



## รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงและผลิตปลากะรัง  
เชิงพาณิชย์

Development of Technology for Increasing Efficiency of Commercial  
Grouper Hatchery and Production

โดย

ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554

ตุลาคม 2556



## รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงและผลิตปลากะรัง  
เชิงพาณิชย์

Development of Technology for Increasing Efficiency of Commercial  
Grouper Hatchery and Production

โดย

ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554

ตุลาคม 2556

## กิตติกรรมประกาศ

แผนงานวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงและผลิตปลากะรังเชิงพาณิชย์ ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2554 การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความร่วมมืออย่างดียิ่งของหลายภาคส่วน คณะผู้บริหารแผนงานฯ และคณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยองและตราด ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ ห้องปฏิบัติ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อการทำวิจัย และขอขอบพระคุณคณะผู้ตรวจสอบทางวิชาการทุกท่านที่ให้การพิจารณา และให้ข้อเสนอแนะแก่โครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยฯ

คณะผู้บริหารแผนงานฯ

ตุลาคม 2556

ชื่อแผนงานวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงและผลิตปลากะรังเชิงพาณิชย์  
 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2554 วงเงิน 3,442,000 บาท  
 ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555  
 ชื่อหัวหน้าแผนงาน ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

### บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงปลากะรังในประเทศไทยยังไม่สามารถพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมที่ยั่งยืนได้ เนื่องจากมีอุปสรรคที่สำคัญได้แก่ ความไม่แน่นอนในด้านปริมาณและคุณภาพของลูกพันธุ์ที่ป้อนเข้าเข้าสู่ระบบการเลี้ยง แผนวิจัยนี้จึงมุ่งวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาและสร้างผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงและการผลิตปลากะรังให้สามารถก้าวไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมที่ยั่งยืนได้ กระบวนการค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังได้ดำเนินโดยการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อและอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลากะรังสีเอ ปลากระดองดำ และปลาหมอทะเล แล้วตรวจสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่ในตู้เย็นโดยการนำไปผลิตลูกปลากะรังพันธุ์ผสม ผลพบว่า สารละลายที่มี Dextrose 5 กรัม และ NaCl 0.4 กรัม เป็นส่วนประกอบในน้ำปริมาตร 100 มล. มีค่า osmolarity 406 mOsm/L เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อของปลากะรังทั้งสามชนิด โดยมีอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารเจือจางที่เหมาะสมคือ 1:6 สำหรับปลากะรังสีเอและปลากะรังดอกดำ และ 1: 9 สำหรับน้ำเชื้อปลาหมอทะเล ในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามด้วยวิธีแช่เย็น ไม่จำเป็นต้องเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะถ้าหากมีการป้องกันการปนเปื้อนในขั้นตอนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อเป็นอย่างดี ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็นพบว่า ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดและการฟักเป็นตัวโดยเฉลี่ยมากกว่า 60 % ผลการทดสอบการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือ programmable-controlled freezer พบว่า 10 % DMSO มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการเป็นสารปกป้องเซลล์ให้แกสเปิร์มของ ปลากะรังสีเอ และปลาหมอทะเล ขณะที่ 20 % DMSO มีความเหมาะสมสำหรับปลากะรังดอกดำ และการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ 10 °C/นาทึ ให้ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อหลังการละลายดีที่สุดทั้งสามชนิด และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังทั้งสามชนิดไปผสมเทียบกับไข่ปลากะรังดอกแดง พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดและการฟักเป็นตัว โดยเฉลี่ยมากกว่า 50 %

ส่วนการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตของการเลี้ยงปลากะรัง ทำโดยการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากลำไส้ของปลากะรัง แล้วศึกษาคุณสมบัติที่เป็นโปรไบโอติกจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ ผลการแยกจุลินทรีย์จากลำไส้ได้แบคทีเรียบริสซูร์ 12 ไอโซเลท และยีสต์ 2 ไอโซเลท โดยมีแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นโปรไบโอติกอยู่ในลำไส้ปลากะรังได้แก่ *Lactobacillus plantarum*. IFS-1 และ ยีสต์ *Candida tropicalis*. JY003 ซึ่งต่อมาได้พัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก และนำไปทดสอบประสิทธิภาพการใช้จริงในปลาที่ทดลองเลี้ยง ผลพบว่า ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากงานวิจัยช่วยทำให้การเจริญเติบโตและการรอดตายของการเลี้ยงปลากะรังดีขึ้นกว่าการไม่ใช้

คำสำคัญ: การเก็บรักษาน้ำเชื้อ, น้ำเชื้อแช่เย็น, น้ำเชื้อแช่แข็ง, ปลากะรังลูกผสม, จุลินทรีย์, ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

## Abstract

Grouper aquaculture in Thailand could not be developed into a sustainable industry. Insufficiency seed supply from hatcheries has been important constraint of grouper aquaculture. This research aims to develop a preservation of grouper sperm technology and provide probiotic product to optimize the grouper aquaculture and increase of grouper production. Finding of appropriate technology to preserve grouper sperm was done by examining an effect of extenders and its dilution ratio on *Epinephelus fuscoguttatus*, *Epinephelus malabaricus* and *Epinephelus lanceolatus* sperm. Next, quality of chilled sperm from each species was performed by producing hybrid grouper. The study found that extender solution contained 5 g Dextrose + 0.4 g NaCl in 100 mL water with 406 mOsm/L osmolality was the most appropriate for these three grouper. A maximum dilution ratio of 1:6 by volume was suitable for *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* milt; while, dilution ratio of 1:9 by volume was for *E. lanceolatus*. This study suggest that application of oxygenation or antibiotic in diluted sperm was not necessary; when, contaminated carefully was carried out during sperm collection. The results of artificial insemination using chilled sperm production demonstrated the high efficiency of fertilization and hatching (more than 60%). An examination on sperm cryopreservation of three groupers species using programmable - controlled freezer found that an appropriate procedure for frozen sperm of *E. fuscoguttatus* and *E. lanceolatus* was using extender contained 5 g Dextrose + 0.4 g NaCl in 100 mL water with 406 mOsm/L osmolality and 10% DMSO as cryoprotectant and used freezing control rate of 10 °C/min. However, the best way for *E. malabaricus* was using extender contained 5 g Dextrose + 0.4 g NaCl in 100 mL water with 406 mOsm/L osmolality and 20% DMSO as cryoprotectant and used freezing control rate of 10 °C/min. The results of artificial insemination using frozen sperm production demonstrated the high efficiency of fertilization and hatching (more than 50%).

The development of probiotic production for grouper cultivation industry was carried out by isolation of biotic bacteria from a gut of grouper (*Epinephelus bleekeri*). The study found 12 isolates of bacteria and 2 isolates of yeast; which, only bacteria, *Lactobacillus plantarum*. IFS-1 and yeast, *Candida tropicalis*. JY003 was qualified as a probiotic. Afterwards, these microorganisms were developed to be probiotic product. Efficiency of 15

probiotic products was later tested. The results demonstrated that the probiotic product, output of this study, could be used to improving growth and survival for grouper production.

---

**Keywords:** Sperm preservation, Chilled sperm, Frozen sperm, Hybrid grouper, Microorganism, Probiotic products

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในแผนงานวิจัย (List of Abbreviations)

| สัญลักษณ์/คำย่อ                  | ความหมาย                                                        |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Na <sup>+</sup>                  | โซเดียม (Sodium)                                                |
| K <sup>+</sup>                   | โพแทสเซียม (Potassium)                                          |
| Ca <sup>2+</sup>                 | แคลเซียม (Calcium)                                              |
| Mg <sup>2+</sup>                 | แมกนีเซียม (Magnesium)                                          |
| Cl <sup>-</sup>                  | คลอไรด์ (Chloride)                                              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium phosphate dibasic)              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate)    |
| NaCl                             | โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)                                |
| H <sub>2</sub> O                 | โมเลกุลน้ำ                                                      |
| %                                | เปอร์เซ็นต์, ร้อยละ                                             |
| °C                               | องศาเซลเซียส                                                    |
| $\alpha$                         | แอลฟา                                                           |
| Ppm                              | ส่วนในล้านส่วน (part per million)                               |
| Psu                              | หน่วยความเค็ม ย่อมาจาก Practical Salinity Unit มีค่าเท่ากับ ppt |
| pH                               | ค่าความเป็นกรด เบส                                              |
| CRD                              | แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design)           |
| ANOVA                            | การทดสอบความแปรปรวน (analysis of variance )                     |
| mOsm                             | มิลลิออสโมล (milliosmole) หน่วยของค่าออสโมลาลิตี้               |
| $P < 0.05$                       | ผลการศึกษาที่ได้ค่า p-value น้อยกว่า 0.05                       |
| $P > 0.05$                       | ผลการศึกษาที่ได้ค่า p-value มากกว่า 0.05                        |
| N                                | แทนค่าจำนวนประชากรตัวอย่างที่ศึกษา                              |
| Se                               | แทนค่า ส่วนเบี่ยงเบน                                            |
| Sd                               | แทนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน                                      |
| CFU                              | หน่วยวัดแบคทีเรีย ย่อมาจาก Colony Forming Unit                  |
| MRS                              | อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตร De Man, Rogaso and Sharpe              |
| TCA                              | อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตร Total Colony Plate Count               |
| mg.                              | หน่วยมิลลิกรัม                                                  |
| kg.                              | หน่วยกิโลกรัม                                                   |

|                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| cm.               | หน่วยเซนติเมตร         |
| g.                | หน่วยกรัม              |
| mL                | หน่วยมิลลิลิตร         |
| L                 | หน่วยลิตร              |
| ก.                | หน่วยกรัม              |
| ซม.               | หน่วยเซนติเมตร         |
| ซม <sup>3</sup> . | หน่วยลูกบาศก์เซนติเมตร |
| °C                | องศาเซลเซียส           |

## สารบัญ

|                                                                                    | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                                                                    | i    |
| บทคัดย่อ                                                                           | ii   |
| Abstract                                                                           | iii  |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย                                          | iv   |
| สารบัญ                                                                             | vi   |
| สารบัญตาราง                                                                        | x    |
| สารบัญภาพ                                                                          | xii  |
| สารบัญภาพผนวก                                                                      | xiv  |
| บทนำรวม (แผนงานวิจัย)                                                              | 1    |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา                                                          | 1    |
| วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย                                                         | 1    |
| รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย                                     | 2    |
| สรุปผลการวิจัย                                                                     | 3    |
| ประโยชน์ที่ได้รับ                                                                  | 4    |
| หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์                                               | 4    |
| โครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อการผลิตปลากะรังลูกผสมเชิงพาณิชย์ | 5    |
| บทคัดย่อ                                                                           | 5    |
| Abstract                                                                           | 7    |
| บทที่ 1      บทนำ                                                                  | 9    |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย                                                     | 9    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย                                                            | 10   |
| บทที่ 2      การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง                                         | 11   |
| 2.1 น้ำเชื้อปลาและการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (Milt and Sperm Motility)                | 11   |
| 2.2 วิธีการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อปลา                                              | 13   |
| 2.3 สารเจือจางน้ำเชื้อ (Semen Extender)                                            | 15   |
| 2.4 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant)                                           | 17   |
| 2.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้สารซึมผ่านเซลล์ (Equilibration time)                 | 19   |

|         |                                                                                                                                                  |      |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|         |                                                                                                                                                  | หน้า |
|         | 2.6 อัตราการลดอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็ง                                                                                                            | 19   |
|         | 2.7 วัสดุเก็บน้ำเชื้อเพื่อการเก็บรักษาในถังไนโตรเจน                                                                                              | 21   |
|         | 2.8 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา (Assessing fish milt quality)                                                                                    | 21   |
| บทที่ 3 | ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย                                                                                                                        | 25   |
|         | 3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย                                                                                                                         | 25   |
|         | 3.2 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์เพื่อการวิจัย                                                                                                           | 26   |
|         | 3.3 การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ                                                                                                                        | 26   |
|         | 3.4 การประเมินการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา                                                                                                       | 27   |
|         | 3.5 การศึกษาความเข้มข้นของสเปิร์ม ( Sperm Concentration) ในน้ำเชื้อ                                                                              | 27   |
|         | 3.6 การทดลองเพื่อค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะรังเสือ<br>ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล                                     | 27   |
|         | 3.7 การค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือ<br>ปลากะรังดอกดำ                                                             | 33   |
| บทที่ 4 | ผลการวิจัย                                                                                                                                       | 38   |
|         | 4.1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลากะรังแต่ละชนิด                                                                              | 38   |
|         | 4.2 ประสิทธิภาพการเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ ต่อ<br>คุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นในปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล | 38   |
|         | 4.3 ผลของการเติมออกซิเจนสมทบ และยาปฏิชีวนะต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นปลากะรัง<br>เสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล                                   | 45   |
|         | 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษานาน 7 วัน                                                                                    | 50   |
|         | 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ต่อสเปิร์มใน<br>ปลากะรังเสือและกะรังดอกดำ                                              | 51   |
|         | 4.6 ชนิดและระดับความเข้มข้นของ cryoprotectant ต่อประสิทธิภาพการแช่แข็ง<br>น้ำเชื้อปลากะรังเสือและกะรังดอกดำ                                      | 55   |
|         | 4.7 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือ<br>ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล                                           | 57   |
|         | 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง                                                                                                         | 57   |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                                                                       | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง                                                             | 60   |
| บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ                                                   | 67   |
| บรรณานุกรม                                                                            | 68   |
| ภาคผนวก                                                                               | 77   |
| <b>โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงปลากะรัง</b>            | 84   |
| บทคัดย่อ                                                                              | 84   |
| Abstract                                                                              | 85   |
| บทที่ 1 บทนำ                                                                          | 87   |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย                                                        | 87   |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย                                                               | 87   |
| บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง                                                 | 88   |
| 2.1 นิยามของโปรไบโอติก                                                                | 88   |
| 2.2 จุลินทรีย์โปรไบโอติก                                                              | 88   |
| 2.3 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ                         | 89   |
| 2.4 จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้ผสมอาหารเลี้ยงปลากะรัง                                  | 90   |
| บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย                                                     | 91   |
| 3.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ ปลากะรัง                                          | 91   |
| 3.2 การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นโปรไบโอติกให้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก            | 91   |
| 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก                                         | 94   |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย                                                                    | 101  |
| 4.1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ปลากะรัง                                            | 101  |
| 4.2 การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหาร                                                           | 101  |
| 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกกับปลากะรังขนาดเล็กที่เลี้ยงในตู้ทดลอง | 102  |
| 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกกับปลากะรังขนาดกลางที่เลี้ยงในกระชัง   | 104  |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                        | หน้า |
|----------------------------------------|------|
| บทที่ 5    อภิปรายและวิจารณ์ผล         | 107  |
| บทที่ 6    สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | 109  |
| บรรณานุกรม                             | 110  |
| ภาคผนวก                                | 112  |
| ข้อมูลนักวิจัย                         | 117  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                              | หน้า |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | องค์ประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทะเลชนิดต่างๆ                                                                                                                                                                                       | 17   |
| 2        | อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทะเลชนิดต่างๆ ที่มีรายงานไว้                                                                                                                                                                                                      | 20   |
| 3        | เกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ                                                                                                                                                                                                                               | 27   |
| 4        | แผนการทดลองเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ                                                                                                                                                                                               | 28   |
| 5        | แผนการทดลองเพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนต์ต่อสเปิร์มปลากระรังเสือ และปลากะรังดอกดำ                                                                                                                                                                             | 33   |
| 6        | แผนการทดลองเพื่อค้นหาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ                                                                                                                                                      | 35   |
| 7        | ค่าคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล                                                                                                                                                                                    | 38   |
| 8        | ค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวจากการผสมเทียมปลากะรังชนิดต่างๆ ด้วยน้ำเชื้อแช่เย็น                                                                                                                                                           | 50   |
| 9        | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (mean $\pm$ se, n=3) ในปลากะรังดอกดำเมื่อทำการตรวจที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที หลังน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ผสมสารไครโอโพรเทคแทนต์ที่ระดับความเข้มข้น 0 %, 5 %, 10 %, 15 % และ 20 %                                                           | 50   |
| 10       | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (mean sd, n=3) ในปลากะรังเสือ เมื่อทำการตรวจที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที หลังน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ผสมสารไครโอโพรเทคแทนต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 %, 5 %, 10 %, 15 % และ 20 %                                                                | 52   |
| 11       | ค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ se) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มในปลากะรังดอกดำและปลากะรังเสือ ภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีสารไครโอโพรเทคแทนต์ 4 ชนิด (DMSO, propylene glycol, และ ethanol) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อัตราการลด อุณหภูมิที่ 10 °C/นาที | 54   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                    | หน้า |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 12       | ค่าเฉลี่ย (mean±se) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลาหมอตะเล ปลากระรังดอกดำและปลากระรังเสือ ภายหลังการเก็บแช่แข็ง (-196 °C) เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (-5, -10 และ -15 °C/นาที) ด้วยเครื่อง programmable-controlled freezer | 56   |
| 13       | ค่าเฉลี่ย (mean±se) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวจากการผสมเทียมปลากระรังชนิดต่างๆ ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง                                                                                                                      | 57   |
| 14       | ค่าเฉลี่ย (mean±se) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวจากการผสมเทียมปลากระรังชนิดต่างๆ ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง                                                                                                                      | 59   |
| 15       | แสดงน้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) น้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (กรัม/วัน) อัตราการรอดตาย (%) ของปลากระรังดอกแดง ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± Standard Error (n=5)                                                                                  | 103  |
| 16       | ข้อมูลคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงลูกปลากระรังดอกแดง                                                                                                                                                                                  | 104  |
| 17       | น้ำหนักปลากระรัง (กรัม) ในช่วงเริ่มต้นและภายหลังการทดลองของกลุ่มควบคุมและ กลุ่มทดลอง ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± Standard Error (n=20)                                                                                               | 105  |
| 18       | ขนาดความยาวของลำตัวปลากระรัง (เซนติเมตร) ในช่วงเริ่มต้นและภายหลังการทดลองของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± Standard Error (n=20)                                                                               | 106  |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                                                                                                            | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 แผนภูมิความเชื่อมโยงของ 2 โครงการย่อย                                                                                                                                                           | 2    |
| 2 ลำดับขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย                                                                                                                                                                   | 25   |
| 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มในปลากะรังดอกดำที่เจือจางด้วยสารเจือจางต่างกัน 3 สูตรแต่ละสูตรเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับ                                                            | 42   |
| 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มในปลากะรังเสือ ที่เจือจางด้วยสารเจือจางต่างกัน 3 สูตรแต่ละสูตรเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับ                                                            | 43   |
| 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มในปลาหมอทะเลที่เจือจางด้วยสารเจือจางต่างกัน 3 สูตรแต่ละสูตรเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับ                                                               | 44   |
| 6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ ( $\text{mean} \pm \text{se}$ , $n=3$ ) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา | 47   |
| 7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ ( $\text{mean} \pm \text{se}$ , $n=3$ ) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา     | 47   |
| 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มปลากะรังเสือ ( $\text{mean} \pm \text{se}$ , $n=3$ ) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา  | 48   |
| 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังเสือ ( $\text{mean} \pm \text{se}$ , $n=3$ ) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา      | 48   |
| 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มปลาหมอทะเล ( $\text{mean} \pm \text{se}$ , $n=3$ ) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา   | 49   |
| 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาหมอทะเล ( $\text{mean} \pm \text{se}$ , $n=3$ ) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา       | 49   |
| 12-15 แสดงอุปกรณ์ และการตัดชิ้นเนื้อใต้ท้องปลา เพื่อนำเอาลำไส้ปลาออกมาใส่จานแก้ว                                                                                                                  | 92   |
| 16-19 แสดงการนำลำไส้ปลาใส่ในถุงอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (peptone water) นำเข้าเครื่องตีปั่น (stomacher) แยกเชื้อด้วยวิธี cross streak ในอาหารจานแก้ว บ่ม ที่ $37^{\circ}\text{C}$ 48 ชม.           | 93   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                              | หน้า |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 20     | แสดงการเลี้ยงลูกปลากระรังที่รวบรวมจากธรรมชาติ เบื้องต้น<br>ในผ้าซี ลอยในถังน้ำ 1 ตัน         | 94   |
| 21     | การฝึกให้ลูกปลายอมรับอาหารเม็ดก่อนเข้าการทดลอง                                               | 95   |
| 22     | อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองช่วงสัปดาห์ที่ 1-4                                     | 95   |
| 23     | อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองช่วงสัปดาห์ที่ 4-8                                     | 96   |
| 24     | ตู้กระจกที่ใช้ทดลองเลี้ยงปลา                                                                 | 96   |
| 25     | วัสดุให้หลบซ่อนที่ใส่ในตู้ทดลอง                                                              | 97   |
| 26     | การชั่งน้ำหนักลูกปลาก่อนการทดลอง                                                             | 98   |
| 27     | ความยาวของปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง                                                           | 98   |
| 28     | ความยาวของปลาที่ 4 สัปดาห์                                                                   | 98   |
| 29     | ขนาดปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง                                                                  | 98   |
| 30     | แสดงลักษณะกระชังปลาที่เลี้ยงในบ่อดิน                                                         | 99   |
| 31     | แสดงขนาดของกระชังกว้าง 2 เมตร ยาว 2 เมตร ลึก 2 เมตร                                          | 99   |
| 32     | แสดงการจับปลามาวัดการเจริญ                                                                   | 99   |
| 33     | แสดงอาหารชนิดเม็ดที่ใช้ในการทดลอง                                                            | 99   |
| 34     | การทำให้ปลาสลบโดยใช้น้ำมัน clove oil และ ethanol                                             | 100  |
| 35     | แสดงการชั่งน้ำหนักปลา                                                                        | 100  |
| 36     | แสดงการวัดขนาดของปลา                                                                         | 100  |
| 37     | หลังจากชั่งและวัดขนาดแล้วปลาจะถูกนำมาพักฟื้นในกะละมังที่เติมอากาศเต็มที่                     | 100  |
| 38     | แสดงตัวอย่างการแยกเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Cross streak plate technique | 101  |

## สารบัญภาพผนวก

| ภาพผนวกที่ |                                                                                        | หน้า |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1          | ขั้นตอนการทำฮอร์โมนเม็ดแปลงเพศ                                                         | 78   |
| 2          | กิจกรรมการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ                                                           | 79   |
| 3          | กิจกรรมการแช่เย็นน้ำเชื้อ                                                              | 79   |
| 4          | กิจกรรมการแช่แข็งน้ำเชื้อ                                                              | 80   |
| 5          | การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษา                                                  | 80   |
| 6          | พัฒนาการของปลากะรังลูกผสมระหว่างไข่มแม่ปลากะรังดอกแดงและน้ำเชื้อแช่แข็งจากปลากะรังเสือ | 82   |
| 7          | พัฒนาการของปลากะรังลูกผสมระหว่างไข่มแม่ปลากะรังดอกแดงและน้ำเชื้อแช่แข็งจากปลาหมอทะเล   | 83   |

## บทนำรวม

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปลากระรังหรือที่รู้จักกันทั่วไปว่า ปลาเก๋า มีชื่อในภาษาอังกฤษว่า Grouper เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากสามารถสร้างรายได้จากการส่งออกให้แก่ประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท และยังจัดว่าเป็นปลาที่มีศักยภาพและมีความเหมาะสมอย่างมากสำหรับส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลากระรังในเชิงอุตสาหกรรม เพราะประเทศไทยมีภูมิประเทศที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลากระรังได้หลายรูปแบบ เช่น การเลี้ยงในกระชัง และการเลี้ยงในบ่อดิน แต่ยังมีปัจจัยบางประการที่ขัดขวางต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ให้ก้าวไปสู่ระดับอุตสาหกรรมที่ยั่งยืนได้ อาทิเช่น กำลังการผลิตที่ถูกจำกัดด้วยลูกพันธุ์ ส่งผลให้การเลี้ยงส่วนใหญ่ในปัจจุบันยังต้องพึ่งพาลูกพันธุ์ที่จับจากธรรมชาติ ขณะเดียวกันลูกพันธุ์จากธรรมชาติที่ส่งเข้าในระบบการเลี้ยงมีจำนวนไม่แน่นอนและมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีความ จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ โดยเฉพาะในด้านการผลิตลูกปลาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง ซึ่งได้แก่การส่งเสริมให้เกิดมีโรงเพาะพันธุ์ปลากระรังมากขึ้นในประเทศที่ซึ่งปัจจุบันพบว่ายังจำกัดอยู่หน่วยงานของรัฐ ภาคเอกชนในประเทศให้ความสนใจทำฟาร์มเพาะพันธุ์ปลากระรังกันน้อยมาก เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์หายากและมีราคาแพง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อมาช่วยเหลือในกระบวนการผลิต จะสามารถช่วยลดปัญหาการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟักลงได้ และยังช่วยให้การเพาะพันธุ์ทำได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงพันธุ์ แม้ว่าเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อในประเทศไทยจะได้รับการศึกษามาพอสมควรแล้วก็ตาม แต่ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในปลาน้ำจืด และผลการศึกษาก็จำกัดอยู่ในเฉพาะห้องปฏิบัติการ การศึกษาในปลาทะเลยังมีน้อย และการบูรณาการเทคโนโลยีนี้สู่เชิงอุตสาหกรรมยังไม่มี ดังนั้น โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อการผลิตลูกปลาเชิงพาณิชย์นี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลากระรังในประเทศไทย

นอกจากนี้ แม้ว่าปลากระรังจะเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีราคาจำหน่ายสูง แต่ก็ต้องใช้ระยะเวลาการเลี้ยงที่นานกว่าหากเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงปลาน้ำจืดหลายชนิด เช่น ปลานิล หรือปลาดุก การพยายามหาวิธีที่จะลดระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง ทางหนึ่งที่ได้ก็คือ การเร่งการเจริญเติบโต โดยไม่ใช้สารเคมีที่อาจเป็นผลกระทบต่อผู้บริโภค การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกกลุ่มที่เป็นประโยชน์มาใช้ในการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำ โดยการส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำเศรษฐกิจ นับว่า เป็นแนวทางการส่งเสริมการเลี้ยงปลาชนิดนี้ในระดับอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี และยังเป็นการจัดการการเพาะเลี้ยงที่ช่วยให้การเพาะเลี้ยงปลากระรังเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาที่ยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

### 2. วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย

- 1) การวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงและผลิตปลากระรังเชิงพาณิชย์

- 2) วิจัยพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลากะรัง เพื่อการผสมเทียม, การผสมข้ามพันธุ์และการอนุรักษ์ทางพันธุกรรม
- 3) การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเสริมในอาหารเลี้ยงปลากะรัง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเลี้ยงปลากะรังเชิงพาณิชย์

### 3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 เป็นการวิจัยพัฒนาการแช่เย็นและแช่แข็งสเปิร์มของปลากะรัง เพื่อให้การผลิตปลากะรังทำได้สะดวกและประสพผลสำเร็จมากขึ้น ลูกพันธุ์จากกระบวนการผลิตด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นหรือแช่แข็งนำไปทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เติมลงในอาหารเลี้ยงปลาในโครงการย่อยที่ 2 เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยสร้างภูมิคุ้มกันโรคให้แก่ปลากะรัง ความเชื่อมโยงของโครงการย่อยทั้งสองจะช่วยให้การเพาะเลี้ยงปลากะรังในประเทศไทยมีการพัฒนาแบบยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม



ภาพที่1 แผนภูมิความเชื่อมโยงของ 2 โครงการย่อย

#### 4. สรุปผลการวิจัย (ภาพรวมทั้งโครงการ)

การบูรณาการเทคโนโลยีเก็บรักษาน้ำเชื้อเข้ากับการปรับปรุงพันธุ์ เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการแก้ปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์ปลากะรังจากโรงเพาะฟัก การปรับปรุงพันธุ์ผ่านทางการผสมข้ามพันธุ์สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้ โดยเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีประสิทธิภาพเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเกื้อหนุนให้กระบวนการผสมเทียมมีความสะดวกยิ่งขึ้น ดังนั้นเพื่อให้สามารถเก็บน้ำเชื้อได้ในระยะเวลานานขึ้นโดยที่น้ำเชื้อยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการปฏิสนธิกับไข่ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ซึ่งมีความเฉพาะกับปลาแต่ละชนิด ในแผนงานวิจัยนี้มุ่งหาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล ที่มุ่งเน้นไปสู่การผลิตเชิงการค้ามากกว่าการทดลอง การศึกษาเริ่มจากการค้นหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเจือจางน้ำเชื้อและสารปกป้องอันตรายต่อเซลล์สเปิร์มในขณะเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นและแช่แข็ง ผลการศึกษาเบื้องต้นนี้นำไปสู่การศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็ง การศึกษาสิ้นสุดเมื่อได้นำน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็งไปผลิตลูกพันธุ์ปลากะรังจำนวนมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจากการศึกษา พบว่า น้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเลที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นระยะสั้น (ไม่เกิน 7 วัน) ให้ประสิทธิภาพในการผสมเทียมสูง เมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายที่มีองค์ประกอบของ Dextrose 5 กรัม และ NaCl 0.4 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนการเจือจาง 1:6 (สำหรับปลากะรังเสือและกะรังดอกดำ) และ 1:9 (สำหรับปลาหมอทะเล) สำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในปลากะรังเสือ และปลาหมอทะเลให้มีคุณภาพสูง ผลการศึกษาแนะนำว่า ควรใช้สารละลายที่มีองค์ประกอบดังกล่าวข้างต้นเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อและใช้ 10 % DMSO (สำหรับปลากะรังเสือและปลาหมอทะเล) และ 20 % DMSO (สำหรับปลากะรังดอกดำ) เป็นสารป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์ขณะทำการแช่แข็ง ควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ  $10^{\circ}\text{C}$ /นาที่ ด้วยเครื่องมือ programmable-controlled freezer ผลจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผลิตตามกระบวนการศึกษาในครั้งนี้ ไปทำการผลิตปลากะรังลูกผสม และได้ปลาลูกผสมที่มีการเจริญเติบโตที่ดีและเลี้ยงง่าย ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อทำให้การเพาะพันธุ์ปลากะรังเป็นเรื่องที่ทำได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น ความสำเร็จจากการศึกษาตามแผนงานนี้ หากได้มีการนำไปบูรณาการหรือขยายผลต่อไป จะทำให้วงการเลี้ยงปลากะรังเชิงพาณิชย์ก้าวหน้าไป และทำเงินรายได้ให้กับประเทศได้เป็นอย่างมาก

นอกจากนี้เนื่องจากปลากะรัง มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวอื่น ๆ จึงทำให้ธุรกิจการเลี้ยงปลาชนิดนี้ได้รับความนิยมน้อยลง ความพยายามลดระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง ย่อมหมายถึงการทำให้ผู้ประกอบการได้รับผลตอบแทนเร็วขึ้น และลดความเสี่ยงลง หนทางที่สามารถทำได้ได้แก่ การส่งเสริมให้ปลามีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น หากการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยไม่มีการใช้เคมีจะเป็นผลดีต่อผู้บริโภค ดังนั้นแผนวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเลี้ยงปลากะรังเชิงพาณิชย์ โดยการแยกจุลินทรีย์กลุ่มที่ดีที่เป็นประโยชน์ต่อการ

เจริญเติบโตจากลำไส้ของปลากะรังในกลุ่มเดียวกัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาพัฒนาในห้องปฏิบัติการจนได้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ โปรไบโอติกและนำไปทดสอบประสิทธิภาพโดยการผสมกับอาหารเลี้ยงปลาขนาดต่าง ๆ ผลการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มดีจากลำไส้ในห้องปฏิบัติการสามารถแยกได้แบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวน 12 ไอโซเลท และยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลท แบคทีเรียและยีสต์ที่ได้นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่เป็นเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum*, IFS-1 และ ยีสต์ *Candida tropicalis*, JY003 ผลการนำผลิตภัณฑ์นี้ไปทดสอบเลี้ยงปลากะรังในสภาพแวดล้อมการเลี้ยงต่างกัน (ตู้ทดลอง และกระชัง) ผลการนำข้อมูลการเจริญเติบโตของปลาทดลองในแต่ละสภาพแวดล้อมการเลี้ยงมาเปรียบเทียบทางสถิติด้วย Independent-Sample T-test พบว่า กลุ่มปลาที่ใช้โปรไบโอติกมีการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ทั้งในตู้ทดลองและในกระชัง ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถพิสูจน์ให้เห็นว่าในลำไส้ของปลากะรังมีแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกและสามารถพัฒนาเป็นอาหารให้ปลากินโดยสามารถช่วยให้ปลาที่กินอาหารที่ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกนี้มีอัตราการรอดตาย (โดยเฉพาะปลาขนาดเล็ก) และการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น แต่การวิจัยนี้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในส่วนของค่าใช้จ่ายที่เพิ่มเติมจากการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารเลี้ยงปลาว่าสามารถลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้

## 5. ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1) ได้องค์ความรู้เพิ่มเติมถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อการขยายพันธุ์ปลากะรัง
- 2) การใช้ probiotic ที่มีคุณสมบัติที่ดี สามารถทำให้ปลามีการเจริญเติบโตดีกว่าเดิม
- 3) สามารถช่วยให้การเพาะเลี้ยงปลากะรังสามารถขยายธุรกิจได้มากขึ้น

## 6. หน่วยงานที่ควรนำผลงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ (ทั้งภาครัฐบาลและภาคเอกชน)

- ภาครัฐและเอกชนที่สนใจการเพาะเลี้ยงปลากะรัง
- นักวิชาการที่ทำการวิจัยในด้านนี้
- กรมประมง สถาบันการศึกษาและภาคเอกชนที่ต้องการทำธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลากะรัง

**ชื่อโครงการ** การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อการผลิตปลากะรังลูกผสมเชิงพาณิชย์

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย** ประจำปี พ.ศ. 2554 จำนวนเงิน 1,526,450 บาท

**ระยะเวลาทำการวิจัย** 1 ปี ตั้งแต่ ธันวาคม พ.ศ. 2554 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

**ชื่อผู้วิจัย** นางอโนชา กิริยากิจ (Dr. of Tech Science, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก)

นายทวีศิลป์ พิษพิสุทธิ์ (Ph.D., นักวิจัยอิสระ)

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเทคโนโลยีเก็บรักษาน้ำเชื้อมาบูรณาการเข้ากับการปรับปรุงพันธุ์ปลา เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์ปลากะรังจากโรงเพาะฟัก โดยมุ่งหาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*), ปลากะรังดอกดำ (*E. malabaricus*) และปลาหมอทะเล (*E. lanceolatus*) การวิจัยเริ่มต้นจากนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในสารละลาย ต่างกัน 4 สูตร ด้วยอัตราส่วน 1:0, 1:6, 1:9 และ 1:12 โดยปริมาตร และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 °C พบว่า สารละลายสูตรที่ 1 (Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.4 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีค่า osmolality 406 mOsm/L) และสูตร 2 (Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.3 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีค่า osmolality 355 mOsm/L) ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากะรังเสือ และปลากะรังดอกดำ สูงกว่าเมื่อเทียบกับสารละลายสูตรที่ 3 (Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.2 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีค่า osmolality 314 mOsm/L) และสูตร 4 (NaCl 0.9 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีค่า osmolality 300 mOsm/L) ในระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (7 วัน) ขณะที่ สารละลายสูตร 1 เท่านั้นทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลาหมอทะเลสูงที่สุดและสูงกว่าสูตรอื่นๆ และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อและอัตราส่วนของการเจือจาง โดยในปลากะรังเสือ และปลากะรังดอกดำสามารถใช้ได้ทั้งสารละลายสูตร 1 และสูตร 2 ในอัตราส่วนการเจือจาง 1:6 เท่านั้น ส่วนปลาหมอทะเลควรเลือกใช้สารละลายสูตร 1 ด้วยอัตราส่วนการเจือจาง 1:9 การเติมออกซิเจน (วันละ 10 วินาที) และยาปฏิชีวนะ ( $500\mu\text{g.mL}^{-1}$  Spectinomycin) ในขวดเก็บน้ำเชื้อก่อนนำไปแช่เย็น ไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพของการแช่เย็นน้ำเชื้อสูงขึ้น แต่เมื่อนำน้ำเชื้อแช่เย็นจากปลากะรังทั้งสามชนิดไปผสมเทียม พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวมากกว่า 60 %

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิดด้วยวิธีแช่แข็ง เริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ต่อน้ำเชื้อปลากะรังเสือ และปลากะรังดอกดำ โดยนำน้ำเชื้อปลาที่เจือจางแล้วมาเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ethanol, methanol, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethylene glycol, DMSO และ trehalose โดยแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 15 และ 20 % ที่อุณหภูมิ 0-4 °C ผลพบว่า เฉพาะ ethanol, DMSO และ propylene glycol ในทุกระดับความเข้มข้นเท่านั้นที่มีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ การทดลองต่อมาจึงนำ ethanol, DMSO และ propylene glycol ไปทดสอบการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือ programmable-controlled freezer โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 15 และ 20

% ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ  $-10^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$  พบว่า การใช้ 10 % DMSO และ 20 % DMSO ในปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด ส่วนการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล โดยใช้สารละลายสูตร 1 เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อ และใช้ 10 % DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่สำหรับปลากะรังเสือ และปลาหมอทะเล และใช้ 20 % DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่สำหรับปลากะรังดอกดำ ไปทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ  $5^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ ,  $10^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$  และ  $15^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$  พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ  $10^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$  ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด ในปลากะรังทั้งสามชนิดที่ทดสอบ และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งจากปลากะรังทั้งสามชนิดไปผสมเทียมกับไข่ของแม่ปลากะรังดอกแดง พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังทั้งสามชนิดที่ได้จากการทดลองนี้มีประสิทธิภาพสูงในการผสมเทียม เนื่องจากทำให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวมากกว่า 50 % ความสำเร็จจากโครงการศึกษานี้ หากได้มีการนำไปบูรณาการหรือขยายผลต่อไป จะทำให้วงการเลี้ยงปลากะรังเชิงพาณิชย์ก้าวหน้าไป และทำเงินรายได้ให้กับประเทศได้เป็นอย่างมาก

---

**คำสำคัญ:** เทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ, น้ำเชื้อแช่เย็น, น้ำเชื้อแช่แข็ง, ปลากะรังลูกผสม

**Project Title:** Development of Sperm Preservation Technology for Commercial of Grouper Hybrids Production

**Year of Research grants:** 2011 Budget 1,526,450 Baht

**Period of research:** 1 yrs. Since December, 2011 to November, 2012

**Name of Researcher:** Mrs. Anocha Kiriyaakit, (Dr. of Tech Science, University)  
Mr. Taweessin Peatpisut (Ph.D., freelance researcher)

### Abstract

Integration of sperm preservation and fish hybridization would be an attractive alternative for solving the problem of shortage grouper seed from hatchery. Therefore, this study focused to develop techniques for the storage of grouper sperm. Short-term storage of grouper sperm was conducted using tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*), malabar grouper (*E. malabaricus*) and giant grouper (*E. lanceolatus*) sperm. Three different formulas, formula I (5 g Dextrose + 0.4 g NaCl in 100 mL water with 406 mOsm/L osmolarity), formula II (5 g Dextrose + 0.3 g NaCl in 100 mL water with 355 mOsm/L osmolarity), and formula III (5 g Dextrose + 0.2 g NaCl in 100 mL water with 314 mOsm/L osmolarity) were tested as sperm extender. Freshly collected milt from these three groupers was diluted in special three sperm extenders, at ratios of 1:6, 1:9 and 1:12 by volume in Erlenmeyer flask prior to storing in refrigerator (0-4 °C). The results showed higher percentage of sperm motility with the formula I or II, compared to the formula III. A maximum dilution ratio for *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* milt was 1:6 by volume; in contrast, there was no effect from three dilution ratios on *E. lanceolatus* sperm. Additional statistical analysis in interaction effect of two factors, extender formula and dilution, suggests that using diluents either Formula 1 or Formula 2 with a diluted ratio of 1:6 gave the best efficiency chilled for *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* sperm. However, only Formula 1 with a diluted ratio of 1:9 was the best for *E. lanceolatus* sperm.

The effect of oxygenation and antibiotic admixture on efficiency of chilled milt after prolonged storage was investigated. Sperm of three grouper was diluted in appropriate dilute solution and dilution ratio according to the above results before oxygenation (for 10 second daily) and antibiotic (500 µg.mL<sup>-1</sup> Spectinomycin) were admixed. The results showed that; there was no significant different in successful storage period of those three grouper species sperm sample when oxygenation or antibiotic was applied. The results of artificial insemination using chilled sperm production, obtained

from the experiments, demonstrate the high efficiency of fertilization and hatching (more than 60%).

Cryopreservation of *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* sperm was studied based on evaluation on the toxicity of cryoprotectant on sperm motility, development of cryopreservation protocol, and the rate of freezing. Sperm of *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* were diluted with different cryoprotectants namely, ethanol, methanol, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethylene glycol, dimethylsulfoxide (DMSO) and trehalose at four concentration level, 5 %, 10 %, 15 % and 20 %, in Erlenmeyer flask at 0-4 °C. Ethanol, DMSO, and propylene glycol were less toxic to *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* sperm at these four level of concentration. These three cryoprotectants were later selected to be used for studying cryopreservation protocol. Cryopreservation of *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* sperm were accomplished by diluting sperm in ethanol, DMSO and propylene glycol at the concentration of 5 %, 10 %, 15 % and 20 % before they were cryopreserved with the freezing rate of 10 °C/min by programmable controlled-rate freezer. Results found that cryopreserved sperm of *E. fuscoguttatus* and *E. malabaricus* using 10% DMSO and 20 % DMSO, respectively showed the highest percentage of sperm motility after thawing. The effect of freezing rates on frozen sperm performance of *E. fuscoguttatus*, *E. malabaricus*, and *E. lanceolaus* were examined. Fresh sperm of *E. fuscoguttatus* and *E. lanceolaus* was diluted using extender Formula I and 10% DMSO as cryoprotectant; while, fresh sperm of *E. malabaricus* was diluted using extender Formula I and 10% DMSO as cryoprotectant. They were frozen using different freezing rate, 5, 10 and 15 °C/min. Results showed that all those three grouper species frozen sperm samples cryopreserved using the freezing rate of 10 °C/min had the highest sperm motility after thawing. The results of artificial insemination using frozen sperm production obtained from this study, demonstrate the high efficiency of fertilization and hatching (more than 50 %). When successfully of this study is expanded, grouper production and fish culture technology of Thailand will be developed.

