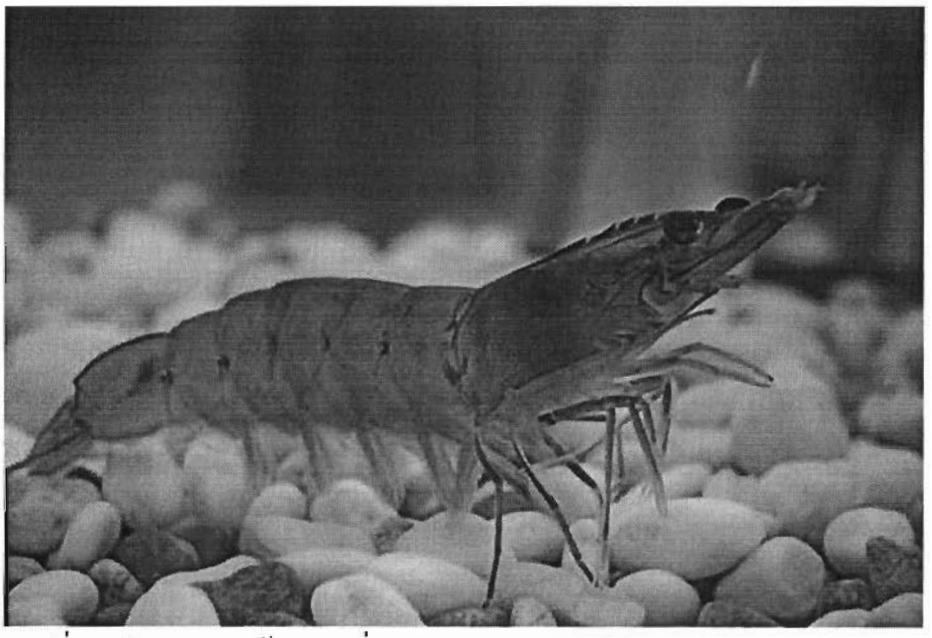
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) หรือ Pacific white shrimp หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า White leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู กุ้งชนิดนี้มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย และบราซิล เนื่องจากกุ้งขาวแปซิฟิกที่เกษตรกรในประเทศไทยนิยมเรียกว่ากุ้งขาวแวนนาไมหรือเรียกกันว่า "กุ้งขาว" เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว กุ้งชนิดนี้ได้มีการนำเข้ามาเลี้ยงในทวีปเอเชียครั้งแรกในประเทศไต้หวันปี พ.ศ. 2539 และต่อมาได้นำเข้าไปในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2541 สำหรับประเทศไทยได้มีการนำกุ้งขาวเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 แต่การทดลองในครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จนกระทั่งเดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้า ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน เกษตรกรบางส่วนจึงได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งส่วนใหญ่ได้ผลค่อนข้างดี ทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547)



ภาพที่ 1 ลักษณะของกุ้งขาว (ที่มา : benzsei.siam2web.com)

ลักษณะอนุกรมวิธาน

กุ้งขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ลิโทพีเนียส แวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ชื่อสามัญที่องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติหรือ Food and Agriculture Organization (F.A.O.) รับรองและใช้เรียกกันทั่วโลกคือ Whiteleg shrimp ซึ่งจัดอยู่ใน (ปิยบุตร,2545)

Kingdom Animali
Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Suborder Natantia
Family Penaeidae
Genus Penaeus
Subgenus Liopenaeus
Species vannamei

โครงสร้างและส่วนประกอบของอวัยวะกุ้ง

1. ตา (eye or opthalmopoda) เป็นตาประกอบ (compound eye) และมีก้านตา (eyestalk) ประกอบด้วยปล้องติดต่อ 3 ปล้อง

2. เหงือก (grill or branchiae) แบ่งออกเป็น 4 ชนิด ตามตำแหน่งที่เหงือกยึดเกาะ คือ
   - Podobranchiae ยึดเกาะส่วนคอกโซโพไดต์ของแมกซิลลิเปดและขาเดิน
   - Arthrobranchiae ยึดเกาะกับเนื้อเยื่อแผ่นบางๆ ที่หุ้มข้อ ส่วนใหญ่พบข้างละ 2 อัน
   - Pleurobranchiae ยึดเกาะกับผนังด้านข้างของส่วนอกระหว่างรยางค์
   - Mastigobranchiae หรือเรียกว่าอิพิโพไดต์อยู่บริเวณโคนแมกซิลลิเปดและขาเดิน

3. รยางค์ต่าง ๆ (appendages) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่
   - รยางค์ส่วนหัว (head appendages) มี 5 คู่ โดยสองคู่แรกเป็นรยางค์ก่อนปาก (preoral appendages) ทำหน้าที่รับสัมผัส ส่วนสามคู่หลังเป็นรยางค์ปาก (oral appendages) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกินและการบดย่อยอาหาร

- รยางค์ส่วนอก (thoracic appendages) มี 8 คู่ ได้แก่ แมกซิลลิเปดคู่ที่1-3 (1-3 maxillipeds) ช่วยในการกินอาหาร และมี ขาเดินคู่ที่ 1-5 (1-5 pereiopod) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ ต่อสู้ อาจพบอิพิไดต์ ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการทำความสะอาดเหงือก

- รยางค์ส่วนท้อง (abdominal appendages) มี 6 คู่ ได้แก่ รยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 1-5 (1-5 pleopod) และยูโรพอด (uropod) เป็นรยางค์ส่วนท้องคู่สุดท้าย

4. หาง (telson) บางครั้งมีหนาม (spines) ชนิดเคลื่อนไหวได้ (unfixed or movable spines) และเคลื่อนไหวไม่ได้ (fixed or immovable spines)

