บทที่ 8

การตรวจคุณภาพ การเจือจาง และการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

จุดประสงค์การเรียนรู้

1. อธิบายการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่าได้
2. อธิบายการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้
3. บอกจุดประสงค์ของการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อได้
4. บอกคุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ดีได้
5. อธิบายการเจือจางน้ำเชื้อได้
6. อธิบายการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้
7. คำนวณอัตราการเจือจางน้ำเชื้อได้

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของน้ำเชื้อว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์หรือมีคุณภาพน้ำเชื้ออยู่ในระดับใด เพื่อประกอบการตัดสินใจ ในการนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมต่อไป ตลอดจนทราบถึงสถานภาพทางการสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์ เพื่อนำไปจัดการด้านการผสมพันธุ์ ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์พันธุ์มีมาตรฐานแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อโดยทั่ว ๆ ไปมี 2 แบบ คือการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า (macroscopic evaluation) และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic evaluation)

1. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า

ทันทีที่รีดน้ำเชื้อได้จะทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า ดังแสดงในรูปที่ 8.1 และ 8.2 ดังนี้

1.1 ปริมาตร (volume) การวัดปริมาตรโดยอ่านดูที่ข้างหลอดเก็บน้ำเชื้อหรือกระบอกรับน้ำเชื้อซึ่งจะมีขีดบอกปริมาตรไว้ ปริมาณที่ได้จะมากหรือน้อย ขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ดังนี้

1.1.1 อายุ สัตว์ที่มีอายุน้อยให้น้ำเชื้อมีปริมาตรน้อยกว่าสัตว์ที่มีอายุมากแต่ยังไม่เสื่อมสมรรถภาพ

1.1.2 ขนาดของสัตว์ สัตว์ขนาดเล็กให้น้ำเชื้อแต่ละครั้งน้อยกว่าสัตว์ขนาดใหญ่

1.1.3 พันธุ์สัตว์ สัตว์ต่างพันธุ์กันปริมาตรน้ำเชื้อต่างกัน เช่น โคเนื้อน้อยกว่าโคนม

1.1.4 จำนวนครั้งการรีดน้ำเชื้อต่อสัปดาห์ การรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งให้ปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดได้น้อยลง

1.1.5 สภาพแวดล้อมและการเลี้ยงดูต่างกัน ปริมาตรน้ำเชื้อจะต่างกัน

1.1.6 วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อต่างกัน ปริมาตรน้ำเชื้อจะต่างกัน เช่น การรีดด้วยเครื่องกระตุ้นด้วยไฟฟ้าให้น้ำเชื้อที่มีปริมาตรมากกว่ารีดด้วยช่องคลอดเทียม

1.2 สิ่งแปลกปลอม (contaminate) ในน้ำเชื้อที่คุณภาพไม่ดีอาจพบสิ่งแปลกปลอมปะปนอยู่ได้มาก เช่น เลือด เศษเนื้อเยื่อ ปัสสาวะ เศษผิวหนัง เศษขน และสารหล่อลื่น เป็นต้น

1.3 ความหนาแน่น (density) ในการวัดความหนาแน่นของน้ำเชื้อ

1.3.1 แบ่งตามความหนาแน่นของน้ำเชื้อ แบ่งระดับคะแนนออกเป็น 3 ระดับ คือ

1) น้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นน้อยที่สุด มีลักษณะจาง (thin) ให้เป็นคะแนน D

2) น้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นระดับปานกลาง (medium) ให้เป็นคะแนน DD

3) น้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นมากที่สุด (thick) ให้เป็นคะแนน DDD

1.3.2 แบ่งความหนาแน่นแบบย่อย ได้ 2 ระดับ คือ

1) คะแนน D(D) น้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นระหว่าง D และ DD

2) คะแนน DD(D) น้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นระหว่าง DD และ DDD

น้ำเชื้อที่นำไปใช้ในการผสมเทียมต่อไป ควรมีระดับคะแนน DD ขึ้นไป

1.4 ความหนืด (consistency) โดยดูความหนืดของน้ำเชื้อที่รีดได้ สามารถแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับ คือ

1.4.1 ลักษณะคล้ายน้ำ (watery) มีความเข้มข้นของตัวอสุจิน้อย ไม่ควรนำไปผสมเทียม

1.4.2 ลักษณะไม่ทึบไม่ใส (translucent) ดีกว่าระดับแรก แต่คุณภาพยังต่ำอยู่

1.4.3 ลักษณะคล้ายนม (milky) มีความหนืดเพิ่มขึ้นเป็นน้ำเชื้อมีคุณภาพดีนำไปผสมเทียมได้

1.4.4 ลักษณะคล้ายครีม (creamy) มีความหนืดปานกลางคล้ายกับครีม เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาก นำไปใช้ผสมเทียมได้ดี

1.4.5 ลักษณะคล้ายกาว (glue-like) มีความหนืดสูงมาก ปริมาตรน้อย มีความเข้มข้นสูง แต่มักมีความผิดปกติของตัวอสุจิมาก ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ผสมเทียมต่อไป

1.5 สี (color) น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่รีดเก็บได้มีสีต่าง ๆ กัน คือ

1.5.1 สีเทาใส (transparent gray) เป็นน้ำเชื้อคุณภาพพอใช้ได้

1.5.2 สีเทาเข้ม (evident gray) เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาก เหมาะในการนำไปผสมเทียม

1.5.3 สีขาวเข้มหรือสีเหลือง (strong white หรือ yellowish white) เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมากพอ ๆ กับสีเทาเข้ม เหมาะในการนำไปผสมเทียมได้