---

**Key Words:** Sperm Preservation Technology, Liquid semen, Frozen semen, Grouper Hybrids

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ปลากะรัง (grouper) เป็นปลาเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยปีละหลายร้อยล้านบาท เนื่องจากมีความต้องการเพื่อการบริโภคสูงมาก ส่งผลให้ปลาชนิดนี้มีราคาดี ประกอบกับเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ให้ผลตอบแทนการเลี้ยงค่อนข้างสูง จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในแถบชายฝั่งทะเลภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศ การเลี้ยงปลากะรังได้รับการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่สามารถก้าวไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ โดยมีอุปสรรคที่สำคัญคือการขาดแคลนลูกพันธุ์จากโรงเพาะฟัก การเลี้ยงส่วนใหญ่ยังคงพึ่งพาลูกพันธุ์ที่รวบรวมจากธรรมชาติ ปัญหาหลักของการผลิตลูกพันธุ์จากโรงเพาะฟัก ได้แก่ อัตราการรอดตายต่ำจากการอนุบาลที่ยังไม่ได้รับการพัฒนามาจนทราบเท่าทุกวันนี้ เทคโนโลยีการผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) น่าจะใช้เป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาดังกล่าว เนื่องจากมีรายงานการวิจัยว่า ผลของการผสมข้ามพันธุ์สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้ โดยผ่านทาง การผสมผสานลักษณะที่ดีจากพ่อแม่สู่ลูก ทำให้ได้ลูกที่มีลักษณะตามที่ปรารถนา ดังเช่นผลจากการผลิตปลาดุกลูกผสม (*Clarias gariepinus* x *C. macrocephalus*) พบว่า ปลาลูกผสมที่ได้มีคุณภาพเนื้อ ความต้านทานโรค และการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นกว่าพ่อแม่ (Na-Nakorn, 1999)

มีรายงานความสำเร็จของการผสมข้ามพันธุ์ของปลากะรังในกลุ่ม *Epinephelus* อาทิเช่น การผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง *E. amblycephalus* x *E. akaara* ในฮ่องกง (Tseng and Poon, 1983) ระหว่าง *E. fuscogutatus* x *E. potyphkadion*, *E. costae* x *E. marginatus* และ *E. marginatus* x *E. aeneus* ในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน (Glamuzina et al., 1999 และ Glamuzina et al., 2001) ส่วนในประเทศไทย มีรายงานความสำเร็จของการทดลองผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างปลากะรังดอกแดงและปลาหมอทะเล (*E. coioides* x *E. lanceolatus*) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไว้เช่นกัน (Kiryakit et al., 2011) ดังนั้น การผสมข้ามพันธุ์ปลากะรังในกลุ่ม *Epinephelus* ด้วยกันจึงไม่ใช่เรื่องยาก เนื่องจากเป็นปลาที่มีความใกล้เคียงกันมากทางสายพันธุ์ (closely related species) แต่การผสมข้ามสายพันธุ์จำเป็นต้องพึ่งพาเทคโนโลยีการผสมเทียม โดยในขั้นตอนของการผสมเทียมปลานั้น สามารถใช้น้ำเชื้อได้ 3 ลักษณะ คือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแบบเหลวแช่เย็น (liquid semen) เก็บรักษาในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 0-4 °C และน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (frozen semen) เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C การเลือกเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยวิธีใดนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่สัมพันธ์กันระหว่างระยะเวลาความต้องการใช้และต้นทุนในการเก็บรักษา การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็น เป็นวิธีที่ใช้อุปกรณ์และวิธีการที่ง่าย สะดวก และราคาถูก มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาสั้นๆ น้ำเชื้อหาได้ง่ายหรือรวบรวมได้ง่าย วิธีนี้จึงนิยมใช้เมื่อมีความต้องการใช้น้ำเชื้อให้เกิดประโยชน์สูงสุดและมีต้นทุนการใช้น้อยที่สุด และยังมีข้อดีคือ เมื่อผสมเทียมแล้วให้อัตราการผสมติดสูงกว่าแบบแช่แข็ง แต่มีจุดอ่อน

คือ ระยะเวลาของการเก็บรักษาสัน ต้องนำไปใช้ผสมเทียมภายหลังการรีดเก็บและเจือจางด้วยสารเจือจางโดยเร็วที่สุด เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังระยะสั้นในตู้เย็น ควรได้รับการพัฒนาให้เป็นที่ยอมรับในวงการเพาะเลี้ยงปลามากขึ้น เพื่อให้สามารถยืดระยะเวลาการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลา จึงสามารถแก้ปัญหาเฉพาะหน้า เช่น กรณีความไม่พร้อมกันของน้ำเชื้อและไข่ที่รีดได้ เป็นต้น สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง แม้จะเป็นวิธีที่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาสูง และต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ แต่มีความสำคัญอย่างยิ่งในแง่การเก็บรักษาพันธุ์กรรม โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ให้คงคุณภาพได้ยาวนานหลายปี แม้ว่าพ่อพันธุ์จะตายไปแล้ว น้ำเชื้อแช่แข็งจึงมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงการอนุรักษ์พันธุ์กรรม เพื่อนำพันธุ์กรรมไปใช้ประโยชน์ในอนาคต นอกจากนี้ ยังมีประโยชน์ต่อปลาที่มีการกลายเพศ (sex reversal) หรือปลาที่การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ และเพศเมียเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน กรณีนี้จึงช่วยให้การจัดการเพาะพันธุ์ปลามีความสะดวกขึ้น เช่น การเพาะพันธุ์ปลาบางชนิด บางช่วงของฤดูกาลของตัวผู้อาจขาดแคลนน้ำเชื้อหรือมีน้ำเชื้อไม่สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ปลาตัวเมียมีไข่แก่ ซึ่งถ้ามีการแช่แข็งน้ำเชื้อเอาไว้ในช่วงที่มีน้ำเชื้อมาก ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ และรวมถึงการไม่ต้องขังพ่อพันธุ์ไว้ในโรงเพาะฟัก ทำให้ลดการใช้พื้นที่ภายในโรงเพาะฟัก

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น การศึกษาเพื่อนำเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อการผลิตลูกพันธุ์ปลากะรังจากโรงเพาะฟัก จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยแม้จะมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบวิธีแช่เย็นและแช่แข็ง อยู่หลายฉบับ แต่ส่วนใหญ่เป็นการรายงานที่มีการปฏิบัติในปลาน้ำจืด ส่วนการศึกษาในปลาทะเลยังมีน้อยเท่าที่ปรากฏเป็นหลักฐานได้แก่ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลาหมอทะเล (Kiriya *et al.*, 2011) ปลากะรังดอกแดง (Peatpisut and Bart, 2010) ปลากะรังหงส์ (เรณู และคณะ, 2553) และปลากะพงแดง (วีระพงศ์ และคณะ, 2552) แต่จากผลการศึกษาเหล่านั้นข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอและยังต้องการการพัฒนาต่อไปอีก เพื่อหาบทสรุปและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังที่มุ่งเน้นไปสู่การผลิตเชิงการค้ามากกว่าการทดลอง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรัง 3 ชนิด ได้แก่ ปลากะรังเสือ ปลากระดังงาดำ และปลาหมอทะเล ด้วยวิธีแช่เย็น (short-term chilled storage) และวิธีแช่แข็ง

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันพบว่า เทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา มีประโยชน์อย่างมากต่อการจัดการด้านการเพาะขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปลา รวมถึงการอนุรักษ์พันธุกรรมของปลา (Suquet *et al.*, 2000) โดยเทคโนโลยีนี้สามารถช่วยให้การจัดการเพาะพันธุ์ปลา มีความสะดวกมากขึ้น ช่วยลดปัญหาในกรณีที่ปลาเพศผู้และเพศเมียมีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน มีประโยชน์ต่อปลาที่มีการกลายเพศหรือปลาที่การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน และยังช่วยลดต้นทุนและลดการใช้พื้นที่ภายในโรงเพาะฟักกรณีเลี้ยงพ่อพันธุ์ไว้ นอกจากนี้เทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อยังช่วยเก็บรักษาพันธุกรรมของปลาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อให้สเปิร์มยังคงสภาพมีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษา และกระบวนการต่าง ๆ ในการเก็บรักษา เช่น สูตรหรือองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษา อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ ระยะเวลาที่ปล่อยให้สารซึมเข้าเซลล์ ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์ในขณะแช่แข็ง อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง และเทคนิคต่าง ๆ ก่อนการแช่แข็งและขณะเก็บรักษา ตลอดจนวิธีการนำไปใช้ผสมเทียมกับไข่ ดังนั้น เพื่อให้กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นไปอย่างถูกต้องและเหมาะสม กับปลาแต่ละชนิด ผู้ปฏิบัติจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจในพื้นฐานต่างๆ ดังต่อไปนี้

#### 2.1 น้ำเชื้อปลา และการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (Milt and Sperm Motility)

ความรู้ความเข้าใจในองค์ประกอบของน้ำเชื้อของปลา รวมถึงกระบวนการทางชีวเคมีพื้นฐานที่เกิดขึ้นระหว่างการเคลื่อนไหว และในขณะเข้าทำการปฏิสนธิของสเปิร์ม จะสนับสนุนให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ได้รับความสำเร็จมากขึ้น (Linhart *et al.*, 1991; Coward *et al.*, 2002; Ingermann *et al.*, 2002) โดยในน้ำเชื้อปลา (milt) ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ ได้แก่ สเปิร์มหรืออสุจิ (spermatozoa) กับ ส่วนที่เป็นของเหลว (seminal fluid) สเปิร์ม เป็นเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศผู้ที่ทำหน้าที่เข้าปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่และได้เป็นตัวอ่อน ส่วนของเหลวในน้ำเชื้อ ทำหน้าที่เป็นน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญอาหาร การมีชีวิต และการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (Bozkurt *et al.*, 2011) ของเหลวในน้ำเชื้อผลิตโดย sperm duct ประกอบด้วยไอออนต่าง ๆ ได้แก่  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Cl}^-$  เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบต่าง ๆ เหล่านี้จะมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันไปตามชนิดหรือกลุ่มของปลา (Suquet *et al.*, 1993; Billard *et al.*, 1995) ทั้งนี้ Bozkurt *et al.* (2011) กล่าวว่า ไอออนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเชื้อ อาทิเช่น  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  และ  $\text{Cl}^-$  ช่วยให้เกิดความสมดุลของออสโมติกในน้ำเชื้อ

ปริมาณและคุณภาพของน้ำเชื้อปลา จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ชนิด ขนาด อายุ ความสมบูรณ์เพศ ฤดูกาล และสิ่งแวดล้อม (Guest *et al.*, 1976; Laung and Jamieson, 1991; Wang and Crim, 1997) ยกตัวอย่างเช่น Büyükhatipoglu and Holtz (1984) สังเกตพบว่าการผลิตน้ำเชื้อและการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) เพิ่มขึ้นจากช่วงต้นฤดูวางไข่ไป

ยังช่วงกลางของฤดู และลดลงไปในช่วงปลายฤดูวางไข่ เช่นเดียวกับศิริพร และคณะ (2550) พบว่า น้ำเชื้อของปลาตุก (*Clarias gariepinus*) ที่รวบรวมในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เมื่อเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์และเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็น จะสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรวบรวมและรักษาในช่วงกลางฤดู หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ Shangguan and Crim, (1995) รายงานว่า อัตราการเคลื่อนไหวสูงสุดของสเปิร์มในปลา Winter flounder (*Pleuronectes americanus*) เกิดขึ้นในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์ ขณะที่ Sorbera *et al.* (1996) และ Fauvel *et al.* (1999) รายงานตรงกันว่า น้ำเชื้อของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ซึ่งประเมินจาก ความเข้มข้น ความสามารถว่ายน้ำในน้ำ อัตราการเคลื่อนไหว อัตราการปฏิสนธิ และระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์สเปิร์มให้มีสภาพมีชีวิต มีคุณภาพลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่

การเคลื่อนไหว (motility) ของสเปิร์ม เป็นตัวแปรที่สำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการปฏิสนธิ (Agarwal, 2005) และเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้บ่อยที่สุดในการประเมินคุณภาพของสเปิร์มปลา (Billard *et al.*, 1995; Lahnsteiner and Patzner, 1998) เนื่องจากสเปิร์มที่มีการเคลื่อนไหวเท่านั้นจึงจะสามารถเข้าปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ได้ Bozkurt *et al.* (2011) กล่าวว่า สเปิร์มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวต่ำ ๆ มักให้อัตราการปฏิสนธิต่ำ มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการเคลื่อนไหวของสเปิร์มกับค่าแรงดันออสโมติก (osmolarity) กล่าวคือ โดยทั่วไปสเปิร์มของปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม จะไม่มีการเคลื่อนไหวเมื่ออยู่ในอณูหรืออยู่ในสารละลายที่มีค่า osmolarity ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อ แต่เมื่อ osmolarity ลดลงจะมีผลในการกระตุ้นให้สเปิร์มของปลาน้ำจืดเคลื่อนที่มากขึ้น (Morisawa *et al.*, 1999) ในทางตรงข้ามสเปิร์มของปลาทะเลจะเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่า osmolarity สูงกว่าในระดับที่พบในของเหลวของน้ำเชื้อ (Morisawa *et al.*, 1983; Bates *et al.*, 1996 และ Gwo, 1993) นอกจากนี้ ความสามารถในการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างพื้นฐานของส่วนหางด้วย (Islam *et al.*, 2011) การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเกิดจากการทำงานของส่วนหาง (flagellum) โดยอาศัย adenosine triphosphate (ATP) ถ้าหางสเปิร์มมี ATP อยู่สูง จะสามารถเคลื่อนไหวได้แรงและเร็วกว่าที่ ATP ต่ำ (Amelar *et al.*, 1980) โดยทั่วไปสเปิร์มในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็มสามารถเคลื่อนไหวได้นานกว่าสเปิร์มของปลาน้ำจืด (Ginsburg, 1963) แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการเคลื่อนไหวได้ของสเปิร์มของปลาส่วนใหญ่อยู่ที่ 30 วินาที ถึง 1-2 นาที (Billard *et al.*, 1993) ดังนั้นการที่จะเก็บรักษาน้ำเชื้อให้อยู่ในสภาพมีชีวิตได้ระยะเวลานานขึ้นนั้น จึงจำเป็นต้องป้องกันไม่ให้สเปิร์มเคลื่อนที่ หรือลดการใช้พลังงานของสเปิร์ม เพราะเมื่อสเปิร์มมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วจะต้องใช้พลังงานมากขึ้น และเมื่อพลังงานหมดก็จะหยุดเคลื่อนไหวและไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปผสมกับไข่ได้

วิธีการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อได้ ตัวอย่างเช่น Ohta *et al.* (1997) เปรียบเทียบวิธีการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) พบว่า น้ำเชื้อที่เก็บรวบรวมโดยวิธีรัดด้วยมือ สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวดีกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรวบรวมโดยตรงจากอณู (intratesticular) ดังนั้นการสุมเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อการเก็บรักษาจำเป็นต้องให้ความระมัดระวังเกี่ยวกับความสมบูรณ์เพศของปลา ฤดูผสมพันธุ์วางไข่ อายุของผู้ให้สเปิร์ม และการปนเปื้อนระหว่างการเก็บรวบรวมเป็นสำคัญ

## 2.2 วิธีการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อปลา

โดยทั่วไปน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมปลา มีอยู่ 3 ลักษณะ คือ 1) น้ำเชื้อสด 2) น้ำเชื้อแบบเหลวแช่เย็น (liquid semen) เก็บรักษาในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 0-4 °C และ 3) น้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (frozen semen) เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C ในกรณีที่ไม่สามารถใช้น้ำเชื้อสดเพื่อการผสมเทียมปลาได้ และมีความจำเป็นต้องใช้น้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษานั้น การเลือกเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยวิธีใดนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่สัมพันธ์กันระหว่างระยะเวลาความต้องการใช้และต้นทุนในการเก็บรักษา โดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามี 2 แบบ เช่นเดียวกับวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสัตว์อื่น ๆ ดังนี้

1) การเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแบบระยะสั้น ( short-term, refrigerated storage) เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปของเหลวในที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 0 °C เล็กน้อย วิธีการคือใช้สารละลายหรือน้ำยา (extender) เจือจางน้ำเชื้อ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 0 – 4 °C ซึ่งส่วนใหญ่มักเก็บในตู้เย็นช่องปกติ หรือ แช่ในน้ำแข็ง วัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อนี้ก็เพื่อรักษาสภาพของน้ำเชื้อ ไว้ให้ยาวนานขึ้นโดยสเปิร์มที่เก็บรักษา ยังคงมีความสามารถในการปฏิสนธิเมื่อนำมาใช้ในการผสมเทียม โดยมีอัตราการผสมติดที่ยอมรับได้ (Bozkur *et al.*, 2009) การเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถเก็บได้ทั้งในสภาพเข้มข้น หรือ เจือจางด้วยสารละลายที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดต่าง ๆ โดยมีผู้ศึกษาการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อปลาชนิดต่างๆ ในระยะเวลาดังนี้

Stoss *et al.* (1987) แนะนำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดปลา Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ด้วยวิธีแช่เย็นโดยไม่เจือจางว่า ในขณะที่แช่เย็น ความสูงของน้ำเชื้อในภาชนะบรรจุไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร เพื่อให้สเปิร์มมีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ DiLauro *et al.* (1994) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของปลา Atlantic sturgeon โดยไม่มีการเจือจางใดๆ และวางไว้บนน้ำแข็งร่วมกับการให้ออกซิเจนสมทบทุกวัน พบว่า สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยคุณภาพสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

Satterfield and Flickinger (1995) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Walleye (*Stizostedion vitreum*) โดยการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ:สารละลายบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:2 ในกล่องแซนวิช (plastic rubbermaid sandwich container) ขนาด 11.4 x 10.8 ซม. แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C พร้อมทั้งให้ออกซิเจนสมทบทุกวัน ผลพบว่า น้ำเชื้อที่เก็บไว้นาน 5 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ดี มีอัตราการปฏิสนธิใกล้เคียงกับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ

Christensen and Tiersch (1996) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) โดยการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Hank' s balance salt solution แล้วเก็บในภาชนะต่าง ๆ กัน ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ทั้งในสภาพให้ออกซิเจนสมทบ และไม่ให้ออกซิเจนสมทบ ผลปรากฏว่า น้ำเชื้อที่เก็บในถุงพลาสติก Zip-loc และให้ออกซิเจนสมทบ สามารถเก็บได้ยาวนานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

จากการศึกษาของ Jenkins and Tiersch (1997) พบว่า หากใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล และมีการเตรียมสารละลายที่ไม่ดีพอ อาจมีแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมน้ำปนเปื้อนอยู่ และส่งผลให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อมีประสิทธิภาพต่ำลง ดังนั้น การเติมยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (Stoss, 1983) แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในระดับที่เข้มข้นมากเกินไปอาจเป็นพิษต่อเซลล์ของสเปิร์มได้ ดังนั้น ควรมีการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมกับปลาแต่ละชนิดก่อน (Christensen and Tiersch, 1996)

2) การเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อในระยะยาว (long term storage) เป็นการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง (frozen semen) มี 2 แบบ คือ แบบบรรจุหลอดฟาง (ministraw) แช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  โดยใช้ไนโตรเจนเหลวในการรักษาอุณหภูมิ และอีกวิธีเป็นการแช่แข็งแบบเป็นเม็ด (pellet) ใช้น้ำแข็งแห้ง (solid carbondioxide) ในการรักษาอุณหภูมิที่  $-79^{\circ}\text{C}$  ซึ่งแบบนี้ในปัจจุบันไม่เป็นที่นิยม เพราะไม่สะดวกในการละลายใช้

เนื่องจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง เป็นการรักษาสภาพของเซลล์สเปิร์มไว้ในที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ และต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ ทำให้น้ำเชื้อปลาในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งโดยปกติจะเก็บในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถหยุดกลไกการทำงานของเซลล์ได้เกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตาม การที่จะแช่แข็งน้ำเชื้อให้ประสบความสำเร็จนั้น จะต้องมีการบวนการต่าง ๆ ที่จะทำให้เซลล์รอดตายจากผลของการลดอุณหภูมิ ซึ่งได้แก่ การผสมสารปกป้องสเปิร์มระหว่างการแช่แข็ง การกำหนดอัตราลดอุณหภูมิ วัสดุที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง ฯลฯ ซึ่งหากมีการปรับกระบวนการต่างๆ เหล่านี้จนเหมาะสมกับปลาชนิดนั้นแล้ว จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ยาวนานหลาย ๆ ปี

รพีพรรณ และคณะ (2548) อธิบายวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาระยะยาวโดยวิธีแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว โดยทั่วไปมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

- 1) เก็บรวบรวมน้ำเชื้อจากปลาที่มีสุขภาพดี มีความสมบูรณ์เพศ โดยควรเลือกเก็บในช่วงที่เป็นจุดสูงสุด (peak) ของฤดูผสมพันธุ์วางไข่ น้ำเชื้อที่รวบรวมได้ ควรได้รับการตรวจสอบคุณภาพก่อนการเก็บรักษา โดยน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาก หรือเป็นน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนไหวมากกว่า 75 % เท่านั้น จึงจะเหมาะสมในการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว
- 2) น้ำเชื้อที่รวบรวมได้นำมาเจือจางด้วยสารเจือจาง โดยชนิดและอัตราส่วนของสารเจือจางที่ใช้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา ต่อจากนั้นผสมสารปกป้องสเปิร์มจากการถูกแช่แข็ง (ไครโอโพรเทคแทนท์) ในความเข้มข้น 7-12 % ของปริมาตรสารละลายน้ำเชื้อทั้งหมด (final concentration)
- 3) บรรจุสารละลายน้ำเชื้อ (ข้อ 2) ใส่ภาชนะบรรจุ (หลอดฟาง, หลอดไครโอ) และปล่อยให้ระยะเวลาให้มีการปรับตัว (equilibration time) เพื่อให้โมเลกุลของสารปกป้องสเปิร์มแพร่

เข้าไปในเซลล์ของสเปิร์มอย่างเต็มที่ ณ ช่วงระยะเวลาหนึ่งๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เวลานาน 15 – 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 – 25 °C ภาชนะเก็บน้ำเชื้อควรมีการเขียนกำกับที่ข้างหลอด เช่น ชนิด และรายละเอียดของปลา วันที่เก็บ หรือใช้หลอดที่มีสีต่างๆ กัน เพื่อให้สะดวกต่อการแยกแยะ

- 4) นำภาชนะบรรจุน้ำเชื้อที่ปรับตัวเรียบร้อยแล้วเข้าเครื่องลดอุณหภูมิ (freezing control) ซึ่งตั้งอัตราการลดอุณหภูมิ (หน่วยเป็น °C/นาที) ไว้แล้ว (ในกรณีเครื่องอัตโนมัติ) หรือเติมไนโตรเจนเหลวไว้ที่ระดับหนึ่งๆ ห่างจากภาชนะบรรจุที่ระยะหนึ่งๆ (ในกรณีใช้ไอของไนโตรเจนเหลว) เริ่มการลดอุณหภูมิโดยกดเริ่มโปรแกรมหรือจับเวลา (15–20 นาที) จนเสร็จสิ้นกระบวนการลดอุณหภูมิ ซึ่งจะทำให้ตัวอย่างถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -52 ถึง -80 °C
- 5) นำภาชนะบรรจุน้ำเชื้อออกจากเครื่องลดอุณหภูมิและใช้ปากคิบบีบที่จุ่มปลายลงในไนโตรเจนเหลว คีบหลอดใส่ลงในช่องเก็บ (goblet) ในถังเก็บตัวอย่างในถังที่มีไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 °C)
- 6) เนื่องจากไนโตรเจนเหลวมีการระเหยตลอดเวลาส่งผลให้ระดับไนโตรเจนเหลวในถังลดลงเรื่อยๆ จนภาชนะที่เก็บน้ำเชื้ออาจพ้นออกจากไนโตรเจนเหลว และส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว โดยปกติไนโตรเจนเหลวจะลดลงประมาณ 1–4 ซม./สัปดาห์ มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณภาพของถังเก็บและอุณหภูมิห้อง ดังนั้น จึงต้องมีการเติมไนโตรเจนเหลวในถังเก็บอย่างสม่ำเสมอ
- 7) เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียม นำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้ปากคิบบีบภาชนะบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังเก็บ นำไปละลายโดยแกว่งภาชนะเก็บน้ำเชื้อในน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 37–40 °C นานจนกว่าน้ำเชื้อในภาชนะบรรจุจะละลายหมด (ในหลอดฟาง นาน 5–8 วินาที, ในหลอดไครโอ (cryotube) นานประมาณ 1 นาที) น้ำเชื้อที่ละลายแล้วสามารถนำไปใช้ผสมเทียมได้ทันที

## 2.3 สารเจือจางน้ำเชื้อ (Semen Extender)

น้ำเชื้อที่ได้จากการรีดจากปลามักมีความหนืดและปริมาตรน้อย (Muchlisin, 2005) เช่น ในปลากะรังดอกดำ น้ำเชื้อที่รีดได้มีปริมาตรประมาณ 0.5 มิลลิลิตร (Gwo, 2002) แต่มีจำนวนสเปิร์มเพียงพอที่จะผสมกับแม่ปลาได้หลายตัว อย่างไรก็ตามการแบ่งน้ำเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นี้ ออกเป็นหน่วยย่อยๆ นั้นเป็นเรื่องยาก จึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อเสียก่อน โดยการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ (semen extender หรือ diluter) ลงไป (Muchlisin, 2005) ขณะเดียวกัน มีนักวิจัยหลายท่านให้ความเห็นตรงกันว่า การเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไม่ควรเก็บสดหรือเก็บรักษาทันทีหลังจากที่รวบรวมได้ แต่ควรเก็บในรูปที่เจือจางแล้ว (diluted sperm) เนื่องจากสารเจือจางจะช่วยควบคุมกระบวนการเคมีและฟิสิกส์ในระหว่างการเก็บรักษา (Stoss, 1983) และมีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงความสำคัญของการเจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อใช้ในอนาคต เช่น การเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางที่เหมาะสมจะช่วยยืดอายุสเปิร์มได้มากกว่าการเก็บสดโดยไม่เจือจาง (Hogendoorn and Vismans, 1980; Withler and Lim, 1982; Harvey and Kelley, 1984) การใช้

น้ำเชื้อที่เจือจางแล้วจะช่วยให้อัตราการผสมติด (fertilization rate) ดีกว่าการใช้น้ำเชื้อที่ไม่เจือจาง (Peon and Johnson, 1970; Billard *et al.*, 1974; Rieniets and Millard, 1987)

สารเจือจางน้ำเชื้อ ควรเป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติและองค์ประกอบคล้ายคลึงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม สารเจือจางที่ดีต้องไม่ทำอันตรายต่อเซลล์สเปิร์ม สามารถยืดอายุของสเปิร์มให้มีชีวิตนานขึ้นและควรมีระดับ osmolarity (ค่าที่บอกปริมาณตัวถูกละลายทั้งหมดในตัวทำละลาย 1 กิโลกรัม มีหน่วยเป็น mOsmol/kg) ใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มของปลาชนิดนั้นๆ ทั้งนี้เพื่อคงให้สเปิร์มอยู่ในสภาพไม่เคลื่อนไหวตลอดเวลา (Graham, 1978) ซึ่งจะทำให้คงความสมบูรณ์พันธุ์ของสเปิร์มได้และมีความสามารถในการเข้าผสมกับไข่ได้ การจะเลือกสารชนิดใดสำหรับการเจือจางนั้นจำเป็นต้องได้รับการศึกษา เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสารเจือจางอาจจะส่งผลกระทบต่อการศึกษา ตามที่นักวิจัยหลายท่านได้พยายามศึกษาหาสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีองค์ประกอบทางไอออนิกตรงกับในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (Billard and Jalabert, 1974; Erdahl and Graham, 1987) สารเจือจางน้ำเชื้อที่นิยมใช้ทั่วไปในปลาทะเลได้แก่ น้ำเกลือ (1-10 %) หรือสารละลายน้ำตาล (5-10 %) (Suquet *et al.*, 2000) สารเจือจางแต่ละชนิดมีความเฉพาะกับปลาแต่ละชนิด เช่น สารละลาย Mounib เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Seabass (*Dicmcranchus labrax*) และ Turbot (*Scophthalmus maximus*) (Mounib, 1978) แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลา Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) (Gwo *et al.*, 1991) ชนิดของสารเจือจางที่มีความเหมาะสมกับปลารวบรวมไว้ในตารางที่ 1

อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารเจือจางขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสเปิร์มในปลาแต่ละชนิด เช่น ในปลา Atlantic croaker พบว่าสเปิร์มมีอัตราลดน้อยลงในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางที่มากกว่า 1: 20 (Gwo *et al.*, 1991) ส่วนในปลา Seabream สเปิร์มมีอัตราลดน้อยลงในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางที่มากกว่า 1: 50 (Chambeyron and Zohar, 1990) ระยะเวลาการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา Black grouper ลดลงจาก 40 นาที เหลือเพียง 2 นาที เมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารเจือจางจาก 1:10 เป็น 1:100 (Gwo, 1993) การเพิ่มอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารเจือจางจาก 1:1 เป็น 1:9 ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา Turbot ภายหลังการละลายน้ำจากที่แช่แข็ง (Dreanno *et al.*, 1997) แต่ในทางตรงข้าม Billard *et al.* (1974) รายงานว่า ความสำเร็จของการผสมติดในปลา Rainbow trout อยู่ในระดับสูง (70-80 %) เมื่อใช้ไข่ปริมาณ 800 ฟอง ผสมกับน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อกับสารเจือจางน้ำเชื้อเท่ากับ 1: 100

**ตารางที่ 1** องค์ประกอบในสารเจือจางน้ำเชื้อที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทะเลชนิดต่าง ๆ

| ชนิดปลา          | ส่วนประกอบของสารเจือจาง                         | อ้างอิง                        |
|------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|
| Atlantic croaker | NaCl, Glucose or Sucrose                        | Gwo <i>et al.</i> , (1991)     |
| Atlantic halibut | NaCl, Glycine, NaHCO <sub>3</sub>               | Bolla <i>et al.</i> , (1987)   |
| Barramundi       | Ringer solution for freshwater fish             | Leung (1987)                   |
| Black grouper    | NaCl                                            | Gwo (1987)                     |
| Cod              | Sucrose, reduced glutathione, KHCO <sub>3</sub> | Mounib (1978)                  |
| Grey mullet      | Ringer solution for marine fish                 | Chao <i>et al.</i> , (1975)    |
| Grouper          | NaCl, NaHCO <sub>3</sub> , Fructose, Lecithin   | Withler and Lim (1982)         |
| Hirame           | Ringer solution for freshwater fish             | Tabata and Mizuta (1997)       |
| Mullet           | Ringer solution for marine fish                 | Joseph and Rao (1993)          |
| Ocean pout       | Medium mimicking seminal fluid                  | Yao <i>et al.</i> , (1995)     |
| Pacific herring  | Ringer solution for marine fish                 | Pillai <i>et al.</i> , (1994)  |
| Plaice           | NaCl                                            | Pullin (1972)                  |
| Puffer           | Glucose                                         | Gwo <i>et al.</i> , (1993)     |
| Seabass          | Sucrose, reduced glutathione, KHCO <sub>3</sub> | Fauvel <i>et al.</i> , (1998)  |
| Seabream         | NaCl                                            | Barbato <i>et al.</i> , (1996) |
| Turbot           | Sucrose, reduced glutathione, KHCO <sub>3</sub> | Dreanno <i>et al.</i> , (1997) |

## 2.4 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant)

เนื่องจากในกระบวนการแช่แข็ง จะมีการลดอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ ทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และการสูญเสียน้ำของเซลล์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อเซลล์ ดังนั้น การที่จะเก็บรักษาน้ำในสภาพแช่แข็งให้ประสบความสำเร็จนั้นจะต้องมีกระบวนการต่างๆที่จะทำให้สเปิร์มรอดตายจากผลของการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการต่างๆ ดังกล่าว ได้แก่ การใส่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งให้แก่เซลล์ ซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ และ อัตราการลด-เพิ่มอุณหภูมิ (Freezing-thawing rate)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ แบ่งตามความสามารถในการซึมผ่านเข้าออกเซลล์ได้ ออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1) กลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (premeating cryoprotectant) สารเคมีกลุ่มนี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดน้ำแข็งขณะแช่แข็ง ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ที่เคยมีผู้ทดสอบในปลาทะเล ได้แก่ ethylene, propylene glycol, glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), และ methanol สารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นข้างสูง (1-4

M) ถ้าพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ พวกที่เป็นแอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ DMSO และ glycerol ตามลำดับ (Suquet *et al.*, 2000)

2) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อทั่วไป นิยมใช้ DMSO glycerol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ คิดเป็น 98 %, 50 % และ 29 % ของรายงาน (Tiersch, 2000) DMSO ให้ผลในการเก็บรักษาดีที่สุด เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์สเปิร์มได้อย่างรวดเร็ว รวมถึงคุณสมบัติที่สามารถทำงานร่วมกับ phospholipid ในเนื้อเยื่อของสเปิร์ม (Ogier de Baulny *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตาม DMSO จะเป็นพิษเมื่อใช้ในระดับเข้มข้นสูง เช่น Leung (1987) พบว่า การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลากะพงขาวลดลงเมื่อใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5 % เช่นเดียวกับ Gwo (1993) พบว่า การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา Black grouper (*E. malabaricus*) ลดลงเมื่อใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 30 % การใช้แอลกอฮอล์ เช่น methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นสารเคมีที่หาง่ายและราคาถูก แต่กลับพบว่า methanol ให้ประสิทธิภาพต่ำในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลากะพงขาว (Leung, 1987) และปลา Turbot (Dreanno *et al.*, 1997) และไม่มีประสิทธิภาพในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลา Atlantic croaker (Gwo *et al.*, 1991) ethylene glycol และ propylene glycol ให้ผลปานกลางในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลา Atlantic croaker (Gwo *et al.*, 1991) และปลา Yellowfin seabream (*Acanthopagrus australis*) (Gwo, 1994) การใช้ glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ มีประสิทธิภาพในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลา Striped trumpeter (*Latris lineate*) และปลา Yellowfin seabream ดีกว่าการใช้ DMSO (Thorogood and Blackshaw, 1992; Riter and Campet, 1995) นอกจากนี้การใช้ glycerol ให้ประสิทธิภาพสูงในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลา Yellowfin seabream (Gwo, 1994) แต่ให้ประสิทธิภาพต่ำในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลา Turbot (Dreanno *et al.*, 1997) และไม่มีประสิทธิภาพในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลา Black grouper (Gwo, 1993) Peatpisut and Bart (2010) รายงานว่า การใช้ trehalose ให้ประสิทธิภาพในการปกป้องอันตรายให้แก่สเปิร์มในปลากะรังดอกแดง (*E. coioides*) ดีกว่า DMSO จากตัวอย่างทั้งหมด จึงเห็นได้ว่า สารชนิดหนึ่งจะมีความเฉพาะเจาะจงกับปลาแต่ละชนิด (species-specific) ดังนั้นการเลือกใช้สารใดให้ทำหน้าที่เป็นสาร ไครโอโพรเทคแทนท์นั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบก่อนสำหรับปลาชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการทดสอบมาก่อน

3) กลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Non-premeating cryoprotectant) สารเคมีกลุ่มนี้ไม่ซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ แต่จะใช้ร่วมกับกลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เพื่อเป็นตัวปรับแรงดันออสโมติก และทำหน้าที่เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ร่วมกัน ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ polyvinylpyrrolidone (PVP), hydroxyethyl starch (HES) , dextrans, albumin, polyethylene glycol และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น sucrose, glucose และ mannitol เป็นต้น

ในการแช่แข็งสเปิร์มในปลาน้ำจืด นิยมใช้สารกลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ เช่น proteins หรือ lipoprotein (ไข่แดง) ในการปกป้องอันตรายให้แก่เยื่อหุ้มเซลล์ (Scott และ Baynes, 1980) เนื่องจากสารเหล่านี้เพิ่มความสามารถในการทนทานต่อแรงดันออสโมติก และเพิ่มประสิทธิภาพการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา Rainbow trout (Cabrita *et al.*, 1998) แต่ในปลาทะเล พบว่า สารกลุ่มนี้ไม่ช่วยปกป้อง

อันตรายให้แก่สเปิร์มแต่อย่างใด ยกตัวอย่างเช่น การเติมไข่แดงของไก่ในอัตรา 10 % ระหว่างการแช่แข็ง ไม่ช่วยให้อัตราการมีชีวิตของสเปิร์มในปลา Pacific herring ดีขึ้นแต่อย่างใด (Pillai *et al.*, 1994)

## 2.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้สารซึมผ่านเซลล์ (Equilibration time)

ช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารโคริโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง ซึ่งในยุคแรก ๆ ของการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อมีข้อเสนอแนะว่า จะต้องนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่เติมสารโคริโอโพรเทคแทนท์แล้ว วางไว้ในตู้เย็นระยะหนึ่ง ระยะเวลานี้เรียกว่า equilibration time แต่ต่อมา Ott and Horton (1971) เป็นรายแรกที่ยกเลิกริธิดังกล่าว เมื่อใช้ DMSO แทนการใช้ glycerol เนื่องจาก DMSO แพร่เข้าไปในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ยังมีการทดลองที่นิยมให้มี equilibration time อยู่ ขณะที่ Tabata and Mizuta (1997) แนะนำว่าภายหลังจากเติมสารโคริโอโพรเทคแทนท์ผสมลงในน้ำเชื้อแล้ว จำเป็นต้องใช้เวลาอย่างเหมาะสมเพื่อให้สารสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 15 ถึง 30 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและความเข้มข้นที่ใช้ หากจำเป็นต้องใช้สารที่พบว่าค่อนข้างมีพิษต่อสเปิร์ม ก็ควรใช้เวลาช่วง equilibration time ให้สั้นลง และพวกเขายังรายงานอีกว่า equilibration time ในช่วง 10 ถึง 60 นาที ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการปฏิสนธิในปลา Hiramé

เนื่องจากสเปิร์มมีขนาดเล็กมาก การซึมผ่านของสารโคริโอโพรเทคแทนท์ โดยเฉพาะ DMSO เข้าสู่เซลล์สเปิร์มจึงเป็นไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น equilibration time จึงไม่จำเป็น (Jamieson, 1991) นอกจากนี้ การไม่ให้มี equilibration time ยังเป็นการลดปัญหาความเป็นพิษของ DMSO อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก Gwo (1994) รายงานว่า การเพิ่ม equilibration time จาก 5 นาที เป็น 60 นาที และการเพิ่มความเข้มข้นของ DMSO จาก 10 % เป็น 30 % ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา Yellowfin seabream ลดลง ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการใช้ glycerol เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ การเพิ่ม equilibration time จาก 10 นาที เป็น 30 นาที ทำให้สเปิร์มแช่แข็งของปลา Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) ภายหลังจากละลายมีการเคลื่อนไหวดีขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทางตรงข้ามเมื่อใช้ DMSO เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ (Doi *et al.*, 1982) ทั้งนี้เนื่องจาก glycerol มีความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ช้า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมี equilibration time

## 2.6 อัตราการลดอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็ง

ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมินั้น สารโคริโอโพรเทคแทนท์จะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นคือ อัตราการลดอุณหภูมิที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์หรือให้เกิดน้อยที่สุด และอัตราการลดอุณหภูมิดังกล่าวจะต้องเป็นอัตราที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำ และการแตกหักของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ (Niemann, 1984) อันตรายที่เกิดจากเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ขณะทำการแช่แข็งคือการสูญเสียน้ำ น่าจะเกิดขณะทำการลดอุณหภูมิจาก  $-15^{\circ}\text{C}$  ถึง  $-50^{\circ}\text{C}$  เพราะหลังจากนั้น สามารถจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงสู่ถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  ได้ทันที นอกจากนี้เทคนิคในการอุณหภูมิต่อสองขั้นตอน (two step freezing) คือ ขั้นแรกจะลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นลงไปสู่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลว และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินั้น ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ซึ่งจะพบว่าได้ผลดีเช่นกัน (Suquet *et al.*, 2000) อัตราการลดอุณหภูมิที่ถูกใช้บ่อยๆ เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่แข็งในปลาทะเลแสดงไว้ในตารางที่ 2

ความอดทนของเซลล์สเปิร์มในปลา Seabream ต่ออัตราการลดอุณหภูมิ มีค่อนข้างต่ำ โดย Billard (1978) พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งที่ระดับ  $10^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  เป็นอัตราที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อของปลา Seabream เมื่อเปรียบเทียบกับ 1, 5, 20, 50 และ  $100^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  ขณะที่อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งที่ระดับ  $5^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  ทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic cod ประสบความสำเร็จมากกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ  $1^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  (Mounib *et al.*, 1968) Conget *et al.* (1996) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Rainbow trout แบบแช่แข็ง โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดต่าง ๆ รวมถึงศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิสามแบบ (อย่างรวดเร็ว ปานกลาง และอย่างช้า ๆ) ผลพบว่า การใช้ DMSO ร่วมกับ sucrose โดยมีระยะเวลาให้สารซึมผ่านเข้าเซลล์ไม่ควรเกิน 10 นาที ให้ผลดีที่สุด ส่วนการใช้อัตราการลดอุณหภูมียังรวดเร็ว ( $30^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$ ) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงกว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมียังช้า ๆ และปานกลาง ( $1^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  และ  $10^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$ ) การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ  $99^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  มีความเหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Turbot ส่วนการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ 46 และ  $148^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวหลังละลายลดลงเหลือ 8 และ 30 % ตามลำดับ (Dreanno *et al.*, 1997) ดังนั้น จึงเห็นได้ว่า การจะเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เท่าใดจึงเหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของปลา

**ตารางที่ 2** อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทะเลชนิดต่างๆ ที่มีรายงานไว้

| ชนิดปลา    | อัตราการลดอุณหภูมิ<br>( $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$ ) | อ้างอิง                        |
|------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Barramundi | 31                                                      | Leung (1987)                   |
| Cod        | 5                                                       | Mounib <i>et al.</i> , (1968)  |
| Hirame     | 8                                                       | Tabata and Mizuta (1997)       |
| Seabass    | 10                                                      | Villani and Catena (1991)      |
| Seabass    | 65                                                      | Fauvel <i>et al.</i> , (1998)  |
| Seabream   | 10                                                      | Barbato <i>et al.</i> , (1996) |
| Turbot     | 99                                                      | Dreanno <i>et al.</i> , (1997) |

ในขั้นตอนการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง จำเป็นต้องใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (thawing rate) อย่างรวดเร็วเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็ง (recrystallization) โดยทั่วไปอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้กับปลาทะเลจะต่ำกว่าในปลาน้ำจืด (Rana, 1995) การใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ระดับ 10 และ  $30^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา Striped trumpeter (Ritar and Campet, 1995) เช่นเดียวกัน การละลายสเปิร์มแช่แข็ง ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ระดับ 20 และ  $40^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$  ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ในปลา Turbot (Dreanno *et al.*, 1997) แต่การเพิ่มอุณหภูมิในขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็งจาก 1 °C เป็น 30 °C ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลา Ocean pout ลดลง (Yao *et al.*, 1995) ขณะเดียวกัน สเปิร์มแช่แข็งของปลา Atlantic croaker เมื่อละลายที่ 0 °C ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิ ต่ำกว่าการละลายที่ 25 °C และ 50 °C (Gwo *et al.*, 1991) Bolla *et al.* (1987) เสนอแนะว่า อัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา Atlantic halibut ที่เก็บในหลอดฟางและการเก็บในรูปเม็ด คือ 10 °C/นาที่ และ 40 °C/นาที่ ตามลำดับ

