

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

วัสดุ

1. พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำ (*Holothuria atra* Jaeger, 1833) ขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 250 กรัมขึ้นไป มีความยาวลำตัวประมาณ 20 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1)
2. ตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia (ภาพที่ 3.3)
3. อาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลตัวอ่อนระยะ auricularia จนถึง pentactular (ระยะลงเกาะ) ได้แก่ *Chaetoceros calcitrans* และ *Isochrysis galbana*
4. วัสดุเกาะที่เป็นวัสดุแข็ง ได้แก่ ทราชทะเล เศษปะการัง และโคลน (ภาพที่ 3.6)
5. วัสดุเกาะที่เป็นสาหร่ายทะเล ได้แก่ สาหร่ายผักกาด (*Ulva rigida*) สาหร่ายขนนก (*Caulerpa taxifolia*) สาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda* sp.) สาหร่ายเม็ดพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) และสาหร่ายพัด (*Padina* sp.) (ภาพที่ 3.7)
6. วัสดุเกาะที่เป็นวัสดุสังเคราะห์ ได้แก่ polyethylene plastic sheet, plastic film, monofilament nylon และ shading net (ภาพที่ 3.8)



ภาพที่ 3.1 พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำ

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. สำหรับการเตรียมน้ำ
 - บั๊มน้ำแบบแช่พร้อมสายยาง
 - หลอด UV สำหรับฆ่าเชื้อน้ำ
 - ถังกรองขนาดช่องตา 69 ไมครอน
 - ถังกรองทราย
 - ถังพลาสติกความจุ 500 ลิตร

- ถังไฟเบอร์กลาสความจุ 800 ลิตร
- อุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ สายยาง และหัวทราย
- เครื่องวัดความเค็ม (refracto-salinometer) ยี่ห้อ Atago รุ่น S-100
- เครื่องวัดอุณหภูมิ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์แบบปรอท ช่วงอุณหภูมิ 0-100 องศาเซลเซียส
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ YSI รุ่น Ecosense pH 100
- เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO meter) ยี่ห้อ YSI รุ่น Professional Series Pro 20

2. สำหรับการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

- กระบะพลาสติกสี่เหลี่ยมความจุ 160 ลิตร (กว้าง x ยาว x สูง = 88 x 160 x 53 เซนติเมตร)
- เครื่องวัดอุณหภูมิ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์แบบปรอท ช่วงอุณหภูมิ 0-100 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็ง
- ป้อนน้ำแบบจุ่มพร้อมสายยาง
- อุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ สายยาง และหัวทราย

3. สำหรับการอนุบาลตัวอ่อน

- ถังพลาสติกทรงกลมสีดำขนาดบรรจุ 200 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 78 เซนติเมตร สูง 64 เซนติเมตร)
- วัสดุสำหรับการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำ ตามชุดการทดลองที่กำหนด
- อุปกรณ์ให้อากาศ

3. สำหรับการตรวจสอบความหนาแน่นและความสมบูรณ์ของตัวอ่อน

- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)
- กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล
- เครื่องนับจำนวนชนิดมีือกด (hand tally counter)
- สไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) พร้อมแผ่นปิดสไลด์
- สไลด์นับแพลงก์ตอน (sedgewick-rafer slide) พร้อมแผ่นปิดสไลด์
- สไลด์หลุมพร้อมแผ่นปิดสไลด์
- หลอดหยด (dropper) พร้อมจุกยาง
- ปีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- ปีกเกอร์ขนาด 100 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

การศึกษาเทคนิคการอนุบาลตัวอ่อนปลิงตำระยะ Auricularia ถึง Pentactular ด้วยวัสดุเกาะต่างชนิด แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ตามรูปแบบของวัสดุเกาะ และแต่ละการทดลองจะแบ่งออกเป็นชุดการทดลองตามชนิดของวัสดุเกาะ ได้แก่ การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาการลงเกาะบนวัสดุชนิดแข็ง การทดลองที่ 2 ศึกษาการลงเกาะบนพืชทะเล และการทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาการลงเกาะบนวัสดุสังเคราะห์ ดังนี้ โดยมีขั้นตอนของวิธีการคือ การเตรียมการทดลอง (การเตรียมน้ำทะเลและอุปกรณ์การทดลอง การรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ การเพาะพันธุ์ และการเตรียมตัวอ่อนระยะ auricularia) การทดลอง (การอนุบาลตัวอ่อนระยะ auricularia จนกระทั่งลงเกาะโดยอาศัยวัสดุเกาะตามที่กำหนด) และการเก็บข้อมูล รายละเอียดของแต่ละขั้นตอนมีดังนี้