1.6 ความเป็นกรดเป็นด่าง อาจใช้เครื่องมือวัดหรือใช้กระดาษลิตมัสวัด โดยการเปรียบเทียบสีปกติน้ำเชื้อพ่อโค มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 6.3-6.9 และสุกรประมาณ 6.8-7.2

รูปที่ 8.1 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อโคด้วยตาเปล่าหลังจากรีดเก็บน้ำเชื้อ

ที่มา: รัญจวน (2554)

รูปที่ 8.2 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสุกรด้วยตาเปล่าหลังจากรีดเก็บน้ำเชื้อ

ที่มา: https://www.youtube.com/watch?v=Eh-G_pF6cb0

2. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

เป็นการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้ออย่างละเอียด มีวิธีการ ดังนี้

2.1 การเคลื่อนที่หมู่ (mass activity) โดยดูการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเป็นกลุ่มก้อนรวม ๆ กันไป ทำได้โดยหยดน้ำเชื้อบนกระจก (slide) ไม่ต้องปิดกระจกบาง (cover slide) ทับหยดน้ำเชื้อ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ 40-100 เท่า แบ่งการเคลื่อนไหวหมู่ออกตามความแรงของการเคลื่อนที่ โดยทั่วไปเกณฑ์การเคลื่อนที่เป็นค่าคะแนน 0-5 ดังนี้

2.1.1 คะแนน 0 ตัวอสุจิตาย ไม่พบการเคลื่อนที่

2.1.2 คะแนน 1 ระดับต่ำมาก มีการเคลื่อนที่ประมาณ 10 %

2.1.3 คะแนน 2 ระดับต่ำ มีการเคลื่อนที่ได้ประมาณ 20-40 % ไม่พบลักษณะการเคลื่อนที่เป็นคลื่นของผิวน้ำเชื้อ การเคลื่อนที่อ่อน

2.1.4 คะแนน 3 ระดับปานกลาง มีการเคลื่อนที่ได้ประมาณ 45-65 % ลักษณะการเคลื่อนที่เป็นคลื่นเล็กน้อย เคลื่อนที่ช้า สามารถสังเกตการเคลื่อนที่รายตัวได้

2.1.4 คะแนน 4 ระดับดี มีการเคลื่อนที่ได้ประมาณ 70-85 % ลักษณะการเคลื่อนที่เป็นคลื่นค่อนข้างเร็ว

2.1.5 คะแนน 5 ระดับดีมาก มีการเคลื่อนที่ได้ประมาณ 90 % หรือสูงกว่า ลักษณะการเคลื่อนที่เป็นลูกคลื่น เร็ว สังเกตเป็นรายตัวไม่ได้

น้ำเชื้อที่นำไปใช้ในการผสมเทียมต่อไป ควรมีระดับคะแนน 3 ขึ้นไป

2.2 การเคลื่อนที่รายตัว (motility) เป็นการสังเกตตัวอสุจิแต่ละตัว โดยหยดน้ำเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนกระจกและปิดด้วยกระจกบาง ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200-400 เท่า จากนั้นสังเกต และบันทึกอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตรงไปข้างหน้า (progressive motility) โดยสังเกตดูในหลาย ๆ พื้นที่ของแผ่นสไลด์ หากความเข้มข้นของอสุจิมากเกินไป ควรเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง ที่มีความเข้มข้นของการละลายเท่ากับน้ำเชื้อ เพื่อให้สามารถสังเกตการเคลื่อนที่รายตัวได้ง่ายขึ้น จากนั้นนับจำนวนอสุจิรวมประมาณ 300 ตัว แล้วนำไปเทียบเป็น ค่าของการเคลื่อนที่รายตัวเป็นการประมาณจำนวนร้อยละของตัวอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าได้ แบ่งระดับคะแนนเป็น 5 ระดับ ดังนี้

2.2.1 คะแนน 1 จัดเป็นคุณภาพต่ำมาก ให้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตรงไปข้างหน้าได้น้อยกว่าร้อยละ 20

2.2.2 คะแนน 2 จัดเป็นคุณภาพต่ำ ให้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตรงไปข้างหน้าได้ เป็นจำนวนร้อยละ 20-40

2.2.3 คะแนน 3 จัดเป็นคุณภาพพอใช้ ให้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตรงไปข้างหน้าได้ เป็นจำนวนร้อยละ 40-60

2.2.4 คะแนน 4 จัดเป็นคุณภาพดี ให้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตรงไปข้างหน้าได้ เป็นจำนวนร้อยละ 60-80

2.2.5 คะแนน 5 จัดเป็นคุณภาพดีมาก ให้สำหรับน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิตรงไปข้างหน้าได้ เป็นจำนวนร้อยละ 80-100

น้ำเชื้อที่นำไปใช้ในการผสมเทียมต่อไป ควรมีระดับคะแนน 3 ขึ้นไป

2.3 ความเข้มข้น (concentration) การประมาณความเข้มข้นของน้ำเชื้อคิดเป็นจำนวนตัวอสุจิต่อน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร เพื่อจะได้ทราบและคำนวณแบ่งน้ำเชื้อไปผสมเทียมให้ได้มากที่สุดหรือสามารถเจือจางได้กี่เท่า เพื่อจะทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้มากที่สุด วิธีหาความเข้มข้นทำได้ 2 วิธี คือ

2.3.1 การใช้โฟโตอิเล็กตริกโคโลริมิเตอร์ (photoelectric colorimeter) หรือสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer method) เป็นวิธีให้ผลถูกต้องและทำได้ในเวลาอันสั้น โดยใช้หลักของแสงผ่านสารที่ทึบได้น้อยกว่าสารที่เจือจางกว่า ดังแสดงในรูปที่ 8.3 มีวิธีการวัดความเข้มข้น ดังนี้

