

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

วัสดุ

1. พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำ (*Holothuria atra* Jaeger, 1833) ขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 250 กรัมขึ้นไป มีความยาวลำตัวประมาณ 20 เซนติเมตร (ภาพที่ 5)
2. ตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia
3. อาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลตัวอ่อนระยะ auricularia จนถึง pentactular (ระยะลงเกาะ) ได้แก่ *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana* และ *Skeletonema costatum*



ภาพที่ 5 พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำ

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. สำหรับการเตรียมน้ำ
 - ป้อนน้ำแบบแช่พร้อมสายยาง
 - หลอด UV สำหรับฆ่าเชื้อน้ำ
 - ถังกรองขนาดช่องตา 69 ไมครอน
 - ถังกรองทราย
 - ถังพลาสติกความจุ 500 ลิตร
 - ถังไฟเบอร์กลาสความจุ 1,000 ลิตร
 - ชุดอุปกรณ์ให้อากาศพร้อมสายยางและหัวทราย
 - เครื่องมือวัดความเค็ม (refracto-salinometer) ยี่ห้อ Atago รุ่น

- เครื่องมือวัดอุณหภูมิ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์แบบปรอท ช่วงอุณหภูมิ 0-100 องศาเซลเซียส

2. สำหรับการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

- กระบะพลาสติกสี่เหลี่ยมความจุ 160 ลิตร (กว้าง x ยาว x สูง = 88 x 160 x 53 เซนติเมตร)
- ตู้แช่แข็ง
- ป้อนน้ำพร้อมสายยาง
- อุปกรณ์ให้อากาศ

3. สำหรับการอนุบาลตัวอ่อน

- ถังพลาสติกทรงกลม ขนาดบรรจุ 200 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 78 เซนติเมตร สูง 64 เซนติเมตร)
- วัสดุสำหรับการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำ
- อุปกรณ์ให้อากาศ

3. สำหรับการตรวจสอบความหนาแน่นและความสมบูรณ์ของตัวอ่อน

- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)
- กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัล
- เครื่องนับจำนวนชนิดม็อกด (hand tally counter)
- สไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) พร้อมแผ่นปิดสไลด์
- สไลด์นับแพลงก์ตอน (sedgewick-rafer slide) พร้อมแผ่นปิดสไลด์
- สไลด์หลุมพร้อมแผ่นปิดสไลด์
- หลอดหยด (dropper) พร้อมจุกยาง
- ปีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- ปีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

4. สำหรับวัดขนาด-ชั่งน้ำหนัก

4.1 สำหรับวัดขนาด

- เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (vernier caliper) ชนิดพลาสติก ยี่ห้อ sonic ขนาด 15 เซนติเมตร x 1 มิลลิเมตร
- อุปกรณ์วัดขนาดผ่านกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ocular micrometer และ stage micrometer

4.2 สำหรับชั่งน้ำหนัก

- เครื่องชั่งสปริงขนาด 1 กิโลกรัม x 5 กรัม ยี่ห้อ CAMRY
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter Toledo รุ่น PL -303

วิธีการ

ทำการศึกษาระดับความเค็มในการฟักไข่ปลิงดำ และปัจจัยที่เหมาะสมในการอนุบาลตัวอ่อน ปลิงดำตั้งแต่ระยะแรกฟัก (auricularia) จนถึงระยะลงเกาะ (pentactular) ปัจจัยที่เลือกนำมาศึกษา ประกอบด้วย สัดส่วนชนิดอาหาร ระดับความเค็ม และการให้แสง โดยมีขั้นตอนวิธีการคือ การเตรียมการทดลอง (การเตรียมน้ำทะเลและอุปกรณ์การทดลอง การรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ การเพาะพันธุ์ และการเตรียมตัวอ่อนระยะ auricularia) การทดลอง (การอนุบาลตัวอ่อนระยะ auricularia จนกระทั่งลงเกาะโดยอาศัยปัจจัยที่กำหนด) และการเก็บข้อมูล รายละเอียดของแต่ละขั้นตอนมีดังนี้