## 2.7 วัสดุเก็บน้ำเชื้อเพื่อการเก็บรักษาในถังไนโตรเจน

วัสดุที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมีหลายแบบ ได้แก่ หลอดฟาง (French straw) หลอดนิดยา (ampoule) และหลอดไครโอ (cryotube) เป็นต้น ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ผู้ใช้จึงต้องเลือกตามความเหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บและวิธีการเก็บรักษา (กฤษณ์, 2536) ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ มีหลายขนาดได้แก่ 0.25 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ควรใช้หลอดที่มีความจุอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร ขึ้นไป (Chandler, 2000) เพราะต้องผสมกับไข่จำนวนมากภายหลังการละลาย จึงต้องให้มีจำนวนสเปิร์มมากพอต่อการผสม และหลอดควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดพอที่จะทำให้ น้ำเชื้อได้รับการลดอุณหภูมิที่สม่ำเสมอ

## 2.8 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา (Assessing fish milt quality)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ดำเนินการภายใต้วัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ปลาซึ่งต้องทำทุกครั้งหลังจากการรีดเก็บน้ำเชื้อและรักษาอุณหภูมิน้ำเชื้อให้อยู่ในระดับ 0-4 °C จนถึงกระบวนการประเมินคุณภาพ เพื่อตรวจสอบว่าคุณภาพของน้ำเชื้ออยู่ในเกณฑ์ปกติหรือไม่ ถ้าคุณภาพน้ำเชื้อไม่ดีหรือต่ำกว่าเกณฑ์ปกติ ก็ควรทิ้งน้ำเชื้อนั้นไปก่อนจะนำเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ถ้าคุณภาพน้ำเชื้อนั้นดีสูงกว่าปกติ จึงจะสามารถนำมาเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ ดังนั้น การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ จะเพิ่มโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการผสมเทียม หรือสามารถบอกคุณภาพของน้ำเชื้อเพื่อเก็บรักษาในลักษณะสดหรือกระบวนการเก็บรักษาระยะยาว เทคนิคการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหรือสเปิร์มของปลาได้รับการพัฒนามาโดยตลอด วิธีที่ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาที่มีการใช้ทั่วไปได้แก่

### 1) ความสามารถในการเข้าปฏิสนธิกับไข่

การใช้ความสามารถในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ เพื่อการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อนั้น จัดว่าเป็นวิธีทางอ้อม โดยวิธีนี้อาจไม่น่าเชื่อถือ หากไข่ปลาที่นำมาปฏิสนธิด้วยนั้นมีคุณภาพต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากในปลาบางชนิด ความพร้อมของไข่อาจไม่ตรงกับความพร้อมของสเปิร์ม นอกจากนี้จำนวนสเปิร์มต่อจำนวนไข่ รวมถึงระยะเวลาที่ให้สเปิร์มเข้าปฏิสนธิกับไข่นั้นก็อาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธิได้ (Suquet *et al.*, 1995 และ Chereuini *et al.*, 1998)

การใช้ความสามารถในการเข้าปฏิสนธิกับไข่เพื่อการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อนั้น ควรใช้ร่วมกับการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อวิธีอื่น ๆ ด้วย ดังที่นักวิจัยหลายท่าน ได้รายงานไว้ว่าการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (ทั้งน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็ง) เช่น ในปลา Rainbow trout (Lahnsteiner *et al.*,

1996) ในปลา African catfish (Rurangwa *et al.*, 2001) และในปลา Atlantic halibut (Tvedt *et al.*, 2001) มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเข้าปฏิสนธิกับไข่

## 2) คุณลักษณะของน้ำเชื้อ

### 2.1) จำนวนสเปิร์มในน้ำเชื้อ

วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ค่าความเข้มข้นของสเปิร์ม ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยการนำน้ำเชื้อมาหยดใส่แผ่นสไลด์ (haemocytometer หรือ counting chamber) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยตรง แล้วนับจำนวนสเปิร์ม (จำนวนสเปิร์ม/น้ำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร) แต่ Rakitin *et al.* (1999) ให้ข้อคิดเห็นว่า วิธีดั้งเดิมนี้อยู่ด้อยประสิทธิภาพ ทำงานลำบาก และใช้เวลามากเกินไป เมื่อต้องประเมินน้ำเชื้อของปลาตัวผู้หลาย ๆ ตัว ในช่วงเวลาสั้น ๆ ต่อมาวิธีนี้ได้ถูกพัฒนาให้เร็วขึ้นโดยการนำน้ำเชื้อไปปั่นแยก (centrifugation) เพื่อดูปริมาณ spermatocrit (อัตราส่วนระหว่างปริมาตรส่วนขาวชั้นต่อปริมาตรน้ำเชื้อทั้งหมด  $\times 100$ ) และปัจจุบันการนับความเข้มข้นของสเปิร์มสะดวกและง่ายขึ้นมาก เนื่องจากมีอุปกรณ์ (Spectrophotometer) ช่วยในการประมาณจำนวนของตัวสเปิร์ม วิธีการคือ นำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปผ่านเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectro-photometer) เครื่องจะแสดงค่าออกมา นำค่าที่เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์แสดงออกมานี้ ไปเทียบกับตารางมาตรฐาน ก็จะได้ความเข้มข้นของตัวสเปิร์มตามต้องการ

ปัจจุบันนี้ยังไม่มีหน่วยวัดความเข้มข้นของสเปิร์มที่เป็นมาตรฐาน เนื่องจากการรายงานของนักวิจัยต่างกัน เช่น รายงานเป็นจำนวนสเปิร์ม (เซลล์) ต่อน้ำหนักรวบรวม ปลา บางท่านรายงานเป็นจำนวนสเปิร์ม (เซลล์) ต่อน้ำหนักอวัยวะ และบางท่านรายงานเป็นจำนวนสเปิร์ม (เซลล์) ต่อปลา 1 ตัว แต่ รพีพรรณ และคณะ (2548) ระบุว่า การรายงานหน่วยค่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อควรรายงานเป็นจำนวนสเปิร์มต่อปริมาตรน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร และควรบอกปริมาตรน้ำเชื้อทั้งหมดที่รวบรวมได้ไว้ด้วย ทั้งนี้สเปิร์มที่มีความเข้มข้นสูงไม่ได้หมายความว่าจะมีอัตราการเคลื่อนไหวหรือมีอัตราการปฏิสนธิสูงเสมอไป (Geffen and Evans, 2000 และ Williot *et al.*, 2000)

### 2.2) องค์ประกอบของของเหลวในน้ำเชื้อ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของของเหลวในน้ำเชื้อได้แก่ การวิเคราะห์องค์ประกอบอนินทรีย์ เช่น  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  เป็นต้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง หรือกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (Morisawa, 1985; Morisawa *et al.*, 1983) การวิเคราะห์องค์ประกอบอินทรีย์ที่บ่งบอกถึงพลังงานเผาผลาญอาหาร ได้แก่ triglycerides, glycerol, fatty acids, glucose, lactate เป็นต้น (Lahnsteiner *et al.*, 1993) และการวิเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ ในน้ำเชื้อ เช่น creatine kinase, malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase (Grunczewska *et al.*, 2003 และ Rurangwa *et al.*, 2002) การวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น เคยถูกใช้เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อมาแล้วทั้งสิ้น แต่จะเห็นว่าการประเมินด้วยวิธีเหล่านี้ไม่สามารถอธิบายศักยภาพของสเปิร์มแต่ละตัวในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้เลย

### 3) การวัดคุณภาพของสเปิร์มแต่ละตัว

3.1) การนับจำนวนตัวเป็นตัวยาย (The live-dead sperm count) การตรวจนับจำนวนสเปิร์มเป็นและตาย ทำได้โดยการย้อมสี ซึ่งสีที่ใช้ย้อมได้แก่ Eosin B-Nigrosin โดยมีหลักการคือ สเปิร์มที่ตาย ผนังเซลล์จะเสื่อมสภาพ ยอมให้สีซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ ดังนั้นสเปิร์มที่ตายจะติดสี ส่วนสเปิร์มที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี วิธีการคือ ใช้น้ำเชื้อ 1 หยดเล็ก ๆ ผสมกับสี Eosin B-Nigrosin ที่ 37 °C ให้หยดสีโตกว่าหยดน้ำเชื้อประมาณ 5-10 เท่า ผสมให้เข้ากันบนแผ่นสไลด์ นานประมาณ 3-5 วินาที แล้วรูดให้เป็นผิวบาง ๆ บนกระจกสไลด์ จากนั้นปล่อยให้แห้งเอง แล้วนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยายขนาดที่มองเห็นการติดสีหรือไม่ติดสีของน้ำเชื้อได้ ทำการนับจำนวนสเปิร์มให้ได้อย่างน้อย 100 ตัว ตัวที่ติดสีจะเป็นสเปิร์มที่ตาย ตัวที่ไม่ติดสีจะเป็นสเปิร์มที่ยังมีชีวิต จากนั้นเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ (Segovia *et al.*, 2000, และ Grzyb *et al.*, 2003)

3.2) การตรวจความผิดปกติในรูปร่างของสเปิร์ม การตรวจความผิดปกติของสเปิร์มที่ส่วนหัว มักนิยมย้อมสีโดยใช้วิธีวิลเลียม (William's method) ซึ่งจะทำให้พบความผิดปกติของสเปิร์มได้ชัดเจน วิธีการ คือ ทำให้น้ำเชื้อเป็นแผ่นฟิล์ม บาง ๆ บนแผ่นสไลด์ และทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่ลงใน absolute alcohol นาน 3-4 นาที นำขึ้นมาแช่ต่อด้วย 0.5% chloramine solution 1-2 นาที จนกว่าผ้าหรือเมือกบนกระจกสไลด์หมดไป ล้างด้วยน้ำกลั่น และแอลกอฮอล์ (96 %) จากนั้นย้อมสีด้วย carbol fuchsin-eosin นาน 2-10 นาที และนำไปล้างน้ำ และซับให้แห้ง นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หาสิ่งผิดปกติ ซึ่งมักพบความผิดปกติที่ส่วนหัว ได้แก่ หัวเล็ก หัวที่ส่วนท้ายเล็ก หัวแหลม หัวกลม หัวใหญ่ เป็นต้น การนับจำนวนสเปิร์มเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ นับไม่น้อยกว่า 200 ตัว

การตรวจหาความผิดปกติของสเปิร์มที่ส่วนหาง นิยมทำการดองด้วยน้ำยา Formal saline น้ำยา Formal-saline ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6.19 กรัม +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.54 กรัม + ฟอร์มาลิน เข้มข้น 125 มิลลิลิตร + NaCl 5.41 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น วิธีการดองทำโดย ดูดน้ำยา Formal-saline 2-3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว จากนั้นหยดน้ำเชื้อลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จากนั้น นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase-contrast สิ่งผิดปกติที่มักตรวจพบ เช่น หางงอ มี 2 หาง หรือไม่มีหาง เป็นต้น การนับจำนวนสเปิร์มเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ นับไม่น้อยกว่า 200 ตัว (รพีพรรณ และคณะ, 2548)

### 4) วิธีประเมินการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา

4.1) ประเมินจากการเคลื่อนไหวเป็นรายตัว (Subjective method) สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ปกติต้องมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) เป็นแนวตรง ถ้าเคลื่อนที่เป็นวงหรือถอยหลัง แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติที่หาง การที่เซลล์สั้นหรือโยกไปมาแสดงถึงสเปิร์มที่แก่ (รพีพรรณ และคณะ 2548) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวคำนวณจากจำนวนของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ด้วยตัวเองได้ต่อ 100 ตัวที่นับ Guest (1973) แบ่งค่าคะแนนการเคลื่อนไหวของสเปิร์มออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 หมายถึง สเปิร์มทั้งหมดไม่มีการเคลื่อนไหว

ระดับ 2 หมายถึง สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 25 %

ระดับ 3 หมายถึง สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 50 %

ระดับ 4 หมายถึง สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 75 %

ระดับ 5 หมายถึง สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวมากกว่า 75 %

รพีพรรณ และคณะ (2548) อธิบายวิธีตรวจการเคลื่อนไหวของสเปิร์มบนแผ่นสไลด์ ไว้ดังนี้

1) สไลด์ที่จะนำมาใช้ตรวจการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ต้องแห้ง สะอาด ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ควรปนเปื้อนสารที่เป็นอันตรายต่อสเปิร์ม

2) เตรียมแผ่นสไลด์, แผ่นปิดสไลด์, สารละลายบัฟเฟอร์ ถ้าตัวอย่างน้ำเชื้อที่จะตรวจมีการตกตะกอน เพราะตั้งทิ้งไว้นานก็ควรเขย่าเบาๆ ให้สเปิร์มกระจาย น้ำเชื้อสดมักเข้มข้นเกินกว่าที่จะตรวจการเคลื่อนไหวได้โดยตรง จึงควรเจือจางด้วยน้ำเกลือปกติ (physiological saline หรือ isotonic buffer) ก่อน

3) หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 1 หยด ลงบนสไลด์ด้วยแท่งแก้วหรือไปเปต หรือหยดน้ำเชื้อที่ยังไม่ได้เจือจางปริมาณเล็กน้อยบนสไลด์ที่มีหยดน้ำเกลือที่ได้หยดไว้ก่อนแล้ว ลากหยดน้ำเชื้อและหยดน้ำเกลือมาให้เข้ากันด้วยไม้จิ้มฟัน และคนให้เข้ากันเบา ๆ ปิดหยดน้ำเชื้อด้วยแผ่นปิดสไลด์ เพื่อให้มีความหนาเท่ากันและป้องกันน้ำเชื้อแห้ง ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (100 เท่า ถึง 250 เท่า) ควรใช้กล้อง phase contrast ที่มีแท่นความร้อน ตัวอย่างน้ำเชื้อควรทำการตรวจดูหลาย ๆ หยด บนแผ่นสไลด์เดียวกัน

4) วางแผ่นสไลด์ที่มีหยดน้ำเชื้อบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์แล้วตรวจดูการเคลื่อนไหวทันที ด้วยหัวกำลังขยายต่ำแล้วจึงดูด้วยกำลังขยายสูง (40 เท่า)

5) ตรวจดูหลาย ๆ ตำแหน่งบนหยดน้ำเชื้อ มองดูสเปิร์มเป็นบริเวณแล้วทำการประเมิน เช่น มีสเปิร์ม 4 ตัว จาก 6 ตัว กำลังเคลื่อนไหว ควรหลีกเลี่ยงการนับตรงขอบ ๆ เพราะเป็นบริเวณที่แห้ง มีสเปิร์มตายมาก

6) การนับให้คะแนน ดูจากเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเปรียบเทียบกับตัวที่ไม่เคลื่อนไหวหรือเคลื่อนไหวผิดปกติ เป็นการประเมินอย่างคร่าว ๆ

7) การตรวจดูการเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ทั้งก่อนและหลังแช่แข็ง ทำได้เหมือนการตรวจน้ำเชื้อสด ยกเว้นไม่ต้องเจือจางน้ำเชื้ออีกแล้ว

4.2) การตรวจประเมินด้วย เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (Computer assisted semen analyzer, CASA) เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ที่สามารถให้รายละเอียดของคุณภาพน้ำเชื้อที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยสายตาในเวลารวดเร็ว ใช้ระบบกล้องถ่ายภาพที่มีความเร็วสูง 1/1,000 วินาที ในการจับภาพการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และนำมาวิเคราะห์ทิศทางการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พร้อมกับประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งมีโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อของสัตว์แต่ละชนิด ทำให้สามารถทราบความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (velocity) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ลักษณะการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (kinetic movement) เช่น การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า การเคลื่อนที่ผิดปกติ สายไปมา หมุนเป็นวง ถอยหลัง เป็นต้น สามารถทราบ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อและจำนวนสเปิร์มมีชีวิต และตาย (รพีพรรณ และคณะ, 2548)

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาและวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลากะรัง 3 ชนิด ได้แก่ ปลาหมอทะเล ปลากะรังดอกดำ และปลากะรังเสือ) ได้ปฏิบัติตามแผนการดำเนินงานอย่างเป็นลำดับขั้นตอน (ภาพที่ 1) โดยการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลองใหญ่ ๆ คือ

1. การค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล
2. การค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

ในแต่ละชุดการทดลอง ประกอบด้วยหลายการทดลองย่อย ทั้งนี้เพื่อให้ได้รับรายละเอียดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่เย็นและแช่แข็ง โดยให้น้ำเชื้อที่เก็บรักษามีคุณภาพดีที่สุด



ภาพที่ 2 ลำดับขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.2 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์เพื่อการวิจัย

รวบรวมพันธุ์ปลากะรังที่ต้องการใช้ในการวิจัย จากเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากะรังเข้าสู่โรงเรือนวิจัย พันธุ์ปลาที่รวบรวมได้แก่ ปลากะรังเสือที่มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 3.5-5.0 กก. จำนวน 3 ตัว ปลากะรังดอกดำที่มีน้ำหนัก 7.03-10.0 กก. จำนวน 5 ตัว ปลากะรังดอกแดงที่มีน้ำหนัก 3.5-5.0 กก. จำนวน 10 ตัว และปลาหมอทะเลที่มีน้ำหนัก 60-80 กก. จำนวน 3 ตัว ปลาทั้งหมดที่รวบรวมได้ถูกเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ ขนาด 4 x 4 x 2.5 ม. จำนวน 3 บ่อ ที่อยู่ภายในโรงเรือนปิด ทั้งนี้บ่อเลี้ยงทุกบ่อได้รับการออกแบบให้เชื่อมต่อกับระบบน้ำหมุนเวียน (recirculating system) น้ำที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองเป็นน้ำผสมระหว่างน้ำความเค็มสูง (200 psu) จากนาเกลือและเจือจางด้วยน้ำจืดสะอาดโดยมีความเค็ม 30 psu อุณหภูมิ น้ำในบ่อเลี้ยงวัดได้อยู่ในระหว่าง 27-28 °C

ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ให้มีความสมบูรณ์ทางเพศ ปลาพ่อแม่พันธุ์ได้รับอาหาร วันเว้นวัน แบบให้กินจนอิ่ม อาหารที่ใช้เป็นปลาข้างเหลืองสด ที่มีการเสริมด้วยวิตามิน C (100 มิลลิกรัม) และ E (400 IU) สัปดาห์ละหนึ่งครั้ง วิธีการให้วิตามิน ทำโดยฝังเม็ดวิตามินดังกล่าวลงในตัวปลาข้างเหลืองสดก่อนให้เป็นอาหารแก่พ่อแม่พันธุ์ จากนั้นปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ ชนิดละ 3 ตัว จะถูกเปลี่ยนเพศให้เป็นเพศผู้ด้วยการฝังฮอร์โมน 17  $\alpha$  methyltestosterone ที่อัตรา 4 มิลลิกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม เป็นเวลาอย่างน้อย 4 เดือน ก่อนการเก็บน้ำเชื้อ (หมายเหตุ: เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ปลากะรังมีราคาค่อนข้างสูง การศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดให้มีตัวแทนปลาทดลองอย่างน้อย 3 ตัว) วิธีการเตรียมฮอร์โมนเพื่อการเปลี่ยนเพศอธิบายไว้ในภาคผนวกที่ 1

### 3.3 การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ

ขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อ เริ่มจากนำปลาเพศผู้มารับการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ที่อัตรา 10 ไมโครกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ Metoclopramide ในอัตรา 2 มิลลิกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ จากนั้นนำปลามาทำให้สลบด้วยน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 10 ppm ทำความสะอาดบริเวณใกล้เคียงช่องเปิดน้ำเชื้อด้วยน้ำเกลือ (normal saline) และเช็ดให้แห้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของน้ำและปัสสาวะของปลา จากนั้นใช้มือสะอาดกดและรีดเบา ๆ ให้น้ำเชื้อไหลออกมา แล้วรวบรวมน้ำเชื้อโดยใช้ Micro pipettes ใส่ไว้ในปิเกตอร์ ขนาด 25 มิลลิลิตร ซึ่งวางไว้บนน้ำแข็งในกล่องโฟม ก่อนลำเลียงไปยังห้องปฏิบัติการ

น้ำเชื้อที่เก็บรวบรวมได้จากภาคสนาม จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้น จะถูกนำไปใช้ในการทดลอง น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีหมายถึงน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น ไม่มีการปนเปื้อนใด ๆ และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง กล่าวคือมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยมากกว่า 75 % (Guest, 1973) น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจะถูกรวบรวมจากปลาตัวผู้จำนวนอย่างน้อย 3 ตัว (pooled sperm) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation)

### 3.4 การประเมินการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา

วิธีประเมินการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลา ใช้วิธีประเมินจากการเคลื่อนไหวเป็นรายตัว (subjective method) ซึ่งพิจารณาการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เป็นแนวตรง โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (หรือประมาณ 20 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 หยด (1 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้ว สังเกตการณ์เคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ส่วนการให้ค่าคะแนนเป็นเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนไหว แบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

| หลักเกณฑ์                                             | หมายเลข | การเคลื่อนที่ (%) |
|-------------------------------------------------------|---------|-------------------|
| ทุกตัวเคลื่อนที่ไปข้างหน้า                            | 4       | 100               |
| ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (3/4)                    | 3       | 75                |
| มีบางตัวเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (2/4)                    | 2       | 50                |
| ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า มีเพียงเล็กน้อย (1/4) | 1       | 25                |
| ที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า                               |         |                   |
| ทุกตัวไม่มีการเคลื่อนที่                              | 0       | -                 |

หมายเหตุ : ดัดแปลงมาจาก Guest (1973)

### 3.5 การศึกษาความเข้มข้นของสเปิร์ม ( Sperm Concentration) ในน้ำเชื้อ

เป็นการนับจำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำเกลือ (NaCl 0.9 %) หรือน้ำทะเลในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำเกลือเท่ากับ 1 : 1,000, 1 : 1,500 และ 1 : 2,000 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ ก่อนใช้ไมโครปิเปต ดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วเขย่าให้ทั่วอีกครั้ง นำน้ำเชื้อไปวางบนสไลด์สำหรับนับเม็ดเลือดทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำมานับจำนวนเซลล์สเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

### 3.6 การทดลองเพื่อค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะรังเสือปลากะรังดอกดำและปลาหมอทะเล

#### 3.6.1 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลากะรังแต่ละชนิด

เมื่อต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้คงคุณภาพไว้ได้นานขึ้น จำเป็นต้องเก็บในสภาพที่เจือจางแล้ว สารที่จะนำมาเจือจางน้ำเชื้อนั้นควรจะมีค่า osmolarity และค่า pH ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้สเปิร์มเคลื่อนที่ หรือลดการใช้พลังงานของตัวสเปิร์ม และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษา การตรวจสอบค่า osmolarity และค่า pH ในของเหลวของน้ำเชื้อปลา ทำได้โดยนำน้ำเชื้อที่รวบรวมได้จากปลาแต่ละชนิด (1 มิลลิลิตร) มาใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อัตราการเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที ภายใต้

อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อแยกสเปิร์มออกจากของเหลว จากนั้นนำส่วนของเหลวใส ซึ่งอยู่ด้านบน ไปตรวจวัดค่า pH ด้วยด้วยเครื่อง pH meter และค่า osmolarity ด้วยเครื่อง osmometer (ดัดแปลงวิธีจาก Gwo, 2000)

### 3.6.2. การตรวจสอบประสิทธิภาพสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆต่อการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะรัง

ผลที่ได้จากการวัดค่า osmolarity, ค่า pH และความหนาแน่นของสเปิร์ม ในน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิด พบว่า ปลากะรังทั้งสามชนิด มีค่า osmolarity อยู่ในช่วง 340 – 430 mOsm/kg ในการทดลองถัดมา จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพสารเจือจางน้ำเชื้อที่เตรียมขึ้น 4 สูตร ร่วมกับอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสม โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบ 4x4 Factorial experiment design in CRD (ตารางที่ 4) สารเจือจาง 4 สูตร มีรายละเอียด ดังนี้

สารเจือจางสูตรที่1 ใช้ Dextrose 5 กรัม และ NaCl 0.4 กรัม ละลายน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีค่า osmolarity เท่ากับ 406 mOsm/L

สารเจือจางสูตรที่2 ใช้ Dextrose 5 กรัม และ NaCl 0.3 กรัม ละลายน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร osmolarity เท่ากับ 355 mOsm/L

สารเจือจางสูตรที่ 3 ใช้ Dextrose 5 กรัม และ NaCl 0.2 กรัม ละลายน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร osmolarity เท่ากับ 314 mOsm/L

สารเจือจางสูตรที่ 4 ใช้ NaCl 0.88 กรัม ละลายน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร osmolarity เท่ากับ 300 mOsm/L

**ตารางที่ 4** แผนการทดลองเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ

| สารเจือจางน้ำเชื้อ                                                        | อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ | ชุดการทดลอง |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|
| <b>สูตร 1;</b> Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.4 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร | 1:0                         | 1           |
|                                                                           | 1:6                         | 2           |
|                                                                           | 1:9                         | 3           |
|                                                                           | 1:12                        | 4           |
| <b>สูตร 2;</b> Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.3 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร | 1:0                         | 5           |
|                                                                           | 1:6                         | 6           |
|                                                                           | 1:9                         | 7           |
|                                                                           | 1:12                        | 8           |
| <b>สูตร 3;</b> Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.2 กรัม ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร | 1:0                         | 9           |
|                                                                           | 1:6                         | 10          |
|                                                                           | 1:9                         | 11          |
|                                                                           | 1:12                        | 12          |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| สารเจือจางน้ำเชื้อ                                    | อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ | ชุดการทดลอง |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|
| สูตร 4; NaCl 0.88 กรัม ในน้ำ<br>ปริมาตร 100 มิลลิลิตร | 1:0                         | 9           |
|                                                       | 1:6                         | 10          |
|                                                       | 1:9                         | 11          |
|                                                       | 1:12                        | 12          |

จากนั้นนำน้ำเชื้อสดของปลากะรังแต่ละชนิดที่เก็บรวบรวมได้ในลักษณะของ pooled sperm มาทำการเจือจางน้ำยาแต่ละสูตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วน น้ำเชื้อสดต่อสารเจือจางต่างกัน 4 ระดับคือ 1:0, 1:6, 1:9 และ 1:12 เขย่าน้ำเชื้อกับสารเจือจางให้เข้ากันเบา ๆ ปิดปากขวดด้วยก๊อนสาลีดไว้ที่ปากขวด เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเข้า แต่ยังให้อากาศถ่ายเทได้ นำขวดเก็บน้ำเชื้อวางไว้ในตู้เย็น (ช่องธรรมดา) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 °C โดยจะนำขวดเก็บน้ำเชื้อออกมาเปิดสาลีดออก และเขย่าให้น้ำเชื้อที่ตกตะกอนกันขวดกระจายวันละ 3 ครั้ง สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บรักษาจากทุกชุดการทดลองในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการเก็บรักษา เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ทำโดยหยดน้ำทะเล (30 psu) สะอาด ประมาณ 20 ไมโครลิตรบนแผ่นสไลด์ จากนั้นใช้ปลายไม้จิ้มฟันแตะน้ำเชื้อตัวอย่าง (ประมาณ 1 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำแล้วใช้ไม้จิ้มฟันลากน้ำทะเลมาสัมผัสกับน้ำเชื้อในขณะมองผ่านกล้องประเมินสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยพิจารณาจากจำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเลปกติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของทุกชุดการทดลอง ตามแบบแผนการทดลอง Factorial experiment design in CRD โดย แปลงค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่ได้เป็นค่า Arcsine แล้ววิเคราะห์โดยใช้วิธีแฟคเตอร์เรียล (Factorial) ศึกษาทั้งปัจจัยเดียวและอิทธิพลร่วมของสองปัจจัย เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ ทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinnear and Gray, 2000)

### 3.6.3. การศึกษาผลกระทบของการเติมออกซิเจนสมทบ และยาปฏิชีวนะต่อการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะรัง

การศึกษาครั้งนี้ ออกแบบการทดลองเป็นแบบ 2x2 Factorial experiment design in CRD เพื่อประเมินผลกระทบของการเติมออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ในขวดเก็บน้ำเชื้อ ขณะเก็บรักษาในตู้เย็น การศึกษาทำโดยนำน้ำเชื้อสดของปลากะรังแต่ละชนิด (n=3) ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นแล้ว มารวบรวมในลักษณะของ pooled sperm จากนั้นนำ pooled sperm ของปลาแต่ละชนิดมาทำการเจือจางด้วยสารเจือจางสูตร 1 (ข้อ 3.4.2) ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสารเจือจางต่างกันตามชนิดปลา กล่าวคือ ปลาหมอทะเลใช้การเจือจางระหว่างน้ำเชื้อสดต่อสารเจือจางในอัตรา 1:9 ส่วนปลากะรังเสือและกะรังดอกดำใช้อัตราส่วน 1:6

จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วของปลาแต่ละชนิดแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 12 หลอดเท่า ๆ กัน โดยน้ำเชื้อเจือจางอย่างละ 3 หลอดจะถูกสุ่มเข้าสู่ชุดการทดลองดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการเติมออกซิเจนสมทบและไม่เติมยาปฏิชีวนะ
- ชุดการทดลองที่ 2 ไม่มีการเติมออกซิเจนสมทบแต่เติมยาปฏิชีวนะ
- ชุดการทดลองที่ 3 เติมออกซิเจนสมทบแต่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ
- ชุดการทดลองที่ 4 เติมออกซิเจนสมทบและเติมยาปฏิชีวนะ

ปิดปากหลอดเก็บน้ำเชื้อด้วยก้อนสาลิอดไว้ที่ปากหลอด นำหลอดเก็บน้ำเชื้อวางไว้ในตู้เย็น (ช่องธรรมดา) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 °C ในชุดการทดลองที่กำหนดให้มีการเติมออกซิเจนสมทบจะทำการเติมออกซิเจนผ่านท่อแก้วนาน 10 วินาที วันละ 1 ครั้ง ส่วนชุดการทดลองที่เติมยาปฏิชีวนะใช้ Spectinomycin ในอัตรา 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เติมในสารเจือจางก่อนนำสารเจือจางไปเจือจางน้ำเชื้อ) ในแต่ละวันของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ทำการเขย่าขวดเก็บน้ำเชื้อเพื่อให้ น้ำเชื้อที่ตกตะกอนกันขวดกระจาย วันละ 3 ครั้ง สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บรักษาจากทุกชุดการทดลองในวันที่ 3, 5 7, และ 9 ของการเก็บรักษา เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (ตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 3.4.2) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (ตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 2.8.3)

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของทุกชุดการทดลองโดยใช้ ANOVA แปลงค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่ได้เป็นค่า Arcsine ก่อนแล้ววิเคราะห์โดยวิธีตามแบบแผนการทดลอง Factorial experiment design in CRD ศึกษาทั้งปัจจัยเดี่ยวและอิทธิพลร่วมของสองปัจจัย เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ ทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinnear and Gray, 2000)

#### 3.6.4. การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษานาน 7 วัน

การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็นมีลำดับขั้นตอนดังนี้

- 1) รวบรวมน้ำเชื้อจากปลากะรังชนิดต่าง ๆ ในลักษณะ pooled sperm ดังนี้
  - ปลากะรังดอกดำ รวบรวมน้ำเชื้อจากปลาเปลี่ยนเพศ จำนวน 4 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย  $13.0 \pm 1.8$  กก. ปริมาณน้ำเชื้อที่รวบรวมได้ 3.2 มิลลิลิตร
  - ปลากะรังเสือ รวบรวมจากปลาเพศผู้โดยธรรมชาติ จำนวน 3 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย  $7.6 \pm 0.6$  กก. ปริมาณน้ำเชื้อที่รวบรวมได้ 6 มิลลิลิตร
  - ปลาหมอทะเล รวบรวมจากปลาเพศผู้โดยธรรมชาติ จำนวน 3 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย  $76.0 \pm 8.5$  กก. มีปริมาณน้ำเชื้อที่รวบรวมได้ 56 มิลลิลิตร

นำน้ำเชื้อที่รวบรวมได้มาเจือจางด้วยสารละลายสูตร 1 (ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.4.2) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ:สารเจือจาง เท่ากับ 1:6 โดยปริมาตร สำหรับปลากะรังดอกดำและกะรังเสือ และอัตราส่วน 1:9 สำหรับปลาหมอทะเล เขย่าขวดเบา ๆ เพื่อให้ น้ำเชื้อและสารเจือจางผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปิดปากขวดด้วยก้อนสาลิอดไว้ที่ปากขวด ก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (ช่องธรรมดา) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 °C เป็นเวลา 7 วันก่อนนำไปผสมเทียมกับไข่ของแม่ปลากะรัง

ดอกแดง โดยจะนำขวดเก็บน้ำเชื้อ ออกมาเปิดส้าลือกแล้วเพิ่มอากาศโดยการพ่นก๊าซออกซิเจนเบา ๆ ลงในขวดเก็บน้ำเชื้อวันละ 1 ครั้ง ๆ ละประมาณ 10 วินาที และทำการเขย่าให้น้ำเชื้อที่ตกตะกอนกันขวดกระจายวันละ 3 ครั้ง ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวทุกวัน โดยในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา ได้สังเกตเห็นว่าน้ำเชื้อยังมีคุณภาพดีอยู่ กล่าวคือ น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมากกว่า 75 % จึงทำการคัดเลือกแม่ปลามาฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่และวางไข่

2) การคัดเลือกแม่ปลา ในการทดลองใช้แม่พันธุ์จากปลากระรังดอกแดง ที่มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 3-5 กิโลกรัม และมีลักษณะท้องอูมเป่ง พักแม่ปลาที่คัดเลือกได้ในถังพลาสติกขนาด 1 ตัน เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานได้ทำการสลับปลาด้วยน้ำมันกานพลูความเข้มข้น 10 ppm จากนั้นสุ่มไข่จากในท้องของแม่ปลาโดยใช้สายยางพลาสติกปลายแหลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร สอดเข้าทอรังไข่ทาง urogenital pore แล้วดูดไข่ออกมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า หากสังเกตเห็นไข่ปลามีลักษณะร่วนและแยกออกเป็นเม็ดอิสระ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 400 ไมโครเมตร จะนำแม่ปลาตัวนั้นมาฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ต่อไป

3) การผสมเทียมข้ามพันธุ์โดยใช้น้ำเชื้อแซ่เย็น เริ่มต้นจากนำแม่ปลากระรังดอกแดงที่มีความพร้อมมาฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน Lutenizing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Suprefact ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม (เข็มที่ 1 อัตราฉีด 10 ไมโครกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม เข็ม 2 อัตราฉีด 20 ไมโครกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม โดยมีระยะห่างระหว่างเข็ม 24 ชั่วโมง) แต่ครั้งของการฉีดฮอร์โมนใช้ร่วมกับ Metoclopramide ในอัตรา 2 มิลลิกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม ทำการรีดไข่ได้ภายใน 10 – 12 ชั่วโมงหลังการฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง ซึ่งการผสมเทียมในการศึกษาครั้งนี้ แยกทำ 3 ครั้ง ตามความสามารถรวบรวมน้ำเชื้อได้ในปลาแต่ละชนิด ไข่ที่รีดได้จะถูกใส่ไว้ในกะละมังที่แห้งและสะอาด ไข่ที่รีดได้จากแม่ปลากระรังดอกแดง 1 ตัว จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษามาแล้ว 7 วัน กับน้ำเชื้อสดของปลากระรังแต่ละชนิด ไข่แต่ละส่วนจะถูกผสมด้วยน้ำเชื้อในอัตราส่วน ไข่ 100 กรัมต่อน้ำเชื้อ 2 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ชนไก่คนเบา ๆ นาน 3 นาที ก่อนค่อย ๆ เติมน้ำทะเลสะอาด (ความเค็ม 30 psu) ลงไป และคนต่อเนื่องอีก 10 นาที จากนั้นจึงทำการล้างไข่และนำไปฟักในถังฟักต่อไป

4) การฟักและการอนุบาลลูกปลา ภายหลังการล้างไข่แล้ว ไข่จะถูกลำเลียงใส่ในโหลแก้วใสขนาดความจุ 15 ลิตร เพื่อแยกไข่ดีออกจากไข่เสีย โดยไข่เสียจะจมลงสู่ก้นโหล จึงทำการดูดไข่เสียออกด้วยวิธีกลักน้ำ จากนั้นนำไข่ดีไปฟักในถังไฟเบอร์กลาสทรงกรวย ขนาดจุน้ำ 500 ลิตร ด้วยอัตราความหนาแน่นของไข่ประมาณ 400 ฟองต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร น้ำทะเลที่ใช้ในการฟักไข่เป็นน้ำที่ผ่านการกรองจนใสสะอาดและผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีนไฮโปคลอไรท์ 20 ppm ความเค็มน้ำระหว่างการฟักไข่คือ 30 psu ควบคุมอุณหภูมิตลอดระยะเวลาการฟักไข่ที่ 29 °C ให้อากาศผ่านหัวทราย เบา ๆ หลังจากนั้น 2 ชั่วโมงถัดมา ทำการสุ่มไข่ระยะ morula มาตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจำนวนหนึ่งจะถูกสุ่มไปศึกษาเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวที่ประมาณ 17-19 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ

เพื่อทราบอัตราฟักไข่และจำนวนลูกปลาทั้งหมดในถังฟักไข่ก่อนย้ายลูกปลาลงบ่ออนุบาล จะหยุดการให้อากาศในถังฟักไข่ จากนั้นกวนน้ำให้หมุนไปในทางเดียวกันปล่อยให้เปลือกไข่ไข่เสีย และเศษ

ตะกอนจมลงรวมอยู่ที่ศูนย์กลางกันถึง ลูกปลาแข็งแรงจะลอยอยู่บนผิวน้ำ เปิดวาล์วที่กั้นถังเพื่อปล่อยให้เปลือกไข่และเศษตะกอนออกไป จากนั้นเปิดให้ฟองอากาศค่อนข้างเบา เพื่อให้ลูกปลากระจายทั่วบ่อ สุ่มนับจำนวนลูกปลาเพื่อประมาณจำนวนลูกปลาทั้งหมด จากนั้นใช้สวิงรวบรวมลูกปลา โดยใช้แก้วใสซ้อนลูกปลาจากสวิงย้ายลงสู่ถังพลาสติกก่อนลำเลียงไปยังบ่ออนุบาล

การอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนทำในถังพลาสติกสีขาวขนาดความจุ 1 ตัน น้ำที่ใช้ในการอนุบาลเป็นน้ำผสมระหว่างน้ำความเค็มสูงจากนาเกลือ (200 psu) กับน้ำจืดปกติ จนได้ความเค็ม 30 psu ซึ่งน้ำผสมนี้จะผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตา 5 ไมครอน และผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วย แคลเซียม - ไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20 ppm และทิ้งไว้จนไม่มีสารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ตกค้าง เริ่มแรกของการอนุบาลจะเติมน้ำลงในบ่ออนุบาลเพียงครึ่งถัง (500 ลิตร) ให้ฟองอากาศเบาๆ โดยวางหัวทรายให้ฟองอากาศกระจายทั่วบ่อประมาณ 4 จุด อุณหภูมิน้ำระหว่างการอนุบาลลูกปลาอยู่ระหว่าง 27-30 °C ปล่อยลูกปลาในบ่ออนุบาลที่ความหนาแน่น 10 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร เมื่อปากลูกปลาเปิด (หลังจากฟักออกเป็นตัวแล้ว ประมาณ 54-59 ชั่วโมง) เริ่มให้อาหาร อาหารและการให้อาหารดัดแปลงวิธีจาก (Kiryakit *et al.*, 2011) โดยอาหารที่เริ่มจากโรติเฟอร์ขนาดเล็ก (ตัวที่รอดผ่านสวิงกรองขนาดตา 80 ไมโครเมตร) ให้กินเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นการให้โรติเฟอร์ทุกขนาด ในระหว่างเลี้ยงลูกปลาด้วยโรติเฟอร์ จะมีการเติมน้ำเขียว (tetrasmis เข้มข้น  $4 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร) ปริมาณ 50 ลิตร ทุกวัน เพื่อให้โรติเฟอร์ที่เหลืออยู่ในบ่อมีอาหารกิน และสามารถขยายพันธุ์เพื่อเป็นอาหารของลูกปลา ความหนาแน่นของโรติเฟอร์ในบ่ออนุบาลลูกปลาจะพยายามรักษาให้อยู่ใน ระดับ 10-15 ตัว/มิลลิลิตร ถ้าหากโรติเฟอร์เหลือน้อย จะเพิ่มโรติเฟอร์ลงในบ่ออนุบาล เพื่อให้มีปริมาณพอเพียงตลอดเวลา จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 30 วัน จึงหยุดให้โรติเฟอร์ ขณะที่ลูกปลาอายุ 15 วัน จะเริ่มฝึกให้กินอาร์ทีเมียแรกฟักเป็นตัว โดยเริ่มให้ในประมาณน้อย ๆ แล้วค่อยเพิ่มมากขึ้น เมื่อลูกปลากินอาร์ทีเมียได้ดี ปริมาณอาร์ทีเมียที่ให้จะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของลูกปลา

การจัดการคุณภาพน้ำและฟืนบ่อ ภายหลังปล่อยลูกปลาลงบ่ออนุบาล จะทำการหยดน้ำมันปลาหมึกครั้งละ 1 หยด วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ที่บริเวณหัวทราย ติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน เพื่อป้องกันปัญหา floating dead (Yamaoka *et al.*, 2000) ในระยะเริ่มแรกของการปล่อยลูกปลาลงบ่ออนุบาล น้ำในบ่ออนุบาลจะมีอยู่ครึ่งบ่อ (ประมาณ 500 ลิตร) และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการเติมน้ำเขียว ทุก ๆ วัน โดยน้ำจะเต็มบ่อหลังจากอนุบาลลูกปลา 5-6 วัน ต่อจากนั้นจะเริ่มเปลี่ยนน้ำเป็นระยะ ดังนี้ คือ เปลี่ยนน้ำ 10-20 % ต่อวัน ในช่วงลูกปลาอายุไม่เกิน 20 วัน เปลี่ยนน้ำ 30 % เมื่อลูกปลาอายุ 20-30 วัน เปลี่ยนน้ำ 40 % เมื่อลูกปลาอายุ 30-45 วัน หลังจากนั้นจะเปลี่ยนน้ำอย่างน้อย 50 % ทุกๆ วัน การดูดตะกอนในบ่ออนุบาลลูกปลาจะเริ่มเมื่อลูกปลาอายุ 12-15 วัน ซึ่งระยะนี้ลูกปลายังว่ายอยู่ใต้ผิวน้ำเมื่อดูดตะกอนลูกปลาจะไม่ติดออกมา หลังจากลูกปลาอายุ 20 วันขึ้นไป ลูกปลามักจะรวมกลุ่มอยู่กลางน้ำและฟืนบ่อมากขึ้น การดูดตะกอนระยะนี้ต้องระวังลูกปลาจะติดออกมา

