

3. อุปกรณ์

- 3.1 พ่อแม่พันธุ์หอยมุก
- 3.2 อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และสารเคมี
- 3.3 กล้องจุลทรรศน์ติดตั้งกล้องถ่ายรูป
- 3.4 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (digital)
- 3.4 เวอร์เนีย คาลิเปอร์ (vernier calipers)
- 3.5 แผ่นสไลด์ Sedgwick-Rafter counting chamber
- 3.6 เครื่องปั๊มลม เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบดิจิทัล ตู้อบแห้ง
- 3.7 อุปกรณ์เพาะลูกหอย
 - ถังเพาะขนาด 500 ลิตร
 - กระบะบรรจุหอย
- 3.8 ฝ้ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 20, 32, 48, 69, 95, 104, 155, 180 และ 197 ไมโครเมตร (μ)
- 3.9 อุปกรณ์เพาะแพลงก์ตอน
 - ขวดคาร์บอยขนาด 20 ลิตร
 - ถังไฟเบอร์กลาส



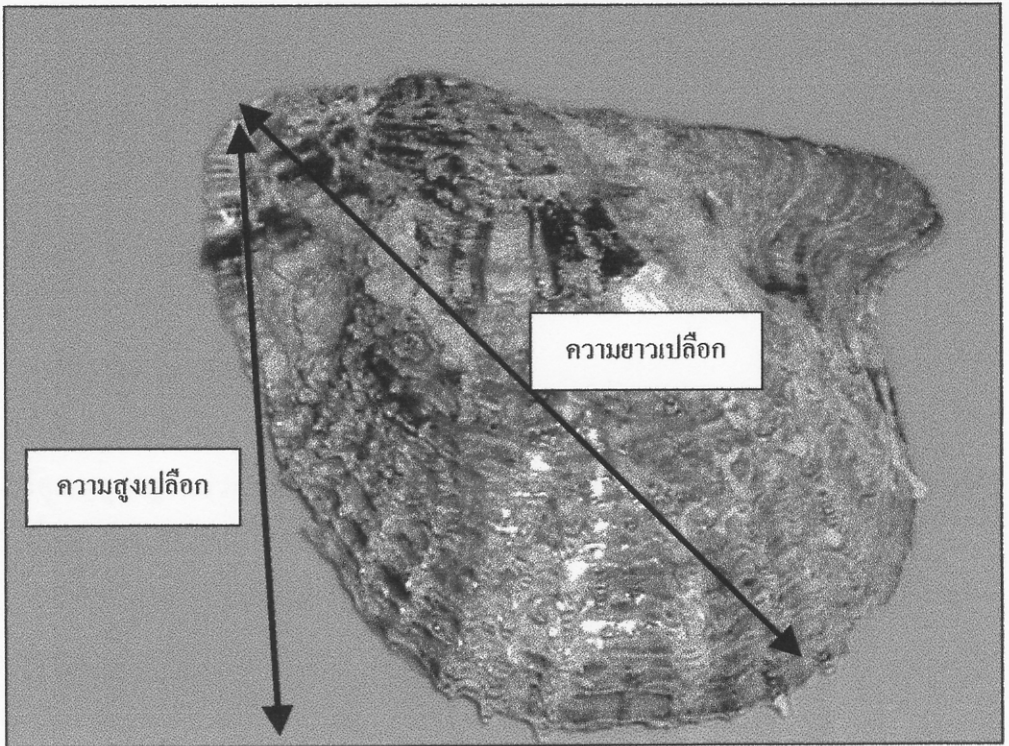
ภาพที่ 3 จุดวงกลมสีแดงแสดงสถานที่ทำการทดลอง

