บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

คุณภาพสเปิร์มของหอยนางรมปากจีบ

คุณภาพน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบที่รวบรวมมาในช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคมมีคุณภาพดี เนื่องจากสเปิร์มมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่สูงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตก็มีค่ามาก แม้ว่าปริมาณน้ำเชื้อของหอยที่ได้มีปริมาณน้อย เนื่องจากเป็นหอยขนาดเล็ก คุณภาพน้ำเชื้อที่ดีของหอยนางรมปากจีบ แสดงให้เห็นว่าหอยนางรมปากจีบที่รวบรวมมาในช่วงนี้อยู่ในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานว่า ช่วงเวลาที่พบลูกหอยนางรมปากจีบบริเวณตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรีมักพบในเดือนเมษายน - พฤษภาคม และตุลาคม - พฤศจิกายนของทุก ๆ ปี (กรมประมง 2536)

ความสมบูรณ์เพศของหอย 2 ฝาส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับขนาดพ่อแม่พันธุ์ มากกว่าอายุ และขนาดของพ่อแม่พันธุ์หอยที่สมบูรณ์เพศก็แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของหอย บริเวณที่หอยแพร่กระจาย และความสมบูรณ์ของอาหารที่หอยได้รับ ซึ่งการประเมินเพศเพศหอยทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาด้านจุลกายวิภาคศาสตร์เนื้อเยื่อ (histology) ซึ่งแม้ว่าจะมีความเที่ยงตรง แต่ต้องรวบรวมต่อมเพศออกมาประเมินแยกเพศ อย่างไรก็ตามวิธีการนำตัวอย่างต่อมเพศ (gonad) บางส่วนออกมา smear บนกระจกสไลด์เป็นวิธีที่นิยมในการแยกเพศหอย ทำให้ทราบความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์หอยที่นำมาใช้ได้เป็นอย่างดี (FAO, 2005)

การเพาะพันธุ์หอยนางรมปากจีบในประเทศไทยในขณะนี้ยังไม่มีโรงเพาะฟักหอยนางรมปากจีบเพื่อผลิตลูกพันธุ์ เนื่องจากลูกพันธุ์หอยที่ใช้ในการเลี้ยงทั้งหมดมาจากพ่อแม่พันธุ์ในธรรมชาติที่ผสมพันธุ์วางไข่ในทะเล แล้วจึงรวบรวมลูกหอยมาเลี้ยง ด้วยเหตุที่หอยนางรมปากจีบเป็นหอยทะเลที่โตช้า และประกอบกับในขณะนี้ปัญหาจากสภาพแวดล้อมชายฝั่งที่เสื่อมโทรมมีเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลา ทำให้การพึ่งพาลูกหอยจากธรรมชาติอย่างเดียวมีความเสี่ยง ซึ่งถ้าได้มีการเพาะพันธุ์หอยในโรงเพาะฟักมากขึ้น ก็จะช่วยส่งเสริมการเลี้ยงหอยชนิดนี้ต่อไป ซึ่งขณะนี้การเพาะพันธุ์หอยนางรมหลายชนิดเชิงพาณิชย์ทั้งลูกหอยปกติและลูกหอย 3n ได้มีการทำในหลายๆประเทศ เช่น ไต้หวัน จีน เป็นต้น (Nell, 2002) อย่างไรก็ตามการแช่เย็นและการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมก็มีส่วนช่วยการบริหารจัดการในระหว่างการเพาะพันธุ์หอยนางรมในโรงเพาะฟักถ้ามีการนำเทคโนโลยีนั้นๆมาประยุกต์ใช้ การเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์หอยนางรมในฟาร์มในประเทศไทยก็ยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อพ่อแม่พันธุ์หอยที่เลี้ยงขุน ซึ่งควรได้มีการวิจัยต่อไปในอนาคต ดังเช่น Suquet et al. (2010) ที่ได้รายงานการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมแปซิฟิคที่มีโครโมโซม 4n (tetraploid Pacific oyster sperm) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเลพบว่า

สเปิร์มหอย 4n สามารถเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นได้นานกว่า 20 ชั่วโมงแต่มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่าสเปิร์มหอย 2n แสดงให้เห็นว่าคุณภาพสเปิร์มหอย 4n ต่ำกว่าคุณภาพสเปิร์มหอย 2n เนื่องจากระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n ตั้งแต่ถูกกระตุ้นจนหยุดเคลื่อนที่จะใช้เวลาสั้นกว่าที่พบในหอย 2n แม้ว่าระดับพลังงานในสเปิร์มหอย 4n (intracellular ATP concentration) มีค่าสูงกว่าที่พบในสเปิร์มหอย 2n แสดงให้เห็นว่าการหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n ไม่เกี่ยวข้องกับระดับ ATP ในสเปิร์มเนื่องจาก ATP ยังมีค่าสูงอยู่ แต่การหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสเปิร์มหอย 4n (morphological alteration) ที่ทำให้สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ และสเปิร์มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากหลังจากเวลากระตุ้นผ่านไป 24 ชั่วโมง

ประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่างๆ ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ

การที่น้ำยาสูตร Ca-F Saline สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบได้นานที่สุด คาดว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับค่าแรงดันออสโมติกของสารละลาย Ca-F Saline ที่มีค่า 704 mOsm/ kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อที่รวบรวมมาศึกษา (628 mOsm/ kg) ทำให้เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 48 ชั่วโมง ในขณะที่น้ำยาสูตร 0.85%NaCl, Ringer และ Ca-F-HBSS มีค่าแรงดันออสโมติก 332, 281 และ 322 mmol/kg ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อค่อนข้างมาก จึงสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน 24 ชั่วโมง สำหรับน้ำยาสูตร ASW ที่มีค่าแรงดันออสโมติก 913 mmol/kg ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (628 mOsm/ kg) ซึ่งอาจจะมีส่วนกระตุ้นให้น้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบถูกกระตุ้นระหว่างเก็บรักษา จึงทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้น้อยที่สุดเพียง 12 ชั่วโมง

จากข้อมูลที่ได้แสดงให้ทราบว่าสเปิร์มหอยนางรมปากจีบจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำกว่าน้ำเชื้อ แต่สเปิร์มจะเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ จึงได้นำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมากระตุ้นด้วยสารละลายแรงดันออสโมติกต่างๆระดับกัน และทราบว่าเมื่อแรงดันออสโมติกของสารละลายเพิ่มเป็น 649 mOsm/ kg และ 658 mOsm/ kg สเปิร์มจะเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นเมื่อแรงดันออสโมติกสูงขึ้น ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายๆชนิด เช่นในรายงานการศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา salmon พบว่าถูกควบคุมโดยระดับโพแทสเซียม (K^+) เป็นส่วนใหญ่เช่นเดียวกับปลา sturgeon ในขณะที่สเปิร์มของปลาน้ำจืด และปลาทะเลนั้น การเคลื่อนที่ของสเปิร์มถูกควบคุมโดยค่าระดับแรงดันออสโมติกเป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าปัจจัยอื่นๆเช่น ความเข้มข้นของสาร metabolite และแร่ธาตุ (เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+}) pH และอุณหภูมิต่างก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Morisawa, 1985)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบที่อัตราส่วน1 ต่อ 2 ผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีกว่าการใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 1 หรือ 1 ต่อ 3 แสดงว่าอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อมีผลต่อ

ระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้เหมือนกับการแช่เย็นน้ำเชื้อสัตว์น้ำบางชนิด เช่น อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันสูงสุดเมื่อเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ และเก็บแช่เย็นคืออัตราส่วน 1:5 (Mansour et al. 2004) ในขณะที่อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อปลา Atlantic cod และปลา haddock (DeGraaf and Berlinsky, 2004) และปลา sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi* and *A. brevirostrum*) (Park and Chapman, 2005) คืออัตราส่วน 1:3 นอกจากนี้ Babiak et al. (2006) ได้รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของการแช่เย็นน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่เจือจางในสารละลาย modified Hanks' balanced salt solution คือ 1:5-1:9 ซึ่งทำให้สเปิร์มมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าการใช้อัตราส่วนอื่นๆในการเจือจางน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยการใช้อัตราส่วนการเจือจางที่สูงขึ้นได้มีรายงานว่ามีผลทำให้ค่าแรงดันออสโมติกเปลี่ยนแปลง จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระยะเวลาการเก็บแช่เย็นลดลงเมื่อเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น Bates et al. (1996) รายงานว่าน้ำเชื้อปลาดุกอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ที่เจือจางในน้ำยา HBSS จะมีผลทำให้ค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายลดลง 10 mOsm/kg