### 3.7 การค้นหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสื่อ และปลากะรังดอกดำ

#### 3.7.1 ศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มของปลากะรังเสื่อและปลากะรังดอกดำ

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำไปใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสื่อ และปลากะรังดอกดำ โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบ 8x4 Factorial experiment design in CRD (ตารางที่ 5) สำหรับปลาแต่ละชนิด การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อของปลากะรังทั้งสองชนิด (ชนิดละ 5 มิลลิลิตร) มาเจือจางด้วยสารละลายสูตร 1 ในอัตราส่วน 1:6 โดยปริมาตร ภายในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร สารโครีโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิดที่ทำการทดสอบได้แก่ ethanol, methanol, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethylene glycol, DMSO และ trehalose ซึ่งภายหลังจากถูกเตรียมขึ้นแล้วนำมาผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในหลอดทดลองด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยกำหนดให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 %, 10 %, 15 % และ 20 % ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ นำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (0-4 °C) เมื่อครบเวลา 20, 40 และ 60 นาที นำไปตรวจสอบค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังกระตุ้นด้วยน้ำทะเลปกติ (ความเค็ม 30 psu) สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ แล้วประเมินค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทันที (ที่เวลา 0 นาที) การประเมินการเคลื่อนที่น้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ใช้เกณฑ์การประเมินตามที่อธิบายไว้ในตารางที่ 3

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของทุกชุดการทดลองโดยใช้ ANOVA แปลงค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่ได้เป็นค่า Arcsine ก่อนแล้ววิเคราะห์โดยวิธีตามแบบแผนการทดลอง Factorial experiment design in CRD ศึกษาทั้งปัจจัยเดี่ยวและอิทธิพลร่วมของสองปัจจัย เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinneer and Gray, 2000)

**ตารางที่ 5** แผนการทดลองเพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มปลากะรังเสื่อ และปลากะรังดอกดำ

| สารโครีโอโพรเทคแทนท์ | ความเข้มข้นสุดท้าย (%) | ชุดการทดลอง |
|----------------------|------------------------|-------------|
| Ethanol              | 5                      | 1           |
|                      | 10                     | 2           |
|                      | 15                     | 3           |
|                      | 20                     | 4           |

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| สารไครโอโพรเทคแทน์ | ความเข้มข้นสุดท้าย (%) | ชุดการทดลอง |
|--------------------|------------------------|-------------|
| Methanol           | 5                      | 5           |
|                    | 10                     | 6           |
|                    | 15                     | 7           |
|                    | 20                     | 8           |
| Sucrose            | 5                      | 9           |
|                    | 10                     | 10          |
|                    | 15                     | 11          |
|                    | 20                     | 12          |
| Propylene glycol   | 5                      | 13          |
|                    | 10                     | 14          |
|                    | 15                     | 15          |
|                    | 20                     | 16          |
| Glycerol           | 5                      | 17          |
|                    | 10                     | 18          |
|                    | 15                     | 19          |
|                    | 20                     | 20          |
| Ethylene glycol    | 5                      | 21          |
|                    | 10                     | 22          |
|                    | 15                     | 23          |
|                    | 20                     | 24          |
| DMSO               | 5                      | 25          |
|                    | 10                     | 26          |
|                    | 15                     | 27          |
|                    | 20                     | 28          |
| Trehalose          | 5                      | 29          |
|                    | 10                     | 30          |
|                    | 15                     | 31          |
|                    | 20                     | 32          |

### 3.7.2 ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสื่อและปลากะรังดอกดำ

ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสื่อและปลากะรังดอกดำ โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบ 3x4 Factorial experiment design in CRD (ตารางที่ 6) สำหรับปลาแต่ละชนิด การศึกษาเริ่มจากการรวบรวมน้ำเชื้อจากปลาตัวผู้แต่ละชนิดอย่างน้อย 3 ตัว ในลักษณะ pooled sperm นำน้ำเชื้อที่

รวบรวมน้ำเชื้อจากด้วยสารละลายสูตร 1 (ข้อ 3.5.2) ด้วยอัตราส่วนการเจือจางของน้ำเชื้อต่อสารเจือจางเท่ากับ 1:6 แล้วนำน้ำเชื้อเจือจางแล้วนี้ไปเจือจางต่อในสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ได้แก่ propylene glycol DMSO และ ethanol ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายเป็น 5 %, 10 %, 15 % และ 20 % ทั้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลายที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ก่อนจะถูกรวบรวมนไว้ในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปเก็บด้วยวิธีแช่แข็งต่อไป การแช่แข็งจะใช้เครื่องมือ programmable-controlled freezer (CL 863) using cryogenesis version 4.0 software (1999) for Windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia) ใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C / นาที เริ่มจากอุณหภูมิห้อง 25 °C จนถึงอุณหภูมิต่ำสุด -80 °C ก่อนนำไปเก็บแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) ทันที แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

**ตารางที่ 6** แผนการทดลองเพื่อค้นหาชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ

| สารโครีโอโพรเทคแทนท์ | ความเข้มข้นสุดท้าย (%) | ชุดการทดลอง |
|----------------------|------------------------|-------------|
| Propylene glycol     | 5                      | 1           |
|                      | 10                     | 2           |
|                      | 15                     | 3           |
|                      | 20                     | 4           |
| DMSO                 | 5                      | 5           |
|                      | 10                     | 6           |
|                      | 15                     | 7           |
|                      | 20                     | 8           |
| Trehalose            | 5                      | 9           |
|                      | 10                     | 10          |
|                      | 15                     | 11          |
|                      | 20                     | 12          |

น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 1 สัปดาห์ จะถูกนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการแช่แข็ง โดยนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 40 °C นานประมาณ 15 วินาที แล้วจึงนำไปตรวจนับเพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการตัดหลอดฟางเพื่อนำน้ำเชื้อออกมาวางบนแผ่นสไลด์ พร้อมกับหยดน้ำทะเลสะอาดความเค็ม 30 psu เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ และเริ่มประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของทุกชุดการทดลองโดยใช้ ANOVA แปลงค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่ได้เป็นค่า Arcsine ก่อนแล้ววิเคราะห์โดยวิธีตามแบบแผนการทดลอง Factorial experiment design in CRD ศึกษาทั้งปัจจัยเดี่ยวและอิทธิพลร่วมของสองปัจจัย เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ ทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

(DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinnear and Gray, 2000)

### 3.7.3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

การศึกษาเริ่มจาก นำน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล ซึ่งถูกเจือจางด้วยสารละลายสูตร 1 (ข้อ 3.5.2) ในอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารเจือจางเท่ากับ 1:6 สำหรับปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ และอัตราส่วน 1: 9 สำหรับปลาหมอทะเลแล้ว มาเติมสารละลาย DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 % สำหรับปลากะรังดอกดำ และ 10 % สำหรับปลากะรังเสือและปลาหมอทะเล ทั้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลายที่อุณหภูมิห้อง ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ก่อนจะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปเก็บด้วยวิธีแช่แข็งต่อไป ในการทดลองนี้ใช้เครื่องมือ programmable-controlled freezer (CL 863) using cryogenesis version 4.0 software (1999) for Windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia) เป็นอุปกรณ์ในการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตราก่อนการแช่แข็ง ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ซึ่งมีอัตราการลดอุณหภูมิเป็น  $-5$ ,  $-10$  และ  $-15^{\circ}\text{C}$ /นาที ตามลำดับ การลดอุณหภูมิเริ่มจากอุณหภูมิห้อง  $25^{\circ}\text{C}$  จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย  $-80^{\circ}\text{C}$  แล้วจึงนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ทันที การทดลองกระทำ 3 ซ้ำ

จากนั้น น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จะถูกนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการแช่แข็ง โดยนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลาย ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  นานประมาณ 15 วินาที แล้วจึงนำไปประเมินค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการตัดหลอดฟางเพื่อนำน้ำเชื้อออกมาวางบนแผ่นสไลด์ พร้อมกับหยดน้ำทะเลสะอาดความเค็ม 30 psu เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ และเริ่มประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

การวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในแต่ละอัตราการลดอุณหภูมิ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD หากพบว่าค่าที่นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างนั้นเป็นค่าเฉลี่ยที่มีการกระจายของข้อมูลไม่เป็นปกติจะทำการวิเคราะห์แบบ Non-parametric test โดย แปลงค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่ได้เป็นค่า Arcsine และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี LSD test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows

### 3.7.4 ศึกษาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

การศึกษานี้ใช้แม่ปลากะรังดอกแดงจำนวน 2 ตัวที่มีน้ำหนัก 5.6 และ 5.8 กิโลกรัม ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ให้แก่แม่ปลาดังกล่าว โดยใช้ Suprefact ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Metoclopramide ในอัตรา 2 มิลลิกรัม/ปลาหนัก 1 กิโลกรัม ทำการรีดไข่ภายใน 10 – 12 ชั่วโมงหลังการฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง ไข่ที่รีดได้ใส่ในกะละมังที่แห้งและสะอาด ไข่ทั้งหมดจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กะละมังเท่า ๆ กัน เพื่อการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากปลาทั้งสามชนิด สุ่มไข่จำนวนหนึ่ง (0.2 กรัม ซึ่งมีไข่ประมาณ 500 ฟอง) ใส่ไว้ใน petri dishes ที่แห้งและสะอาด และทำการผสมเทียมกับน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งละลายที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  นาน 15 วินาที โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1 หลอด (0.5

มิลลิลิตร) ต่อ 3 petri dishes (การผสมเทียมจะกระทำ 3 ซ้ำสำหรับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด) จากนั้นผสมให้น้ำเชื้อและไข่เข้ากันดี ใช้เวลาประมาณ 2-3 นาที จึงค่อย ๆ เติมน้ำทะเลสะอาดที่ความเค็ม 30 ลงไป และคนต่อไปประมาณ 10 นาที จากนั้นจึงทำการล้างไข่ และนำไปฟักในบีกเกอร์ที่มีน้ำปริมาตร 1 ลิตร ในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ (29 °C) เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักต่อไป หลังจากนั้น 2 ชั่วโมงถัดมา สุ่มไข่ระยะ morula มาตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัว ภายในระยะเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง หลังจากการผสมน้ำเชื้อกับไข่ ส่วนไข่ที่เหลือในแต่ละกะละมัง (150 กรัมต่อกะละมัง) จะถูกผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 2 หลอดต่อกะละมัง ซึ่งภายหลังการผสม และล้างไข่แล้ว นำไปฟักในถังฟักทรงกรวยขนาดความจุ 500 ลิตรต่อไป

ลูกปลาแรกฟักเป็นตัวของแต่ละสายพันธุ์ลูกผสม จะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนหนึ่ง (ชนิดละ 30,000 ตัว) ศึกษาการอนุบาลตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 3.4.4 ที่โรงเรียนเพาะฟักของโครงการวิจัย อีกส่วนหนึ่ง (ชนิดละ 50,000 ตัว) นำไปศึกษาการอนุบาลโดยฟาร์มเอกชน ส่วนที่เหลือ (ชนิดละ 100,000 ตัว) ศึกษาการอนุบาลภายในโรงเพาะฟักของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง ตามวิธีชีวภาพของสมประสงค์ (2553) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ การอนุบาลเริ่มจากเตรียมน้ำเขียว โดยการเลี้ยงปลาหมอเทศ ซึ่งมีปลาเปิดขวานอยู่ในบ่อเลี้ยง เพื่อให้เกิดห่วงโซ่อาหารตามธรรมชาติ จนน้ำเริ่มเป็นสีเขียวเข้ม (ใช้เวลา 2-4 วัน) จากนั้นสูบน้ำเขียวจากบ่อปลาหมอเทศไปใส่บ่ออนุบาลขนาดความจุ 13 ลบ.ม. เติมน้ำส้มสายชูแท้ 5 % ในบ่ออนุบาลด้วยความเข้มข้น 200 ppm นาน 6 ชั่วโมง เพื่อป้องกันพาราสิตภายนอก จากนั้นเติมโรติเฟอร์ลงในบ่ออนุบาลให้มีความหนาแน่น 30 ตัว/ลิตร แล้วจึงปล่อยลูกปลาอายุ 1 วันลงในบ่ออนุบาล เมื่อลูกปลาอายุ 19 วัน เริ่มให้อาหารผงสำเร็จรูปกับอาร์ทีเมียแรกฟัก อนุบาลจนปลากระรังลูกผสมอายุ 43 วัน จึงคัดแยกขนาด ลูกปลาที่ยังเปลี่ยนแปลงรูปร่างไม่สมบูรณ์นำมาอนุบาลในบ่อน้ำเขียวชีวภาพใหม่ ปลากระรังลูกผสมที่มีพัฒนาการสมบูรณ์คัดแยกขนาดนำไปอนุบาลในบ่อขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร เพื่อฝึกให้กินอาหารเม็ดต่อไป

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลากะรังแต่ละชนิด

ผลการตรวจวัดคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล แสดงผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

| ชนิดปลา                                     | จำนวน<br>(ตัว) | น้ำหนักเฉลี่ย<br>(กก.) | pH  | osmolarity<br>(mOsm/L) | ความหนาแน่น<br>(cell/mL)     |
|---------------------------------------------|----------------|------------------------|-----|------------------------|------------------------------|
| ปลากะรังเสือ<br>( <i>E. fuscoguttatus</i> ) | 3              | $6.7 \pm 0.6$          | 7.5 | $357 \pm 5$            | $4.5 \pm 2.7 \times 10^9$    |
| ปลากะรังดอกดำ<br>( <i>E. malabaricus</i> )  | 4              | $12.8 \pm 1.9$         | 7.5 | $349 \pm 3$            | $6.7 \pm 3.1 \times 10^9$    |
| ปลาหมอทะเล<br>( <i>E. lanceolatus</i> )     | 3              | $74.5 \pm 9.3$         | 7.6 | $429 \pm 2$            | $3.8 \pm 1.2 \times 10^{10}$ |

#### 4.2 ประสิทธิภาพสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นในปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

เมื่อนำสารเจือจางสูตรต่างๆ ทั้ง 3 สูตรมาเจือจางน้ำเชื้อของปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วประเมินการเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า พบว่า ไม่ปรากฏการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลากะรังทั้งสามชนิดที่อยู่ในสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตร แต่เมื่อทำการกระตุ้นด้วยน้ำทะเลปกติ (ความเค็ม 30 psu) พบการเคลื่อนไหวของสเปิร์มเป็นปกติ (เคลื่อนที่ไปข้างหน้า เป็นแนวตรง) และเมื่อทำการทดสอบต่อไปโดยการเจือจางน้ำเชื้อของปลากะรังทั้งสามชนิดด้วยสารเจือจางต่างกัน 4 สูตร โดยมีอัตราส่วนการเจือจางต่างกัน 4 ระดับ และเก็บรักษาในตู้เย็นเป็นเวลานานขึ้น พบว่า สารเจือจางแต่ละสูตรและอัตราส่วนการเจือจางให้ประสิทธิภาพการเก็บรักษาที่ต่างกันตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยอธิบายเป็นรายชนิดดังนี้

ในปลากะรังดอกดำ ภายหลังจากแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 3 วัน สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เก็บรักษาในสารเจือจางทั้ง 4 สูตรไม่แตกต่างกัน ( $68.72\%$ ,  $68.7\%$ ,  $67.2$  และ  $64.1\%$  ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 ( $86.0\%$ ) สูงกว่าในอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมี

นัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ส่วนการเจือจางในอัตราส่วน 1:9 และ 1:12 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน (73.4 % และ 65.6 % ตามลำดับ) และน้ำเชื้อที่ไม่เจือจางมีค่าต่ำที่สุด (9.4 %) (ภาพที่ 3 ก)

ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 5 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 (53.1 %) สูงที่สุดและสูงกว่าสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่เจือจางด้วยสารเจือจางสูตร 2, 3 และ 4 ไม่แตกต่างกัน (43.7 %, 42.2 % และ 37.5 % ตามลำดับ) นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 (67.2 %) สูงกว่าในอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่ในอัตราส่วน 1:9 (54.7 %) และ 1:12 (45.3 %) ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อที่ไม่เจือจางไม่มีการเคลื่อนไหวน (ภาพที่ 3 ข) และไม่พบอภิติพลกรรมของปัจจัยทั้งสอง

ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 7 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 และสูตร 2 (39.1 % และ 32.8 % ตามลำดับ) สูงกว่าที่อยู่ในสูตร 3 (21.9 %) และสูตร 4 (15.6 %) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 กับสูตร 2 และสูตร 3 กับสูตร 4 ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 สูงที่สุด (46.9 %) และสูงกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่ในอัตราส่วน 1:9 (36.0 %) และ 1:12 (26.6 %) ตามลำดับ (ภาพที่ 3 ค) และไม่พบอภิติพลกรรมของปัจจัยทั้งสอง

ในปลากระรังเสื่อ ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 3 วัน สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่เก็บรักษาด้วยสารเจือจางในสูตร 1, 2 และ 3 (73.4 %, 73.4 % และ 67.2 % ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่เก็บรักษาด้วยสารเจือจางทั้ง 3 สูตรนี้ สูงกว่า สูตร 4 (57.8 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 (89.1 %) สูงกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาคือ ในอัตราส่วน 1:9 และ 1:12 (73.4 % และ 68.8 % ตามลำดับ) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มเมื่อเจือจางในอัตราส่วน 1:9 และ 1:12 ไม่แตกต่างกัน และน้ำเชื้อที่ไม่เจือจางมีค่าต่ำที่สุด (12.5 %) (ภาพที่ 4 ก) และไม่พบอภิติพลกรรมของปัจจัยทั้งสอง

ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 5 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 (57.8 %) สูงที่สุด และสูงกว่าสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่สเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 2 (48.4 %) สูตร 3 (40.6 %) และ สูตร 4 (31.3 %) ตามลำดับ โดยที่

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 2 กับสูตร 3 ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 (68.8 %) สูงกว่าในอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่ ในอัตราการเจือจาง 1:9 และ 1:12 (53.1% และ 46.9% ตามลำดับ) โดยที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางในอัตราส่วน 1:9 กับ 1:12 ไม่แตกต่างกัน ขณะที่น้ำเชื้อที่ไม่เจือจางไม่พบการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (ภาพที่ 4 ข) และยังพบว่า มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ ในสารเจือจาง 4 สูตร หากเจือจางด้วยอัตราส่วนการเจือจาง 1:6 ให้ผลการเก็บรักษาดีกว่าการเจือจางที่อัตราส่วน 1:9 และ 1:12

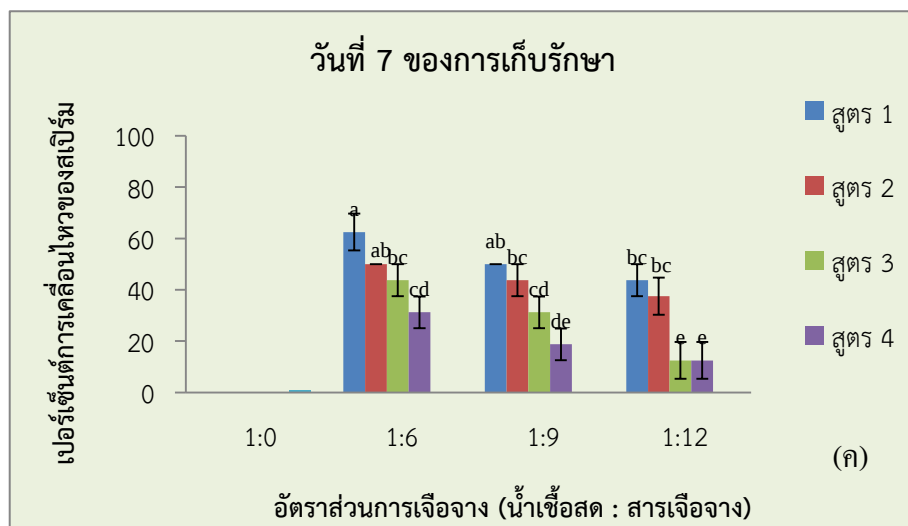
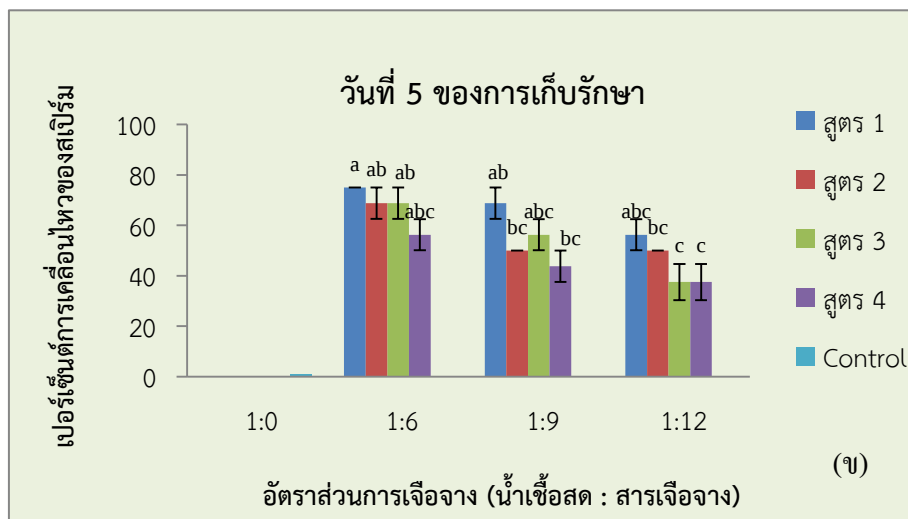
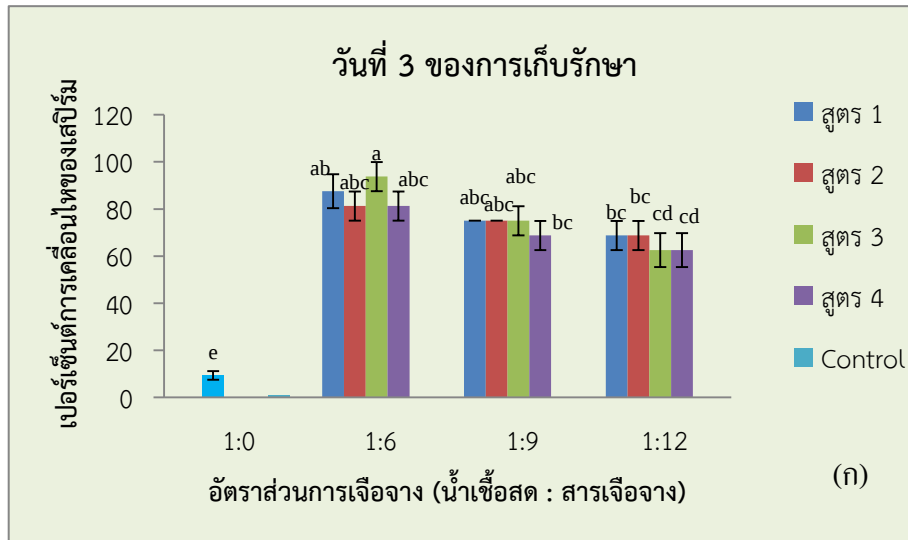
ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 7 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 (42.2 %) และสูตร 2 (39.1 %) สูงกว่าที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 3 (21.9 %) และสูตร 4 (3.1 %) ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนี้ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เจือจางในด้วยอัตราส่วน 1:6 (48.4 %) สูงที่สุดและสูงกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ส่วนการเจือจางในอัตราส่วน 1:9 และ 1:12 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน (31.3 % และ 26.2 % ตามลำดับ) (ภาพที่ 4 ค) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ ในสารเจือจาง 4 สูตร หากเจือจางในอัตราส่วนการเจือจาง 1:6 ให้ผลการเก็บรักษาดีกว่าการเจือจางในอัตราส่วน 1:9 และ 1:12

ในปลาหมอตะเล ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 3 วัน สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 (81.3 %) สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากที่อยู่ในสูตร 2 (75 %) นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างในค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางระหว่างสูตร 2 และสูตร 3 (68.8 %) และระหว่างสูตร 3 และสูตร 4 (64.1 %) ขณะเดียวกัน ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:9 (85.9 %) และ 1:12 (81.3 %) สูงกว่าในอัตราส่วน 1:6 (76.6 %) และน้ำเชื้อที่ไม่เจือจาง (0 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเมื่อเจือจางในอัตราส่วน 1:9 และ 1:12 ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5 ก) และไม่พบอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสอง

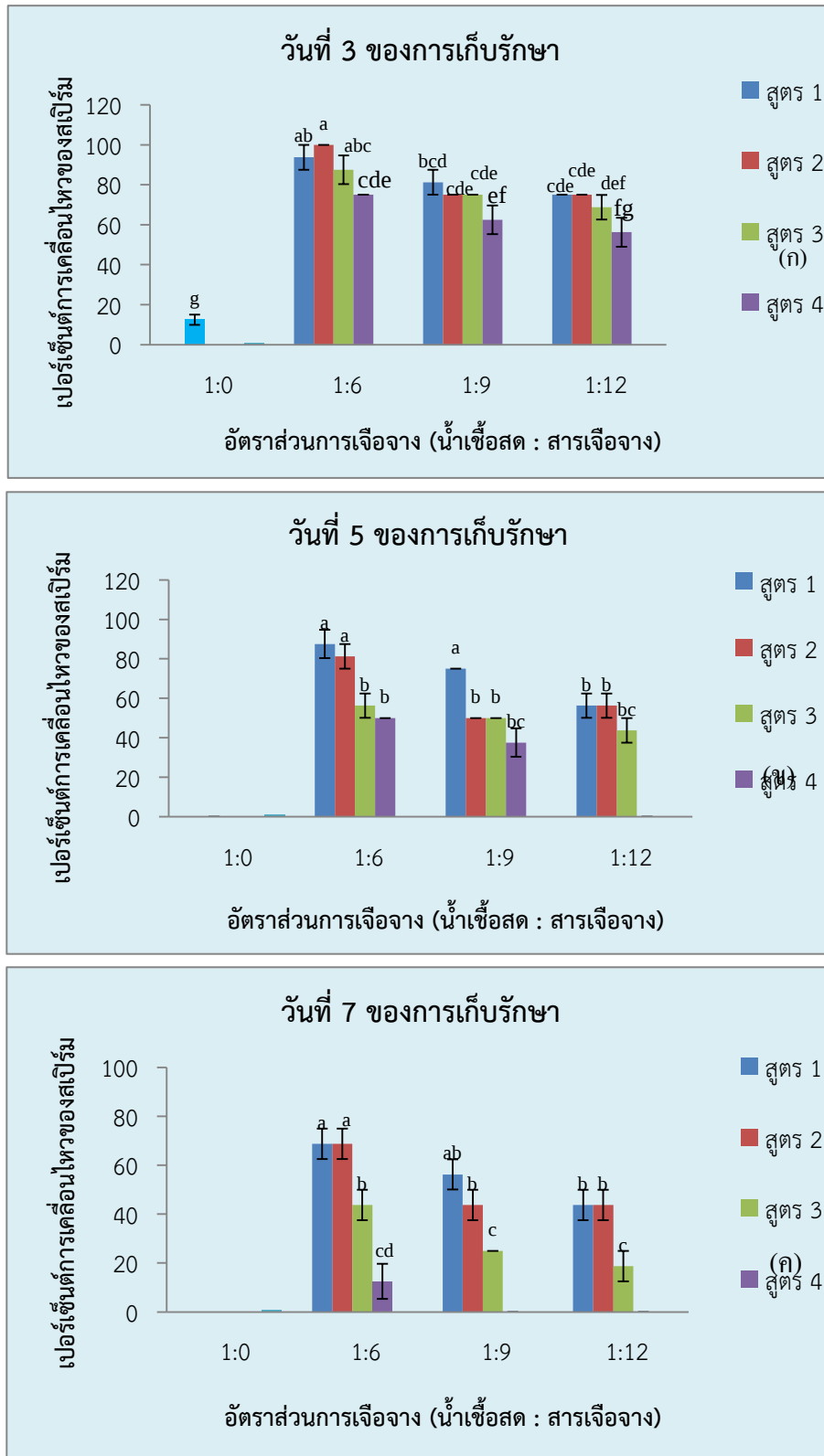
ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 5 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 (70.3 %) สูงที่สุดและสูงกว่าสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 2 (60.9 %), สูตร 3 (43.8 %) และสูตร 4 (37.5 %) ตามลำดับ โดยที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 3 และสูตร 4 ไม่ต่างกัน ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเมื่อเจือจางในอัตราส่วน 1:6, 1:9 และ 1:12 (62.5 %, 67.2 % และ 62.5 % ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) แต่การเจือจางทั้ง

สามอัตราส่วนทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มดีกว่าการไม่เจือจาง (ภาพที่ 5 ข) และไม่พบอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสอง

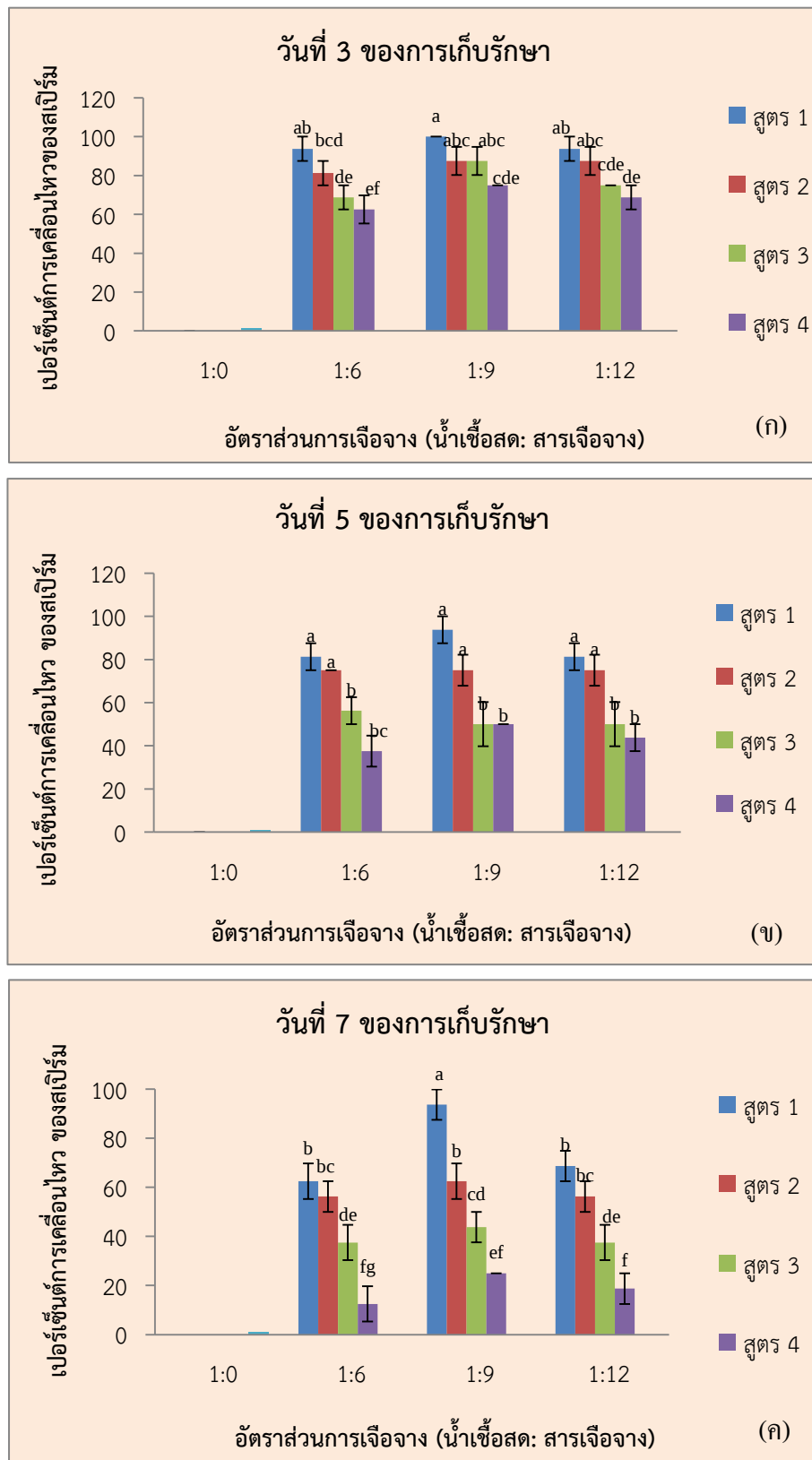
ภายหลังการแช่เย็นน้ำเชื้อได้ 7 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรของสารเจือจาง โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อยู่ในสารเจือจางสูตร 1 (56.3 %) มีค่าสูงสุด ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่ สเปิร์มในสารเจือจางสูตร 2 (43.8 %), สูตร 3 (29.7 %) และสูตร 4 (14.1 %) ตามลำดับ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของการเจือจาง โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มสูงสุดที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:9 ( $P < 0.05$ ) รองลงมาได้แก่อัตราส่วนการเจือจาง 1:12 (45.2 %) และ 1:6 (42.2 %) ส่วนน้ำเชื้อที่ไม่เจือจาง มีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มต่ำสุด (0 %) ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เจือจางด้วยอัตราส่วน 1:6 และ 1:12 ไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย กล่าวคือ เมื่อใช้สารเจือจางสูตร 1 ด้วยอัตราส่วนการเจือจาง 1:9 ให้ผลการเก็บรักษาดีที่สุด ส่วนการใช้สารเจือจางสูตรอื่นๆ ด้วยอัตราส่วนการเจือจาง 1:6, 1:9 และ 1:12 ให้ผลไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5 ค)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลากะรังดอกดำ ที่เจือจางด้วยสารเจือจางต่างกัน 4 สูตร แต่ละสูตรเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับ



ภาพที่ 4 เปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลากะรังเสือ ที่เจือจางด้วยสารเจือจางต่างกัน 4 สูตร แต่ละสูตรเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับ



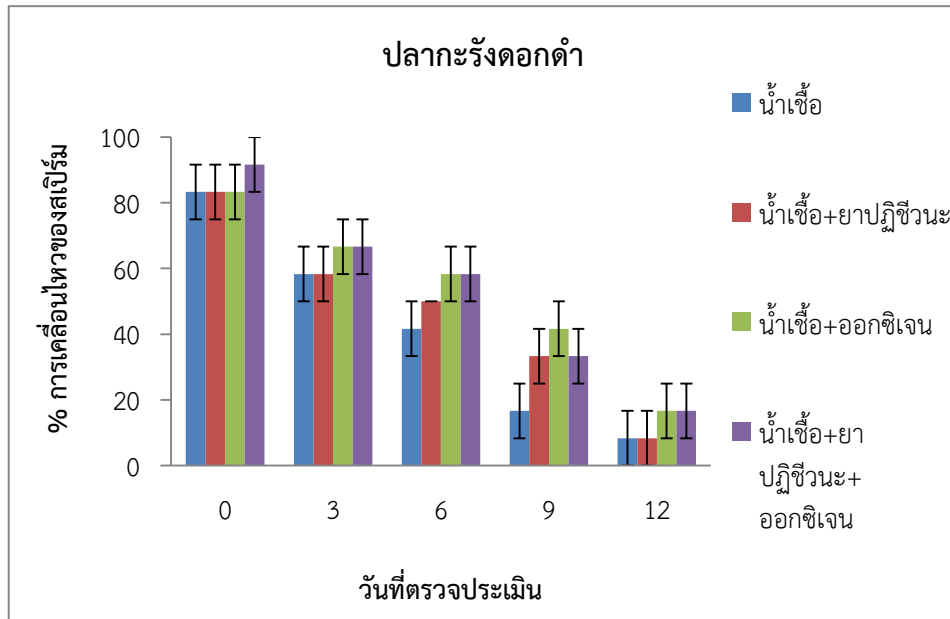
ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลาหมอทะเล ที่เจือจางด้วยสารเจือจางต่างกัน 4 สูตร แต่ละสูตรเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างกัน 4 ระดับ

### 4.3 ผลของการเติมออกซิเจนสมทบ และยาปฏิชีวนะต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นปลากะรัง เชื้อ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

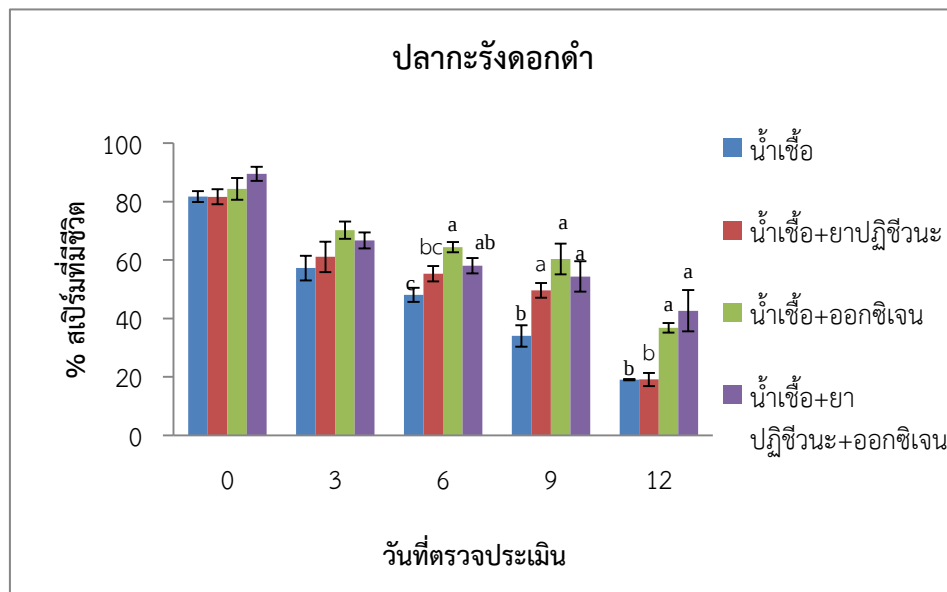
การเติมออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะมีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 °C เป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 วัน แตกต่างกันดังแสดงไว้ในภาพที่ 6 และ 7 โดยในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา พบว่า การเติมออกซิเจนสมทบระหว่างการเก็บรักษาทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (67 % และ 68 % ตามลำดับ) สูงกว่าการไม่เติม (58 % และ 59 % ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ขณะที่การเติมยาปฏิชีวนะไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (63 % และ 63 % ตามลำดับ) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (64 % และ 64 % ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) ในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา พบว่า การเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (58 % และ 46 % กับ 54% และ 50% ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) การเติมยาปฏิชีวนะแม้ไม่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (57 % และ 56 % ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) แต่การเติมออกซิเจนทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (61 %) สูงกว่าการไม่เติม (52 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เช่นกัน ในวันที่ 9 พบว่า การเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (37 % และ 25 % กับ 33 % และ 29 % ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) การเติมยาปฏิชีวนะแม้ไม่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (52 % และ 47 % ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) แต่การเติมออกซิเจนทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (57 %) สูงกว่าการไม่เติม (42 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และในวันที่ 12 พบว่าการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (17 % และ 8 % กับ 13 % และ 13 % ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) การเติมยาปฏิชีวนะแม้ไม่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (31% และ 28% ตามลำดับ) ( $P > 0.05$ ) แต่การเติมออกซิเจนทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (40 %) สูงกว่าการไม่เติม (19 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และพบว่าทั้งสองปัจจัยที่ทำการทดสอบไม่มีอิทธิพลร่วมกันตลอดการทดลอง

การเติมออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะมีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังเชื้อในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 วัน แตกต่างกันดังแสดงไว้ในภาพที่ 8 และ 9 โดยในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา พบว่าการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะสมทบในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (70 % และ 62 % กับ 70 % และ 62 % ตามลำดับ) แต่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังเชื้อ กล่าวคือ การเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะสมทบในระหว่างการเก็บรักษาทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังเชื้อ (74 % และ 72% ตามลำดับ) สูงกว่าการไม่เติม (65 % และ 65 % ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า การเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะสมทบในระหว่างการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว และการมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังเชื้อแต่อย่างใด ( $P > 0.05$ ) และพบว่า ทั้งสองปัจจัยที่ทำการทดสอบไม่มีอิทธิพลร่วมซึ่งกันและกันตลอดการทดลอง

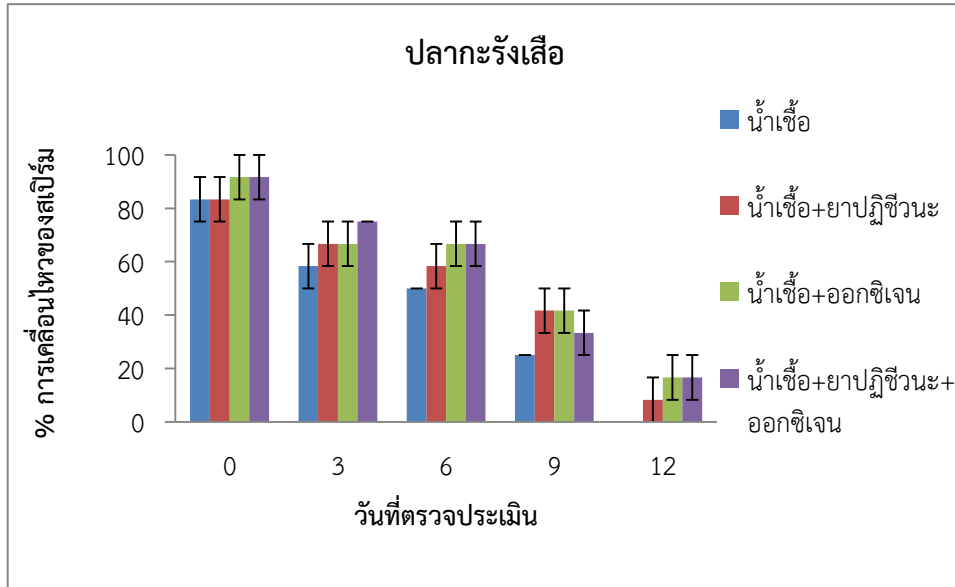
การเติมออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะมีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาหมอตะเลในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 วัน แตกต่างกันดังแสดงไว้ในภาพที่ 10 และ 11 โดยในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา พบว่า การเติมออกซิเจนสมทบในขณะที่ทำการเก็บรักษาทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาหมอตะเล (96 % และ 86 % ตามลำดับ) สูงกว่าการไม่เติม (75 % และ 74 % ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ขณะที่การเติมยาปฏิชีวนะแม้ไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลาหมอตะเล (83 % และ 88 % ตามลำดับ) แต่ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำกว่าการไม่เติม (77 % และ 83 % ตามลำดับ) ในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา พบว่าการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะสมทบในขณะที่ทำการเก็บรักษาไม่มีผลค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลาหมอตะเล (79 % และ 67 % กับ 70 % และ 75 % ตามลำดับ) ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ แต่มีการเติมออกซิเจนสมทบ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาหมอตะเลดีกว่า ส่วนในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา พบว่า การเติมออกซิเจนสมทบในขณะที่ทำการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาหมอตะเล (50 % และ 54 % กับ 56 % และ 53 % ตามลำดับ) แต่ทุกชุดการทดลองที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาหมอตะเลดีกว่าที่มีการเติม (58 % และ 51 % ตามลำดับ) และในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่าการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะสมทบในขณะที่ทำการเก็บรักษาไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาหมอตะเล และพบว่าทั้งสองปัจจัยที่ทำการทดสอบไม่มีอิทธิพลร่วมกันตลอดการทดลอง



