

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์

- 1.1 เครื่องให้อากาศแบบใช้แบตเตอรี่
- 1.2 เครื่องมือประมงพื้นบ้านประเภท อวนลอย อวนถ่วง ลอบปู
- 1.3 ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร

2. วัสดุและอุปกรณ์ในโรงเพาะฟัก

โรงปฏิบัติการเพาะเลี้ยงปลาฉลามมีระบบน้ำไหลผ่านตลอดเวลา โดยใช้น้ำทะเลจากธรรมชาติ ผ่านขั้นตอนการเตรียมน้ำด้วยระบบบ่อกักน้ำและกรองด้วยเศษปะการังที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว มีเครื่องอัดอากาศที่เดินเครื่องตลอดเวลา ซึ่งมีรายละเอียดของวัสดุและอุปกรณ์ดังต่อไปนี้

- 2.1 บ่อกอนกรีตสี่เหลี่ยม ความจุ 200 ตัน สำหรับเตรียมน้ำ
- 2.2 ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1,000 ลิตร สำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์
- 2.3 วัสดุที่ทำขึ้นด้วยเชือกเพื่อให้เป็นเชือกสาหร่ายสำหรับให้ไข่ยึดเกาะ
- 2.4 ตู้กระจกขนาด 45x122x47 เซนติเมตร สำหรับเพาะฟักไข่
- 2.5 ซากปะการังและระบบกรองน้ำภายในถัง (filter system)
- 2.6 สวิตช์ไขปลาและถังพลาสติกสำหรับลำเลียงไขปลา
- 2.7 สายวัดความยาวสำหรับวัดตัวปลา และเวอร์เนีย สำหรับวัดขนาดไข่
- 2.8 เครื่องชั่งระบบดิจิทัล ความละเอียด 0.1 ตำแหน่ง
- 2.9 กรรไกร
- 2.10 เครื่องอัดอากาศ และอุปกรณ์ให้อากาศ เช่น หัวทราย สายยาง ท่อพีวีซี
- 2.11 dymo tape สำหรับติดเครื่องหมายวันเดือนปีที่วางไข่
- 2.12 อาหารสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ เนื้อปลาทุบแช่ (Decapterus sp.)
- 2.13 อาหารสำหรับเลี้ยงลูกปลาฉลามกบวัยอ่อน ได้แก่ เนื้อกุ้งสดแกะเปลือก

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการและการถ่ายภาพ

3.1 สารเคมีสำหรับเก็บรักษาตัวอย่าง

- 3.1.1 ฟอรัมาลิน 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.1.2 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 3.1.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
- 3.1.4 Acidum aceticum concentrated
- 3.1.5 Glutandehyd
- 3.1.6 เอซิลแอลกอฮอล์
- 3.1.7 น้ำกลั่น
- 3.1.8 ควินาดีน (quinaldine)

3.2 อุปกรณ์บันทึกภาพและวิเคราะห์ผล

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ dissecting stereo microscope พร้อมติดตั้งกล้องถ่ายภาพ
- 3.2.2 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล ความละเอียด 5 เมกะพิกเซล ยี่ห้อ Olympus
- 3.2.3 เครื่องบันทึกวิดีโอ ยี่ห้อ Toshiba รุ่น Time lapse video 4 Head/960 Hour
- 3.2.4 กล้องถ่ายภาพนิ่ง ยี่ห้อ Nikon รุ่น F3
- 3.2.5 กล้องวิดีโอวงจรปิด ยี่ห้อ Fujiko B/W CCD CAMERA รุ่น EA 100/C
- 3.2.6 โคมไฟ infrared LED (night mode)
- 3.2.7 เทปบันทึกภาพวิดีโอ
- 3.2.8 เครื่องคอมพิวเตอร์ตั้งโต๊ะสำหรับเก็บข้อมูลและประมวลผล

3.3 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

- 3.3.1 อุปกรณ์และชุดเครื่องมือผ่าตัด
- 3.3.2 จานแก้ว และถาดผ่าตัด
- 3.3.3 สไลด์หลุมแบบหนา
- 3.3.4 ขวดฉีดน้ำ
- 3.3.5 ถุงมือพลาสติก

4. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำ

- 4.1 เครื่องวัดความเค็ม (salino refractometer)
- 4.2 เครื่องวัดอุณหภูมิ (max-min thermometer)
- 4.3 เครื่องวัดออกซิเจน (Oxygen meter) Model 850A Dissolved Oxygen / BOD
- 4.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH meter)

วิธีการ

1. การรวบรวมและการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาฉลามกบ

ออกเก็บตัวอย่างด้วยเรือประมงขนาดเล็กโดยใช้เครื่องมือประมงประเภทวนลาก ทำการประมงในเวลากลางวันบริเวณใกล้ฝั่งในระดับความลึกของน้ำ 5 – 20 เมตร บริเวณชายฝั่งทะเลของจังหวัดพังงา นำพ่อแม่พันธุ์ปลาฉลามกบมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ทรงกลมขนาดความจุ 1000 ลิตร ความสูงของระดับน้ำในถังประมาณ 70 เซนติเมตร แยกออกเป็น 3 ถัง โดยมีปริมาณน้ำในถังประมาณถังละ 780 ลิตร มีการกรองน้ำทะเลด้วยระบบกรองน้ำภายในถัง (sub-sand filter system) เปิดน้ำไหลผ่านตลอดเวลา ปริมาณน้ำเฉลี่ย 20 ลิตร/ชั่วโมง และเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำโดยใช้หัวทราย ปิดปากถังเลี้ยงด้วยอวนตาข่ายขนาดตา 1 นิ้ว เพื่อป้องกันการกระโดดเมื่อปลามีอาการตกใจจากการถูกรบกวนภายนอก และช่วยกรองแสงสว่าง ภายในถังเลี้ยงมีเชือกป่านผูกติดกับก้อนหิน คลายเกลียวเชือกออก เลียนแบบธรรมชาติให้มีลักษณะใกล้เคียงกับกิ่งกัลปังหา ปะการัง หรือสาหร่ายทะเล เพื่อเป็นที่สำหรับให้ไข่ไข่ยึดติดอยู่ได้ ตรงกลางถังมีท่อขนาด 4 นิ้วเจาะเป็นรูประมาณ 15 – 20 รู ที่ส่วนบนของท่อสำหรับถ่ายน้ำทะเลออก และท่อขนาด 1 นิ้วสำหรับเปิดน้ำเข้าจากข้างบนถังเพื่อให้ น้ำไหลผ่านในถังตลอดเวลาทั้งในช่วงกลางวันและในช่วงกลางคืน

ให้อาหารทุกวันโดยใช้เนื้อปลาทุบแช่ชนิด *Decapterus* sp. หั่นเป็นชิ้นๆ และเนื้อกุ้งสดชนิด *Peneus merguensis* และเปลือกในอัตราส่วน 1:1 ให้อาหารกินจนอิ่มทุกมื้อหากมีเศษอาหารเหลือจะทำการเก็บเศษอาหารที่ตกค้างพร้อมทั้งดูดตะกอนออกทุกครั้งโดยวิธีกักน้ำ

2. การตรวจสอบความสมบูรณ์ทางเพศและการผสมพันธุ์วางไข่

ปลาฉลามกบที่พร้อมจะเป็นพ่อแม่พันธุ์หรือเป็นวัยเจริญพันธุ์ สังเกตได้จากความเข้มของสีตลอดลำตัว ปลาฉลามกบตัวผู้มีสีเทาดำไม่มีลาย ขนาดความยาวตัวมากกว่า 56 เซนติเมตรและลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ (claspers) มีความสมบูรณ์แสดงว่ามีการผลิตน้ำเชื้อผสมพันธุ์ได้ ส่วนในปลาฉลามกบเพศเมียลำตัวจะเป็นสีน้ำตาลดำไม่มีลาย ขนาดความยาวตัวมากกว่า 54 เซนติเมตร ส่วนท้องลักษณะอูมเป่งมีสีซีดจางออกเป็นสีขาว แสดงว่ามีการเจริญพันธุ์สามารถให้ไข่ได้