1. การเตรียมการทดลอง

1.1. การเตรียมน้ำทะเลและวัสดุอุปกรณ์การทดลอง

1.1.1 การเตรียมน้ำทะเล: โดยการสูบน้ำทะเลมาพักไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปผ่านระบบกรองทรายตามวิธีการของ Xiyin *et al.* (2004) และฆ่าเชื้อด้วยแสงยูวีตามวิธีการของ ธนศ (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

ทำการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลิงตำจากธรรมชาติ บริเวณชายฝั่งทะเลในช่วงเวลาน้ำลง แหล่งรวบรวมพ่อแม่พันธุ์คือชายฝั่งอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร วิธีการรวบรวมอาศัยการดำผิวน้ำ (snorkeling) และใช้มือเก็บ โดยคัดเลือกเฉพาะปลิงตำที่มีขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 250 กรัมขึ้นไป มีความยาวลำตัวประมาณ 20 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2) นำมาพักเป็นเวลา 1 คืน เพื่อบริโภคเพาะพันธุ์ น้ำทะเลที่ใช้มีระดับความเค็มใกล้เคียงกับแหล่งอาศัยเดิมของพ่อแม่พันธุ์ (ประมาณ 30 ส่วนในพัน) เพื่อให้พ่อแม่พันธุ์ขับทรายบางส่วนในระบบทางเดินอาหาร แต่จะไม่พักนานเกิน 1 คืน เนื่องจากจะทำให้เกิดความเครียดและพ่อแม่พันธุ์ไม่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์



ภาพที่ 3.2 พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำจากธรรมชาติ

1.3. การเพาะพันธุ์

การเพาะพันธุ์อาศัยการกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยอสุจิและไข่ ออกมาผสมกันในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ วิธีการกระตุ้นเป็นการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ โดยการเตรียมน้ำทะเลที่มีระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน (ระดับเดียวกับน้ำที่ใช้สำหรับฟักพ่อแม่พันธุ์) การกระตุ้นใช้ถังพลาสติกสีเหลืองขนาดบรรจุ 160 ลิตร จำนวน 2 ถัง เติมน้ำทะเลสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ถังที่ 1 สำหรับการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ ในถังนี้จะปรับอุณหภูมิน้ำให้ต่ำกว่าในถังฟักพ่อแม่พันธุ์ประมาณ 5 องศาเซลเซียส โดยการใช้น้ำแข็งบรรจุถุงพลาสติก ส่วนถังที่ 2 สำหรับการปล่อยไข่และอสุจิ อุณหภูมิน้ำจะเท่ากับในถังฟักพ่อแม่พันธุ์

กระตุ้นโดยการนำพ่อแม่พันธุ์ในถังฟักจำนวน 20 ตัว ใส่ลงในถังที่ 1 ซึ่งทำการปรับอุณหภูมิลแล้ว ทิ้งไว้ 30 นาที และให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นนำพ่อแม่พันธุ์ทั้งหมดไปใส่ในถังที่ 2 เพื่อให้ปล่อยอสุจิและไข่ ในถังนี้จะให้อากาศตลอดเวลาเช่นกัน ซึ่งตามปกติพ่อแม่พันธุ์จะปล่อยอสุจิออกมาก่อนจากนั้นแม่พันธุ์จะปล่อยไข่ออกมาภายหลัง โดยพ่อแม่พันธุ์จะปล่อยอสุจิในช่วงเวลา 15-30 นาที (ภาพที่ 3.3) ส่วนแม่พันธุ์จะปล่อยไข่หลังจากนั้นประมาณ 5-30 นาที (ภาพที่ 3.3) ระยะเวลาในการปล่อยจะแตกต่างกันตามความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ที่นำมากระตุ้น ไข่ปลิงดำมีสีแดงอมส้มหรือสีชมพูอมส้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 140-150 ไมครอน (ภาพที่ 3.4) หลังจากปลิงทะเลปล่อยอสุจิและไข่เสร็จสิ้นแล้วจะนำพ่อแม่พันธุ์ออกจากถัง รอให้ไข่ได้รับการผสมกับอสุจิประมาณ 30 นาที จากนั้นย้ายไข่ไปใส่ในถังฟักไข่เพื่อผลิตตัวอ่อนระยะ auricularia ต่อไป