5. อวัยวะเพศ (sex organ) ในกุ้งเพศผู้มีพีเทสมา (petasma) อยู่บริเวณรยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 1 ส่วนในกุ้งเพศเมียมีทีไลกัม (thelycum) อยู่บริเวณด้านท้องระหว่างขาเดินคู่ที่ 4-5 (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2550)

ลักษณะทางกายภาพ

กุ้งขาวมีลักษณะภายนอกมี ลำตัวมี 6 – 8 ปล้อง หน้าอกใหญ่ ส่วนหัวมีกรียาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก หัวสั้น กรีสูง ปลายแคบมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 หยัก ด้านล่างมี 1-2 หยัก ส่วนบนของกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกส่วนหัวมีสีขาวอมชมพูแดง ขามีสีขาว มีหนวดสีแดง 2 คู่ สั้นและยาว ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดง แพนหางมี 4 ใบ และ 1 กรี ขนาดโตเต็มที่วัดจากกรีที่หัวสุดถึงปลายกรี ยาวประมาณ 9 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 120 กรัม (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, 2549)

ลักษณะอุปนิสัย

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่มีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมได้ดี โดยเฉพาะสามารถปรับตัวในช่วงความเค็มกว้างตั้งแต่ 0-35 ppt. ความเค็มที่เหมาะสมระหว่าง 10-30 ppt. ปรับตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 24-32 องศาเซลเซียส แต่จะเหมาะสมที่สุดระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตดี ลอกคราบบ่อยจึงต้องการแร่ธาตุสูง โดยเฉพาะแมกนีเซียมและแคลเซียม กุ้งขาวเคลื่อนตัวได้เร็ว ว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลา จึงต้องการออกซิเจนค่อนข้างสูง มีนิสัยก้าวร้าวและทำร้ายกุ้งตัวอื่น กินอาหารได้หลายชนิดที่มีอยู่ในธรรมชาติในทุกระดับความลึก (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, 2549)

การสืบพันธุ์

ในการผสมพันธุ์ กุ้งขาวจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน หลังจากมีการลอกครอบของตัวเมียจะมีการเกี้ยวพาราสีและผสมพันธุ์กัน ในธรรมชาติแม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมที่จะวางไข่นั้นจะสังเกตได้จากจะเห็นรังไข่ เป็นลำทึบมีสีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัว ตั้งแต่บริเวณหลังไปจรดหางและตรงบริเวณด้านข้างของลำตัว ตรงปล้องที่ 1-2 จะเห็นรังไข่แผ่ออกไปเป็นหยัก ๆ โค้งลงมาทางด้านข้างของลำตัวทั้งสองข้างโดยมีพฤติกรรมในการผสมพันธุ์แบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 ตัวเมียจะว่ายน้ำขนานไปกับตัวผู้ ตัวเมียจะว่ายน้ำสูงกว่าประมาณ 30-40 เซนติเมตร แล้วว่ายวกกลับไปกลับมาสลับกับการหยุดพักที่พื้นเป็นระยะ ๆ มักจะมีตัวผู้ว่ายไล่ตามหลายตัว แต่จะมีเพียงตัวเดียวที่สามารถว่ายน้ำเข้ามาขนานช้อนอยู่ด้านล่างของตัวเมียพอดี แล้วตัวเมียจะค่อย ๆ ใช้ขาเดินโอบรัดที่ส่วนหัว (carapace) ของตัวผู้ ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที ถ้าตัวผู้สามารถจัดตำแหน่งได้เหมาะสม ถ้ายังจัดตำแหน่งไม่เหมาะสมหรือมีการหยุดพักนานอาจใช้เวลานานมากกว่าหนึ่งชั่วโมง

ระยะที่ 2 ตัวผู้จะพลิกตัวค่อย ๆ หงายขึ้นมาติดตัวเมีย พอทั้งคู่ประกบกันได้ตัวผู้จะแนบส่วนต่อของอกกับท้องเข้ากับส่วนนอกด้านล่างของตัวเมีย ซึ่งจะทำให้ตัวผู้ตัวอื่นหมดโอกาสในการเข้าทำการผสมพันธุ์กับตัวเมียในจังหวะนี้ แต่ถ้าในระยะนี้ตัวผู้ยังเข้าทำได้ไม่สำเร็จ ตัวผู้จะกลับมาอยู่ในท่าคว่ำ แล้วจะพยายามว่ายน้ำขนานกับตัวเมียเพื่อสร้างโอกาสใหม่อีกครั้ง

ระยะที่ 3 ตัวผู้จะทำตัวเกือบตั้งฉากกับตัวเมีย หลังจากจังหวะที่ประกบตัวได้แล้ว ตัวผู้จะใช้ขาเดินคู่ที่ 5 เขี่ยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (petasma) ซึ่งเห็นง่ายอยู่ด้านข้างเป็นคู่ ลักษณะคล้ายตะขอ อยู่ที่ขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นอวัยวะที่ช่วยในการปล่อยน้ำเชื้อแล้วจับ petasma ใส่ไปที่ thelyeum อวัยวะของเพศเมีย ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่น รูปคล้ายผีเสื้อกลางปีก มีรูเปิดอยู่ตรงกลางยาวลงไปเป็นร่องเหมือนรังกระดุมเสื้อเชิ้ด อยู่ตรงกลางระหว่างขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 กับขาเดินคูที่ 5 ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีไว้สำหรับเก็บน้ำเชื้อของกุ้งตัวผู้ ภายหลังการเกาะติดแน่นมากเหมือนทากาวแล้วตัวผู้จะโค้งรอบตัวเมีย แล้วกระตุกหัวและหางเป็นจังหวะอย่างต่อเนื่องเพื่อบีบให้น้ำเชื้อออกมา ตัวเมียจะเก็บน้ำเชื้อเข้าไปแล้วปล่อยไข่เลยซึ่งในกุ้งขาวนี้ไข่ของกุ้งขาวจะอยู่ข้างใน ส่วนของน้ำเชื้อที่เข้าไปจะอยู่ด้านนอก ซึ่งปากรูของ thelycum ต้องเปิดก่อนถึงจะเก็บน้ำเชื้อที่ได้รับมา ทำให้ปริมาณของเชื้อตัวผู้ที่เข้าไปปฏิสนธิกับไข่เป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ จึงทำให้โอกาสในการได้ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วเจริญต่อไปเป็นตัวอ่อนน้อยกว่ากรณีของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย หลังจากนั้นจึงค่อยแยกตัวออกจากกันแล้วว่ายน้ำออกไปในเวลา 2-3 วินาที ซึ่งรวมเวลาทั้งสิ้นในการผสมพันธุ์ทั้งหมดประมาณ 1-3 ชั่วโมง แล้วแม่กุ้งทำการปล่อยไข่ขณะที่ลดความเร็วการว่ายน้ำลงอย่าง