1) นำน้ำเชื้อใส่ในหลอดแก้วโปร่งใส จากนั้นเติมสารละลาย 2.9 % sodium citrate ในสุกรนิยมเจือจางประมาณ 1:40 เพื่อความสะดวก หากเตรียมส่วนผสมประมาณ 4 มิลลิลิตร โดยดูดน้ำเชื้อสุกร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละสาย 4 มิลลิลิตร ส่วนในโคประมาณ 1:100

2) ใช้อุปกรณ์ในการอ่านค่าระหว่าง 525-550 นาโนเมตร

3) นำหลอดไปอ่านค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหรือเปอร์เซ็นต์การดูดแสง แล้วบันทึกไว้ หากอ่านค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่าน ต้องปรับค่าที่อ่านหลอดบรรจุสารละลายที่ยังไม่มีน้ำเชื้อเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ก่อน และหากอ่านค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การดูดแสง ต้องปรับค่าเป็น 0

4) ค่าที่อ่านได้เทียบกับกราฟที่ทำเป็นมาตรฐานความเข้มข้นของตัวอสุจิไว้แล้ว เส้นกราฟที่ถูกทำขึ้นมาด้วยวิธีการดังกล่าวแล้ว ร่วมกับการวัดด้วยวิธีการตรวจนับเม็ดเลือดแดงหลาย ๆ ครั้ง และจำนวนมากจนได้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของตัวอสุจิที่สามารถอ่านได้ทันทีเมื่อเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหรือค่าเปอร์เซ็นต์การดูดแสงที่อ่านได้จากเครื่อง ซึ่งในปัจจุบันมีหลายบริษัทผลิตออกมาจำหน่าย ขั้นตอนและวิธีการตรวจหาความเข้มข้นของตัวอสุจิขึ้นอยู่กับชนิดและรุ่นของเครื่อง รวมทั้งบริษัทผู้ผลิตเป็นผู้กำหนด

รูปที่ 8.3 เครื่องโฟโตอิเล็กตริกโคโลริมิเตอร์

ที่มา: เทวินทร์ (2542)

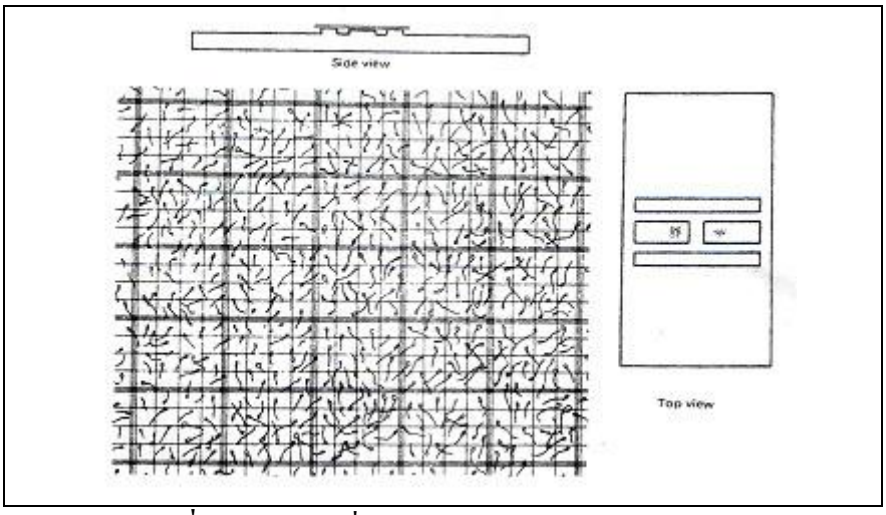
2.3.2 การใช้เครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer) เป็นแท่นนับเม็ดเลือดมีอยู่หลายแบบ ส่วนใหญ่ใน 1 ตารางมิลลิเมตร จะมี 25 ตารางใหญ่ ในแต่ละตารางใหญ่จะมี 16ตารางเล็ก ดังแสดงในรูปที่ 8.4 เมื่อปิดด้วยกระจกบาง ลงบนแท่นนับเม็ดเลือด จะมีช่องที่น้ำเชื้ออยู่ได้ลึก 0.1 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรของตาราง 25 ช่อง จะมีปริมาตรน้ำเชื้อเจือจาง 1/10,000 มิลลิลิตร (วิธีการคำนวณจะกล่าวในขั้นตอนต่อไป) วิธีนี้จะให้ผลถูกต้องดีมาก นิยมใช้กันทั่วไป โดยใช้หลักการทำให้ตัวอสุจิตายเสียก่อนเพื่อง่ายในการนับ แล้วเจือจางในอัตราที่แน่นอน ส่องนับด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายประมาณ 300-400 เท่า และคำนวณหาความเข้มข้นออกมา มีวิธีการ ดังนี้

1) การเจือจางน้ำเชื้อ ในสุกรเจือจางในอัตราน้ำเชื้อ : สารละลายเจือจาง เท่ากับ 1:40 ส่วนในโค 1:100 หรือ 1: 200 หากเจือจาง 100 เท่า โดยการดูดน้ำเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปทและดูด 3.6 % sodium citrate ที่มีส่วนผสมของฟอร์มาลีน 1 หยด ปริมาตรรวม 9.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2) หยดส่วนผสมของน้ำเชื้อ ลงบนตารางทั้ง 2 ข้าง ของแท่นนับ จากนั้นปิดด้วยกระจกบาง ตรวจดูว่าของเหลวบรรจุอยู่เต็มช่องว่าง ไม่มีฟองอากาศและไม่มีของเหลวไหลออกมา

3) ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้อสุจิโรยตัวนอนบนพื้นระนาบเดียวกัน จากนั้นนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่อง ของตารางใหญ่ (อาจใช้ช่องตารางทแยงซ้ายหรือขวาหรือช่องตารางมุมทั้งสี่และช่องกลาง) รวมกันคูณด้วย 10^7 จะเป็นตัวอสุจิใน 1 มิลลิเมตร ของน้ำเชื้อ โดยมีหลักการคำนวณ คือ

พื้นที่ 25 ตาราง	= 0.1 × 0.1 มิลลิเมตร
ปริมาตร (ลึก 0.01 มิลลิเมตร)	= 0.1 × 0.1 × 0.01 มิลลิเมตร
	= 1/10,000 มิลลิลิตร
การเจือจางน้ำเชื้อ	= 1:200 เท่า
น้ำเชื้อ 5/25 ตาราง	= 1:5
นับตัวอสุจิได้รวม	= N จาก 5 ตารางใน 25 ตาราง
ความเข้มข้นของตัวอสุจิใน 1 มิลลิลิตร	= N × 10^7 ตัว



รูปที่ 8.4 การใช้เครื่องนับเม็ดเลือด นับจำนวนตัวอสุจิ

ที่มา: เทวินทร์ (2542)

2.4 ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต (percentage of lived sperm) การตรวจหานั้นใช้หลักการซึมผ่านของสารอิโอซิน (eosin) ซึ่งสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของตัวอสุจิที่ตายแล้วได้เท่านั้น ทำได้โดยนำน้ำเชื้อมาหยดลงบนแผ่นกระจก แล้วผสมสารละลายไนโครซินอิโอซิน (nigrosin-eosin solution) ทำการแผ่สารละลายให้เป็นแผ่นบาง ๆ (smear) วางไว้ให้แห้งในอากาศ แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ถ้าตัวอสุจิตาย หัวของตัวอสุจิจะติดสีแดง แต่ถ้ามีชีวิตหัวของตัวอสุจิจะเป็นสีใส ๆ หรือไม่ติดสี นับตัวอสุจิที่ตายจากตัวอสุจิที่พบทั้งหมดหนึ่งร้อยตัว มีวิธีการดังนี้

2.4.1 การย้อมสี ทำได้ดังนี้

1) หยดน้ำเชื้อ 2 หยดลงในหลอดแก้วที่ลอยใน ตู้เลี้ยงเชื้อ (water bath) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2) หยดสีย้อม 4 หยด ลงในหลอดแก้วที่อยู่ในตู้เลี้ยงเชื้อ

3) คนสีย้อมและน้ำเชื้อให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3-5 นาที

4) หยดส่วนผสมลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วแผ่ส่วนผสมให้เป็นแผ่นบาง ๆ

5) ทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว อาจใช้ลมเป่าหรือวางสไลด์บนแผ่นความร้อน (hot plate) และพึงเข้าใจว่าปัจจัยใด ๆ ที่ทำให้ตัวอสุจิตายระหว่างการย้อมหรือการทำให้แห้ง จะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนตัวตายขึ้นจากตัวเลขจริง

2.4.2 การนับ ควรตรวจดูอสุจิจากหลาย ๆ บริเวณบนสไลด์ นับตัวอสุจิประมาณ 300 ตัว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งต้องใช้ oil emersion หยดบนสไลด์ โดยนับครั้งละ 100 ตัว 3 ครั้ง แล้วจึงเฉลี่ยเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตต่อไป

2.5 การตรวจดูลักษณะของตัวอสุจิ (sperm morphology) โดยปกติในน้ำเชื้อจะมีตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติประมาณ 5 % นอกจากนี้น้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิผิดปกติไม่เกิน20-25 % จะไม่มีผลกระทบกระเทือนต่ออัตราการผสมติด ตัวอสุจิที่ผิดปกตินี้จะเคลื่อนที่ไม่ตรง ดังนั้นการประเมินการเคลื่อนที่ตรงไปข้างของตัวอสุจิ จึงเป็นการรูปร่างผิดปกติของตัวอสุจิทางอ้อมด้วย การตรวจดูลักษณะโดยใช้หมึกอินเดีย (indian ink) ผสมกับน้ำเชื้อ แล้วหยดลงบนกระจกและทำให้เป็นแผ่นบาง ๆ วางไว้ให้แห้งในอากาศแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ดูร้อยละของตัวอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติ โดยแยกเป็นร้อยละของตัวอสุจิ ที่มีลักษณะผิดปกติที่ส่วนหัว ลำตัว และส่วนหาง ลักษณะที่ผิดปกติของตัวอสุจิ มีดังนี้

2.5.1 ลักษณะผิดปกติปฐมภูมิ (primary abnormalities) โดยตัวอสุจิจะผิดปกติตั้งแต่อยู่ในอัณฑะ ซึ่งพบความผิดปกติ ดังนี้

1) ลักษณะผิดปกติที่ส่วนหัว ได้แก่

(1) หัวกิ่วที่บริเวณที่ส่วนต่อกับส่วนกลาง (pyriform หรือ pear-shaped)

(2) หัวกลม (round)

(3) หัวยาว (elongated หรือ slender)

(4) หัวเล็กกว่าปกติ (micocephalic หรือ small)

(5) หัวขนาดโตกว่าปกติ (macocephalic หรือ giant)

(6) มี 2 หัว (double หรือ twin)

(7) มีอโครโซมผิดปกติ (abnormal acrosome)