1.4. การเตรียมตัวอ่อนระยะ auricularia

เตรียมตัวอ่อนระยะ auricularia (ภาพที่ 3.5) โดยการนำไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไปใส่ในถังฟัก โดยใช้ถังพลาสติกกลมขนาดบรรจุ 200 ลิตร ที่ระดับความเค็มน้ำ 30 ส่วนในพัน ให้อากาศตลอดเวลา ในระหว่างฟักไข่จะตรวจสอบการพัฒนารูปร่างของตัวอ่อนจนกระทั่งฟักออกเป็นตัวอ่อน

ระยะแรกหรือระยะ auricularia ระยะเวลาดำรงชีพประมาณ 45-48 ชั่วโมง ขนาดความยาวของตัวอ่อนประมาณ 400-450 ไมครอน ตรวจสอบความหนาแน่นและสัณฐานจำนวนของตัวอ่อนนำไปอนุบาลตามตามปัจจัยที่กำหนดต่อไป

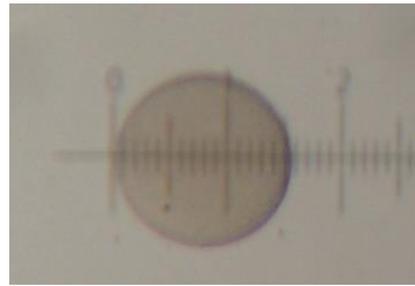
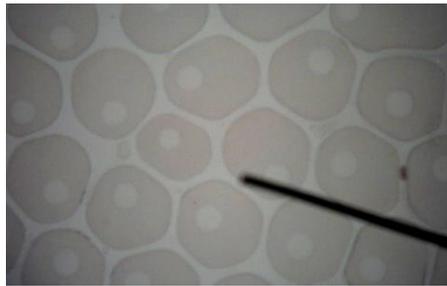


ลักษณะการปล่อยอสุจิของพ่อพันธุ์



ลักษณะการปล่อยไข่ของแม่พันธุ์

ภาพที่ 3.3 ลักษณะการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ



ภาพที่ 3.4 ลักษณะไข่ของปลิงดำ



ภาพที่ 3.5 ลักษณะตัวอ่อนระยะ auricularia ของปลิงดำ

1.5. การเตรียมแพลงก์ตอนพืช

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

1.6. การเตรียมวัสดุเกาะ

วัสดุเกาะทุกชนิดจะนำมาล้างทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งมีชีวิตที่อาจเกาะติดมากับวัสดุดังกล่าว ดังนี้

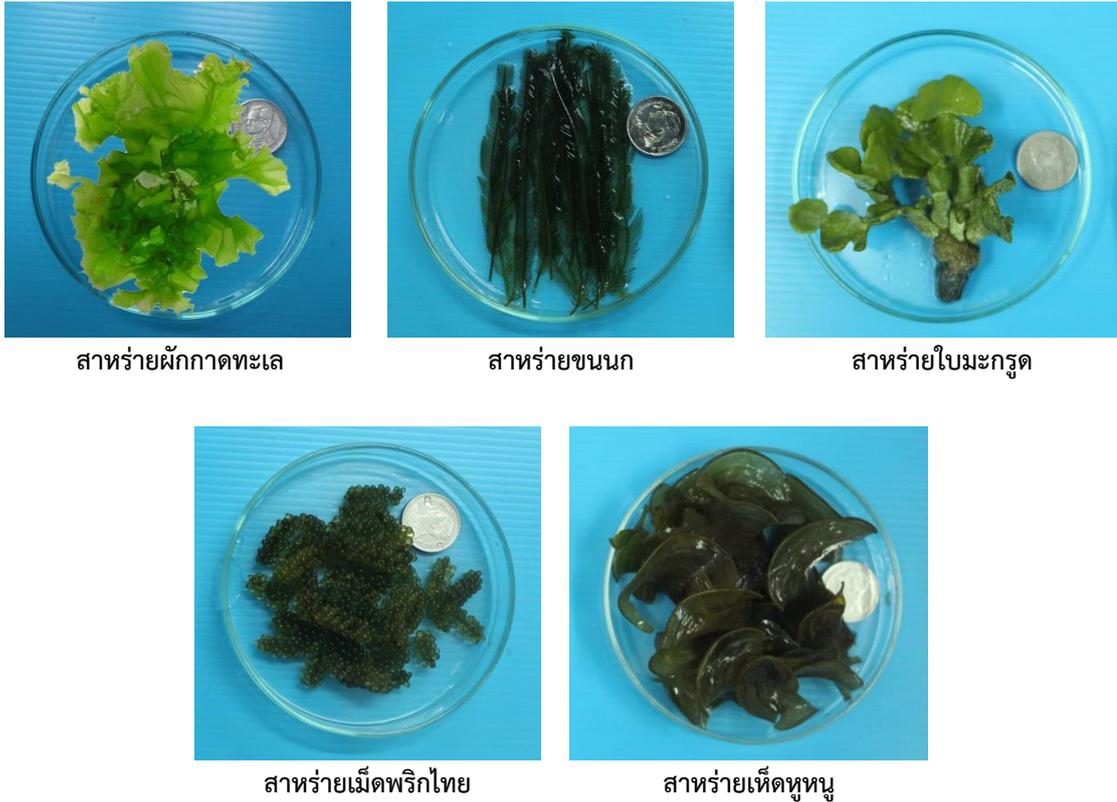
1) วัสดุเกาะที่เป็นชนิดแข็ง (ภาพที่ 3.6) ซึ่งได้แก่ ททรายทะเล เศษปะการัง และโคลน ทำความสะอาดตามวิธีการของ Mercier (2000) โดยการปล่อยน้ำทะเลให้ไหลผ่านวัสดุดังกล่าวนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณสารอินทรีย์ วัสดุชนิดแข็งเหล่านี้เมื่อนำไปใส่ลงในถุงอนุบาลจะมีความหนาจากพื้นก้นถึง 5 เซนติเมตร โดยมีพื้นที่ผิวหรือพื้นที่หน้าตัดประมาณ 2,850 ตารางเซนติเมตร



