

บทที่ 4 ผลการวิจัย

ผล

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการอนุบาลตัวอ่อนปลิงดำ (*Holothuria atra* Jaeger, 1833) ระยะ auricularia จนถึงระยะลงเกาะ แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็น การศึกษาระดับความเค็มในการฟักไข่ปลิงดำ ซึ่งทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาระดับความเค็มน้ำที่เหมาะสมที่สุดในการฟักไข่ โดยจะเกี่ยวข้องกับการผลิตตัวอ่อนระยะ auricularia สำหรับการศึกษา ปัจจัยที่เหมาะสมในการอนุบาลต่อไป การอนุบาลตัวอ่อนตั้งแต่ระยะแรกฟัก (auricularia) จนถึง ระยะลงเกาะ (pentactula) นั้น จะทำการทดลองศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ประการ ได้แก่ สัดส่วน อนุอาหาร ระดับความเค็ม และการให้แสง แบ่งได้เป็น 3 การทดลอง มีรายละเอียดผลการทดลอง ดังนี้

1. การศึกษาระดับความเค็มในการฟักไข่ปลิงดำ

การศึกษาระดับความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการฟักไข่ของปลิงดำ โดยการทดลองนำไข่ที่ได้ จากการกระตุ้นและได้รับการผสมกับอสุจิแล้วไปทำการฟักในน้ำทะเลที่ระดับความเค็มต่างกัน 5 ระดับ คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 ส่วนในพัน ผลการทดลองพบว่าไข่ปลิงดำมีการปฏิสนธิ การฟัก ขนาดของไข่และตัวอ่อน รวมถึงพัฒนาการของคัพภะ (embryo) ดังต่อไปนี้

1.1. การปฏิสนธิและอัตราการปฏิสนธิ

การทดลองนำไข่ปลิงดำที่ได้รับการผสมแล้วไปฟักในน้ำทะเลที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 ส่วนในพัน โดยมีจำนวนไข่เริ่มต้นเฉลี่ย $52,000.33 \pm 2,349.733$ ฟอง พบว่าที่ระดับความเค็ม 40 และ 45 ส่วนในพัน ไข่ทั้งหมดไม่สามารถ พัฒนาถึงระยะ gastrula ได้ แสดงว่าที่ระดับความเค็มดังกล่าวทำให้พัฒนาการของคัพภะไม่สมบูรณ์ หรือไข่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ โดยที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน คัพภะมีการพัฒนาถึงระยะ 32 เซลล์ แต่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ เช่นเดียวกับที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน ที่คัพภะมีการพัฒนาถึง ระยะ 16 เซลล์ เท่านั้น

ระดับความเค็มที่ทำให้ไข่ปลิงดำมีพัฒนาการจนถึงระยะ gastrula และถือว่าไข่ได้รับการ ปฏิสนธิ คือ 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน มีจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเฉลี่ย $25,388.67 \pm 2,002.325$; $36,499.67 \pm 2,920.062$ และ $16,944.00 \pm 3,351.250$ ฟอง ตามลำดับ คิด เป็นอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย 50.776 ± 4.006 ; 72.998 ± 5.840 และ 33.887 ± 6.702 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน เป็นระดับที่ไข่ปลิงดำมีการปฏิสนธิและอัตรา การปฏิสนธิสูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับความเค็ม 25 และ 35 ส่วนในพัน

และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเค็ม 25 และ 30 ส่วนในพัน พบว่าที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีการปฏิสนธิและอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การปฏิสนธิของไขปลิงดำในน้ำทะเลที่มีความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	จำนวนไข่ที่ได้รับปฏิสนธิ** (ฟอง)	อัตราการปฏิสนธิ** (เปอร์เซ็นต์)
25	25,388.67±2,002.325 ^b	50.776±4.006 ^b
30	36,499.67±2,920.062 ^a	72.998±5.840 ^a
35	16,944.00±3,351.250 ^c	33.887±6.702 ^c
40	-	-
45	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

1.2. การฟักและอัตราการฟัก

จากจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเมื่อทดลองฟักที่ระดับความเค็ม 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน 25,388.67±2,002.32; 36,499.67±2,920.06 และ 16,944.00±3,351.25 ฟอง ตามลำดับ พบว่าไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิสามารถพัฒนาจนกระทั่งฟักเป็นตัวอ่อน auricularia ทั้งสิ้น 19,888.33±3,276.02; 32,944.00±1,575.39 และ 9,444.33±2,916.90 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการฟัก 78.100±9.166, 90.420±3.191 และ 54.978±7.877 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าทั้งจำนวนตัวอ่อนที่ฟักและอัตราการฟักในแต่ละระดับความเค็ม มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยจำนวนตัวอ่อนที่ฟักในระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีค่าเฉลี่ยสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับที่ความเค็ม 25 และ 35 ส่วนในพัน สอดคล้องกับอัตราการฟัก ซึ่งพบว่าที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเช่นเดียวกันแต่ไม่แตกต่างกับที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน ในขณะที่อัตราการฟักที่ระดับความเค็ม 25 และ 30 ส่วนในพัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 อัตราการฟักของไข่ปลิงดำในน้ำทะเลที่มีความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	จำนวนไข่ที่ได้รับการ ปฏิสนธิ** (ฟอง)	จำนวนไข่ที่ฟัก** (ฟอง)	อัตราการฟัก** (เปอร์เซ็นต์)
25	25,388.67±2,002.32 ^b	19,888.33±3,276.02 ^b	78.100±9.166 ^a
30	36,499.67±2,920.06 ^a	32,944.00±1,575.39 ^a	90.420±3.191 ^a
35	16,944.00±3,351.25 ^c	9,444.33±2,916.90 ^c	54.978±7.877 ^b
40	-	-	-
45	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสมมติเดียวกัน

3. ระยะเวลาการพัฒนา

พัฒนาการของคัพภะปลิงดำที่ความเค็ม 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน มีระยะเวลาการปฏิสนธิเฉลี่ย 34.000±4.582; 27.333±2.886 และ 38.000±0.000 ชั่วโมง ตามลำดับ ระยะเวลาในการฟักเฉลี่ย 63.333±1.527; 46.333±2.081 และ 59.333±1.527 ชั่วโมง ตามลำดับ ระยะเวลาการปฏิสนธิจนถึงระยะฟักเท่ากับ 29.333±3.214; 19.000±1.000 และ 21.333±1.527 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งทุกระดับความเค็มมีระยะเวลาการปฏิสนธิและระยะเวลาการฟักแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จะเห็นได้ว่าที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน ไข่ปลิงดำสามารถพัฒนาจนถึงระยะปฏิสนธิสมบูรณ์และฟักออกเป็นตัวได้ในระยะเวลาสั้นกว่าที่ระดับความเค็ม 25 และ 35 ส่วนในพัน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระยะเวลาการพัฒนาของคัพภะปลิงดำเมื่อทำการฟักที่ความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	ระยะเวลาการ ปฏิสนธิ** (ชั่วโมง)	ระยะเวลาการฟัก** (ชั่วโมง)	ระยะเวลาการปฏิสนธิ (gastrula)- ฟัก** (ชั่วโมง)
25	34.000±4.582 ^{ab}	63.333±1.527 ^a	29.333±3.214 ^a
30	27.333±2.886 ^b	46.333±2.081 ^b	19.000±1.000 ^b
35	38.000±0.000 ^a	59.333±1.527 ^a	21.333±1.527 ^b
40	-	-	-
45	-	-	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสมมติเดียวกัน

1. 4. การพัฒนาของคัพภะ

1.4.1. ขนาดของคัพภะ (ตารางที่ 7)

- ระยะ 2 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 20, 25 และ 30 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะที่ใกล้เคียงกัน คือ 156.666 ± 11.547 , 156.666 ± 5.773 และ 153.333 ± 5.773 ไมครอน ตามลำดับ ต่างจากระดับความเค็ม 40 และ 45 ส่วนในพัน ที่มีขนาด 133.333 ± 5.773 และ 123.333 ± 5.773 ไมครอน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า

- ระยะ 4 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุด 173.333 ± 25.166 ไมครอน รองลงมาคือระดับความเค็ม 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะ 166.666 ± 20.816 , 156.666 ± 5.773 และ 140.000 ± 17.320 ไมครอน ตามลำดับ และที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน มีขนาดเล็กที่สุด 123.333 ± 5.773 ไมครอน

- ระยะ 8 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุด 156.666 ± 11.547 ไมครอน รองลงมาคือระดับความเค็ม 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะ 146.666 ± 32.145 , 136.666 ± 32.145 และ 140.000 ± 10.000 ไมครอน ตามลำดับ และที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน มีขนาดเล็กที่สุด 130.000 ± 10.000 ไมครอน

- ระยะ 16 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุด 160.000 ± 10.000 ไมครอน รองลงมาคือระดับความเค็ม 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะ 150.000 ± 0.000 , 150.000 ± 0.000 และ 143.333 ± 5.773 ไมครอน ตามลำดับ และที่ระดับความเค็ม 45 มีขนาดของคัพภะเล็กที่สุด 110.000 ± 10.000 ไมครอน

- ระยะ 32 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน คัพภะไม่สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะนี้ได้ โดยหลังจากระยะ 16 เซลล์ พบว่าคัพภะไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อได้และเสื่อมไปในที่สุด ที่ความเค็ม 40 ส่วนในพัน คัพภะมีขนาดเล็กที่สุด คือ 130.000 ± 10.000 ไมครอน ส่วนที่ความเค็ม 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน มีขนาด 153.333 ± 5.773 , 153.333 ± 5.773 และ 146.666 ± 5.773 ไมครอน ตามลำดับ

- ระยะ 64 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน คัพภะไม่สามารถพัฒนาจากรยะ 32 เซลล์ เข้าสู่ระยะนี้ได้ ดังนั้นระดับความเค็มที่คัพภะสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ 64 เซลล์ได้ มี 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน ซึ่งมีขนาดของคัพภะ 163.333 ± 5.773 , 150.000 ± 0.000 และ 146.666 ± 5.773 ไมครอน ตามลำดับ

