บทที่ 3

เทคนิค และวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดง

โดยปกติคุณภาพน้ำเชื้อของปลาจะสามารถประเมินได้โดยการทำปฏิสนธิกับไข่ แต่ในบางครั้งพบว่าอาจไม่สามารถที่จะหาไข่ปลามาเพื่อทำการปฏิสนธิได้ ซึ่งสาเหตุที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากความไม่สมบูรณ์ของแม่พันธุ์ปลา หรืออาจจะอยู่นอกฤดูผสมพันธุ์ของปลาชนิดนั้นๆ อย่าไรก็ตามการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาสามารถที่จะประเมินได้จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งผลของอัตราการเคลื่อนไหว ระดับการเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิตก็สามารถที่จะบอกถึงแนวโนมในการปฏิสนธิได้เช่นกัน (Scott และ Baynes, 1980) และ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาถึงลักษณะภายนอกโดยทั่วไปที่สามารถตรวจพบได้ของน้ำเชื้อ และอสุจิของปลากะพงแดง นอกจากนี้ยังศึกษาถึงเทคนิคในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาเพื่อใช้ในการประเมินน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในการทดลองต่อไป

วิธีดำเนินการทดลอง

1.การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองแช่เยือกแข็งในครั้งนี้ทำการเก็บจากพ่อพันธุ์ในกระชังทดลองของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดชลบุรี และบ่อทดลองเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงแดงบริเวณศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง การเลี้ยงพันธุ์ปลากะพงแดงที่สีชังนั้นจะทำการเลี้ยงในกระชังขนาด 9 ลูกบาศก์เมตร โดยเลี้ยงด้วยปลาข้างเหลือง (Yellowstripe trevally) ทุกวันในฤดูผสมพันธุ์ช่วงเดือน เมษายน ถึง พฤษจิกายน (Doi and Singhagriwan, 1993) และผสมวิตามินให้ทุกๆ อาทิตย์ ส่วนทางด้านศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออกจะเลี้ยงปลาในบ่อเลี้ยงขนาด 30x30 ตารางเมตร ลึก 1- 1.5 เมตร ให้ปลาข้างเหลืองเป็นอาหารทุกวัน ปลาที่นำมาใช้ในการทดลองจะใช้ปลาที่มีอายุตั้งแต่ 2-4 ปี และมีน้ำหนักเฉลี่ย 2-4 กิโลกรัม

ตัวอย่างน้ำเชื้อปลากะพงแดงจะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากพ่อ แม่พันธุ์ปลาที่มีอยู่ ทำการชั่งน้ำหนัก วัดขนาด และทดสอบรีดน้ำเชื้อเพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของปลา เมื่อพบปลาที่มีความสมบูรณ์เพศพร้อมก็จะทำการเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ผ้าที่สะอาดเช็ดบริเวณช่องเพศให้แห้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อ จากสิ่งสกปรกที่ติดมากับของเสีย และน้ำเมือกของปลา ตัวอย่างน้ำเชื้อจะถูกรีดเก็บลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และบรรจุลงในถังน้ำแข็ง

รูปที่ 3 แสดงกรรมวิธีในการเก็บน้ำเชื้อของปลากะพงแดง

2. การตรวจสอบลักษณะภายนอกทั่วไปของตัวอสุจิ

เจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9% (Normal Saline) ในอัตราส่วน 1:100 ตรวจลักษณะของตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x100 วัดขนาด รายงานผลของลักษณะทั่วไปภายนอกของอสุจิปลากะพงแดง โดยเทียบกับรายงานจากปลาชนิดอื่นๆ

3.การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

3.1) การตรวจนับปริมาณน้ำเชื้อโดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือดแดง (กฤษณ์มงคลปัญญา, 2536) เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9% ในอัตราส่วน 1:400 หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วลงในร่องของ Counting Chamber (BOECO Germany) ที่ปิดด้วยกระจกปิด (Coverglass) ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 2-3 นาที เพื่อให้ตัวอสุจิตกลงสู่พื้นหรือหยุดนิ่ง ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x100 ตรวจหาช่องที่อยู่ตรงกลางของ Counting Chamber การนับหาจำนวนตัวของอสุจิจะนับที่ช่องใหญ่ล้อมรอบด้วยเส้นตรง 3 เส้นซึ่งภายในจะมีช่องเล็กๆ อีก 16 ช่อง นับจำนวนอสุจิใน 5 ช่องใหญ่รวมกันโดยใช้กำลังขยาย x400 จากนั้นคำนวณหาจำนวนอสุจิจากสมการ

$$\text{จำนวนอสุจิ/ลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \frac{\text{จำนวนอสุจิที่นับได้ x อัตราการเจือจาง}}{\text{ปริมาตร}}$$