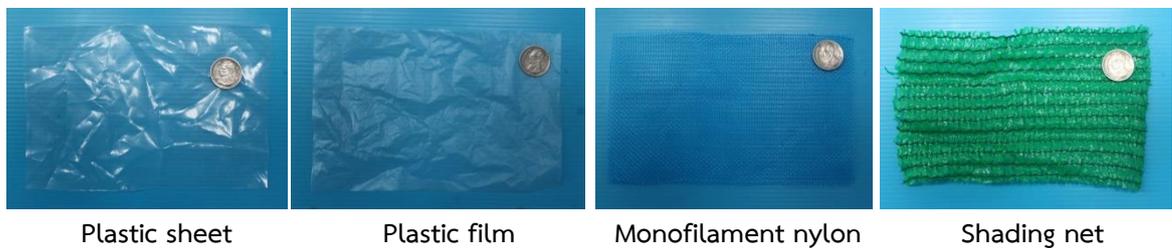
ภาพที่ 3.6 วัสดุเกาะชนิดแข็ง

2) วัสดุเกาะที่เป็นสาหร่ายทะเล (ภาพที่ 3.7) ซึ่งได้แก่ สาหร่ายผักกาด สาหร่ายขนนก สาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda* sp.) สาหร่ายเม็ดพริกไทย และสาหร่ายเห็ดหูหนู (*Padina* sp.) ทำความสะอาดตามวิธีการของ Mercier (2000) โดยการแช่ในน้ำจืดเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในเมธานอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และนำไปแช่ในน้ำจืดอีก 10 นาที ขนาดของสาหร่ายที่ใช้แต่ละชั้นจะมีพื้นที่ผิวประมาณ 14 ตารางเซนติเมตร และมีพื้นที่ผิวรวมในแต่ละหน่วยการทดลอง 15,000 ตารางเซนติเมตร

3) วัสดุสังเคราะห์ (ภาพที่ 3.8) วัสดุทั้ง 4 ชนิด คือ plastic sheet, plastic film, monofilament nylon และ shading net จะนำมาแช่ในน้ำทะเลเพื่อให้ปราศจากพืชเนื่องจากเป็นวัสดุสังเคราะห์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ ตามวิธีการของ Li *et al.* (2010) โดยการนำไปแช่ในต่างทับทิม (potassium permanganate) ความเข้มข้น 20 ส่วนในล้าน นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำจืด และตากให้แห้งก่อนนำไปใช้ โดย plastic sheet จะมีขนาด (กว้างxยาว) เท่ากับ 10X15 เซนติเมตรเมตร plastic film มีขนาด 10X15 เซนติเมตร (พื้นที่ผิวด้านละ 150 ตารางเซนติเมตร) monofilament nylon ขนาด 20X30 เซนติเมตร และ shading net (สีเขียว) ขนาด 10X15 เซนติเมตร วัสดุสังเคราะห์ทุกชนิดมีพื้นที่ผิวด้านละ 150 ตารางเซนติเมตร และแต่ละชนิดจะนำมาประกอบเป็นชุด ๆ ละ 10 ชั้น (แต่ละชุดมีพื้นที่ผิว 3,000 ตารางเซนติเมตร) แต่ละหน่วยการทดลองใส่วัสดุเกาะจำนวน 5 ชุด (แต่ละหน่วยการทดลองมีพื้นที่ผิว 15,000 ตารางเซนติเมตร)



