บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่พบได้ตามชายฝั่งทะเล ตามโขดหิน ตามรากไม้ หรือวัสดุที่อยู่ในระดับน้ำท่วมถึง โดยใช้ฝาด้านหนึ่งเชื่อมติดไว้ ซึ่งฝาด้านที่ใช้เกาะติดกับวัสดุเป็นอุ้งลึกกว่าอีกฝาหนึ่ง หอยนางรมกินอาหารด้วยการกรองกินแพลงก์ตอนพืชและสัตว์น้ำขนาดเล็กที่แขวนลอยในแหล่งน้ำเป็นอาหารหลัก (กรมประมง, 2547) หอยนางรมเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ได้แก่ โปรตีน 10.12%, ไกลโคเจน 6.14%, ไขมัน 1.99%, แร่ธาตุ 1.82% และน้ำ 76.10% หอยนางรมที่บริโภคอยู่ในรูปหอยสดทั้งตัวไม่แกะเปลือก หอยแกะเนื้อแช่เย็น หอยตากแห้งรมควัน หอยดองเปรี้ยวและดองเค็มบรรจุกระป๋องนอกจากนี้เปลือกหอยนางรมใช้เป็นปูนขาวใช้ในการก่อสร้างและทำเป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงเป็ดและไก่ หอยนางรมที่นำมาบริโภคเกือบทั้งหมดเป็นหอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยอาศัยธรรมชาติ ผลผลิตหอยนางรมในปี 2550 มี 22,600 ตัน คิดเป็นมูลค่า 332.9 ล้านบาท (กรมประมง, 2550) หอยนางรมอาศัยอยู่ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำทะเล พบชุกชุมบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงอยู่เป็นประจำ เช่น บริเวณที่ตื้นตามปากแม่น้ำลำคลอง ตามชายเกาะหรือชายฝั่งที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนถ่ายเทดี โดยทั่วไปหอยนางรมมีลักษณะภายนอกหรือลักษณะเปลือกหอยที่แปรผันตามสภาพแวดล้อมของแหล่งกำเนิดและวัตถุที่หอยเกาะ (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546) หอยนางรมที่นิยมนำมาเลี้ยงมี 3 ชนิด คือ หอยตะโกรมกรามขาว *Crassostrea belcheri*, หอยตะโกรมกรามดำ *Crassostrea iredalei* เลี้ยงกันมากในภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี สงขลา ปัตตานี ส่วนหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* จังหวัดที่มีการเลี้ยงกันมาก คือ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

หอยนางรมปากจีบมีชื่อสามัญว่า Indian rock oyster, Bombay rock oyster มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccostrea cucullata* จัดอยู่ในอนุกรมวิธาน คือ

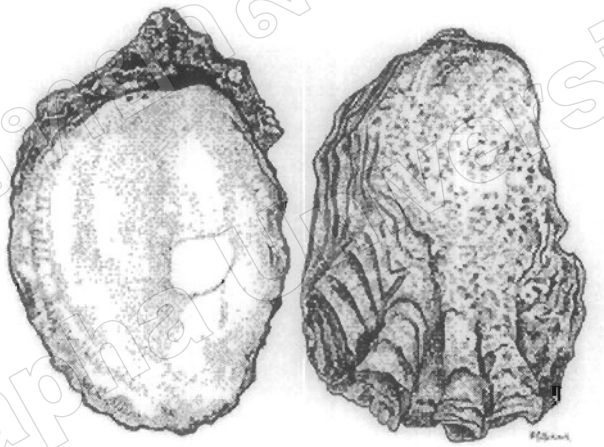
Phylum Mollusca
Class Bivalvia
Family Ostreidae
Genus *Saccostrea*

(เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

ลักษณะทั่วไปของหอยนางรมปากจีบ

ลักษณะเปลือกภายนอก

หอยนางรมขนาดเล็ก ความยาวและความสูงของเปลือกประมาณ 4 เซนติเมตร และ 6.5 เซนติเมตร ขอบเปลือกมีรอยหยักไม่สม่ำเสมอ เปลือกซ้ายโค้งเป็นรูปถ้วย มีสีสันและร่อง ทำให้ขอบเปลือกมีลักษณะเป็นจีบ แอ่งใต้ขั้วเปลือกค่อนข้างลึก เปลือกขวาแบน มีแผ่นเกล็ดตามขอบเปลือก ด้านในของเปลือกมีสีขาวคล้ำ ตามขอบเปลือกมีสีเข้ม รอยกล้ามเนื้อยึดเปลือกคล้ายรูปไต (ภาพที่ 1) และส่วนมากมีเส้นสีน้ำตาลเข้มพาดตามแนวนอน บริเวณเปลือกที่ยึดติดไม่เต็มทั้งเปลือก โดยมักจะใช้เฉพาะบริเวณขั้วใต้เปลือก ยกเว้นในกรณีที่ติดอยู่ตามแหล่งที่มีคลื่นลมจัด บริเวณที่ยึดติดจะใช้เกือบทั้งเปลือก ทำให้เปลือกซ้ายแบน แอ่งใต้ขั้วเปลือกตื้น รอยหยักขอบไม่ชัดเจน (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)



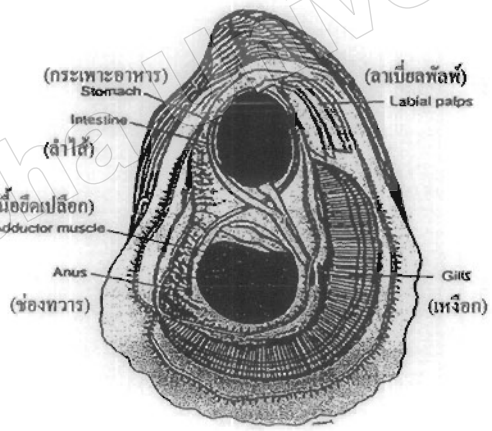
ภาพที่ 1 ลักษณะด้านในเปลือกและด้านนอกเปลือกของหอยนางรมปากจีบ
ที่มา: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Saccostrea_commercialis/en (10 สิงหาคม 2553)