2) ลักษณะผิดปกติที่ส่วนกลาง (midpiece) ได้แก่

(1) การโค้งงอ (bent)

(2) มี 2 หาง (double)

(3) บวม (swollen)

(4) ตำแหน่งไม่อยู่ในศูนย์กลางของหัว (off center attacment)

3) ลักษณะผิดปกติที่ส่วนหาง ได้แก่

(1) หางม้วน (coiled หรือ curled)

(2) หาง 2 แฉก (double tail)

2.5.1 ลักษณะผิดปกติแบบทุติยภูมิ (secondary abnormalities) เป็นความผิดปกติที่ปรากฏภายหลังผ่านท่อผลิตอสุจิแล้ว คือความผิดปกติที่เกิดภายนอกลูกอัณฑะ เกิดขึ้นในระบบท่อ ได้แก่

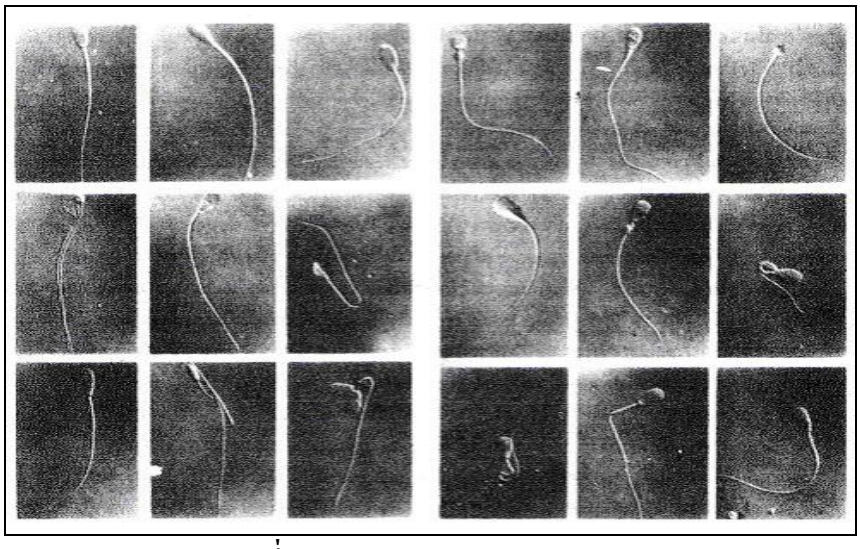
1) หัวขาด (detached heads)

2) มีเม็ดตุ่มที่คอหรือที่หาง (protoplasmic droplet on the neck or tail)

3) หางพับงอ (shock hook tail)

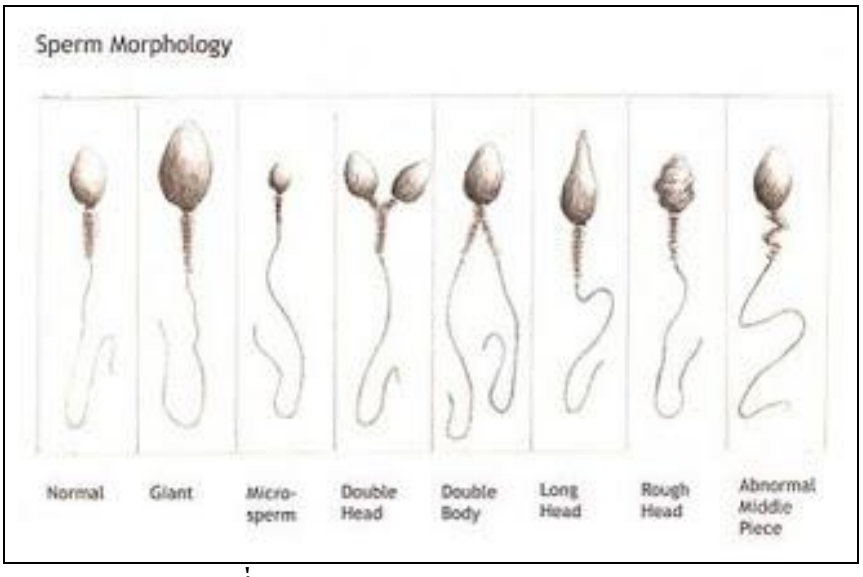
4) ไม่มีอโครโซม (loose cap from the head)

ดังแสดงในรูปที่ 8.5 และ 8.6



รูปที่ 8.5 ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิ

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุรชัย (2545)



รูปที่ 8.6 แสดงรูปร่างลักษณะของตัวอสุจิ

ที่มา: รัญจวน (2554)

3. การเจือจางน้ำเชื้อ

เนื่องจากน้ำเชื้อพ่อโคมีปริมาณน้อย มีความเข้มข้นสูงมาก เป็นการยุ่งยากในการแบ่งไปใช้ จึงมีการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ (semen extender) หรือ (semen diluent) ส่วนน้ำเชื้อจากพ่อสุกรมีความจำเป็นต้องเจือจางเช่นเดียวกัน เพื่อรักษาสภาพของตัวอสุจิให้อยู่ในสภาวะเหมาะสม เก็บรักษาให้อยู่ได้นาน

การเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อจุดประสงค์เพื่อยืดอายุการมีชีวิตรอดของอสุจิ เพื่อให้มีความสามารถในการผสมติดสูง เก็บรักษายาวนาน และเพื่อเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อให้สามารถนำไปผสมเทียมกับแม่พันธุ์ได้จำนวนมากขึ้น ดังนั้นสารเจือจางน้ำเชื้อที่ดีจึงต้องมีคุณสมบัติและประเภทของสารเจือจางน้ำเชื้อ และอัตราเจือจาง ดังนี้