ภาพที่ 3.7 สาหร่ายทะเล



ภาพที่ 3.8 วัสดุสังเคราะห์

วัสดุเกาะที่เป็นสาหร่ายทะเลและวัสดุสังเคราะห์ทุกชนิดเมื่อทำความสะอาดแล้ว จะนำมาแช่น้ำทะเลในถังไฟเบอร์ขนาด 200 ลิตร พร้อมใส่อาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนปลิงดำ ก่อนจะเข้าระยะ pentactula ประมาณ 3-5 วัน เพื่อให้เกิดการเคลือบผิวของวัสดุเกาะ หรือเกิด biofilm แล้วนำไปใส่ในถังทดลอง ส่วนวัสดุชนิดแข็งจะใส่สาหร่ายขนาดเล็กในระหว่างการทดลอง

2. การทดลอง

ทำการทดลองเพื่อศึกษาวัสดุที่เหมาะสมในการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำทั้งสิ้น 3 ประเภท ได้แก่ วัสดุเกาะที่เป็นวัสดุแข็ง วัสดุเกาะที่เป็นพืชทะเล และวัสดุเกาะที่เป็นวัสดุสังเคราะห์ แบ่งการ

ทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ตามประเภทของวัสดุเกาะ ซึ่งแต่ละการทดลองมีการแบ่งชนิดของวัสดุที่ศึกษา ดังต่อไปนี้

2.1. การทดลองที่ 1 ศึกษาการลงเกาะบนวัสดุชนิดแข็ง

2.1.1 แผนการทดลอง

การศึกษาการลงเกาะบนวัสดุชนิดแข็งวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีวัสดุเกาะ (ปูพื้น) ชนิดแข็งเป็นสิ่งที่ทดลอง (treatments) แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ (replications) รวมทั้งสิ้น 16 หน่วยทดลอง (experimental units) ดังนี้

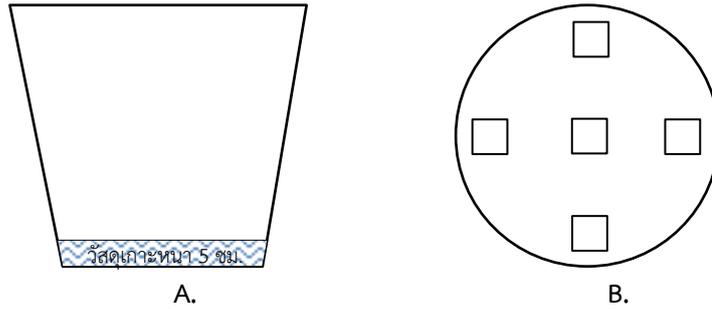
- ชุดการทดลองที่ 1 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้ทรายทะเลเป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 2 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้เศษปะการังเป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 3 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้โคลนเป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 4 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้วัสดุเกาะผสมระหว่าง ทรายทะเล เศษปะการัง และโคลน