โดยปริมาตร = พื้นที่ x ความลึก x จำนวนช่องที่นับ

= (0.2 x 0.2) x 0.1 x 5

= 0.02 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

3.2) การสุ่มนับตัวอสุจิเป็น และตายด้วยการย้อมสี (Live-Dead Stain : LDS) การประเมินระดับการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนไหว (ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ, 2532 และ กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2532 อ้างตาม Sorensen, 1979) หยดตัวอย่างน้ำเชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด และแห้ง หยดสีย้อม Eosin-Nigrosin 1 หยด ลงบนน้ำเชื้อ ผสมสีย้อม และน้ำเชื้อให้เข้ากันโดยเร็ว จากนั้นเสมียร์บางๆ ทันทีด้วยสไลด์ที่สะอาดอีกแผ่นหนึ่ง ผึ่งให้แห้งปิดด้วย กระจกปิดทันที ตรวจนับจำนวนอสุจิที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสี และตัวอสุจิที่ตายซึ่งจะติดสีม่วง-แดง คำนวณเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่มีชีวิต ประเมินระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ไม่ติดสี ให้คะแนนความแข็งแรงของตัวอสุจิเคลื่อนที่เป็น 10 ระดับ ตั้งแต่ 1-10 โดยให้ ระดับที่ 1 แทนตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนที่น้อยมาก หรือไม่มีการเคลื่อนที่เลย และให้ 10 แทนตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ได้ว่องไวมาก ตรวจดูปริมาณอสุจิที่เคลื่อนไหวของตัวอสุจิโดยดูจากการสั่นของหาง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่เคลื่อนไหว

ผลการทดลอง

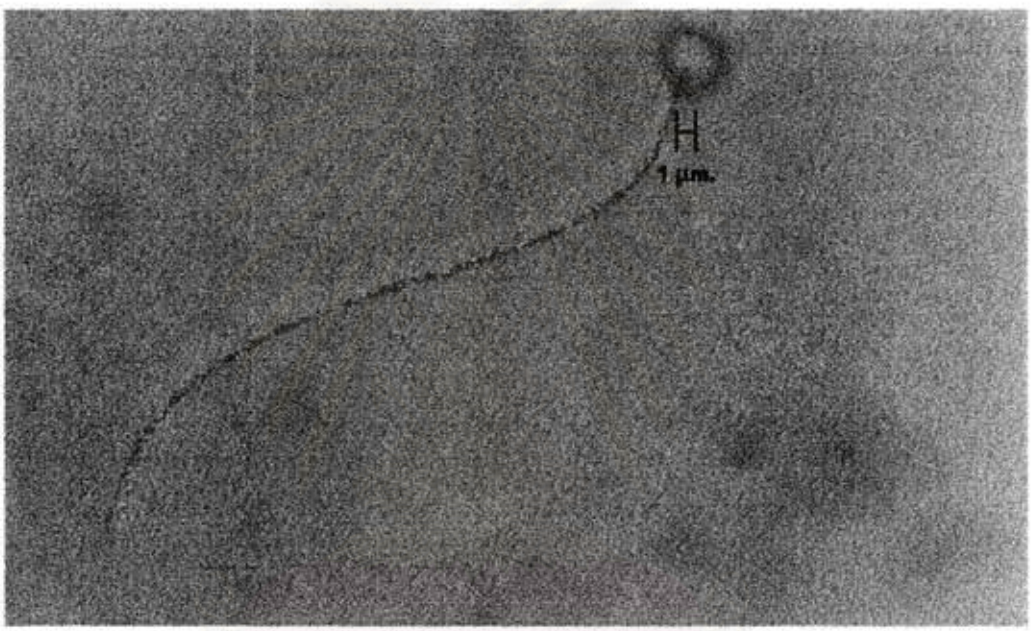
จากการทดลองพบว่าลักษณะโดยทั่วไปของน้ำเชื้อปลากะพงแดงมีลักษณะสีขาวครีม และมีความข้นสูง ปริมาณน้ำเชื้อเฉลี่ยที่สามารถเก็บได้ในช่วงเดือนเมษายน ถึง มิถุนายน 2537 ประมาณ 0.5 - 2 มิลลิลิตร ต่อปลาขนาด 2 - 3 กิโลกรัม เมื่อนำน้ำเชื้อมาตรวจสอบลักษณะของตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย x 100 พบว่าตัวอสุจิของปลากะพงแดงมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับตัวอสุจิในสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไป แต่มีส่วนที่แตกต่างคือส่วนหัวของอสุจิปลากะพงแดงจะมีลักษณะค่อนข้างกลม และไม่มีอะโครโซม ซึ่งขนาดของตัวอสุจิปลากะพงแดงที่วัดได้เฉลี่ยประมาณ 33 μm. แบ่งเป็นส่วนหัวมีขนาดความกว้างประมาณ 3-4 μm. ยาวประมาณ 1.5-2 μm. และหางมีลักษณะเป็นแส้ยาวขนาดความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 30 μm. ลักษณะของโดยทั่วไปของตัวอสุจิของปลากะพงแดงที่ตรวจพบดังตัวอย่างในรูปที่ 3, 4 และ 5

ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อของปลากะพงแดงพบว่าปริมาณตัวอสุจิของปลากะพงแดงที่นับได้ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือดมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 20.94 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 50.99 % เมื่อประเมินระดับการเคลื่อนที่เฉลี่ยของตัวอสุจิจากตัวอย่างน้ำเชื้อสดพบว่าอยู่ในระดับ 9-10 และอัตราส่วนเซลล์ที่มีชีวิตต่อปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 69.43 % รายละเอียดของการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลากะพงแดง เมื่อเทียบกับคุณภาพในน้ำเชื้อปลาแซลมอน (Scott และ Baynes, 1980) แสดงไว้ดังตารางที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงลักษณะสีของน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดงลักษณะ และขนาดของตัวอสุจิปลากะพงแดงที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย x 100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แสดงการติดสีของอสุจิปลากะพงแดง เมื่อทำการย้อมด้วยสีย้อม Eosin-Nigrosin จากภาพ : อสุจิที่ตายจะติดสีย้อมของ Eosin-Nigrosin เป็นสีม่วง-แดง อสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงระดับของคุณภาพของน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่ตรวจสอบได้จากการทดลอง

ลักษณะที่ตรวจสอบ	น้ำเชื้อปลากะพงแดง	น้ำเชื้อปลาแซลมอน
สีของน้ำเชื้อ	สีขาวครีม ขัน	สีขาวขุ่น
ความหนาแน่นของอสุจิต่อมิลลิลิตร	2.09×10^{8}	$9 - 30 \times 10^{9}$
ขนาดของอสุจิ หัว กว้าง X ยาว	3-4 µm X 1.5-2 µm	2-4 µm X 2 µm
ความยาวหางรวม	~ 30 µm	33 µm
	~ 33 µm	35 - 37 µm
อะโครโซม	ไม่มี	ไม่มี
อัตราการเคลื่อนไหว	50.99 %	-
ระดับการเคลื่อนที่	9 - 10	-
เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตจากการย้อมสี Eosin-Nigrosin	69.43 %	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าลักษณะของน้ำเชื้อปลากะพงแดงมีลักษณะไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของน้ำเชื้อปลาแซลมอนซึ่งรายงานไว้โดย Scott และ Baynes (1980) ซึ่งรายงานไว้ว่าในปลากะดูกแข็งโดยทั่วไปแล้วบริเวณหัวของอสุจิจะไม่มีอะโครโซมและสันนิฐานได้ว่าตรงกับการที่ไข่ปลาส่วนใหญ่มีรูเปิด (Micropyle) เป็นส่วนที่รับตัวอสุจิเพื่อการปฏิสนธิ นอกจากลักษณะของอสุจิที่ไม่มีอะโครโซมในปลากะพงแดงแล้ว รูปร่างส่วนบริเวณหัวของอสุจิที่มีลักษณะค่อนข้างกลมสามารถที่จะเปรียบเทียบกับรายงานของ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) อ้างตาม Franzen (1970) ซึ่งรายงายถึงการที่ส่วนหัวของอสุจิมีลักษณะกลม จัดได้ว่าเป็นลักษณะของอสุจิในแบบที่ยังไม่พัฒนา (primitive spermatozoa) โดยอสุจิประเภทนี้จะมีการผสมนอกตัว (external fertilization) ส่วนหัวของอสุจิจะสั้น กลม (roundish) หรือรูปกรวย (conical) ในส่วนกลางเป็นที่รวมของไมโตคอนเดรีย และส่วนหางเป็นแส้ยาว จากลักษณะนี้อาจจัดได้ว่าอสุจิของปลากะพงแดงเป็นอสุจิในจำพวกเดียวกับ ปลาดุก ปลาบึก ปลาสวาย และปลาทอง นอกจากนี้จากรายงานของ Wicker และ Huish (1982) ยังอาจเปรียบเทียบได้กับปลาอีก 3 ชนิดได้แก่ Bluegil, Chain pickerel, และ Yellow perch

