บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

- พลั่วตักดิน
- ตะแกรงร่อนขนาดช่องตาตะแกรง 5, 1 และ 0.5 มิลลิเมตร
- Hand Refractometer
- ปั๊มน้ำขนาด 40 วัตต์ จำนวน 2 เครื่อง
- อุปกรณ์ต่อท่อน้ำ/ท่ออากาศ
- เครื่องให้อากาศ หัวทราย
- ตาข่ายสีฟ้าชนิดตาละเอียด 1x1 มิลลิเมตร
- ถุงกรองน้ำขนาดตาละเอียด 5 ไมครอน
- กรวยกรองขนาดตาละเอียด 20 ไมครอน
- กะละมังสังกะสีเคลือบสีขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 เซนติเมตร สูง 6.5 เซนติเมตร ความจุ 1 ลิตร
- Thermometer
- เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บีกเกอร์ หลอดหยด สไลด์ และ สไลด์หลุม ฯลฯ
- ขวดโหลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร ความจุ 10 ลิตร
- ขวดน้ำพลาสติกขนาด 8x8x30 เซนติเมตร ความจุ 1.5 ลิตร
- เครื่องเขย่าอัตโนมัติ
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และแบบเลนส์ประกอบ
- อุปกรณ์ถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- ปากคีบ และ เข็มเขี่ย
- กล้องถ่ายรูป
- ขวดแก้วเก็บตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร
- ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างแบบมีฝาปิด ขนาด 1 มิลลิลิตร
- ฟอร์มาลิน 10 %

2.2 วิธีดำเนินการ

2.2.1 การเตรียมอุปกรณ์

บ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์: ใช้บ่อซีเมนต์ขนาด 176x270x70 เซนติเมตร จำนวน 2 บ่อ รองพื้นบ่อด้วยตาข่ายมุ้งสีฟ้าชนิดตาละเอียดขนาดตาประมาณ 1x1 มิลลิเมตร ก่อนที่จะใส่ทรายหยาบลงไป โดยใส่ให้มีความหนาของชั้นทราย 10 เซนติเมตร (รูปที่ 16 และ 17)

ภาชนะที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อน: แบ่งออกเป็น 2 ระยะของการอนุบาล ระยะแรกหลังจากที่ไข่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม นำไข่ไปอนุบาลในขวดพลาสติกทรงเหลี่ยมใสขนาด 8x8x30 เซนติเมตร ความจุ 1.5 ลิตร ใส่น้ำ 1 ลิตร ที่หุ้มรอบขวดด้วยพลาสติกสีดำ (รูปที่ 18) อนุบาลจนเข้าสู่ระยะ trochophore แล้วจึงย้ายตัวอ่อนไปอนุบาลต่อในขวดโหลทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร สูง 35 เซนติเมตร ที่หุ้มด้วยพลาสติกสีดำ ความจุ 10 ลิตร (รูปที่ 19) ใส่น้ำ 5 ลิตร จนตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง

2.2.2 การเตรียมดิน

ก่อนเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์จะต้องล้างทรายด้วยน้ำจืดหลายๆ ครั้งให้สะอาด แล้วนำทรายไปตากแดดให้แห้งก่อนนำมาใส่ในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์

นำดินจากบริเวณเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคเม็ดดิน โดยวิธีไฮโดรมิเตอร์ (Gee and Bauder, 1986) และวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุตามวิธี Walkley and Black modified (Nelson and Sommers, 1986) และนำทรายที่ใช้เลี้ยงมาวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคเม็ดดิน และหาปริมาณอินทรียวัตถุภายหลังจากการเลี้ยง

รูปที่ 16 บ่อซีเมนต์ขนาด 176x270x70 เซนติเมตร ที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์

รูปที่ 17 ลักษณะของทรายหยาบที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์

รูปที่ 18 ขวดพลาสติกใสที่หุ้มด้วยพลาสติกสีดำขนาดความจุ 1.5 ลิตร ที่ใช้ในการอนุบาลตัวอ่อนจนเข้าสู่ระยะ trochophore