ลักษณะทั่วไปภายในเปลือก

ภายในเปลือกประกอบด้วยลำตัวของหอยมีเนื้อเยื่อบาง ๆ ห่อหุ้มตัวทั้งสองข้าง เรียกว่า แผ่นเนื้อแมนเติล (mantle) มีลักษณะเป็นแผ่นบางแผ่คลุมถึงช่องปากและลาเบี่ยลพัลพ์ (labial palp) ลักษณะขอบของแมนเติลและลักษณะของลาเบี่ยลพัลพ์ ใช้จำแนกชนิดของหอยนางรมได้ โดยเฉพาะลักษณะของเส้นหนวด ความยาวของเส้นหนวด และลักษณะการเรียงตัวของเส้นหนวดบนขอบแผ่นเนื้อแมนเติล เหงือกเป็นอวัยวะที่ใช้กรองอาหารมีอยู่ 2 คู่ หรือ 4 แถว หอยนางรมกิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาหาร โดยการกรองอาหารจากน้ำโดยน้ำไหลผ่านเข้ามาในช่องแมนเติลไหลผ่านเหงือกและออกไปทางท่อน้ำออก อาหารต่าง ๆ ที่พัดพามาจากน้ำจะติดบนซี่เหงือก อาหารที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะตกลงในช่องแมนเติลตอนล่างและถูกขับออกทางท่อน้ำออก หอยนางรมมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการกรองอาหาร โดยที่อาหารที่เป็นอนุภาคขนาดเล็กจะมีเมือกมาปกคลุมและมีเส้นหนวดเล็ก ๆ คอยพัดโบกให้อนุภาคเหล่านี้เข้าสู่ทางเดินอาหาร นอกจากเหงือกจะทำหน้าที่เป็นอวัยวะที่ใช้กรองอาหารจากน้ำแล้ว ยังทำหน้าที่ในการหายใจและช่วยในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกาย บริเวณกึ่งกลางลำตัวมีกล้ามเนื้อยึดเปลือกซึ่งทำหน้าที่ปิดเปิดเปลือก ซึ่งมีรูปร่างต่างกันไปในหอยนางรมแต่ละชนิด ส่วนถัดเข้าไปเป็นลำตัวที่เป็นที่รวมอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งรวมอยู่ภายใน ได้แก่ ระบบประสาท ระบบการขับถ่ายของเสีย ระบบเลือดและระบบสืบพันธุ์ อวัยวะสืบพันธุ์จะเห็นเป็นเนื้อสีขาวปกคลุมกระเพาะอาหาร ช่องทางออกของเซลล์สืบพันธุ์ ใช้ในการจำแนกชนิดของหอยนางรม (ภาพที่ 2) โดยที่หอยนางรมทั้ง 3 ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จะมีช่องทางออกของเซลล์สืบพันธุ์สู่ภายนอกตัว หอยพวกนี้มีการปฏิสนธิของไข่และอสุจิเกิดในน้ำทะเล (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)



ภาพที่ 2 อวัยวะภายในของหอยนางรม (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยนางรม

โดยทั่วไปหอยนางรมจะมีเพศแยกกัน ยกเว้นบางกรณีที่พบหอยที่มีทั้งสองเพศอยู่ในตัวเดียวกัน คือ มีทั้งไข่และน้ำเชื้อหรือมีการสลับเพศกันไปมา การเปลี่ยนแปลงเพศจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ถ้ามีอาหารอุดมสมบูรณ์ พบว่าหอยนางรมเพศผู้จะเปลี่ยนเป็นเพศเมีย ซึ่งในทางตรงข้ามถ้าอาหารลดน้อยลง หอยนางรมเพศเมียจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้มาก อุณหภูมิน้ำก็มีส่วนในการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

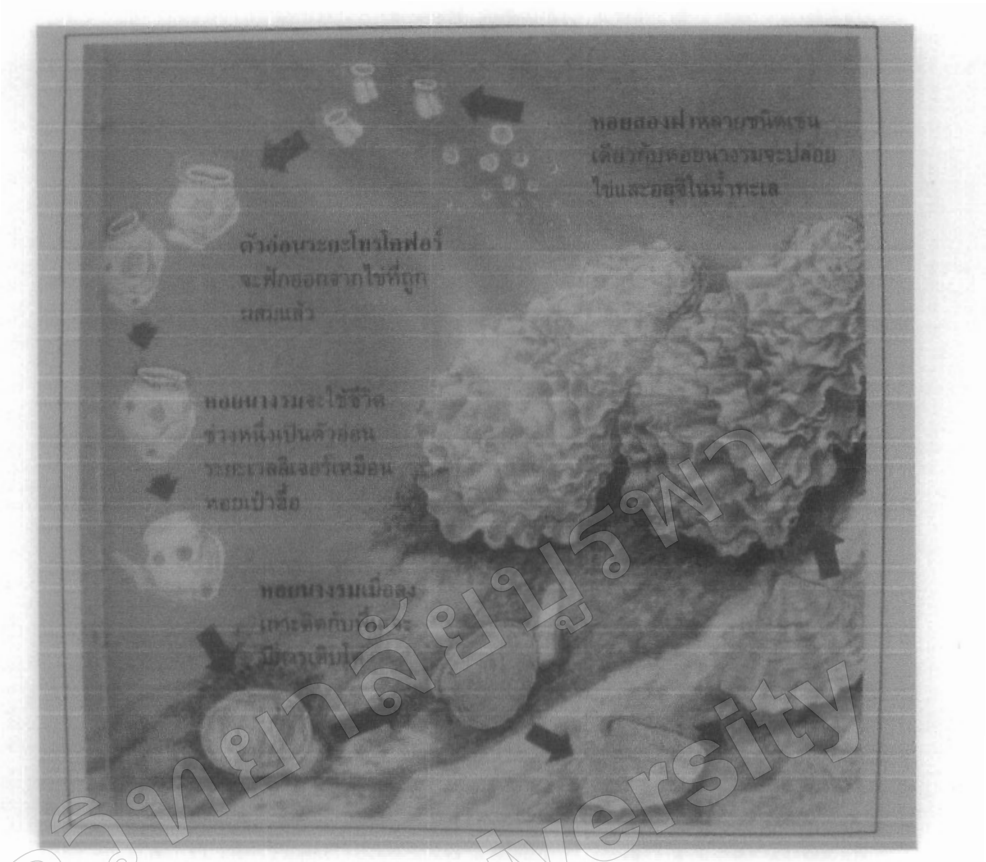
เปลี่ยนแปลงสลับเพศในหอยนางรม การจำแนกเพศของหอยนางรมดูจากลักษณะภายนอกไม่ได้ นอกจากต้องเปิดเปลือกหอยแล้วสังเกตดูจากอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ที่ปกคลุมอยู่รอบกระเพาะอาหาร นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงจะแยกได้ว่าเป็นตัวผู้หรือตัวเมีย หอยนางรมตัวผู้และตัวเมียที่มีความสมบูรณ์เพศจะพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์เป็นสีครีมขาวเหมือนกัน โดยธรรมชาติพบหอยมีความสมบูรณ์เพศและผสมพันธุ์ได้เกือบตลอดทั้งปี (ตารางที่ 1) ยกเว้นในช่วงฤดูฝนที่น้ำมีความเค็มต่ำหรือในช่วงที่หอยผอมหลังฤดูวางไข่ (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