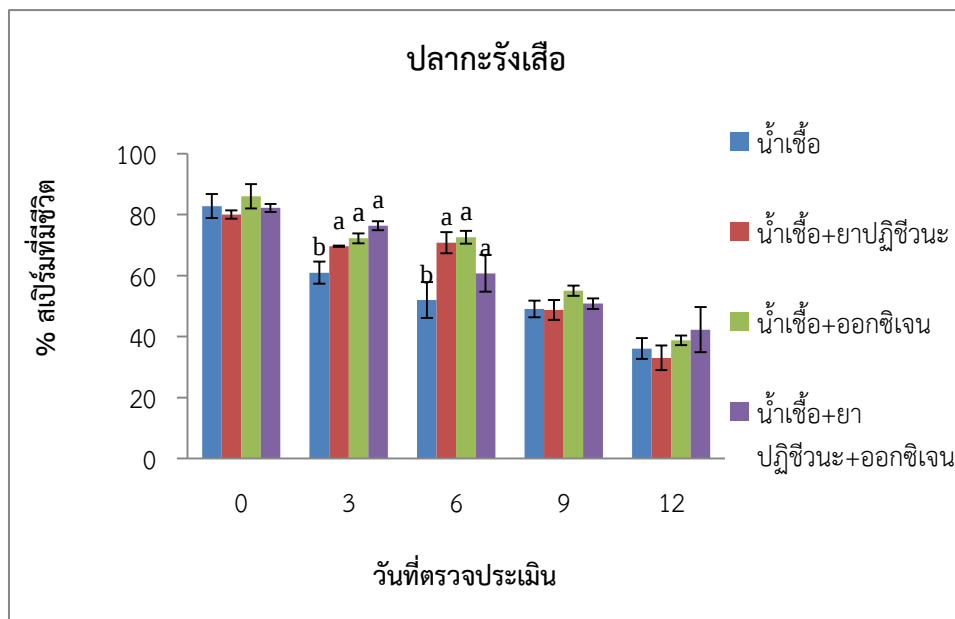
ภาพที่ 6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (mean $\pm$ se, n=3) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกลิจินและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา



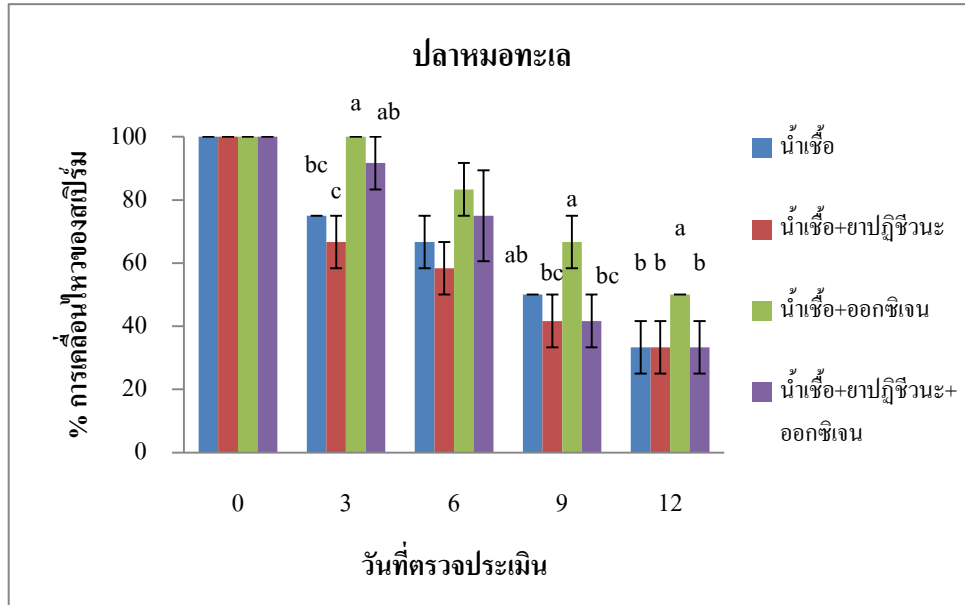
ภาพที่ 7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ (mean $\pm$ se, n=3) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกลิจินและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา



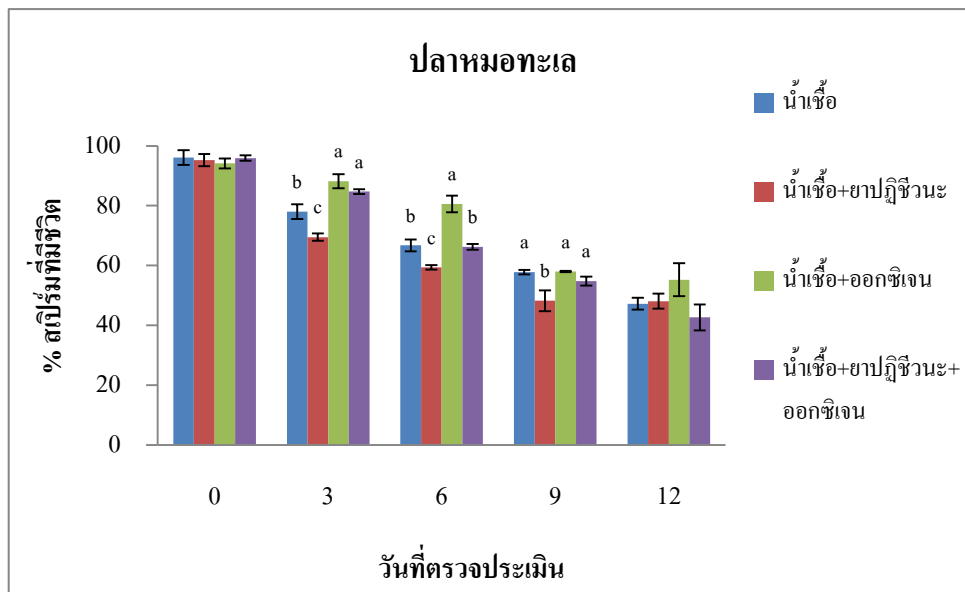
ภาพที่ 8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสเปิร์มปลากะรังเสือ (mean $\pm$ se, n=3) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังเสือ (mean $\pm$ se, n=3) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวกของสปีรึมปลาหมอทะเล (mean $\pm$ se, n=3) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การการมีชีวิตของสปีรึมปลาหมอทะเล (mean $\pm$ se, n=3) ณ วันที่ทำการประเมินต่างๆ เมื่อมีการเติมออกซิเจนและยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา

#### 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษานาน 7 วัน

ผลการตรวจสอบด้านเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักแสดงไว้ในตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ โดยผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ในการผสมเทียมโดยใช้ไข่จากแม่ปลากะรังดอกแดงและใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็นจากปลากะรังทั้งสามชนิด พบว่าทั้งน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็นของปลากะรังทั้งสามชนิดให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวในบีกเกอร์ไม่แตกต่างกัน แต่เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวในถังฟักขนาด 500 ลิตรมีความแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด โดยเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวเมื่อใช้น้ำเชื้อจากสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็นจากปลากะรังดอกดำให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวเมื่อใช้น้ำเชื้อจากสดหรือน้ำเชื้อแช่เย็นจากปลากะรังเสือ และปลากะรังทะเลให้ผลแตกต่างกัน กล่าวคือเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่เย็น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ส่วนการอนุบาลไม่ประสบผลสำเร็จ โดยลูกปลาตายทั้งหมดหลังการอนุบาลได้เพียง 7 วัน สุ่มลูกปลาที่ยังไม่ตายและที่ตายแล้วมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบอาหารในกระเพาะของลูกปลา

**ตารางที่ 8** ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิจากการผสมเทียมปลากะรังชนิดต่าง ๆ ด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็น

| ชนิดปลา                                      | การปฏิสนธิ (%) |                 |
|----------------------------------------------|----------------|-----------------|
|                                              | น้ำเชื้อสด     | น้ำเชื้อแช่เย็น |
| <i>E. coioides</i> x <i>E. malabaricus</i>   | 87.1±4.0       | 78.3±2.1        |
| <i>E. coioides</i> x <i>E. lanceolatus</i>   | 84.3±3.8       | 75.8±2.5        |
| <i>E. coioides</i> x <i>E. fuscoguttatus</i> | 77.0±2.3       | 71.0±5.4        |

หมายเหตุ ไม่สามารถเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลภายในคอลัมน์เดียวกันได้เนื่องจากไม่ใช้การผสมเทียมที่ปฏิบัติพร้อมกันและแม่พันธุ์เดียวกัน

**ตารางที่ 9** ค่าเฉลี่ย (mean±se) เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวจากการผสมเทียมปลากะรังชนิดต่างๆ ด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็น

| ชนิดปลา                                      | % การฟักเป็นตัวในบีกเกอร์ |                 | % การฟักเป็นตัวในถังฟักไข่ |                 |
|----------------------------------------------|---------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
|                                              | น้ำเชื้อสด                | น้ำเชื้อแช่เย็น | น้ำเชื้อสด                 | น้ำเชื้อแช่เย็น |
| <i>E. coioides</i> x <i>E. malabaricus</i>   | 80.7±2.4                  | 73.7±5.5        | 60.0±2.9                   | 58.3±4.4        |
| <i>E. coioides</i> x <i>E. lanceolatus</i>   | 74.7±2.2                  | 72.0±2.1        | 60.0±7.6                   | 50.0±2.9        |
| <i>E. coioides</i> x <i>E. fuscoguttatus</i> | 77.0±2.3                  | 71.0±5.4        | 61.7±4.4                   | 46.7±7.3        |

หมายเหตุ ไม่สามารถเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลภายในคอลัมน์เดียวกันได้เนื่องจากไม่ใช้การผสมเทียมที่ปฏิบัติพร้อมกันและแม่พันธุ์เดียวกัน

#### 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ต่อสเปิร์มในปลากระรังเสื่อ และปลากะรังดอกดำ

การทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด คือ ethanol, methanol, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethylene glycol, DMSO และ trehalose ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0 %, 5 %, 10 %, 15 และ 50 % ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที ภายหลังจากการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายที่มีส่วนประกอบของ Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.4 กรัม + น้ำ 100 มิลลิลิตร และใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์ ตามชนิดและความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น แสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 10 และ 11 แยกอธิบายเป็นรายชนิดดังนี้

ในปลากะรังดอกดำ จากการศึกษพบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ มีผลต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที ให้ผลเหมือนกัน คือการใช้ ethanol, DMSO และ propylene glycol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงที่สุดและไม่แตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละชนิด เมื่อเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5-10 % มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงกว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 15-20 % ผลการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่า มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยดังกล่าว โดยเมื่อใช้ ethanol, DMSO หรือ propylene glycol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ในทุกระดับความเข้มข้นมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 10) ส่วนสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ชนิดอื่นๆมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวแตกต่างกันไปในแต่ละระดับความเข้มข้น

ในปลากะรังเสื่อ จากการศึกษพบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ มีผลต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 20 นาที การใช้ ethanol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับ DMSO รองลงมาคือ trehalose และ propylene glycol ซึ่งในแต่ละชนิด เมื่อเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5-10 % มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงกว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 15-20 % ที่เวลา 40 และ 60 นาที ให้ผลในทำนองเดียวกัน คือการใช้ ethanol, DMSO และ propylene glycol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงที่สุดและไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11) ซึ่งในแต่ละชนิด เมื่อเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5-10 % มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงกว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 15-20 % มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยดังกล่าว โดยการใช้ ethanol, DMSO หรือ propylene glycol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ในทุกระดับความเข้มข้น มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน ส่วน สารโครีโอโพรเทคแทนท์อื่นๆ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวแตกต่างกันไปในแต่ละระดับความเข้มข้น

ผลที่ได้จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (ชนิดและระดับความเข้มข้น) นำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ เพื่อใช้ในขั้นตอนการแช่แข็ง ซึ่งพบว่าสารละลาย DMSO, propylene glycol และ ethanol มีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ เพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำและกะรังเสื่อมากที่สุด เนื่องจากสารละลายทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มของปลากะรังเสื่อและปลากะรังดอกดำน้อยที่สุด โดยพบว่าสเปิร์มยังมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวในเวลา 60 นาทีหลังเริ่มต้นการทดลอง อยู่ในระดับสูง

(ตั้งแต่ 75 % ขึ้นไป) และใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม สำหรับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในกลุ่มควบคุมของสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิด มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 80 - 100%

**ตารางที่ 10** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (mean $\pm$ se, n=3) ในปลากะรังดอกดำเมื่อทำการตรวจที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที หลังน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 %, 5 %, 10 %, 15 % และ 20 %

| ชนิดของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | ความเข้มข้นของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (%) |                                |                                |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                                |                                       | 20 นาที                                | 40 นาที                        | 60 นาที                        |
| Ethanol                        | 0                                     | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 10                                    | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>           | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>   | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>   |
|                                | 15                                    | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 20                                    | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  |
| Methanol                       | 0                                     | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>          | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>abcd</sup> | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 10                                    | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>           | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 15                                    | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>bcd</sup>          | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>bcde</sup> | 41.7 $\pm$ 8.3 <sup>efgh</sup> |
|                                | 20                                    | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>cd</sup>           | 50.0 $\pm$ 0.0 <sup>cde</sup>  | 25.0 $\pm$ 0.0 <sup>gh</sup>   |
| Sucrose                        | 0                                     | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 5                                     | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>          | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  | 58.3 $\pm$ 8.3 <sup>cdef</sup> |
|                                | 10                                    | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>           | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  | 58.3 $\pm$ 8.3 <sup>cdef</sup> |
|                                | 15                                    | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>cd</sup>           | 50.0 $\pm$ 0.0 <sup>cde</sup>  | 33.3 $\pm$ 8.3 <sup>fgh</sup>  |
|                                | 20                                    | 58.3 $\pm$ 8.3 <sup>de</sup>           | 50.0 $\pm$ 0.0 <sup>cde</sup>  | 33.3 $\pm$ 8.3 <sup>fgh</sup>  |
| Propylene glycol               | 0                                     | 100.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>           | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 10                                    | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>          | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 15                                    | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>          | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>abcd</sup> |
|                                | 20                                    | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>bcd</sup>          | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>abcd</sup> | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>abcd</sup> |
| Glycerol                       | 0                                     | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>           | 91.7 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 5                                     | 83.3 $\pm$ 8.3 <sup>abc</sup>          | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>abcd</sup> | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 10                                    | 75.0 $\pm$ 0.0 <sup>bcd</sup>          | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>bcde</sup> | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 15                                    | 66.7 $\pm$ 8.3 <sup>cd</sup>           | 58.3 $\pm$ 8.3 <sup>cde</sup>  | 50.0 $\pm$ 0.0 <sup>defg</sup> |
|                                | 20                                    | 58.3 $\pm$ 8.3 <sup>de</sup>           | 41.7 $\pm$ 8.3 <sup>ef</sup>   | 25.0 $\pm$ 0.0 <sup>gh</sup>   |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 10 (ต่อ)

| ชนิดของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | ความเข้มข้นของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (%) |                          |                          |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                |                                       | 20 นาที                                | 40 นาที                  | 60 นาที                  |
| Ethylene glycol                | 0                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 5                                     | 66.7±8.3 <sup>cd</sup>                 | 66.7±8.3 <sup>bcde</sup> | 50.0±0.0 <sup>defg</sup> |
|                                | 10                                    | 66.7±8.3 <sup>cd</sup>                 | 50.0±0.0 <sup>def</sup>  | 41.7±8.3 <sup>efgh</sup> |
|                                | 15                                    | 41.7±8.3 <sup>ef</sup>                 | 41.7±8.3 <sup>ef</sup>   | 16.7±8.3 <sup>h</sup>    |
|                                | 20                                    | 33.3±8.3 <sup>f</sup>                  | 33.3±8.3 <sup>f</sup>    | 16.7±8.3 <sup>h</sup>    |
| DMSO                           | 0                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 5                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                 | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 10                                    | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                 | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 15                                    | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  | 75.0±0.0 <sup>abcd</sup> |
|                                | 20                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  | 75.0±0.0 <sup>abcd</sup> |
| trehalose                      | 0                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                 | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 5                                     | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 75.0±0.0 <sup>abcd</sup> | 58.3±8.3 <sup>cdef</sup> |
|                                | 10                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 75.0±0.0 <sup>abcd</sup> | 58.3±8.3 <sup>cdef</sup> |
|                                | 15                                    | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  | 75.0±0.0 <sup>abcd</sup> |
|                                | 20                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>  | 75.0±0.0 <sup>abcd</sup> |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 11** เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวน้ำของสเปิร์ม (mean sd, n=3) ในปลากระรังเสื่อ เมื่อทำการตรวจที่ เวลา 20, 40 และ 60 นาที หลังน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับ ความเข้มข้น 0 %, 5 %, 10 %, 15 % และ 20 %

| ชนิดของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | ความเข้มข้นของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวน้ำของสเปิร์ม (%) |                          |                          |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                |                                       | 20 นาที                                   | 40 นาที                  | 60 นาที                  |
| Ethanol                        | 0                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 10                                    | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 66.7±8.3 <sup>abcd</sup> |
|                                | 15                                    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>                    | 75.0±8.3 <sup>abc</sup>  | 75.0±8.3 <sup>abc</sup>  |
|                                | 20                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                   | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> |
| Methanol                       | 0                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                    | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 66.7±8.3 <sup>cde</sup>                   | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  |
|                                | 10                                    | 66.7±8.3 <sup>cde</sup>                   | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  |
|                                | 15                                    | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup>                  | 33.3±8.3 <sup>ef</sup>   | 8.3±8.3 <sup>gh</sup>    |
|                                | 20                                    | 33.3±8.3 <sup>f</sup>                     | 25.0±0.0 <sup>f</sup>    | 0.0±0.0 <sup>h</sup>     |
| Sucrose                        | 0                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                    | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                   | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 10                                    | 75.0±0.0 <sup>bcd</sup>                   | 66.7±8.3 <sup>abcd</sup> | 50.0±0.0 <sup>cdef</sup> |
|                                | 15                                    | 66.7±8.3 <sup>cde</sup>                   | 50.0±0.0 <sup>cde</sup>  | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  |
|                                | 20                                    | 58.3±8.3 <sup>de</sup>                    | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  | 25.0±0.0 <sup>fg</sup>   |
| Propylene glycol               | 0                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                    | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    |
|                                | 5                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 10                                    | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                    | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 15                                    | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  |
|                                | 20                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  |
| Glycerol                       | 0                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                    | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 75.0±0.0 <sup>bcd</sup>                   | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> | 50.0±0.0 <sup>cdef</sup> |
|                                | 10                                    | 75.0±0.0 <sup>bcd</sup>                   | 50.0±0.0 <sup>cde</sup>  | 50.0±0.0 <sup>cdef</sup> |
|                                | 15                                    | 58.3±8.3 <sup>de</sup>                    | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  | 33.3±8.3 <sup>ef</sup>   |
|                                | 20                                    | 50.0±0.0 <sup>ef</sup>                    | 25.0±0.0 <sup>f</sup>    | 0.0±0.0 <sup>h</sup>     |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 11 (ต่อ)

| ชนิดของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | ความเข้มข้นของสาร<br>ไครโอโพรเทคแทนท์ | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (%) |                          |                          |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                |                                       | 20 นาที                                | 40 นาที                  | 60 นาที                  |
| Ethylene glycol                | 0                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 66.7±8.3 <sup>cde</sup>                | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  |
|                                | 10                                    | 66.7±8.3 <sup>cde</sup>                | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  | 33.3±8.3 <sup>ef</sup>   |
|                                | 15                                    | 58.3±8.3 <sup>de</sup>                 | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> | 41.7±8.3 <sup>def</sup>  |
|                                | 20                                    | 66.7±8.3 <sup>cde</sup>                | 50.0±0.0 <sup>cde</sup>  | 50.0±0.0 <sup>cdef</sup> |
| DMSO                           | 0                                     | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                 | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 10                                    | 100.0±0.0 <sup>a</sup>                 | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 15                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  |
|                                | 20                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  |
| trehalose                      | 0                                     | 91.7±8.3 <sup>ab</sup>                 | 91.7±8.3 <sup>a</sup>    | 83.3±8.3 <sup>ab</sup>   |
|                                | 5                                     | 75.0±0.0 <sup>bcd</sup>                | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 10                                    | 75.0±0.0 <sup>bcd</sup>                | 66.7±8.3 <sup>abcd</sup> | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 15                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 75.0±0.0 <sup>abc</sup>  | 58.3±8.3 <sup>bcde</sup> |
|                                | 20                                    | 83.3±8.3 <sup>abc</sup>                | 66.7±8.3 <sup>abcd</sup> | 66.7±8.3 <sup>abcd</sup> |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### 4.6 ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสื่อและปลากะรังดอกดำ

จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำและปลากะรังเสื่อในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ Dextrose 5 กรัม + NaCl 0.4 กรัม + น้ำ 100 มิลลิลิตร และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างกัน 3 ชนิด แต่ละชนิดมีความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ มี equilibration time นาน 10 นาที โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 °C/นาที ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ภายหลังการละลายและตรวจสอบพบว่า ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตแยกอธิบายเป็นรายชนิดดังนี้

ในปลากะรังดอกดำ พบว่า เมื่อใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มสูงกว่าการใช้ ethanol และ propylene glycol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยไม่พบความแตกต่างในค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มเมื่อใช้ ethanol และ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นสุดท้ายของไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่า ในไครโอโพรเทคแทนท์ทุกชนิด เมื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 % ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มสูงกว่าที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 % และ 20 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การ

เคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มเมื่อใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 % และ 15 % ไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่า มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยดังกล่าว กล่าวคือเมื่อใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 % ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงสุด เท่ากับ  $83.3 \pm 8.3$  % ซึ่งไม่แตกต่างกับเมื่อใช้ propylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 % ( $P > 0.05$ ) นอกจากนี้การใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 % ยังทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ  $74.5 \pm 5.1$  % ซึ่งไม่แตกต่างกับเมื่อใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 15 % ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 12)

**ตารางที่ 12** ค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ se) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มในปลากะรังดอกดำและปลากะรังเสือ เมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ DMSO propylene glycol, และ ethanol ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 %, 10 %, 15 % และ 20 % และใช้อัตราลดอุณหภูมิที่ 10 °C/นาที

| ชนิด<br>Cryoprotectant | ความเข้มข้น<br>(%) | ปลากะรังดอกดำ        |                      | ปลากะรังเสือ        |                      |
|------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                        |                    | % Motility           | % Live sperm         | % Motility          | % Live sperm         |
| DMSO                   | 5                  | $33.3 \pm 8.3^{def}$ | $42.6 \pm 12.1^f$    | $58.3 \pm 8.3^{bc}$ | $60.6 \pm 2.2^{cd}$  |
|                        | 10                 | $41.6 \pm 8.3^{cde}$ | $52.7 \pm 9.8^{de}$  | $83.3 \pm 8.3^a$    | $79.3 \pm 1.2^a$     |
|                        | 15                 | $50.0 \pm 0.0^{bcd}$ | $69.6 \pm 5.2^{ab}$  | $66.7 \pm 8.3^{ab}$ | $69.0 \pm 2.1^b$     |
|                        | 20                 | $83.3 \pm 8.3^a$     | $74.0 \pm 5.1^a$     | $58.3 \pm 8.3^{bc}$ | $58.8 \pm 2.4^{cd}$  |
| Propylene glycol       | 5                  | $25.0 \pm 0.0^{ef}$  | $37.6 \pm 2.1^f$     | $50.0 \pm 0.0^{bc}$ | $58.4 \pm 3.1^{cd}$  |
|                        | 10                 | $66.7 \pm 8.3^{ab}$  | $61.4 \pm 3.4^{bcd}$ | $66.7 \pm 8.3^{ab}$ | $65.6 \pm 1.6^{bc}$  |
|                        | 15                 | $50.0 \pm 0.0^{bcd}$ | $56.1 \pm 2.0^{cd}$  | $58.3 \pm 8.3^{bc}$ | $58.7 \pm 2.7^{cd}$  |
|                        | 20                 | $25.0 \pm 0.0^{ef}$  | $38.4 \pm 0.7^f$     | $50.0 \pm 0.0^{bc}$ | $54.5 \pm 1.1^{cd}$  |
| Ethanol                | 5                  | $33.3 \pm 8.3^{def}$ | $46.0 \pm 1.5^{ef}$  | $25.0 \pm 0.0^d$    | $46.5 \pm 3.7^f$     |
|                        | 10                 | $58.3 \pm 8.3^{bc}$  | $64.6 \pm 4.0^{bc}$  | $41.7 \pm 8.3^{cd}$ | $47.7 \pm 3.7^{ef}$  |
|                        | 15                 | $33.3 \pm 8.3^{def}$ | $44.4 \pm 1.9^{ef}$  | $50.0 \pm 0.0^{bc}$ | $53.8 \pm 1.6^{def}$ |
|                        | 20                 | $16.7 \pm 8.3^f$     | $38.4 \pm 5.3^f$     | $58.3 \pm 8.3^{bc}$ | $59.4 \pm 2.5^{cd}$  |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ในปลากะรังเสือ พบว่า เมื่อใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มสูงกว่าการใช้ ethanol และ propylene glycol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นสุดท้ายของไครโอโพรเทคแทนท์พบว่า ในไครโอโพรเทคแทนท์ทุกชนิด เมื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 %, 15 % และ 20 % ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มสูงกว่าที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มเมื่อใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 %, 15 % และ 20 % ไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยดังกล่าว โดย DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 % ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงสุดเท่ากับ  $83.3 \pm 8.3$  % รองลงมาคือ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 15 % ( $P > 0.05$ )

นอกจากนี้การใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 % ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ  $79.3 \pm 1.2$  % (ตารางที่ 12)

#### 4.7 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากระดังงา และปลาหมอทะเล

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 13) พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งด้วยเครื่อง programmable-controlled freezer ให้ผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามแตกต่างกัน โดยในปลาหมอทะเลและปลากะรังดอกดำ การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ  $-10$  และ  $-15$  °C/นาที่ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มสูงกว่าที่อัตรา  $-5$  °C/นาที่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อัตราการลดอุณหภูมิ  $-5$  และ  $-15$  °C/นาที่ ไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) ส่วนในปลากะรังเสือการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่  $-10$  °C/นาที่ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มสูงที่สุดและสูงกว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ  $-5$  และ  $-15$  °C/นาที่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่อัตราการลดอุณหภูมิ  $-5$  และ  $-15$  °C/นาที่ ไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ )

**ตารางที่ 13** ค่าเฉลี่ย (mean±se) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลาหมอทะเล ปลากะรังดอกดำ และปลากะรังเสือ ภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง ( $-196$  °C) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ ( $-5$ ,  $-10$  และ  $-15$  °C/นาที่) ด้วยเครื่อง programmable-controlled freezer

| อัตราการลดอุณหภูมิ | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (%) |                  |                  |
|--------------------|----------------------------------------|------------------|------------------|
|                    | ปลาหมอทะเล                             | ปลากะรังเสือ     | ปลากะรังดอกดำ    |
| $-5$ °C/นาที่      | $50.0 \pm 0.0^b$                       | $41.7 \pm 8.3^b$ | $50.0 \pm 0.0^b$ |
| $-10$ °C/นาที่     | $83.3 \pm 8.3^a$                       | $83.3 \pm 8.3^a$ | $91.7 \pm 8.3^a$ |
| $-15$ °C/นาที่     | $66.7 \pm 8.3^{ab}$                    | $75.0 \pm 0.0^a$ | $66.7 \pm 8.3^b$ |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

#### 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ จากการนำน้ำเชื้อสด (ยกเว้นในปลาหมอทะเล) และน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษามาแล้วเป็นเวลาประมาณ 1 เดือนของปลากะรังดอกดำ ปลากะรังเสือ และปลาหมอทะเล มาผสมกับไข่ของแม่ปลากะรังดอกแดงจำนวน 1 ตัว แสดงผลในตารางที่ 14 ผลการนำค่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟักไข่จากการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้น้ำเชื้อสด พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งจากปลากะรังดอกดำและปลากะรังเสือ ให้ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและการฟักไข่ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด ( $P < 0.05$ ) ส่วนในปลาหมอทะเลไม่สามารถทำการเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดได้ เนื่องจากในช่วงเวลาที่ทำการทดลองดังกล่าวไม่สามารถรวบรวมน้ำเชื้อสดได้ ส่วนกรณีที่ใช้ไข่จากแม่ตัวเดียวแล้วผสมกับน้ำเชื้อปลาต่างชนิดกันยังพบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสด จากปลากะรังทั้งสามชนิด (ยกเว้นน้ำเชื้อสดจากปลาหมอทะเล) มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน ( $P < 0.05$ )

ลูกปลาแรกฟักเป็นตัวที่ได้จากการผสมเทียมครั้งนี้ถูกนำไปศึกษาการอนุบาลต่อด้วยความร่วมมือจาก 3 หน่วยงาน ดังนี้ ลูกผสมระหว่างปลากะรังดอกแดงกับปลาหมอทะเลถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่ง (ประมาณ 80,000 ตัว) นำไปศึกษาการอนุบาลที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ. ระยอง ส่วนที่เหลือ (ประมาณ 30,000 ตัว) อนุบาลที่โรงเพาะฟักของโครงการวิจัยฯ ลูกผสมระหว่างปลากะรังดอกแดงกับปลากะรังเสือ ทั้งที่ผลิตจากน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่ง (อย่างละประมาณ 40,000 ตัว) นำไปศึกษาการอนุบาลที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ. ระยอง ส่วนที่เหลือ (อย่างละประมาณ 40,000 ตัว) ศึกษาการอนุบาลที่โรงเพาะฟักของโครงการวิจัยฯ ส่วนลูกผสมระหว่างไข่ปลากะรังดอกแดงและน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำนั้น ทั้งหมด(อย่างละ 60,000) นำไปอนุบาลที่ฟาร์มปลาเอกชนในจังหวัดสมุทรปราการ ผลการอนุบาลที่โรงเพาะฟักของโครงการวิจัยฯ และภาคเอกชนไม่ประสบผลสำเร็จ โดยลูกปลาทายทั้งหมดหลังการอนุบาลได้เพียง 7 วัน โดยมีสาเหตุจากลูกปลาไม่ได้รับอาหาร ส่วนลูกปลาที่อนุบาลที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ. ระยอง ได้ปลาลูกผสมระหว่างปลากะรังดอกแดงกับปลาหมอทะเลซึ่งเป็นผลผลิตจากน้ำเชื้อแช่แข็ง จำนวน 525 ตัว และได้ลูกปลาผสมระหว่างปลากะรังดอกแดงและปลากะรังเสือซึ่งเป็นผลผลิตจากน้ำเชื้อแช่แข็ง จำนวน 125 ตัว ปัจจุบันปลากะรังลูกผสมทั้งสองชนิดมีอายุ 124 วัน (4 กุมภาพันธ์ 2556) มีความยาวตัว  $17.57 \pm 0.37$  เซนติเมตร น้ำหนัก  $101.43 \pm 8.41$  กรัม

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย (mean±se) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวจากการผสมเทียมปลากะรังชนิดต่างๆ ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

| ชนิดปลา                                      | % การปฏิสนธิ |                 | % การฟักในปีกเกอร์ |                 | % การฟักในถังฟักไข่ |                 |
|----------------------------------------------|--------------|-----------------|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
|                                              | น้ำเชื้อสด   | น้ำเชื้อแช่แข็ง | น้ำเชื้อสด         | น้ำเชื้อแช่แข็ง | น้ำเชื้อสด          | น้ำเชื้อแช่แข็ง |
| <i>E. coioides</i> × <i>E. malabaricus</i>   | 69.0±3.8     | 67.7±2.3        | 67.3±2.4           | 59.0±1.2        | 55.0±7.6            | 46.7±6.0        |
| <i>E. coioides</i> × <i>E. lanceolatus</i>   | *            | 70.0±3.4        | *                  | 52.0±5.6        | *                   | 67.7±2.3        |
| <i>E. coioides</i> × <i>E. fuscoguttatus</i> | 65.3±5.0     | 58.1±7.8        | 64.0±3.1           | 60.0±2.6        | 53.3±4.4            | 50.0±5.8        |

\*ไม่ได้ทำการศึกษา เนื่องจากไม่สามารถรวบรวมน้ำเชื้อสดได้

## บทที่ 5

### อภิปรายและวิจารณ์ผล

#### 5.1 ประสิทธิภาพสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นในปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

การศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเลที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่ในตู้เย็นในระยะสั้น เริ่มต้นด้วยการวัดค่า osmolarity และค่า pH ที่อยู่ในช่องเหลวของน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิด แล้วจัดเตรียมสารเจือจางสูตรต่างๆ โดยให้สารเจือจางที่เตรียมขึ้นนั้น มีค่า pH และค่า osmolarity ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงที่สุดกับของเหลวที่อยู่ในน้ำเชื้อของปลากะรังทั้งสามชนิด ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเจือจาง 4 สูตรที่เตรียมขึ้นเบื้องต้นโดยการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนและหลังการกระตุ้นด้วยน้ำทะเล พบว่า สารเจือจางทั้ง 4 สูตร สามารถใช้เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อได้ดี เนื่องจากไม่ทำให้ตัวอสุจิเคลื่อนที่ แต่หลังจากกระตุ้นด้วยน้ำทะเลพบว่า สเปิร์มในสารเจือจางทุกสูตรมีการเคลื่อนที่ 100 % จากนั้นการศึกษาได้มุ่งทดสอบผลการใช้และไม่ใช้ dextrose ร่วมกับ NaCl ต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิดดังกล่าว เมื่อเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็น ผลการศึกษาพบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น (5-7 วัน) การใช้สารเจือจางที่มี dextrose เป็นส่วนผสมทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาดีกว่าสารเจือจางที่ไม่มี dextrose เป็นส่วนผสม แม้ว่าการใช้ 0.9 % NaCl จะเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังดอกแดง (Peatpisut and Bart, 2010) และปลากะรังหงส์ ( เรณู และนิพนธ์, 2550) เนื่องจาก ให้ค่า osmolarity ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อของปลากะรังทั้งสองมากที่สุด ดังนั้นการประยุกต์ใช้ 0.9 % NaCl เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเลด้วยวิธีแช่เย็น อาจช่วยให้การศึกษาลดลง แต่ Karen and Woods (2002) ให้ความเห็นว่า สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดหนึ่งมีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อ แต่อาจไม่เหมาะสมสำหรับการแช่เย็นน้ำเชื้อก็ได้ เนื่องจากได้ประยุกต์ใช้สารเจือจางที่ดีที่สุดของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Striped Bass มาใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาชนิดเดียวกัน แต่ผลการศึกษากลับพบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำลง นอกจากนี้การเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 °C ขบวนการเมตาโบลิซึมในสเปิร์มยังคงเกิดขึ้น ดังนั้น การใช้ NaCl เพียงอย่างเดียวอาจไม่ช่วยให้การเก็บรักษาคุณภาพของสเปิร์มได้ยาวนานขึ้น เนื่องจาก NaCl เป็นสารละลายเกลือที่ทำหน้าที่เป็นสารบัฟเฟอร์ให้แก่สเปิร์มเพียงอย่างเดียว การแช่เย็นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 0-4 °C สเปิร์มยังต้องการพลังงานเพื่อที่จะรักษาเมตาโบลิซึม ดังนั้นการเพิ่มแหล่งพลังงานแก่สเปิร์มในระหว่างแช่เย็นน้ำเชื้อ จะทำให้ความสามารถในการมีชีวิตและความสามารถในการปฏิสนธิของสเปิร์มดีขึ้น (Tiersch, 2000) ทั้งนี้ Mann and Lutwak-Mann ( 1981) กล่าวว่า แหล่งพลังงานที่ดีของสเปิร์มคือน้ำตาล น้ำตาลที่ใช้ในสารเจือจางน้ำเชื้อมักจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุกโทส (fructose) นอกจากเป็นแหล่งพลังงานแล้ว ยังทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพสมดุลของแรงดันออสโมติก แม้ว่าสเปิร์มของปลาจะมีความสามารถในการออกซิไดซ์กลูโคสได้ดีกว่าสัตว์เลือดอุ่น แต่ก็มีรายงานความสำเร็จของการใช้

กลูโคสเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อปลา โดย Peñaranda *et al.* (2010) เปรียบเทียบสารเจือจางชนิดต่างๆ (foetal bovine serum, N-Tris (hydroxymethyl) methyl-3-amino propanesulfonic acid, bovine serum albumin, และ glucose) ต่อคุณภาพการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในน้ำเชื้อปลาไหลยุโรป (European eel sperm) ที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็น ผลการตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มภายหลังการเก็บรักษาได้นาน 7 วัน พบว่า มีเพียงกลูโคสเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มสูงที่สุด ( $77.9 \pm 2.5 \%$ ) เช่นเดียวกับ Taner and Ergun (2010) พบว่า การใช้ 0.3 M กลูโคสเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อปลา Abant trout (*Salmo trutta*) มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการเก็บรักษาระยะสั้นกว่าการใช้ Ringer solution

ผลการศึกษายังพบเพิ่มเติมในทุกชุดการทดลองที่มีการใช้ dextrose เป็นส่วนผสม โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl จาก 0.2 % เป็น 0.4 % ทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิดที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นดีขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร 1 ใช้ ปริมาณ NaCl มากที่สุด (0.4 %) มีผลทำให้สารเจือจางน้ำเชื้อมีค่า osmolarity สูงที่สุด (406 mOsm/L) เมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆ โดยค่า osmolarity นี้มีความใกล้เคียงกับค่า osmolarity ในของเหลวของน้ำเชื้อปลาหมอทะเลมากที่สุด ( $429 \pm 2$  mOsm/L) แต่มีค่าสูงกว่าค่า osmolarity ในของเหลวของน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำ ( $349 \pm 3$  mOsm/L) และปลากะรังเสือ ( $357 \pm 3$  mOsm/L) ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร 1 มีความเหมาะสมสำหรับการแช่เย็นน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิด เนื่องจากมีแนวโน้มทำให้คุณภาพของสเปิร์มที่เก็บรักษายาวนานขึ้น มีคุณภาพดีที่สุด สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร 2 มีค่า osmolarity (355 mOsm/L) ใกล้เคียงกับค่า osmolarity ในของเหลวของน้ำเชื้อปลากะรังเสือ และปลากะรังดอกดำมากที่สุด จึงให้ประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังเสือ และปลากะรังดอกดำดีที่สุด แต่ให้ผลไม่แตกต่างกับสูตร 1 ขณะที่สารเจือจางสูตร 3 (osmolarity 314 mOsm/L) มีแนวโน้มทำให้คุณภาพของสเปิร์มของปลากะรังทั้งสามชนิดที่เก็บรักษาเมื่อระยะเวลายาวนานขึ้นต่ำกว่าสูตร 1 และสูตร 2 ทั้งนี้เพราะสารเจือจางสูตร 3 มีค่า osmolarity ต่ำกว่าค่า osmolarity ในของเหลวของน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิด ขณะเดียวกันสารเจือจางสูตร 4 มีค่า osmolarity ต่ำที่สุด และมีแนวโน้มทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลากะรังทั้งสามชนิดต่ำที่สุดในแต่ละครั้งที่ทำการประเมิน และส่วนใหญ่ทำให้สเปิร์มมีชีวิตได้ไม่เกิน 5 วันภายหลังเก็บรักษาในตู้เย็น ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า แหล่งพลังงานสำรอง และ osmolarity มีผลต่อการมีชีวิตและใช้ได้ของสเปิร์มผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็น ผลการศึกษานี้ได้สนับสนุนรายงานของ Morisawa and Suzuki (1980) และ Oda and Morisawa (1993) กรณีที่ osmolarity หรือแรงดันออสโมติกเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของปลา หากทำให้สเปิร์มที่เก็บรักษาอยู่ในภาวะ Isotonic หรือภาวะที่ความดันออสโมติกภายในและภายนอกเซลล์สเปิร์มเท่ากัน จะช่วยป้องกันการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนที่จะนำไปแช่เก็บรักษา ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการสูญเสียพลังงานของสเปิร์มก่อนผสมกับไข่ การที่ค่า osmolarity มีค่าต่ำกว่าในของเหลวของน้ำเชื้อปลาและทำให้ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาลดลงนั้น เป็นเพราะเมื่อนำสารเจือจางที่มีแรงดันออสโมติกต่ำกว่าสารของเหลวในน้ำเชื้อ จะทำให้น้ำเกิดการออสโมซิสจากสารละลายภายนอกเซลล์สู่ภายในเซลล์ จึงทำให้เซลล์ของสเปิร์มเกิดการบวมขึ้น และส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนไหวและการมีชีวิตของสเปิร์มได้

คุณภาพของน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิดที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเจือจางแต่เพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อต่อสารเจือจางด้วย เนื่องจากในการศึกษา