ปลาฉลามกบมักมีการผสมพันธุ์และวางไข่ในช่วงเวลากลางคืน การศึกษาโดยนำกล้องวิดีโอความไวแสงสูง (night mode) ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกภาพวิดีโอ (time lapse) และต่อเข้าเครื่องโทรทัศน์ สำหรับบันทึกพฤติกรรมกรรมการผสมพันธุ์และการวางไข่เพื่อให้ทราบระยะเวลาที่แน่นอนของอายุไข่แต่ละฟอง บันทึกภาพโดยใช้แสง infra red (night mode) ในเวลากลางคืน ระยะเวลาในการศึกษานาน 1 เดือน

3. การเก็บตัวอย่างไข่ปลาฉลามกบและการตรวจสอบความสมบูรณ์ของไข่

หลังจากที่แม่ปลาวางไข่ ตรวจสอบเวลาที่แน่นอนจากกล้องบันทึกภาพ ใช้สวิงตักไข่ปลาออกจากถังเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ มาพักลงในถังขนาดความจุ 10 ลิตร ซึ่งมีน้ำทะเลอยู่ประมาณครึ่งถัง ทำความสะอาดไข่โดยใช้กรรไกรตัดเส้นใยรอบๆ ขอบของเปลือกไข่ เพื่อป้องกันการเน่าเสียในภายหลัง และเพื่อความสะดวกต่อการดูแลตัวอ่อนภายในไข่ ตรวจสอบสภาพของไข่ว่ามีความสมบูรณ์หรือไม่ โดยการนำไข่ไปส่องให้แสงสว่างผ่าน ถ้าเป็นไข่ที่สมบูรณ์จะเห็นเป็นเงาก้อนกลมของไข่แดงชัดเจน เมื่อเอียงไข่ไปซ้ายมาขวาไข่แดงจะเคลื่อนที่ไปตามแรงโน้มถ่วงของโลก แต่ถ้าไข่แดงไม่เคลื่อนไหวแสดงว่าเป็นไข่เสีย บันทึกขนาดของไข่ โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ วัดความกว้าง ความหนาและความยาวของไข่ ชั่งน้ำหนักไข่โดยใช้เครื่องชั่งดิจิทัลความละเอียด 0.1 กรัม บันทึกข้อมูลโดยติดแถบหมายเลขพลาสติก (dymo tape) เข้ากับไข่แต่ละใบ โดยระบุวันเดือนปีที่วางไข่

4. การศึกษาพัฒนาการของปลาฉลามกบ

นำไข่ไปฟักโดยเรียงเป็นแถวในตู้ไฟเบอร์ทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 50 x 120 x 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระดับน้ำสูง 45 เซนติเมตร ลักษณะของตู้ประกอบด้วย

กระจกอะคริลิกหนึ่งด้าน มีระบบกรองด้วยทรายและให้อากาศโดยใช้หัวทรายผ่านระบบกรอง เปลี่ยนน้ำและทำความสะอาดตู้ฟักไข่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในระหว่างการเพาะฟักต้องตรวจสอบสภาพ ไข่ทุกวัน

ศึกษาการเกิดระบบอวัยวะต่างๆ ของตัวอ่อนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะต่างๆ ที่เกิดขึ้น เป็นลำดับขั้นตามระยะเวลาหรืออายุของตัวอ่อน โดยนำฟองไข่มาผ่าเปิดออกดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) ที่มีกล้องถ่ายภาพประกอบติดไว้ และสังเกตลักษณะต่างๆ ได้โดยตรงเมื่อตัวอ่อนมีขนาดโตขึ้น พร้อมด้วยบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับตัวอ่อนก่อนจะฟักออก เมื่อลูกปลาฟักออกมาจากไข่ วัดความยาว ชั่งน้ำหนัก และตรวจสอบเพศลูกปลา

การศึกษการพัฒนาของตัวอ่อนปลาตามกบแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ

1. การพัฒนาของตัวอ่อนภายในฟักไข่ เริ่มศึกษาตั้งแต่ ไข่ที่ได้รับการผสมจนกระทั่งแม่ปลาวางไข่ ขนาดของไข่และเส้นผ่าศูนย์กลางของไข่แดง การแบ่งเซลล์ในระยะแรก การเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่างบนไข่แดง และไข่เริ่มเปลี่ยนสี การเริ่มมีตัวอ่อนที่จุดแรกของไข่แดง การเริ่มเป็นตัวอ่อน การพัฒนาการเกิดอวัยวะต่างๆ ของตัวอ่อนและการเกิดเมดูลี จนตัวอ่อนมีลักษณะของอวัยวะต่างๆ ครบสมบูรณ์ และพร้อมที่จะฟักออกจากเปลือกไข่มาสู่ภายนอก

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของตัวอ่อนหลังจากที่ฟักออกมาจากไข่ จนมีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย ได้แก่ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีและลายบนตัวปลา ที่มีความสัมพันธ์กับอายุเมื่อปลามีขนาดโตขึ้น

การอนุบาล โดยแยกเลี้ยงในตะกร้าซึ่งมีฝาปิด ขนาด กว้าง x ยาว x ลึก เท่ากับ 20 x 32 x 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลูกปลาที่ฟักออกในวันเดียวกันจำนวนตะกร้าละ 4 ตัว ลอยตะกร้าในถังกลมขนาดความจุ 1000 ลิตร เปิดน้ำไหลผ่านตลอดเวลา ให้อากาศโดยผ่านหัวทราย ให้เนื้อกุ้งสดหรือปลาหมึกสดเป็นอาหาร หั่นเป็นชิ้นขนาดพอดีปาก อนุบาลลูกปลาตามกบในตะกร้าเป็นระยะเวลาประมาณ 1 เดือน จากนั้นปล่อยลงเลี้ยงในถังจำนวนถังละ 4 ตัว แยกเลี้ยงเป็น 2 แบบคือ ลูกปลาตามกบที่มีอายุต่างกัน และลูกปลาตามกบที่มีอายุเท่ากัน เพื่อความสะดวกในการเก็บข้อมูลของลักษณะลวดลายบนตัวปลา และลักษณะสีภายนอก ทำการเลี้ยงลูกปลาไปจนกระทั่งมีลักษณะใกล้เคียงพ่อแม่พันธุ์หรือเป็นตัวเต็มวัย

การศึกษาการเจริญเติบโตของปลาฉลามกบ โดยการสุ่มตัวอย่างปลาฉลามกบจำนวน 60 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และวัดความยาวของลำตัว การศึกษาการเปลี่ยนลายและสีบนตัวปลา เก็บรายละเอียดด้วยการบันทึกภาพไว้เป็น รูปปลาฉลามกบที่มีอายุต่างกันเก็บข้อมูลการถ่ายภาพทุก 7 วัน รูปปลาฉลามกบที่มีอายุเท่ากันบันทึกภาพทุก 10 วัน แล้วนำข้อมูลภาพถ่ายทั้งหมด มาประมวลผลเพื่อแบ่งระยะเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะบนตัวปลาอย่างชัดเจน ตัวอย่างการแยกเลี้ยงปลาฉลามกบเพื่อต้องการเก็บข้อมูลอย่างละเอียดด้วยการถ่ายภาพ ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงการเก็บข้อมูลการถ่ายภาพทุก 10 วัน ของกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุเท่ากัน

กลุ่มตัวอย่างรูปปลาที่มีอายุเท่ากัน ตะกร้าละ 4 ตัว (เก็บข้อมูลทุกๆ 10 วัน)					
ครั้งที่	วันที่เก็บข้อมูล	อายุกลุ่มตัวอย่าง ณ. วันที่เก็บข้อมูล			
		ตะกร้าที่ 1	ตะกร้าที่ 2	ตะกร้าที่ 3	ตะกร้าที่ 4
1	1 มกราคม	1	3	6	9
2	11 มกราคม	11	13	16	19
3	21 มกราคม	21	23	26	29
4	31 มกราคม	31	33	36	39
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
37	28 ธันวาคม	361	363	366	369