1. การเตรียมการทดลอง

1.1. การเตรียมน้ำทะเลและวัสดุอุปกรณ์การทดลอง

1.1.1 การเตรียมน้ำทะเล: โดยการสูบน้ำทะเลมาพักไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปผ่านระบบกรองทรายตามวิธีการของ Xiyin *et al.* (2004) และฆ่าเชื้อด้วยแสงยูวีตามวิธีการของ ธเนศ (2551) จากนั้นกรองโดยใช้ถุงกรองละเอียดอีกครั้งเพื่อกำจัดสิ่งแขวนลอยในน้ำ และปรับความเค็มตามที่กำหนด (Laxminarayana, 2005) พักไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

1.1.2 การเตรียมวัสดุอุปกรณ์: จัดหาวัสดุและอุปกรณ์ให้เพียงพอสำหรับการทดลอง นำมาล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้น 300 ส่วนในล้าน จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ส่วนอุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารมีชีวิตจะมีวิธีการเตรียมตาม โชคชัย (2554) และ Lavens and Sorgeloos (1996)

1.2. การรวบรวมพ่อแม่พันธุ์

ทำการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลิงดำจากธรรมชาติ บริเวณชายฝั่งทะเลในช่วงเวลาน้ำลง แหล่งรวบรวมพ่อแม่พันธุ์คือชายฝั่งอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร วิธีการรวบรวมอาศัยการดำผิวน้ำ (snorkeling) และใช้มือเก็บ โดยคัดเลือกเฉพาะปลิงดำที่มีขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 250 กรัมขึ้นไป มีความยาวลำตัวประมาณ 20 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) นำมาพักเป็นเวลา 1 คืน เพื่อรอการเพาะพันธุ์ น้ำทะเลที่ใช้มีระดับความเค็มใกล้เคียงกับแหล่งอาศัยเดิมของพ่อแม่พันธุ์ (ประมาณ 30 ส่วนในพัน) เพื่อให้พ่อแม่พันธุ์ขับถ่ายบางส่วนในระบบทางเดินอาหาร แต่จะไม่พักนานเกิน 1 คืน เนื่องจากจะทำให้เกิดความเครียดทำให้พ่อแม่พันธุ์ไม่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์



ภาพที่ 6 พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำจากธรรมชาติ

1.3. การเพาะพันธุ์

การเพาะพันธุ์อาศัยการกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยอสุจิและไข่ ออกมาผสมกันใต้น้ำทะเลที่เตรียมไว้ วิธีการกระตุ้นเป็นการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ โดยการเตรียมน้ำทะเลที่มีระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน (ระดับเดียวกับน้ำที่ใช้สำหรับฟักพ่อแม่พันธุ์) การกระตุ้นใช้ถังพลาสติกสีเหลี่ยมขนาดบรรจุ 160 ลิตร จำนวน 2 ถัง เติมน้ำทะเลสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ถึงที่ 1 สำหรับการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ ในถังนี้จะปรับอุณหภูมิน้ำให้ต่ำกว่าในถังฟักพ่อแม่พันธุ์ประมาณ 5 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำแข็งบรรจุถังพลาสติก ส่วนถึงที่ 2 สำหรับการปล่อยไข่และอสุจิ อุณหภูมิน้ำจะเท่ากับในถังฟักพ่อแม่พันธุ์