พบว่า น้ำเชื้อปลากะรังเสียและปลากะรังดอกดำควรเจือจางได้สูงสุดเพียง 6 เท่า เท่านั้น เพราะจากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนการเจือจางที่สูงขึ้น ( $> 1:6$ ) ส่งผลให้คุณภาพของสเปิร์มที่เก็บรักษาลดลงเนื่องจากน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางมากขึ้นอาจส่งผลให้องค์ประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่ในของเหลวของน้ำเชื้อเจือจางลงในระดับที่ไม่เหมาะสมต่อการอยู่รอดและการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ทั้งนี้ Bozkurt *et al.* (2011) กล่าวว่าองค์ประกอบทางกายภาพและเคมีในสเปิร์มและของเหลวของน้ำเชื้อมีอิทธิพลต่อคุณภาพทางชีวภาพของน้ำเชื้อ ซึ่งสารเจือจางทุกสูตรที่ทดสอบในการศึกษานี้ มุ่งเน้นรักษาองค์ประกอบทางกายภาพ (ค่า osmolality) มากกว่า ทำให้เมื่อมีการเจือจางมากขึ้น แม้จะรักษาสมดุลทางกายภาพให้ใกล้เคียงกับในของเหลวของน้ำเชื้อได้ แต่สมดุลของออสโมลในของเหลวของน้ำเชื้ออาจเปลี่ยนไปจนกระทั่งส่งผลต่อการอยู่รอดและการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม นอกจากนี้ Gwo (2000) กล่าวว่า การใช้อัตราส่วนการเจือจางต่ำๆ เป็นประโยชน์ต่อการรักษาคุณภาพสเปิร์มปลาทะเลมากกว่าอัตราส่วนการเจือจางสูงๆ เพราะอัตราส่วนการเจือจางสูงๆ ทำให้สเปิร์มอ่อนแอลง ผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับในปลา Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) เมื่อใช้อัตราการเจือจางที่มากกว่า 1:20 (Gwo *et al.*, 1991) และ ปลา sea bream (*Sparus aurata*) (Chambeyron and Zohar, 1990) ใช้อัตราการเจือจางที่มากกว่า 1:50 อัตรา ทำให้การรอดของสเปิร์มต่ำลง และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 1:1 เป็น 1:100 มีผลให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังดอกดำ ลดลงจาก 40 เหลือ 2 นาที่ (Gwo, 1993) ส่วนในปลาหมอตทะเลการเจือจางสามารถทำได้ถึง 9 – 12 เท่า สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของเรณู และคณะ (2542) ซึ่งใช้น้ำยา MFR และ CT ในการเจือจางน้ำเชื้อปลาหมอตทะเลด้วยอัตราส่วนการเจือจาง (น้ำเชื้อ:น้ำยา) เท่ากับ 1:9 และ เรณูและนิพนธ์ (2551) ซึ่งใช้สารละลายน้ำเกลือ (NaCl 0.9 %) เจือจางน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ (*Cromileptes altivelis*) ด้วยอัตราส่วนการเจือจาง (น้ำเชื้อ:น้ำยา) เท่ากับ 1:9 ก่อนการแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อปลาสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ เหตุผลที่น้ำเชื้อปลาหมอตทะเลสามารถเจือจางได้มากกว่าปลากะรังเสียและปลากะรังดอกดำนั้น เป็นเพราะน้ำเชื้อปลาหมอตทะเลมีความหนาแน่นของสเปิร์มสูงกว่า จึงสามารถเจือจางในอัตราที่สูงกว่าได้ ความหนาแน่นของสเปิร์มมีความแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด (Stein, 1980) ขึ้นอยู่กับ ฤดูกาลสืบพันธุ์ของปลาแต่ละชนิด (Piironen and Hyvarinen, 1983; Piironen, 1985) อายุและขนาดของปลา (Billard, 1988) ดังนั้นอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อจึงมีความจำเพาะเจาะจงกับปลาแต่ละชนิด (Lahnsteiner *et al.*, 1996)

## 5.2 การเติมออกซิเจนสมทบ และยาปฏิชีวนะต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นปลากะรังเสีย ปลา กะรังดอกดำ และปลาหมอตทะเล

ผลการทดสอบการเติมออกซิเจนสมทบ และยาปฏิชีวนะในสารละลายน้ำเชื้อ และเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็นน้ำเชื้อ ให้ผลเป็นไปในทำนองเดียวกันในปลากะรังทั้งสามชนิด กล่าวคือ การเติมออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะให้แก่ น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในตู้เย็นไม่ช่วยทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาดีขึ้น เนื่องจากตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 °C) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในขวดเก็บน้ำเชื้อที่มีการเติมออกซิเจนสมทบ และยาปฏิชีวนะให้ผลทางสถิติไม่แตกต่างกับการไม่เติม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ ที่มีการใส่ใจเกี่ยวกับการระมัดระวังการปนเปื้อนอุจจาระหรือปัสสาวะรวมถึงสิ่งสกปรกอื่นๆ เป็นพิเศษ กล่าวคือ ภายหลังการสลบปลาที่นำขึ้นมาเก็บน้ำเชื้อแล้ว จะทำการรีดปัสสาวะและอุจจาระออกทิ้งก่อน จากนั้นจึงใช้สารเจือจางน้ำเชื้อล้างทำความสะอาดรอบๆ บริเวณอวัยวะที่รีดน้ำเชื้อ แล้วเช็ดให้แห้ง ก่อนใช้ไมโครปิเปตเก็บรวบรวมน้ำเชื้อใส่ลงในบีกเกอร์ที่สะอาดและผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว หาก

มั่นใจว่า ขั้นตอนการรวบรวมน้ำเชื้อปราศจากการปนเปื้อน การเติมยาปฏิชีวนะลงในสารละลายน้ำเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อาจเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนจึงไม่มีความจำเป็น ผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับ Riley (2002) ซึ่งทดสอบผลของเติมยาด้านแบคทีเรียและยาด้านเชื้อรา (10,000 IU penicillin + 10 g streptomycin + 25  $\mu$ g amphotericin ต่อปริมาตร 0.9 % sodium chloride 1 mL) ในน้ำเชื้อปลา Red Snapper ที่ระดับ 0.1 และ 1.0 % แล้วเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็น เปรียบเทียบกับการไม่ใช้ยาทั้งสองชนิด ผลการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อปลาดังกล่าวซึ่งเจือจางด้วย HBSS 200 mOsm/L /kg ทั้งที่มีการเติมหรือไม่เติมยาด้านแบคทีเรีย และยาด้านเชื้อราสามารถเก็บน้ำเชื้อได้นานถึง 9 วัน โดยให้ผลไม่แตกต่างกันทั้งด้านคุณภาพและระยะเวลาที่เก็บ แต่ผลการศึกษานี้ตรงข้ามกับ Chao *et al.* (1992) ซึ่งพบว่า การเติม Streptomycin ที่ระดับ 500 ppm ในสารละลายน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำช่วยให้คุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็น (อุณหภูมิ 4 °C) ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ neomycin หรือ penicillin และชุดควบคุม โดยสามารถเก็บสเปิร์มได้ถึง 8 วัน (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมากกว่า 10 %)

รายงานหลายฉบับกล่าวถึงความสำคัญของการให้ออกซิเจนแก่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่เย็น (Billard, 1981; McNiven *et al.*, 1993; Bencic *et al.*, 2000; Jenkins-Keeran *et al.*, 2001) ว่าอาจช่วยยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้นรวมถึงทำให้คุณภาพของสเปิร์มที่เก็บรักษาดีขึ้น แต่จากการศึกษานี้กลับพบว่า การให้หรือไม่ให้ออกซิเจนสมทบในขวดเก็บน้ำเชื้อปลากะรังทั้งสามชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการใช้สารเจือจางที่มีคุณภาพดีที่สามารถลดหรือควบคุมขบวนการเมตาโบลิซึมของสเปิร์มได้เป็นอย่างดี และไม่มีแบคทีเรียเกิดขึ้นในขณะเก็บรักษา ดังนั้นการให้ออกซิเจนของสเปิร์มที่อยู่ในขวดเก็บน้ำเชื้อจึงมีน้อยมาก และปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ภายในขวดน่าจะมีปริมาณเพียงพอแล้ว

### 5.3 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่เย็น

การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้น้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษาในตู้เย็นมาเป็นเวลา 7 วัน โดยน้ำเชื้อสดจากปลากะรังทั้งสามชนิดที่รวบรวมได้ถูกเจือจางด้วยสารละลายที่มีส่วนประกอบของ 5 g. Dextrose+ 0.4 g. ละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีอัตราส่วนของการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารเจือจางเป็น 1:6 สำหรับปลากะรังดอกดำและปลากะรังเสือ และ 1:9 สำหรับปลาหมอทะเล โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ไข่จากแม่ปลากะรังดอกแดงเป็นปลาทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวของน้ำเชื้อแช่เย็นที่ผ่านกระบวนการพัฒนาในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากเป็นปลาที่มีราคาต่ำที่สุดและหาได้ง่ายกว่าปลากะรังชนิดอื่นๆ ผลการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่และวางไข่ของการผสมเทียมทั้ง 3 ครั้งแม้ว่าในแต่ละครั้งจะใช้แม่ปลา 2-3 ตัว มาทำการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่และวางไข่ แต่จะคัดเลือกไข่จากแม่ปลาที่ภายหลังการฉีดให้ไข่คุณภาพดีเท่านั้น มาทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน โดยไข่คุณภาพดีสังเกตจากคุณภาพไข่ที่ดี มีลักษณะใส ร่วนเป็นเม็ดอิสระ และรีตได้ง่าย ตรงเวลา และในระหว่างรีตไม่มีเลือดปน ส่วนน้ำเชื้อสดในที่นี้ หมายถึงน้ำเชื้อสดที่รีตมารอไข่ อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ผลการปฏิสนธิและการฟักไข่ในปลากะรังลูกผสมแต่ละชนิดให้ผลสอดคล้องกัน คือ การใช้น้ำเชื้อแช่เย็นจากการศึกษาครั้งนี้ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและมากกว่า 70 % ในปลากะรังลูกผสมทุกชนิด ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธินี้ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ส่วนเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ในบีกเกอร์ของปลากะรังลูกผสมทุกชนิด เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำเชื้อสดกับน้ำเชื้อแช่เย็น พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และค่า

เปอร์เซ็นต์ที่ได้ส่วนใหญ่อยู่ในระดับค่อนข้างสูง (> 70 %) ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ในบีกเกอร์จะทำการคัดเลือกเฉพาะไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิและอยู่ในระยะพัฒนาการเดียวกันเท่านั้นมาศึกษา นอกจากนี้การฟักทำในสภาวะความหนาแน่นที่ต่ำมาก (100 ฟอง/ลิตร) และมีการควบคุมอุณหภูมิให้มีความสม่ำเสมอตลอดเวลาการฟัก ส่วนเปอร์เซ็นต์การฟักในถังฟักไข่ขนาด 500 ลิตร ไข่ไข่ที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อและแยกไข่ดีไข่เสียออกจากกันแล้วนำมาฟักทันที จึงมีทั้งไข่ที่ได้รับและไม่ได้รับการปฏิสนธิอยู่ด้วยกัน เมื่อสุมนับจำนวนลูกปลาหลังฟักเป็นตัวมาคำนวณกับจำนวนไข่ทั้งหมดที่ใส่ในถังฟัก จึงทำให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าในบีกเกอร์ สำหรับเปอร์เซ็นต์การฟักเฉลี่ยในถังฟักไข่ที่พบว่า การใช้ไข่แช่เย็นจากทั้งปลากระรังเสือและปลาหมอทะเลมีค่าต่ำกว่าการใช้ไข่สด สันนิษฐานว่า อาจเป็นเพราะคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นที่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด แต่อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมโดยใช้ไข่แช่เย็นในครั้งนี้ นับว่าประสบความสำเร็จค่อนข้างสูง แม้ว่าการอนุบาลจะไม่ประสบความสำเร็จก็ตาม ทั้งนี้เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่า การอนุบาลลูกปลากระรังเป็นเรื่องยาก และยังต้องการการพัฒนาต่อไป ซึ่งความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีการอนุบาลลูกปลากระรัง

#### 5.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ต่อสเปิร์มในปลากระรังเสือและปลากระรังดอกดำ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ เพื่อเป็นเกณฑ์ในการเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการแช่แข็ง แม้ว่า สารโครีโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ ethanol, methanol, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethylene glycol, DMSO และ trehalose ที่คัดเลือกมาทดสอบกับน้ำเชื้อปลากระรังเสือและปลากระรังดอกดำครั้งนี้ ล้วนแต่เคยผ่านการทดสอบแล้วว่าให้ผลดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทะเลหลายชนิด แต่เป็นเพราะความเหมาะสมเฉพาะตัวของสารต่างๆ ในปลาแต่ละชนิด (the species-specific cryopreservation requirements) ทำให้ต้องมีการศึกษาสำหรับปลาชนิดใหม่เสมอ เช่น การใช้ ethylene glycol เป็นสาร โครีโอโพรเทคแทนท์ที่ให้ผลกลางๆ สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา atlantic croaker (Gwo *et al.*, 1991) และปลา yellowfin seabream (Gwo, 1994) ส่วน methanol ให้ผลดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลา bitterling spermatozoa (Ohta *et al.*, 2001) และปลา spine foot (*Siganus rivulatus*) (Chao, 1991) แต่การศึกษาครั้งนี้กลับพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ethylene glycol ทำให้สเปิร์มปลากระรังดอกดำมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวต่ำที่สุด ส่วน methanol มีประสิทธิภาพต่ำสุดสำหรับน้ำเชื้อปลากระรังเสือ สันนิษฐานว่า การสูญเสียการเคลื่อนไหวนี้น่าจะเป็นเพราะพิษเฉียบพลันของสารเคมีต่อเซลล์สเปิร์ม นอกจากนี้ ผลการศึกษาพบว่า ethanol, DMSO และ propylene glycol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มของปลากระรังเสือและปลากระรังดอกดำน้อยที่สุดในทุกระดับความเข้มข้น (5-20 %) คือภายใน 60 นาที ยังพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มในปลากระรังทั้งสองชนิดมากกว่า 75 % ดังนั้นในการทดลองถัดไป จึงเลือก ethanol, DMSO และ propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้น 5 ถึง 20 % ไปทดสอบการแช่แข็ง

## 5.5 ชนิดและระดับความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ ต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากระรังเสื่อ และปลากระรังดอกดำ

ผลการทดลองใช้ ethanol, DMSO และ propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % ซึ่งใช้อัตราการลดอุณหภูมิด้วยเครื่อง programmable-controlled freezer ที่ระยะ equilibration time นาน 10 นาที หลังจากเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 1 สัปดาห์ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดและที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลให้สเปิร์มของปลากระรังดอกดำและปลากระรังเสื่อภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) อิทธิพลร่วมของสองปัจจัย มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยเดียว คือ ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ จะเห็นว่า เมื่อใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ มีผลทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อปลากระรังดอกดำและปลากระรังเสื่อดีกว่าการใช้ ethanol และ propylene glycol ทั้งนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์แล้ว พบว่า สารทั้งสามชนิดนี้มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มของปลากระรังดอกดำ และปลากระรังเสื่อใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำมาผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วกลับพบว่า ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากระรังดอกดำและปลากระรังเสื่อภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งสูงที่สุด และสูงกว่า การใช้ ethanol และ propylene glycol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) จึงกล่าวได้ว่า DMSO ทำหน้าที่ปกป้องความเสียหายของเซลล์สเปิร์มปลากระรังดอกดำและปลากระรังเสื่อได้ดีที่สุด ในการเลือกใช้ ethanol, DMSO และ propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ (5, 10, 15 และ 20 %) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากระรังดอกดำและปลากระรังเสื่อมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดย การใช้ 20 % DMSO ทำหน้าที่เป็นสารปกป้องอันตรายของเซลล์สเปิร์มในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากระรังดอกดำได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาในปลาทะเลหลายชนิด เช่น ในปลา black grouper (Gwo, 1993) ในปลา ocean pout (Yao *et al.*, 1995) เป็นต้น การใช้ 10 % DMSO ทำหน้าที่เป็นสารปกป้องอันตรายของเซลล์สเปิร์มในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากระรังเสื่อได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาในปลาทะเลหลายชนิด เช่น ปลา milkfish (Chao, 1991), ปลา seabream (Maisse *et al.*, 1996) และปลา spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) (Wayman *et al.*, 1996) เป็นต้น ผลการศึกษาในครั้งนี้สนับสนุนการรายงานของ Gwo (2000) ที่รายงานไว้ว่า การใช้ 10 และ 20 % DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการแช่แข็งปลาทะเลหลายชนิด เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและการปฏิสนธิสูง DMSO ทำหน้าที่ปกป้องอันตรายให้แก่เซลล์สเปิร์มได้เป็นอย่างดีเนื่องจากมีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และมีปฏิสัมพันธ์กับ phospholipid ของเยื่อหุ้มของเซลล์สเปิร์ม (Ogier de Baulny *et al.*, 1996)

## 5.6 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากระรังเสื่อ ปลากระรังดอกดำ และปลาหมอทะเล

อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของปลาเป็นสำคัญ (Suquest *et al.*, 2000) Maurer (1978) ได้ให้ความเห็นว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คือ อัตราการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือถ้าเกิดขึ้นก็ให้น้อยที่สุด แต่ขณะเดียวกันอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นก็ยังเป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วพอที่จะไม่ทำให้เซลล์เป็นอันตรายเนื่องมาจากการสูญเสีย

และการตกผลึกของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังดอกดำ ปลากะรังเสือ และปลาหมอทะเล โดยพบว่า การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ด้วยเครื่อง programmable-controlled freezer โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ  $-10$  และ  $-15^{\circ}\text{C/นาท}$  ทำให้น้ำเชื้อของปลากะรังเสือและปลาหมอทะเล ภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพดีกว่าใช้อัตราการลดอุณหภูมิ  $5^{\circ}\text{C/นาท}$  ผลการศึกษารังนี้สอดคล้องกับ นิพนธ์ และคณะ (2554) ซึ่งพบว่า ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่  $10$  และ  $15^{\circ}\text{C/นาท}$  ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่าที่  $5^{\circ}\text{C/นาท}$  ส่วนในปลากะรังดอกดำ พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ  $-10^{\circ}\text{C/นาท}$  ให้ผลดีที่สุดต่อคุณภาพน้ำเชื้อ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สเปิร์มของปลากะรังเสือ และปลาหมอทะเลมีความอดทนต่ออัตราการลดอุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็ว (high freezing tolerance) ได้ดีกว่าปลากะรังดอกดำ ขณะที่สเปิร์มของปลากะรังดอกดำต้องการอัตราการลดอุณหภูมิต่ำที่  $-10^{\circ}\text{C/นาท}$  เท่านั้น จึงจัดว่าสเปิร์มของปลากะรังเสือเป็นพวก lower freezing tolerance ความเหมาะสมในการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำที่  $-10^{\circ}\text{C/นาท}$  เพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในปลาทะเลหลายชนิด เช่น ในปลา seabream (Barbato *et al.*, 1996) ในปลา seabass (Villani and Catena, 1991) ในปลากะรังดอกแดง (Peatpisut and Bart, 2010) และในปลาหมอทะเล (Kiryakit *et al.*, 2011) ความเหมาะสมในการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำที่  $-15^{\circ}\text{C/นาท}$  เพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีรายงานในปลา Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิต่ำที่  $15^{\circ}\text{C/นาท}$  ให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุด การใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำช้าหรือเร็วนั้นมีผลทำให้น้ำสามารถซึมเข้า-ออกจากเซลล์เป็นผลให้เซลล์ของสเปิร์มเหี่ยว (Plasmolysis) และเซลล์แตก (Plasmolysis) ส่วนการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็งก็เป็นผลให้เซลล์ถูกตีแตกจากเกล็ดน้ำแข็งได้ (Chao *et al.*, 1992)

## 5.7 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

การทดสอบการปฏิสนธิระหว่างไข่ และน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนมานานประมาณ 1 เดือน พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักไข่อยู่ในระดับค่อนข้างสูง ( $> 50\%$ ) และใช้ผลิตปลาลูกผสมจำนวนหนึ่งได้ สามารถสรุปได้ว่า น้ำเชื้อแช่แข็งจากปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเลที่ได้การศึกษาศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตในครั้งนี้ เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตลูกปลากะรังเชิงพาณิชย์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคการอนุบาลลูกปลาให้มีอัตราการรอดสูง จำเป็นต้องได้รับการพัฒนาต่อไป ซึ่งเทคนิคการอนุบาลจะได้รับการพัฒนาเร็วขึ้น เมื่อกระบวนการผลิตลูกปลากะรังสามารถทำได้สะดวกมากขึ้น ด้วยการใช้เทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ นอกจากนี้ประโยชน์ของการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในการศึกษารังนี้ด้วย เนื่องจากได้นำน้ำเชื้อแช่แข็งผลิตปลาผสมสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างประสบความสำเร็จ เช่นเดียวกับเกรียงศักดิ์ (2545) ผลิตปลาผสมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากปลาเทโพและไข่จากปลาสร้อย ได้ลูกผสมที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปลาสร้อย แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ต้องศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงและพัฒนาการอนุบาลให้มีอัตราการรอดสูงขึ้น โดยเฉพาะการอนุบาลเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลาที่ผลิตด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งกับน้ำเชื้อสด หรือเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการรอดตายระหว่างปลาผสมกับสายพันธุ์แท้ และในอนาคตสามารถนำเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไปผลิตลูกปลาเชิงพาณิชย์มากขึ้น

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผลการวิจัย

1. สารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อปลากะรังเสือ ปลากะรังดอกดำ และปลาหมอทะเล ได้แก่ สารละลายที่มีส่วนประกอบของ 5 กรัม Dextrose + 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 มีค่า osmolarity 406 mOsm/L โดยมีอัตราส่วนการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสารเจือจางเป็น 1:6 สำหรับปลากะรังเสือและปลากะรังดอกดำ และอัตราส่วน 1:9 สำหรับปลาหมอทะเล ซึ่งให้ผลในการเก็บรักษาในตู้เย็นได้ยาวนานถึง 7 วัน โดยที่ยังมีการเคลื่อนไหวอยู่ในระดับสูง (> 50 %)

2. กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่เหมาะสมสำหรับปลากะรังเสือและปลาหมอทะเล ได้แก่ การใช้สารเจือจางตามที่สรุปไว้ในข้อ 6.1.1 และใช้ 10 % DMSO ส่วนปลากะรังดอกดำใช้ 20 % DMSO เป็นสารไครโอโพรTECTANT หรือสารป้องกันความเสียหายให้แก่เซลล์ขณะทำการลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือ programmable-controlled freezer มี equilibration time นาน 10 นาที ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ  $-10^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$  โดยมีอุณหภูมิสุดท้ายเป็น  $-80^{\circ}\text{C}$  ก่อนจุ่มลงเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อเมื่อเก็บรักษานานประมาณ 1 เดือน พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและการฟักเป็นตัวในระดับที่ค่อนข้างสูง (> 50 %)

#### 6.2 ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บน้ำเชื้อเพื่อการแช่แข็ง เพื่อให้ได้สเปิร์มที่มีคุณภาพดี และมีปริมาณเพิ่มขึ้นควรเก็บในช่วงต้นถึงกลางฤดูสืบพันธุ์ของปลากะรัง (กรกฎาคม-ตุลาคม)

2. ในขั้นตอนการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อควรทำด้วยความสะอาดและระมัดระวังการปนเปื้อนในน้ำเชื้อ ซึ่งจะทำให้น้ำเชื้อที่เก็บรวบรวมมีความสะอาด และไม่จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในระหว่างการเก็บรักษา

3. ควรมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับผลกระทบของน้ำเชื้อแช่แข็งต่อสมรรถภาพการผลิตปลากะรัง

4. ควรมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับอัตราการเจริญเติบโต การรอดตาย และประสิทธิภาพการผลิตปลาลูกกะรังลูกผสม เพื่อเป็นแนวทางสำหรับสัตว์เศรษฐกิจตัวใหม่

5. ควรมีการศึกษาด้านลักษณะทางพันธุกรรมของลูกปลาด้วย เพราะหาว่าลูกผสมที่ได้จากงานวิจัยสามารถผสมต่อไปอีกได้หรือไม่ เพื่อไม่ให้มีปัญหาเรื่องลูกผสมแพร่พันธุ์ในธรรมชาติโดยที่เราไม่รู้และไม่มีข้อมูล

## บรรณานุกรม

- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2545. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแซ่แซ้ง. วารสารการประมง ปีที่ 55 ฉบับที่ 1:65-69.
- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแซ่แซ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า
- เรณู ยาชีโร วิชัย วัฒนกุล เจนจิตต์ คงกำเนิด และ สรณัฐ ศิริสว. 2542. การเก็บน้ำเชื้อปลาหมอตทะเล โดยวิธีแซ่แซ้ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 12/2542. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 14 หน้า.
- เรณู ยาชีโร และ นิพนธ์ เสนอินทร์ 2551. การเก็บน้ำเชื้อปลากระริงหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) โดยวิธีแซ่แซ้ง. วารสารการประมง 61(6): 508-513.
- เรณู ยาชีโร และ นิพนธ์ เสนอินทร์. 2553. การเก็บน้ำเชื้อปลากระริงหงส์, *Cromileptes altivelis*, (Valenciennes, 1828) โดยวิธีแซ่แซ้ง. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง ระยอง
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และอานนท์ เทืองสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อแซ่แซ้ง แพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus® Bioexcel® และ Egg Yolk Tris. ประมวลผลงานการประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 20 ประจำปี 2548, 27-29 สิงหาคม 2548, กรมปศุสัตว์. (CD-ROM, no. 33).
- สมประสงค์ ชันถม. 2553. การอนุบาลสัตว์น้ำโดยวิธีชีวภาพ. ([www.slideshare.net/ThaiJSP/220920101-5264321](http://www.slideshare.net/ThaiJSP/220920101-5264321)), 31 มกราคม 2556.
- ศิริพร คชรัตน์, วีรพงศ์ ปฐมวรชาติ, สุบัณฑิต นิมิตรตัน และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2549. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแซ่แซ้ง. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน. กรุงเทพฯ. หน้า 52-59.
- Agarwal, N.K. 2005. Developing cryopreservation protocols for the spermatozoa of snow trout and other endangered coldwater species. (Final report) ICARS scheme, 105.
- Amelar, R.D., Dubin, L., and Schoenfeld, C. 1980. Sperm motility. Fertility and Sterility 34 (3), 197-215.
- Barbato, F., Canese, S., Moretti, F. and Misiti, S. 1996. Notes on a cryopreservation technique for gilthead sea bream sperm, p.21, In: *Proceedings of the Commission C2, Refrigeration and Production, International Symposium Froid et Aquaculture* . Bordeaux.
- Bates, M. C., Wayman, W. R. and Tiersch, T. R. 1996. Effect of osmotic pressure on the activation and storage of channel catfish sperm. Transactions of the American Fisheries Society 25, 798-802.

- Billard, R., Petit, J., Jalabert, B. and Szoloci, D. 1974. Artificial insemination in trout using a sperm diluents, pp. 715-723. In: (Blaxter, J.H.S. ed.) *Early Life History of Fish*, Berlin: Springer Verlag.
- Billard, R. 1978. Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de Colloques du CNEXO* 8, 59-73.
- Billard, R., Cosson, J. and Crim, L.W. 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources* 6, 67.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. and Suquet, M. 1995. Sperm physiology and quality In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Bromage, N.R. and Roberts, R.J. (Eds.), pp. 53-76. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bolla, S., Holmefjord, I. and Refstie, T. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture* 65, 371-374.
- Bozkurt, Y., Oğretmen, F., Kokcu, O. and Ercin, U. 2009. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science* 56, 355-364.
- Bozkurt, Y. Oğretmen, F. and Ercin, U. 2011. Relationship between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science* 56 (8), 355-364.
- Buyukhatipoglu, M.S. and Holtz, W. 1984. Sperm output in rainbow trout effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37, 63-71.
- Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K. and Herraiez, M.P. 1998. Sub lethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37, 245-253.
- Chambeyron, F. and Zohar, Y., 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90, 345-352.
- Chao, N.H., Chen, H.P. and Liao, I.C. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture* 5, 389-406.
- Chao, N. H., Tsai, H. P. and Liao, I. C. 1992. Short and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fishery Science* 5, 103-116.
- Chereguini, O., Cal, R.M., Dreanno, C., Ogier de Baulny, B. and Maisse, G. 1998. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scaphthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources* 10, 251-255.
- Christensen, J. M. and Tiersch, T. R. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 340-346.

- 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.
- Coward, K., Bromage, N.R. and Hibbitt, O. 2002. Gametogenesis, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 33-58.
- DiLauro, M.N., Krise, W.F., Hendrix, M.A. and Baker, S.E. 1994. Short-term storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish-culturist* 56, 143-144.
- Doi, M., Hoshino, T., Taki, Y. and Ogasawara, Y. 1982. Activity of the sperm of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) under fresh and preserved conditions. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48, 495-498.
- Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. and Billard, R. 1997. Cryopreservation of turbot, (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology* 48, 589-601.
- Erdahl, A.W. and Graham, E.F. 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking Medium. *Aquaculture* 60, 311-321.
- Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V. and Menu, B. 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. *Aquatic Living Resources* 11, 387-394.
- Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J. and Suquet, M. 1999. Characteristics of sperm of captive sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology* 54, 356-369.
- Geffen, A.J., and Evans, J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 182, 61-72.
- Ginsburg, A.S. 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *Journal of Embryo and Experimental Morphology* 11, 13-33.
- Glamuzina, B., Kozul, V., Tutman, P. and Skaramuca, B. 1999. Hybridization of Mediterranean groupers: *Epinephelus marginatus* × *Epinephelus aeneus* and early development. *Aquaculture Research* 30, 625 - 628.
- Glamuzina, B., Glavi, N., Scaramouch, B., Kozul, V. and Tutman, P. 2001. Early development of the hybrid *Epinephelus costae* ♀ × *E. marginatus* ♂. *Aquaculture* 198, 55 - 61.
- Graham, E.F. 1978. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. The integrity of frozen spermatozoa. Page 4 in *Proc. of Conf. Natl. Acad. Sci., Washington, DC*.
- Gronczewska, J., Zietara, M.S., Biegñiewska, A., and Skorkowski, E.F. 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 134 B, 399-406.

- Grzyb, K., Rychlowski, M., Biegniewska, A. and Skorkowski, E.F. 2003. Quantitative determination of creatine kinase release from herring (*Clupea harengus*) spermatozoa induced by tributyltin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134, 207-213.
- Guest, W.C. 1973. Spermatology and sperm preservation of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Master thesis. School of Forestry and wildlife management. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical college. 92 pp.
- Guest, W. C., Avault, J. W. and Rousse, J. D. l. 1976. A Spermatology study of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Transactions of the American Fisheries Society*.
- Gwo, J.C., Strawn K., Longnecker M.T. and Arnold C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94, 355-375.
- Gwo, J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. (Teleost, Periformes, Sparidae). *Theriogenology* 39, 1331-1342.
- Gwo, J.C. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa teleost, perciformes, sparidae). *Theriogenology* 41, 989-1004.
- Gwo, J.C. 2000. Cryopreservation of Sperm of Some Marine Fishes. In: Tierch, T.R. and P.M. Mazik, (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. pp. 136-160.
- Gwo, J.C., Kurokura, H., and Hirano, R. 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 777-782.
- Harvey, B. and Kelley, R.N. 1984. Short-term storage of *Sarotherodon mossambicus* ova. *Aquaculture* 37, 391-395.
- Hogendoorn, H. and Vismans, M.M. 1980. Controlled propagation of the African catfish *Clarias lazera* (C and V). II. Artificial reproduction. *Aquaculture* 21, 39-53.
- Ingermann, R., Holcomb, M. and Robinson, M.L. 2002. Carbon dioxide and pH affect Sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *The Journal of Experimental Biology* 205, 2885-2890.
- Islam, M.S. and Akhter, T. 2011. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences* 1(1), 11-19.
- Jamieson, B.G.M. 1991. *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Jenkins, J. A. and Tiersch, T.R. 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of World Aquaculture Society* 28, 282- 288.
- Jenkins-Keeran, K. and Woods III, L.C. 2002. The cryopreservation of striped bass *Morone saxatilis* semen. *Journal of World Aquaculture Society* 33 (1), 70-77.

- Joseph, E. and Rao, P.V. 1993. Studies on the histological and biochemical changes during spermatogenesis in *Mugil cephalus* Linnaeus and related species. CMFRI Special Publication 56, 37-41.
- Kinnear, P.R. and Gray, C.D. 2000. SPSS for Windows made simple. Release 10. Psychology Press, Sussex, U.K.
- Kiriyakit, A., Gallardo, G.W. and Bart, A.N. 2011. Development of seed production Techniques for grouper hybrids (*Epinephelus coioides* ♀ x *Epinephelus lanceolatus* ♂). Aquaculture 320, 106-112.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. and Weismann, T. 1993. The testicular main duct and the spermatic duct in some cyprinid fishes II. Composition of seminal fluid. Journal of Fish Biology 44, 459-67.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and Patzner, R.A. 1996. Physiological and biochemical determination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen quality for cryopreservation. Journal of Applied Aquaculture 6, 47- 73.
- Lahnsteiner, F. and Patzner, R.A. 1998. Sperm motility of the marine teleosts Boops boops, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. Journal Fish Biology 52, 726-742.
- Leung, L.K.P., 1987. Cryopreservation of spermatozoa of tile barramundi (*Lates calcarifer*) Teleostei: Centropomidae). Aquaculture 64, 243-247.
- Leung, L.K.P. and Jamieson, B.G.H. 1991. Live preservation of fish gametes. In: Jaemison, B.G.M. (Ed.), Fish Evolution and Systematic: Evidence from Spermatozoa. pp. 231-234. Cambridge University Press, London.
- Linhart, O., Slechta, V. and Slavik, T. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica Monographs 16, 285-311.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, L. 1981. Male reproduction function and semen. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp.495.
- Morisawa, M. and Suzuki, K. 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science 210, 1145-1147.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. 1983. Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Zoology 107, 95-103.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. Journal of Zoological Science 2, 605-615.
- Morisawa, M., Oda, S. and Yoshida, M. 1999. Trans-membrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: Gagnon C (Ed.) The male gamete: From basic to clinical applications. Cache Rive Press, Vien-na, IL, pp 149 -160.

- Mounib, M.S., Hwang, P.C. and Idler, D.R. 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod *Gadus morhua* sperm. Journal of the Fisheries Resources Board of Canada 25, 2623-2632.
- Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 53, 13-18.
- Muchlisin Z. A. 2005 Review: Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. Biodiversities 6 (1):66-69.
- Na-Nakorn, U. 1999. Genetic factors in fish production: a case study of the catfish *Clarias*. pp. 175-187, In Mustafa, S. (Ed.) Genetics in Sustainable Fisheries Management. Fishing News Books, London.
- Niemann, H. 1985. Freezing of bovine embryos: effects of a one-step addition of 1.4 M glycerol. Theriogenology 23, 369-379.
- Oda, S. and Morisawa, M. 1993. Rises of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. Cell Motility and the Cytoskeleton 25, 171-178.
- Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Heyderff, M. and Maisse, G. 1996. Flow cytometric analysis of plasma membrane damages of rainbow trout and turbot frozen sperm. In: *Proceedings of the Commission C2, Refrigeration and Production, International Symposium Froid et Aquaculture* pp. 65-72, Bordeaux.
- Ohta, H., Ikeda, K. and Izawa, T. 1997. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. Journal of Experimental Zoology 277, 171-180.
- Ott, A. G. and Horton, H. F. 1971. Fertilization of Chinook and Coho salmon eggs with Cryopreserved sperm. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 28, 745-749.
- Penaranda, D.S., Perez, L., Gallego, V., Barrera, R., Jover, M. and Asturiano, J.F. 2010. European eel sperm diluents for short-term storage. Reproduction in Domestic Animal 45, 407-415.
- Peatpisut, T., Bart, A.N. 2010. Cryopreservation of sperm from natural and sex-reversed orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Aquaculture Research 42, 22-30.
- Pillai, M.C., Yanagimachi, R. and Cherr, G.N. 1994. In vivo and in vitro initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from Pacific herring, *Clupea pallasii*. Journal of Experimental Zoology 269, 62-68.
- Pullin, R.S.V. 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures. Aquaculture 1, 279-283.
- Rakitin, A., Ferguson, M. M. and Edward A.T. 1999. Sperm competition and fertilization success in Atlantic cod (*Gadus morhua*): effect of sire size and condition factor on gamete quality. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56, 2315-2323.

- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. In: *Broodstock Management and Egg and larval Quality* (Ed. by N.R. Bromage and R.J. Roberts), pp. 53-76. Cambridge University Press, Cambridge.
- Riley, P.L.K. 2002. Refrigerated Storage and Cryopreservation of Sperm for the Production of Red Snapper and Snapper Hybrids. Master thesis. School of Renewable Natural Resources. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 192 pp.
- Ritar, A.J. and Campet, M. 1995. Cryopreservation of sperm from striped trumpeter *Latris lineata*. In: *Proceedings of the Fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish* (Ed. by Goetz, F.W. and Thomas, P.), p. 136. Austin, TX.
- Rieniets, J.P. and Millard, J.L. 1987. Use of saline solutions to improve fertilization of northern pike eggs. *Progressive Fish-Culturist* 48, 117-119.
- Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, G., Kime, D.E. and Ollevier, F. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* 55, 751-769.
- Rurangwa, E., Biegniowska, A., Slominska, E., Skorkowski, E. F. and Ollevier, F. 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 335-344.
- Saad, A., R. Billard, M., Theron, C. and Holledbee, M. G. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture* 71, 133-150.
- Satterfield, J.R. and Flickinger, S. 1995. Field Collection and Short-Term Storage of Walleye Semen. *Progressive Fish-Culturist* 57 (3), 182-187.
- Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17, 707-39.
- Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., and Tiersch, T.R., 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* 53, 1489-1499.
- Shangguan, B. and Crim, L.W. 1995. The effect of stripping frequency on the sperm Quantity and quality in winter flounder. *Pleuronectes americanus*, p. 142. In: (by Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds.) *Proceedings of the Fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish*, Austin, TX.
- Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carillo, M. and Zohar, Y. 1996. Sustained administration of GnRH increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *Journal of Experimental Zoology* 276, 361-368.

- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In Fish Physiology, Vol. 9. (Eds. by Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M.), pp.305- 350. Academic Press, New York.
- Stoss, J., Gexies, L. and Holtz, W. 1987. The role of sample depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) Semen under oxygen. Aquaculture 61, 275-297.
- Suquet, M., Dorange, G., Omens, H.M., Normant, Y., Le Roux, A. and Fauvel, C. 1993. Composition of seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoa of turbot (*Scophthalmus maximus*). Journal of Fish Biology 42, 509-516.
- Suquet, M., Gaignon, J.L., Quemener, L. and Normant, Y. 1995. Artificial insemination of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs: a procedure for experimental purposes. pp. 57-59. In: (P. Lavens, F. Jaspers and Roelants, L., Eds.) Larvio 95, *Fish and Shellfish Larviculture Symposium*, Gent.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. and Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research 31, 231- 243.
- Tabata, K. and Mizuta, A. 1997. Cryopreservation of sex reversed gynogenetic females sperm in hirame. Fisheries Science 63, 482-483.
- Taner, H., and Ergun, A. 2010. Fertilizing ability of short-term preserved spermatozoa Abant trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954). Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 57, 33-38.
- Tiersch, T.R. 2000. Introduction. pp 19-26 In: Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic species. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.
- Thorogood, J. and Blackshaw, A. 1992. Factors affecting the activation, motility and cryopreservation of the spermatozoa of the yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Gimther). Aquaculture and Fisheries Management 23, 337-344.
- Tseng, W.Y. and Poon, C.T. 1983. Hybridization of *Epinephelus* species. Aquaculture 34, 177 - 182.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J. and Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture 194, 191-200.
- Villani, P. and Catena, C. 1991. Gametes cryopreservation of male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): solutions and methodologies. Rivista Italiano di Acquacoltura 26, 217-226.
- Vuthiphandchai, V, Chomphuthawach, S, and Nimrat, S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 1, 72 (1), 129-38.

- Wang, Z. and Crim, L. W. 1997. Season changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, (*Macrozoarces americanus* ). Fish Physiology and Biochemistry 16, 77-83.
- Williot, P., Kopeika, E.F. and Goncharov, B. 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the culture Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). Aquaculture 189, 53–61
- Withler, P.C. and Lim, L.C. 1982. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. Aquaculture 27, 389-392.
- Yao, Z., Crim, L.W., Richardson, G.F. and Emerson, C.J. 1995. Cryopreservation, motility and ultrastructure of sperm from the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.). An internally fertilizing marine teleost. In: Goetz, F.W. and Thomas, P. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish. Proceeding of Fifth International Symposium, p, 149. Austin. TX.
- Yashiro, R. 2008. Overview of grouper aquaculture in Thailand. In: The Aquaculture of Grouper. Lioa, I. C., Leaño, E. M., (Eds.), pp.143 - 154. High Point Press, Taiwan.
- Yamaoka, K., Nanbu, T., Miyakawa, M., Isshiki, T. and Kusaka, A. 2000. Water surface tension-related deaths in prelarval red-spotted grouper. Aquaculture 189, 165–176.

ภาคผนวก

### ภาคผนวกที่ 1 วิธีการเตรียมฮอร์โมนเพื่อการเปลี่ยนเพศ

(Adapted from Garcia, 1989, 1990)

- 350 mg of 17 $\alpha$  Methyltestosterone, MT (Sigma grade)
  - 190 mg Cholesterol powder (95-100 % Cholesterol)
  - 10 mg palm butter.
  - 80 % ethanol
1. ละลาย 350 mg of 17 $\alpha$  MT ด้วย 80 % ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
  2. ผสมสารละลายฮอร์โมนข้อ 1 ให้เข้า with 190 mg Cholesterol powder.
  3. ปั่นยิ้งให้แห้งพอหมาดที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 ชั่วโมง.
  4. ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันดีอีกครั้งกับ 10 mg of palm butter.
  5. นำส่วนผสมทั้งหมดกรอกลงในแท่งพิมพ์เม็ด (pellet maker).
  6. ปั่นยิ้งให้ส่วนผสมแห้งอยู่ในแท่งพิมพ์ประมาณ 30 นาที จึงแกะเม็ดฮอร์โมนออก
  7. เม็ดฮอร์โมนแต่ละเม็ดที่อัดแน่นในแท่งพิมพ์ ซึ่งน้ำหนักหลักแกะออกจากแท่งพิมพ์ได้ 16 มก.ต่อเม็ด โดยแต่ละเม็ดจะบรรจุฮอร์โมน 10 มก.