- ระยะ 128 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุด 160.000 ± 10.000 ไมครอน รองลงมาคือความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีขนาด 153.333 ± 5.773 ไมครอน และ 25 ส่วนในพัน มีขนาดเล็กที่สุด 146.666 ± 5.773 ไมครอน

- ระยะเวลา Blastula: คัพภะของปลิงดำที่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastula และมีขนาดใหญ่ที่สุดคือที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีขนาด 156.666 ± 5.773 ไมครอน รองมาคือความเค็ม 35 ส่วนในพัน ขนาด 150.000 ± 10.000 ไมครอน และ 25 ส่วนในพัน ขนาดเล็กที่สุด 146.666 ± 5.773 ไมครอน

- ระยะเวลา Gastrula: คัพภะที่พัฒนาเข้าสู่ระยะนี้ถือว่าได้รับการปฏิสนธิสมบูรณ์ โดยที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุดคือ 223.333 ± 5.773 ไมครอน ในขณะที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีขนาดเล็กที่สุด 163.333 ± 5.773 ไมครอน ส่วนความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีขนาด 203.333 ± 15.275 ไมครอน

- ตัวอ่อนระยะ Auricularia: ระยะ auricularia เป็นตัวอ่อนระยะแรกของปลิงดำ ดังนั้นจึงถือว่าเป็นระยะแรกฟัก ซึ่งพบว่าความเค็มที่มีขนาดตัวอ่อนใหญ่ที่สุดคือ 30 ส่วนในพัน มีขนาด 403.333 ± 17.275 ไมครอน รองลงมาคือความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีขนาด 286.666 ± 23.094 ไมครอน ในขณะที่ 35 ส่วนในพัน มีขนาดเล็กที่สุด 166.666 ± 15.275 ไมครอน

ตารางที่ 7 ขนาดคัพภะและตัวอ่อนปลิงดำเมื่อทำการฟักที่ความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ

ระยะ	ขนาดคัพภะและตัวอ่อน (ไมครอน)				
	25	30	35	40	45
2-cell	156.666 ± 11.547	153.333 ± 5.773	153.333 ± 5.773	133.333 ± 5.773	123.333 ± 5.773
4-cell	173.333 ± 25.166	156.666 ± 5.773	156.666 ± 5.773	140.000 ± 17.320	123.333 ± 5.773
8-cell	156.666 ± 11.547	146.666 ± 32.145	136.666 ± 32.145	140.000 ± 10.000	130.000 ± 10.000
16-cell	160.000 ± 0.000	150.000 ± 0.000	150.000 ± 0.000	143.333 ± 5.773	110.000 ± 10.000
32-cell	153.333 ± 5.773	146.666 ± 5.773	146.666 ± 5.773	130.000 ± 10.000	-
64-cell	163.333 ± 5.773	146.666 ± 5.773	146.666 ± 5.773	-	-
128-cell	160.000 ± 10.000	146.666 ± 5.773	146.666 ± 5.773	-	-
blastula	146.666 ± 5.773	150.000 ± 10.000	150.000 ± 10.000	-	-
gastrula	203.333 ± 15.275	223.333 ± 5.773	163.333 ± 5.773	-	-
auricularia	286.666 ± 23.094	403.333 ± 17.275	166.666 ± 15.275	-	-

4.2. ระยะเวลาการพัฒนาของคัพภะ (ภาพที่ 10)

- ระยะ 2 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 20, 25 และ 30 ส่วนในพัน ไข่ของปลิงดำใช้ระยะเท่ากันในการแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์ เป็น 2 เซลล์ คือ 1 ชั่วโมง ในขณะที่ความเค็ม 40 และ 45 ส่วนในพัน ใช้ระยะเวลานานกว่าคือช่วงระหว่าง 1 ถึง 2 ชั่วโมง

- ระยะ 4 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน คัพภะใช้ระยะเวลาในการพัฒนาเข้าสู่ระยะ 4 เซลล์ 2 ชั่วโมง ที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน ใช้ระยะเวลาในช่วงระหว่าง 2-3 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน ใช้ระยะเวลานานที่สุดคือ 3 ชั่วโมง

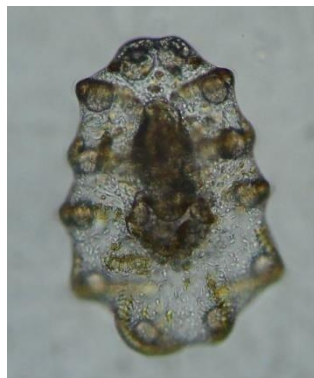
- ระยะ 8 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 และ 30 ส่วนในพัน คัพภะใช้ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากันในการพัฒนาเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ ในขณะที่ความเค็ม 35 ใช้ระยะเวลาระหว่าง 4-5 ชั่วโมง ความเค็ม 40 ส่วนในพัน ใช้เวลาระหว่าง 5-6 ชั่วโมง ในขณะที่ความเค็ม 45 ส่วนในพัน ใช้เวลานานที่สุดคือ 6 ชั่วโมง
- ระยะ 16 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 และ 35 ส่วนในพัน คัพภะใช้ระยะเวลาเท่ากันในการพัฒนาเข้าสู่ระยะ 16 เซลล์ คือ ช่วงระหว่าง 5-6 ชั่วโมง ความเค็ม 40 ส่วนในพัน ใช้เวลา 8 ชั่วโมง ในขณะที่ความเค็ม 45 ส่วนในพัน ใช้เวลานานที่สุดคือช่วงระหว่าง 8-9 ชั่วโมง ส่วนระดับความเค็มที่คัพภะใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการพัฒนาเข้าสู่ระยะนี้คือ 30 ส่วนในพัน
- ระยะ 32 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 45 ส่วนในพัน คัพภะไม่สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะนี้ได้ โดยหลังจากระยะ 16 เซลล์ พบว่าคัพภะไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อได้และเสื่อมไปในที่สุด ที่ความเค็ม 40 ส่วนในพัน คัพภะใช้ระยะเวลาในการพัฒนาเข้าสู่ระยะ 32 เซลล์ นานที่สุดคือ 12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันใช้เวลาสั้นที่สุดคือระหว่าง 7-8 ชั่วโมง ส่วนที่ความเค็ม 25 และ 35 ส่วนในพัน ใช้ระยะเวลา 8 และ 8-9 ชั่วโมง ตามลำดับ
- ระยะ 64 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน คัพภะไม่สามารถพัฒนาจากระยะ 32 เซลล์ เข้าสู่ระยะนี้ได้ ดังนั้นระดับความเค็มที่คัพภะสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ 64 เซลล์ได้ มี 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน โดย 30 ส่วนในพันใช้เวลาสั้นที่สุดคือช่วงระหว่าง 9-10 ชั่วโมง ความเค็ม 35 ส่วนในพัน ใช้เวลา 10 ชั่วโมง และ 25 ส่วนในพันใช้เวลานานที่สุดคือ 11 ชั่วโมง
- ระยะ 128 เซลล์: ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ 128 เซลล์สั้นที่สุดที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน คือ 13-14 ชั่วโมง ถัดมาคือความเค็ม 35 ส่วนในพัน นาน 15-16 ชั่วโมง และ 25 ส่วนในพัน นานที่สุด 17-18 ชั่วโมง
- ระยะ Blastula: คัพภะของปลิงดำมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastula สั้นที่สุดที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน คือ 19 ชั่วโมง ถัดมาคือความเค็ม 35 ส่วนในพัน นาน 20 ชั่วโมง และ 25 ส่วนในพัน นานที่สุด 23 ชั่วโมง
- ระยะ Gastrula: คัพภะที่พัฒนาเข้าสู่ระยะนี้ถือว่าได้รับการปฏิสนธิสมบูรณ์ โดยที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน ใช้เวลาสั้นที่สุดคือ 27 ชั่วโมง ในขณะที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน ใช้เวลานานที่สุด 38 ชั่วโมง ส่วนความเค็ม 25 ส่วนในพันใช้ระยะเวลา 34 ชั่วโมง
- ตัวอ่อนระยะ Auricularia: ระยะ auricularia เป็นตัวอ่อนระยะแรกของปลิงดำ ดังนั้นจึงถือว่าเป็นระยะแรกฟัก ซึ่งพบว่าที่ความเค็มที่ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการฟักไข่ปลิงดำคือ 30 ส่วนในพัน โดยใช้เวลา 46 ชั่วโมง ในขณะที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน ใช้เวลา 59 ชั่วโมง ในขณะที่ 25 ส่วนในพันใช้เวลานานที่สุดคือ 25 ส่วนในพัน นาน 63 ชั่วโมง

2. ลักษณะของตัวอ่อน

ตัวอ่อนของปลิงดำในช่วงที่ทำการศึกษแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ auricularia, doliolaria และ pentactula โดยทั้งสามระยะจะมีลักษณะและขนาดแตกต่างกัน ดังภาพที่ 11