ตารางที่ 1 ฤดูวางไข่และช่วงการเกิดลูกหอยนางรมในประเทศไทย

ชนิดของหอยนางรม	ฤดูวางไข่และช่วงการเกิดลูกหอย
หอยนางรมปากจีบ	ชลบุรี – มีตลอดทั้งปีแต่พบมาก 2 ช่วง คือ เมษายน –มิถุนายน และกันยายน–พฤศจิกายน จันทบุรี – พบมากในช่วงสิงหาคม–พฤศจิกายน ประจวบคีรีขันธ์ – พบมากที่สุดในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม ตรัง – พบมากในช่วงเดือนมิถุนายน-กันยายน สตูล – พบมากในช่วงเดือนมิถุนายน-ตุลาคม
หอยตะโกรม	อ่าวไทย (สุราษฎร์ธานี จันทบุรี และตราด) พบมาก 2 ช่วง คือ เดือนกุมพาพันธ์-มีนาคม และเดือนกันยายน-ตุลาคม อ่าวไทย (สงขลา) พบมากในช่วงเดือนมกราคม-เมษายน ทะเลอันดามัน (ระนอง พังงา และกระบี่) พบมาก 2 ช่วง คือ เดือนพฤษภาคม-มิถุนายน และเดือนธันวาคม-มกราคม

(เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของหอยนางรม (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์

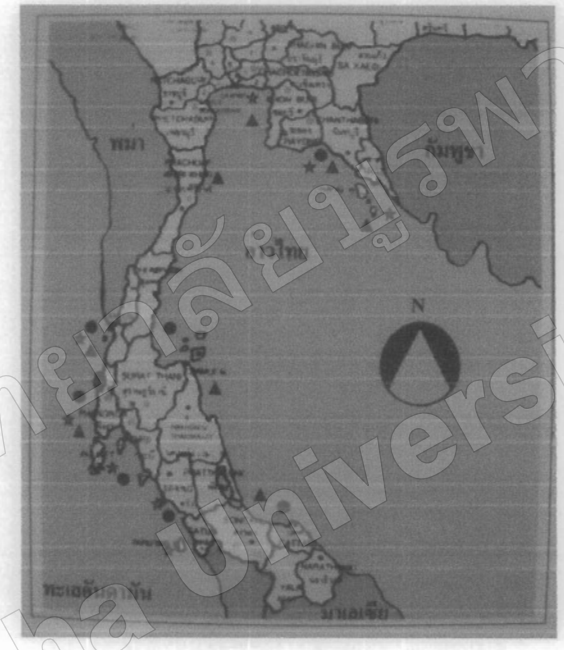
สเปิร์มของหอยสองฝาประกอบด้วย ส่วนหัว (Head) ส่วนกลาง (Mid piece) และส่วนหาง (Tail) โดยส่วนหัวมีนิวเคลียสรูปร่างค่อนข้างยาวมีอะโครโซม (Acrosome) ซึ่งมีเอนไซม์ใช้ในการย่อยผนังของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ประมาณ 4-5 อัน ล้อมเซลทริโอล (Centriole) ส่วนหางคือ แฟลกเจลลัม (Flagellum) (ชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เคลือตราชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ จันทเตมีย์, 2538)

ไข่ของหอยสองฝามักมีรูปร่างกลม พวกหอยสองฝาที่มีระยะตัวอ่อนเจริญภายนอกมักมีไข่ขนาดเล็ก ส่วนหอยสองฝาที่มีระยะตัวอ่อนเจริญภายในมักมีไข่ขนาดใหญ่ ไข่แดงมีแกรนูล (Granule) อยู่ 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นโปรตีนและชนิดที่เป็นไขมัน หอยสองฝาที่มีไข่ขนาดเล็กมักผลิตไข่จำนวนมาก (ภาพที่ 3) อาศัยอยู่ในทะเลบริเวณน้ำตื้น เช่น หอยนางรมชนิดต่าง ๆ ส่วนหอยสองฝาที่มีขนาดใหญ่และมีระยะตัวอ่อนอยู่ภายในมักผลิตไข่เป็นจำนวนน้อย (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การกระจายของหอยนางรม

หอยนางรมปากจีบ *Saccostrea forskali* พบในเขตน้ำตื้นที่อยู่ระหว่างน้ำขึ้นน้ำลงทั้งในทะเล น้ำกร่อยและบริเวณป่าชายเลน หอยนางรมชนิดนี้พบกระจายทั่วไปในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน พบชุกชุมที่จังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด ทางภาคใต้พบได้ตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา (ภาพที่ 4) ส่วนทางฝั่งทะเลอันดามันพบหอยนางรมปากจีบชนิดนี้ได้ที่จังหวัดระนอง พังงา กระบี่ ตรัง และสตูล (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)



ภาพที่ 4 การกระจายของหอยนางรมปากจีบ (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

การเพาะพันธุ์หอยนางรม

การเพาะหอยนางรมสามารถทำได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ ได้แก่ การกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning induction) และการผสมเทียมโดยการผ่าตัด (sacrification technique)

1. กระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

การกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ คือ การทำให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกตามความต้องการซึ่งมีได้หลายวิธีแต่หลักการสำคัญก็คือ มีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์อย่างฉับพลัน อย่างไรก็ดีประเด็นสำคัญที่สุดที่จะนำไปสู่ความสำเร็จของการกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยหลัก ๆ จะต้องขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการขุน-พ่อแม่พันธุ์ กล่าวคือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

พ่อแม่พันธุ์ต้องมีการเจริญพันธุ์อย่างเต็มที่ก่อนจึงจะประสบความสำเร็จในการกระตุ้น วิธีหลัก ๆ ที่ใช้ในการกระตุ้นมีดังนี้