### ภาพผนวกที่ 1 ขั้นตอนการทำฮอร์โมนเม็ดแปลงเพศ



ภาพผนวกที่ 2 กิจกรรมการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ



ภาพผนวกที่ 3 กิจกรรมการแช่เย็นน้ำเชื้อ

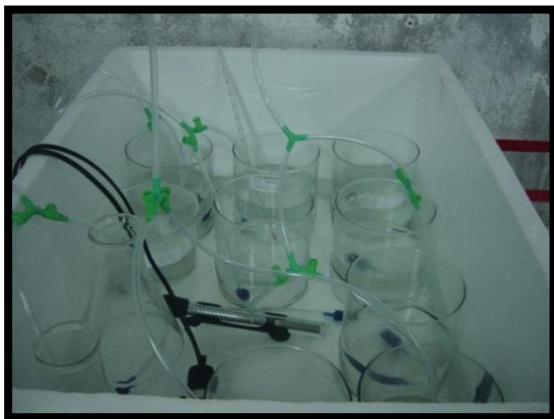


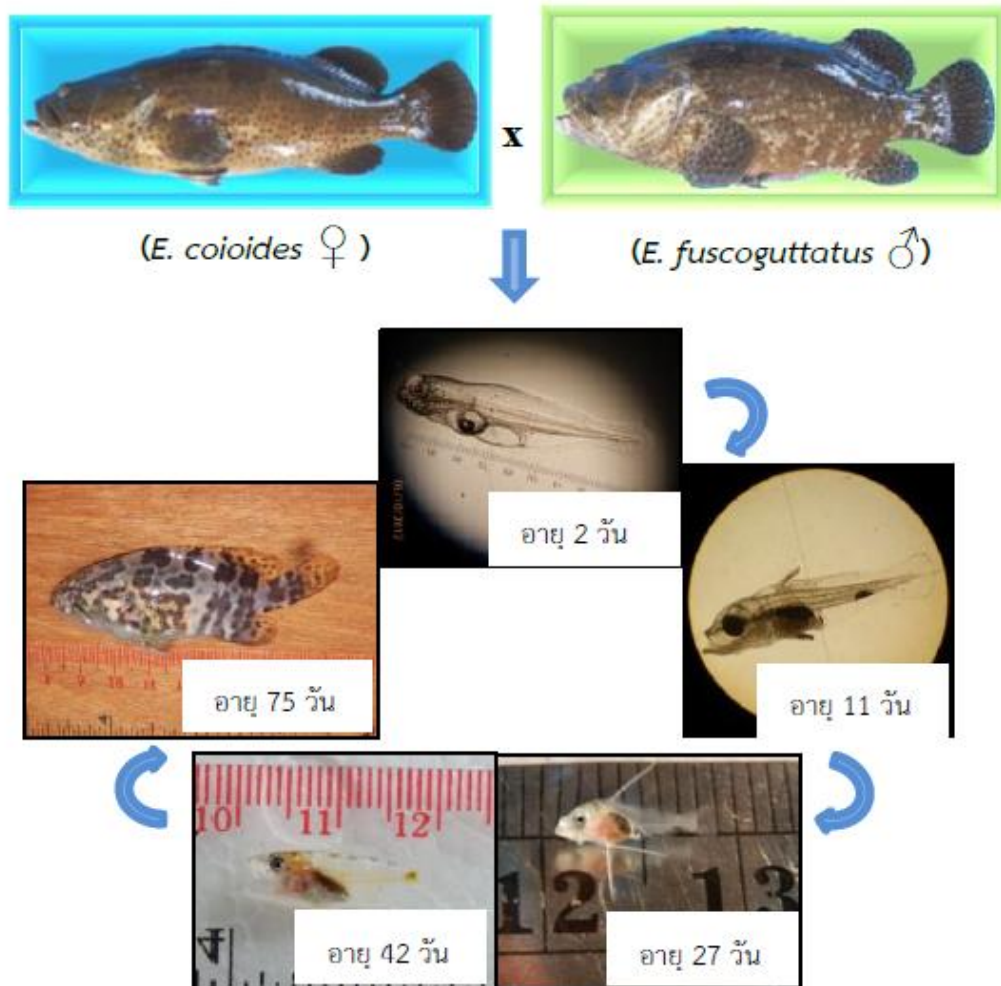
ภาพผนวกที่ 4 กิจกรรมการแช่แข็งน้ำเชื้อ



ภาพผนวกที่ 5 การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษา

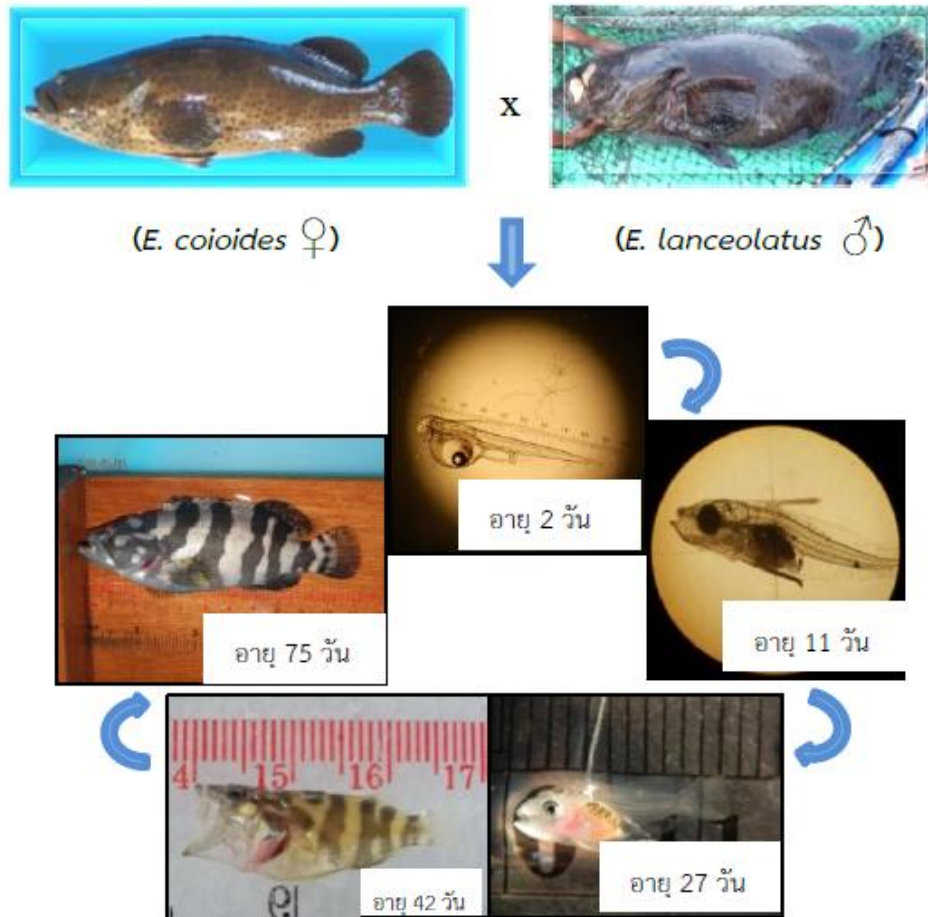






ภาพผนวกที่ 6 พัฒนาการของปลากะรังลูกผสมระหว่างไข่แม่ปลากะรังดอกแดงและน้ำเชื้อแช่แข็งจากปลากะรังเสือ

ภาพผนวกที่ 7 พัฒนาการของปลากะรังลูกผสมระหว่างไข่แม่ปลากะรังดอกแดงและน้ำเชื้อแช่แข็งจากปลาหมอทะเล



**ชื่อโครงการ** การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงปลากะรัง

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย** ประจำปี พ.ศ. 2554 จำนวนเงิน 1,393,930 บาท

**ระยะเวลาทำการวิจัย** 1 ปี ตั้งแต่ ธันวาคม พ.ศ. 2554 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2555

**ชื่อผู้วิจัย** นายปราโมทย์ ศิริโรจน์ (ph.D, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

นายโกวิท สุวรรณรัตน์ (วท.บ,ไทยเจริญฟาร์ม) ,นายอิติกร ดวงอุปมา วท.บ.สัตวบาล วท.ม.สัตวบาล

## บทคัดย่อ

การเลี้ยงปลากะรังโดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 ปี จึงสามารถขายผลผลิตได้ ระยะเวลาการเลี้ยงที่นานขึ้นอาจส่งผลให้มีความเสี่ยงในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ โปรไบโอติก สำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตปลากะรังที่เลี้ยง การศึกษาเริ่มด้วยการคัดแยกจุลินทรีย์จาก ลำไส้ของปลากะรัง (*Epinephelus bleekeri*) ผลการคัดแยกได้แบคทีเรียบริสุทธิ 12 ไอโซเลท และยีสต์ 2 ไอโซเลท ต่อมาทำการศึกษาค้นคุณลักษณะเบื้องต้นของจุลินทรีย์ที่แยกได้เหล่านั้น พบจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกได้แก่ *Lactobacillus plantarum*. IFS-1 และยีสต์ *Candida tropicalis*. JY003 จึงทำการ พัฒนาจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกขึ้น และนำผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกนี้ไปทดสอบใช้จริง โดยการ สเปรย์ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก 1 ลิตร บนอาหารเม็ด 30 กิโลกรัม ใช้เวลาบ่ม 30 นาที ก่อนนำอาหารไปเลี้ยง ปลากะรังดอกแดง (*E. coioides*) การทดสอบทำในปลากะรังที่มีขนาดเริ่มต้นต่างกัน 2 ขนาด คือขนาดความ ยาวตัวปลาเริ่มต้นเฉลี่ย  $2.1 \pm 0.2$  เซนติเมตร ซึ่งทดลองในตู้กระจก ขนาด  $92 \times 49 \times 52$  ซม.<sup>3</sup> มีปริมาตรน้ำ 180 ลิตร ความเค็ม 20 psu ความหนาแน่นของปลา 50 ตัว/ตู้ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ใช้เวลาทดลอง 8 สัปดาห์ และขนาดความยาวตัวปลาเริ่มต้น 18 - 25 ซม. ทดลองในกระชัง ขนาด  $2 \times 2$  ม.<sup>2</sup> ซึ่งติดตั้งแบบขึ้นลงตามน้ำใน บ่อดิน แบ่งขนาดปลาเป็น 3 กลุ่ม (เล็ก: 18-19 ซม., กลาง: 21-22 ซม., และใหญ่: 24-25 ซม.) กลุ่มละ กระชังๆ ละ 20 ตัว ให้อาหารวันละครั้ง ใช้เวลาทดลอง 12 สัปดาห์ ผลการทดสอบในปลากลุ่มแรก พบว่า น้ำหนักตัวเฉลี่ย และอัตราการรอดตายของปลากะรังในชุดทดลองสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปลากะรังในชุดทดลองและชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์รอดตายเฉลี่ย  $78.0 \pm 18$  และ  $48.7 \pm 9.8$  เปอร์เซ็นต์ ความยาวตัวเฉลี่ย  $11.6 \pm 1.3$  และ  $10.2 \pm 1.3$  ซม. และน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $34.9 \pm 3.2$  และ  $31.6 \pm 3.0$  กรัม ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบในปลากลุ่มหลังพบว่า ตลอดการทดลองไม่พบ ปลาตายทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม น้ำหนักตัวและความยาวตัวเฉลี่ยของกลุ่มปลาใหญ่และกลางในชุด ทดลองสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนในกลุ่มปลาเล็กพบว่าน้ำหนักตัวและความ ยาวตัวเฉลี่ยของปลาชุดทดลองสูงกว่าชุดควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) โดยเมื่อสิ้นสุดการ ทดลอง ปลากลุ่มใหญ่ กลุ่มกลาง และกลุ่มเล็กในชุดทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $493.75 \pm 22.45$ ,  $364.00 \pm 13.11$  และ  $238.00 \pm 16.98$  ก. และมีความยาวตัวเฉลี่ย  $32.8 \pm 0.4$ ,  $29.7 \pm 0.4$  และ  $25.6 \pm 0.6$  ซม. ตามลำดับ ส่วนปลาในชุดควบคุมมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย  $388.5 \pm 21.6$ ,  $300.5 \pm 15.2$  และ  $231.0 \pm 16.6$  ก. ตามลำดับ และมีความยาวตัวเฉลี่ย  $30.7 \pm 0.7$ ,  $28.0 \pm 0.4$  และ  $24.9 \pm 0.7$  ซม. ตามลำดับ ผลที่ได้จากการ วิจัยครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าในลำไส้ของปลากะรังมีจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกและสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ที่สามารถช่วยให้การรอดตาย และการเจริญเติบโตให้ดีขึ้น แต่การวิจัยนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในเรื่อง ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในอาหารเลี้ยงปลาสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้

คำสำคัญ : แบคทีเรีย โปรไบโอติก ประสิทธิภาพ การผลิต ปลากะรัง

Project Title: Development of Probiotic Production for Grouper Cultivation Industry

Year of Research grants: 2011 Budget 1,393,930 Baht

Period of research: 1 yrs. Since December, 2011 to November, 2012

Name of Researcher: Mr. Pramote Siriroch, (ph.D, Kasetsart University)

Mr. Kovit Suwanarut (B.S, Thai Chareon Farm)

Mr.Thitikorn Duangaupama (B.S.,M.S., Animal Husbandry)

## Abstract

Generally, grouper culture takes approximately one year for harvesting. The prolonged culture period of grouper may affect to risky investment. Thus, the development of probiotic production for grouper cultivation industry was conducted in this study. Microorganisms have been isolated from a gut of grouper (*Epinephelus bleekeri*) and probiotic property assessment of those isolated microorganism was carried out in later. The results found 12 isolates of bacteria and 2 isolates of yeast; which, only bacteria, *Lactobacillus plantarum*. IFS-1 and yeast, *Candida tropicalis*. JY003 was qualified as probiotic organism. Afterwards, these microorganisms were developed to be probiotic product. Efficiency of probiotic products was tested by two groups of fish. The probiotic product was sprayed on the pellets feed (30 mL/kg of feed) and incubated for 30 min before fed to the experimental fish. Fifty Orange-spotted groupers, *E. coioides* with mean length of  $2.1 \pm 0.2$  cm were stoked in an aquarium size  $92 \times 49 \times 52$  cm<sup>3</sup>, contained 180 L of water volume, and 20 psu. of water salinity. They were fed two times daily for 8 weeks. Another, twenty Orange-spotted groupers with 3 size group (small: 18-19 cm.; medium: 21-22 cm. and big :24-25cm.) were cultured in separate cage ( $2 \times 2$  m<sup>2</sup> size ) which hanged in an earthen pond. They were fed once time daily for 12 weeks. The results found that survival and growth of experimental fish in first batch were significantly higher than the control fish ( $P < 0.05$ ). At the end, mean survival of experimental group and control group were 78.0 and 48.7 percent, mean length were  $11.6 \pm 1.3$  cm and  $10.2 \pm 1.3$  cm, and mean weight were  $34.9 \pm 3.2$  and  $31.6 \pm 3.0$  g, respectively. In second batch, no dead fish found in both experimental and control. Fish growth of big and medium group in experimental fish was significantly higher than the control fish ( $P < 0.05$ ). However, fish growth of small group of experimental and control fish was not significant different ( $P > 0.05$ ). At the end, mean weight of experimental fish in small, medium and big group was  $38.00 \pm 16.98$ ,  $364.00 \pm 13.11$  and  $493.75 \pm 22.452$  g, respectively; mean length was  $32.80 \pm 0.44$ ,  $29.70 \pm 0.36$  and  $25.60 \pm 0.56$  cm., respectively. While, mean weight in control fish was  $388.50 \pm 21.62$ ,  $300.50 \pm 15.24$  and  $231.00 \pm 16.64$  g, respectively, and mean length was  $25.60 \pm 0.56$ ,  $29.70 \pm 0.36$  and  $32.80 \pm 0.44$  cm., respectively. The results demonstrated that probiotic microorganism can be found in

gut of grouper. Moreover, these found probiotic microorganism also can be developed to be a product that can help to improve growth and survival of fish. However, further study need to know that whether this probiotic product can reduce production costs and increase fish production.

---

Key words: Bacteria   Probiotic   Efficiency   Production   Grouper

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

“ปลากะรัง” ปลาเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งที่มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาที่สร้างรายได้จากการส่งออกให้กับประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท แต่เนื่องจากการเจริญเติบโตช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวอื่น ๆ จึงทำให้ธุรกิจการเลี้ยงปลาชนิดนี้ได้รับความนิยมน้อยลง ความพยายามลดระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง ย่อมหมายถึงการทำให้ผู้ประกอบการได้รับผลตอบแทนเร็วขึ้น และลดความเสี่ยงลง หนทางที่สามารถทำได้ได้แก่ การส่งเสริมให้ปลาที่มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น หากการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยไม่มีการใช้เคมีจะเป็นผลดีต่อผู้บริโภค การนำจุลินทรีย์ โปรไบโอติกกลุ่มที่เป็นประโยชน์มาใช้ในการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำโดยเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ปลาที่เลี้ยง จึงนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการส่งเสริมการเลี้ยงปลากะรังให้ก้าวขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรมสัตว์น้ำของประเทศ

คำว่า “โปรไบโอติก” (Probiotic) ในเชิงเพาะเลี้ยงสัตว์ หมายถึง จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลิตผลจากแบคทีเรียที่ใส่ลงในระบบการเลี้ยงสัตว์ แล้วส่งผลให้สุขภาพของสัตว์ดีขึ้น (ภวัต, 2544; Balcazar *et al.*, 2006) การนำโปรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น ได้ดำเนินการมานานนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ในคนและสัตว์บก (Irianto and Austin, 2002; Rinkinen *et al.*, 2003) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ กลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งจัดเป็นพวกจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์ (beneficial microorganism) การทดลองแยกแบคทีเรียแลคติกจากลำไส้ของปลากะรังแล้วพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่สะดวกสำหรับการนำมาใช้ให้ในการเลี้ยงปลากะรังด้วยตนเอง นับเป็นความท้าทายอย่างยิ่ง เนื่องจากหากแบคทีเรียกลุ่มนี้เมื่อเติมลงไปให้อาหารแล้วสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ปลากะรังแล้ว ไม่เฉพาะแต่การเพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิตของปลากะรังได้ดีขึ้นเท่านั้น แต่ยังช่วยให้สามารถผลิตปลากะรังที่ปลอดภัยต่อการบริโภค และลดการนำเข้าวัตถุดิบหรือสารเติมแต่งอาหารสัตว์ลงได้ อีกทั้งยังเป็นการพัฒนาการเลี้ยงปลากะรังในประเทศไทยให้ยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเสริมในอาหารเลี้ยงปลากะรัง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเลี้ยงปลากะรังเชิงพาณิชย์

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 นิยามของโปรไบโอติก

คำนิยามของโปรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งมาจากภาษากรีก แปลว่า เพื่อชีวิต ( for life ) ที่ให้ไว้โดยองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และให้การรับรองโดยสมาคมวิทยาศาสตร์นานาชาติด้านโปรไบโอติกและพรีไบโอติก (The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) มีความหมายกว้างๆว่า “โปรไบโอติก คือจุลินทรีย์มีชีวิตที่ให้เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกาย ในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของเจ้าของร่างกายนั่น ( live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host )”

ขณะที่ Parker (1974) ได้ให้ความหมายของจุลินทรีย์โปรไบโอติกไว้ว่า คือ สิ่งมีชีวิตที่อาจเป็นแบคทีเรีย รา โปรโตซัว ยีสต์ สาหร่าย หรือ ไวรัส รวมถึงสารเคมีใดๆ ที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ แต่โปรไบโอติกในความหมายของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หมายความว่า จุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ที่เติมเข้าไปในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แล้วไปมีผลช่วยให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดีขึ้น (FAO/WHO, 2001; Balcazar *et al.*, 2006) ทั้งนี้ Balcazar *et al.* (2006) กล่าวว่า ผลผลิตของสัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับความสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค แต่โปรไบโอติก ที่ดีต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นจะต้องเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ก่อประโยชน์ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่มจำนวน และทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งมีความคงทนต่อการเก็บรักษา (ภวัต, 2544)

#### 2.2 จุลินทรีย์โปรไบโอติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ได้รับการพิจารณาว่า เป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยสูงต่อคนและสัตว์ ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ พบทั่วๆตามธรรมชาติสามารถสร้างสารที่ยับยั้งและทำลายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ที่มาจากการปนเปื้อนจากอาหาร ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางสายพันธุ์ เพื่อที่จะนำมาใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลคติกต่างๆ

ในประเทศไทย ได้มีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากระบบทางเดินอาหารของปลาทะเลหลายชนิด เช่น ปลากดทะเล ปลาทูแดง ปลาทู 4 โอโหล และปลากะบอก 8 และพบสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกได้ 6 โอโหล ได้แก่ Tb11, Ma9, Mu7, Ba9, Ba1 และ Ba16 ซึ่งเชื่อกันว่ามีความสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 2-10 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 1-5% และสามารถเจริญได้ในน้ำ ตีลังคราห์ ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 0.9% (ฐิติรัตน์และ นนุช, 2555)

## 2.3 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในวงการ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่า ได้มีการศึกษาและนำแบคทีเรียกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติก สำหรับยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร มีผลทำให้โครงสร้างภายในร่างกายของเจ้าบ้าน (host) มีความสมบูรณ์ และยังช่วยควบคุมสิ่งแวดล้อมที่ชักนำให้เกิดโรคอีกด้วย โดยแบคทีเรียที่พบส่วนมากในระบบทางเดินอาหารของปลา เช่น *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* และ *Leconostoc* เป็นต้น (Ringo and Gatesoupe, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent) โดยพบว่า สารที่สร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นสารพวกกรดแลกติกและกรดอะซิติก ซึ่งในปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลกติกได้รับความสนใจ และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง

อนาคตของโปรไบโอติก อาจกล่าวได้ว่าการใช้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ในอนาคตนั้น มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นและเป็นไปได้หลายอย่าง อีกทั้งการค้นคว้าวิจัยก็เป็นไปอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผู้ที่เกี่ยวข้องมีข้อมูลเพื่อการตัดสินใจมากขึ้น แนวโน้มและโอกาสที่จะทำให้การใช้โปรไบโอติกเพิ่มขึ้นนั้น สามารถพิจารณาจากปัจจัยหลัก ๆ (Reid, 2006) ดังนี้

1. มีผลการค้นคว้าวิจัยที่สนับสนุนและอ้างถึงประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกมากขึ้น
2. จากการศึกษาวิจัยพบว่าการใช้โปรไบโอติกนั้นมีผลดีมากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ ที่มีข้อจำกัดของการใช้มากมายและมีผลกระทบข้างเคียงต่อผู้บริโภค
3. แนวโน้มความต้องการสารชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้นเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี

โดยการวิเคราะห์การตลาดถึงแนวโน้มความต้องการของการใช้โปรไบโอติกว่าอีกประมาณ 4 ปีข้างหน้า (ค.ศ.2010) ปริมาณสินค้าประเภทนี้จะวางขายในยุโรปและสหรัฐอเมริกาเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าจากเดิมที่มีอยู่ในปัจจุบัน (European and US Probiotics Market Research, 6 August 2003; [www.frost.com](http://www.frost.com))

ในส่วนของการใช้โปรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นก็มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน สาเหตุหลักคือการคำนึงถึง ยา (เคมี) ฆ่าเชื้อ สารปฏิชีวนะต่างๆ ที่ตกค้างในตู้ปลา ทำให้ลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและยังส่งผลดีต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงในระยะยาวอีกด้วย อาจกล่าวได้ว่าเป็น “อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม” แนวทางนี้จะ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่เกษตรกรไทยสามารถใช้เป็นระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดระยะยาวทดแทนการใช้ยาเพื่อรักษาเพราะหากคิดแล้วการใช้ยาจะเป็นการแก้ที่ปลายเหตุมากกว่า และส่งผลเสียมากมายตามมา เช่นการดื้อยาของเชื้อก่อโรค ทำให้การรักษาไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพและสูญเสียค่าใช้จ่ายโดยไร้ประโยชน์

มีการวิจัยมากมายหลายแนวทางเพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับอุตสาหกรรมเลี้ยงปลา เช่นการศึกษาพฤติกรรมต่างๆของลูกปลา การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การจัดโรงเรือนสำหรับอนุบาลลูกปลาที่สามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมให้ได้มากที่สุด เป็นต้น ได้มีการใช้ probiotics เป็นอาหารเสริมสำหรับการเลี้ยงปลาหลายชนิดก็เป็นวิธีการหนึ่งที่มีมานานหลายปีแล้วแต่สำหรับปลากะรังนั้น ในประเทศไทยยังไม่พบรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเลย ส่วนของต่างประเทศเพิ่งเริ่มมีการตีพิมพ์รายงานวิจัยแต่ยังมีจำนวนน้อย

## 2.4 จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้ผสมอาหารเลี้ยงปลากะรัง

Laconi and Pompei (2007) พบยีสต์สกุล *Candida* อาศัยอยู่ทั่วไปในลำไส้ปลากะบอก (*Mugil spp.*) หลายสายพันธุ์ และรวมถึงยีสต์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Metschnikowia*, *Sporidiobolus*, *Clavispora* และ *Sporobolomyces* ยีสต์เหล่านี้สามารถเกาะติดที่ผิวผนังลำไส้ได้ดี ช่วยยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* ตลอดจนแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้อีกหลายชนิด

Son *et al.* (2009) ทดลองเลี้ยงปลากะรังพันธุ์ *Epinephelus coioides* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยการให้อาหารที่ผสม *Lactobacillus plantarum*  $10^8$  CFU ต่ออาหาร 1 กก. พบว่า การเพิ่มของน้ำหนักตัวปลา (percent weight gain) และประสิทธิภาพการให้อาหาร (feed efficiency) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 404.6 % และ 1.26 ตามลำดับ มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มเปรียบเทียบที่เป็นอาหารธรรมดา และเมื่อหยุดการให้ probiotic เชื้อแบคทีเรียจะลดลงไปมากจากลำไส้ภายใน 1 สัปดาห์

Sun *et al.* (2009, 2010) พบว่าปลากะรังพันธุ์ *Epinephelus coioides* มีการเจริญเติบโตสองกลุ่มด้วยกัน คือกลุ่มโตช้า (slow growth) และกลุ่มโตเร็ว (fast growth) ในลำไส้ปลากลุ่มแรก พบแบคทีเรีย *Vibrio* 4 สายพันธุ์ ประมาณ 12.3 % ของแบคทีเรียในลำไส้ทั้งหมด แต่พบ *Vibrio* 2 สายพันธุ์ ประมาณ 3.6 % ของแบคทีเรียในลำไส้ทั้งหมด ของปลากลุ่มหลัง นอกจากนี้ยังได้พบแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*, *B. clausii* และ *Psychroacter* sp. อีกด้วย และเมื่อนำแบคทีเรีย แบซิลลัส สองสายพันธุ์นี้ไปผสมอาหารปลากะรัง โดยทดลองเลี้ยงปลาเป็นเวลา 60 วัน พบว่าอัตราการเจริญ และน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มเปรียบเทียบ แต่พบว่า feed conversion ratio มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ phagocytic activity และ phagocytic index มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย

กรณีของ Nayak (2010) ได้รวบรวมกลุ่ม probiotic ที่มีการทดลองใช้เลี้ยงปลาชนิดต่างๆรวมถึงปลากะรังด้วย ที่มี *Lactobacillus plantarum* เป็น probiotic สามารถลดการติดเชื้อโรคของ *Streptococcus* sp. และ *Iridovirus* sp. ได้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้แยกการดำเนินการวิจัยออกเป็นสองส่วนสำคัญคือ ส่วนแรกทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์แบคทีเรียในลำไส้ปลากะรังแล้วเก็บไว้ทดลองต่อไป

ส่วนที่สองเป็นการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ได้จัดจำแนกแล้ว ของภาควิชาจุลชีววิทยา ทั้งในตู้ทดลองและระดับฟาร์ม เหตุผลการทดสอบครั้งนี้เพื่อใช้เป็นบรรทัดฐานเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังของผลงานส่วนแรก (ซึ่งจะได้ทำการทดสอบในงานวิจัยปีที่สองต่อไป) การศึกษาวิจัยในแต่ละส่วนมีรายละเอียดดังนี้

#### 3.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ ปลากะรัง

เลือกตัวอย่างปลากะรัง (*Epinephelus bleekeri*) สภาพดีและสดจากตลาด ทำความสะอาด ใช้กรรไกรเปิดช่องท้อง แล้วตัดส่วนทางเดินอาหาร (ลำไส้) ออกมาทั้งหมดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นผ่าแยกลำไส้ ชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 25 ก. นำชิ้นส่วนของลำไส้ที่ตัดแยกประมาณ 25 ก.นี้ไปแช่ในสารละลายเปปโตน ที่มีความเข้มข้น 0.1% แล้วนำเอาไปเข้าเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี cross streak technique บนอาหารแข็งสูตร MRS และ TCA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเก็บไว้ใน slant agar นำเชื้อที่แยกได้ไปแยกจำแนกชนิดต่อไป ขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์แสดงในภาพที่ 12-15

#### 3.2 การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นโปรไบโอติกให้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

##### การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

นำยีสต์ *Candida tropicalis* JY003 จาก stock เชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast peptone dextrose (YPD) ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5-5.0 ทำให้เชื้อกระจายในอาหารโดยใช้ vortex mixture นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง โดยยีสต์นี้จะถูกนำไปใช้เป็น starter ของการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

ถ่ายเชื้อยีสต์จาก starter ลงในอาหารดัดแปลง (น้ำตาลทรายแดง 3%, yeast extract 1.5% และ ovanine white malt 0.5%) ซึ่งปรับค่า pH เท่ากับ 4.5-5.0 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่ให้อากาศแบบเต็มที่เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบปริมาณเชื้อยีสต์ที่อยู่ในการเหลวด้วยวิธีการ spread plate



ภาพที่ 12



ภาพที่ 13



ภาพที่ 14



ภาพที่ 15

ภาพที่ 12-15 แสดงอุปกรณ์ และการตัดชิ้นเนื้อใต้ท้องปลา เพื่อนำเอาลำไส้ปลาออกมาใส่จานแก้ว



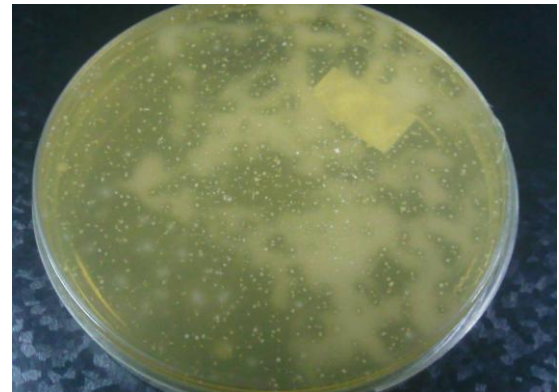
ภาพที่ 16



ภาพที่ 17



ภาพที่ 18



ภาพที่ 19

ภาพที่ 16 -19 แสดงการนำใส่ปลาใส่ในถุงอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (peptone water) นำเข้าเครื่องตีปั่น (stomacher) แยกเชื้อด้วยวิธี cross streak ในอาหารจานแก้ว บ่ม ที่  $37^{\circ}\text{C}$  48 ชม. แบคทีเรียเจริญขึ้นดังในภาพที่ 8

#### การเตรียมหัวเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* IFS-1 จาก stock เชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการเติม calcium carbonate ทำให้เชื้อกระจายเบาๆ ในอาหาร นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื่อนี้จะถูกนำไปใช้เป็น starter ของการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

ถ่ายเชื้อจาก starter ลงในอาหารดัดแปลง (น้ำตาลทรายแดง 1.5%, yeast extract 0.75%, ovantine white malt 0.3% และ calcium carbonate 0.7%) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาตรวจสอบปริมาณเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวด้วยวิธีการ pour plate

### การผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เลี้ยงปลากะรัง

หลังจากเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus sp.* IFS-1 และ *Candida tropicalis*. JY003 ในอาหารเหลว ดัดแปลงให้ได้ปริมาณ เซลล์ ประมาณ  $10^9$  CFU/mL แล้วผสมเชื้อทั้งสองรวมกัน เพื่อนำไปใช้ต่อไป

### 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

#### การใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเลี้ยงปลากะรังขนาดเล็กในตู้ทดลองในโรงเรียน

ลูกปลาที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นลูกปลากะรังดอกแดง (*E. cooidedes*) ที่รวบรวมจากธรรมชาติ จำนวน 500 ตัว เมื่อลูกปลาลำเลียงถึงโรงเพาะฟักแล้ว จะขังลูกปลาทั้งหมดไว้ในถังพลาสติกทรงกลมขนาด ความจุ 1 ตัน ซึ่งมีฝาชีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ซม. แขนงลอยอยู่ในถัง (ภาพที่ 20) และมีการติดตั้งระบบ น้ำหมุนเวียนผ่านระบบกรองชีวภาพ (ความเค็ม 25 psu) ตลอดเวลา โดยลูกปลาทั้งหมดจะได้รับการฝึกให้ ยอมรับอาหารเม็ดสำเร็จก่อนจะนำเข้าสู่อการทดลอง (ภาพที่ 21) อาหารเม็ดสำเร็จรูป (ภาพที่ 22-23) เป็นชนิด จมตัวช้าๆ สำหรับปลาทะเล (โปรตีน 45 % ไขมัน 4.6 % กาก 5.6 % ความชื้น 9.2 %) แบบให้กินจนอิ่ม วัน ละ 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลาฝึก 1 สัปดาห์

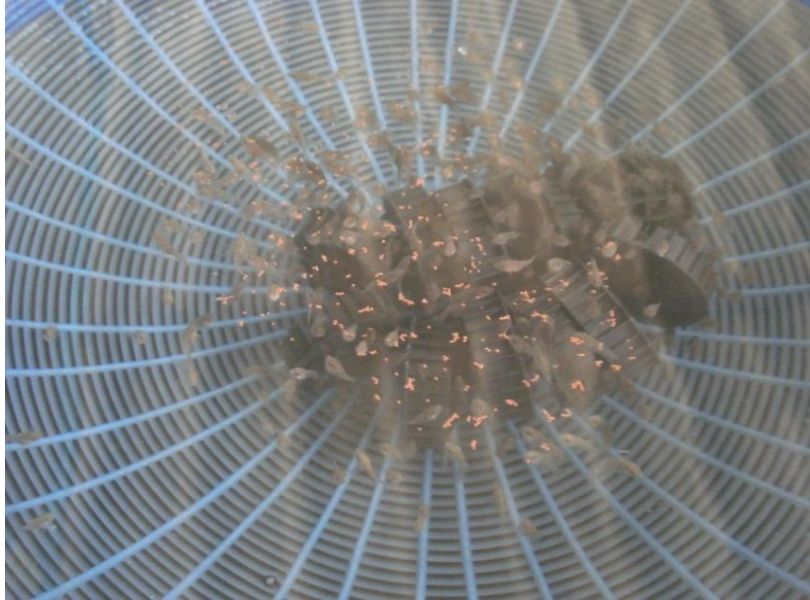


ภาพที่ 20 แสดงการเลี้ยงลูกปลากะรังที่รวบรวมจากธรรมชาติ เบื้องต้นในฝาชี ลอยในถังน้ำ 1 ตัน

การทดลองทำในในตู้กระจกทดลองขนาด  $92 \times 49 \times 52$  ซม.<sup>3</sup> จำนวน 6 ตู้ (ภาพที่ 24) ซึ่งออกแบบ ให้มีระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิดมีการบำบัดน้ำผ่านบ่อบำบัดทางชีวภาพ (Biological filtration) ขนาดความจุ  $30 \times 49 \times 45$  ซม.<sup>3</sup>

อัตราการไหลของน้ำ 6 ลิตรต่อชั่วโมง วัสดุที่ใช้เป็นตัวกรองชีวภาพ (biofilter) ได้แก่เปลือกหอย นานรมที่ทำความสะอาดแล้ว ปริมาณ 5 กก.ต่อตู้ ใช้ความเค็มสูงที่ปรับความเค็มให้ได้ 20 psu และผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีนเรียบร้อยแล้ว โดยจะทำการเดินระบบให้น้ำมีการหมุนเวียนภายในตู้ 2 สัปดาห์

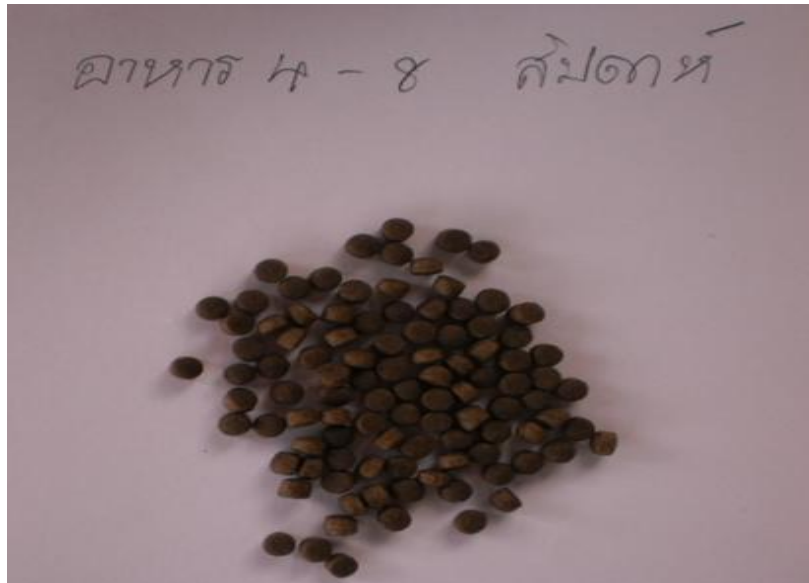
และตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกตู้ ก่อนปล่อยลูกปลาลงเลี้ยง แต่ละตู้จะใส่ตะกร้อรูปทรงกระบอกขนาดเล็ก (ภาพที่ 25 ) จำนวนตู้ละ 6 ใบ สำหรับเป็นที่หลบซ่อนให้แก่ลูกปลา



ภาพที่ 21 การฝึกให้ลูกปลายอมรับอาหารเม็ดก่อนเข้าการทดลอง



ภาพที่ 22 อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองช่วงสัปดาห์ที่ 1-4



ภาพที่ 23 อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองช่วงสัปดาห์ที่ 4-8



ภาพที่ 24 ตู้กระจกที่ใช้ทดลองเลี้ยงปลา



ภาพที่ 25 วัสดุให้หลบซ่อนที่ใส่ในตู้ทดลอง

เมื่อลูกปลาทั้งหมดกินอาหารเม็ดได้เป็นอย่างดีแล้วจึงทำการคัดเลือกลูกปลาที่มีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง และมีขนาดใกล้เคียงกัน (ขนาดความยาวลำตัวเริ่มต้นเฉลี่ย  $2.1 \pm 0.2$  ซม.) ปล่อยู่น้ำอย่างสม่ำเสมอ เลี้ยงที่อัตราความหนาแน่น 50 ตัวต่อตู้ วันถัดมาหลังจากปล่อยู่น้ำลงตู้ทดลอง เริ่มให้อาหารทดลองแก่ ลูกปลา โดยกำหนดให้อาหารวันละ 2 ครั้ง (08.00 น. และ 17.00 น.) อาหารที่ให้ 2 ชนิด ชนิดแรกเป็น อาหารเม็ดสำเร็จรูปชนิดจมตัวช้าๆ สำหรับปลาทะเล ให้ปลาทดลองกินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชนิดที่สองเป็น อาหารเม็ดสำเร็จรูปชนิดลอยน้ำสำหรับปลากะพง (เบอร์ 1) ปริมาณที่ให้ในแต่ละครั้งคือ ให้ที่ละน้อยจนอิ่ม โดยสังเกตจากพฤติกรรมการกิน สำหรับกลุ่มทดลองใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกนั้น จะทำการฉีดพ่นจุลินทรีย์โปรไบโอติกลงบนอาหารแบบให้พองหมดทั่วทุกเม็ด (1ลิตร/อาหาร 30 กก.) ปิดฝาภาชนะบรรจุอาหารที่ฉีดพ่นเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำอาหารนี้ไปให้ปลากิน จัดบันทึกน้ำหนักอาหารที่ใช้ไปในแต่ละตู้ ใช้เวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์ ทำการเก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ โดยบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

1. น้ำหนักตัวเฉลี่ย เป็นน้ำหนักของปลาต่อตัว ของปลาในแต่ละหน่วยทดลอง
2. น้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (average daily weight gain, ADG) (ก./ตัว/วัน)  
= น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง-น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง/ จำนวนวันที่ใช้ทดลอง
3. อัตราการรอดตาย (survival rate) (%)  
= จำนวนปลาที่เหลือรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง  $\times 100$  / จำนวนปลาที่ปล่อยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง
4. วิเคราะห์คุณภาพน้ำ ดังนี้ การตรวจสอบคุณภาพน้ำในบ่อทดลองทุกวันสำหรับ ค่าพีเอช (pH) อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (D.O.) ส่วนปริมาณไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ ) แอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) และ ค่าความเป็นด่างของน้ำ จะทำการตรวจวัดสัปดาห์ละครั้ง

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้ T-test for independent samples ในการทดสอบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระจากกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % การวิเคราะห์ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS



ภาพที่ 26 การชั่งน้ำหนักลูกปลาก่อนการทดลอง      ภาพที่ 27 ความยาวของปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง



ภาพที่ 28 ความยาวของปลาที่ 4 สัปดาห์      ภาพที่ 29 ขนาดปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

### การใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเลี้ยงปลากะรังขนาดกลางในกระชังที่แขวนลอยในบ่อดิน

ดำเนินการเช่าบ่อดินที่ ฟาร์มในเขตอำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา และเตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ เช่น กระชัง เครื่องปั้มน้ำ เครื่องตรวจคุณภาพน้ำ อาหารปลา และสารเคมี เป็นต้น

เนื่องจากลูกพันธุ์ปลากะรังที่ไดรวรรวมาทั้งหมดมีการตายเป็นจำนวนมากไม่สามารถหาปลาได้ครบตามจำนวนที่วางแผนไว้ จึงได้ปรับแผนใหม่ โดยใช้ปลาที่มีขนาดต่างกัน 3 ขนาด แบ่งเป็นกลุ่มลูกพันธุ์ปลา 4 กลุ่ม ทดลองใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก 3 กระชัง ลูกพันธุ์ปลากลุ่มควบคุม 3 กระชัง รวมเป็น 6 กระชัง ในแต่ละกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม จะเป็นลูกพันธุ์ปลาขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ อย่างละ 1 กระชัง โดยใส่ลูกพันธุ์ปลากะรังละ 20 ตัว กระชังจะเป็นอวนโพลี ขนาดตาอวน 1 นิ้ว ขนาดของกระชังกว้าง 2 เมตร ยาว 2 เมตร ลึก 2 เมตร มีอวนมุ้งฟ้ากรูรอบขอบปากกระชัง เพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดอาหารลอยออกไปนอกกระชัง ระหว่างการให้อาหารกระชังจะแขวนลอยกับกรอบโครงเหล็กที่ยึดติดกับทุ่นลอยซึ่งเป็นถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ในกลุ่มลูกพันธุ์ปลาทดลอง จะให้อาหารเม็ดผสมโปรไบโอติก (1 ลิตร/อาหาร 30 กก.) ส่วนในกลุ่มควบคุมจะให้อาหารเม็ดธรรมดาตามปกติ โดยจะให้อาหารวันละ 1 มื้อ เวลา 7.00 น. ของทุกวัน จดบันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกวันเช่นกัน ส่วนการจัดเตรียมลูกพันธุ์ปลา ทำการชั่งวัดน้ำหนักและความยาว ลูกพันธุ์ปลาของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมกระชังละ 20 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ บันทึกข้อมูล

ในการทดลอง ได้แก่ น้ำหนักปลา และความยาวปลาที่เพิ่มขึ้น วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 1996)



ภาพที่ 30 แสดงลักษณะกระชังปลาที่เลี้ยงในบ่อดิน



ภาพที่ 31 แสดงขนาดของกระชังกว้าง 2 เมตร ยาว 2 เมตร ลึก 2 เมตร



ภาพที่ 32 แสดงการจับปลาเพื่อการเจริญ



ภาพที่ 33 แสดงอาหารชนิดเม็ดที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 34 การทำให้ปลาสลบโดยใช้น้ำมัน clove oil และ ethanol



