

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

แผนการวิจัย

กำหนดแผนการดำเนินงานต่อขั้นตอนการวิจัยทดลองอนุบาลลูกปูออกเป็น 3 ช่วงดังนี้

1. การอนุบาลลูกปูระยะซูเอีย 1 ถึง ซูเอีย 4
2. การอนุบาลลูกปูระยะเมกาโลปา 1 ถึงเมกาโลปา 3
3. การอนุบาลลูกปูระยะเป็นตัวปูวันแรก ถึง ลูกปูอายุ 5 วัน

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้แม่พันธุ์ปูม้า (*Portunus pelagicus*) ที่มีไข่นอกกระดองสีดำ ขนาดความกว้างของกระดอง (External Carapace Width) 10 – 12 เซนติเมตร (ภาพที่ 5) จำนวน 27 ตัว ที่จับด้วยเครื่องมือลอบพับ จากบริเวณตำบลเทพ อำเภอมือง จังหวัดระยอง ภายหลังลำเลียงมาถึงฟาร์ม อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการคัดแยกแม่ปูพักในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 60 ลิตร ปริมาตรน้ำ 30 ลิตร ถึงละ 9 ตัว ที่บรรจุด้วย ความเค็ม 24, 27 และ 30 ppt ให้อากาศผ่านหัวทรายถึงละ 1 หัว ใช้เวลาพักเพื่อให้แม่ปูปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม นาน 3 ชั่วโมงก่อนสุมแม่พันธุ์ปูไปทำการเพาะฟักในบ่ออนุบาลต่อไป



ภาพที่ 5 แม่พันธุ์ปูม้าที่มีไข่นอกกระดองสีดำ

การเตรียมบ่อทดลอง

ตลอดการทดลองใช้บ่อซีเมนต์รูปสี่เหลี่ยมขนาด 1.30 เมตร x 3.35 เมตร x 0.70 เมตร (ภาพที่ 6) ที่เคยได้ออกแบบไว้สำหรับการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ ก่อนทำการทดลองผ่านการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคด้วยฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 100 ppm ทำการสูบล้างเพื่อเลือกบ่อเพื่อกำหนดใช้ในแต่ละการทดลอง ตลอดการอนุบาลทั้ง 3 ช่วงจะคลุมหลังคาด้วยกระเบื้อง ในช่วง 7 วันแรกหลังจากไข่ฟักเป็นตัวจะใช้ผ้าใบสีดำคลุมทับแผ่นกระเบื้องอีกชั้นหนึ่ง เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ หลังจากนั้นเปิดผ้าใบสีดำออก และเปิดกระเบื้องออกบ่อละ 1 แผ่น สำหรับเป็นช่องสำหรับให้อาหาร ให้อากาศผ่านหัวทรายโดยวางไว้บนพื้นบ่อ 18 จุดต่อบ่อ



ภาพที่ 6 บ่ออนุบาลใช้อุณหภูมิ

การเตรียมน้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลอง เป็นน้ำผสมระหว่างน้ำนาเกลือความเค็ม 90 ppt กับน้ำจืดกรองทราย ทำการเตรียมน้ำในบ่อคอนกรีตขนาด 4.0 เมตร x 4.0 เมตร x 1.5 เมตร จำนวน 3 บ่อ ปรับความเค็มน้ำให้ได้ระดับที่ต้องการใช้ทดลอง ได้แก่ 24, 27 และ 30 ppt จากนั้นเติมคลอรีนผง ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) 20 กรัมต่อน้ำ 1 ลูกบาศก์เมตรเพื่อฆ่าเชื้อโรค พร้อมทั้งให้อากาศอย่างแรงเป็นเวลา 2 - 3 วัน เพื่อให้คลอรีนสลายตัวไป แล้วจึงนำไปใส่บ่ออนุบาลที่เตรียมน้ำ 3.3 บ่อละ 1,300 ลิตร ในการเตรียมน้ำสำหรับทดลองทุกครั้งจะทำการตรวจสอบความเค็มด้วยเครื่องวัดความเค็มแบบหักเหแสง (Refractometer)

การเตรียมการฟักไข่

นำแม่พันธุ์ปูม้าใส่ในตะกร้าชนิดมีฝาปิด ลงสู่บ่อเพาะฟัก ในอัตรา 1 ตัวต่อบ่อตามที่เตรียมดังข้อ 3.3 และ 3.4 แล้วปล่อยให้ไข่ฟักเป็นตัว (ภาพที่ 7) (ใส่สีน้ำเทียมน้ำที่มีจำหน่ายในรูปแบบการค้าตราซูเปอร์ – แบลค (Super black) ในอัตรา 2.5 กรัมต่อบ่อ โดยใส่ครั้งแรกในวันที่ปล่อยแม่พันธุ์ปูม้าที่มีไข่นอกกระดองลงเพาะฟัก และใส่ทุกครั้งหลังการถ่ายน้ำ)