2.1.2 วิธีการทดลอง

ศึกษาการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำโดยทำการทดลองในถังพลาสติกกลมสีดำขนาด 200 ลิตร โดยการเติมน้ำทะเลที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน ปริมาตร 150 ลิตร แต่ละหน่วยการทดลองปล่อยตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia ลงอนุบาลที่ความหนาแน่น 200 ตัว ต่อ น้ำ 1 ลิตร (30,000 ตัวต่อถัง) ในถังทดลองจะใส่วัสดุเกาะชนิดแข็งตามชุดการทดลองที่กำหนด ซึ่งจะเริ่มใส่วัสดุเกาะเมื่อตัวอ่อนปลิงดำพัฒนาเข้าสู่ระยะ late doliolaria อาหารที่ให้ในช่วงก่อนการลงเกาะเป็นแพลงก์ตอนผสมระหว่าง *Chaetoceros calcitrans* และ *Isochrysis galbana* ในอัตราส่วนผสมระหว่าง 1:1 ความเข้มข้นของอาหารที่ให้ประมาณ 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Laxminarayana, 2005) วันละ 2 ครั้ง เวลา 06.00 และ 18.00 น. มีการคลุกถังเลี้ยงด้วยผ้าใบสีดำให้มีตลอดเวลา ทำการอนุบาลจนกระทั่งตัวอ่อนปลิงดำลงเกาะทั้งหมด (ตรวจสอบจากการที่ตัวอ่อนหายไปจากมวลน้ำ)

2.1.3 การสุ่มเก็บข้อมูล

เนื่องจากวัสดุชนิดแข็งจะทิ้งตัวอยู่บริเวณก้นถังอนุบาล ดังนั้นการสุ่มเก็บตัวอย่างจึงคำนวณจากพื้นที่หน้าตัดของถังพลาสติกทรงกลมขนาด 200 ลิตร ที่ความสูงจากพื้นก้นถึงประมาณ 5 เซนติเมตร (ความหนาของชั้นวัสดุเกาะ) ซึ่งมีพื้นที่หน้าตัดประมาณ 2,850 ตารางเซนติเมตร ทำการสุ่มเก็บข้อมูลจำนวน 5 จุด (ภาพที่ 3.9) จุดละ 100 ตารางเซนติเมตร รวมพื้นที่สุ่มทั้งสิ้น 500 ตารางเซนติเมตร



ภาพที่ 3.9 การสุ่มเก็บข้อมูลจากการลงเกาะบนวัสดุชนิดแข็ง (A. ลักษณะถังอนุบาลและความสูงของวัสดุเกาะ B. พื้นที่หน้าตัดก้นถังและช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเป็นพื้นที่สุ่มขนาด 10x10 เซนติเมตร)

2.2. การทดลองที่ 2 ศึกษาการลงเกาะบนพืชทะเล

2.2.1 แผนการทดลอง

การศึกษากการลงเกาะบนพืชทะเล จะอาศัยส่วนที่มีลักษณะคล้ายใบของสาหร่ายทะเล และส่วนใบของหญ้าทะเลที่เจริญเติบโตในแหล่งอาศัยตามธรรมชาติของปลิงทะเล เป็นสิ่งทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 15 หน่วยการทดลอง ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้สาหร่ายผักกาด (*Ulva rigida*) เป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 2 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้สาหร่ายขนนก (*Caulerpa taxifolia*) เป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 3 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้สาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda* sp.) เป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 4 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้สาหร่ายสาหร่ายเม็ดพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) เป็นวัสดุเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 5 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้สาหร่ายเห็ดหูหนู (*Padina* sp.) เป็นวัสดุเกาะ

2.2.2 วิธีการทดลอง

ศึกษากการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำโดยทำการทดลองในถังพลาสติกกลมสีขาวขนาด 200 ลิตร โดยการเติมน้ำทะเลที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน ปริมาตร 150 ลิตร แต่ละหน่วยการทดลองปล่อยตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia ลงอนุบาลที่ความหนาแน่น 200 ตัว ต่อ น้ำ 1 ลิตร (30,000 ตัวต่อถัง) ในถังทดลองจะใส่วัสดุเกาะชนิดแข็งตามชุดการทดลองที่กำหนด ซึ่งจะเริ่มใส่วัสดุเกาะเมื่อตัวอ่อนปลิงดำพัฒนาเข้าสู่ระยะ late doliolaria อาหารที่ให้ในช่วงก่อนการลงเกาะเป็น

แพลงก์ตอนผสมระหว่าง *Chaetoceros calcitrans* และ *Isochrysis galbana* ในอัตราส่วนผสมระหว่าง 1:1 ความเข้มข้นของอาหารที่ให้ประมาณ 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Laxminarayana, 2005) วันละ 2 ครั้ง เวลา 06.00 และ 18.00 น. เปิดถังเลี้ยงให้ได้รับแสงตลอดเวลา เนื่องจากวัสดูเกาะเป็นกลุ่มของสาหร่ายและพืช ทำการอนุบาลจนกระทั่งตัวอ่อนปลิงดำลงเกาะทั้งหมด (ตรวจสอบจากการที่ตัวอ่อนหายไปจากมวลน้ำ)