4. วิธีการวิจัย

4.1 ขั้นตอนการเพาะและการอนุบาลหอยมุกแกลบ

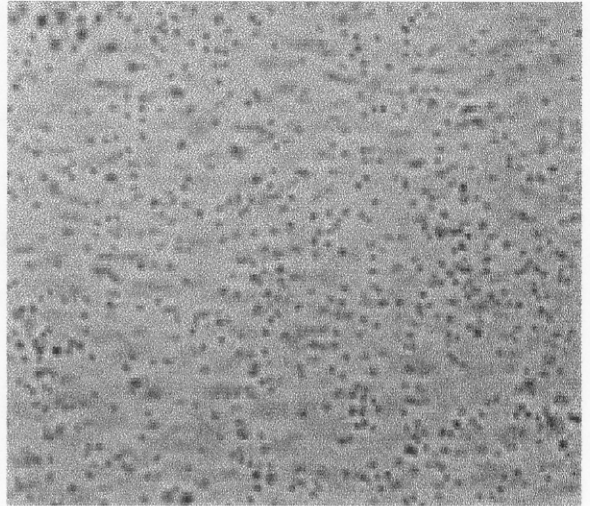
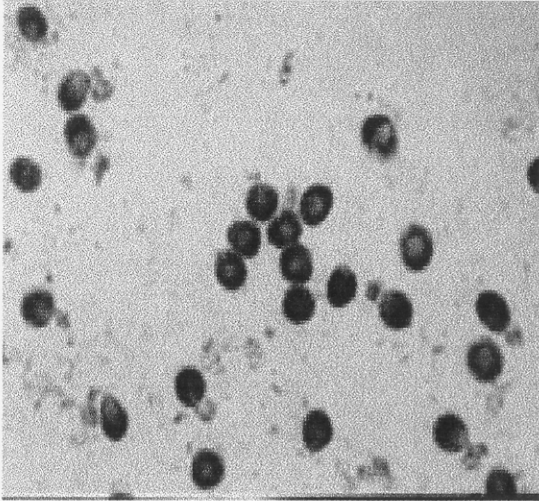
4.1.1 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์

1. คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ขนาดความยาวเปลือก 6.40-6.70 เซนติเมตร โดยวัดจากส่วนปลายแหลมด้าน anterior ที่ติดกับบานพับของเปลือก ไปจนถึงขอบเปลือกตามภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การวัดขนาดเปลือกหอยมุกแกลบ

2. ตรวจสอบความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์ ถ้าหอยที่มีความสมบูรณ์ตัวหอยจะอวบและเต่งตึง โดยทดลองใช้เข็มเข็มบริเวณที่เป็นของเหลวสีขาวครีมซึ่งเมื่อนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10×40 ถ้าเป็นสปิริรมจะเห็นเชลล์ขนาดเล็กมากมาย และถ้าเป็นไข่จะมีลักษณะค่อนข้างกลม (ขนาดของไข่จะใหญ่กว่าขนาดของสปิริรม) ตามภาพที่ 5 การสังเกตสีของอวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์เพื่อใช้ในการแยกเพศหอยมุกแกลบสังเกตได้ไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากบางครั้งอวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะมีสีส้ม แต่บางครั้งก็จะเป็นสีขาวครีมจึงต้องใช้วิธีตรวจดูด้วยกล้องเพียงอย่างเดียว จากการทดลองใช้ตัวอย่างหอยมุกแกลบ 200 ตัว ได้ตัวผู้ที่มีสมบูรณ์เพศ 50 ตัว และตัวเมีย 60 ตัว โดยล้างทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งมีชีวิตอื่นที่เกาะบนเปลือกออกให้หมด



ภาพที่ 5 ลักษณะของไข่ (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) ที่ยังไม่ได้รับการผสม

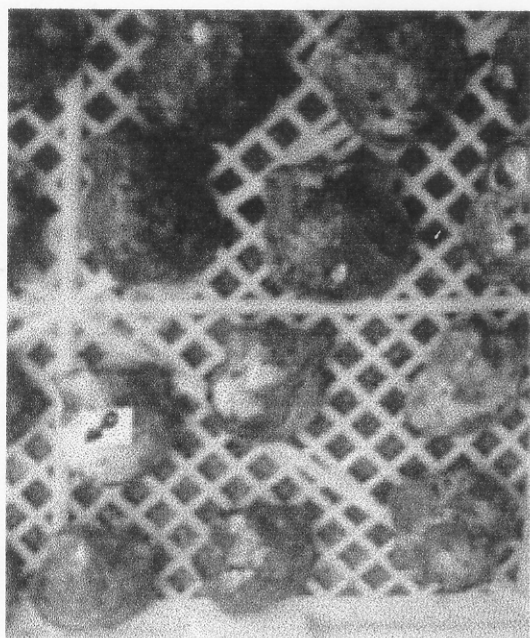
4.1.2 การเตรียมน้ำทะเล

1. เตรียมน้ำทะเลที่ความเค็ม 33-35 ส่วนในพันส่วน (ppt) ผ่านเครื่องกรองและเครื่องทำความร้อน ให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 31-32 องศาเซลเซียส สลับกับน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส (นำน้ำทะเลแช่แข็ง)
2. เตรียมน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 30 นาที ปริมาตร 10 ลิตร หรือใช้น้ำผ่านแสง UV สำหรับทำความสะอาดไข่ขณะกรอง