ในด้านของการทดสอบคุณภาพของน้ำเชื้อพบว่าความหนาแน่นของอสุจิต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 2.09 X 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อปลาแซลมอนที่รายงานไว้โดย Scott และ Baynes (1980) ได้รายงานความหนาแน่นของอสุจิของปลาในตระกูลปลาแซลมอน 3 ชนิดได้แก่ *Salmo gairdnerii* 9-26 X 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, *S. salar* 12-30 X 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร, *S. trutta* 9-26 X 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะพบได้ว่ามีความแตกต่างกันในความหนาแน่นของปริมาณอสุจิในน้ำเชื้อระหว่างปลากะพงแดง และปลาแซลมอน หรือแม้กระทั่งปลาในตระกูลแซลมอนเองก็มีความแตกต่างกันในปริมาณของอสุจิทั้งนี้จากรายงานของ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้รายงานถึงปริมาตรของน้ำเชื้อที่ได้จากปลาตัวหนึ่งครั้งหนึ่ง และความหนาแน่นของตัวอสุจิว่า จะมีความผันแปรไปตามชนิดของปลา ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากความแตกต่างของพฤติกรรม และแหล่งน้ำที่ใช้ในการผสมพันธุ์วางไข่ ปริมาตรของน้ำเชื้อปลาชนิดเดียวกันตัวเดียวกันอาจแตกต่างกันได้ตามฤดูกาล และช่วงระยะเวลาในการผสมพันธุ์ นอกจากนี้ในรายงานของ Piironen และ Hyvarinen (1983) ได้อธิบายถึงสาเหตุที่น้ำเชื้อของปลาในตระกูลแซลมอนมีความหนาแน่นต่างกันเพราะเนื่องมาจากปลาในตระกูลนี้บางชนิดผสมพันธุ์ในแหล่งน้ำไหล จึงมีการเพิ่มของปริมาณน้ำเชื้อ ความหนาแน่นของอสุจิ และพฤติกรรมในการวางไข่ เพื่อเป็นการเพิ่มอัตราการปฏิสนธิในธรรมชาติให้สูงขึ้น

ในการตรวจสอบหาอัตราการเคลื่อนไหว และระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิปลากะพงแดง พบในน้ำเชื้อสดของปลากะพงแดงมีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยของอสุจิเท่ากับ 50.99 % และมีระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 9-10 ในขณะที่ Leung (1987) รายงานถึงอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ว่ามีอัตราการเคลื่อนไหวประมาณ 70-100% ในระยะเวลา 7 นาที การที่อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิปลากะพงแดงมีอัตราที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับปลาชนิดอื่นอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจอัตราการเคลื่อนไหวซึ่งใช้เวลา 10-15 นาที อาจเป็นระยะเวลาที่นานเกินไปจึงทำให้อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิต่ำกว่าที่ควร กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้อธิบายสาเหตุการที่อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิลดลงเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจางน้ำเชื้อ เมื่อมีการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำในแหล่งผสมพันธุ์การเจือจางดังกล่าวจะเป็นการกระตุ้นให้ตัวอสุจิเคลื่อนไหว และสามารถผสมกับไข่ สามารถสันนิษฐานถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของอสุจิได้เช่น 1) เพราะในน้ำมีปริมาณออกซิเจนที่สูง 2) เพราะความเป็นกรด-ด่างของน้ำ 3) สำหรับในน้ำทะเลอิออนของสังกะสี และทองแดงอาจเป็นตัวกระตุ้น และ 4) อาจเป็นเพราะการเจือจางทำสารที่มีผลในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของอสุจิลดน้อยลง Stoss (1983) รายงานถึงถึงองค์ประกอบที่เกี่ยวของกับการเคลื่อนไหวของอสุจิ เช่น Cations, ความเป็นกรด-ด่าง, และแรงดันออสโมติก มีส่วนช่วยในการทำให้อสุจิของปลาสามารถที่จะเคลื่อนไหวในระยะเวลาและความเร็วที่ต่างกันในน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด

จากผลการทดลองในด้านของการย้อมสี Eosin-Nigrosin พบว่าอัตราของอสุจิที่มีชีวิตต่อปริมาณอสุจิทั้งหมดเท่ากับ 69.43% หรือประมาณ 1.46×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีรายงายการแนะนำการใช้วิธีย้อมสีในรายงานการวิจัยของ ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ (2532) แต่ไม่พบว่ามีการรายงานผลการทดลอง นอกจากนี้ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้กล่าวถึงการใช้วิธีตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยการย้อมสี โดยอ้างจาก Sorensen (1979) ซึ่งใช้ในการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อโค และได้แนะนำในการปรับมาใช้กับการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อเจือจางของปลาที่ไม่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อปลาทั้ง 3 แบบประกอบกันแล้วก็อาจที่จะสามารถคาดเดาถึงความสามารถในการปฏิสนธิได้เช่นกัน โดยอัตราการปฏิสนธินั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณอสุจิที่มีชีวิตรอดจากการแช่เยือกแข็ง มีระดับการเคลื่อนที่สูงและมีเปอร์เซ็นต์ของอสุจิมีชีวิตที่เคลื่อนไหวในปริมาณมากพอ (Scott และ Baynes, 1980)