3.1 คุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อ

3.1.1 มีความดันของสารละลายใกล้เคียงกับน้ำเชื้อ หากความดันของสารละลายสูงหรือต่ำเกินไป หางตัวอสุจิจะงอ เคลื่อนที่วน และตาย ดังนั้นสารละลายน้ำเชื้อควรมีความดันใกล้เคียงกับน้ำเชื้อ ซึ่งค่าความดันดังกล่าววัดเป็นความเข้มข้นของน้ำเกลือธรรมดา 0.9 % ซาไลน์ (normal saline solution, NSS) ซึ่งจะเท่ากับความเข้มข้นของเกลือในกระแสเลือดหรือของเหลวในร่างกายสัตว์ปกติด้วย

3.1.2 มีคุณสมบัติในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (buffer) อันเนื่องมาจากการผลิตกรดในน้ำเชื้อ ซึ่งเกิดจากขบวนการเมตาโบลิซึมของตัวอสุจิ

3.1.3 เพื่อป้องกันความเสียหายเนื่องจากความเย็น (cold shock) ในกรณีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสด ต้องมีส่วนประกอบของเลซิธิน (lecithin) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) จากนมหรือไข่

3.1.4 เป็นแหล่งพลังงานแก่ตัวอสุจิ ได้จากนม ไข่ และน้ำตาลพวกกลูโคสและฟรุคโตส เป็นพวกน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide)

3.1.5 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ ปกติจะมีการเติมยาปฏิชีวนะต่าง ๆ เช่น เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน เป็นต้น

3.1.6 เพื่อป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิระหว่างการแช่แข็ง (freezing) และการทำละลาย (thawing) โดยการเติมกลีเซอรอล (glycerol) ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

3.2 ประเภทของสารเจือจางน้ำเชื้อ แบ่งสารเจือจางน้ำเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

3.2.1 สารเจือจางน้ำเชื้อจากธรรมชาติ ได้แก่ นมสด หางนม และนมผง ก่อนนำสารละลายไปใช้ต้องพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 92-95 องศาเซลเซียส นาน 8-10 นาที เพื่อกำจัดปัจจัยที่เป็นพิษต่อตัวอสุจิ ก่อนลดอุณหภูมิและนำไปเจือจางน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง หากต้อง การเก็บรักษาสารละลายนี้ไว้ใช้อีกควรเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน

3.2.2 สารเจือจางน้ำเชื้อสังเคราะห์ ซึ่งสารเจือจางมักจะผสมมาเป็นสูตรต่าง ๆ วัตถุดิบที่ใช้เป็นสารสังเคราะห์มาผสมกับวัตถุดิบธรรมชาติในอัตราส่วนต่าง ๆ ในปัจจุบันมีจำนวนเป็นพัน ๆ สูตร และมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ตัวอย่างสารเจือจางที่ใช้โดยทั่วไป ดังนี้

1) สูตรไข่แดงและซิเตรท (egg yolk citrate diluent) มีส่วนประกอบ ดังนี้
   (1) ผลึกโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรท (sodium citrate di hydrate) 2.9 กรัม
   (2) น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
   (3) ไข่แดงร้อยละ 20 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
2) สูตรไอวีที (Ilinois variable temperature, IVT) มีส่วนประกอบ ดังนี้
   (1) โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) 2.00 กรัม
   (2) โซเดียมไบคาร์บอเนท (sodium bicarbonate) 0.21 กรัม
   (3) โปแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) 0.04 กรัม
   (4) กลูโคส 0.03 กรัม
   (5) ซัลฟานิลาไมด์ (sulfa nilamide) 0.03 กรัม

(6) ไข่แดง (egg yolk) 10 มิลลิลิตร

(7) เพนนิซิลลิน (หน่วยสากล/มิลลิลิตร) 1,000

(8) สเตรปโตมัยซิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 1,000

(9) น้ำกลั่นร้อน 100 มิลลิลิตร

ทำการละลายสารทั้งหมดลงในน้ำกลั่นร้อน เติมคาร์บอนไดออกไซด์จนอิ่มตัว ประมาณ 10 นาที

3) สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อผสมไข่แดง ใช้เจือจางน้ำเชื้อพ่อโคในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง มีส่วนประกอบ ดังนี้

(1) ผลึกโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรท 23.2 กรัม

(2) เพนนิซิลลิน (หน่วยสากล/มิลลิลิตร) 1,000

(3) โพลีไมซินบี (polymycin B) (หน่วยสากล/มิลลิลิตร) 500

(4) สเตรปโตไมซิน (หน่วยสากล/มิลลิลิตร) 1,000

(5) กลีเซอรอล 70 มิลลิลิตร

(6) ไข่แดง 200 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4) สูตรซียูอี-ทรีส (Cornel university extender, CUE) เป็นสูตรที่มาจากมหาวิทยาลัยคอร์เนล มีส่วนประกอบ ดังนี้

(1) ทรีส (tris) 7.57 กรัม

(2) ฟรุคโตส 2.50 กรัม

(3) กรดซิตริค (citric acid) 5.53 กรัม

(4) โซเดียมซิเตรท 10.88 กรัม

(5) โซเดียมไบคาร์บอเนท 1.35 กรัม

(6) โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.25 กรัม

(7) กลูโคส 2.25 กรัม

(8) กลีเซอรอล 7.03 %

(9) ซัลฟานิลาไมด์ 2.25 กรัม

(10) ไข่แดง 10-20 %

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.3 อัตราการเจือจางน้ำเชื้อ

3.3.1 อัตราการเจือจางน้ำเชื้อโค หลักสำคัญในการเจือจางน้ำเชื้อมีอยู่ 2 ประการ คือ

1) การมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ (motile sperm) หลังการเจือจางแล้วต้องมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้อยู่เพียงพอที่จะให้การผสมติดสูง

2) การเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ หลังการเจือจางแล้วต้องมีน้ำเชื้อเพิ่มปริมาณมากที่สุด โดยปกติแล้วในโคถ้าใช้ในรูปน้ำเชื้อเหลว (liquid semen) จะต้องมีตัวอสุจิที่สมบูรณ์แข็งแรงเคลื่อนที่ได้ 10-15 ล้านตัวต่อการผสม 1 ครั้ง ส่วนการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง (deep frozen semen) จะต้องมีตัวอสุจิที่สมบูรณ์แข็งแรงเคลื่อนที่ได้ 30 ล้านตัวต่อ 1 หลอด (โด๊ส) ดังนั้น ก่อนการเจือจางน้ำเชื้อจะต้องทราบข้อมูลข้อต่อไปนี้

(1) ปริมาตรน้ำเชื้อ

(2) ร้อยละของตัวอสุจิที่สมบูรณ์แข็งแรง

(3) ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

(4) จำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ ที่ต้องการฉีดผสมในแต่ละครั้ง

เพื่อให้เกิดความเข้าใจในการเจือจางน้ำเชื้อ ดังแสดงในตัวอย่างที่ 8.1

ตัวอย่างที่ 8.1 ในการใช้ช่องคลอดเทียมรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคตัวหนึ่ง ปรากฏว่าเก็บน้ำเชื้อได้ 8 มิลลิลิตร เมื่อนำน้ำเชื้อไปตรวจสอบ พบว่ามีตัวอสุจิอยู่ 1,400 ล้านตัวต่อ 1 มิลลิลิตร มีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้อยู่ร้อยละ 70 ถ้าหากต้องการคำนวณจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 10 ล้านตัวต่อการผสมหนึ่งครั้ง อยากทราบว่า ต้องเจือจางในอัตราเท่าใด และต้องใช้สารละลายเจือจางทั้งหมดเท่าใด

วิธีทำ <u>ขั้นที่ 1</u> หาตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ใน 1 มิลลิลิตร

ตัวอสุจิ 100 ตัว เป็นตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 70 ตัว

ตัวอสุจิ 14×10^{8} ตัว เป็นตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ $\frac{70\times14\times10^{8}}{100}$ ตัว

ดังนั้น น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร มีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 980,000,000 ตัว

<u>ขั้นที่ 2</u> หาอัตราเจือจาง

จำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ ที่ต้องการผสม 1 ครั้ง 10^{7} ตัว/1 มิลลิลิตร ของตัวเจือจาง

น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร จะผสมได้ $\frac{98\times10^{7}}{10^{7}}=98$ ตัว

ดังนั้น น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใช้สารละลายเจือจาง 97 มิลลิลิตร อัตราการเจือจาง = 1:97

<u>ขั้นที่ 3</u> หาจำนวนสารละลายเจือจางทั้งหมด

น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใช้สารละลายเจือจาง 97 มิลลิลิตร

ถ้าน้ำเชื้อ 8 มิลลิลิตร ใช้สารละลายเจือจาง 97 x 8 = 776 มิลลิลิตร

3.3.2 การเจือจางน้ำเชื้อสุกร หลักสำคัญในการเจือจางน้ำเชื้อมีอยู่ 2 ประการ คือ

1) การมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ (motile sperm) หลังการเจือจางแล้วต้องมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้อยู่เพียงพอที่จะให้การผสมติดสูง

2) การเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ หลังการเจือจางแล้วต้องมีน้ำเชื้อเพิ่มปริมาณมากที่สุด โดยปกติแล้วในสุกรนิยมใช้ในรูปน้ำเชื้อเหลว (liquid semen) จะต้องมีตัวอสุจิที่สมบูรณ์แข็งแรงเคลื่อนที่ได้ 3-4 พันล้านตัวต่อการผสม 1 ครั้ง (โด๊ส) ๆ ละ 80-100 มิลลิลิตร ดังนั้น ก่อนการเจือจางน้ำเชื้อ จะต้องทราบข้อมูลข้อต่อไปนี้

(1) ปริมาตรน้ำเชื้อ

(2) ร้อยละของตัวอสุจิที่สมบูรณ์แข็งแรง

(3) ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

(4) จำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ ที่ต้องการฉีดผสมในแต่ละครั้ง

เพื่อให้เกิดความเข้าใจในการเจือจางน้ำเชื้อ ดังแสดงในตัวอย่างที่ 8.2

ตัวอย่างที่ 8.2 ในการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรตัวหนึ่ง รีดเก็บน้ำเชื้อได้ 160 มิลลิลิตร เมื่อนำน้ำเชื้อไปตรวจสอบ พบว่ามีตัวอสุจิอยู่ 300 ล้านตัวต่อ 1 มิลลิลิตร มีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้อยู่ร้อยละ 70 ถ้าหากต้องการคำนวณจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 3,000 ล้านตัวต่อการผสมหนึ่งครั้ง อยากทราบว่าต้องเจือจางในอัตราเท่าใด และต้องใช้สารละลายเจือจางทั้งหมดเท่าใด

วิธีทำ <u>ขั้นที่ 1</u> หาตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ใน 1 มิลลิลิตร

ตัวอสุจิ 100 ตัว เป็นตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 75 ตัว

ตัวอสุจิ 3×10^8 ตัว เป็นตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ $\frac{75\times3\times10^8}{100}$ ตัว