4.1.3 การกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์หอยด้วยอุณหภูมิ (temperature shock method)

นำพ่อแม่พันธุ์หอยที่เตรียมไว้ กระตุ้นให้ปล่อยไข่และน้ำเชื้อ ดังนี้

เวลา (น.)	ขั้นตอน
17:30	ทำสัญลักษณ์ที่พ่อแม่พันธุ์ตัวผู้และตัวเมียที่แยกเพศแล้ว (ภาพที่ 6) จากนั้นแยกตัวเมียใส่ตะกร้าแขวนในถังที่จะใช้ผสมพันธุ์ให้อากาศเบา ๆ ส่วนตัวผู้วางไว้ในถังกลมอีกถังหนึ่ง โดยจัดเรียงเป็นวงกลมรอบถัง ใส่น้ำอุณหภูมิปกติให้อากาศเบา ๆ พร้อมทั้งกวนน้ำให้เป็นวงกลมช้า ๆ เพื่อทำการกระตุ้น
18:00	เปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิปกติ การเปลี่ยนน้ำใหม่ใช้วิธีการทำให้น้ำไหลผ่าน (flow) และล้นออกมาแทนที่น้ำเดิม
18:30	เปลี่ยนน้ำใหม่โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
19:00	เปลี่ยนน้ำใหม่โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส
19:30	เปลี่ยนน้ำใหม่โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส
20:00	เปลี่ยนน้ำใหม่โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส
20:30	เปลี่ยนน้ำใหม่โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เริ่มมีตัวผู้ปล่อยน้ำเขื่อนำตัวผู้ที่เริ่มปล่อยน้ำเขื่อนำในถังเดียวกับตัวเมียที่แยกเอาไว้ เมื่อตัวผู้ปล่อยน้ำเขื่อนำจะไปกระตุ้นตัวเมียที่มีไข่พร้อมอยู่แล้ว ปล่อยไข่ออกมาผสมกัน
21:30	แยกพ่อแม่พันธุ์ออกจากถังเพาะ
22:15	เวลาที่สิ้นสุดการปล่อยเซลล์



ภาพที่ 6 สัญลักษณ์ พ่อแม่พันธุ์ที่ทำสัญลักษณ์แยกเพศไว้

4.2 การอนุบาลลูกหอยในโรงเพาะฟักด้วยอาหารต่างชนิดกัน

4.2.1. แยกพ่อแม่พันธุ์ออกหลังจากปล่อยไข่และน้ำเชื้อแล้ว คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน ปล่อยให้ทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้มีการไหลเวียนของน้ำในถังตลอดเวลาเพื่อป้องกันการเกิด polyspermy เพราะสเปิร์มมีจำนวนเซลล์มากกว่าจำนวนเซลล์ของไข่ หรือโดยการกรองไข่ที่ได้รับการผสมแล้วด้วยผ้ากรองแพลงก์ตอนขนาด 20 ไมโครเมตร ทั้งนี้เนื่องจากสเปิร์มมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ไมโครเมตรจึงลอดผ่านผ้ากรองได้ ส่วนไข่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 ไมโครเมตร (Southgate and Beer, 1997) จึงติดบนผ้ากรอง จากนั้นสุ่มไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10×40 เท่า ทุก 15 นาที เพื่อศึกษาการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของลูกหอยในระยะต่าง ๆ

4.2.2. หลังจากเพาะได้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มทำการกรองอีกครั้งเพื่อกำจัดตะกอนและสิ่งสกปรกออก โดยวิธีใช้ผ้ากรองแพลงก์ตอน (plankton net) 3 ขนาดคือ กรองจากผ้ากรองขนาด 104 ไมโครเมตรลงสู่ผ้ากรองขนาด 48, 32 และ 20 ไมโครเมตรตามลำดับ แล้วล้างไข่ที่ติดกับผ้ากรองด้วยน้ำทะเลมาเชื้อที่เตรียมไว้ ไข่ที่มีขนาดเล็กก็จะลอดผ่านผ้ากรองขนาด 104, 48 และ 32 ไมโครเมตรได้ แต่เศษขยะหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีขนาดใหญ่กว่าก็จะติดอยู่กับผ้ากรอง นำไข่ที่กรอง

ได้บนผ้ากรองขนาด 20 ไมโครเมตรไปใส่ในถังสำหรับอนุบาล ซึ่งจะแบ่งลูกหอยออกเป็น 3 ถัง เพื่อทดลองการอนุบาลลูกหอยด้วยอาหารต่างชนิดกัน