ช้า ๆ ออกทางช่องเปิดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 45-60 วินาที การวางไข่นี้ใช้เวลา 3-5 นาที ถ้ากุ้งวางไข่จะสามารถสังเกตเห็นคราบไขมันลอยอยู่บริเวณใกล้เคียง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545)

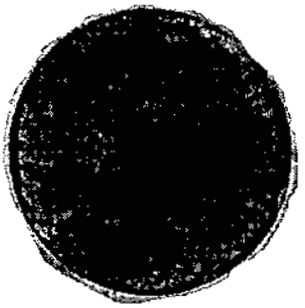
พัฒนาการของตัวอ่อน (Larval development)

1. นอเพียส (nauplius) มีขนาด 0.1-0.3 มิลลิเมตร ลักษณะทั่วไปของตัวอ่อนระยะนี้คือ มีรูปร่างคล้ายแพร์ฝรั่ง (pear shaped) ส่วนหัวและลำตัวไม่แยกออกจากกัน ลำตัวยังไม่แบ่งเป็นปล้อง ส่วนหัวมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหาง ส่วนหางแยกออกเป็นหนาม 1 คู่ยาวเท่ากัน ยื่นออกไปทางด้านท้ายของลำตัว มีรยางค์ 3 คู่ ได้แก่ หนวดคู่ที่ 1 มีลักษณะเป็นแขนงเดียว (uniramous) หนวดคู่ที่ 2 มีลักษณะแยกออกเป็น 2 แขนง (biramous) แขนงที่เป็นเอกโซโพไดต์มีความยาวกว่าเอนโดโพไดต์ สำหรับรยางค์คู่สุดท้ายคือ แมนดิเบิล ลักษระแยกเป็น 2 แขนง แต่มีลักษณะสั้น ๆ รยางค์ทั้ง 3 คู่นี้ทำหน้าที่ว่ายน้ำ พบตาเดียว 1 อัน (median eye) อยู่ระหว่างโคนหนวดคู่ที่ 1 ซึ่งมีชื่อเรียกว่า ตานอเพียส (nauplius eye) ระยะนี้ไม่กินอาหารจากภายนอก เนื่องจากมีไข่แดง (yolk) ติดอยู่ประมาณ 1-2 วัน

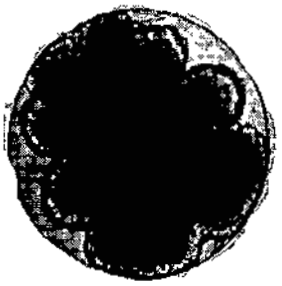
2. โปรโตซูเอีย (protozoea) มีขนาด 1.4-2.3 มิลลิเมตร เป็นตัวอ่อนที่พัฒนามาจากระยะนอเพียส ลำตัวเริ่มยาวขึ้น เริ่มแบ่งเป็นปล้อง ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัว อก มีคาราเปซคลุมถึงบริเวณปล้องที่ 2 ของลำตัว ในระยะแรกยังคงมีนอเพียส หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดรูปหายไป และมีตาประกอบมาแทนที่ ส่วนปลายสุดของลำตัวซึ่งเป็นส่วนหางจะแยกออกเป็น 2 แฉก (furca) ปลายของระยะนี้จะเริ่มกินแพลงก์ตอนสัตว์

3. ไมซิส (mysis) มีขนาด 2.9-4.0 มิลลิเมตร จะพบการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดคือ ขาเดินหรือรยางค์ส่วนอก 5 คู่สุดท้ายมีลักษณะ 2 แขนงชัดเจน ทำหน้าที่ในการเคลื่อน ลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้น หลังจากนั้นจะมีการลอกคราบไปเป็นระยะโพสต์ลาวา ในระยะนี้จะกินทั้งแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

4. โพสต์ลาวา (postlarva) มีขนาดประมาณ 3.5-4.7 มิลลิเมตร ระยะนี้สัตว์จะมีรยางค์ครบ และสามารถทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ส่วนมากกินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร เริ่มกินสัตว์ที่ตายแล้วเนื่องจากวัยอ่อนระยะนี้ เตรียมที่จะปรับตัวอาศัยบริเวณผิวดิน (ธนิษฐา ทรรพนันทน์, 2550)



ภาพที่ 2 ระยะคลีเวจหรือ 2-3 ชั่วโมงหลังการวางไข่ในน้ำทะเลอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3 ระยะบลาสตูลาหรือ 6-7 ชั่วโมงหลังการวางไข่ในน้ำทะเลอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4 ระยะแกสตรูลาหรือ 10-11 ชั่วโมงหลังการวางไข่ในน้ำทะเลอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