ระยะ auricularia



ระยะ doliolaria

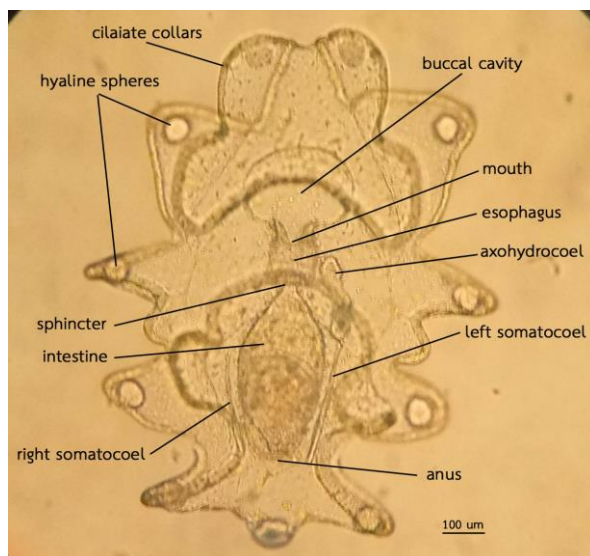


ระยะ pentactula

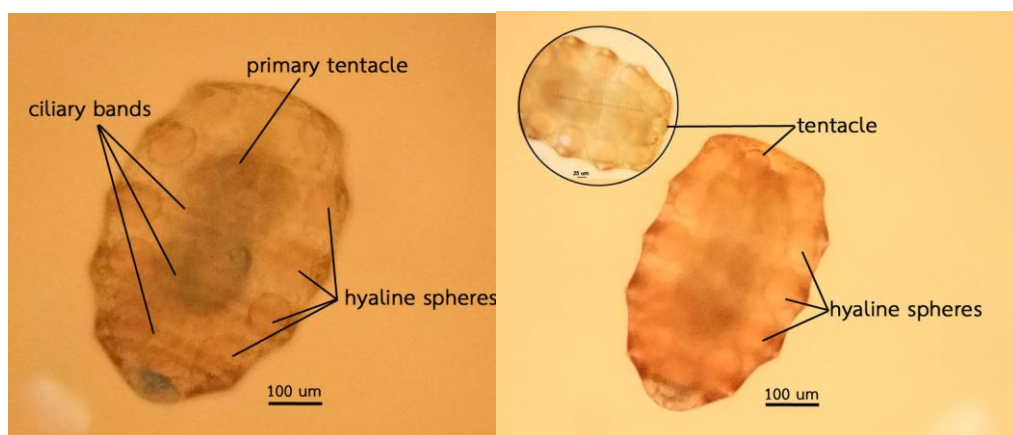
ภาพที่ 11 ตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia, doliolaria และ pentactula

2.1. ระยะ auricularia: เป็นตัวอ่อนระยะแรกฟัก มีขนาดอยู่ในช่วง 240-650 ไมครอน หรือเฉลี่ย 363.333 ± 85.554 ไมครอน โดยระยะ early auricularia นั้น โครงสร้างหลักของร่างกาย ประกอบด้วย ciliary bands, hyaline spheres, อุ้งปาก (buccal cavity), หลอดอาหาร (esophagus), ลำไส้ (intestine) ทวารร่วม (cloaca) ทวารหนัก (anus) เมื่อ auricularia พัฒนา สมบูรณ์แล้ว จะปรากฏส่วน somatocoel ทางด้านซ้ายและขวา, axohydrocoel, และกล้ามเนื้อหูรูด (sphincter) ระหว่างหลอดอาหารและลำไส้ และมีโครงสร้างอื่นเหมือนกับระยะ early auricularia ในขณะที่ระยะ late auricularia จะมีโครงสร้างทั้ง hyaline spheres, esophagus, intestine, somatocoel และ axohydrocoel เห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ในขณะที่ส่วนของ ciliary bands และ buccal cavity ลดรูปลง (ภาพที่ 12)

2.2. ระยะ doliolaria: ระยะ doliolaria ที่สมบูรณ์จะมีโครงสร้างประกอบด้วย hyaline spheres, primary tentacle (ส่วนของหนวดที่เริ่มพัฒนา), ciliary bands และ somatocoel ในระยะ doliolaria นี้ ตัวอ่อนจะมีลักษณะเป็นทรงรีคล้ายถังเปียร์ ส่วนของ hyaline sphere ขยายขนาดจนเห็นได้ชัดเจน ลำตัวมีสีขาวขุ่นถึงน้ำตาลออกเหลือง ในช่วงแรกของระยะนี้ส่วนของหนวดจะยังอยู่ภายในลำตัว และยื่นออกมาภายนอกให้เห็นเมื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactula (ภาพที่ 13)

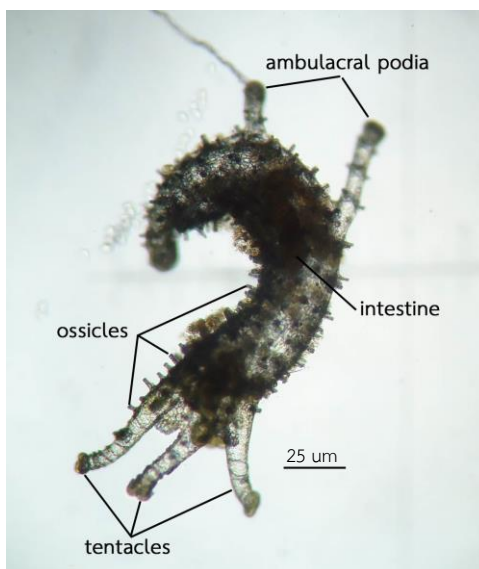


ภาพที่ 12 รายละเอียดลักษณะของตัวอ่อนปลิงตำระยะ auricularia



ภาพที่ 13 รายละเอียดลักษณะของตัวอ่อนปลิงตำระยะ doliolaria (ซ้าย) และระยะ early pentactula (ขวา)

2.3. ระยะ pentactula: ระยะนี้เป็นตัวอ่อนระยะสุดท้าย การดำรงชีวิตจะเปลี่ยนจากการล่องลอยอยู่ในมวลน้ำในลักษณะของแพลงก์ตอนมาเป็นยึดเกาะกับพื้น ดังนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะนี้หนวดจะยื่นออกมาภายนอกให้เห็นได้ชัดเจน โดยในระยะ early pentactula จะมีหนวดยื่นออกมา 5 เส้น ciliary bands ยังสามารถมองเห็นได้ ซึ่งระยะนี้จะไม่ลงเกาะสมบูรณ์ การลงเกาะของตัวอ่อนระยะนี้จะเห็นได้ชัดเมื่อส่วนของ ambulacral podia เริ่มปรากฏทางด้านท้อง ในขณะที่ด้านหลังยังคงมองเห็น hyaline sphere ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 14) ตัวอ่อนระยะนี้สังเกตได้ยากที่สุด เนื่องจากมีลำตัวค่อนข้างใสอาจมีสีขาวยุ่นบ้าง ประกอบการลงเกาะกับวัสดุเมื่อยังมีขนาดเล็กมาก ทำให้การนับจำนวนจึงต้องใช้ความละเอียดสูง



ภาพที่ 14 รายละเอียดลักษณะของตัวอ่อนปลิงตำระยะ juvenile

3. การศึกษาระดับความเค็มในการอนุบาลปลิงตำระยะวัยอ่อน

การทดลองอนุบาลตัวอ่อนปลิงตำระยะ auricularia จนถึงระยะ pentactula ในน้ำทะเลที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 20, 25, 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน ที่ความหนาแน่นประมาณ 200 ตัวต่อลิตร มีการรอดตาย ขนาด ระยะเวลาการพัฒนา และการลงเกาะของตัวอ่อนแตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

3.1. การรอดตายและอัตราการรอดตาย

การรอดตายของตัวอ่อนแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือการรอดตายของตัวอ่อนระยะ auricularia จนถึง doliolaria และจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula สำหรับผลการรอดตายในช่วงแรกคือจากระยะ auricularia จนถึง doliolaria เมื่ออนุบาลในระดับความเค็ม 20, 25, 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน พบว่ามีตัวอ่อน auricularia พัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria จำนวน $6,666.667 \pm 666.665$, $7,333.337 \pm 1,154.701$, $8,222.222 \pm 1,018.350$, $12,222.222 \pm 2,036.701$ และ $8,000.003 \pm 1,154.701$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอด 33.333 ± 3.333 , 36.667 ± 5.774 , 41.111 ± 5.092 , 41.111 ± 5.092 , 61.111 ± 10.184 และ 40.000 ± 5.774 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าจำนวนและอัตราการรอดตายของตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria เมื่ออนุบาลในระดับความเค็มต่างกันมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอนุบาลที่ระดับความเค็มอื่น

ในขณะที่การอนุบาลในระดับความเค็ม 20, 25, 30 และ 40 ส่วนในพัน มีจำนวนและอัตราการรอดตายของตัวอ่อนระยะ doliolaria ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การรอดตายของตัวอ่อนระยะ auricularia ถึงระยะ doliolaria เมื่ออนุบาลในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	การรอดตาย	
	จำนวน (ตัว)*	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)*
20	6,666.667±666.665 ^b	33.333±3.333 ^b
25	7,333.337±1,154.701 ^b	36.667±5.774 ^b
30	8,222.222±1,018.350 ^b	41.111±5.092 ^b
35	12,222.222±2,036.701 ^a	61.111±10.184 ^a
40	8,000.003±1,154.701 ^b	40.000±5.774 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

ผลการรอดตายของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula พบว่าที่ความเค็มทั้ง 5 ระดับมีจำนวนตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactula ทั้งสิ้น 858.444±222.494, 1,239.444±144.206, 1,888.889±81.944, 2,403.333±147.120 และ 1,708.000±89.052 ตัวตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีจำนวนตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactula มากที่สุด รองลงมาเป็นการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน ในขณะที่การอนุบาลในระดับความเค็ม 20 ส่วนในพัน มีจำนวนตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactula น้อยที่สุด แต่เมื่อพิจารณาอัตราการรอดตายจากระยะ doliolaria ถึง pentactula พบว่าที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดคือ 23.217±3.071 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น 40, 35, 25 และ 20 ส่วนในพัน ตามลำดับ โดยมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 21.797±4.645, 19.947±2.622, 17.157±3.256 และ 12.853±3.037 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าอัตราการรอดตายของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula เมื่ออนุบาลที่ระดับความเค็มต่าง ๆ มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีอัตราการรอดตายของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพัน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 25, 35 และ 40 ส่วนในพัน ในขณะที่การอนุบาลที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน นั้น มีอัตราการรอดตายของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 20, 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การรอดตายของตัวอ่อนระยะ doliolaria ถึงระยะ pentactula เมื่ออนุบาลในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	การรอดตาย		
	ระยะ doliolaria (ตัว)	ระยะ pentactula (ตัว)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)*
20	6,666.667±666.665	858.444±222.494	12.853±3.037 ^b
25	7,333.337±1,154.701	1,239.444±144.206	17.157±3.256 ^{ab}
30	8,222.222±1,018.350	1,888.889±81.944	23.217±3.071 ^a
35	12,222.222±2,036.701	2,403.333±147.120	19.947±2.622 ^a
40	8,000.003±1,154.701	1,708.000±89.052	21.797±4.645 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