4.2.3. เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน ระหว่างการเปลี่ยนถ่ายน้ำต้องกรองตัวอ่อนที่ได้ เพื่อเป็นการคัดขนาดของตัวอ่อนแต่ละระยะ โดยใช้ผ้ากรองพลาสติกต่อนครั้งละ 3-5 ขนาด เช่น ครั้งที่ 1 ใช้ขนาด 20, 32, 48 และ 69 ไมโครเมตร ครั้งที่ 2 ใช้ 48, 69, 95 และ 104 ไมโครเมตร เป็นต้น

4.2.4. ให้อาหารธรรมชาติวันละ 2 มื้อเช้า-เย็น พวกแพลงก์ตอนพืช 2 ชนิดคือ *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* และอาหารผสม (*Isochrysis galbana* : *Chaetoceros calcitrans* อัตราส่วน 1 : 1) เริ่มให้อาหารเมื่อลูกหอยเข้าสู่ระยะ D-shape หลังจากไข่ได้รับการผสมแล้ว 24 ชั่วโมง ลูกหอยจะเข้าสู่ช่วงระยะ D-shape ซึ่งต้องกรองเพื่อคัดขนาดโดยใช้ขนาดของผ้ากรอง 20, 32, 48, 69, 95, 104, 155, 180 และ 197 ไมโครเมตรดังนี้

อายุ (วัน)	ขนาดผ้ากรอง (ไมโครเมตร)	ปริมาณอาหาร/มล. (เฉลี่ย)
1	20, 32, 48, 104	5,000
3-15	32, 48, 69, 95, 104	10,300
16-17	48, 69, 95, 104	14,000
18-27	48, 69, 95, 104, 155	15,300
28-29	69, 95, 104, 155	19,000
30-33	95, 104, 155, 180	20,500
34-37	104, 155, 180, 197	22,000
38-40	155, 180, 197	23,600
41-44	180, 197	28,750

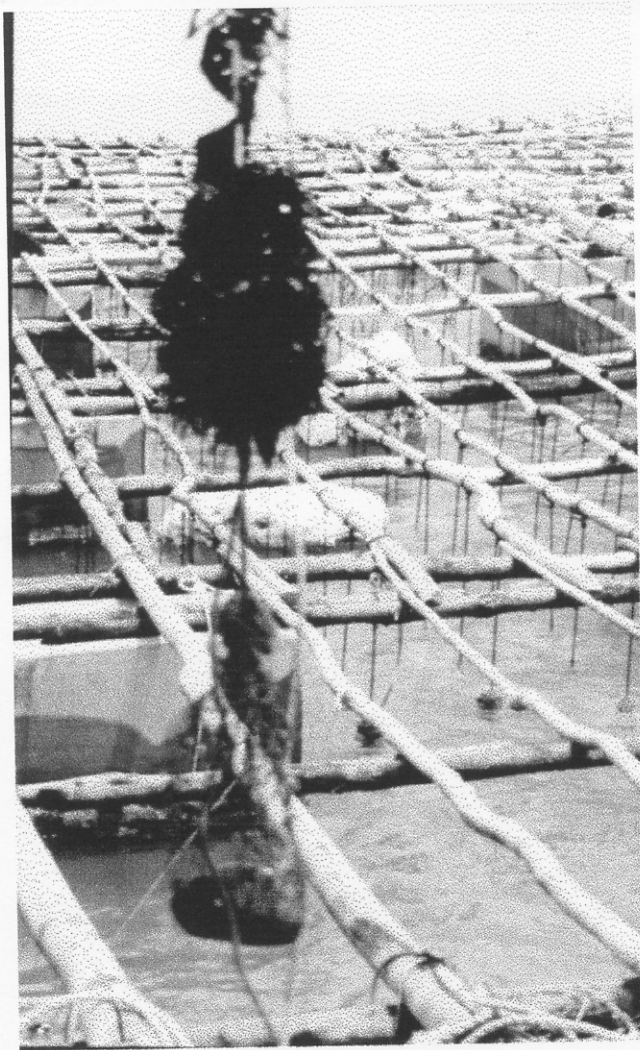
4.2.5. ตรวจสอบระยะต่าง ๆ ของลูกหอย ถ้าเริ่มเข้าระยะที่เรียกว่า eyed spot หรือ spat อายุประมาณ 17-29 วันหอยจะเริ่มยึดเกาะสิ่งต่าง ๆ จึงต้องจัดหาวัสดุใส่ลงในถัง เพื่อให้หอยยึดเกาะ แต่จากการทดลองเลี้ยงหอยให้เกาะที่ก้นถังก่อน หลังจากลงเกาะได้ประมาณ 1 สัปดาห์จึงขูดออกมาอย่างเบา ๆ แล้วนำมาโรยลงในวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