กระตุ้นโดยการนำพ่อแม่พันธุ์ในถังฟักจำนวน 20 ตัว ใส่ลงในถังที่ 1 ซึ่งทำการปรับอุณหภูมิแล้วทิ้งไว้ 30 นาที และให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นนำพ่อแม่พันธุ์ทั้งหมดไปใส่ในถังที่ 2 เพื่อให้ปล่อยอสุจิและไข่ ในถังนี้จะให้อากาศตลอดเวลาเช่นกัน ซึ่งตามปกติพ่อแม่พันธุ์จะปล่อยอสุจิออกมาก่อนจากนั้นแม่พันธุ์จะปล่อยไข่ออกมาภายหลัง โดยพ่อแม่พันธุ์จะปล่อยอสุจิในช่วงเวลา 15-30 นาที (ภาพที่ 7) ส่วนแม่พันธุ์จะปล่อยไข่หลังจากนั้นประมาณ 5-30 นาที (ภาพที่ 7) ระยะเวลาในการปล่อยจะแตกต่างกันตามความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ที่นำมากระตุ้น ไข่ปลิงดำมีสีแดงอมส้มหรือสีชมพูอมส้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 140-150 ไมครอน (ภาพที่ 8) หลังจากปลิงทะเลปล่อยอสุจิและไข่เสร็จสิ้นแล้วจะนำพ่อแม่พันธุ์ออกจากถัง รอให้ไข่ได้รับการผสมกับอสุจิประมาณ 30 นาที จากนั้นย้ายไข่ไปใส่ในถังฟักไข่เพื่อผลิตตัวอ่อนระยะ auricularia ต่อไป

1.4. การเตรียมอ่อนระยะ auricularia

เตรียมตัวอ่อนระยะ auricularia (ภาพที่ 9) โดยการนำไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไปใส่ในถังฟัก โดยใช้ถังพลาสติกกลมขนาดบรรจุ 200 ลิตร ที่ระดับความเค็มน้ำ 30 ส่วนในพัน ให้อากาศตลอดเวลา ในระหว่างฟักไข่จะตรวจสอบการพัฒนาก่อนการฟักออกเป็นตัวอ่อนจนกระทั่งฟักออกเป็นตัวอ่อนระยะแรกหรือระยะ auricularia ระยะเวลาการฟักประมาณ 45-48 ชั่วโมง ขนาดความยาวของตัวอ่อนประมาณ 400-450 ไมครอน ตรวจสอบความหนาแน่นและสัณฐานจำนวนของตัวอ่อนนำไปอนุบาลตามตามปัจจัยที่กำหนดต่อไป

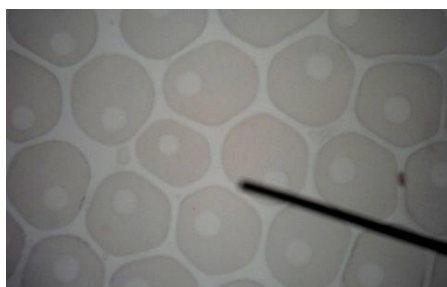


ลักษณะการปล่อยอสุจิของพ่อพันธุ์



ลักษณะการปล่อยไข่ของแม่พันธุ์

ภาพที่ 7 ลักษณะการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ



ภาพที่ 8 ลักษณะไข่ของปลิงดำ



ภาพที่ 9 ลักษณะตัวอ่อนระยะ auricularia ของปลิงดำ

1.5. การเตรียมแพลงก์ตอนพืช

สำหรับการเตรียมแพลงก์ตอนพืชที่จะนำมาใช้เป็นอาหารของตัวอ่อนปลิงดำนั้น มีวิธีการเตรียมโดยอ้างอิงตาม โชคชัย (2554) และ Lavens and Sorgeloos (1996)

1.6. การเตรียมวัสดุเกาะ

วัสดุที่นำมาใช้เป็นวัสดุเกาะคือแผ่นพลาสติกใสขนาด 20x30 เซนติเมตร เตรียมโดยการนำมาแช่ในน้ำทะเลเพื่อให้ปราศจากพิษเนื่องจากเป็นวัสดุสังเคราะห์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ ตามวิธีการของ Li and Kong (2010) โดยการแช่ในด่างทับทิม (potassium permanganate) ความเข้มข้น 20 ส่วนในล้าน นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำจืด และตากให้แห้งก่อนนำไปใช้ และก่อนนำไปให้ตัวอ่อนปลิงดำลงเกาะจะนำมาแช่น้ำทะเล พร้อมใส่อาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ก่อนเข้าระยะ pentactular ประมาณ 3-5 วัน เพื่อให้เกิดการเคลือบผิวของอาหารบนวัสดุเกาะหรือเกิด biofilm แล้วจึงนำไปใส่ในถังทดลอง