3.2. ขนาดของตัวอ่อน

การอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อนในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 20, 25, 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน พบว่าตัวอ่อนระยะ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ (fully auricularia) มีขนาดความยาวเฉลี่ย 905.555±45.897, 1,074.444±99.168, 1,027.778±47.386, 1,122.222±92.170 และ 978.333±165.890 ไมครอน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน จะให้ตัวอ่อนระยะ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพัน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 25, 30 และ 40 ส่วนในพัน ในขณะที่ขนาดของ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ เมื่ออนุบาลในระดับความเค็ม 20 ส่วนในพัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการอนุบาลในระดับความเค็ม 25, 30 และ 40 ส่วนในพัน

สำหรับขนาดของตัวอ่อนระยะ doliolaria เมื่ออนุบาลที่ระดับความเค็มแตกต่างกันทั้ง 5 ระดับ พบว่ามีความยาวเฉลี่ย 490.000±43.333, 498.889±26.736, 507.778±19.245, 567.778±35.642 และ 561.111±70.264 ไมครอน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าตัวอ่อนระยะ doliolaria ที่อนุบาลในระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาเป็นการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 40, 30, 25 และ 20 ส่วนในพัน ตามลำดับ แต่จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าขนาดของตัวอ่อนระยะ doliolaria ดังกล่าว มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ขนาดของตัวอ่อนระยะ auricularia และ doliolaria เมื่ออนุบาลในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	ขนาด (ไมครอน)	
	ระยะ Auricularia*	ระยะ Doliolaria ^{ns}
20	905.555±45.897 ^b	490.000±43.333
25	1,074.444±99.168 ^{ab}	498.889±26.736
30	1,027.778±47.386 ^{ab}	507.778±19.245
35	1,122.222±92.170 ^a	567.778±35.642
40	978.333±165.890 ^{ab}	561.111±70.264

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน
2. ns คือ non-significant หมายถึง มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในสดมภ์เดียวกัน

3.3. ระยะเวลาการพัฒนา

ผลของระดับความเค็มต่อระยะเวลาในการพัฒนาของตัวอ่อนปลิงดำในที่นี้ แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือช่วงแรกตั้งแต่ระยะ auricularia จนถึงระยะ doliolaria และช่วงหลังตั้งแต่ระยะ doliolaria จนถึงระยะ pentactula โดยเมื่ออนุบาลตัวอ่อนในระดับความเค็ม 20, 25, 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน ตัวอ่อน auricularia ใช้เวลาพัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria เฉลี่ย 23.667±0.577, 21.000±1.732, 20.333±0.577, 20.000±1.000 และ 19.333±0.577 วัน ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการอนุบาลตัวอ่อนที่ระดับความเค็มสูง 40 ส่วนในพัน จะส่งผลให้ตัวอ่อนระยะ auricularia พัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria ได้เร็วที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 25, 30 และ 35 ส่วนในพัน แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพัน และจากผลของระยะเวลาการพัฒนาในช่วงระดับความเค็มที่กำหนดดังกล่าวนี้ ยังแสดงให้เห็นว่าตัวอ่อน auricularia สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria ได้เร็วขึ้นเมื่อระดับความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 11)

สำหรับการพัฒนาของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึงระยะ pentactula ใช้เวลาเฉลี่ย 7.667±0.577, 7.333±0.577, 5.667±0.577, 5.000±1.000 และ 4.333±0.577 วัน ตามลำดับ การวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าระยะเวลาในการพัฒนาในแต่ละระดับความเค็ม มีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างระดับความเค็มพบว่า ที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน มีระยะเวลาในการพัฒนาจากระยะ doliolaria ถึงระยะ pentactula สั้นที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันกับที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน ในขณะที่ที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน กลับมีระยะเวลาการพัฒนาไม่แตกต่างกันกับที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน ส่วนระดับความเค็มที่มีระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนนานที่สุดคือ 20 ส่วนในพัน ซึ่งมีค่าแตกต่าง

กันทางสถิติกับที่ระดับความเค็ม 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน แต่ไม่แตกต่างกันกับที่ 25 ส่วนในพัน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนปลิงดำในแต่ละระยะเมื่ออนุบาลในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	ระยะเวลา (วัน)	
	Auricularia – Doliolaria*	Doliolaria – Pentactula*
20	23.667±0.577 ^a	7.667±0.577 ^a
25	21.000±1.732 ^b	7.333±0.577 ^a
30	20.333±0.577 ^b	5.667±0.577 ^b
35	20.000±1.000 ^b	5.000±1.000 ^{bc}
40	19.333±0.577 ^b	4.333±0.577 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

การพัฒนาจากระยะ auricularia จนถึง pentactula พบว่า การอนุบาลที่ระดับความเค็ม 40 ส่วนในพัน นั้น ตัวอ่อนใช้ระยะเวลาในการพัฒนาสั้นที่สุด รองลงมาเป็น 35, 30, 25 และ 20 ส่วนในพัน ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาการพัฒนา 23.667±0.577, 25.000±1.732, 26.000±0.000, 28.333±1.528 และ 31.333±1.155 วัน ตามลำดับ การวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าตัวอ่อนที่อนุบาลในระดับความเค็มต่างกันมีระยะเวลาในการพัฒนาแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่การพัฒนาของตัวอ่อนที่ความเค็ม 40 ส่วนในพัน ซึ่งใช้ระยะเวลาพัฒนาสั้นที่สุดนั้น มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการพัฒนาที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน และการพัฒนาที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน ยังใช้เวลาในการพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติกับที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน (ตารางที่ 12)

3.4. การลงเกาะและอัตราการลงเกาะ

ตัวอ่อนของปลิงดำที่เป็นระยะลงเกาะคือระยะ pentactular โดยการลงเกาะจะเห็นได้ชัดเมื่อหนวดยื่นออกมาภายนอกและปรากฏส่วนของ ambulacral podia อันแรกในการศึกษาครั้งนี้จึงถือเอาระยะ pentactula เป็นระยะลงเกาะ (settlement stage) ซึ่งจากการอนุบาลตัวอ่อนที่ระดับความเค็ม 20, 25, 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน มีตัวอ่อนที่ลงเกาะเป็นจำนวน 858.444±222.494, 1,239.444±144.206, 1,888.889±81.944, 2,403.333±147.120 และ 1,708.000±89.052 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการลงเกาะ 4.292±1.112, 6.197±0.721, 9.444±0.410, 12.017±0.736 และ 8.540±0.445 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าทั้งจำนวนและอัตราการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่ออนุบาลในระดับความเค็มแตกต่างกัน โดยจำนวนและอัตราการลงเกาะเมื่ออนุบาลที่

ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีค่าสูงที่สุด ในขณะที่การอนุบาลที่ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพัน มีค่าต่ำที่สุด ส่วนการอนุบาลที่ระดับความเค็ม 30 และ 40 ส่วนในพัน มีจำนวนและอัตราการลงเกาะไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ auricularia ถึง pentactula เมื่ออนุบาลในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	ระยะเวลาการพัฒนา (วัน)*
20	31.333±1.155 ^a
25	28.333±1.528 ^b
30	26.000±0.000 ^c
35	25.000±1.732 ^{cd}
40	23.667±0.577 ^d

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 13 จำนวนและอัตราการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำเมื่ออนุบาลในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ระดับความเค็ม (ส่วนในพัน)	การลงเกาะ	
	จำนวน (ตัว)*	อัตราการลงเกาะ (เปอร์เซ็นต์)*
20	858.444±222.494 ^d	4.292±1.112 ^d
25	1,239.444±144.206 ^c	6.197±0.721 ^c
30	1,888.889±81.944 ^b	9.444±0.410 ^b
35	2,403.333±147.120 ^a	12.017±0.736 ^a
40	1,708.000±89.052 ^b	8.540±0.445 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

4. การศึกษาสัดส่วนชนิดอาหารในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

การศึกษาสัดส่วนชนิดอาหาร โดยเลือกใช้แพลงก์ตอนพืช 4 ชนิด คือ *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana* และ *Skeletonema costatum* กำหนดสัดส่วนอาหารเป็น 4 ชุดการทดลองคือ *C. calcitrans*, *C. calcitrans* + *T. chuii* ในสัดส่วน 1:1, *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 และ *C. calcitrans* + *S. costatum* ในสัดส่วน 1:1

นำไปใช้เป็นอาหารในการอนุบาลปลิงดำระยะ auricularia จนถึงระยะ pentactula ความหนาแน่น 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันละ 2 ครั้ง พบว่าผลที่ได้มีดังนี้

4.1. การรอดตายและอัตราการรอดตาย

การรอดตายของตัวอ่อนปลิงดำสามารถรายงานผลได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก ตั้งแต่ระยะ auricularia จนถึง doliolaria และช่วงหลัง ตั้งแต่ระยะ doliolaria จนถึง pentactula ผลการรอดตายและอัตราการรอดตายในช่วงแรกแสดงไว้ในตารางที่ 14 โดยการอนุบาลด้วยอาหารที่เป็น *C. calcitrans*, *C. calcitrans* + *T. chuii*, *C. calcitrans* + *I. galbana* และ *C. calcitrans* + *S. costatum* มีการรอดตายของตัวอ่อน doliolaria จำนวน $6,500.003 \pm 1,374.367$, $11,166.668 \pm 1,478.239$, $13,666.665 \pm 1,924.502$ และ $8,083.336 \pm 687.186$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดตาย 32.500 ± 6.872 , 55.833 ± 7.391 , 68.333 ± 9.623 และ 40.417 ± 3.436 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าทั้งจำนวนและอัตราการรอดตายในแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยจะเห็นได้ว่าการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 มีจำนวนและอัตราการรอดตายของตัวอ่อน doliolaria สูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น ในขณะที่การอนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงอย่างเดียว กับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 ให้จำนวนและอัตราการรอดตายของตัวอ่อน doliolaria ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 14 การรอดตายของตัวอ่อนระยะ auricularia จนถึงระยะ doliolaria เมื่ออนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน

สัดส่วนชนิดอาหาร	การรอดตาย	
	จำนวน (ตัว)*	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)*
<i>C. calcitrans</i> (ชุดควบคุม)	$6,500.003 \pm 1,374.367^c$	32.500 ± 6.872^c
<i>C. calcitrans</i> + <i>T. chuii</i> (1:1)	$11,166.668 \pm 1,478.239^b$	55.833 ± 7.391^b
<i>C. calcitrans</i> + <i>I. galbana</i> (1:1)	$13,666.665 \pm 1,924.502^a$	68.333 ± 9.623^a
<i>C. calcitrans</i> + <i>S. costatum</i> (1:1)	$8,083.336 \pm 687.186^c$	40.417 ± 3.436^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

การรอดตายและอัตราการรอดตายของตัวอ่อนปลิงดำในช่วงหลังตั้งแต่ระยะ doliolaria จนถึง pentactula แสดงไว้ในตารางที่ 15 พบว่าการอนุบาลด้วยอาหารทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะ pentactula จำนวน $2,000.000 \pm 215.269$, $3,304.667 \pm 358.654$, $5,109.333 \pm 531.410$ และ $2,460.333 \pm 151.145$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดตายของตัว

อ่อนปลิงดำจากระยะ doliolaria ถึงระยะ pentactula เท่ากับ 31.586 ± 5.502 , 29.854 ± 3.850 , 38.228 ± 8.170 และ 30.693 ± 4.185 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จะเห็นได้ว่าการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดซึ่งสอดคล้องกับการรอดตายในช่วงแรก

ตารางที่ 15 การรอดตายของตัวอ่อนระยะ doliolaria จนถึงระยะ pentactula เมื่ออนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน

สัดส่วนชนิดอาหาร	การรอดตาย		
	ระยะ doliolaria (ตัว)	ระยะ pentactula (ตัว)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) ^{ns}
<i>C. calcitrans</i> (ชุดควบคุม)	$6,500.003 \pm 1,374.367$	$2,000.000 \pm 215.269$	31.586 ± 5.502
<i>C. calcitrans</i> + <i>T. chuii</i> (1:1)	$11,166.668 \pm 1,478.239$	$3,304.667 \pm 358.654$	29.854 ± 3.850
<i>C. calcitrans</i> + <i>I. galbana</i> (1:1)	$13,666.665 \pm 1,924.502$	$5,109.333 \pm 531.410$	38.228 ± 8.170
<i>C. calcitrans</i> + <i>S. costatum</i> (1:1)	$8,083.336 \pm 687.186$	$2,460.333 \pm 151.145$	30.693 ± 4.185

หมายเหตุ ns คือ non-significant หมายถึง มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในสมมุติเดียวกัน

4.2. ขนาดของตัวอ่อน

การอนุบาลตัวอ่อนปลิงดำด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกันคือ *C. calcitrans*, *C. calcitrans* + *T. chuii*, *C. calcitrans* + *I. galbana* และ *C. calcitrans* + *S. costatum* พบว่าตัวอ่อนระยะ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ มีขนาดความยาวเฉลี่ย $1,039.167 \pm 16.130$, $1,091.667 \pm 49.065$, $1,112.500 \pm 25.909$ และ $1,065.000 \pm 19.100$ ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นได้ว่าการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงเดียวนั้นให้ตัวอ่อนที่มีขนาดเล็กที่สุด ส่วนการให้ *C. calcitrans* + *I. galbana* สัดส่วน 1:1, *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1 และ *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 นั้นมีขนาดของ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 16)

สำหรับขนาดของตัวอ่อนระยะ doliolaria พบว่ามีขนาดความยาวเฉลี่ย 555.000 ± 12.323 , 580.833 ± 13.437 , 592.500 ± 28.723 และ 557.500 ± 11.980 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 ให้ตัวอ่อน doliolaria ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *T. chuii* ในสัดส่วน 1:1 ในขณะที่การอนุบาลด้วย *C. calcitrans*, *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1 และ *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 ให้ตัวอ่อนที่มีขนาดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ขนาดของตัวอ่อนระยะ auricularia และ doliolaria เมื่ออนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน

สัดส่วนชนิดอาหาร	ขนาด (ไมครอน)	
	ระยะ Auricularia*	ระยะ Doliolaria*
<i>C. calcitrans</i> (ชุดควบคุม)	1,039.167±16.130 ^b	555.000±12.323 ^b
<i>C. calcitrans</i> + <i>T. chuii</i> (1:1)	1,091.667±49.065 ^a	580.833±13.437 ^{ab}
<i>C. calcitrans</i> + <i>I. galbana</i> (1:1)	1,112.500±25.909 ^a	592.500±28.723 ^a
<i>C. calcitrans</i> + <i>S. costatum</i> (1:1)	1,065.000±19.100 ^{ab}	557.500±11.980 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

4.3. ระยะเวลาการพัฒนา

ตัวอ่อนปลิงดำที่อนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกันคือ *C. calcitrans*, *C. calcitrans* + *T. chuii*, *C. calcitrans* + *I. galbana* และ *C. calcitrans* + *S. costatum* มีระยะเวลาในการพัฒนาจากระยะ auricularia จนถึง doliolaria เฉลี่ย 20.000±0.816, 18.750±0.500, 18.250±0.957 และ 19.750±0.500 วัน ตามลำดับ เมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าระยะเวลาในการพัฒนาดังกล่าวมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* สัดส่วน 1:1 ตัวอ่อนสามารถพัฒนาจากระยะ auricularia ไปเป็น doliolaria ได้เร็วที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงอย่างเดียว และการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1 ในขณะที่การอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1 และ *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 มีระยะเวลาในการพัฒนาจากระยะ auricularia ไปเป็นระยะ doliolaria ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงอย่างเดียว และการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 ที่มีระยะเวลาในการพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน

สำหรับพัฒนาการของตัวอ่อนตั้งแต่ระยะ doliolaria จนถึงระยะ pentactula นั้น ใช้เวลาเฉลี่ย 5.750±0.500, 5.000±0.000, 4.750±0.500 และ 5.500±0.577 วัน ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า การอนุบาลด้วยอาหารทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีระยะเวลาในการพัฒนาจากระยะ doliolaria จนถึงระยะ pentactula แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการให้อาหารที่เป็น *C. calcitrans* + *I. galbana* สัดส่วน 1:1 มีระยะเวลาสั้นที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการให้อาหารที่เป็น *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1 ในขณะที่การให้อาหารที่เป็น *C. calcitrans* เพียงอย่างเดียวมีระยะเวลาในการพัฒนานานที่สุดแต่ไม่แตกต่างกันกับการให้อาหารที่

เป็น *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 อย่างไรก็ตามการให้อาหารที่เป็น *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 นี้กลับมีความระยะเวลาการพัฒนาไม่แตกต่างกันกับการให้ *C. calcitrans* + *T. chuii* ในสัดส่วน 1:1 (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนปลิงดำในแต่ละระยะเมื่ออนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน

สัดส่วนชนิดอาหาร	ระยะเวลา (วัน)	
	Auricularia – Doliolaria	Doliolaria - Pentactula
<i>C. calcitrans</i> (ชุดควบคุม)	20.000±0.816 ^a	5.750±0.500 ^a
<i>C. calcitrans</i> + <i>T. chuii</i> (1:1)	18.750±0.500 ^{bc}	5.000±0.000 ^{bc}
<i>C. calcitrans</i> + <i>I. galbana</i> (1:1)	18.250±0.957 ^c	4.750±0.500 ^c
<i>C. calcitrans</i> + <i>S. costatum</i> (1:1)	19.750±0.500 ^{ab}	5.500±0.577 ^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

การพัฒนาของตัวอ่อนจากระยะ auricularia จนถึง pentactula พบว่าการให้อาหารที่เป็น *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 ทำให้ตัวอ่อนปลิงดำใช้ระยะเวลาในการพัฒนาสั้นที่สุด รองลงมาเป็นการอนุบาลด้วยอาหารที่เป็น *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1, *C. calcitrans* + *S. costatum* สัดส่วน 1:1 และ *C. calcitrans* ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการพัฒนา 23.000±1.414, 23.750±0.500, 25.250±0.500 และ 25.750±0.957 วัน ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า การอนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน ทำให้ตัวอ่อนปลิงดำมีการพัฒนาในระยะเวลาที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบว่าการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 ใช้ระยะเวลาพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *T. chuii* สัดส่วน 1:1 และการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงอย่างเดียวก็ใช้ระยะเวลาในการพัฒนาไม่แตกต่างกันกับการอนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *S. costatum* ในสัดส่วน 1:1 (ตารางที่ 18)

4.4. การลงเกาะและอัตราการลงเกาะ

การอนุบาลตัวอ่อนปลิงดำด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ *C. calcitrans*, *C. calcitrans* + *T. chuii*, *C. calcitrans* + *I. galbana* และ *C. calcitrans* + *S. costatum* พบว่าตัวอ่อนสามารถพัฒนาจนถึงระยะลงเกาะจำนวน 2,000.000±215.269, 3,304.667±358.654, 5,109.333±531.410 และ 2,460.333±151.145 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการลงเกาะ 10.000±1.076, 16.523±1.793, 25.547±2.657 และ 12.302±0.756 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่ลงเกาะและอัตราการลงเกาะของตัว

อ่อน ในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยตัวอ่อนที่อนุบาลด้วย *C. calcitrans* + *I. galbana* สัดส่วน 1:1 มีจำนวนตัวอ่อนที่ลงเกาะและอัตราการลงเกาะสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการอนุบาลด้วยอาหารในชุดการทดลองอื่น ในขณะที่การอนุบาลด้วย *C. calcitrans* เพียงอย่างเดียว มีจำนวนและอัตราการลงเกาะต่ำที่สุด (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 18 ระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ auricularia ถึง pentactula เมื่ออนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน

สัดส่วนชนิดอาหาร	ระยะเวลาการพัฒนา (วัน)*
<i>C. calcitrans</i> (ชุดควบคุม)	25.750±0.957 ^a
<i>C. calcitrans</i> + <i>T. chuii</i> (1:1)	23.750±0.500 ^b
<i>C. calcitrans</i> + <i>I. galbana</i> (1:1)	23.000±1.414 ^b
<i>C. calcitrans</i> + <i>S. costatum</i> (1:1)	25.250±0.500 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 19 จำนวนและอัตราการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงตำระยะ pentactula เมื่ออนุบาลด้วยอาหารที่มีสัดส่วนชนิดแตกต่างกัน