วิธีที่ 1 การปล่อยแห้ง ทำได้โดยการนำพ่อแม่พันธุ์หอยนางรมมาทำความสะอาดแล้วผึ่งให้แห้งไว้ในอากาศเป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง บางครั้งอาจจะผึ่งไว้กลางแดดแต่ต้องไม่ให้อุณหภูมิร้อนจัดจนเกินไป จากนั้นนำพ่อแม่พันธุ์ลงในถังกระตุ้นการวางไข่ที่ใส่น้ำทะเลที่กรองแล้ว โดยน้ำทะเลต้องมีอุณหภูมิเท่ากับน้ำทะเลปกติที่อยู่ในที่ร่ม คือ ประมาณ 28 องศาเซลเซียส พ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์เพียงพอจะวางไข่และปล่อยน้ำเชื้อออกมาภายใน 3-6 ชั่วโมง หากหอยไม่วางไข่และปล่อยน้ำเชื้อออกมาแล้วก็จะหยุดทำการกระตุ้น โดยจะทำการกระตุ้นต่อในวันรุ่งขึ้นโดยจะทำการกระตุ้นติดต่อกันไม่เกิน 3 วัน ตามปกติถ้าการกระตุ้นได้ผล หอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาก่อน แล้วตัวเมียจึงจะวางไข่ในเวลาต่อมา ซึ่งมีวิธีสังเกต คือ น้ำเชื้อของหอยตัวผู้จะถูกพ่นออกมาเป็นสายตลอดเวลาดูเหมือนคนพ่นควันบุหรี่เป็นลักษณะจาง ๆ เหมือนหมอก ขณะที่ไข่ของหอยตัวเมียจะมีสีขาวขุ่น ๆ และถูกพ่นออกมาเป็นครั้ง ๆ ประมาณ 1-3 นาทีต่อครั้ง ซึ่งถ้าสังเกตดูใกล้ ๆ จะสามารถเห็นเป็นเม็ดเล็ก ๆ ได้ เมื่อหอยเริ่มวางไข่และปล่อยน้ำเชื้อแล้วต้องรีบแยกหอยตัวผู้และหอยตัวเมียออกมาใส่ภาชนะต่างห่างแยกเพศกัน ปล่อยให้หอยปล่อยไข่และน้ำเชื้อแล้วจึงค่อยทำการนับจำนวนไข่แล้วนำมาผสมภายหลัง แต่ไม่ควรทิ้งระยะเวลาให้นานจนเกินไปเพราะจะทำให้น้ำเชื้อหอยมีคุณภาพต่ำลงทำให้อัตราการผสมลดลง ในขั้นนี้อาจปล่อยให้ไข่และน้ำเชื้อผสมกันในบ่อเพาะเลยก็ได้ แต่อาจจะมีปัญหาในกรณีที่หอยตัวผู้มีมากกว่าหอยตัวเมียจะทำให้ไข่ที่ได้รับการผสมจากสเปิร์มหลายตัวแล้วทำให้ไข่ไม่พัฒนาเป็นลูกหอย (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

วิธีที่ 2 การใช้อุณหภูมิ วิธีนี้ใช้การเปลี่ยนอุณหภูมิน้ำที่แช่หอย โดยการเติมน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วที่อุณหภูมิปกติลงในกระบะพ่อแม่พันธุ์หอยพอท่วมตัวหอยทุกตัว แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วจึงเติมน้ำทะเลที่ต้มแล้วลงในกระบะให้ได้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว แช่หอยทิ้งไว้อีกประมาณ 30 นาที ถ่ายน้ำออกแล้วเติมน้ำทะเลอุณหภูมิปกติอีกครั้ง ทำแบบนี้ใหม่อีกประมาณ 3-4 รอบ ถ้าหอยไม่ปล่อยไข่หรือน้ำเชื้อแสดงว่าพ่อแม่พันธุ์ยังไม่สมบูรณ์พอ แต่ถ้าหอยปล่อยไข่หรือน้ำเชื้อแล้วจะต้องแยกหอยใส่ภาชนะต่างหากแล้วค่อยนำมาผสมกัน (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

1. เทคนิคการผสมเทียมโดยการผ่าตัด

การผสมเทียมโดยการผ่าตัดเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือวิธีนี้จะทำให้พ่อแม่พันธุ์ตาย และใช้พ่อแม่พันธุ์ได้ครั้งเดียว รวมทั้งพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะจำเป็นจะต้องมีความสมบูรณ์เพศ นอกจากนั้นความสะอาดของน้ำเชื้อเพศผู้และเพศเมียก็เป็นสิ่งสำคัญอีกด้วย

ขั้นตอนในการดำเนินการมีดังต่อไปนี้

1.1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์ ทำความสะอาดเปลือกพ่อแม่พันธุ์ เพื่อลดปริมาณเชื้อโรคที่จะติดต่อสู่ลูกหอย

1.1 เปิดฝาพ่อแม่พันธุ์โดยใช้สิ่วตอกบริเวณบานพับของเปลือกหอย

1.2 ใช้มีดผ่าตัดค่อยแหย่เข้าไปตัดกล้ามเนื้อที่ยึดเปลือกทั้งสองข้างเอาไว้

1.3 เมื่อเปิดฝาแล้ว ตรวจดูสภาพทั่วไปของพ่อแม่พันธุ์ด้วยตาเปล่า ถ้าพ่อแม่พันธุ์มีความสมบูรณ์เพศจะเห็นเนื้อหอยเต็มช่องว่างระหว่างเปลือกและส่วนเนื้อหอยจะมีสีขาวหรือสีครีม และสามารถมองเป็นท่อเซลล์สืบพันธุ์เป็นลายเห็นได้ชัดโดยจะพบอยู่รอบ ๆ กล้ามเนื้อที่ยึดเปลือกเอาไว้ ในขั้นนี้ไม่สามารถแยกเพศหอยได้ ยกเว้นแต่ผู้ที่มีความชำนาญมาก

1.4 ใช้หลอดหยดรีดเบา ๆ บริเวณท่อเชื้อ ดูดเอาเซลล์สืบพันธุ์มาเล็กน้อย หยดลงบนสไลด์หลุมแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อแยกเพศหอยดูความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อตัวผู้จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กมาก มีหางและเคลื่อนที่ได้ ถ้าเซลล์แข็งแรงจะมองเห็นการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ถ้าไม่แข็งแรงก็จะเคลื่อนไหวน้อย ส่วนไข่จะมีลักษณะได้หลายแบบ ตอนแรกจะมองเห็นเป็นเม็ดขนาดใหญ่ รูปร่างรี รูปหยดน้ำ รูปสามเหลี่ยม และค่อนข้างกลม เพราะถูกบีบอัดอยู่ในรังไข่ หากทิ้งไว้สักพักจะเห็นไข่รูปร่างกลมขึ้น ในขั้นนี้จะต้องแยกหอยเพศผู้และเพศเมียเก็บไว้คนละภาชนะที่มีเครื่องหมาย

1.5 รีดไข่หรือน้ำเชื้อออกมาแยกใส่ในกระบอกพลาสติกที่มีน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร (ความเค็มระหว่าง 25-30 ppt) ควบคุมเรื่องทำความสะอาดโดยการรีดเบา ๆ ระวังไม่ให้ส่วนของเหลวที่อยู่ในกระเพาะอาหารหรือเนื้อเยื่อหอยหลุดติดปะปนออกมา ไม่จำเป็นต้องรีดไข่หรือน้ำเชื้อจนหมดเพราะอาจจะทำให้มีเชื้อโรคติดลูกหอยที่ผสมได้ คงเอาแต่เฉพาะส่วนที่รีดออกได้โดยการกดแรงปานกลางเท่านั้น