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่ผสมน้ำยา (Control) หรือน้ำเชื้อสดสามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลา 12-36 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล แสดงให้ถึง ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน ทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของหอยนางรมปากจีบแบบแช่เย็นโดยไม่ใส่น้ำยาบัฟเฟอร์ก็มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยใส่น้ำยาบัฟเฟอร์ลงไป เนื่องจากน้ำยาบัฟเฟอร์มีประสิทธิภาพในการช่วยเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยน้ำยาบัฟเฟอร์จะมีค่าแรงดันออสโมติกใกล้เคียงกับแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อสด ดังผลการทดลองที่ได้จากการใช้ Ca-F saline เจือจางน้ำเชื้อ นอกจากนี้ปัจจัยที่จะทำให้น้ำเชื้อที่นำมาเก็บรักษามีคุณภาพไม่ดีมีหลายประการ เช่น คุณภาพของพ่อพันธุ์และความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างตัวหอย เทคนิคการแช่เย็น ความเหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นต้น หอยนางรมที่ใช้ทดลองแม้ว่าสามารถทำการรวบรวมน้ำเชื้อได้ด้วยการรีดน้ำเชื้อซึ่งน้ำเชื้อที่ได้สะอาดและไม่มีการปนเปื้อนก็สามารถเก็บรักษาได้นาน แต่ถ้าน้ำเชื้อที่ได้มีการเจือปนไม่ว่าจะเป็นน้ำทะเลหรือของเสียจากตัวหอยนางรมก็จะส่งผลให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ผลที่คลาดเคลื่อน ด้วยเหตุที่หอยนางรมปากจีบมีขนาดเล็ก และน้ำเชื้อมีปริมาณน้อยมาก เมื่อรวบรวมน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณมากต้องใช้หอยจำนวนมาก โดยน้ำเชื้อที่ได้ (fresh semen) แม้ว่าจะเก็บรักษาไว้ในจานแก้วที่เย็นบนน้ำแข็งก็ตาม น้ำเชื้อเหล่านี้บางส่วนอาจมีการระเหย (evaporation) ในระหว่างการรวบรวม ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง แม้ว่าจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก็อาจไม่สามารถทำให้เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน นอกจากนี้ในกรณีที่ตัวหอยนางรมปากจีบไม่อยู่ในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์จะมีปริมาณน้ำเชื้อน้อยหรือไม่มีน้ำเชื้อ จึงต้องรีดน้ำเชื้อจากหอยจำนวนมาก ทำให้ระยะเวลา

น้ำเชื้อสัมผัสอากาศนานขึ้นและมีโอกาสถูกปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้สูง อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติการรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบจะมีน้ำในตัวหอยปนเปื้อนหรือของเสียอื่นๆ ออกมาทำให้คุณภาพน้ำเชื้อหอยลดลง แม้ว่าจะได้ระมัดระวังอย่างเต็มที่แล้วก็ตาม โดยทั่วไปแล้วน้ำเชื้อทีใช้ในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยการเก็บแบบแช่แข็ง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสโดยการเก็บแบบแช่เย็น จะต้องเป็นน้ำเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำเลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่นๆ ทำให้คุณภาพไม่ดี เนื่องจากคุณภาพสเปิร์มที่ลดลง ทำให้สเปิร์มสามารถเก็บรักษาได้ไม่นาน อุทัยรัตน์ (2526) รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) คือ อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 ส่วน ในขณะที่ Hulata and Rothbard (1979) ใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*)

ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบ

การประเมินผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 10 ชนิดทราบว่า DMSO, sucrose และ trehalose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มหอยนางรมปากจีบต่ำ เนื่องจากสเปิร์มที่อยู่ในสารดังกล่าวตั้งแต่ความเข้มข้น 2.5-20% ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากเวลาผ่านไป 180 นาที แต่ด้วยเหตุที่ sucrose และ trehalose เป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จึงได้นำเอา ethylene glycol และ propylene glycol ซึ่งเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ มาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ DMSO ซึ่งก็เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์เช่นกัน

การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์เพื่อทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ และชนิดของเซลล์/ตัวอ่อนของสัตว์น้ำที่นำมาทดสอบ ซึ่งมีการตอบสนองต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างกัน เช่น Gwo et al. (2002) ได้ศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด คือ DMSO, dimethyl acetamide (DMA), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), butylene glycol (BG), polyethylene glycol, glycerol and methanol ที่ความเข้มข้นระหว่าง 5, 10, 15, 20 และ 25% ด้วยการทดสอบที่เวลา 5, 10, 30 และ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส พบว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์อีก 7 ชนิด โดยการใช้ระดับความเข้มข้นของ 5% DMSO, 10% DMSO และ 5% DMA มีผลให้สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่มากกว่า 75% และระยะเวลาที่สเปิร์มอยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์นานที่เกิน 10 นาทีทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว Nascimento et al. (2005) ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (Methanol, Propylene glycol และ DMSO) ที่มีต่อน้ำเชื้อ ไข่ และตัว