สัดส่วนชนิดอาหาร	การลงเกาะ	
	จำนวน (ตัว)	อัตราการลงเกาะ (เปอร์เซ็นต์)*
<i>C. calcitrans</i> (ชุดควบคุม)	2,000.000±215.269 ^c	10.000±1.076 ^c
<i>C. calcitrans</i> + <i>T. chuii</i> (1:1)	3,304.667±358.654 ^b	16.523±1.793 ^b
<i>C. calcitrans</i> + <i>I. galbana</i> (1:1)	5,109.333±531.410 ^a	25.547±2.657 ^a
<i>C. calcitrans</i> + <i>S. costatum</i> (1:1)	2,460.333±151.145 ^c	12.302±0.756 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

5. การศึกษาการให้แสงในการอนุบาลปลิงตำระยะวัยอ่อน

การอนุบาลตัวอ่อนปลิงตำโดยการให้แสงแตกต่างกัน 4 ลักษณะ คือ ไม่ให้แสงตลอดเวลา การให้แสงตลอดเวลา การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง และการให้แสงตามธรรมชาติ พบว่าผลที่ได้มีดังนี้

5.1. การรอดตายและอัตราการรอดตาย

การศึกษาการให้แสงกับตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia จนถึงระยะลงเกาะหรือ pentactula ทั้ง 4 ลักษณะ พบว่ามีตัวอ่อนที่รอดตายและพัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria จำนวน $16,171.500 \pm 1,812.425$, $8,257.750 \pm 1,081.485$, $12,635.083 \pm 1,744.805$ และ $13,100.500 \pm 1,959.552$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดตาย 80.858 ± 9.062 , 41.289 ± 5.407 , 63.175 ± 8.724 และ 65.503 ± 9.798 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าจำนวนและอัตราการรอดตายของตัวอ่อนระยะ doliolaria ที่ได้รับแสงทั้ง 4 ลักษณะ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทั้งจำนวนและอัตราการรอดตาย พบว่าการอนุบาลโดยไม่ให้แสงตลอดเวลาที่มีจำนวนและอัตราการรอดตายสูงที่สุด ส่วนการให้แสงตลอดเวลานั้นมีจำนวนและอัตราการรอดตายต่ำที่สุด และแตกต่างกันทางสถิติกับการให้แสงอีก 3 ลักษณะ ในขณะที่การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง กับการให้แสงตามธรรมชาติ มีจำนวนและอัตราการรอดตายของตัวอ่อน doliolaria ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 การรอดตายของตัวอ่อนระยะ auricularia จนถึงระยะ doliolaria เมื่ออนุบาลภายใต้การให้แสงที่แตกต่างกัน

การให้แสง	การรอดตาย	
	จำนวน (ตัว)*	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)*
ไม่ให้แสงตลอดเวลา	$16,171.500 \pm 1,812.425^a$	80.858 ± 9.062^a
ให้แสงตลอดเวลา	$8,257.750 \pm 1,081.485^c$	41.289 ± 5.407^c
ให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง	$12,635.083 \pm 1,744.805^b$	63.175 ± 8.724^b
ให้แสงตามธรรมชาติ	$13,100.500 \pm 1,959.552^b$	65.503 ± 9.798^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

เมื่อพิจารณาการรอดตายจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula พบว่ามีตัวอ่อนที่รอดตายจำนวน $9,261.167 \pm 1,509.797$; $2,992.917 \pm 294.506$; $4,996.417 \pm 840.220$ และ $5,557.833 \pm 831.175$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดตายจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula เฉลี่ยเท่ากับ 57.147 ± 4.652 , 36.546 ± 4.661 , 39.432 ± 1.682 และ 43.209 ± 9.108 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าตัวอ่อน pentactula ที่อนุบาลภายใต้การได้รับแสงที่แตกต่างกันมีอัตราการรอดตายแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างการใช้แสงในลักษณะต่างๆ จะเห็นได้ว่าการไม่ให้แสงตลอดเวลามีอัตราการรอดตายของตัวอ่อน pentactula สูงที่สุด และมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการให้แสงในลักษณะอื่น ในขณะที่การให้แสงตลอดเวลา การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ

12 ชั่วโมง และการให้แสงตามธรรมชาติ มีอัตราการรอดของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 การรอดตายของตัวอ่อนระยะ doliolaria จนถึงระยะ pentactula เมื่ออนุบาลภายใต้การให้แสงที่แตกต่างกัน

การให้แสง	การรอดตาย		
	ระยะ doliolaria (ตัว)	ระยะ pentactula (ตัว)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)*
ไม่ให้แสงตลอดเวลา	16,171.500±1,812.425	9,261.167±1,509.797	57.147±4.652 ^a
ให้แสงตลอดเวลา	8,257.750±1,081.485	2,992.917±294.506	36.546±4.661 ^b
ให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง	12,635.083±1,744.805	4,996.417±840.220	39.432±1.682 ^b
ให้แสงตามธรรมชาติ	13,100.500±1,959.552	5,557.833±831.175	43.209±9.108 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

5.2. ขนาดของตัวอ่อน

การอนุบาลตัวอ่อนปลิงดำภายใต้การให้แสงแตกต่างกัน 4 ลักษณะ ได้แก่ การไม่ให้แสงตลอดเวลา การให้แสงตลอดเวลา การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง และการให้แสงตามธรรมชาติ พบว่าตัวอ่อนระยะ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ มีขนาดความยาว 945.417±48.042, 664.167±16.415, 1,066.667±41.388 และ 1,118.750±24.884 ไมครอน ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการให้แสงในแต่ละลักษณะ พบว่าตัวอ่อน auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ ซึ่งอนุบาลภายใต้การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง กับ การให้แสงตามธรรมชาติ มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีความยาวเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าผลจากการให้แสงทั้งสองลักษณะมีค่าแตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้แสงตลอดเวลา และการให้แสงตลอดเวลา (ตารางที่ 22)

สำหรับขนาดของตัวอ่อนระยะ doliolaria พบว่าให้ผลสอดคล้องกับตัวอ่อนระยะ auricularia ที่พัฒนาสมบูรณ์ โดยมีความยาวเฉลี่ย 565.000±11.706, 515.000±4.303, 592.500±9.179 และ 601.667±6.939 ไมครอน ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าตัวอ่อน doliolaria ที่อนุบาลภายใต้การให้แสงทั้ง 4 ลักษณะ มีขนาดความยาวแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการได้รับแสงแต่ละลักษณะจะเห็นได้ว่าการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง กับให้แสงตามธรรมชาติ มีความยาวของตัวอ่อน doliolaria มากที่สุดซึ่งมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง กับให้แสงตามธรรมชาติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการไม่ให้แสงตลอดเวลาและการให้แสงตลอดเวลา (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 22 ขนาดของตัวอ่อนระยะ auricularia และ doliolaria เมื่ออนุบาลภายใต้การให้แสงที่แตกต่างกัน

การให้แสง	ขนาด (ไมครอน)	
	ระยะ Auricularia*	ระยะ Doliolaria*
ไม่ให้แสงตลอดเวลา	945.417±48.042 ^b	565.000±11.706 ^b
ให้แสงตลอดเวลา	664.167±16.415 ^c	515.000±4.303 ^c
ให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง	1,066.667±41.388 ^a	592.500±9.179 ^a
ให้แสงตามธรรมชาติ	1,118.750±24.884 ^a	601.667±6.939 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

5.3. ระยะเวลาการพัฒนา

การศึกษาผลของการให้แสงต่อพัฒนาการของตัวอ่อนจากระยะ auricularia ถึง pentactula พบว่าการไม่ให้แสงตลอดเวลา การให้แสงตลอดเวลา การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง และการให้แสงตามธรรมชาติ ส่งผลให้ตัวอ่อนพัฒนาจากระยะ auricularia จนถึง doliolaria ได้ภายในระยะเวลา 18.500±0.577, 20.250±0.500, 19.000±0.816 และ 18.500±1.291 วัน ตามลำดับ การวิเคราะห์ผลทางสถิติแสดงให้เห็นความแตกต่างของระยะเวลาการพัฒนาระหว่างการให้แสงที่แตกต่างกัน โดยการไม่ให้แสงตลอดเวลามีผลให้ตัวอ่อนมีพัฒนาการเร็วที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการให้แสงตามธรรมชาติและการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง ในขณะที่การให้แสงตลอดเวลามีผลให้ตัวอ่อนมีพัฒนาการช้าที่สุดแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 23)

การพัฒนาของตัวอ่อนจากระยะ doliolaria จนถึง pentactula พบว่าการให้แสงที่แตกต่างกัน 4 ลักษณะ ส่งผลให้ตัวอ่อนมีระยะเวลาการพัฒนา 4.500±0.577, 6.250±0.500, 5.250±0.500 และ 4.750±0.500 วัน ตามลำดับ ซึ่งตัวอ่อนที่ไม่ได้รับแสงตลอดเวลาจะมีพัฒนาการในระยะเวลาสั้นที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง และการให้แสงตามธรรมชาติ ส่วนการให้แสงตลอดเวลานั้นมีการพัฒนาการของตัวอ่อนนานที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการให้แสงอีก 3 ลักษณะ (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 ระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนปลิงดำในแต่ละระยะเมื่ออนุบาลภายใต้การให้แสงที่แตกต่างกัน

การให้แสง	ระยะเวลา (วัน)	
	Auricularia – Doliolaria*	Doliolaria – Pentactula*
ไม่ให้แสงตลอดเวลา	18.500±0.577 ^b	4.500±0.577 ^b
ให้แสงตลอดเวลา	20.250±0.500 ^a	6.250±0.500 ^a
ให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง	19.000±0.816 ^{ab}	5.250±0.500 ^b
ให้แสงตามธรรมชาติ	18.500±1.291 ^b	4.750±0.500 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