2.2.3 การสุ่มเก็บข้อมูล

การสุ่มเพื่อเก็บข้อมูลจากวัสดูเกาะที่เป็นสาหร่ายทะเล เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมสาหร่ายทะเลเพื่อเป็นวัสดูเกาะได้กำหนดขนาดที่จะนำมาใช้ โดยเมื่อคำนวณหาพื้นที่ผิวของสาหร่ายทะเลแล้วพบว่าแต่ละชนิดแต่ละชั้นจะมีพื้นที่ 14 ตารางเซนติเมตร และในแต่ละหน่วยการทดลองจะใส่สาหร่ายทะเลให้มีพื้นที่ผิวทั้งสิ้น 15,000 ตารางเซนติเมตร แต่ละหน่วยการทดลองจะทำการสุ่มสาหร่ายทะเลเพื่อเก็บข้อมูลทั้งสิ้น 10 ชั้น คิดเป็นพื้นที่ทั้งสิ้น 1,400 ตารางเซนติเมตร

2.3. การทดลองที่ 3 ศึกษาการลงเกาะบนวัสดูสังเคราะห์

2.3.1 แผนการทดลอง

การศึกษากการลงเกาะบนวัสดูสังเคราะห์ เป็นการดัดแปลงใช้วัสดูจากการเลี้ยงปลิงทะเลชนิดอื่นๆในต่างประเทศ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีวัสดูสังเคราะห์เป็นสิ่งทดลอง แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 16 หน่วยการทดลอง ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้ plastic sheet เป็นวัสดูเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 2 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้ plastic film เป็นวัสดูเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 3 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้ monofilament nylon เป็นวัสดูเกาะ
- ชุดการทดลองที่ 4 อนุบาลตัวอ่อนปลิงดำโดยใช้ shading net เป็นวัสดูเกาะ

2.3.2 วิธีการทดลอง

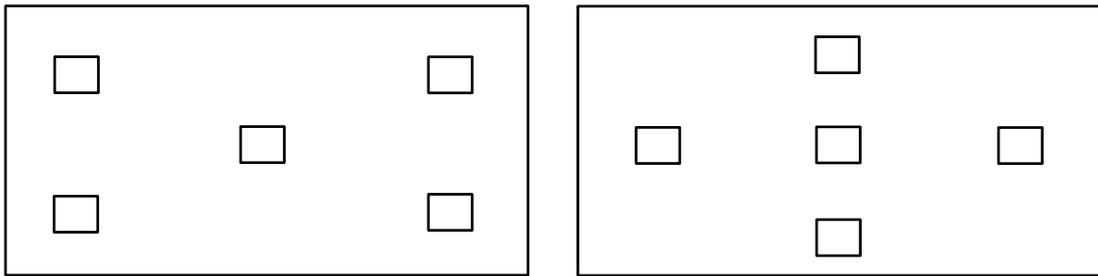
ศึกษากการลงเกาะของตัวอ่อนปลิงดำโดยทำการทดลองในถังพลาสติกกลมสีดำขนาด 200 ลิตร โดยการเติมน้ำทะเลที่ความเค็ม 35 ส่วนในพัน ปริมาตร 150 ลิตร แต่ละหน่วยการทดลองปล่อยตัวอ่อนปลิงดำระยะ auricularia ลงอนุบาลที่ความหนาแน่น 200 ตัว ต่อ น้ำ 1 ลิตร (30,000 ตัวต่อถัง) ในถังทดลองจะใส่วัสดูเกาะชนิดแข็งตามชุดการทดลองที่กำหนด ซึ่งจะเริ่มใส่วัสดูเกาะเมื่อตัวอ่อนปลิงดำพัฒนาเข้าสู่ระยะ late doliolaria อาหารที่ให้ในช่วงก่อนการลงเกาะเป็นแพลงก์ตอนผสมระหว่าง *Chaetoceros calcitrans* และ *Isochrysis galbana* ในอัตราส่วนผสมระหว่าง 1:1 ความเข้มข้นของอาหารที่ให้ประมาณ 20,000-25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(Laxminarayana, 2005) วันละ 2 ครั้ง เวลา 06.00 และ 18.00 น. มีการคลุมถังเลี้ยงด้วยผ้าใบสีดำ ให้มืดตลอดเวลา ทำการอนุบาลจนกระทั่งตัวอ่อนปลิงดำลงเกาะทั้งหมด (ตรวจสอบจากการที่ตัวอ่อนหายไจากมวน้ำ)

