที่มีชีวิตได้สูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยอัตราอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งการเติม Sucrose 5%, DMSO 5% และการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ที่อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังจากการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน

อัตราการลดอุณหภูมิ (^{0}C/นาที)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)			
	5% DMSO	5% Sucrose	เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	5% Sucrose ก่อนเติม 5% DMSO
-1 ^{0}C/นาที	84.79 ± 0.37^{a,1}	78.76 ± 8.45^{a,1}	84.02 ± 3.13^{a,1}	64.18 ± 5.24^{b,1}
-2 ^{0}C/นาที	47.15 ± 2.35^{b,2}	29.18 ± 5.26^{c,3}	43.16 ± 3.08^{b,2}	68.97 ± 0$^{.00\ a,1}$
-3 ^{0}C/นาที	47.11 ± 0.00^{b,2}	57.17 ± 1.41^{a,2}	13.56 ± 2.31^{c,3}	20.53 ± 1.11^{c,2}
-4 ^{0}C/นาที	2.25 ± 0.55^{b,3}	16.00 ± 0.00^{a,4}	1.55 ± 0.77^{b,4}	2.76 ± 1.41^{b,3}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -30 องศาเซลเซียส โดยใช้ Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% และสารผสมทั้งสองชนิดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ยังมีประสิทธิภาพไม่สูงมากนักในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการลดอุณหภูมิด้วยอัตราเดิม คือ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ –1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที แต่เปลี่ยนจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส แทนอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม ได้ผลการศึกษาดังนี้

น้ำเชื้อสดของกุ้งแชบ๊วยมีสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 91.75 ± 0.59% เมื่อนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-Free Saline ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้ Sucrose และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% และสารผสมทั้งสองชนิด แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หลังการแช่แข็งพบว่าการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ณ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 และ -2 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยได้ดีและสูงกว่าการเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นการเติม 5% DMSO ณ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -2 องศาเซลเซียสต่อนาที ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังจากตั้งไว้ 5 นาที หลังการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน

อัตราการลดอุณหภูมิ (^{0}C/นาที)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)			
	5% DMSO	5% Sucrose	เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	5% Sucrose ก่อนเติม 5% DMSO
-1 ^{0}C/นาที	63.05 ± 1.87 ^{b,2}	50.41 ±2.61 ^{c,2}	86.23 ±7.7 ^{a,1}	68.04 ± 0.93 ^{b,1}
-2 ^{0}C/นาที	89.87 ±2.47 ^{a,1}	79.56 ±3.59 ^{b,1}	82.98 ± 3.68 ^{a,1}	47.07 ± 3.5 ^{c,3}
-3 ^{0}C/นาที	26.15 ±4.01 ^{b,3}	3.54 ±0.41 ^{c,3}	65.28 ± 10.36 ^{a,2}	55.87 ± 0.67 ^{a,2}
-4 ^{0}C/นาที	2.67 ± 1.01 ^{c,4}	38.38 ±5.90 ^{b,23}	1.68 ± 0.12 ^{c,3}	57.89 ± 8.82 ^{a,2}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเดียวกัน แต่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน (-30 และ -80 องศาเซลเซียส) พบว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ -80 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่าอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ดังนั้นการศึกษาต่อมาจึงเป็นการศึกษาถึงการลดอุณหภูมิด้วยอัตราเดิม คือ อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ –1, -2, -3, และ -4 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำมาแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม ได้ผลการศึกษาดังนี้

น้ำเชื้อสดของกุ้งแชบ๊วยมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 93.78 ± 2.89% เมื่อนำมาแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันและเก็บในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที สามารถรักษาสเปิร์มที่มีชีวิตได้สูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยอัตราอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งการเติม DMSO 5% และการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ที่อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันในการรักษาการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งแชบ๊วยอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 ถึง -80 องศาเซลเซียส และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน และเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง

อัตราการลดอุณหภูมิ (^{0}C/นาที)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)			
	5% DMSO	5% Sucrose	เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	5% Sucrose ก่อนเติม 5% DMSO
-1 ^{0}C/นาที	73.37 ± 2.10 ^{a,1}	61.83 ± 0.32 ^{ab,1}	67.67 ± 0.94 ^{a,1}	52.72 ± 2.02 ^{b,1}
-2 ^{0}C/นาที	28.68 ± 2.99 ^{c,2}	70.67 ± 1.44 ^{a,1}	16.6 ± 2.72 ^{c,3}	41.93 ± 5.67 ^{b,2}
-3 ^{0}C/นาที	23.25 ± 0.61 ^{b,2}	37.59 ± 3.99 ^{a,2}	40.60 ± 0.00 ^{a,2}	8.86 ± 2.66 ^{c,3}
-4 ^{0}C/นาที	7.17 ± 1.07 ^{b,3}	24.06 ± 6.62 ^{a,2}	2.16 ± 0.26 ^{b,4}	6.53 ± 0.41 ^{b,3}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงเลือก DMSO 5% และการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน มาทำการทดลองเปรียบเทียบอีกครั้งหนึ่งเพื่อยืนยันและเลือกสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อไป โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการรักษาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วย ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำมาแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยที่เติม 5% DMSO ก่อนการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวและหลังการแช่แข็งเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 90.23 ± 1.07% และ 83.45 ± 2.72% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับการเติม DMSO 5% และ Sucrose 5% พร้อมกัน ที่มีค่าเท่ากับ 83.03 ± 1.23% และ 61.36 ± 1.15% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส

สารไครโอโพรเทคแทนท์	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)	
	ไม่แช่ในถังไนโตรเจนเหลว	แช่ในถังไนโตรเจนเหลว
5% DMSO	90.23 ± 1.07 [a,1]	83.45 ± 2.72 [a,1]
เติม 5% Sucrose และ 5% DMSO พร้อมกัน	83.03 ± 1.23 [a,1]	61.36 ± 1.15 [b,2]

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4. ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยต่อการมีชีวิตของสเปิร์ม

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการละลายที่เหมาะสมต่อสเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าเท่ากับ 85.1±1.4%, 61.6±0.8%, 25.3±1.2% และ 15.8±1.8% เมื่อละลายที่อุณหภูมิ 30, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งชุดการทดลองที่ละลายด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับการละลายที่อุณหภูมิอื่น (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแช่แข็งที่ละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิที่ใช้ละลาย (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต
กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)	88.4 ± 0.8[a]
30	85.1 ± 1.4[a]
50	61.6 ± 0.8[b]
70	25.3 ± 1.2[c]
90	15.8 ± 1.8[d]

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งแชบ๊วยแบบแช่แข็งพบว่าวิธีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อถุงแชบ๊วยในหลอด 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