การให้แสงที่แตกต่างกันมีผลต่อระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนจากระยะ auricularia จนถึง pentactula พบว่าการไม่ให้แสงตลอดเวลา มีผลทำให้ตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactula ในระยะเวลาสั้นที่สุด รองลงมาเป็นการให้แสงตามธรรมชาติ การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง และการให้แสงตลอดเวลา ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาในการพัฒนา 23.000±0.816, 23.250±1.708, 24.250±0.957 และ 26.500±0.577 วัน ตามลำดับ การวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ระยะเวลาการพัฒนาดังกล่าวมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งตัวอ่อนที่อนุบาลภายใต้การไม่ให้แสงตลอดเวลา การให้แสงตามธรรมชาติ และการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง มีระยะเวลาการพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการอนุบาลภายใต้การให้แสงตลอดเวลา (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 ระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ auricularia ถึง pentactula เมื่ออนุบาลภายใต้การให้แสงที่แตกต่างกัน

การให้แสง	ระยะเวลาการพัฒนา (วัน)*
ไม่ให้แสงตลอดเวลา	23.000±0.816 ^b
ให้แสงตลอดเวลา	26.500±0.577 ^a
ให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง	24.250±0.957 ^b
ให้แสงตามธรรมชาติ	23.250±1.708 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

5.4. การลงเกาะและอัตราการลงเกาะ

ผลการลงเกาะพิจารณาจากจำนวนตัวอ่อนระยะ auricularia ที่ปล่อยลงเลี้ยงกับจำนวนตัวอ่อนระยะ pentactula ที่ลงเกาะบนวัสดุเกาะ ส่วนระยะเวลาการลงเกาะรายงานไว้ในส่วนของระยะเวลาการพัฒนา โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าการอนุบาลภายใต้ การไม่ให้แสงตลอดเวลา การให้แสงตลอดเวลา การให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง และการให้แสงตามธรรมชาติ มีจำนวนตัวอ่อน pentactula ลงเกาะ $9,261.167 \pm 1,509.797$; $2,992.917 \pm 294.506$; $4,996.417 \pm 840.220$ และ $5,557.833 \pm 831.175$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการลงเกาะ 46.306 ± 7.549 , 14.965 ± 1.473 , 24.982 ± 4.201 และ 27.789 ± 4.156 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าทั้งจำนวนและอัตราการลงเกาะของตัวอ่อนภายใต้การให้แสงในแต่ละลักษณะมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการอนุบาลภายใต้การไม่ให้แสงตลอดเวลา มีจำนวนและอัตราการลงเกาะสูงที่สุด และแตกต่างกันกับการให้แสงในอีกสามลักษณะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การอนุบาลภายใต้การให้แสงตามธรรมชาติกับการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยรองลงมาตามลำดับ แต่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 จำนวนและอัตราการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงค้ำระยะ pentactula ที่อนุบาลภายใต้การให้แสงที่แตกต่างกัน

การให้แสง	การลงเกาะ	
	จำนวน (ตัว)*	อัตราการลงเกาะ (เปอร์เซ็นต์)*
ไม่ให้แสงตลอดเวลา	$9,261.167 \pm 1,509.797^a$	46.306 ± 7.549^a
ให้แสงตลอดเวลา	$2,992.917 \pm 294.506^c$	14.965 ± 1.473^c
ให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง	$4,996.417 \pm 840.220^b$	24.982 ± 4.201^b
ให้แสงตามธรรมชาติ	$5,557.833 \pm 831.175^b$	27.789 ± 4.156^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันกำกับ แสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

วิจารณ์ผล

การศึกษาระดับความเค็มในการฟักไข่ปลิงดำ

จากการทดลองที่ระดับความเค็ม 40 และ 45 ส่วนในพัน ไข่ทั้งหมดไม่สามารถพัฒนาถึงระยะ gastrula ได้ แสดงว่าที่ระดับความเค็มดังกล่าวทำให้พัฒนาการของคัพภะไม่สมบูรณ์หรือไข่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ สอดคล้องกับ อารมณ (2545) ที่รายงานว่าปลิงทะเลเป็นสัตว์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ในช่วงแคบ เนื่องจากมีระบบควบคุมสมดุลเกลือแร่ (osmoregulation) ที่ยังพัฒนาไม่มากนัก ความเค็มมีผลต่อการควบคุมสมดุลเกลือแร่ระหว่างของเหลวภายในเซลล์และช่องลำตัวของปลิงทะเลจะมีปริมาณใกล้เคียงกับน้ำทะเล (อารมณ 2545 อ้างตาม Binyon, 1972) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน คือยอมให้น้ำผ่านเข้าและออกเซลล์ได้ แต่ไม่ยอมให้สารโมเลกุลผ่านเข้าออก ดังนั้นเมื่อความเค็มของน้ำทะเลสูงขึ้น น้ำจากภายในเซลล์ผ่านออกไปภายนอกเซลล์มากจึงทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงหรือเหี่ยวและตายในที่สุด (อารมณ 2545 อ้างตาม Milne, 1995) และสอดคล้องกับ Yellow Sea Fisheries Research Institute in Qingdao (1991) ที่รายงานว่าระดับความเค็มที่สูงมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของตัวอ่อน อาจทำให้ตัวอ่อนพิการหรือตายได้

ผลจากการฟักพบว่าที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีอัตราการฟักสูงที่สุด คือ 90.420 ± 3.191 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีอัตราการฟัก 54.978 ± 7.877 เปอร์เซ็นต์ แต่จากรายงานของ Laxminarayana (2005) ซึ่งทดลองในปลิงดำ (*H. atra*) จากเกาะ Mauritius พบว่าอัตราการฟักที่ระดับความเค็ม 34-35 ส่วนในพัน มีค่าสูงถึง 98.3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องจากการที่ฝั่งอ่าวไทยและเกาะ Mauritius ในมหาสมุทรอินเดีย มีระดับความเค็มเฉลี่ยของน้ำทะเลแตกต่างกัน ปลิงดำจะมีการปรับตัวและตอบสนองต่อระดับความเค็มที่แตกต่างกัน ระดับความเค็มเฉลี่ยบริเวณหาดสาบั้น (อ่าวไทย) คือ 30 ส่วนในพัน ส่วนเกาะ Mauritius มีระดับความเค็มเฉลี่ย 35 ส่วนในพัน (Goorah *et al.*, 1998)

ระยะเวลาการพัฒนาการของไข่ปลิงดำที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน ใช้ระยะเวลาการฟักเป็นตัวอ่อน auricularia สั้นที่สุดเฉลี่ย 46.333 ± 2.081 ชั่วโมง พบว่าปลิงทะเลแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาในการฟักที่ระดับความแตกต่างกัน เช่น ปลิงทะเล *A. japonicas* ใช้ระยะเวลา 34 ชั่วโมง ในการฟักที่ระดับความเค็ม 36 ส่วนในพัน (Xiyin *et al.*, 2004) ปลิงทะเล *Stichopus* sp. ใช้ระยะเวลา 35 ชั่วโมง (Hu *et al.*, 2010) ปลิงทะเล *H. spinifera* ใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในการฟักที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน (Asha and Muthiah, 2005)

ขนาดของตัวอ่อนที่สมบูรณ์และขนาดใหญ่สุดที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน คือ 403.333 ± 17.275 ไมครอน ใกล้เคียงกับ Gerris *et al.* (1995) ที่รายงานขนาดตัวอ่อนระยะ auricularia ของปลิงดำ *H. atra* เฉลี่ย 431 ± 41.70 ไมครอน ที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน จากการทดลองมีขนาดของ auricularia 166.666 ± 15.275 ไมครอน ซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับ 440 ไมครอน ซึ่งรายงานโดย Laxminarayana (2005) และยังเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับทดลองที่ 30 ส่วน

ในพื้น ดังนั้นจึงเป็นส่วนที่สามารถส่งเสริมข้อมูลที่กล่าวในข้างต้นคือการพัฒนาการของปลิงดำจะสอดคล้องกับระดับความเค็มปกติในแหล่งอาศัยเดิม ขนาดของตัวอ่อนของปลิงทะเลแต่ละชนิดจะแตกต่างกันถึงแม้จะทำการเพาะฟักในระดับความเค็มเดียวกัน เช่น *auricularia* ของปลิงทะเล *A. japonica* ที่ฟักในน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน มีขนาด 320-600 ไมครอน (Renbo and Yuan, 2004) ปลิงทะเล *B. marmorata* ที่ทำการฟักในน้ำทะเลความเค็ม 35 ส่วนในพัน มีขนาด 370 ไมครอน (Laxminarayana, 2005)

การศึกษาระดับความเค็มในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

จากการศึกษาระดับความเค็มที่เหมาะสมในการอนุบาลปลิงดำตั้งแต่ระยะ *auricularia* จนถึงระยะ *pentactula* พบว่าระดับความเค็มที่เหมาะสมคือ 35 ส่วนในพัน เนื่องจากมีอัตราการรอดตายและอัตราการลงเกาะสูงที่สุด และตัวอ่อนที่ได้ยังมีขนาดใหญ่ที่สุด Verween *et al.* (2007) กล่าวว่าความเค็มเป็นปัจจัยสภาพแวดล้อม ที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในลักษณะจำเพาะชนิด (species-specific) โดยการศึกษาผลของระดับความเค็มต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และพัฒนาการของตัวอ่อนปลิงทะเลชนิด *H. spinifera* โดย Asha and Muthiah (2005) ซึ่งพบว่าที่ระดับความเค็ม 35 ส่วนในพัน นั้น ตัวอ่อนมีอัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด และมีพัฒนาการเร็วที่สุด และระดับความเค็มที่ลดลงจะทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อน Al Rashdi *et al.* (2012) รายงานความเค็มที่เหมาะสมสำหรับปลิงขาว (*H. scabra*) อยู่ในช่วง 32-36 ส่วนในพัน แตกต่างกับ Giraspy and Ivy (2010) ที่รายงานไว้ 37.5-38.0 ส่วนในพัน ระดับความเค็มที่ปลิงชนิด *Apostichopus japonicus* มีอัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ 30 ส่วนในพัน (Li and Li, 2010) จากผลการทดลองยังพบว่าระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อน มีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเค็ม 30, 35 และ 40 ส่วนในพัน ทั้งนี้อาจเกิดจากความสามารถในการปรับตัวของปลิงดำวัยอ่อน โดยในปลิงขาวมีรายงานว่าปลิงทะเลวัยรุ่นสามารถรับมือต่อการลดลงของความเค็มจนถึง 25 ส่วนในพัน (Mercier *et al.*, 1999)