รูปที่ 19 ขวดโหลขนาดความจุ 10 ลิตร ปิดคลุมด้านข้างด้วยพลาสติกสีดำที่ใช้ในการอนุบาลตัวอ่อนระยะ trochophore จนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง

2.2.3 การเตรียมน้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลอง: ใช้ทั้งน้ำทะเล และน้ำจืด (น้ำประปา) เพราะจะต้องปรับค่าความเค็มของน้ำให้ได้ตามต้องการ น้ำทะเลและน้ำจืดที่นำมาใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนผง (แคลเซียมไฮโปคลอไรต์) ความเข้มข้น 20 ppm (สิทธิ บุณยรัตผลิน, 2530) และกำจัดคลอรีนให้หมดก่อนนำมาใช้โดยการให้อากาศตลอดเวลาจนกว่าคลอรีนจะหมดไป ซึ่งทดสอบได้โดยการใช้โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) หยดลงไปในน้ำเพื่อดูการเปลี่ยนสีของสารละลายหากสารละลายมีการเปลี่ยนสีจากสีขาวใสไปเป็นสีเหลืองแสดงว่าคลอรีนยังคงเหลืออยู่ แต่ถ้าสารละลายไม่มีการเปลี่ยนสีแสดงว่าคลอรีนถูกกำจัดออกหมดจึงจะสามารถนำน้ำดังกล่าวมาใช้ได้ น้ำทะเลและน้ำจืดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะต้องนำมาพักเตรียมไว้ใช้ตลอดการทดลองโดยมีการให้อากาศตลอดเวลา (รูปที่ 20)

น้ำที่ใช้เติมในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์จะต้องมีการกรองโดยใช้ถุงกรองซึ่งทำจากผ้าขนาดตาละเอียด 5 ไมครอน ทุกครั้ง ส่วนน้ำที่ใช้ในการทดลองเพาะพันธุ์ ศึกษาพัฒนาการขั้นต้นและวิธีการคนไข่ จะต้องปรับค่าความเค็มให้เท่ากับความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ขณะนั้น และก่อนใช้จะต้องกรองน้ำโดยใช้ถุงกรองขนาดตาละเอียด 5 ไมครอน แล้วกรองอีกครั้งด้วยกรวยกรองขนาดตาละเอียด 20 ไมครอน ก่อนใส่ในภาชนะที่ใช้อนุบาล เพื่อกำจัดใยของถุงกรองขนาดตาละเอียด 5 ไมครอน เพราะถุงกรองชนิดดังกล่าวเมื่อใช้ไปจะมีการเปื่อยยุ่ย

รูปที่ 20 บ่อพักน้ำเค็มที่ปรับค่าความเค็ม ก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ และใช้ในการทดลอง ภายในบ่อมีการให้อากาศตลอดเวลา

2.2.4 การเตรียมตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์

เก็บตัวอย่างจากบริเวณหมู่ 1 บ้านอ่าวทราย ต. เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา ในขณะที่น้ำลงต่ำสุดจนสามารถมองเห็นพื้นโคลนในบริเวณเขต intertidal โดยใช้พลั่วตักดินลึกประมาณ 10-20 เซนติเมตร งัดเอาก้อนดินขึ้นมาแล้วจึงกระจายเอาก้อนดินออกเพื่อนำไส้เดือนทะเลออกจากดิน เลือกเฉพาะไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* ที่มีลักษณะเป็นตัวเต็มวัย โดยไส้เดือนทะเลชนิดดังกล่าวมีลักษณะที่สามารถสังเกตได้จากภายนอกคือ ลำตัวมีสีแดงปนสีชมพูอ่อน ลักษณะลำตัวยาว มี tentacle cirri 4 คู่ มีตา 2 คู่ มี palp 2 อัน มีขนาดความยาวประมาณ 5-9 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (รูปที่ 21 บน) เก็บพ่อแม่พันธุ์ไส้เดือนทะเลให้ได้ปริมาณมากที่สุด ซึ่งการเก็บแต่ละครั้งอาจได้ตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์จำนวนไม่มาก เพราะฉะนั้นจึงต้องมีการเก็บตัวอย่างหลายครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณพ่อแม่พันธุ์สำหรับใช้ทดลองอย่างเพียงพอ นำไส้เดือนทะเลที่คัดเลือกได้ไปใส่ในกะละมังอะลูมิเนียมที่เตรียมไว้ ซึ่งได้ใส่ทรายละเอียดจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างลงไปในกะละมังเล็กน้อยเพื่อเป็นที่หลบซ่อนของไส้เดือนทะเล และใส่น้ำจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างพอท่วมทราย (รูปที่ 21 กลาง) จากนั้นนำไส้เดือนทะเลที่ได้มายังโรงเพาะฟักภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (รูปที่ 21 ล่าง) เพื่อทำการคัดเลือกไส้เดือนทะเลที่มีความสมบูรณ์นำไปเลี้ยงเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป

2.2.5 อาหารที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนทะเล

ในช่วงของการเลี้ยงเพื่อนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์จะให้อาหารกุ้งสำเร็จรูป (อาหารกุ้งกุลาดำเบอร์ 2 ยี่ห้อ ดีลักซ์ ABN-2 ของบริษัทไทยลักซ์ เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด (มหาชน) มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% ปริมาณไขมันไม่ต่ำกว่า 5% กากไม่มากกว่า 3% และความชื้นไม่มากกว่า 15%) แก่ไส้เดือนทะเล (ปริมาณอาหารที่ให้จะปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสมโดยสังเกตจากปริมาณไส้เดือนทะเลที่ขึ้นมากินอาหาร) ส่วนในระยะที่เป็นแพลงก์ตอนไส้เดือนทะเลในวงศ์ Nereididae จะไม่กินอาหาร (Ruppert and Barnes, 1994) เพราะฉะนั้นในช่วงของการศึกษาวิธีการเพาะพันธุ์ พัฒนาการขั้นต้น และวิธีการคนไข่ จึงไม่ต้องให้อาหารแก่ตัวอ่อน

รูปที่ 21 การเก็บตัวอย่างไส้เดือนทะเล: คัดเลือกไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* ออกจากดิน (บน); กะละมังอะลูมิเนียมที่ใส่ทราย และน้ำจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างลงไปพอท่วมทราย (กลาง); ไส้เดือนทะเลบรรจุในถุงพลาสติกเพื่อขนย้าย (ล่าง)

2.3 วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design: CRD)

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* โดยวิธีตามธรรมชาติ และวิธีการผสมเทียมภายในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาจากอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตราการรอด จนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง (เนื่องมาจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการปฏิสนธิ ตัวอ่อนจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่มี 3 ปล้องอย่างสมบูรณ์)

นำพ่อแม่พันธุ์ไส้เดือนทะเลที่พร้อมผสมพันธุ์โดยสังเกตจากการขึ้นมาว่ายน้ำเพื่อจับคู่ผสมพันธุ์มาทำการทดลองเพาะพันธุ์ 2 วิธีคือ

1) การเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ เตรียมน้ำทะเลให้มีความเค็มเท่ากับความเค็มในบ่อเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ขณะนั้น นำกะละมังสังกะสีเคลือบสีขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 เซนติเมตร สูง 6.5 เซนติเมตร ความจุ 1 ลิตร ใส่น้ำทะเลที่เตรียมไว้ลงไป 200 มิลลิลิตร ใส่ไส้เดือนทะเลตัวผู้และตัวเมียที่ขึ้นมาว่ายน้ำแล้วในอัตราส่วน 1:1 ไส้เดือนทะเลที่พร้อมจะผสมพันธุ์จะว่ายน้ำเข้ามารัดกันเอง หลังจากไส้เดือนทะเลผสมพันธุ์กันเสร็จให้แยกตัวพ่อแม่พันธุ์ออก (ปิยะพงค์ โชติพันธุ์ และ อนงค์ สวรรยาธิปัตย์, 2528) นำไข่ที่ได้ไปอนุบาลเพื่อศึกษาต่อ ในขวดพลาสติกที่เตรียมไว้ เติมน้ำทะเลที่เตรียมไว้ลงไปจนได้ปริมาตร 1 ลิตร และให้อากาศตลอดเวลา จนครบ 48 ชั่วโมง