2. การทดลอง

ทำการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการอนุบาล 3 ปัจจัย ได้แก่ สัดส่วนชนิดอาหาร ระดับความเค็ม และการได้รับแสง โดยความเค็มมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับสรีรวิทยาของร่างกายสัตว์ทะเล จึงกำหนดให้การศึกษาเกี่ยวกับระดับความเค็มเป็นปัจจัยเริ่มต้นในการทดลอง และเพิ่มเติมการศึกษาระดับความเค็มที่ใช้ในการฟักไข่ปลิงดำ ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ครอบคลุมและเกี่ยวข้องกับพัฒนาการของตัวอ่อนมากยิ่งขึ้น โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง ดังต่อไปนี้

2.1. การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับความเค็มในการฟักไข่ปลิงดำ

2.1.1 แผนการทดลอง

ศึกษาระดับความเค็มที่เหมาะสมในการฟักไข่ปลิงดำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) กำหนดให้ระดับความเค็มเป็นสิ่งที่ทดลอง (treatments) แบ่งออกเป็น 5 ระดับ (ชุดการทดลอง) แต่ละชุดการทดลองหรือแต่ละระดับความเค็มแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ (replications) รวมทั้งสิ้น 15 หน่วยการทดลอง (experimental units) ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ฟักไข่ปลิงดำที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน
- ชุดการทดลองที่ 2 ฟักไข่ปลิงดำที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน
- ชุดการทดลองที่ 3 ฟักไข่ปลิงดำที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 4 ฟักไข่ปลิงดำที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน
- ชุดการทดลองที่ 5 ฟักไข่ปลิงดำที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน

2.1.2 วิธีการทดลอง

ทดลองฟักไข่ปลิงดำในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 15 ใบ โดยมีระดับความเค็มน้ำตามหน่วยการทดลองที่กำหนด ความหนาแน่นของไข่ประมาณ 50 ฟองต่อมิลลิลิตร ในระหว่างฟักจะให้อากาศตลอดเวลา ในระหว่างฟักจะทำการตรวจสอบพัฒนาการของคัพภะจนกระทั่งตัวอ่อนฟักออกจากไข่ บันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ข้อมูลความระดับเค็มที่เหมาะสมในการฟักจะนำไปใช้ในการอนุบาลตัวอ่อนระยะ auricularia จนถึงระยะ pentactula ในการทดลองที่ 2 ต่อไป

2.2. การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับความเค็มในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

2.2.1 แผนการทดลอง

การศึกษาระดับความเค็มที่เหมาะสมในการอนุบาล โดยการคัดเลือกระดับความเค็มน้ำจากการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มของน้ำตามแนวชายฝั่ง ที่เป็นแหล่งเลี้ยงตัวของปลิงดำในธรรมชาติ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กำหนดให้ระดับความเค็มเป็นสิ่งทดลอง แบ่งออกเป็น 5 ระดับ (ชุดการทดลอง) แต่ละชุดการทดลองหรือแต่ละระดับความเค็มแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 15 หน่วยการทดลอง ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 อนุบาลที่ระดับความเค็มน้ำ 20 ส่วนในพัน
- ชุดการทดลองที่ 2 อนุบาลที่ระดับความเค็มน้ำ 25 ส่วนในพัน
- ชุดการทดลองที่ 3 อนุบาลที่ระดับความเค็มน้ำ 30 ส่วนในพัน (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 4 อนุบาลที่ระดับความเค็มน้ำ 35 ส่วนในพัน
- ชุดการทดลองที่ 5 อนุบาลที่ระดับความเค็มน้ำ 40 ส่วนในพัน

2.2.2 วิธีการทดลอง

ทดลองการโดยการเตรียมถังอนุบาลขนาด 200 ลิตร จำนวน 15 ถัง ตามหน่วยการทดลอง บรรจุน้ำที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีระดับความเค็มตามชุดการทดลอง อุณหภูมิ น้ำประมาณ 28 องศาเซลเซียส ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ปลอยตัวอ่อนระยะ auricularia ลงเลี้ยงความหนาแน่น 200 ตัวต่อลิตร (Laxminarayana, 2005) หรือ 20,000 ตัวต่อหน่วยการทดลอง ให้ *Chaetoceros* เป็นอาหาร อัตราความหนาแน่น 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Laxminarayana, 2005) วันละ 2 ครั้ง เวลา 06.00 และ 18.00 น. อนุบาลจนกระทั่งลูกปลิงดำลงเกาะ ในระหว่างการอนุบาลไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ แต่จะมีการเติมน้ำทะเลเพิ่ม และใส่วัสดุเกาะเมื่อตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ late doliolaria