อ่อน Trochophore ของหอยนางรม *Crassostrea rhizophorae* โดยปล่อยให้น้ำเชื้อ ไข่ และตัวอ่อนอยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้น 5, 10, 15 หรือ 20% เป็นเวลา 10, 20 หรือ 30 นาที พบว่า Methanol มีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อ และไข่ โดยไม่มีผลต่อตัวอ่อน แต่ Propylene glycol มีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อ และตัวอ่อนโดยไม่มีผลต่อไข่ Ieropoli et al. (2004) ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิค (*Crassostrea gigas*) โดยเริ่มจากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO, Ethylene glycol, Propylene glycol และ Glycerol ที่ระดับ 5-15% ที่มีต่อน้ำเชื้อนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส พบว่า 5% DMSO, 10% Ethylene glycol และ 15% Propylene glycol มีความเหมาะสมในการนำไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบในช่วงแรกใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดคือ DMSO Ethylene glycol และ Propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% โดยลดอุณหภูมิมาถึง -30 องศาเซลเซียส พบว่า การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 5% ให้ผลการแช่แข็งที่ดี เช่น Ethylene glycol ความเข้มข้น 5% และอัตราการลดอุณหภูมิ 7.5 องศาเซลเซียส/นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีที่สุดเท่ากับ 73.33 ± 6.67% DMSO ความเข้มข้น 5% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เท่ากับ 93.33 ± 6.67% และ Propylene glycol ความเข้มข้น 5% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 7.5 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มที่ดีที่สุด เท่ากับ 60% ซึ่งก็ทำให้ผู้วิจัยได้ปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ให้มีช่วงที่กว้างขึ้นเพื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมที่สุดในการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ ดังนั้นการทดลองแช่แข็งในช่วงต่อมาจึงทำการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบด้วยสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด DMSO Ethylene glycol และ Propylene glycol ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15% และ 20% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิเหมือนเดิมทุกอย่าง เพียงแต่อุณหภูมิสุดท้ายลดต่ำลงเป็น -80 องศาเซลเซียส พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ตัวที่ดีที่สุดในการแช่แข็งในครั้งนี้ คือ Ethylene glycol ความเข้มข้น 5% และอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที และ 7.5 องศาเซลเซียส/นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด เท่ากับ 80 ± 0.00% และ 73.33 ± 6.67% ตามลำดับ รองลงมา คือ DMSO ความเข้มข้น 2.5% และ DMSO ความเข้มข้น 5% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 และ 2.5 องศาเซลเซียส/นาที ตามลำดับ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีที่สุดเท่ากัน คือ 66.67% และ Propylene glycol ความเข้มข้น 2.5% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที ก็มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด เท่ากับ 60% ตามลำดับ แสดงว่า สารไครโอโพรเทค

แทนท์ความเข้มข้น 2.5-5% มีความเหมาะสมในการการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ เพราะการใช้สารที่มีความเข้มข้น 15% และ 20% ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดลงหลังการละลาย

สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบคือ Ethylene glycol, DMSO และ Propylene glycol ต่างก็สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวได้ผลดีแม้ว่าโดยภาพรวม Propylene glycol จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเล็กน้อย โดยระดับของความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิ และอุณหภูมิสุดท้ายที่เลือกใช้ก่อนนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำชนิดเดียวกันในบางครั้งก็สามารถทำได้ผลดีเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกัน หรือใช้ความเข้มข้นต่างกัน หรือใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน เนื่องจากกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อนที่เมื่อใช้สารสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ต่างกันโดยเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (intracellular cryoprotectant) ทั้ง 3 ตัวของการทดลองนี้เมื่อใช้แช่แข็งในเปอร์เซนต์ที่เท่ากัน (5, 10, 15 หรือ 20%) แต่ปริมาณสารที่แพร่ซึมเข้าไปในสเปิร์มหอยนางรมปากจีบระหว่างการปรับสมดุล 10 นาทีก็จะไม่เท่ากัน เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ต่างกัน ทำให้แพร่ซึมเข้าเซลล์ได้ต่างกัน ทำให้เมื่อลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็ง ซึ่งน้ำจะไหลออกจากเซลล์สเปิร์ม แล้วสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้แพร่เข้าไปภายในเซลล์สเปิร์มเพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ระหว่างการลดอุณหภูมิก็มีปริมาณไม่เท่ากัน ทำให้ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งได้ต่างกัน ประกอบกับขนาดของผนังเซลล์ (cell membrane) ของสัตว์น้ำแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (membrane permeability) ก็ทำให้สารไครโอโพรแทคแทนท์ซึมผ่านเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์ได้ต่างกัน (He et al., 2004) นอกจากนี้อัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วหรือช้าต่างกัน ก็เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการไหลของน้ำออกนอกเซลล์มากน้อยต่างกัน เช่นการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ทำให้น้ำออกจากเซลล์มากขึ้น เพราะใช้เวลามากขึ้นในการแช่แข็งเซลล์ แต่ถ้าแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว น้ำจะไหลออกจากเซลล์น้อยลง เพราะใช้เวลาสั้นในการแช่แข็งเซลล์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงระหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างในเซลล์ โดยการไหลออกของน้ำในเซลล์ขณะแช่แข็งจะต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม มีความสัมพันธ์กับชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ปกป้องเซลล์ไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต้องใช้รูปแบบอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมเช่นกัน ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกัน หรือต่างความเข้มข้น หรือใช้รูปแบบการลดอุณหภูมิต่างกัน ก็สามารถประสบผลสำเร็จเช่นกัน เช่น Dong et al. (2005) แช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิค (*Crassostrea gigas*) ที่มีโครโมโซม 2n หรือ 4n ด้วยการใช้ 8% DMSO และ 10% Propylene glycol ในอัตราการลดอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส/นาทีถึง -140 องศาเซลเซียสแล้วนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว ก็พบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงหลังการละลายน้ำเชื้อ (post-thaw sperm motility)

เมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิด Paniagua-Chavez and Tiersch (2001) ก็ได้รายงานความสำเร็จของการใช้ Propylene glycol เช่นกันในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรม Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 2.5 องศาเซลเซียส/นาทีถึง -30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว Kawamoto et al. (2007) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมญี่ปุ่น (Japanese pearl oyster; *Pinctada fucata martensii*) ด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ methanol, dimethylformamide หรือ dimethylacetamide ด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวถึง -50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวก็พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดนี้ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลาย (post-thaw sperm motility) สูงกว่าการใช้ DMSO หรือ glycerol

การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายชนิดก็มีรายงานถึงความสำเร็จเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน เช่น อัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*H. diversicolor supertexta*) มีค่าระหว่าง 12-15 องศาเซลเซียส/นาที ในขณะที่อัตราการลดอุณหภูมิ 3.5, 5, 7.5 และ 20 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ต่ำ (Gwo et al., 2002) สำหรับอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยญี่ปุ่น (*Pinctada fucata martensii*) มีค่าระหว่าง 15-20 องศาเซลเซียส/นาที ซึ่งเป็นการแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว (Kawamoto et al., 2007) อย่างไรก็ตาม อัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิค (*Crassostrea gigas*) ที่เหมาะสมคือ 6 องศาเซลเซียส/นาที หลังจากนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งด้วย 10% Ethylene glycol เนื่องจากน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถปฏิสนธิไข่ได้ตัวอ่อนระยะ D-shape ไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด (Ieropoli et al. , 2004)

การลดอุณหภูมิเร็วเกินไป ทำให้เซลล์มีโอกาสเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (intracellular ice crystal) มากขึ้น ทำให้เซลล์บาดเจ็บและตายได้ ในขณะที่การลดอุณหภูมิช้าเกินไป ทำให้น้ำออกนอกเซลล์มากขึ้น ทำให้ความเข้มข้นภายในเซลล์ (osmolality) สูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้เซลล์ตายได้เช่นกัน ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงส่งผลโดยตรงต่อการรอดชีวิตของเซลล์ขณะแช่แข็ง โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบในการศึกษาครั้งนี้มีค่าระหว่าง 5-7.5 องศาเซลเซียส/นาที โดยทั่วไปแล้วอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับ ชนิดของสัตว์น้ำ หรือชนิดของเซลล์ที่นำมาแช่แข็ง ซึ่งมีลักษณะจำเพาะ (species) ทำให้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำชนิดหนึ่งไม่สามารถนำมาใช้กับน้ำเชื้อสัตว์น้ำอีกชนิดหนึ่งได้ทันที เนื่องจากความแตกต่างของผนังเซลล์ที่มีไขมันต่างกัน และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ซึมผ่านเข้าเซลล์มีความสัมพันธ์ที่สลับซับซ้อนในการกำหนดระดับความสำเร็จในการแช่แข็ง ซึ่งการศึกษาเชิงลึกในขั้นต่อไปควรมีการศึกษาถึงปัจจัยสภาพแวดล้อมภายในและภายนอกเซลล์และกลไกต่างๆที่เกิดขึ้นที่มีผลต่อการแช่แข็งเซลล์ (cooling sensitivity)

การลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งมาถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบไม่แตกต่างกับการใช้อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -30 องศาเซลเซียส เนื่องจาก

สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ที่ดีเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดที่มีความเข้มข้นระหว่าง 5-10% และอัตราการลดอุณหภูมิระหว่าง 5-7.5 องศาเซลเซียส/นาทีในการแช่แข็ง โดยทั่วไปสเปิร์มหลังการแช่แข็งจะเคลื่อนที่ได้ดีมากน้อยเพียงไร ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้กระบวนการน้ำไหลออกจากเซลล์ขณะแช่แข็ง (dehydration) มีสภาวะที่เหมาะสม ไม่เร็วหรือช้าจนเกินไป ทำให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ดี ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดสูงหลังการละลายเซลล์ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้การลดอุณหภูมิมาถึง -30 องศาเซลเซียสมีผลทำให้เซลล์สเปิร์มแข็งตัว (frozen) แล้ว ซึ่งเมื่อนำไปใส่ในถังไนโตรเจนเหลวทันที ก็ไม่มีการช็อคจากสภาวะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเฉียบพลันเพราะน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบก็มีการเคลื่อนที่สูงหลังการละลาย เช่นเดียวกับการลดอุณหภูมิต่ำลงถึง -80 องศาเซลเซียส ก็ทำให้เซลล์สเปิร์มแข็งตัวอย่างมาก ทำให้เมื่อนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว ไม่มีการช็อคของสเปิร์มระหว่างการเลี่ยนแปลงอุณหภูมิจาก -80 องศาเซลเซียส มาเป็น -196 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามรูปแบบการลดอุณหภูมิที่ใช้อุณหภูมิสุดท้ายต่างกันก็มีรายงานถึงความสำเร็จในการแช่แข็งต่างกัน เช่น Gwo et al. (2002) รายงานว่าน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*H. diversicolor supertexta*) ที่แช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส/นาที มาถึงอุณหภูมิสุดท้าย -90 องศาเซลเซียส มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายระหว่าง 50-75% ในขณะที่การลดอุณหภูมิมาถึง -30 หรือ -60 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายมีค่าระหว่าง 25-50% Kawamoto et al. (2007) รายงานว่าน้ำเชื้อหอยญี่ปุ่น (*Pinctada fucata martensii*) ที่ได้แช่แข็งมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -50, -60 หรือ -70 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อมาที่อุณหภูมิสุดท้ายที่ -30 หรือ -40 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปแล้วน้ำบริสุทธิ์แข็งตัวที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แต่น้ำเชื้อจะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เพราะน้ำเชื้อที่แช่แข็งขณะนี้มีตัวถูกละลาย (solute) มากขึ้นผสมอยู่ทั้งสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีแร่ธาตุหลายตัว และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ปนอยู่ ทำให้ freezing point ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส แต่การแข็งตัวของน้ำเชื้อจะเป็นที่อุณหภูมิเท่าใดนั้นก็ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวถูกละลายที่มีแตกต่างกันไปสำหรับแต่ละการทดลอง อย่างไรก็ตามการแช่แข็งเซลล์ส่วนใหญ่แล้วจะมีโอกาสที่มีการบาดเจ็บของเซลล์ (cryoinjury) เกิดขึ้นมากที่อุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง -40 องศาเซลเซียส ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำส่วนมากใช้การแช่แข็งมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียสแล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (Leung, 1991) ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อให้ประสบผลสำเร็จขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชนิดของสัตว์น้ำ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม รวมทั้งความสมบูรณ์ของสเปิร์มสัตว์น้ำแต่ละชนิด ซึ่งต้องมีความเหมาะสม

ซึ่งการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งควรจะได้มีการนำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่หอยนางรมปากจีบเพื่อผลิตลูกหอยต่อไป

สรุปผลการทดลอง

น้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบสามารถแช่เย็นด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F Saline และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีในอัตราส่วนเจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 1 ต่อ 2 DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่สามารถนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบด้วยการลดอุณหภูมิระหว่าง 5-7.5 องศาเซลเซียส/นาทีมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -30 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนใส่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งไม่ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่แตกต่างกัน ระดับความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของชนิด และความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ และอัตราการลดอุณหภูมิ