ดังนั้น น้ำเชื้อ 160 มิลลิลิตร มีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 225,000,000 x 160 = 3.6 X 10^{10} ตัว

<u>ขั้นที่ 2</u> หาจำนวนโด๊สจากน้ำเชื้อที่รีดได้ทั้งหมด

จำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ ที่ต้องการผสม 1 ครั้ง 3×10^9 ตัว/100 มิลลิลิตร

น้ำเชื้อ 160 มิลลิลิตร จะผสมได้ $\frac{3.6\times10^{10}}{3x10^9}=12$ โด๊ส

<u>ขั้นที่ 3</u> หาจำนวนสารละลายเจือจางทั้งหมด

ผสมโด๊สละ 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายเจือจาง 100 X 12 = 1,200 มิลลิลิตร

ดังนั้น ใช้สารละลายเจือจาง 1,200 – 160 = 1,040 มิลลิลิตร

4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ (semen preservation) ที่เจือจางแล้วทำได้ 2 ลักษณะ ดังนี้

4.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อเหลว (liquid semen) เมื่อเติมสารละลายเจือจางแล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิทีละน้อย ๆ จนถึง 5 องศา-เซลเซียส และเก็บที่อุณหภูมินี้ได้นาน 3-5 วัน ได้แก่ การเก็บน้ำเชื้อเหลวในการผสมเทียมสุกร น้ำเชื้อโคที่ใช้รูปแบบนำเชื้อเหลว เป็นต้น

4.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) การทำน้ำเชื้อเจือจางให้เป็นน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นต้องเก็บที่อุณหภูมิเย็นจัด นิยมใช้กัน 2 ชนิด คือ

4.2.1 น้ำแข็งแห้ง (dry ice) อุณหภูมิ –79 องศาเซลเซียส ปัจจุบันไม่นิยมใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ

4.2.2 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส สำหรับรูปแบบของการเก็บน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วนั้น นิยมทำกันเป็น 3 รูปแบบ คือ บรรจุในกระเปาะแก้ว บรรจุในหลอดฟาง และบรรจุแบบเม็ด ในปัจจุบันนิยมการเก็บแบบบรรจุในหลอดฟางโดยเก็บรักษาเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว ดังแสดงในรูปที่ 8.7 และ 8.8

รูปที่ 8.7 แสดงการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

ที่มา: รัญจวน (2554)

รูปที่ 8.8 (วีดีทัศน์ที่ 8.1) แสดงถังบรรจุไนโตรเจนเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง

ที่มา: https://www.youtube.com/watch?v=lpwWx2YPDOE

สรุป

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อถือว่าเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผสมเทียม ให้มีอัตราการผสมติดสูง จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องประเมินศักยภาพของน้ำเชื้อ ว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์หรืออัตราการผสมติดในระดับใด ซึ่งมีวิธีการโดยการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า และการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อประกอบการพิจารณาตัดสินใจว่าควรนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ไปทำการเจือจางน้ำเชื้อหรือไม่ ตลอดจนการเก็บรักษาน้ำเชื้อ และนำน้ำไปผสมเทียมให้มีอัตราการผสมติดสูงต่อไป

คำถามท้ายบทที่ 8

คำสั่ง ให้ตอบคำถามทุกข้อให้ถูกต้องสมบูรณ์

1. ให้อธิบายการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า
2. ให้อธิบายการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์
3. รีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคตัวหนึ่ง เก็บน้ำเชื้อได้ 4 ลบ. ซม. เมื่อนำน้ำเชื้อไปตรวจคุณภาพ พบว่ามีตัวอสุจิอยู่ 1,200 ล้านตัว/1 ลบ.ซม. มีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้อยู่ร้อยละ 80 ถ้าหากต้องการคำนวณจำนวน

ตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ 10 ล้านตัวต่อการผสมหนึ่งครั้ง อยากทราบว่าต้องเจือจางในอัตราเท่าใด และต้องใช้สารละลายเจือจางทั้งหมดเท่าใด

4. ให้บอกจุดประสงค์ของการเติมสารเจือจางน้ำเชื้อ
5. ให้บอกคุณสมบัติของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ดี
6. ให้บอกตัวอย่างของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้โดยทั่วไป
7. ให้อธิบายการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

แหล่งความรู้เพิ่มเติม

เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2542. **การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.

พงศ์เทพ พลแสง. 2557. **แบบเรียนออนไลน์วิชาการผสมเทียม.** (cited 27 August 2014). Available from: URL: http://www.kasetyaso.ac.th/pong/index.html

รัญจวน อิสรรักษ์. 2554. **การผสมเทียมปศุสัตว์.** (cited 11 August 2014). Available from: URL: http://kaset1.blogspot.com/p/2.html.

รัญจวน อิสรรักษ์. 2554. **การผสมเทียมปศุสัตว์.** (cited 11 August 2014). Available from: URL: http://kaset2.blogspot.com/.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2545. **การผสมเทียมโค.** ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น : ขอนแก่น.

สุรชัย ชาครียรัตน์. 2545. **การสืบพันธุ์และการผสมเทียมโค-กระบือ.** สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.

อรรณพ คุณาวงษ์กฤต. 2545. **วิทยาการสืบพันธุ์สุกร.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพมหานคร.

Bearden, H.J., and J.W. Fuquay. 1997. **Applied Animal Reproduction. 4 th ed.** Prentice Hall: New Jersey.

https://www.youtube.com/watch?v=Eh-G_pF6cb0

https://www.youtube.com/watch?v=lpwWx2YPDOE