ตารางที่ 2 แสดงการเก็บข้อมูลการถ่ายภาพทุก 7 วัน ของกลุ่มตัวอย่างที่มีช่วงอายุต่างกัน

กลุ่มตัวอย่างรูปปลาที่มีอายุต่างกัน ตะกร้าละ 4 ตัว (เก็บข้อมูลทุกๆ 7 วัน)					
ครั้งที่	วันที่เก็บข้อมูล	ช่วงอายุของตัวอย่าง ณ. วันที่เก็บข้อมูล			
		ตะกร้าที่ 1	ตะกร้าที่ 2	ตะกร้าที่ 3	ตะกร้าที่ 4
1	1 มกราคม	1-4	5-8	9-12	13-16
2	8 มกราคม	5-8	9-12	13-16	17-20
3	15 มกราคม	9-12	13-16	17-20	21-24
4	22 มกราคม	13-16	17-20	21-24	25-28
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
52	28 ธันวาคม	364-368	-	-	-

5. การศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ของปลาฉลามกบ

การศึกษาพฤติกรรมตลอดช่วงของชีวิตตั้งแต่ฟักออกมาจากไข่ จนกระทั่งสามารถเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้อีกรุ่น โดยนำปลาฉลามกบที่มีอายุเท่ากันประมาณ 1 ปี แยกเลี้ยงในกระชัง ใส่ปลาฉลามกบเพศผู้และเพศเมียที่มีอายุเท่ากัน กระชังละ 1 คู่ จำนวน 4 กระชัง เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการศึกษา เมื่อแม่ปลาเริ่มวางไข่ทำให้ทราบข้อมูลอายุของวัยเจริญพันธุ์ ที่แน่นอน

เมื่อแม่ปลาเริ่มวางไข่ในกระชังทดลองเลี้ยง ทำให้ทราบอายุถึงวัยเจริญพันธุ์ของปลาฉลามกบเพศเมีย และเมื่อนำไข่มาฟักในตู้กระจก สังเกตการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนภายในฟักไข่ว่ามีการพัฒนาหรือไม่ เพื่อจะได้ทราบอายุวัยเจริญพันธุ์ของปลาฉลามกบเพศผู้ โดยเมื่อเพศเมียได้รับน้ำเชื้อจากการผสมพันธุ์สามารถเห็นได้จากการที่มีการพัฒนาของตัวอ่อนภายในฟักไข่ ทำให้ทราบอายุของวัยเจริญพันธุ์ของปลาฉลามกบเพศผู้ได้

6. การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะฟักและอนุบาล

ตรวจวัดคุณภาพน้ำที่ใช้ในการเพาะฟักไข่ปลาฉลามและการอนุบาลลูกปลาทุกวัน ได้แก่ วัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ (Max-Min Thermometer) ชนิดบรรจุปรอทบันทึกค่าต่ำสุด-สูงสุด วัดความเค็มโดยใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ (Refractometer) และวัดความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้เครื่องพีเอช มิเตอร์ (pH-meter)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่

โรงเพาะฟักของสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน
อำเภอเมือง จังหวัด ภูเก็ต โทรศัพท์ 0-7639-1126 โทรสาร 0-7639-1406

2. ระยะเวลาในการวิจัย

ทำการศึกษาระหว่างเดือน มิถุนายน 2545 ถึง เดือนธันวาคม 2547 เป็นเวลา 2 ปี 6 เดือน

- เก็บข้อมูลการเปลี่ยนสีและลักษณะภายนอกบนผิวของตัวปลา เดือน เมษายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547 รวมเป็นระยะเวลา 1 ปี
- เก็บข้อมูลการพัฒนาตัวอ่อน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2547 ถึงเดือน ตุลาคม 2547 รวมเป็นระยะเวลา 6 เดือน
- เก็บข้อมูลศึกษาพฤติกรรมตลอดวงจรชีวิตตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2545 ถึง เดือน ธันวาคม 2547 รวมเป็นระยะเวลา 2.5 ปี
- วิเคราะห์ข้อมูลการศึกษาและเขียนรายงานวิทยานิพนธ์ ตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2547 ถึงเดือน มกราคม 2549