2) การเพาะพันธุ์โดยวิธีผสมเทียม นำไส้เดือนทะเลตัวผู้และตัวเมียแยกใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไส้เดือนทะเลตัวเมียมาตัดตรงกลางลำตัวโดยใช้มีดผ่าตัดแล้วปล่อยให้ไข่ไหลออกมาจนหมด นำไข่ไปล้างด้วยน้ำทะเลที่เตรียมไว้ (ปรับค่าความเค็มแล้ว) โดยการคนด้วยขนไก่เบาๆ รอให้ไข่ตกตะกอน แล้วค่อยๆ รินน้ำออก ทำซ้ำกัน 2 ครั้ง จากนั้นนำไส้เดือนทะเลตัวผู้มาตัดตรงกลางลำตัวเช่นกัน โดยในภาชนะจะต้องใส่น้ำทะเลที่เตรียมไว้ประมาณ 25-50 มิลลิลิตร ปล่อยให้น้ำเชื้อไหลออกมาแล้วคนน้ำเชื้อผสมกับน้ำทะเลที่เตรียมไว้ แล้วดูดเอาน้ำเชื้อที่ผสมแล้วจำนวน 3-4 หยด ลงไปผสมกับไข่ที่ล้างแล้ว ทำการคนเบาๆ (Grave, 1937) นำไข่ที่ได้ไปอนุบาลเพื่อศึกษาต่อในขวดพลาสติกที่เตรียมไว้ เติมน้ำทะเลที่เตรียมไว้ลงไปจนได้ปริมาตร 1 ลิตร และให้อากาศตลอดเวลา จนครบ 48 ชั่วโมง

การเพาะพันธุ์ในแต่ละวิธีจะใช้พ่อแม่พันธุ์ครั้งละ 1 คู่ ทำการทดลองทั้งหมดวิธีละ 4 ครั้ง การฟักไข่จะแยกฟักไข่ของคู่ผสมแต่ละคู่ออกจากกัน

การเก็บตัวอย่างแบ่งออกเป็น 3 ครั้ง

ครั้งที่ 1 เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิ โดยเก็บตัวอย่างหลังจากเริ่มทำการทดลอง 30 นาที เนื่องจากที่ระยะเวลาดังกล่าว สามารถสังเกตความแตกต่างระหว่างไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ กับไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิได้อย่างชัดเจน

ครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาอัตราการฟัก โดยเก็บตัวอย่างหลังจากเริ่มทำการทดลอง 10 ชั่วโมง เนื่องจากที่ระยะเวลาดังกล่าวสามารถสังเกตตัวอ่อนที่ฟักออกมาได้

ครั้งที่ 3 เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาอัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง หมายถึงเวลาที่สิ้นสุดการทดลอง โดยนับเฉพาะตัวอ่อนระยะ nectochaete ที่มี 3 ปล้องสมบูรณ์

การกำหนดระยะเวลาต่างๆ และวิธีเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้เป็นการนำข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นมาปรับใช้ตามความเหมาะสม

การหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตรารอดจนถึงระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมงที่ได้จากการเพาะพันธุ์ทั้ง 2 วิธี ใช้วิธีคำนวณโดย:

$$\text{อัตราการปฏิสนธิ (\%)} = \left(\frac{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดที่นำมาทดลอง - จำนวนไข่เสีย}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดที่นำมาทดลอง}} \right) * 100$$

$$\text{อัตราการฟัก (\%)} = \left(\frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ฟักออกมาใหม่}}{\text{จำนวนไข่ที่นำมาฟัก}} \right) * 100$$