1.6 สุ่มเซลล์ไข่ไปนับจำนวนใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อประมาณจำนวนไข่ที่ผสมและจำนวนบ่อที่จะใช้ โดยจะมีปริมาณไข่ 1,000,000 ฟองต่อบ่อ หรือประมาณ 10-20 ฟองต่อมิลิลิตร

1.7 ผสมไข่กับน้ำเชื้อเข้าด้วยกัน โดยเทลงถังที่มีน้ำทะเลสะอาดประมาณ 10 ลิตร ให้อากาศเบา ๆ ทิ้งไว้ให้ผสมกันประมาณ 5-10 นาที แล้วจึงเทน้ำผ่านผ้ากรองขนาด 58 ไมครอน ลงบ่อขนาด 1 ตัน ซึ่งใส่น้ำทะเลที่ผ่านการกรองและมีความเค็มประมาณ 25 ppt ให้อากาศเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 6-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อลูกหอยเริ่มว่ายน้ำได้จะให้สาหร่ายเซลล์เดียวพวก *Isochrysis* เป็นอาหารประมาณบ่อละ 1.5-3 ลิตร เมื่อให้อาหารแล้วเพิ่มความแรงของอากาศขึ้นเล็กน้อยเพื่อให้ลูกหอยและอาหารกระจายได้ทั่วบ่อ

1.8 เมื่อลูกหอยอายุครบ 24 ชั่วโมงหอยจะเข้าสู่ระยะรูปตัวดี (D-Shaped) แล้วจึงเริ่มเปลี่ยนน้ำทะเล (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอยนางรม

วิธีการนำน้ำเชื้อทำได้โดยการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) และเขี่ยเอาเซลล์สืบพันธุ์ออกมาโดยตรง ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้ผลเป็นอย่างดีกับหอยนางรม ข้อควรระวังในการเก็บน้ำเชื้อหรือเซลล์สืบพันธุ์ คือ ควรใช้หอยที่มีความสมบูรณ์เพศเท่านั้น เช่น น้ำเชื้อตัวผู้เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่าว่ายน้ำได้อย่างแข็งแรง

วิธีการเก็บน้ำเชื้อ มีดังนี้

1. นำหอยนางรมมาตัดเชือกที่ติดกันเป็นพวงออกให้เป็นตัวเดี่ยว ๆ ทำความสะอาดเปลือกหอย แต่ไม่ควรนำไปล้างน้ำเพราะน้ำจะไปกระตุ้นให้หอยนางรมปล่อยน้ำเชื้อ

2. เปิดเปลือกหอยนางรมแล้ว ตรวจดูสภาพทั่วไปของหอยนางรมด้วยตาเปล่า ถ้าหอยมีความสมบูรณ์เพศจะเห็นเนื้อหอยเต็มช่องว่างระหว่างเปลือกและส่วนเนื้อหอยจะมีสีขาวหรือสีครีม และสามารถมองเป็นท่อเซลล์สืบพันธุ์เป็นลายเห็นได้ชัดโดยจะพบอยู่รอบ ๆ กล้ามเนื้อที่ยึดเปลือกเอาไว้ ในขั้นนี้ไม่สามารถแยกเพศหอยได้ ยกเว้นแต่ผู้ที่มีความชำนาญมาก

3. ใช้หลอดหยดรีดเบา ๆ บริเวณท่อเชื้อ ดูดเอาเซลล์สืบพันธุ์มาเล็กน้อย หยดลงบนสไลด์หลุมแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อแยกเพศหอยดูความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อตัวผู้จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กมาก มีหางและเคลื่อนที่ได้ ถ้าเซลล์แข็งแรงจะมองเห็นการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ถ้าไม่แข็งแรงก็จะเคลื่อนไหวน้อย ส่วนไข่จะมีลักษณะได้หลายแบบ ตอนแรกจะมองเห็นเป็นเม็ดขนาดใหญ่ รูปร่างรี รูปหยดน้ำ รูปสามเหลี่ยม และค่อนข้างกลม เพราะถูกบีบอัดอยู่ในรังไข่

4. เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่าเป็นน้ำเชื้อ ก็รีดลงในภาชนะที่เตรียมไว้ควบคุมเรื่องทำความสะอาดโดยการรีดเบา ๆ ระวังไม่ให้ส่วนของเหลวที่อยู่ในกระเพาะอาหารหรือเนื้อเยื่อหอยหลุดติดปะปนออกมาคงเอาแต่เฉพาะส่วนที่รีดออกได้โดยการกดแรงปานกลางเท่านั้น (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

โดยทั่วไปสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในเซมินอลฟลูอิด (seminal fluid) แต่จะเคลื่อนที่แบบปราดเปรียว เมื่ออยู่ในน้ำโดยจะมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำและสภาพแวดล้อม เช่น สเปิร์มปลาน้ำกร่อยและปลาทะเลมักจะเคลื่อนไหวได้นานกว่า

สเปิร์มปลาน้ำจืดโดยทั่วไป สเปิร์มที่อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายภายในตัวจะมีชีวิตได้นาน อุณหภูมิน้ำมีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เพราะถ้ามีอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้สเปิร์มมีระยะเวลาการเคลื่อนที่ในน้ำน้อยกว่าอุณหภูมิต่ำกว่า นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีระยะเวลาจำกัด เช่นปลาน้ำจืดส่วนมากจะสามารถเคลื่อนที่ได้นานประมาณ 1 นาที โดยจะว่ายน้ำปราดเปรียวในระยะแรก ๆ และค่อย ๆ ว่ายน้ำช้าลงจนหยุดการเคลื่อนที่ ซึ่งในช่วงดังกล่าวถ้าสเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ก็จะทำให้สเปิร์มตายในที่สุด โดยเฉพาะการผสมเทียมปลาต้องใช้ระยะเวลาผสมเทียมที่เร็วที่สุดไม่ให้สเปิร์มตาย เพื่อที่จะได้อัตราปฏิสนธิสูงที่สุด โดยมีวิธีประเมิน 3 วิธีดังนี้ คือ