การพัฒนาของไข่

1. ระยะคลีเวจ (cleavage stage) ลักษณะภายนอกไข่มีสีเหลืองนวล ไข่มีรูปร่างกลมรีอ่อนนุ่ม ภายในมีไข่แดงบรรจุอยู่เต็มและมีการแบ่งเซลล์ (รูปที่ 2)

2. ระยะบลาสตูลา (blastula stage) ไข่มีรูปร่างกลมรี ผิวตึง เห็นรอยแบ่งภายในเซลล์ไข่จำนวนมาก มีปริมาณของไข่แดงเต็มเซลล์ (รูปที่ 3)

3. ระยะแกสตรูลา (gastrula stage) ลักษณะภายนอกไข่มีสีส้ม ภายในไข่มีการคอดเว้าของเซลล์ไข่ ทำให้เกิดช่องว่าง (blastocoel) ภายในถุงไข่ (รูปที่ 4)

4. ระยะเกิดจุดตาและเม็ดสี (eye-spot and pigmentation stage) ลักษณะภายนอกจะเห็นเป็นสีน้ำตาล ภายในไข่มองเห็นเป็นโครงสร้าง (outline) ของตัวอ่อนและมีจุดสีแดงเล็ก ๆ รูปร่างเป็นเสี้ยว 2 จุด เป็นจุดสีตา (eye pigment) ของตัวอ่อน หลังจากนั้นเม็ดสี (pigment) จะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของการพัฒนาของไข่

5. ระยะหัวใจเต้น (heart-beating stage) ระยะนี้ไข่มีสีเทาดำและขนาดใหญ่ขึ้น มีการเต้นของหัวใจของตัวอ่อน ในช่วงแรกจะมีการเต้นอย่างช้า ๆ และช่วงท้ายจะเห็นการเต้นของหัวใจชัดเจนและเร็วขึ้น ส่วนตาจะมีขนาดใหญ่เห็นเป็นสีดำชัดเจน สามารถมองเห็นเป็นตัวอ่อนภายในได้ชัดเจน มีปริมาณของไข่แดง 1/3 ของปริมาตรถุงไข่ (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2550)

ลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศของกุ้ง

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เรียกว่า พีแทสมา (petasma) ซึ่งเป็นส่วนของเอนโดพอด (endopod) ของรยางค์ว่ายน้ำคู่ที่1 มาเชื่อมติดกันโดยโครงสร้างคล้ายตะขอขนาดเล็ก มีเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่าสเปิร์ม มักมีรูปร่างกลม (minute globular) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 μ มีหางค่อนข้างสั้นและหนา เคลื่อนที่ไม่ได้

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเรียกว่า ทีไลกัม (thelycum) ตั้งอยู่ระหว่างขาเดินคู่ที่ 5 แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. ทีไลกัมแบบปิด (closed thelycum) มีแผ่นปิดอยู่ ซึ่งประกอบด้วยแผ่นด้านหน้า (anterior plate) 1 อัน และแผ่นด้านข้าง (lateral plate) 1 คู่ กุ้งเพศเมียต้องผ่านการลอกคราบก่อนที่จะรับสเปิร์มจากตัวผู้ โดยกุ้งเพศผู้จะนำถุงเสปิร์ม (spermatophore) สอดเข้าไปในช่องที่อยู่ระหว่างแผ่นด้านข้างทั้งสองขณะที่กุ้งเพศเมียผ่านการลอกคราบใหม่ ๆ และเปลือกยังคงนิ่มอยู่ ดังนั้นจะพบถุงเสปิร์มเก็บอยู่ในเพศเมียระยะหนึ่ง ก่อนที่เพศเมียจะมีการปล่อยไข่ออกมา กุ้งที่มีทีไลกัมแบบเปิดได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งกุลาลาย (*Penaeus semisulcatus*) กุ้งแชบ๊วย (*Feneropenaeus merguiensis*) กุ้งขาวจีน (*Feneropenaeus chinensis*) กุ้งขาวอินเดีย (*Feneropenaeus indicus*) กุ้งเหลืองหางฟ้า (*Melicertus latisulcatus*) และกุ้งญี่ปุ่น (*Marsupenaeus japonicus*) เป็นต้น

2. ทีไลกัมแบบเปิด (open thelycum) ไม่มีแผ่นปิดอยู่ กุ้งเพศเมียต้องผ่านการลอกคราบก่อนรับเสปิร์มจากเพศผู้ โดยเพศผู้จะนำถุงเสปิร์ม (spermatophore) วางไว้บนด้านบนของทีไลกัมของกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะปกติ ทำให้มองเห็นเหมือนมีก้อนสีขาวติดอยู่บริเวณทีไลกัม นั่นหมายถึงกุ้งเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์เรียบร้อยแล้วและพร้อมที่จะปล่อยไข่ลงสู่ทะเลทันทีที่

ไข่สุก กุ้งที่มีทีไลกัมแบบเปิดได้แก่ กุ้งขาวแวนนาไม (*Liopenaeus vannamei*) และกุ้งแชบ๊วยสีน้ำเงิน (*Liopenaeus stylirostris*) (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล, 2547)