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \left(\frac{\text{จำนวนตัวอ่อนระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ฟัก}} \right) * 100$$

การทดลองที่ 2 ศึกษาพัฒนาการขั้นต้นของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* (ตั้งแต่เริ่มมีการปฏิสนธิจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง)

เลือกวิธีการเพาะพันธุ์ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ทำการเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเลเพื่อนำมาศึกษาในการทดลองที่ 2 โดยสุ่มตัวอย่างมาศึกษาพัฒนาการในแต่ละระยะ แบ่งการสุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 ช่วงคือ

- ช่วงที่ 1 สุ่มตัวอย่างทุกๆ 10 นาที ตั้งแต่ไข่เริ่มมีการปฏิสนธิจนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 2 (120 นาที)
- ช่วงที่ 2 สุ่มตัวอย่างทุก 30 นาที เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ถึงชั่วโมงที่ 12
- ช่วงที่ 3 สุ่มตัวอย่างทุก 60 นาที หลังจากชั่วโมงที่ 12 จนตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง การสุ่มตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาจะสุ่มตัวอย่าง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประมาณ 10 ตัว แล้วนำไปดองใน buffer formalin 4 % ที่ทำให้เป็นกลางโดยใช้ borax ($Na_2B_4O_7$) (Fauchald, 1977) เพื่อนำมาศึกษาระยะการพัฒนาด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป การกำหนดระยะเวลาในการสุ่มตัวอย่างออกเป็นช่วงๆ ดังกล่าว เนื่องมาจากผู้วิจัยได้ทำการทดลองเบื้องต้นพบว่าในช่วงแรกของการพัฒนา ไข่ของไส้เดือนทะเลจะมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว และจะค่อยๆ ช้าลงในระยะต่อมา จึงนำผลการทดลองดังกล่าวมาใช้ในการกำหนดเวลาในการเก็บตัวอย่าง

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของวิธีการคนไข่ ต่ออัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*

ทำการเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเล (เลือกวิธีการจากผลของการทดลองที่ 1) นำไข่ที่ได้มาแบ่งออกเป็น 12 ส่วนเท่าๆกัน แล้วนำไปเลี้ยงต่อโดยวิธีการคนต่างๆ กัน ดังนี้

1 วิธีการวางภาชนะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า นำไข่ที่ได้รับการผสมแล้วมาเลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบ/นาที มีการให้อากาศตลอดเวลา

2 วิธีการคนด้วยมือโดยใช้หลอดกาแฟเป็นวัสดุในการคน นำไข่ที่ได้รับการผสมแล้วมาเลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร มีการให้อากาศตลอดเวลา และมีการคนไข่ด้วยมือเป็นเวลา 2 นาที โดยการคนแนวตรงไปทางขวา (ในแนวเดียวกันตลอด) ทุกๆ 6 ชั่วโมง

3 วิธีการให้อากาศตลอดเวลา นำไข่ที่ได้รับการผสมแล้วมาเลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร มีการใช้เครื่องให้อากาศตลอดเวลา แต่ไม่มีการคนไข่

ทำการทดลองวิธี (treatment) ละ 4 ซ้ำ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (พ่อแม่พันธุ์ครั้งละ 1 คู่) หาอัตรารอด (%) ของตัวอ่อนระยะ nectochaete ในแต่ละวิธีโดย

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \left(\frac{\text{จำนวนตัวอ่อนระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง}}{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ}} \right) * 100$$

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* โดยวิธีตามธรรมชาติ และวิธีการผสมเทียมภายในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาจากอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 ศึกษาพัฒนาการขั้นต้นของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* (ตั้งแต่เริ่มมีการปฏิสนธิจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง) วิเคราะห์ผลการทดลองโดยสรุประยะเวลาที่ตัวอ่อนใช้ในการพัฒนาเข้าสู่ระยะต่างๆ

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของวิธีการคนไข่ ต่ออัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์