บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในประเทศไทยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณชายฝั่งมีอยู่ทั่วไปในหลายจังหวัดที่มีชายฝั่งทะเล โดยหอยนางรมเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาบริโภคเป็นอาหาร โดยชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงมีอยู่ 2 ชนิด คือ หอยนางรมพันธุ์เล็ก ซึ่งมีชื่อเรียกตามพื้นบ้านว่าหอย-ปากจีบ หอยเจาะ หอยอีรม เป็นต้น ส่วนหอยนางรมอีกชนิด คือ หอยนางรมพันธุ์ใหญ่ ได้แก่หอยตะโกรมกรามขาว และหอยตะโกรมกรามดำ การเลี้ยงหอยนางรมพันธุ์เล็ก พบได้แถบชายฝั่งทะเลของประเทศไทยทางภาคตะวันออก ในจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด สำหรับฝั่งอ่าวไทยด้านจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา ปัตตานีและนราธิวาส จะนิยมการเลี้ยงทั้งหอยนางรมพันธุ์เล็กและพันธุ์ใหญ่ (กรมประมง, 2547) การเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยส่วนใหญ่เลี้ยงกันภายในครอบครัวไม่ได้ทำเป็นธุรกิจใหญ่ และวิธีการเลี้ยงส่วนใหญ่เป็นแบบดั้งเดิม โดยที่ผลผลิตหอยนางรมของประเทศไทยในปี 2552 มีผลผลิตสูงถึง 26,200 ตัน คิดเป็นมูลค่า 614.9 ล้านบาท และลดลงในช่วงปี 2553 และ 2554 เหลือเพียง 10,800 และ 8,400 ตัน คิดเป็นมูลค่า 148.5 และ 198.4 ล้านบาท (กรมประมง, 2554)

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เป็นหอยสองฝาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเนื้อที่มีรสชาติอร่อย ซึ่งสามารถรับประทานสดและนำไปประกอบเป็นอาหารได้อีกหลายชนิด จึงมีผู้บริโภคหอยนางรมกันมาก ในปัจจุบันได้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าแต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ฝรั่งเศส และอเมริกา เป็นต้น จึงทำให้ตลาดหอยนางรมสามารถขยายตัวได้อีก (เปียะบุตรวานิชพงษ์พันธุ์, 2554) ทำให้หอยนางรมมีราคาสูงเมื่อเทียบกับหอยชนิดอื่นๆ หอยนางรมที่นำมาบริโภคเกือบทั้งหมดเป็นหอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยอาศัยธรรมชาติ หอยนางรมปากจีบกินอาหารด้วยการกรองกินพืชน้ำขนาดเล็กที่แขวนลอยในแหล่งน้ำเค็มเป็นอาหารหลัก (กรมประมง, 2547) หอยนางรมปากจีบที่นำมาเลี้ยงนั้น อาศัยลูกหอยที่ได้จากธรรมชาติเป็นหลัก จึงทำให้ประสบปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์หอยนางรมปากจีบที่จะนำมาเลี้ยง เนื่องจากลูกหอยในธรรมชาติมีจำนวนน้อยอันเนื่องมาจากปัญหาทางสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้ส่งผลต่อปริมาณลูกพันธุ์หอยในธรรมชาติ เช่น การตายของหอยนางรม ปัญหาคุณภาพน้ำหรือปัญหาน้ำเสีย รวมทั้งปัญหาที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมชายฝั่งเปลี่ยนแปลงก็มีผลทำให้หอยนางรมมีอัตราการตายสูง (เผดิมศักดิ์

จารยะพันธุ์, บรรจง เทียนส่งรัศมี, วันทนา อยู่สุข และณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์, 2546) แนวทางหนึ่งที่ช่วยในการเพาะขยายพันธุ์หอยนางรมปากจีบได้คือ การนำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมาแช่แข็งแล้วเก็บรักษาไว้นำมาใช้ในภายหลัง ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ได้ และช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนลูกหอยนางรมปากจีบที่ได้จากธรรมชาติ

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งในต่างประเทศประสบความสำเร็จในสัตว์น้ำหลายชนิดและนิยมศึกษาในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด ปลาทะเล เช่น salmon, channel catfish, sea bream เป็นต้น (Satashi, Tetsuo, & Nobuhisa, 2002; Michael & Terrence, 2005; Cabrita et al., 2005) รวมทั้งมีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอย เช่น Pacific oyster, mussel, black-lip pearl oyster เป็นต้น (Sercan et al., 2004; Matteo, Lanqellotti, Masullo, & Sansone, 2009; Hector, Dean, & Paul, 2007) ซึ่งใน *Crassostrea* หลายชนิด พบว่าขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศที่แตกต่างกัน (Galtsoff, 1964) ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงภายในโรงเพาะฟัก วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยทั่วไปทำได้โดย การนำน้ำเชื้อมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำไม่ว่าจะเก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็ง ซึ่งการเก็บรักษาแบบแช่เย็นทำได้โดยการเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ก็สามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ออกไปได้นานขึ้นหลายอาทิตย์ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ยังมีการศึกษาค่อนข้างจำกัดในประเทศไทย ข้อดีของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ คือ ทำให้ง่ายแก่การจัดการผสมเทียม โดยน้ำเชื้อจะได้ถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ช่วงเวลาหนึ่ง สามารถนำมาใช้ มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถลำเลียงน้ำเชื้อแช่เย็นไปใช้ประโยชน์ได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ และยังสามารถนำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาใช้ประโยชน์ในภายหลัง ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์ หรือปรับปรุงพันธุ์ได้ และยังอาจช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนลูกหอยนางรมปากจีบที่ได้จากธรรมชาติ

ส่วนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งทำได้โดยการนำน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (cryoprotectant) เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง แล้วบรรจุใส่หลอดบรรจุน้ำเชื้อ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลาย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

อย่างไรก็ตามการศึกษาเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หรือการอนุรักษ์ยังมีน้อยมาก โดยยังไม่มีรายงานการศึกษาด้านดังกล่าวในหอยนางรมปากจีบ ไม่ว่าจะเป็นข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อ หรือการแช่เย็นน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบต่อไป ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตหอยที่โตเร็วทนทานต่อโรคให้มากขึ้น เพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ต่างๆได้ง่ายขึ้น ซึ่งในการทำวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาหาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยทะเลชนิดอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบ (*S.cucullata*) ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่
2. ศึกษาผลของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)
3. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโพรเทคแทนท์ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)
4. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) หลังการละลาย (thawing)

สมมติฐานของการวิจัย

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบเกิดขึ้นในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่
2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมในน้ำยาบัฟเฟอร์ต่างชนิดกันทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่างกัน
3. ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโพรเทคแทนท์ที่ต่างกัน มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่างกัน
4. อัตราการลดอุณหภูมิที่ต่างกัน มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

2. ทราบถึงชนิดน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ ทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของสารไครโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ

3. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ ใช้ตัวอย่างพ่อพันธุ์หอยทดลองโดยซื้อมาจากบริเวณอ่างศิลาเพื่อความสะดวกในการทำงาน เพราะเป็นแหล่งที่มีการเลี้ยงหอยนางรมปากจีบจำนวนมาก โดยในการแช่แข็งน้ำเชื้อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Calcium Free Hank's Balanced salt solution (Ca-F HBSS) กับ Calcium-Free saline salt solution (Ca-F saline) เนื่องจาก Ca-F HBSS ใช้ได้ผลดีในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลาไน ปลาตะเพียน หอยนางรม (*Crassostrea virginica*) เป็นต้น ส่วน Ca-F saline ยังไม่พบรายงานในการทดลองของหอยนางรม การใช้สารไครโพรเทคแทนท์ Dimethylsulfoxide (DMSO), Propylene glycol (PG) และ Ethylene glycol (EG) เนื่องจาก DMSO เป็นสารที่มีลักษณะเป็นทั้งกลุ่ม hydrophobic (methyl group) และกลุ่ม hydrophilic (sulfoxides group) และมีความสามารถในการซึมผ่านเนื้อเยื่อสูงกว่า Propylene glycol และ Ethylene glycol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม dihydric alcohol อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -7°C/นาที ซึ่งเป็นการใช้อัตราลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ทำให้ของเหลวภายนอกเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ ส่งผลให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์ แต่ถ้าใช้อัตราลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว จะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์อย่างรวดเร็ว อาจเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และจะทำให้เซลล์เกิดอันตรายได้ และนำน้ำเชื้อหอยที่ได้ถูกแช่แข็งนำมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) หลังจากนั้นทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็ง โดยประเมินจากการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นิยามศัพท์เฉพาะ

Cryopreservation คือ การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต โดยผ่านกระบวนการแช่แข็ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

Extender คือ สารละลายของเกลือที่ใช้ในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง ซึ่งบางครั้งมีสารอินทรีย์รวมอยู่ด้วยช่วยในการเก็บรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดระหว่างการลดอุณหภูมิ และยังเป็นสารอาหารแก่เซลล์ ส่วนมาก Extender มีค่า Osmolality ใกล้เคียงกับ Seminal Fluid ของสัตว์ชนิดนั้นจึงทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่

Cryoprotectant คือ สารเคมีที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์หรือภายนอกเซลล์ และช่วยชะลอการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์มีชีวิตรอดในกระบวนการแช่แข็ง

Equilibration Time คือ ระยะเวลาที่เซลล์ปรับตัวกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนเริ่มทำการแช่แข็ง

Freezing คือ การทำให้ของเหลวที่อยู่รอบๆเซลล์และภายในเซลล์ค่อยๆแข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม จะทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์อย่างต่อเนื่องซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์

Thawing คือ การละลายเซลล์ที่แข็งตัวโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ก่อนนำไปใช้ประโยชน์

Osmolality คือ ปริมาณของตัวถูกละลาย (solute) ที่มีในตัวทำละลาย (solvent)

เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Programmable freezer) คือ เครื่องมือลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ใช้คอมพิวเตอร์เป็นตัวควบคุมการการจ่ายไอไนโตรเจนเหลวจากถังเก็บเข้าสู่ช่องใส่ตัวอย่าง (chamber) สามารถตั้งอัตราการลดอุณหภูมิได้จากคอมพิวเตอร์และส่วนควบคุม