วิธีการนับไข่

การนับไข่มีหลายวิธี วิธีที่ได้ผลถูกต้องตรงกับความเป็นจริงซึ่งน่าจะเป็นการนับไข่ทั้งหมดที่มีอยู่ (actual count) แต่วิธีนี้มีความยุ่งยากและใช้เวลามากจนบางครั้งไม่สามารถกระทำได้ ต้องใช้วิธีนับโดยประมาณ (approximate) แต่ควรทดสอบผลการประมาณแต่ละวิธี โดยนำไข่มาหนึ่งชุด นับจำนวนไข่ทั้งหมดในชุด ใช้วิธีต่าง ๆ ประมาณไข่ทั้งหมดในชุดโดยการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม (random) พร้อมทั้งคำนวณหาช่วงความเชื่อมั่นเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมได้ผลที่ถูกต้องซึ่งมีความเที่ยง (accuracy) แม่นยำ (precision) สูง วิธีการที่ได้ผลแม่นยำกว่าวิธีอื่น คือ วิธีการนับไข่ทั้งหมด (actual count method) คือนับไข่ทุกฟองที่มีอยู่ในรังไข่หรือแต่ละชุดที่รวบรวมได้ หากไข่มีปริมาณมากจะทำให้มีความยุ่งยากและใช้เวลามาก (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2550)

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการฟัก

1. การบริโภคออกซิเจน เมื่อไข่ปลาเจริญขึ้นความต้องการออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ การบริโภคออกซิเจน หรือการหายใจ มีระบบของการศึกษาอยู่หลายระบบได้แก่

1.1 ระบบปิดสนิท (closed chamber) เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดในการจัดทำระบบ มีข้อดีเฉพาะการวัดการบริโภคออกซิเจนในช่วงสั้น ๆ เท่านั้น เนื่องจากระบบนี้ มีข้อเสียที่สำคัญคือการมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจำกัด ดังนั้น เมื่อทดลองไปได้ระยะหนึ่งและมีการปล่อยของเสียเกิดขึ้น ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะลดลง สัตว์จะเกิดความเครียดขึ้น ทำให้การบริโภคออกซิเจนมีค่าที่ผิดพลาดไปจากที่ควรจะเป็น โดยเฉพาะสัตว์ในกลุ่มหอยฝาเดียวเกือบทุกชนิด ดังที่ Bayne and Newell (1973) รายงานว่า ในสภาวะที่มีออกซิเจนละลายน้ำต่ำ หรือมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความเค็ม หรือมีการปนเปื้อนของสารเคมีบางชนิด หอยฝาเดียวจะปิดฝาเพื่อลดอัตราการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (acrobic respiration) แต่จะใช้การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anacrobic respiration) แทน และการเผาผลาญพลังงานจะเป็นไปในลักษณะ anaerobic oxidation โดยใช้แหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตที่สะสมในร่างกาย

1.2 ระบบเปิด (open system) เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาภาคสนาม เนื่องจากการใช้ระบบนี้มักจะเป็นการวัดการถ่ายเทพลังงาน (energy flow) ของทั้งระบบนิเวศน์

มากกว่าจะใช้วัดในสัตว์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ และจะต้องมีอุปกรณ์ในการวัดเป็นพิเศษเช่น D.O. meter และมีการติดตามผลตลอด 24 ชั่วโมง

1.3 ระบบกึ่งปิด (semi-closed system) เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปและสามารถจัดการทดลองได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้หลักการควบคุมการไหลของน้ำให้เป็นระบบน้ำไหลผ่านตลอด ในระบบนี้จะคำนวณอัตราการบริโภคออกซิเจนของสัตว์ทดลอง ได้จากค่าความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ทางน้ำไหลเข้าและไหลออก โดยทราบอัตราการไหลของน้ำที่คงที่ตลอดการทดลอง วิธีนี้จะเป็นผลดีต่อสัตว์ทดลองในแง่ของการลดความเครียดเนื่องจากการขาดออกซิเจน (ธนิษฐา ทรรพนันทน์, 2543)

2. ความสมบูรณ์ของพันธุ์ หมายถึง ความสมบูรณ์ของไข่และเสปิร์ม ต้องได้มาจากพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรง มีสุขภาพดี ปลอดโรค และอายุของพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม รวมถึงอาหารที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ (สมบุญ กาละพงศ์, 2545)

3. อุณหภูมิหรือความร้อน ที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดอัตราการฟักที่ดี เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากต่อระยะเวลาฟักของไข่ปลา เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นไข่จะฟักเป็นตัวเร็วขึ้น และในทางตรงกันข้ามเมื่ออุณหภูมิลดลง ไข่ปลาที่ฟักเป็นตัวช้าลงดังรายงานการวิจัยดังต่อไปนี้

Arul (1991) ได้กล่าวถึงการทดลองเพาะฟักไข่ปลาช่อน พบว่าตัวอ่อนของปลาช่อนใช้เวลาฟักเป็นตัว 56, 48, 36 และ 30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20, 24, 28 และ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่ออนุบาลลูกปลาช่อนที่ 32 องศาเซลเซียส ลูกปลาจะใช้อาหารในถุงไข่แดงหมดใน 102 ชั่วโมง เร็วกว่าเมื่อทดลองอนุบาลที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลา 156 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามไข่ปลาจะเจริญได้ในอุณหภูมิช่วงหนึ่งเท่านั้น เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงดังกล่าวจะมีผลให้ลูกปลาพิการมากขึ้น และอัตราการฟักจะต่ำลง

Vuthiphandchai et al. (2005) ได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการฟักของไข่กุ้งกุลาดำ ที่อุณหภูมิ 6, 11, 16, 21 และ 25 องศาเซลเซียส นาน 30, 60, 90, 120 และ 150 นาทีพบว่า ไข่ที่มีการการพัฒนาในระยะสุดท้าย (late-stage) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการฟักของไข่กุ้งกุลาดำมากกว่าอัตราการฟักของไข่กุ้งที่อยู่ในการพัฒนาระยะแรก (early-stage) และระยะกลาง (mid-stage)

Alfaro et al. (2001) ได้ทำการศึกษาถึงผลของความเย็น ที่มีต่อไข่กุ้งและนอเพียส ของกุ้ง *Penaeus stylirostris* และ *Trachypenaeus byrdi* สามารถทนต่อความเย็นได้ที่ 10 องศาเซลเซียส และจะความคงทนน้อยที่ 0 องศาเซลเซียส

Kang and Sheng (2005) ได้ทำการศึกษาผลของความเย็นที่มีต่อไข่ของตั๊กแตน *Locusta migratoria* โดยใช้ไข่ 3 ระยะของแต่ละการพัฒนาตัวอ่อน (early, mid และ late-stage)

โดยใช้อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ตัวอ่อนในระยะแรก (early-stage) มีอัตราการฟักน้อยกว่าระยะการพัฒนาอื่น ๆ

4. ปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายประการก็มีอิทธิพลต่อการเจริญของไข่ อาทิ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระ, ปริมาณไนโตรเจนในน้ำ แสง ฯลฯ แต่ปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลเพียงเล็กน้อย (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531) ต่ออัตราการฟักของไข่กุ้งขาว

วิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation)

การแช่แข็ง คือ การลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำที่เป็นของเหลวกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง ในการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำทำได้โดยการลดอุณหภูมิลงและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196°C เมื่อมีการลดอุณหภูมิลงต่ำถึง 0°C หรือต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย (-0.5°C) ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว ดังนั้นของเหลวรอบเซลล์จะอยู่ในสภาพที่เย็นจัด ตามปกติเซลล์จะคงอยู่ในสภาพเย็นจัดได้นานต่อไป ขณะที่ของเหลวรอบ ๆ เซลล์เริ่มมีเกล็ดน้ำแข็งหรืออีกนัยหนึ่งก็คือ การเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์เกิดขึ้นช้ากว่าการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในของเหลวรอบ ๆ เซลล์

โดยทั่วไปเซลล์ประกอบด้วย น้ำ ออร์แกเนลล์ สารละลายเกลือ น้ำตาล โปรตีนและลิปิด โดยเซลล์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ยอมให้โมเลกุลเล็ก ๆ ผ่านน้ำทั้งน้ำเข้าออกได้ แต่โมเลกุลใหญ่ ๆ ไม่สามารถที่จะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปได้ ฉะนั้นโดยธรรมชาติแล้วน้ำมีแนวโน้มที่จะเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อคงสภาพความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ให้เท่ากัน ความเข้มข้นของตัวถูกละลายนี้คือค่า osmolality ในเซลล์ทั่ว ๆไปมีค่า 280-310 mOSm/kg. (Blaisdell et al., 2000) จากองค์ประกอบของเซลล์นี้เมื่อทำการแช่แข็งลดอุณหภูมิลงต่ำจนถึง 0°C ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว เนื่องจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์มีสภาพเป็นสารละลาย จึงทำให้อุณหภูมิจุดเยือกแข็งต่ำกว่า 0°C ในขณะที่ลดอุณหภูมิลงไปเรื่อย ๆ ของเหลวรอบ ๆ เซลล์จะเกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นมาก่อนที่จะเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ จากปรากฏการณ์นี้ทำให้ของเหลวรอบ ๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้เกิดแรงดันออสโมติก ส่งผลให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์เพื่อปรับสมดุลให้สารละลายทั้งสองด้านมีความเข้มข้นเท่ากัน จึงส่งผลให้เซลล์หดตัวและ ของเหลวภายในเซลล์จะมีความเข้มข้นสูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ผลเสียที่เกิดขึ้นดังกล่าวมีมากน้อยขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิว สภาพการยอมให้น้ำผ่านเข้าออกได้ของผนังเซลล์ (permeability) ตามหลักการแช่แข็งนั้นการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและเหมาะสมจะสามารถลดผลเสียดังกล่าวได้ เนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะทำให้น้ำภายใน

เซลล์ไหลออกจากเซลล์ไม่ทัน อย่างไรก็ตามการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไปจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystallization) ขึ้นภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เช่นกัน โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่ออยู่ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ มีดังนี้ ช่วงอุณหภูมิ 0°C ถึง 40°C จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH สารละลาย ปริมาตรของเซลล์ ช่วงอุณหภูมิ 0°C - 130°C จะมีการเกิดเกล็ดน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เห็นได้ว่าเซลล์ที่ทำการแช่แข็งได้รับผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมในการนำเซลล์มาแช่แข็งจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการมีชีวิตของเซลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant)

Cryoprotectant เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง (freezing) และการละลาย (thawing) เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ จำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Intracellular cryoprotectant) เช่น DMSO, methanol, propylene glycol, acetamide, formamide, glycerol, ethylene glycol และ ethanol เป็นต้น สารชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยที่เมื่อใส่สารป้องกันการแข็งตัวชนิดนี้มันจะแทรกเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ ทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์ก่อนนำไปลดอุณหภูมิ ช่วยควบคุมการผันแปรของความเข้มข้นภายใน และภายนอกเซลล์ไม่ให้เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป ควบคุมการดึงน้ำออกจากเซลล์ให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง และสัมพันธ์กับการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ให้ลดเหลี่ยมมุมลงเพื่อลดอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ (pickett, 1984) ช่วยลดอุณหภูมิที่จะเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ให้ต่ำถึง -40°C (Friedler et al., 1988) และป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายโดยเกล็ดน้ำแข็ง (Seidel, 1984) สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ถ้าจะพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ alcohol มีอัตราการแพร่สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ DMSO และ glycerol ตามลำดับ สารเคมีกลุ่มนี้มักเป็นพิษทำลายเซลล์ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์

2. ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular cryoprotectant) เช่น sucrose, trehalose, dextrans, manitol, เป็นต้น สารชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีขนาดใหญ่ ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้จึงทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าชนิดแรก (0.01-0.2 M) และยังมีความเป็นพิษน้อยกว่าด้วย (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystall) ในระหว่างการลดอุณหภูมิ ทำให้เซลล์ไม่ได้รับอันตราย และมีชีวิตรอด มีงานวิจัยจำนวนมากสนับสนุนถึงผลของชนิดไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความสำเร็จในการแช่แข็งสัตว์หลายชนิด ดังเช่น

Vuthiphandchai et al. (2005) ได้ทำการศึกษาถึงผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์และผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อไข่ของกุ้งกุลาดำโดยใช้ DMSO, methanol, acetamide, formamide, glycerol, ethylene glycol, sucrose และ ethanol ใน 4 ระดับความเข้มข้น คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ที่ระยะเวลา 10 และ 20 นาที พบว่าการทนต่อความเป็นพิษของตัวอ่อนกุ้งกุลาดำจะแปรผันตามระยะของตัวอ่อน โดยไข่ของกุ้งกุลาดำระยะสุดท้าย (gastrula stage) จะมีความคงทนต่อความเป็นพิษของสารไคโอโพเทคแทนท์มากที่สุดและยังพบว่า DMSO, acetamide, glycerol และ sucrose มีความเป็นพิษต่ำกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์อื่น

Alfaro et al. (2001) ได้ทำการศึกษาถึงผลของความเย็น, สารไครโอโพรเทคแทนท์ และ ความเค็ม ที่มีต่อเอมบริโอและนอเพียสของกุ้ง *Penaeus stylirostris* และ *Trachypenaeus byrdi* โดยใช้ สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, sucrose, methanol และ glycerol พบว่าเอมบริโอที่ใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ในระยะ morula และ advance embryos (setae development stage) โดยที่ 2 โมลของ methanol ไม่มีความเป็นพิษ (non-toxic) ต่อการพัฒนาของเอมบริโอ ส่วน 0.5 โมล DMSO, 0.25 โมล glycerol และ sucrose มีความเป็นพิษที่มีผลต่อการพัฒนาของเอมบริโอรองลงมาตามลำดับ และระยะ morula สามารถคงทนต่อความเค็มได้ถึง 55 ppt

Dong et al. (2004) ได้ทำการศึกษาถึงผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิดที่มีผลต่อตัวอ่อนกุ้งขาว ได้แก่ DMSO, methanol, ethylene glycol และ propylene glycol ที่ระดับสามความเข้มข้นคือ 10 ,20 และ 30% ในระยะเวลา 5, 10, 15, 120, 25, 30 และ 60 นาที จากการศึกษาพบว่า 5% ethylene glycol มีความเป็นพิษต่ำสุด ส่วน methanol มีความเป็นพิษต่ำกว่า DMSO และ propylene glycol ที่มีความเป็นพิษไม่แตกต่างกัน

สุพรรณษา สุขประเสริฐ (2548) ได้ทำการศึกษาผลของ DMSO, methanol, formamide, glycerol และ trehalose ที่มีผลต่อเสปิร์มกุ้งขาวใน 4 ระดับความเข้มข้น คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ที่ระยะเวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่า ระดับของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ 5% มีความเป็นพิษจากน้อยที่สุดไปมากที่สุด คือ DMSO< glycerol< formamide< methanol< trehalose ตามลำดับ

Kang et al. (2005) ได้ทำการศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อไข่ของ Locusta migratoria โดยใช้ไข่ 3 ระยะของแต่ละการพัฒนาตัวอ่อน (early, mid และ late-stage)

โดยใช้สารจำนวน 5 ชนิด myo-inositol, trehalose, glycerol, mannitol และ sorbitol พบว่า การพัฒนาระยะแรก (early-stage) ในสารทุกชนิดมีความคงทนต่อความเป็นพิษได้น้อยกว่าระยะอื่น สุภาพรรณ ชำนาญกิจ (2545) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ป้องกันไม่ให้เกิดเซลล์แตก พบว่า sucrose 2.5% รวมกับ DMSO 2.5% เป็นสารที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนกุ้งกุลาดำ

Renard (1991) ศึกษาในตัวอ่อนหอยนางรม ในระยะที่มีการพัฒนา 2-4 เซลล์ เพื่อดูอัตราการรอดของเอมบริโอ ในน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และที่อุณหภูมิ -10 และ - 20 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ – 10 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดของเอมบริโอหอยนางรมมากกว่า – 20 องศาเซลเซียส

Gwo and Lin (1998) ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของสารไครโอโพเทคแทนท์จำนวน 5 ชนิด คือ DMSO, glycerol, methanol, ethylene glycol และ propylene glycol ที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30% ในระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที ที่มีผลต่อเอมบริโอ 3 ระยะ (morula, blastocele และ prenauplius) นอเพียส และ ระยะซูเอียในกุ้งชนิด *P. japonicus* พบว่า 5% และ 10% methanol ในเวลา 10 และ 20 นาที ให้ผลดีมากกว่าสารชนิดอื่น และ ไข่หรือตัวอ่อนในระยะแรกเริ่มของการพัฒนาจะมีความคงทนต่อความเป็นพิษได้น้อยกว่าระยะท้ายของการพัฒนา

Kasai and Mukaida (2004) ได้มีการทดลองเก็บรักษาตัวอ่อนแบบการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้นสูง (vitrification) ในตัวอ่อนของมนุษย์ไม่ให้มีการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง พบว่าหากไม่ได้นำตัวอ่อนมาแช่แข็ง จะทำการเก็บรักษาตัวอ่อนได้ในระยะเวลาสั้นกว่าการนำมาแช่แข็ง ซึ่งการทำแบบ vitrification จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารไครโอโพเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ เพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จากเกล็ดน้ำแข็ง