1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

เมื่อรีดน้ำเชื้อออกมาจากสัตว์น้ำหรือตัวหอยที่มีความเข้มข้นหรือปริมาณที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ ต้องสังเกตดูสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถพิจารณาได้ในแง่ของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยกำหนดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ (Vuthiphandchai & Zohar, 1999)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้ผลเร็วแต่ไม่แน่นอน เพราะผู้ประเมินต้องมีประสบการณ์ในการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม นอกจากนี้พบว่าสเปิร์มของพวกครัสเตเชียนหลายชนิด เช่น กุ้ง ไม่มีการเคลื่อนที่ ทำให้การประเมินโดยใช้การเคลื่อนที่กับสัตว์เหล่านี้ จึงไม่สามารถทำได้ (Lezcano, Granja & Salazar, 2004) จึงเห็นได้ว่าการประเมินน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยดูการเคลื่อนที่ จึงไม่สามารถประเมินได้กับสเปิร์มสัตว์น้ำทุกชนิด อย่างไรก็ตามกุ้งทะเลหลายชนิดนั้นสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่จึงต้องใช้การประเมินโดยวิธีอื่นซึ่งวิธีที่สามารถประเมินน้ำเชื้อได้คือการย้อมสี

3. การย้อมสีสเปิร์มเป็นการตรวจดูสเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (Live-Dead Staining) โดยวิธีนี้มีหลักการ คือ สีพิเศษบางชนิดเมื่อนำมาย้อมสเปิร์มแล้ว ถ้าสเปิร์มตายจะดูดซับสีหรือติดสีม่วง ในขณะที่สเปิร์มมีชีวิตจะไม่ดูดซึมสีหรือติดสีย้อม อันเนื่องมาจากความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่ยอมให้สีผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ถ้าเซลล์มีชีวิตอันเนื่องมาจากมีกลไกป้องกัน แต่ถ้าเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่มีกลไกการป้องกันไม่ให้สีผ่านเข้ามาในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เนื่องจากเซลล์ตาย เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจึงติดสีย้อม โดยทั่วไปนิยมใช้สีอีโอซิน (Eosin) ผสมกับสีอื่น ๆ ที่นิยมใช้มีอยู่

2 ชนิด คือ สีอิโอซิน-นิโกรซิน (Eosin-Nigrosin) และอิโอซิน-ฟาสท์กรีน (Eosin-Fast Green FCF) การย้อมสีสเปิร์มโดยใช้สี Eosin-Nigrosin สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีจะเห็นเป็นสีขาว ส่วนสเปิร์มที่ตายแล้วจะติดสีย้อมเมื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้ออีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ โดยนำไข่มาปฏิสนธิกับสเปิร์มแล้วดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไข่หลังจากมีการปฏิสนธิ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

การเก็บรักษาสเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต โดยผ่านกระบวนการแช่แข็ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องมีการเลือกใช้สูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (สารที่ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง เพื่อทำให้การแช่แข็งของสเปิร์มสำเร็จ ถ้าจะใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการละลายและอุณหภูมิที่เหมาะสม (ภาพที่ 5) จะทำให้ผลการเพาะฟักและผสมเทียมมีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (นิศา ไชยรักษ์, 2539)

สำหรับงานวิจัยด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งส่วนมาก มีความแตกต่างกันไปในสัตว์น้ำแต่ละชนิดทั้งการเลือกใช้สูตรน้ำยาบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทค-แทนท์ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบจึงต้องเริ่มจากการเอาน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับหอยแต่ละชนิดซึ่งไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วนำไปผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ และอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง โดยที่จะประสบความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบนั้นขึ้นอยู่กับการเลือกน้ำยาบัฟเฟอร์ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม ซึ่งทำให้สเปิร์มมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็ง ดังที่ปรากฏในงานวิจัยเหล่านี้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

ผู้ศึกษา	ชนิดสัตว์ทดลอง	ชนิดน้ำยาบัฟเฟอร์	ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	อัตราการลดอุณหภูมิ	ผลการทดลอง
Gwo, Strawn, Longneeker, and Arnold (1991)	ปลา Atlantic Croaker	ประกอบด้วยเกลือแกง กลูโคส และซูโครส	-	-10 จนถึง -150°C/นาที	ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมกับไข่
Paniagua-Chavez, and Tiersch (2001)	สเปิร์มและตัวอ่อนของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*)	Artificial Seawater (ASW)	15% Propylene Glycol	-2.5°C/นาที	มีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ Trochophore
Gwo, Chen, and Cheng (2002)	หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolar superteva*)	Artificial Seawater (ASW)	10% DMSO	-12, -15°C/นาที	สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 50-75% และมีการปฏิสนธิ 48%
Choi and Chang (2003)	หอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*)	-	0.2 M DMSO ผสมกับ 0.2 glucose และ sucrose	-1°C/นาที	ทำให้หอยระยะ Trochophore พัฒนามาถึงระยะ D-Shaped Larva ประมาณ 89-91%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

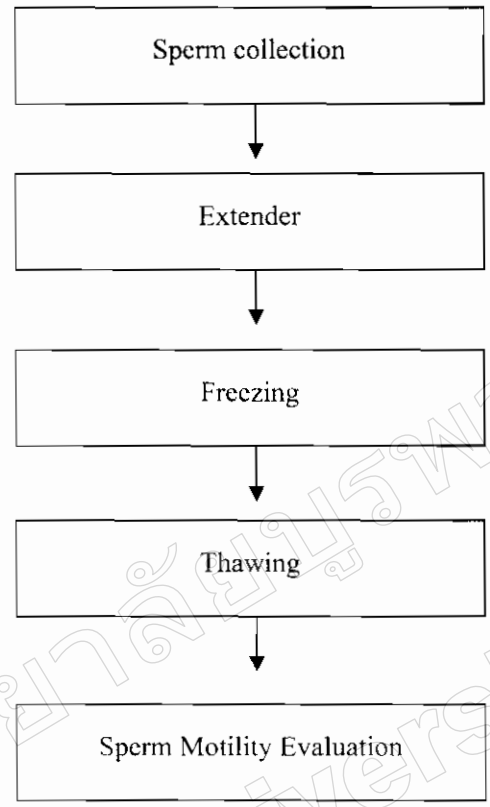
ผู้ศึกษา	ชนิดสัตว์ทดลอง	ชนิดน้ำยาบัฟเฟอร์	ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	อัตราการลดอุณหภูมิ	ผลการทดลอง
Ieropol, Masullo, Santo, and Sansone (2004)	หอยนางรม (*Crassostrea gigas*)	-	10% Ethylene Glycol	-6°C/นาที	มีการการปฏิสนธิ 58.9%
Dong, Eudeline, Huang, Allen, and Tiersch (2005)	diploid และ tetraploid ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*)	Ca-F HBSS	8% DMSO	-16°C/นาที	diploids มีการเคลื่อนที่ 30% และการปฏิสนธิ 96% tetraploids มีการเคลื่อนที่น้อยกว่า 10% และการปฏิสนธิต่ำกว่า 28%
Dong, Huang, Eudeline, Allen, and Tiersch (2006)	diploid และ tetraploid ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*)	-	6% MeOH และ 2% PEG/ 4% MeOH, 6% PEG/ 4% P-glycol และ 6% PEG 4% DMSO	-5°C/นาที ถึงอุณหภูมิ -30°C และ 45°C/นาที จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C	diploid สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 70% และมีการปฏิสนธิ 98% tetraploid สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 50% และมีการปฏิสนธิ 48%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้ศึกษา	ชนิดสัตว์ทดลอง	ชนิดน้ำยาบัฟเฟอร์	ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	อัตราการลดอุณหภูมิ	ผลการทดลอง
Hector, Dean, and Paul (2007)	black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera L.*)	-	0.45 M trehalose และ 0, 0.64, 1.02 หรือ 1.53 M Me_2SO	2.1–5.2°C/นาที	สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีสุดประมาณ 40%
Kawamoto et al. (2007)	Japanese pearl oyster *(Pinctada fucata martensii)*	FBS	10% methanol	-15 และ -20 °C/นาที	การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีสุด
Matteo, Langellotti, Masullo, and Sansone (2009)	หอยแมลงภู่ *(Mytilus galloprovincialis)*	-	7% Ethylene Glycol	-1°C/นาทีถึงอุณหภูมิ -15°C และ -6°C/นาทีจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80°C	สเปิร์มมีการปฏิสนธิมากกว่า 60%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Tiersch, 2000)

สารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์

Extender หรือน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา เป็นสารละลายที่ช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง ช่วยให้เก็บน้ำเชื้อได้นานกว่าปกติ และเป็นการเจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อสะดวกในการปฏิบัติการ น้ำยาเจือจางนั้นจะไม่ส่งผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ หากจะพิจารณาส่วนประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการแช่แข็ง ควรมีหลักการดังนี้ สูตรน้ำยาต่าง ๆ เหล่านี้ ประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ที่ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเลือด (Seminal Plasma) และน้ำยาต้องมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงกับแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด อย่างเช่น สัตว์น้ำจืด Extender ที่ใช้การมีค่าออสโมลาริตี้ 280-300 mOsmol/kg ส่วนสัตว์น้ำเค็มควรใช้ Extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ 200-300 mOsmol/kg (Wayman & Tiresch, 2000) การหา Extender ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีออสโมลาลิตี้ในเซลล์และส่วนประกอบของแร่ธาตุในเซลล์ต่างกันจึงต้องเลือกใช้ Extender ที่ต่างกันด้วย เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้มีการศึกษาในเรื่องของ Extender พบว่าสารละลาย Ca-Free Saline ไม่มีผลต่อรูปร่างของสเปิร์ม นอกจากนี้ Extender ประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่

ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงานและสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant)

เป็นสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ ระหว่างการลดอุณหภูมิ ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในและนอกเซลล์ เราสามารถจำแนกประเภทออกเป็น 2 พวก คือ

1. ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เป็นสารที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ สารเคมีเหล่านี้จำต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็ง ได้แก่ DMSO, Methanol, Glycerol เป็นต้น โดยเมื่อใส่สารป้องกันการแข็งตัวชนิดนี้มักจะแทรกเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์ก่อนนำไปลดอุณหภูมิ ช่วยควบคุมการผันแปนของความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ให้เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป ควบคุมการดึงน้ำออกจากเซลล์ให้เป็นไปอย่างต่อเนื่องและสัมพันธ์กับการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในสารละลาย ช่วยเปลี่ยนรูปร่างและขนาดของเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์โดยลดเหลี่ยมมุมลง เป็นการลดอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ และป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายด้วยเกล็ดน้ำแข็ง (Seidel, 1984)

สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดี เมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ถ้าพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงที่สุดรองลงมาได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และ กลีเซอรอล ตามลำดับ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ ดังนั้นการคำนึงถึงระดับความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาในการทิ้งเซลล์ให้ถึงสมดุลที่เหมาะสม

2. ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะอยู่นอกเซลล์ ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น Sucrose, Glucose เป็นต้น และใช้ได้ผลดีที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่าด้วยตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ โพลีไวนิลเพียร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidon, PVP) และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น sucrose, glucose, manitol เป็นต้น (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

กระบวนการแช่แข็งต้องนำ Extender มาละลายในสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนแล้วจึงค่อยนำไปผสมกับน้ำเชื้อหรือไข่หรือตัวอ่อน โดยการใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อควรใส่อย่างช้า ๆ และที่อุณหภูมิต่ำ ๆ (Wayman & Fiersch, 2000) เพื่อช่วยให้เซลล์ค่อย ๆ

ปรับสภาพ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่จะใช้ในการแช่แข็งนี้ ควรเป็นน้ำยาที่เตรียมขึ้นมาใหม่ หรือถ้าจะเตรียมไว้ล่วงหน้าควรเก็บไว้ในตู้เย็น แต่ไม่ควรเตรียมล่วงหน้าไว้นานกว่า 1-2 วัน และเมื่อใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์นี้ลงสู่น้ำเชื้อแล้วต้องทิ้งระยะให้สารนี้ซึมเข้าไปในเซลล์ (Equilibration time) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการแช่แข็งเช่นกัน โดยในสัตว์แต่ละชนิด สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละตัว แต่ละความเข้มข้นจะมี Equilibration time ต่างกัน ฉะนั้นในการแช่แข็งต้องมีการทดลองหา Equilibration time ที่เหมาะสมด้วย ถ้าปล่อยให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ผสมกับน้ำเชื้ออยู่นานเกินไปจะมีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ แต่ถ้าน้ำเชื้อผสมอยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์น้อยเกินไป อาจจะยังซึมเข้าสู่เซลล์ยังไม่ทั่วถึงเมื่อนำเซลล์ไปแช่แข็งจึงเกิดความล้มเหลวได้ สารไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันออสโมติก จุดเยือกแข็ง และช่วยปรับแรงดันออสโมติกของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้เพราะ

1. ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยทำให้ของเหลวแข็งตัวช้าลงและทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

2. ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์ไปแทนที่น้ำในเซลล์ที่แพร่ออกจากเซลล์ เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไป เนื่องจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลาภายในเซลล์จะแข็งตัว

3. ช่วยป้องกันอันตรายเนื่องจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโตรไลท์ คือ เมื่อมีการควบคุมการเกิดเกล็ดน้ำแข็งและการลดขนาดของเซลล์ ขณะทำการแช่แข็งได้ย่อมทำให้เซลล์คงสภาพปกติมีชีวิตอยู่ได้

4. ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออกาแนลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การลดอุณหภูมิ

การลดอุณหภูมิ คือ การทำให้ของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เซลล์และภายนอกค่อย ๆ แข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิของเหลวภายนอกเซลล์จะเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไปซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ เพราะมีการสูญเสียน้ำและความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไปอาจทำให้ตกผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คืออัตราการลดอุณหภูมิที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือให้เกิดเกิดน้ำแข็งน้อยที่สุด และอัตราการลดอุณหภูมิดังกล่าวจะต้องเป็นอัตราที่ไม่เป็น

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

อันตรายต่อเซลล์ อันตรายที่เกิดจากเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ขณะทำการแช่แข็ง น่าจะเกิดขึ้นขณะทำการลดอุณหภูมิจาก -15 องศาเซลเซียส ถึง -50 องศาเซลเซียส เพราะหลังจากนั้นสามารถจุ่มหลอดบรรจุตัวอย่างลงสู่ถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้ทันที (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ละลายหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งโดยเตรียมเครื่องละลายน้ำเชื้อโดยตั้งบีกเกอร์เติมน้ำบนเครื่องให้ความร้อน แบบตั้งอุณหภูมิได้ (Hot plate)หรือใช้อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) ตั้งอุณหภูมิไว้ตามที่กำหนดซึ่งส่วนใหญ่อยู่ที่ 35 – 40°C ใช้ฟอร์เซบที่แช่เย็นจัดคีบหลอดแช่แข็งที่ต้องการออกจากถังเก็บตัวอย่างไปแช่แข็งในกล่องโฟมหรือ ภาชนะที่ใส่ไนโตรเจนเหลวเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเชื้อละลายก่อน ละลายน้ำเชื้อโดยใช้ฟอร์เซบคีบหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจุ่มในน้ำอุ่นที่ตั้งอุณหภูมิไว้แกว่งหลอดไปมาเบา ๆ จนน้ำเชื้อละลายหมด โดยหลอดฟางใช้เวลาประมาณ 8 - 10 วินาที ขณะที่หลอดแช่แข็งจะใช้เวลาประมาณ 1- 2 นาที ในการทำให้น้ำเชื้อละลายหมด วางหลอดน้ำเชื้อที่ละลายบนน้ำแข็งเพื่อนำไปใช้ตรวจคุณภาพหรือผสมเทียมต่อไป (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ละลายน้ำเชื้อที่แช่แข็งทำโดยการนำน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลว นำมาแช่น้ำร้อน 70-80°C ซึ่งหากใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ทำจาก Al sheath ควรแช่น้ำร้อนนานไม่เกิน 20 วินาที เพื่อให้น้ำเชื้อละลาย

Ji et al. (2004) ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งใน cryovials ปริมาตรขนาดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิน้ำ 37°C ใช้เวลา 50 วินาที 1.5 นาที และ 2.5 นาที สำหรับ 0.5, 1.0 และ 1.8 มิลิลิตร ตามลำดับ

Christensen et al. (2005) ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา Chanal catfish ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 วินาที, 50°C เป็นเวลา 10 วินาที และ 40°C เป็นเวลา 10 วินาที ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่ต่างกัน

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็ง

ปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์หรืออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีหลายประการเพราะการปฏิบัติงานทุกขั้นตอน นับตั้งแต่การเก็บตัวอย่างเซลล์ การปฏิบัติต่อตัวอย่างเซลล์ ตลอดจน

สูตรน้ำยา และการเตรียมน้ำยาสำหรับการเจือจางนั้น ๆ ต่างก็เป็นปัจจัยที่ทำให้ประสบผลสำเร็จในการแช่แข็ง หากพิจารณาในอีกแง่หนึ่งพบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการแช่แข็ง และการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับ

1. ขนาดของเซลล์

343341

2. อัตราการลดอุณหภูมิ

3. อัตราการแพร่ของผนังเซลล์

ปัจจัยทั้ง 3 ประการนี้มีความสัมพันธ์ กับปริมาณน้ำภายในเซลล์กล่าวคือ สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำภายในเซลล์ได้ เพราะมีความผันแปรกับอุณหภูมิ ถ้าทราบพื้นที่ผิวของเซลล์ อัตราการการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์ และความผันแปรของอัตราการแพร่ของน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้เสนอไว้โดย Mazur (1963) และเป็นที่ยอมรับและยึดถือเป็นหลักปฏิบัติทั่วไปคือ

1. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่หรือ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวปริมาตรเซลล์มีค่าน้อยเมื่อนำมาแช่แข็งต้องลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอในขณะทำการแช่แข็งทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ถูกทำลาย

2. ถ้าธรรมชาติของผนังเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุในการแพร่ของน้ำเข้าออกเซลล์ได้ยากอัตราการลดอุณหภูมิจึงจำเป็นต้องช้าลง เพื่อเปิดโอการให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอ ตามที่กล่าวมาแล้วในข้อแรกสำหรับการเก็บรักษาแบบแช่แข็งตัวอสุจิปลา นั้นไม่มีปัญหาเรื่องขนาดเซลล์ และอัตราการแพร่ของน้ำเข้าออกเซลล์ ทั้งนี้เพราะอสุจิมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 ไมครอน (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ

หลอดที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมีหลายแบบ ได้แก่ หลอดฟาง (Straw) หลอดยาฉีด (Ampule) หลอดไครโอ (Cryotube) หลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 แบบนี้มีความจุหลายขนาดแตกต่างกัน ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ผู้ใช้จึงควรเลือกให้เหมาะสมกับชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ หรือวิธีการนำไปใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บและวิธีเก็บรักษา ดังนั้นการใช้หลอดที่มีความจุอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตรขึ้นไป แต่เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน หลอดนั้นควรมีขนาดไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร และความยาวของหลอดนั้นไม่สูงเกินกระบอกสำหรับบรรจุหลอดน้ำเชื้อ (canistor) ที่มีอยู่ในถังไนโตรเจนเหลวที่ใช้อยู่ เพราะถ้าความยาวของหลอดน้ำเชื้อมากกว่าความสูงของกระบอก จะไม่สามารถเก็บลงในถังไนโตรเจนเหลว เพราะส่วนของหลอดที่ยาวเกินจะค้ำฝารองถังไนโตรเจนเหลว จะทำให้ปิดฝาถังไนโตรเจนเหลวไม่สนิท (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)