การศึกษาสัดส่วนชนิดอาหารในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

ปลิงทะเลในระยะวัยอ่อนจะกินอาหารที่มีลักษณะแขวนลอยในมวลน้ำ (suspension feeding) ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมจึงเป็นพวกแพลงก์ตอนพืช แต่ขนาดของอาหารจะต้องสัมพันธ์กับขนาดของปาก โดยกลไกการทำงานของ ciliated bands อาหารจะถูกส่งไปยังเส้นกึ่งกลางลำตัว และต่อไปยังปาก จากผลการศึกษาพบว่าอนุบาลด้วย *Chaetoceros calcitrans* + *Isochrysis galbana* ในสัดส่วน 1:1 ให้ผลดีที่สุดทั้งในแง่ของอัตราการรอดตาย อัตราการลงเกาะ ระยะเวลาการพัฒนา และขนาดของตัวอ่อน ทั้งนี้อาจเนื่องจากขนาดของแพลงก์ตอนที่เหมาะสมกับขนาดของปาก ซึ่งพบว่า *I. galbana* นั้น เป็นแพลงก์ตอนเซลล์เดี่ยว ไม่มีผนังเซลล์ มีขนาดเล็กมากเพียง 5-6 ไมครอน (ลัดดา, 2544) การที่มีเซลล์เดี่ยวนี้อาจทำให้ปลิงจับกินได้สะดวก และการที่ไม่มีผนังเซลล์จึงสามารถย่อยได้ง่าย ประกอบกับการที่มีขนาดเล็กจึงเหมาะสมสำหรับตัวอ่อนในระยะแรกคือ *auricularia* ที่มีขนาดของปากเล็กมาก *I. galbana* จึงอาจมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับตัวอ่อน

ระยะ auricularia ถึง doliolaria แต่เมื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria จนถึง pentactula อาจใช้ประโยชน์จาก *C. calcitrans* ได้ดีกว่า เนื่องจากมีขนาดใหญ่ขึ้นประกอบกับเป็นเส้นสาย (โชคชัย, 2548) ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับขนาดของปากปลิงดำในช่วงระยะดังกล่าว *I. galbana* เป็นแพลงก์ตอนที่นำมาใช้เป็นอาหารในระยะ auricularia และเมื่อเข้าสู่ระยะ pentactula จะเปลี่ยนเป็นแพลงก์ตอนผสมระหว่าง *C. calcitrans* กับ *Tetraselmis chuii* (Jame, 2004) แต่การทดลองครั้งนี้เป็นการให้อาหารผสมระหว่างแพลงก์ตอน 2 ชนิด ตั้งแต่ระยะ auricularia จนถึง pentactula ซึ่งเห็นว่าอาหารที่เหมาะสมสำหรับการอนุบาลปลิงดำอาจเป็นส่วนผสมของแพลงก์ตอนพืชทั้ง 3 ชนิด คือ *I. galbana* , *C. calcitrans* และ *T. chuii* เนื่องจากผลการทดลองพบว่าขนาดของตัวอ่อนและระยะการพัฒนา ในชุดการทดลองที่เป็นอาหารผสมระหว่าง *C. calcitrans* + *I. galbana* ในสัดส่วน 1:1 กับ *C. calcitrans* + *T. chuii* มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการให้อาหารผสมระหว่างแพลงก์ตอน 2 ชนิด มีความเหมาะสมต่อการอนุบาลตัวอ่อนปลิงดำ มากกว่าการให้อาหารที่เป็นแพลงก์ตอนเพียงชนิดเดียว นอกจากกลุ่มของแพลงก์ตอนที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว ยังมีแพลงก์ตอนอีกหลายชนิดที่นำมาใช้เป็นอาหารสำหรับอนุบาลปลิงทะเล เช่น *Isochrysis* sp., *C. muelleri*, *C. calcitrans*, *Pavlova lutheri*, *Dunaliella salina*, *Dicrateria* spp., *Nanochloropsis oculata*, *Platymonas* sp., *Rhodomonas salina* (Jame, 2004; Pitt and Duy, 2004; Duy, 2012; Gamboa et al., 2012; Mills et al., 2012) เป็นต้น

จากการอนุบาลปลิงขาว *H. scraba* นั้น Jame (2004) แนะนำว่าการอนุบาลที่การเจริญเติบโตดีที่สุดและมีอัตราการตายต่ำที่สุด ควรให้ *I. galbana* ในช่วงแรกของการอนุบาล และหลังจากนั้นประมาณ 4-5 วัน จึงให้อาหารผสมโดยมี *Chaetoceros* spp. เป็นชนิดหลัก แต่หากจะนำข้อแนะนำดังกล่าวมาปรับใช้กับปลิงดำอาจต้องพิจารณาในเรื่องของการพัฒนาการเนื่องจากปลิงดำมีพัฒนาการช้ากว่าปลิงขาว ที่เห็นได้ชัดเจนคือระยะ auricularia มีระยะเวลานานประมาณ 20 วัน ในขณะที่ปลิงขาวใช้เวลาในระยะนี้เพียง 8-10 วัน เท่านั้น

การศึกษาการให้แสงในการอนุบาลปลิงดำระยะวัยอ่อน

ผลการอนุบาลตัวอ่อนปลิงดำตั้งแต่ระยะ auricularia จนถึงระยะ pentactula ภายใต้การได้รับแสงที่แตกต่างกัน พบว่าการได้รับแสงมีผลต่ออัตราการรอดตาย อัตราการลงเกาะ ขนาด และระยะเวลาการพัฒนาของตัวอ่อน สอดคล้องกับ Mercier et al. (1999) ที่กล่าวว่า การดำเนินกิจกรรมการดำรงชีวิตของปลิงทะเลที่มีขนาดเล็กกว่า 10-40 มิลลิเมตร จะเกี่ยวข้องกับการได้รับแสงในรอบวัน แต่ขนาดใหญ่มากกว่า 40-140 มิลลิเมตร จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ You et al. (2004) รายงานไว้ว่า เม่นทะเลชนิด *Hemicentrotus pulcherrimus* ซึ่งเป็น echinoderm เช่นเดียวกับปลิงทะเล จะมีการกินอาหาร การดูดซึม และจังหวะการให้อาหาร ที่ได้รับผลกระทบโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญกับช่วงเวลาการได้รับแสง พบว่าการอนุบาลภายใต้การไม่ให้แสงตลอดเวลานั้น มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดทั้งระยะ auricularia, doliolaria และ pentactula มีอัตรา

การลงเกาะสูงสุด มีระยะเวลาในการพัฒนาสั้นที่สุด แต่กลับมีขนาดของตัวอ่อนเล็กกว่าการอนุบาลภายใต้แสงธรรมชาติ และการให้แสงและไม่ให้แสงอย่างละ 12 ชั่วโมง ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลิงดำตอบสนองต่อสภาพแสงน้อยได้ดีกว่า ซึ่งอาจสอดคล้องกับพฤติกรรมการดำรงชีวิตตามธรรมชาติของปลิงทะเลเกือบทุกชนิด โดย Guancang *et al.* (2011) กล่าวว่าปลิงทะเลชนิด *Apostichopus japonicus* ที่อาศัยในธรรมชาติ จะมีพฤติกรรมการดำรงชีวิตตามปกติในช่วงเวลากลางคืน และพักผ่อนในช่วงเวลากลางวัน ดังนั้นการที่ปลิงดำต้องอาศัยอยู่ภายใต้การไม่ได้รับแสงตลอดเวลา จึงมีพฤติกรรมการดำรงชีวิต เช่น การกินอาหาร และเคลื่อนที่ได้ในช่วงเวลาที่ยาวนานขึ้น จึงส่งผลให้มีอัตราการรอดตายและอัตราการลงเกาะสูง และมีพัฒนาการที่ดี พฤติกรรมการออกหากินในเวลากลางคืนนี้ เกิดขึ้นกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยในทะเลหลายชนิดและอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพ (Mercier *et al.*, 1999; Dance *et al.*, 2003) แต่ในบางชนิดอาจไม่เกี่ยวข้องกับปัจจัยดังกล่าวทั้งที่เป็นสภาพธรรมชาติและสภาพการเพาะเลี้ยง (Guancang *et al.*, 2011)

อย่างไรก็ตามภายใต้สภาพไม่มีแสงดังกล่าวอาจส่งผลต่ออาหารซึ่งเป็นกลุ่มของแพลงก์ตอนพืช ที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้และอาจตายลง ในบางช่วงเวลาจึงอาจมีผลต่อปริมาณอาหารที่ไม่เพียงพอ จึงทำให้ขนาดของตัวอ่อนเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพแสงธรรมชาติ เมื่อมองในแง่ของขนาดจะสอดคล้องกับ Chen *et al.* (2007) ที่กล่าวว่าปลิง *A. japonicus* ที่ได้รับแสงอย่างต่อเนื่องและไม่ได้รับแสงอย่างต่อเนื่องจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าการได้รับแสงธรรมชาติ และการได้รับแสงและไม่ได้รับแสงอย่างละ 12 ชั่วโมง แต่ต่างกันตรงที่การทดลองครั้งนี้กลับพบว่าปลิงดำที่ไม่ได้รับแสงอย่างต่อเนื่องกลับมีระยะเวลาการพัฒนาที่สั้นกว่า Guancang *et al.* (2011) ได้รายงานไว้ว่าการได้รับแสงในช่วง 6-15 ชั่วโมงต่อวัน เป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับสภาพแสงตามธรรมชาติ และสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหารและกิจกรรม จึงอาจเป็นช่วงแสงที่เหมาะสมกับการเลี้ยงปลิงทะเลชนิด *A. japonicas* แต่การทดลองครั้งนี้ไม่ได้กระจายช่วงเวลาการได้รับแสงดังเช่นการทดลองดังกล่าว อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองก็แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนของปลิงดำชอบสภาพไม่มีแสงมากกว่าสภาพมีแสง