2.3.3 การสุ่มเก็บข้อมูล

วัสดุสังเคราะห์ที่ใช้คือ plastic sheet, plastic film, monofilament nylon และ shading net เนื่องจากวัสดุสังเคราะห์ที่ใช้มีลักษณะที่ไม่แตกต่างกันมาก แต่อาจมีบางชนิดที่มีลักษณะเป็นช่อง คือ monofilament nylon ดังนั้นในแต่ละชั้นจึงมีขนาดเป็น 2 เท่า ของวัสดุชนิดอื่น ซึ่ง plastic sheet, plastic film และ shading net แต่ละชั้นจะมีขนาด 10X15 เซนติเมตร ส่วน monofilament nylon มีขนาด 20X30 เซนติเมตร แต่เมื่อนำมาหาพื้นที่ผิวแล้วจะมีพื้นที่ประมาณ 150 ตารางเซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลอง

การสุ่มจะสุ่มจาก 5 จุด บนผิววัสดุแต่ละชั้น รวม 2 ลักษณะ (ภาพที่ 3.10) แต่ละจุดมีพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร แต่ละหน่วยการทดลองจะสุ่มทั้งสิ้น 15 ชั้น (ใส่วัสดุเกาะหน่วยการทดลองละ 5 ชุด 1 ชุด ประกอบด้วย 10 ชั้น สุ่ม 3 ชั้น จากแต่ละชุด)



ภาพที่ 3.10 การสุ่มเก็บข้อมูลจากการลงเกาะบนวัสดุสังเคราะห์ (พื้นที่สี่เหลี่ยมเล็กคือแต่ละจุดที่เก็บข้อมูล)

3. การเก็บรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ผล

3.1. การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลที่ทำกรเก็บรวบรวม ได้แก่ จำนวนและอัตราการลงเกาะ ระยะเวลาการลงเกาะ และขนาดของตัวอ่อน pentactula ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการเก็บข้อมูลในส่วนของอัตราการรอดตาย (survival rate) เนื่องจากตัวอ่อนปลิงดำบางส่วนไม่ได้ลงเกาะบนวัสดุที่ทำกรทดลองทั้งหมด แต่มีบางส่วนที่อาจลงเกาะบนภาชนะสำหรับอนุบาล ดังนั้นจำนวนตัวอ่อนที่ลงเกาะและอัตราการลงเกาะจึงไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของจำนวนตัวอ่อนที่รอดตายและอัตราการรอดตายได้ การเก็บรวบรวมข้อมูลมีขั้นตอนวิธีการ ดังนี้

3.1.1 จำนวนและอัตราการลงเกาะ

ในแต่ละการทดลองจะทำการสุ่มนับจำนวนตัวอ่อนระยะ pentactula บนวัสดุเกาะแต่ละชนิด นำมาคำนวณหาจำนวนตัวอ่อนที่ลงเกาะและอัตราการลงเกาะ (settlement rate) ดังนี้

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

3.1.2 ระยะเวลาการลงเกาะ

เนื่องจากตัวอ่อนระยะ auricularia – doliolaria อยู่ในลักษณะที่เป็นแพลงก์ตอนลอยอยู่ในมวลน้ำ ทั้งยังมีลักษณะลำตัวใส และมีขนาดเล็กต้องส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจสอบการลงเกาะของตัวอ่อนจึงมีความยุ่งยาก ในที่นี้จะตัดแปลงจากวิธีการของ Mercier (2000) โดยการสุ่มเก็บน้ำในแต่ละหน่วยทดลองปริมาตร 120 มิลลิลิตร มาตรวจสอบและนับจำนวนตัวอ่อน ถ้าพบตัวอ่อนในน้ำแสดงว่าตัวอ่อนยังลงเกาะไม่หมด แต่ถ้าไม่พบตัวอ่อนแสดงว่าตัวอ่อนลงเกาะหมด การตรวจสอบระยะเวลาการลงเกาะจะนับเริ่มตั้งแต่ปล่อยตัวอ่อน auricularia ลงอนุบาลจนถึงวันที่ตัวอ่อนลงเกาะทั้งหมด

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล:

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

4. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

- รวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลิงดำจากบริเวณหาดบ่อเมา อำเภอบึงสามพัน จังหวัดชุมพร
- ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล ณ อาคารปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร อำเภอบึงสามพัน จังหวัดชุมพร