ภาพที่ 35 แสดงการชั่งน้ำหนักปลา



ภาพที่ 36 แสดงการวัดขนาดของปลา



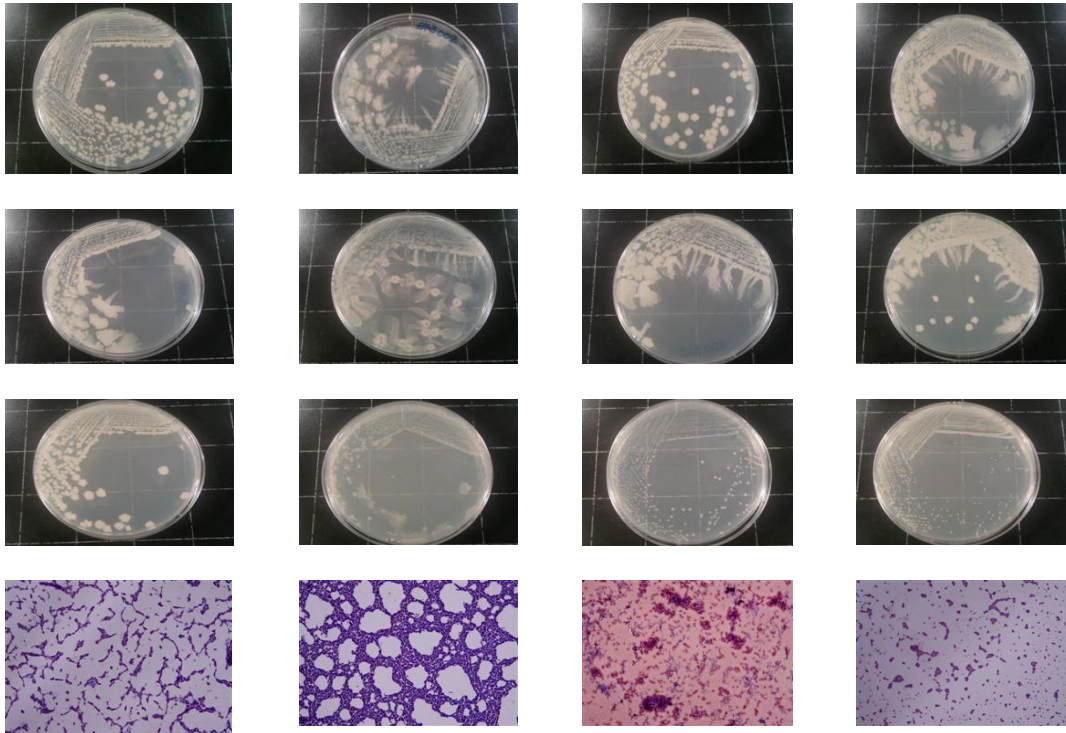
ภาพที่ 37 หลังจากชั่งและวัดขนาดแล้วปลาจะถูกนำมาพักฟื้นในกะละมังที่เติมอากาศเต็มที่

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ปลากะรัง

ผลการแยกแบคทีเรีย และยีสต์จากลำไส้ปลากะรัง 2 ตัว ด้วยวิธี cross streak plate technique ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 38



ภาพที่ 38 แสดงตัวอย่างการแยกเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Cross streak plate technique

สามารถแยกแบคทีเรียและยีสต์ประจำถิ่นจากลำไส้ปลากะรัง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) และ YPD (yeast extract peptone dextrose) ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ 12 ไอโซเลท และ ยีสต์ 2 ไอโซเลท ซึ่งได้เก็บเป็น stock เชื้อจุลินทรีย์ ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เพื่อทำการศึกษาต่อไป

#### 4.2 การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหาร

การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารมีจุดประสงค์ เพื่อต้องการลดต้นทุนสำหรับขยายการผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงต้องใช้สารอาหารที่มีราคาถูกกว่าสูตรอาหารมาตรฐานที่จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แต่ให้มีคุณภาพใกล้เคียงกัน สามารถซื้อหาได้ในประเทศ และมีสม่ำเสมอตลอดทั้งปี จากการทดลองของ Charalampopoulos *et al.* (2002) พบว่า กลุ่มแบคทีเรียแลกติก ที่เป็นโปรไบโอติก สามารถเจริญได้ดีในอาหารธัญพืชที่มีมอลต์เป็นส่วนผสมอยู่ ดังนั้นจึงได้คิดสูตรอาหารที่ใช้แทน อาหาร MRS

(แบคทีเรียแล็กติก) และอาหาร NA ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลทรายแดง 1.5% ยีสต์สกัด 0.75%, มอลต์สกัด 0.3% และ แคลเซียมคาร์บอเนต 1.0%

ผลการตรวจสอบเชื้อแล็กติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารทดแทนสูตรอาหาร MRS ระยะเวลา 48 ชม. ครั้งที่ 1 เฉลี่ยเท่ากับ  $3.30 \times 10^9$  CFU/mL และ ครั้งที่ 2 เฉลี่ยเท่ากับ  $1.32 \times 10^9$  CFU/mL สำหรับสูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ ที่ใช้แทนอาหาร YPD นั้น ประกอบด้วย น้ำตาลทรายแดง 3%, ยีสต์สกัด 1.5 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% ซึ่งผลการตรวจสอบเชื้อยีสต์บนอาหารทดแทน YPD ระยะเวลา 72 ชม. ครั้งที่ 1 เฉลี่ยเท่ากับ  $1.23 \times 10^9$  CFU/mL และครั้งที่ 2 เฉลี่ยเท่ากับ  $1.43 \times 10^9$  CFU/mL

ดังนั้นจึงใช้สูตรอาหารราคาถูกนี้ แทนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน สำหรับผลิต แบคทีเรียแล็กติก และยีสต์ เพื่อการทดลองเลี้ยงปลากะรังต่อไป

#### 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกกับปลากะรังขนาดเล็กที่เลี้ยงในตู้ทดลอง

จากการเลี้ยงลูกปลากะรังดอกแดงขนาดเล็กในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ข้อมูลด้านการเจริญเติบโตและ%การรอดตาย เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดลองซึ่งมีการเสริมผลิตภัณฑ์ โปรไบโอติกในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการใช้ แสดงไว้ในตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า น้ำหนักตัวและความยาวลำตัวเฉลี่ยของปลากะรังดอกแดงก่อนทำการทดลอง มีค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) นั้นหมายถึงเทคนิคในการสุ่มเลือกตัวอย่างมาใช้ในการวิจัยมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเข้าสู่การทดลอง พบว่า เมื่อเลี้ยงปลากะรังดอกแดงเป็นระยะเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว, น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Average Daily Gain; ADG), ความยาวลำตัว และอัตราการรอดตายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) โดยกลุ่มทดลองให้ค่าที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม

นอกจากนี้ตลอดการทดลองเลี้ยงปลาและทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำ ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำ พบว่า ค่าคุณสมบัติน้ำที่ตรวจสอบทุกตัวมีความเหมาะสมตามเกณฑ์มาตรฐานการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไป (ตารางที่ 16)

**ตารางที่ 15** แสดงน้ำหนักตัวเฉลี่ย (ก.) น้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (ก./วัน) อัตราการรอดตาย (%) ของการเลี้ยงปลากะรังดอกแดง 8 สัปดาห์ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  Standard Error ( $n=50$ )

|                                          | กลุ่มควบคุม     | กลุ่มทดลอง<br>(เสริมโปรไบโอติก) | <i>p value</i> |
|------------------------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|
| <b>อัตราการรอด (%)</b>                   | 48.7 $\pm$ 9.8  | 78.0 $\pm$ 18                   | 0.037*         |
| <b>น้ำหนักตัวเฉลี่ย (g)</b>              |                 |                                 |                |
| เริ่มต้น                                 | 0.18 $\pm$ 0.03 | 0.18 $\pm$ 0.03                 | 0.801          |
| 2 สัปดาห์                                | 4.8 $\pm$ 0.7   | 6.22 $\pm$ 0.6                  | 0.000*         |
| 4 สัปดาห์                                | 12.7 $\pm$ 0.6  | 13.3 $\pm$ 0.7                  | 0.001*         |
| 6 สัปดาห์                                | 19.6 $\pm$ 0.6  | 21.3 $\pm$ 1.2                  | 0.000*         |
| 8 สัปดาห์                                | 31.6 $\pm$ 3.0  | 34.9 $\pm$ 3.2                  | 0.000*         |
| <b>น้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (g/ตัว/วัน)</b> |                 |                                 |                |
| 2 สัปดาห์                                | 0.34 $\pm$ 0.02 | 0.43 $\pm$ 0.04                 | 0.020*         |
| 4 สัปดาห์                                | 0.45 $\pm$ 0.01 | 0.47 $\pm$ 0.01                 | 0.010*         |
| 6 สัปดาห์                                | 0.46 $\pm$ 0.1  | 0.45 $\pm$ 0.1                  | 0.823          |
| 8 สัปดาห์                                | 0.56 $\pm$ 0.02 | 0.62 $\pm$ 0.01                 | 0.009*         |
| <b>ความยาวลำตัวเฉลี่ย (ซม.)</b>          |                 |                                 |                |
| เริ่มต้น                                 | 2.1 $\pm$ 0.2   | 2.1 $\pm$ 0.2                   | 0.698          |
| 2 สัปดาห์                                | 3.7 $\pm$ 0.6   | 4.1 $\pm$ 0.6                   | 0.012*         |
| 4 สัปดาห์                                | 6.8 $\pm$ 1.0   | 7.5 $\pm$ 1.0                   | 0.000*         |
| 6 สัปดาห์                                | 8.9 $\pm$ 1.1   | 9.3 $\pm$ 1.3                   | 0.060          |
| 8 สัปดาห์                                | 10.2 $\pm$ 1.3  | 11.6 $\pm$ 1.3                  | 0.000*         |

หมายเหตุ: \*แถวในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ )

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงลูกปลากะรังดอกแดง

| ตู้ทดลอง | ออกซิเจนละลายน้ำ<br>(mg. L <sup>-1</sup> ) | พีเอช       | อุณหภูมิ<br>(° C) | ความเป็นด่าง<br>(mg. L <sup>-1</sup> ) | แอมโมเนีย<br>(mg. L <sup>-1</sup> ) |
|----------|--------------------------------------------|-------------|-------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| 1        | 5.6±0.47                                   | 7.92 ± 0.02 | 28.7 ± 0.4        | 88.1 ± 2.8                             | 0.031 ± 0.018                       |
| 2        | 5.8±0.44                                   | 7.89 ± 0.02 | 28.8 ± 0.4        | 93.5 ± 3.7                             | 0.028 ± 0.014                       |
| 3        | 6.3±0.46                                   | 7.87 ± 0.02 | 28.7 ± 0.4        | 94.1 ± 3.5                             | 0.056 ± 0.016                       |
| 4        | 7.1±0.36                                   | 7.91 ± 0.05 | 28.7 ± 0.4        | 90.6 ± 3.6                             | 0.068 ± 0.034                       |
| 5        | 6.5±0.45                                   | 7.86 ± 0.02 | 28.7 ± 0.3        | 96.1 ± 1.2                             | 0.059 ± 0.012                       |
| 6        | 6.8±0.44                                   | 7.86 ± 0.01 | 28.8 ± 0.4        | 90.4 ± 2.2                             | 0.083 ± 0.019                       |

หมายเหตุ: ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± Standard Error

#### 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกกับปลากะรังที่เลี้ยงในกระชัง

จากการเลี้ยงปลากะรังดอกแดงขนาดกลางในกระชังที่แขวนลอยอยู่ในบ่อดิน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ข้อมูลด้านการเจริญเติบโตและ%การรอดตาย เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดลองซึ่งมีการเสริมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการใช้ แสดงไว้ในตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า น้ำหนักเริ่มต้นของปลากะรังทั้ง 3 ขนาด มีค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) นั้นหมายถึงเทคนิคการสุ่มเลือกตัวอย่างปลามาใช้ในการวิจัยนั้นมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน

ภายหลังการเลี้ยงปลากะรังขนาดใหญ่ ในช่วงครบ 4 สัปดาห์จนถึงครบ 12 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มทดลองหรือกลุ่มที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) กับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากในปลาขนาดใหญ่มีการพัฒนาของระบบย่อยอาหารและขนาดของลำไส้ ที่เพิ่มขึ้น รวมถึงพื้นที่ผิวในการยึดเกาะของจุลินทรีย์โปรไบโอติก มากขึ้นจึงช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรค ช่วยย่อยอาหาร ผลิต วิตามิน กรดอินทรีย์ พร้อมกับเสริมสร้างความแข็งแรงของลำไส้อีกด้วย

ในปลาขนาดกลางพบว่าในแต่ละช่วงเวลายังคงให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ต่างกันไป ขนาดน้ำหนักตัวในช่วง ครบ 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มทดลองให้ค่าที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ในขณะที่ เมื่อเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ )

ในกลุ่มปลาขนาดเล็กพบว่าน้ำหนักปลาให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจากการพัฒนาระบบทางเดินอาหารของปลาในขนาดนี้ยังไม่เต็มที่ มีจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ก่อนแล้วทำให้มีพื้นที่ไม่เพียงพอสำหรับการยึดเกาะของจุลินทรีย์โปรไบโอติก

ตารางที่ 17 แสดงน้ำหนักปลากะรัง (ก.) ที่เลี้ยงในกระชัง 12 สัปดาห์

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  Standard Error ( $n=20$ )

| กลุ่มปลาทดลอง      | กลุ่มควบคุม        | กลุ่มทดลอง<br>(เสริมโปรไบโอติก) | <i>p-value</i> |
|--------------------|--------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>ปลาขนาดใหญ่</b> |                    |                                 |                |
| เริ่มต้น           | 266.00 $\pm$ 6.71  | 259.15 $\pm$ 9.46               | 0.5582         |
| 4 สัปดาห์          | 246.75 $\pm$ 10.56 | 280.25 $\pm$ 13.00              | 0.0493*        |
| 8 สัปดาห์          | 308.50 $\pm$ 16.34 | 401.50 $\pm$ 17.43              | 0.0004*        |
| 12 สัปดาห์         | 388.50 $\pm$ 21.62 | 493.75 $\pm$ 22.45              | 0.0017*        |
| <b>ปลาขนาดกลาง</b> |                    |                                 |                |
| เริ่มต้น           | 183.30 $\pm$ 3.42  | 187.55 $\pm$ 4.24               | 0.4403         |
| 4 สัปดาห์          | 161.00 $\pm$ 3.13  | 174.00 $\pm$ 5.48               | 0.0483*        |
| 8 สัปดาห์          | 215.75 $\pm$ 10.20 | 234.00 $\pm$ 9.10               | 0.1899         |
| 12 สัปดาห์         | 300.50 $\pm$ 15.24 | 364.00 $\pm$ 13.11              | 0.0031*        |
| <b>ปลาขนาดเล็ก</b> |                    |                                 |                |
| เริ่มต้น           | 105.35 $\pm$ 5.41  | 93.35 $\pm$ 3.65                | 0.0738         |
| 4 สัปดาห์          | 119.00 $\pm$ 8.91  | 122.10 $\pm$ 6.29               | 0.7776         |
| 8 สัปดาห์          | 161.00 $\pm$ 11.87 | 172.50 $\pm$ 11.03              | 0.4823         |
| 12 สัปดาห์         | 231.00 $\pm$ 16.64 | 238.00 $\pm$ 16.98              | 0.7700         |

หมายเหตุ: \*แถวในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ )

จากตารางที่ 18 แสดงขนาดความยาวเริ่มต้นของปลากะรังทั้ง 3 กลุ่ม มีขนาดที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) นั้นหมายถึงเทคนิคการสุ่มเลือกตัวอย่างปลามาใช้ในการวิจัยนั้นมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน

ขนาดความยาวของลำตัวในกลุ่มปลาขนาดใหญ่พบว่า เมื่อเลี้ยงครบ 8 และ 12 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ในขณะที่ขนาดความยาวของตัวปลากลุ่มขนาดกลางพบเพียงในช่วงเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์เท่านั้นที่กลุ่มทดลองให้ค่าที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) แต่ในกลุ่มปลาขนาดเล็กพบว่าความยาวของลำตัวมีค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 18 แสดงขนาดความยาวของลำตัวปลากระรัง (ชม.) ในการเลี้ยง 12 สัปดาห์  
ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  Standard Error ( $n=20$ )

| กลุ่มปลาทดลอง      | กลุ่มควบคุม      | กลุ่มทดลอง<br>(เสริมโปรไบโอติก) | <i>p-value</i> |
|--------------------|------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>ปลาขนาดใหญ่</b> |                  |                                 |                |
| เริ่มต้น           | 24.64 $\pm$ 0.27 | 24.87 $\pm$ 0.42                | 0.6465         |
| 4 สัปดาห์          | 26.98 $\pm$ 0.36 | 27.93 $\pm$ 0.38                | 0.0785         |
| 8 สัปดาห์          | 28.33 $\pm$ 0.43 | 30.55 $\pm$ 0.41                | 0.0006*        |
| 12 สัปดาห์         | 30.65 $\pm$ 0.74 | 32.80 $\pm$ 0.44                | 0.0177*        |
| <b>ปลาขนาดกลาง</b> |                  |                                 |                |
| เริ่มต้น           | 22.15 $\pm$ 0.22 | 22.03 $\pm$ 0.18                | 0.6651         |
| 4 สัปดาห์          | 23.72 $\pm$ 0.20 | 24.03 $\pm$ 0.25                | 0.3430         |
| 8 สัปดาห์          | 25.08 $\pm$ 0.35 | 25.75 $\pm$ 0.32                | 0.1626         |
| 12 สัปดาห์         | 28.00 $\pm$ 0.39 | 29.70 $\pm$ 0.36                | 0.0027*        |
| <b>ปลาขนาดเล็ก</b> |                  |                                 |                |
| เริ่มต้น           | 18.47 $\pm$ 0.31 | 18.81 $\pm$ 0.21                | 0.3763         |
| 4 สัปดาห์          | 20.53 $\pm$ 0.68 | 21.00 $\pm$ 0.36                | 0.5416         |
| 8 สัปดาห์          | 22.60 $\pm$ 0.60 | 23.35 $\pm$ 0.56                | 0.3655         |
| 12 สัปดาห์         | 24.85 $\pm$ 0.69 | 25.60 $\pm$ 0.56                | 0.4049         |

\*แถวในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ )

## บทที่ 5

### อภิปรายและวิจารณ์ผล

ในต่างประเทศ การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกผสมกับอาหารเลี้ยงปลากะรังเพิ่งจะมีรายงานวิจัยนับย้อนหลังไปประมาณ 5-6 ปี โดย *Lactobacillus plantarum* 7-40 เป็นแบคทีเรียแยกได้จากอาหารหมักดองของประเทศเกาหลีชื่อว่า “กิมจิ” ที่ Son และคณะ 2009 ทดลองเลี้ยงปลากะรังพันธุ์ *E. coioides* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยการให้อาหารที่ผสม  $10^8$  CFU ต่ออาหาร 1 กก. พบว่า การเพิ่มของน้ำหนักตัวปลา (Percent weight gain) และประสิทธิภาพการให้อาหาร (feed efficiency) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 404.6 % และ 1.26 ตามลำดับ มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มเปรียบเทียบที่เป็นอาหารธรรมดา

แต่งงานวิจัยของ Sun *et al.* (2009, 2010) พบว่าปลากะรังพันธุ์ *E. coioides* มีการเจริญเติบโตสองกลุ่มด้วยกัน คือกลุ่มโตช้า (slow growth) และกลุ่มโตเร็ว (fast growth) ในลำไส้ปลากลุ่มแรก พบแบคทีเรีย *Vibrio* 4 สายพันธุ์ ประมาณ 12.3 % ของแบคทีเรียในลำไส้ทั้งหมด แต่พบ *Vibrio* 2 สายพันธุ์ ประมาณ 3.6 % ของแบคทีเรียในลำไส้ทั้งหมดของปลากลุ่มหลัง นอกจากนี้ยังได้พบแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*, *B. clausii* และ *Psychroacter* sp. อีกด้วย และเมื่อนำแบคทีเรีย บาซิลลัส สองสายพันธุ์นี้ไปผสมอาหารปลากะรัง โดยทดลองเลี้ยงปลาเป็นเวลา 60 วัน พบว่าอัตราการเจริญ และน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มเปรียบเทียบ แต่พบว่า feed conversion ratio มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ phagocytic activity และ phagocytic index มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย

และนอกจากนี้ Nayak 2010 ได้รวบรวมกลุ่ม probiotic ที่เคยมีการทดลองใช้เลี้ยงปลาชนิดต่างๆ รวมถึงปลากะรังซึ่งพบว่ามี *Lactobacillus plantarum* เป็น probiotic สามารถลดการติดเชื้อโรคของ *Streptococcus* sp. และ *Iridovirus* ได้

จากผลการวิจัยของโปรไบโอติกที่ใช้เลี้ยงปลากะรังในต่างประเทศทำให้มีผลต่อแนวความคิดของผู้วิจัยว่า แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของปลากะรังที่พบมีการเจริญเติบโตที่ดี แต่เมื่อแยกออกมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนมากขึ้น แล้วผสมอาหารให้ปลากิน กลับพบว่า ปลาที่มีการเจริญที่ไม่แตกต่างจากที่ให้อาหารปกติ แต่กรณีของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* น่าจะมีผลไปในทางบวกมากกว่าทางลบ ขณะเดียวกัน ภาควิชาจุลชีววิทยา มีแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ โดยแยกมาจากลำไส้ปลาน้ำจืดเก็บรวบรวมไว้อยู่ อีกทั้งยังไม่พบรายงานการวิจัยที่ใช้แบคทีเรียชนิดนี้กับปลากะรังในประเทศไทยเลย และเนื่องด้วยระยะเวลาของการวิจัยมีจำกัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มาทดลอง และเพิ่มเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนและวิตามินปรีรวม ให้กับปลาอีกทางหนึ่งด้วย ผลงานวิจัยที่ได้ครั้งนี้จะเป็นจุดเริ่มต้น และ บรรทัดฐานใช้อ้างอิงงานวิจัยโปรไบโอติกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ มาใช้เลี้ยงปลากะรังในประเทศไทยต่อไป

ผลจากงานทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า ควรใช้โปรไบโอติกผสมอาหารในช่วง 2 ระยะ คือช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง และช่วงปลาขนาดใหญ่ เนื่องจากในช่วงเริ่มต้นจะช่วยให้มีอัตราการรอดที่สูงกว่าและช่วยในการรักษาสภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม สภาพน้ำในตู้กลุ่มทดลอง มีความใสกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน และในช่วงปลาขนาดใหญ่พบว่าทุกช่วงของกลุ่มทดลองให้น้ำหนักและขนาดความยาวของลำตัวที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม แต่หากพิจารณาในแง่มุมของการรักษาสภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาที่ตีนั้น สามารถใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ในทุกช่วงของปลากะรัง แม้ในบางช่วงไม่สามารถช่วยให้น้ำหนักของปลาเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังช่วยรักษาคุณภาพของน้ำดีกว่าการเลี้ยงแบบธรรมดา

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผลการวิจัย

- 1) ในลำไส้ปลากระรังมีแบคทีเรียกลุ่มแลคติก ที่สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกและนำไปเลี้ยงปลาได้
- 2) ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum*. IFS-1 และ ยีสต์ *Candida tropicalis*. JY003 ซึ่งผลการทดสอบประสิทธิภาพโดยการนำไปเสริมในอาหารเลี้ยงปลา พบว่าช่วยทำให้การเจริญเติบโตและการรอดตายของการเลี้ยงปลากระรังดีขึ้นกว่าการไม่ใช้

#### 6.2 ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

- 1) ควรมีการทดลองต่อเนื่องในปีที่สอง โดยนำแบคทีเรียในลำไส้ปลากระรังที่ได้รวบรวมไว้แล้วมาทดลองผสมกับอาหารเลี้ยงปลา เปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้ ซึ่งจะช่วยให้ได้โปรไบโอติกของการเลี้ยงปลากระรังทั้งสายพันธุ์แท้ และพันธุ์ผสม มากยิ่งขึ้น
- 2) ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยเพิ่มผลผลิตให้ สูงขึ้น รวมถึงลดระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลงได้ ซึ่งควรมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้แน่ใจว่าสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม และสามารถผลิตได้จำนวนมาก
- 3) ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ หากได้มีการทดสอบในปลาทะเลชนิดอื่น ๆ และให้ผลไปในทางที่ดีเช่นเดียวกัน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการลดค่าใช้จ่ายในการศึกษาลง

## บรรณานุกรม

- ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ. 2555. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล. การประชุมวิชาการงานเกษตรนครสวรรค์ ครั้งที่ 10. 24-29 กรกฎาคม 2555. มหาวิทยาลัยนครสวรรค์, พิษณุโลก หน้า 220-229
- ภวัต สังขะวัฒนะ. 2544. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D, Vendrell, D., and Muzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Journal of Veterinary Microbiology* 114, 173-186.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. and Webb, C. 2002. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 851-859.
- FAO/WHO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.
- Irianto, A. and Austin, B. 2002. Use of the probiotic to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease* 25, 333-342.
- Laconi, S and Pompei R., 2007. Study and characterization of intestinal yeasts of mullet (*Mugil spp.*) for potential probiotic use. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5 (3&4), 475-480.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics; the other half of the antimicrobial story. *Journal of Animal Nutrition and Health* 29, 4-8.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E, Salminen, S. and Ouwehand, A.C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for industrial *Enterococcus faecium* colonization. *Journal of Veterinary Microbiology* 92, 111-119.

- Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K. and Chiu, C.H. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 26, 691-698.
- Sun, Y., Yang, H., Ling, Z. Chang, J. and Ye, J. 2009. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *African Journal of Microbiology Research* 3(11), 713-720.
- Nayak, S.K. 2010. Probiotics and Immunity: A fish perspective. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 29, 2-14.
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L. and Lin, W.Y. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Fish and Shellfish Immunology* 29, 803-809.

ภาคผนวก

ข้อมูลผลการทดลองโครงการโปรไบโอติกส์ในปลากะรังดอกแดงในช่วงเริ่มต้นของการทดลอง

| ซ้ำที่ | ลูกปลานขนาดใหญ่ |        |               |       | ลูกปลานขนาดกลาง |        |               |       | ลูกปลานขนาดเล็ก |       |               |       | หมายเหตุ |
|--------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|-------|---------------|-------|----------|
|        | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม)  |       | ความยาว (ซม.) |       |          |
|        | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม          | ทดลอง | ควบคุม        | ทดลอง |          |
| 1      | 330             | 280    | 27.6          | 27.5  | 160             | 172    | 21.2          | 20.4  | 75              | 84    | 17.6          | 18.5  |          |
| 2      | 252             | 236    | 24.5          | 25    | 166             | 205    | 22.4          | 22    | 110             | 90    | 19            | 19.2  |          |
| 3      | 255             | 290    | 25            | 26.7  | 180             | 210    | 23            | 22.7  | 112             | 88    | 20            | 19    |          |
| 4      | 276             | 210    | 25.5          | 22.6  | 173             | 175    | 22.1          | 22.3  | 82              | 72    | 17.9          | 18    |          |
| 5      | 270             | 340    | 24.6          | 28.4  | 200             | 173    | 21.4          | 23.5  | 100             | 115   | 18.2          | 20.2  |          |
| 6      | 260             | 310    | 24.2          | 26.5  | 190             | 166    | 21            | 23    | 135             | 110   | 20            | 20    |          |
| 7      | 240             | 290    | 24            | 25.4  | 185             | 195    | 23.2          | 21.4  | 150             | 80    | 20.2          | 17.8  |          |
| 8      | 290             | 215    | 25.8          | 23.2  | 150             | 160    | 21            | 20    | 80              | 120   | 17            | 20.6  |          |
| 9      | 220             | 225    | 23            | 24.4  | 182             | 200    | 23.1          | 21    | 130             | 68    | 18.8          | 17    |          |
| 10     | 250             | 230    | 23.8          | 24.7  | 185             | 164    | 21.2          | 23.2  | 132             | 110   | 19            | 19.4  |          |
| 11     | 274             | 310    | 25.6          | 26.3  | 190             | 170    | 21.4          | 22.8  | 70              | 82    | 14            | 18.4  |          |
| 12     | 250             | 260    | 23            | 24.5  | 186             | 180    | 21.7          | 22.3  | 110             | 80    | 18.3          | 17.8  |          |
| 13     | 222             | 232    | 22.5          | 22.6  | 170             | 200    | 22.5          | 23    | 116             | 90    | 18.8          | 18.5  |          |
| 14     | 256             | 222    | 24            | 22.4  | 184             | 230    | 22.8          | 21.2  | 130             | 100   | 19            | 18.6  |          |
| 15     | 248             | 290    | 26            | 25.2  | 205             | 193    | 22            | 22.4  | 132             | 112   | 20.1          | 20.2  |          |
| 16     | 330             | 333    | 24.8          | 27.4  | 208             | 196    | 23.2          | 23.2  | 82              | 82    | 18.2          | 18    |          |
| 17     | 252             | 236    | 23.5          | 24    | 180             | 170    | 21.5          | 21    | 70              | 72    | 17.5          | 18    |          |
| 18     | 265             | 212    | 25            | 22    | 195             | 182    | 22            | 22.6  | 95              | 90    | 18.4          | 18.5  |          |
| 19     | 310             | 222    | 25.8          | 23.2  | 172             | 210    | 22.8          | 22    | 100             | 112   | 19            | 19.4  |          |
| 20     | 270             | 240    | 24.5          | 25.3  | 205             | 200    | 21            | 23    | 96              | 110   | 18.4          | 19    |          |
| Mean   | 266.00          | 259.15 | 24.64         | 24.87 | 183.30          | 187.55 | 22.03         | 22.15 | 105.35          | 93.35 | 18.47         | 18.81 |          |

## ข้อมูลผลการทดลองโครงการโปรโปโตกส์ในปลากะรังดอกแดงในช่วง 1 เดือนหลังการทดลอง

| ซ้ำที่ | ลูกปลานขนาดใหญ่ |        |               |       | ลูกปลานขนาดกลาง |        |               |       | ลูกปลานขนาดเล็ก |        |               |       | หมายเหตุ |
|--------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|--------|---------------|-------|----------|
|        | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       |          |
|        | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง |          |
| 1      | 255             | 210    | 26.5          | 26.0  | 200             | 185    | 25.5          | 24.5  | 160             | 165    | 23.5          | 23.0  |          |
| 2      | 265             | 275    | 28.0          | 27.5  | 160             | 145    | 24.5          | 22.5  | 145             | 145    | 23.0          | 21.5  |          |
| 3      | 250             | 280    | 27.5          | 28.0  | 150             | 210    | 23.0          | 26.0  | 140             | 135    | 23.0          | 21.5  |          |
| 4      | 330             | 270    | 30.0          | 27.0  | 155             | 175    | 22.5          | 24.0  | 170             | 120    | 24.0          | 21.0  |          |
| 5      | 260             | 390    | 28.0          | 31.0  | 185             | 140    | 25.0          | 23.0  | 145             | 160    | 22.5          | 22.0  |          |
| 6      | 190             | 290    | 25.0          | 28.5  | 170             | 180    | 23.5          | 25.0  | 80              | 115    | 19.5          | 21.0  |          |
| 7      | 175             | 340    | 25.0          | 29.5  | 150             | 175    | 23.0          | 24.0  | 170             | 135    | 24.0          | 22.5  |          |
| 8      | 370             | 305    | 31.0          | 29.0  | 145             | 180    | 23.5          | 25.0  | 165             | 145    | 23.5          | 22.5  |          |
| 9      | 285             | 325    | 29.0          | 29.0  | 160             | 200    | 25.0          | 25.0  | 115             | 115    | 21.0          | 21.5  |          |
| 10     | 215             | 320    | 26.0          | 29.0  | 165             | 235    | 23.0          | 26.0  | 65              | 80     | 16.5          | 19.5  |          |
| 11     | 255             | 335    | 27.0          | 29.5  | 170             | 190    | 25.0          | 24.0  | 130             | 122    | 22.0          | 21.5  |          |
| 12     | 210             | 210    | 25.5          | 26.0  | 145             | 165    | 23.0          | 23.0  | 135             | 125    | 22.0          | 21.0  |          |
| 13     | 260             | 290    | 27.5          | 28.5  | 150             | 170    | 23.5          | 24.0  | 155             | 110    | 22.5          | 20.0  |          |
| 14     | 215             | 210    | 25.5          | 25.5  | 160             | 135    | 23.0          | 22.0  | 110             | 145    | 17.5          | 22.0  |          |
| 15     | 240             | 340    | 27.0          | 29.5  | 170             | 160    | 23.5          | 23.0  | 70              | 110    | 16.5          | 20.0  |          |
| 16     | 240             | 210    | 26.5          | 25.5  | 160             | 165    | 24.0          | 24.0  | 80              | 105    | 16.5          | 20.0  |          |
| 17     | 205             | 215    | 26.0          | 27.0  | 170             | 165    | 24.0          | 23.5  | 55              | 130    | 15.5          | 22.0  |          |
| 18     | 240             | 215    | 26.5          | 26.0  | 145             | 180    | 23.0          | 24.0  | 65              | 65     | 16.5          | 17.0  |          |
| 19     | 260             | 355    | 26.0          | 30.5  | 150             | 140    | 22.5          | 23.0  | 80              | 65     | 18.5          | 17.5  |          |
| 20     | 215             | 220    | 26.0          | 26.0  | 160             | 185    | 24.4          | 25.0  | 145             | 150    | 22.5          | 23.0  |          |
| Mean   | 246.75          | 280.25 | 26.98         | 27.93 | 161.00          | 174.00 | 23.72         | 24.03 | 119.00          | 122.10 | 20.53         | 21.00 |          |

## ข้อมูลผลการทดลองโครงการโปรโปโตกส์ในปลากะรังดอกแดงในช่วง 2 เดือนหลังการทดลอง

| ซ้ำที่ | ลูกปลาขนาดใหญ่ |        |               |       | ลูกปลาขนาดกลาง |        |               |       | ลูกปลาขนาดเล็ก |        |               |       | หมายเหตุ |
|--------|----------------|--------|---------------|-------|----------------|--------|---------------|-------|----------------|--------|---------------|-------|----------|
|        | น้ำหนัก (กรัม) |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม) |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม) |        | ความยาว (ซม.) |       |          |
|        | ควบคุม         | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม         | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม         | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง |          |
| 1      | 350            | 415    | 29.5          | 31.0  | 270            | 210    | 27.0          | 25.0  | 60             | 170    | 17.5          | 23.5  |          |
| 2      | 355            | 445    | 29.5          | 32.0  | 290            | 200    | 27.5          | 24.5  | 150            | 160    | 23.0          | 23.0  |          |
| 3      | 250            | 470    | 27.0          | 33.0  | 260            | 225    | 27.0          | 25.0  | 140            | 205    | 21.5          | 25.0  |          |
| 4      | 420            | 440    | 31.0          | 31.0  | 200            | 220    | 25.5          | 25.0  | 180            | 170    | 24.0          | 23.0  |          |
| 5      | 360            | 570    | 29.0          | 33.0  | 200            | 210    | 24.5          | 27.0  | 90             | 185    | 19.5          | 24.0  |          |
| 6      | 390            | 425    | 30.0          | 31.0  | 110            | 215    | 21.5          | 25.0  | 210            | 70     | 24.5          | 17.0  |          |
| 7      | 270            | 410    | 27.0          | 31.0  | 140            | 190    | 22.0          | 24.0  | 170            | 95     | 23.5          | 19.5  |          |
| 8      | 390            | 415    | 30.5          | 31.0  | 200            | 255    | 25.0          | 27.0  | 115            | 190    | 20.5          | 24.0  |          |
| 9      | 210            | 335    | 25.5          | 29.5  | 200            | 285    | 25.0          | 28.0  | 230            | 200    | 25.5          | 25.0  |          |
| 10     | 290            | 560    | 28.5          | 35.0  | 205            | 320    | 24.5          | 28.0  | 180            | 170    | 24.0          | 24.5  |          |
| 11     | 250            | 300    | 27.5          | 28.0  | 195            | 195    | 24.5          | 24.0  | 190            | 300    | 24.0          | 28.0  |          |
| 12     | 375            | 400    | 30.0          | 31.0  | 220            | 215    | 26.0          | 25.0  | 130            | 200    | 21.0          | 25.0  |          |
| 13     | 215            | 405    | 26.0          | 30.0  | 200            | 260    | 24.0          | 27.0  | 75             | 160    | 17.5          | 24.0  |          |
| 14     | 220            | 385    | 26.0          | 30.0  | 200            | 255    | 24.0          | 26.5  | 215            | 165    | 24.5          | 23.5  |          |
| 15     | 220            | 440    | 26.0          | 31.0  | 260            | 170    | 26.0          | 24.0  | 200            | 170    | 24.5          | 23.5  |          |
| 16     | 225            | 385    | 26.0          | 30.0  | 195            | 280    | 25.0          | 27.0  | 240            | 80     | 26.0          | 18.0  |          |
| 17     | 380            | 310    | 31.0          | 28.0  | 185            | 260    | 24.0          | 26.5  | 145            | 195    | 22.0          | 24.5  |          |
| 18     | 260            | 295    | 26.5          | 28.0  | 255            | 260    | 26.5          | 27.0  | 180            | 180    | 24.0          | 23.5  |          |
| 19     | 370            | 295    | 30.0          | 28.0  | 250            | 175    | 25.0          | 23.5  | 100            | 200    | 19.0          | 25.0  |          |
| 20     | 370            | 330    | 30.0          | 29.5  | 280            | 280    | 27.0          | 26.0  | 220            | 185    | 26.0          | 23.5  |          |
| Mean   | 308.50         | 401.50 | 28.33         | 30.55 | 215.75         | 234.00 | 25.08         | 25.75 | 161.00         | 172.50 | 22.60         | 23.35 |          |

## ข้อมูลผลการทดลองโครงการโปรโปโตกส์ในปลากะรังดอกแดงในช่วง 3 เดือนหลังการทดลอง

| ซ้ำที่ | ลูกปลานขนาดใหญ่ |        |               |       | ลูกปลานขนาดกลาง |        |               |       | ลูกปลานขนาดเล็ก |        |               |       | หมายเหตุ |
|--------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|--------|---------------|-------|----------|
|        | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       | น้ำหนัก (กรัม)  |        | ความยาว (ซม.) |       |          |
|        | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง | ควบคุม          | ทดลอง  | ควบคุม        | ทดลอง |          |
| 1      | 430             | 790    | 33.0          | 38.0  | 190             | 370    | 26.0          | 31.0  | 170             | 260    | 23.0          | 26.0  |          |
| 2      | 380             | 460    | 32.0          | 34.0  | 360             | 450    | 29.0          | 32.0  | 150             | 120    | 22.0          | 24.0  |          |
| 3      | 440             | 370    | 32.0          | 30.0  | 410             | 370    | 31.0          | 31.0  | 220             | 320    | 25.0          | 28.0  |          |
| 4      | 400             | 560    | 32.0          | 34.0  | 190             | 400    | 25.0          | 30.0  | 340             | 160    | 29.0          | 22.0  |          |
| 5      | 610             | 450    | 35.0          | 32.0  | 380             | 370    | 30.0          | 30.0  | 100             | 390    | 19.0          | 30.0  |          |
| 6      | 400             | 420    | 32.0          | 32.0  | 360             | 390    | 29.0          | 30.0  | 200             | 370    | 24.0          | 29.0  |          |
| 7      | 330             | 470    | 30.0          | 33.0  | 300             | 340    | 28.0          | 29.0  | 320             | 310    | 29.0          | 28.0  |          |
| 8      | 470             | 610    | 32.0          | 35.0  | 190             | 300    | 24.0          | 28.0  | 360             | 180    | 20.0          | 23.0  |          |
| 9      | 440             | 430    | 32.0          | 31.0  | 260             | 300    | 27.0          | 28.0  | 230             | 290    | 26.0          | 28.0  |          |
| 10     | 500             | 490    | 32.0          | 33.0  | 340             | 470    | 28.0          | 32.0  | 310             | 160    | 28.0          | 23.0  |          |
| 11     | 320             | 430    | 20.0          | 32.0  | 230             | 440    | 27.0          | 31.0  | 190             | 210    | 24.0          | 26.0  |          |
| 12     | 410             | 580    | 32.0          | 35.0  | 290             | 380    | 28.0          | 29.0  | 280             | 200    | 27.0          | 24.0  |          |
| 13     | 300             | 520    | 29.0          | 34.0  | 250             | 310    | 27.0          | 28.0  | 320             | 310    | 29.0          | 29.0  |          |
| 14     | 210             | 570    | 26.0          | 34.0  | 270             | 250    | 27.0          | 26.0  | 250             | 260    | 27.0          | 26.0  |          |
| 15     | 530             | 380    | 35.0          | 31.0  | 280             | 300    | 28.0          | 29.0  | 180             | 200    | 24.0          | 24.0  |          |
| 16     | 390             | 545    | 31.0          | 33.0  | 360             | 400    | 30.0          | 31.0  | 230             | 260    | 26.0          | 27.0  |          |
| 17     | 270             | 400    | 29.0          | 30.0  | 330             | 310    | 29.0          | 29.0  | 100             | 240    | 19.0          | 26.0  |          |
| 18     | 330             | 460    | 30.0          | 31.0  | 290             | 330    | 28.0          | 29.0  | 190             | 210    | 24.0          | 24.0  |          |
| 19     | 270             | 390    | 28.0          | 31.0  | 340             | 430    | 29.0          | 32.0  | 240             | 160    | 26.0          | 23.0  |          |
| 20     | 340             | 550    | 31.0          | 33.0  | 390             | 370    | 30.0          | 29.0  | 240             | 150    | 26.0          | 22.0  |          |
| Mean   | 388.50          | 493.75 | 30.65         | 32.80 | 300.50          | 364.00 | 28.00         | 29.70 | 231.00          | 238.00 | 24.85         | 25.60 |          |

## ข้อมูลนักวิจัย

### 1. หัวหน้าแผนงานวิจัย

ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทร 02-562-5444 ต่อ 4005 โทรสาร 02-5792081 E-mail : [fscipms@ku.ac.th](mailto:fscipms@ku.ac.th)

### 2. ที่ปรึกษาแผนงานวิจัย

ดร.ธวัช วิรัตน์พงศ์

NASA-JPL California Institute of Technology

โทร: (818) 354-2719 โทรสาร: (818) 393-3505

### 3. หัวหน้าโครงการย่อยที่ 1

ดร.อโนชา กิริยาภิจ

คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี

ต.พลวง อ.เขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี 22210

โทร (039)307261-2 ต่อ 184 โทรสาร (039)307268

Mobile: +(66) 850846825 Email: anoant@hotmail.com

### 4. ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 1

ดร. ทวีศิลป์ พิษพิสุทธิ

111 หมู่ 1 ต. แม่น้ำคู่ อ.ปลวกแดง จ.ระยอง 21140

โทรศัพท์มือถือ 081 5512275 E-mail: taweessinpe@hotmail.com

### 5. หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2

ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทร 02-562-5444 ต่อ 4005 โทรสาร 02-5792081 E-mail : [fscipms@ku.ac.th](mailto:fscipms@ku.ac.th)

**6. ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 2**

นายโกวิท สุวรรณรัตน์

ไทยเจริญฟาร์ม

39 ม. 2 ต. สนามจันทร์ อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี 24140

โทรศัพท์มือถือ 082-268-8997

**7. ผู้ร่วมวิจัยโครงการย่อยที่ 2**

นายธิตกร ดวงอุปมา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทร 02-562-5444 ต่อ 4039 มือถือ 089-7728 549 โทรสาร 02-579-2081