2.3. การทดลองที่ 3 การศึกษาสัดส่วนชนิดอาหารในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

2.3.1 แผนการทดลอง

การศึกษาสัดส่วนชนิดอาหารเป็นการหาสัดส่วนที่เหมาะสมของแพลงก์ตอน 4 ชนิด ได้แก่ *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana* และ *Skeletonema costatum* แผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ ปัจจัยการทดลองคือสัดส่วนของแพลงก์ตอน แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 16 หน่วยทดลอง คือ

- ชุดการทดลองที่ 1 อนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงชนิดเดียว (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลองที่ 2 อนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1
- ชุดการทดลองที่ 3 อนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* สัดส่วน 1:1
- ชุดการทดลองที่ 4 อนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1

2.3.2 วิธีการทดลอง

ทดลองโดยการเตรียมถังอนุบาลขนาด 200 ลิตร จำนวน 16 ถัง ตามหน่วยการทดลอง บรรจุน้ำที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อแล้ว ความเค็มน้ำคัดเลือกจากระดับที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2 อุณหภูมิน้ำประมาณ 28 องศาเซลเซียส ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ปล่อยตัวอ่อนระยะ auricularia ลงเลี้ยงที่ความหนาแน่น 200 ตัวต่อลิตร อนุบาลด้วยแพลงก์ตอนตามสัดส่วนในแต่ละชุดการทดลองที่กำหนด อัตราความหนาแน่น 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันละ 2 ครั้ง เวลา 06.00 และ 18.00 น. อนุบาลจนกระทั่งลูกปลิงดำลงเกาะหรือพัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactular ในระหว่างการอนุบาลไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเนื่องจากตัวอ่อนมีขนาดเล็กมาก แต่จะมีการเติมน้ำทะเลเพิ่ม และใส่วัสดุเกาะเมื่อตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ late dolioaria เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองทำการคัดเลือกสัดส่วนอาหารที่เหมาะสมนำไปใช้ในการทดลองที่ 4

2.4. การทดลองที่ 4 การศึกษาการให้แสงในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

2.4.1 แผนการทดลอง

เป็นการศึกษาผลของการได้รับแสงและไม่ได้รับแสง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมีปัจจัยการทดลองเป็นช่วงเวลากการได้รับแสงและไม่ได้รับแสง แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 16 หน่วยทดลอง คือ

- ชุดการทดลองที่ 1 อนุบาลโดยไม่ให้แสงตลอดเวลา
- ชุดการทดลองที่ 2 อนุบาลโดยการให้แสงตลอดเวลา
- ชุดการทดลองที่ 3 อนุบาลโดยการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง
- ชุดการทดลองที่ 4 อนุบาลโดยการให้แสงตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม)

2.4.2 วิธีการทดลอง

ทดลองโดยการเตรียมถังอนุบาลขนาด 200 ลิตร จำนวน 16 ถัง ตามหน่วยการทดลอง บรรจุน้ำที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีระดับความเค็มที่เหมาะสมตามการทดลองที่ 2 อุณหภูมิน้ำประมาณ 28 องศาเซลเซียส ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ปล่อยตัวอ่อนระยะ auricularia ลงเลี้ยงความหนาแน่น 200 ตัวต่อลิตร ให้อาหารที่เหมาะสมโดยการคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 อัตราความหนาแน่น 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันละ 2 ครั้ง เวลา 06.00 และ 18.00 น. โดยชุดการทดลองที่ 1 คลุมถังด้วยผ้าใบทึบแสงสีดำเพื่อไม่ให้แสงส่องผ่าน ชุดการทดลองที่ 2 ให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ชุดการทดลองที่ 3 ให้แสง 12 ชั่วโมง ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ สลับกับการคลุมผ้าใบทึบแสงสีดำ และชุดการทดลองที่ 4 ให้แสงและไม่ให้แสงตามธรรมชาติ อนุบาลจนกระทั่งลูกปลิงด้าลงเกาะ ในระหว่างการอนุบาลไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ แต่จะมีการเติมน้ำทะเลเพิ่มและใส่วัสดุเกาะเมื่อตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ late doliolaria

3. การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผล

3.1. การเก็บรวบรวมข้อมูล:

การทดลองฟักไข่ปลิงด้าในน้ำทะเลที่ระดับความเค็มต่าง ๆ จะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ อัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก ระยะเวลาการฟัก รวมถึงพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของคัพพะ สำหรับการทดลองศึกษาในระดับความเค็ม สัดส่วนชนิดอาหาร และการให้แสง ในการอนุบาลปลิงด้าระยะวัยอ่อนนั้น จะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลขนาดความยาว อัตราการรอดตาย (survival rate) อัตราการลงเกาะ (settlement rate) และระยะเวลาการพัฒนาและลงเกาะ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- อัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) โดยการนำไข่ที่ปล่อยออกมาและผสมกับสเปิร์มแล้วมาฟักในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน รวบรวมทั้งตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula นับจำนวน และคำนวณอัตราการปฏิสนธิจาก

$$\text{อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนระยะ gastrula}}{\text{จำนวนไข่ดีทั้งหมด}} \times 100$$

- อัตราฟัก (hatching rate) คำนวณจาก

$$\text{อัตราฟัก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อน gastrula ที่ฟักออกจากไข่}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100$$

- ระยะเวลาการฟัก คำนวณจากเวลาที่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งตัวอ่อนฟักออกจากไข่

- พัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของคัพภะ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของคัพภะตั้งแต่ไข่ได้รับการผสมจนกระทั่งพัฒนาเข้าสู่ระยะ auricularia โดยทำการตรวจสอบทุก 1 ชั่วโมง บันทึกการเปลี่ยนแปลง และวัดขนาดของแต่ละระยะผ่านกล้องจุลทรรศน์พร้อมบันทึกภาพประกอบ

- ขนาดของตัวอ่อน การวัดขนาดของตัวอ่อนอาศัยวิธีการวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีอุปกรณ์สำหรับวัดคือ eyepiece micrometer และ stage micrometer ซึ่งเป็นการวัดขนาดความยาวและรายงานผลในหน่วยไมครอน ประกอบด้วยขนาดของตัวอ่อนระยะ auricularia เมื่อพัฒนาสมบูรณ์ (fully auricularia) และขนาดของตัวอ่อนระยะ doliolaria แต่จะไม่วัดขนาดของ pentactula เนื่องจากตัวอ่อนมีการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อทำให้วัดความยาวได้ยากและผลที่ได้อาจไม่สะท้อนขนาดที่แท้จริงของตัวอ่อนระยะนี้

- อัตราการรอดตาย (survival rate) พิจารณาจากจำนวนตัวอ่อนที่เหลือรอดในแต่ละระยะ ได้แก่ ระยะ auricularia, doliolaria และ pentactula แล้วนำมาคำนวณอัตราการรอดตายในแต่ละระยะ ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่เหลือแต่ละระยะ} \times 100}{\text{จำนวน auricularia เมื่อเริ่มทดลอง}}$$

- อัตราการลงเกาะ (settlement rate) พิจารณาจากจำนวนตัวอ่อนระยะ pentactula ที่ลงเกาะบนวัสดุ แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการลงเกาะ ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวน pentactula ที่ลงเกาะ} \times 100}{\text{จำนวน auricularia เมื่อเริ่มทดลอง}}$$

- ระยะเวลาการพัฒนาและลงเกาะ พิจารณาจากช่วงเวลาที่ตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ จนกระทั่งลงเกาะกับวัสดุ

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล:

นำข้อมูลที่รวบรวมได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป