บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

อภิปรายผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

จากการทดลองการรวบรวมน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบทุกเดือนเป็นระยะเวลา 1 ปี และการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยนางรมปากจีบ พบว่า สเปิร์มมีความหนาแน่นสูงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งในสภาพธรรมชาตินั้น หอยส่วนใหญ่มักจะมีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล ส่งผลมาถึงการเจริญเติบโตตลอดจนการพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ของพ่อแม่หอยที่นำมาเพาะพันธุ์ ซึ่งในบริเวณจังหวัดชลบุรีก็มีรายงานว่าความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์หอยนางรมปากจีบมีตลอดทั้งปี แต่พบมาก 2 ช่วงเวลา คือ เมษายน- มิถุนายน และ กันยายน--พฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของหอยนางรมปากจีบ (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ ในช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายนพบว่าหอยนางรมปากจีบมีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 25.7 $x10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร และในช่วงเดือนกันยายน พฤศจิกายนมีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 21.4 $x10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความหนาแน่นของสเปิร์มหอยนางรม 2n และ 4n (*Crassostrea gigas*) ที่มีเท่ากับ 2.7±0.5 $x10^{10}$ ต่อกรัมของน้ำหนัก Gonad (Dong et al., 2005) นอกจากนี้ก็มีรายงานว่าหอยนางรม (*C. gigas*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 10-20 $x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Ieroppli et al., 2004) หอยแมลงภู่ (*Perna canaliculus*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 2.0 $x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Smith et al., 2001) หอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 1.5 $x10^{10}$ ตัวต่อมิลลิลิตร (Kawamoto et al., 2007) การตรวจสอบดูความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนมีนาคมของหอยนางรม (*C. commercialis*) จำนวน 20 ตัว พบว่าในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน หอยนางรมส่วนใหญ่มีเนื้อผอมลีบมาก ผนังกระเพาะบางมากและมีสีเขียวคล้ำ มีค่าความสมบูรณ์ (condition index) เฉลี่ย เท่ากับ 8.58% และ 8.51% ตามลำดับ ส่วนในเดือนธันวาคมหอยนางรมส่วนใหญ่มีความสมบูรณ์ขึ้น แต่ยังไม่มีการพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีค่าความสมบูรณ์เฉลี่ย 10.45% สำหรับในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ หอยนางรมมีเนื้อเต่งตึง แต่เมื่อเจาะบริเวณผนังคลุมกระเพาะของหอยนางรม จะพบของเหลวสีครีมเพียงเล็กน้อย ค่าความสมบูรณ์เฉลี่ย 13.01% และ 14.39% ตามลำดับ (สมชาย มั่นอนันต์ทรัพย์, 2526)

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่มีค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม, การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม และ Osmolality ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเวลานอกฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่ พบว่าความหนาแน่นของสเปิร์มลดลง และน้อยที่สุดในช่วงต้นปี อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำทะเล และความเค็ม ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญจากสภาพแวดล้อมภายนอกส่งผลต่อคุณภาพสเปิร์ม เช่น ในการทดลองของ Loosanoff & Davis (1953) พบว่าการเลี้ยงหอยนางรม (*C. virginica*) ที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C ทำให้น้ำเชื้อและไข่เจริญเต็มที่ภายใน 5 วัน และ 3 วัน ในรายงานของ Loosanoff (1937) พบว่าหอยนางรม (*O. edulis*) จะวางไข่ที่อุณหภูมิ 15-16°C หอยนางรม (*C. virginica*) วางไข่ที่อุณหภูมิ 20-21°C ในหอยนางรม (*C. gigas*) วางไข่ที่อุณหภูมิ 25°C และ หอยนางรม (*C. cucullata)* จะวางไข่ที่อุณหภูมิ 26.7-30.6°C เช่นเดียวกับการทดลองของ Nagabhuhanam and Bidarkar (1977) ซึ่งหอยนางรม (*Crassostrea cucullata*) ที่พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงมากขึ้นในเดือนสิงหาคมหอยนางรมจะเริ่มมีกระบวนการ gametogenesis แต่จะไม่มีการผสมพันธุ์ และจะมีความสมบูรณ์เพศที่สุดในเดือนมิถุนายนและเมื่อเข้าสู่ฤดูฝนก็มีจะผสมพันธุ์วางไข่ หลังจากหมดฤดูฝนเมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มสูงขึ้นหอยนางรมก็จะเริ่มมีการสร้างสเปิร์มให้มีความสมบูรณ์เพศอีกครั้ง Loosanoff (1945) พบว่าฤดูกาลวางไข่ของหอยนางรม (*C. virginica*) ในบริเวณ Long Island Sound หอยจะวางไข่ก่อนจะเข้าฤดูหนาว คือ เริ่มตั้งแต่ปลายเดือนมิถุนายนหรือต้นเดือนกรกฎาคม จนถึงปลายเดือนสิงหาคมหรือต้นเดือนกันยายน และเมื่อเข้าฤดูหนาวจะไม่มีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิของน้ำและความเค็มจะมีผลต่อการเริ่มกระบวนการสร้างสเปิร์มซึ่งมีผลให้ความหนาแน่นของสเปิร์มเพิ่มขึ้น ในการทดลองครั้งนี้น้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมีค่า Osmolality เฉลี่ย 666 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในน้ำเชื้อหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) ที่มีค่า Osmolality เฉลี่ย 573±45 mOsm/kg (Paniagua-Chavez et al., 1998) การศึกษากลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่สเปิร์มของหอยนางรม 4n (*C. gigas*) พบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงเมื่อกระตุ้นด้วย artificial seawater (ASW) ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 1000 mOsm/kg แต่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยค่า Osmolality สูงกว่า 1000 mOsm/kg และสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อค่า Osmolality น้อยกว่า 500 mOsm/kg (Dong et al., 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรม (*C. virginica*) ที่เจือจางในสารละลาย HBSS ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 833 mOsm/kg ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 73±3% เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 1 วัน (Paniagua-Chavez et al., 1998) จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้ทราบว่าสเปิร์มหอยนางรมปากจีบจะไม่เคลื่อนที่เมื่อสารละลายที่ใช้กระตุ้นมีค่า Osmolality ต่ำกว่าในน้ำเชื้อ และสเปิร์มจะเคลื่อนที่เมื่อสารละลายมีค่า Osmolality สูงกว่าในน้ำเชื้อ แต่หากค่า Osmolality สูงกว่า 1000 mOsm/kg การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลง

2. การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

2.1 ศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยนางรมปากจีบ

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบแบบแช่เย็นด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ Ca-F HBSS และ Ca-F saline และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าสเปิร์มที่เจือจางน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 72 ชั่วโมง ส่วนน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 12 ชั่วโมง และน้ำเชื้อสดที่ไม่ผสมน้ำยาบัฟเฟอร์มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพียงแค่ 24 ชั่วโมง การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อสดที่ไม่ได้ผสมน้ำยาบัฟเฟอร์สามารถเก็บได้นาน 6-24 ชั่วโมง ก่อนที่สเปิร์มจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล ซึ่งเก็บรักษาได้สั้นกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline เนื่องจากน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline เป็นสารละลายที่ช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ ช่วยให้เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานขึ้น อีกทั้งเป็นการเจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อสะดวกในการปฏิบัติการ น้ำยาเจือจางต้องไม่ส่งผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ เพราะน้ำยา Ca-F saline ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ มีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงกับแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อสด ทำให้สเปิร์มสามารถเก็บรักษาได้ดีกว่าการใช้ Ca-F HBSS ซึ่งมีค่าแรงดันออสโมติกต่ำกว่าที่พบในน้ำเชื้อสด ดังเช่น ในรายงานการศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา salmon พบว่าถูกควบคุมโดยระดับโพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}) และโซเดียม (Na^+) (Alavi & Cosson, 2006) ซึ่งยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น pH, อุณหภูมิ, แร่ธาตุ และความเข้มข้นของสาร metabolite ซึ่งต่างก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Morisawa, 1985) ในปลาทะเลเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ intracellular Ca^{2+} และ K^+ จะไปกระตุ้นให้สเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่ (Krasznai et al., 2003; Alavi & Cosson, 2006) แต่มีการทดลองโดยใช้สารละลาย NaCl แต่ไม่เติม $CaCl_2$ ปรากฏว่าไม่เกิดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในปลา sea-water tilapia แต่เมื่อเติม 1.5-30 mM $CaCl_2$ สเปิร์มจะมีการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์ (Linhart et al., 1999) เห็นได้ว่า แคลเซียม (Ca^{2+}) จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดังนั้นการใช้ Calcium free จึงทำให้สเปิร์มไม่เกิดการเคลื่อนที่แม้ Ca-F saline จะมีค่า Osmolality (702 mOsm/kg) สูงกว่าค่า Osmolality ของน้ำเชื้อสด (666 mOsm/kg) เล็กน้อย แต่จากการวัดค่า Osmolality ของสาร Ca-F HBSS ของการทดลองนี้พบว่ามีค่า Osmolality เพียง 332 mOsm/kg จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกันมากที่จะส่งผลให้สเปิร์มต้องมีการปรับตัวมากตามไปด้วยจากแรงดันออสโมติกที่ต่ำลงถึงครึ่งหนึ่งของสาร Ca-F HBSS เป็นไปได้ที่อาจทำให้เนื้อเยื่อของเซลล์เกิดความเสียหาย จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า Ca-F saline แต่ยังมีการทดลองโดยใช้สาร Ca-F HBSS ที่ได้ผลดีในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยนางรมเช่น การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรม (*C. virginica*) ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า HBSS

ที่มีค่า Osmolality 833 mOsm/ kg มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 73±3% เมื่อเก็บไว้นาน 1 วัน และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงน้อยกว่า 10% เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 4 วัน (Paniagua-Chavez et al., 1998) หรือการศึกษาในน้ำยาบัฟเฟอร์ชนิดอื่น เช่นการทดลองของ Dong et al. (2002) พบว่าสเปิร์มของหอยนางรม 4n (*C. gigas*) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเมื่อแช่เย็นด้วย ASW ที่มีค่า Osmolality 1000 mOsm/ kg (83±14%) เป็นต้น และในการทดลองครั้งนี้ใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:4 ซึ่งการใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาในการแช่เย็นน้ำเชื้อของสัตว์น้ำ มีผลต่อความสำเร็จในการแช่เย็น เช่นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรม (*C. virginica*) ที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:3 ที่เก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยมากกว่า 80% (Paniagua-Chavez et al., 1998) ในขณะที่อัตราตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันคือ 1:5 (Mansour et al., 2004) และในปลา Atlantic halibut คือ 1:5-1:9 ซึ่งทำให้สเปิร์มมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าการใช้อัตราส่วนเจือจางอื่น ๆ ในการเจือจางน้ำเชื้อ (Babiak et al.. 2006)

อย่างไรก็ตามหอยนางรมปากจีบที่ใช้ในการทดลอง เป็นหอยนางรมที่มีขนาดเล็ก ทำให้ได้น้ำเชื้อมีปริมาณน้อย ต้องใช้หอยจำนวนมากเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำเชื้อสดจำนวนมากสำหรับการทดลอง ซึ่งอาจส่งผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลงได้ แม้ว่าจะน้ำเชื้อที่ได้มาไม่มีการปนเปื้อนของน้ำทะเล และของเสียจากหอย จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรม-ปากจีบเป็นระยะเวลานานมากกว่า 3 วัน นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ไม่ได้มีการเติมยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ระหว่างการเก็บแช่เย็น ทำให้อาจมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเมื่อระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อนานขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงหลังการเก็บรักษาแช่เย็น (Aas et al., 1991) การเติมยาปฏิชีวนะระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจะช่วยลดจำนานแบคทีเรียระหว่างแช่เย็นได้ (Scott & Baynes. 1980) จึงน่าจะได้มีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับผลของยาปฏิชีวนะต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบแบบแช่เย็น ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นของสัตว์น้ำเท่าที่มีการรายงานก็ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกัน ความเข้มข้นของสเปิร์ม (Sperm Concentration) ค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality) การปนเปื้อนของแบคทีเรีย (Bacteria contamination) องค์ประกอบของน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender composition) และการให้ออกซิเจนสมทบระหว่างเก็บรักษา (Oxygen supplementation) (Stoss et al.. 1987; Lahnsteiner et al., 1997; Sunitha & Jayaprakas. 1997; Dong et al., 2002) ดังนั้นน้ำเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส หรือการเก็บแบบแช่แข็ง จะต้องเป็นน้ำเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนของน้ำเลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ ซึ่งจะทำให้คุณภาพสเปิร์มลดลง ทำให้สเปิร์มเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำได้ไม่นาน (อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2526)

2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

จากผลการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายในการแช่แข็งน้ำเชื้อของหอยนางรมปากจีบโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F saline ผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ได้แก่ DMSO, Propylene glycol, Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10% และ 15% ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -7°C / min และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 1 วัน พบว่า ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3°C / min โดยใช้ 10% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงที่สุดเท่ากับ 77.78±3.39% ซึ่งในงานวิจัยส่วนใหญ่มีการใช้สารละลาย DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลาดุกอัฟริกัน (Viveiros, So, & Komen, 2000), ปลาเก๋า (Cho, Tsai, & Liao, 1992), ปลากะพง (Ji et al., 2004), หอยนางรม (*Crassostrea gigas*; Usuki, Hamaguchi, & Ishioka, 1999), หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*; Gwo et al., 2002) ซึ่งสาร DMSO เป็นสารที่มีลักษณะเป็นทั้งกลุ่ม hydrophobic (methyl group) และกลุ่ม hydrophilic (sulfoxides group) และมีความสามารถในการซึมผ่านเนื้อเยื่อสูง แต่สาร DMSO จะมีความเป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้นและมีอุณหภูมิที่สูง (Spindlere, Wolkers, & Glasmarcher, 2009) สาร DMSO เมื่อใช้ในความเข้มข้นสูงสามารถช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากการ cryoinjuries แต่จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษที่เพิ่มขึ้นไปยังเซลล์ (Nascimento et al., 2005) แต่ถ้าสาร DMSO มีความเข้มข้นน้อย (2-10%) มีผลทำให้สเปิร์มจับตัวเป็นก้อน และไม่มีการจับตัวเป็นก้อนของสเปิร์มเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 12% (Dong et al., 2005) เนื่องจากสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็นสารที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งระหว่างการลดอุณหภูมิ ซึ่งการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ต่างกันจะทำให้ปริมาณสารซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อปกป้องเซลล์ได้ต่างกัน (He et al., 2004) ส่วนสาร Propylene glycol และ Ethylene glycol เป็นสาร dihydric alcohol (Mandumpal, 2011) ซึ่งการใช้สาร Propylene glycol 15% ในการแช่แข็งหอย Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิ -2.5°C / min พบว่าได้ผลไม่ดีนักโดยมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพียง 22% แต่ก่อนการแช่แข็งเมื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม Propylene glycol 10% มีอัตราการเคลื่อนที่ดีกว่า 15% แต่กลับไม่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งโดยมีเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งไม่ถึง 10% (Paniagua-Chavez et al., 1998) ส่วนการใช้สาร Ethylene glycol ตัวเดียวได้ผลไม่ดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*) แต่เมื่อปรับใช้สาร Polyethylene glycol (2%) ร่วมกับสาร Methanol (6%) กลับได้ผลดีโดยมีอัตราการเคลื่อนที่ถึง 70% (Dong et al., 2005) เห็นได้ว่าสารทั้งสองตัวไม่สามารถรักษาความมีชีวิตของสเปิร์มได้ดีเท่าสาร DMSO ซึ่งระดับความเข้มข้นของสาร DMSO ที่เหมาะสมคือ 10% โดยที่สาร DMSO 5% อาจเป็นความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจึงไม่สามารถป้องกัน

การเกิดผลึกน้ำแข็ง และมีผลทำให้สเปิร์มจับตัวเป็นก้อนในขณะที่ทำการแช่แข็งเซลล์ และระดับที่ความเข้มข้น 15% อาจเป็นระดับที่สูงมากเกินไปจะมีความเป็นพิษต่อสเปิร์ม เนื่องจากผลของแรงดันออสโมติกที่ทำให้เซลล์เหี่ยวจากการสูญเสียน้ำที่มากเกินไปหรืออาจทำให้เซลล์บวมน้ำหลังจากทำการละลาย (Denniston et al., 2000)

การใช้อัตราลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ของเหลวภายนอกเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ ส่งผลให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์ (Denniston et al., 2000) แต่ถ้าใช้อัตราลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว จะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์อย่างรวดเร็ว อาจเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และจะทำให้เซลล์เกิดอันตรายได้ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อของหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C / min ร่วมกับการเติม 0.2 M DMSO ผสมกับ 0.2 M Glucose และ Sucrose ทำให้ลูกหอยระยะ Trochophore มีการพัฒนามาถึงระยะ D-Shaped Larvae ประมาณ 89-91% (Choi & Chang, 2003) เช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิก 2n และ 4n (*Crassostrea gigas*) โดยใช้ 8% DMSO โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -16°C / min พบว่า มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรม 2n 30% และการปฏิสนธิ 96% แต่สเปิร์มหอยนางรม 4n มีการเคลื่อนที่ <10% และการปฏิสนธิ <28% (Dong et al., 2005) และในงานวิจัยของ Hanquet-Dufour et al. (2006) ที่แช่แข็ง Vesicular Cell ของหอยนางรม (*C. gigas*) พบว่า การใช้ 10% Glycerol โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3°C / min มีจำนวนสเปิร์มมีชีวิตสูงถึง 91.5% ส่วนการใช้ 4% DMSO + 4% Glycerol + 4% Ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C / min มีจำนวนสเปิร์มมีชีวิต 84.4% และการศึกษาของ Ieropoli et al. (2004) แช่แข็งสเปิร์มหอยนางรม (*C. gigas*) พบว่าการใช้ 10% Ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -6°C/min มีการพัฒนาหลังการปฏิสนธิถึงระยะ D- Larvae 58.9% ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ขณะทำการแช่แข็ง ซึ่งการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไป จะทำให้เซลล์มีโอกาสเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ทำให้เป็นอันตรายต่อเซลล์และเกิดความเสียหายต่อเซลล์ ซึ่งอาจไม่ได้ผลในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมเช่นในการแช่แข็งน้ำเชื้อของ Yang et al. (2012) ที่แช่แข็งน้ำเชื้อหอย Eastern oyster (*C. virginica*) โดยใช้ Ca-H HBSS กับ DMSO 10% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -20 ถึง 25°C min มีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งเพียง 34 ± 5% เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองนี้และการทดลองในหอยตะโกรมกรามขาวของ ศิริพร คชรัตน์ (2007) ที่ใช้ DMSO 10% ในการแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3°C / min และ -1°C / min ตามลำดับจะมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ที่ 77% ทั้งสองการทดลอง จึงเป็นไปได้ที่สเปิร์มของหอยนางรมไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ลดลงอย่างรวดเร็วได้ อีกทั้งการที่สเปิร์มของหอยนางรมมี

ความเข้มข้นสูงอาจจะทำให้เกิด Acrosomal Reaction ระหว่างแช่แข็ง และการละลาย จึงเกิดการปล่อยพันธะโมเลกุล (Releases the Binding Molecules) ทำให้เซลล์เปลี่ยนจากของเหลวเป็นก้อน (Coagulate Cells) ทำให้โครงสร้างของสเปิร์มบางส่วนถูกทำลาย เช่น อะโครโซม (Acrosome) และส่วนหางแตก (Broken Tails) (Dong et al., 2005) ซึ่งมีผลทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อหอยนางรมลดลง

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบในรอบปี มีคุณภาพดีและสเปิร์มมีความหนาแน่นสูง
2. น้ำเชื้อสด สามารถเก็บรักษาได้นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส
3. น้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F saline มีความเหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบแบบแช่เย็น เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 72 ชั่วโมง
4. อัตราการลดอุณหภูมิ -3°C / min โดยใช้ 10% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดลองใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดออกฤทธิ์ภายในเซลล์ร่วมกับชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์
2. ควรมีการทดลองผสมเทียมเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University