4.2.6. เลี้ยงในถังต่ออีกประมาณ 45 วันจึงย้ายไปอนุบาลต่อในทะเล ในระยะแรกต้องมีถุงหรือตะแกรงตาถี่หุ้มอีกชั้นหนึ่งเพื่อป้องกันอันตรายจากสัตว์น้ำชนิดอื่น

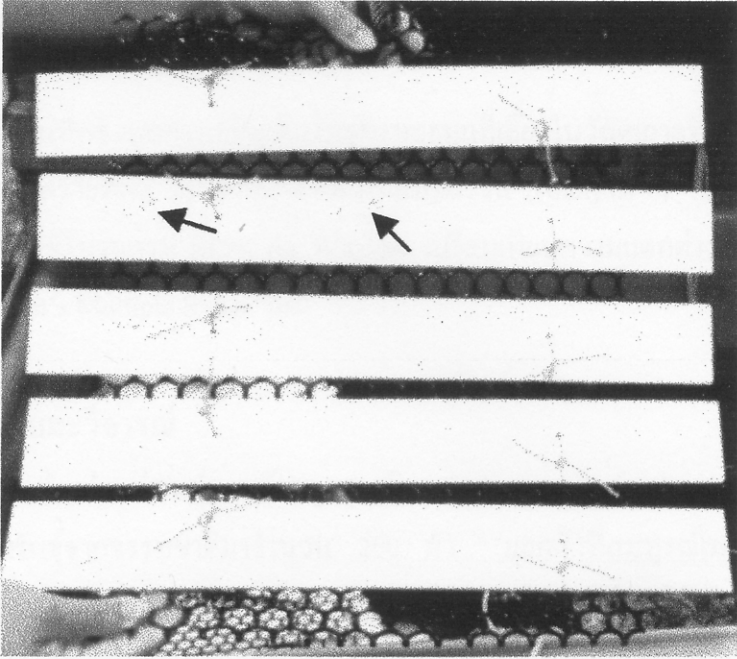
4.3 วัสดุลงเกาะของลูกหอย (spat collector)

4.3.1 ตาข่ายพลาสติกสีดำ (saran) : ใช้ตาข่ายสีดำกว้าง 10-12 เซนติเมตร ยาว 1 เมตร โดยใช้เข็มขนาดใหญ่ร้อยด้วยเอ็น เย็บขึ้นลงเพื่อให้ตาข่ายซ้อนทับกัน (Haws and Ellis, 2000) ตามภาพที่ 7

4.3.2 พลาสติกแผ่นเรียบ : ใช้พลาสติกแผ่นเรียบสีขาวกว้าง 5 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตรจำนวน 5 แผ่น ร้อยต่อกัน (ภาพที่ 8) เมื่อลูกหอยลงเกาะแล้วใช้ตาข่ายผ้าห่มอีกหนึ่งชั้นเพื่อป้องกันลูกหอยจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น



ภาพที่ 7 การใช้ตาข่ายซาแรนสีดำเป็น collector



ภาพที่ 8 ลูกหอยที่เกาะบนแผ่นพลาสติกที่ใช้เป็น collector

4.3.3 กระเบื้องลอนใหญ่ : ใช้กระเบื้องลอนใหญ่กว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 75 เซนติเมตรหุ้มด้วยตาข่ายสีฟ้าอีกชั้นหนึ่ง (ลักษณะคล้ายกับ box net) (Ellis and Haws, 2000) เพื่อป้องกันลูกหอยจากผู้ล่า (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงลูกหอยที่เกาะบนกระเบื้องลอนใหญ่ที่ใช้เป็น collector

4.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.4.1 บันทึกข้อมูลอัตราการตาย อัตรารอดและการเจริญเติบโตของหอยมุกที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน

4.4.2 บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของหอยมุกที่เลี้ยงในวัสดุเกาะที่แตกต่างกัน

4.4.3 วิเคราะห์ผล ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แบบ two-way ANOVA และใช้โปรแกรม SPSS for Window เปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลองทางสถิติด้วย Duncan's Multiple Range Test