Newton and Subramoniam (1996) ได้ศึกษาผลของสารไครโอโพเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อเอมบริโอกุ้งทะเล คือ glycerol, formamide, actamide, methanol, propylene glycol, DMSO และ ethylene glycol ที่อุณหภูมิแตกต่างกันที่ 15 และ 28 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ที่ 15 นาที พบว่าเอมบริโอของกุ้งมีความคงทนต่อสาร methanol และ DMSO ที่ 28 องศาเซลเซียสดีกว่าสารชนิดอื่น

กลไกการออกฤทธิ์ของสารไครโอโพรเทคแทนท์

ไครโอโพรเทคแทนท์ต่าง ๆ นั้น จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ไม่ว่าจะเป็นผลกระทบต่อแรงดันไอ จุดเดือด จุดเยือกแข็งและแรงดันออสโมติก ซึ่งผลกระทบที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการรอดชีวิตของเซลล์ได้แก่

1. จุดเยือกแข็ง เนื่องจากโดยปกติแล้วของเหลวภายในร่างกาย และภายในเซลล์จะมีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าน้ำซึ่งจะแข็งตัวที่ 0°C และเมื่อมีการเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปจะยิ่งทำให้จุดเยือกแข็งต่ำลง เป็นเหตุให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวเร็วกว่าภายนอก ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกสู่ภายนอกเซลล์ และการที่น้ำเหลืออยู่ภายในเซลล์น้อย ย่อมทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์น้อยด้วย เห็นได้ว่าสารไคโอโพเทคแทนท์ช่วยป้องกันเซลล์ โดยทำให้ของเหลวแข็งตัวช้าและน้ำในเซลล์มีน้อยลง

2. แรงดันออสโมติก มีผลกระทบต่อขนาดของเซลล์ และความสมดุลของอิเล็กโทรไลท์ โดยเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของของเหลวทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ เมื่อเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของของเหลวภายในหรือภายนอกเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ผ่านของสารไคโอโพเทคแทนท์เข้าสู่เซลล์ได้มาก น้อย หรือไม่ได้เลย และการแพร่ของสารไคโอโพเทคแทนท์เข้าสู่เซลล์เป็นการไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์ เนื่องมาจากความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนแปลงไป เพราะการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในจะแข็งตัว ทำให้ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ในระหว่างการลดอุณหภูมิได้

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าผลของไครโอโพรเทคแทนท์ต่อจุดเยือกแข็งและแรงดันออสโมติกนี้มีความสำคัญในการช่วยให้เซลล์รอดชีวิตในระหว่างการแช่แข็ง เพราะ

- ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์
- ป้องกันการลดขนาดของเซลล์
- ป้องกันอันตรายเนื่องจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโทรไลท์
- ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์

ความเป็นพิษของสารไคโอโพเทคแทนท์ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของสิ่งมีชีวิต ชนิดและความเข้มข้นของสารไคโอโพเทคแทนท์ อุณหภูมิ ช่วงการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต รวมถึงระยะเวลาในการสัมผัสสารของเซลล์ เป็นต้น (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)
การศึกษาในกุ้งขาวที่สนับสนุนให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมลาลิตี้ในกุ้งขาว ซึ่งสามารถเกิดความเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ไปกระทบ เช่น ความเค็ม ชนิดของแร่ธาตุต่าง ๆ

เป็นต้น ซึ่งก่อนการทำการวิจัย ควรจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับตัวอย่างสัตว์ที่นำมาทดลองด้วย เช่นการวิจัยของ บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ (2551) พบว่าค่าออสโมลาลิตี้ของกุ้งขาวจะมีค่าสูงขึ้นตามระดับความเค็มน้ำที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกุ้งขาวจะแสดงสภาวะ hyperregulation ที่ระดับความเค็มน้ำ 2.8 ppt จนถึงระดับความเค็มน้ำ 22 ppt และมีค่าออสโมลาลิตี้เลือดเท่ากับออสโมลาลิตี้น้ำ (isosmotic point) ที่ระดับความเค็มน้ำ 23 ppt หลังจากนั้นกุ้งขาวจะมีการปรับตัวแบบ hypoosmoregulation ในระดับความเค็มน้ำ 24 ppt จนถึงระดับความเค็มน้ำ 50 ppt โดยสัดส่วนของออสโมลาริตี้ของเลือดกุ้งต่อน้ำทะเลมีค่าสูงที่สุดที่ระดับความเค็มน้ำต่ำ (2.8 ppt) และลดลงอย่างต่อเนื่องในระดับความเค็มน้ำที่สูงขึ้นจนมีค่าสัดส่วนเป็น 7:1 ที่ระดับความเค็มน้ำ 25-50 ppt ดังนั้นถ้ากุ้งขาวมีการเลี้ยงที่ระดับความเค็มสูงกุ้งจะต้องทำการขับแร่ธาตุออกจากร่างกายหรือนำน้ำเข้าสู่ร่างกายเนื่องจากมีค่าสูงเกินกว่าระดับที่กุ้งต้องการ หรือในทางตรงกันข้าม กุ้งต้องนำแร่ธาตุเข้าสู่ร่างกายหรือนำน้ำออกจากร่างกายเนื่องจากมีค่าต่ำกว่าระดับที่กุ้งต้องการ ซึ่งมีพฤติกรรมใกล้เคียงกับกุ้งกุลาดำ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2546) และใกล้เคียงกับปูม้า (บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2547) และปูทะเล (Gilles & Pequeux, 1981) เป็นต้น