ภาพที่ 7 การเตรียมการฟักไข่แม่พันธุ์ปูม้าที่มีไข่นอกกระดองสีดำ

การอนุบาลลูกปูระยะชูกุเียว

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Design) แบ่งออกเป็น 9 การทดลอง (Treatment) ตามปัจจัยจำกัด 2 ประการ ได้แก่ ความเข้มข้น 3 ระดับ และ ชนิดของอาหาร 3 สูตร ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 วิธีการอนุบาลลูกปูมีระยะชุกเีย 1 ถึงชุกเีย 4 ภายใต้ความเค็มน้ำ 3 ระดับและอาหาร 3
สูตร

การทดลอง	ความเค็มน้ำ(ppt)	ชนิดอาหาร
1	24	โรติเฟอร์+อาร์ทีเมียเฟลก
2	27	โรติเฟอร์+อาร์ทีเมียเฟลก
3	30	โรติเฟอร์+อาร์ทีเมียเฟลก
4	24	โรติเฟอร์+ไรแดง
5	27	โรติเฟอร์+ไรแดง
6	30	โรติเฟอร์+ไรแดง
7	24	โรติเฟอร์+อาร์ทีเมียวัยอ่อน
8	27	โรติเฟอร์+อาร์ทีเมียวัยอ่อน
9	30	โรติเฟอร์+อาร์ทีเมียวัยอ่อน

การดำเนินการทดลอง

ภายหลังจากไข่ฟักเป็นตัว ทำการสุ่มนับจำนวนลูกปูในแต่ละบ่อทดลอง แล้วปรับความหนาแน่นของลูกปูในแต่ละบ่อเฉลี่ย 225 ตัวต่อลิตร

ในช่วง 4 วันแรกหลังจากลูกปูฟักเป็นตัว ทุกการทดลองให้สไปรูลินา (*Spirulina*) ผง ปริมาณ 2.5 กรัมต่อบ่อ วันละ 4 ครั้ง ร่วมกับโรติเฟอร์(*B. plicatilis*)มีชีวิต ในปริมาณที่มากเกินไปพอ โดยให้ 40 กรัมต่อบ่อ วันละ 4 ครั้ง (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของโรติเฟอร์ 10 – 15 ตัวต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร) สไปรูลินาผงที่ใช้ในการทดลองมีโปรตีน 41 %, ไขมันอย่างน้อย 6.5 %, และความชื้นอย่างมาก 10 % วิธีการเตรียมโดยการนำสไปรูลินาผงละลายน้ำ 500 มิลลิลิตรผ่านสวิงกรอง แพลงก์ตอนขนาดตา 125 ไมครอน แล้วนำไปสาดให้ทั่วบ่อทดลอง

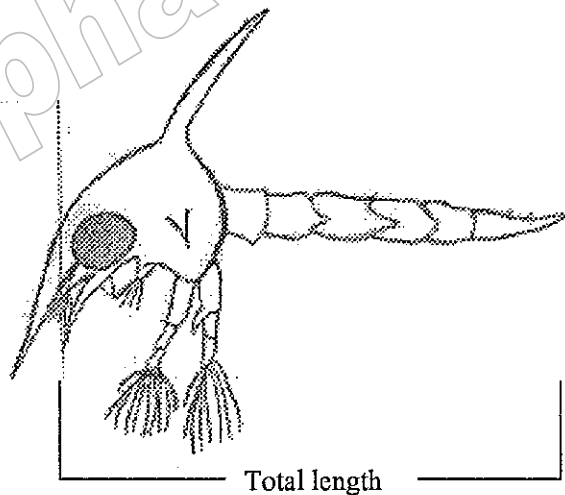
ช่วงหลังจาก 4 วันแรก ทุกการทดลองงดการให้สไปรูลินาผง ค่อย ๆ ลดการให้โรติเฟอร์ลง (ใช้เวลาการปรับลด 2 วัน) โดย 3 ชุดการทดลองแรกของการอนุบาลที่ความเค็มน้ำทั้ง 3 ระดับปรับเปลี่ยนอาหารเป็นให้อาร์ทีเมียเฟลกปริมาณ 35 กรัมต่อบ่อ วันละ 4 ครั้ง อาร์ทีเมียเฟลกที่ใช้ในการทดลองมีคุณค่าทางอาหารดังนี้ โปรตีน 53.0 %, ไขมัน 8.2 %, เกลือ 9.4 % ลักษณะของอาร์ทีเมียเฟลกเป็นแผ่นบางกรอบ ก่อนให้ลูกปูกินเป็นอาหารนำมาบดให้มีขนาดประมาณ 250 ไมครอน (ด้วยเครื่องปั่นบดไฟฟ้า) อีก 3 ชุดการทดลองถัดมาปรับเปลี่ยนอาหารเป็นให้ไรแดง (*M. macrocopa*) แช่เย็นปริมาณ 60 กรัมต่อบ่อ วันละ 4 ครั้ง (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของไรแดง 1-2 ตัวต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร) และ 3 ชุดการทดลองที่เหลือ ปรับเปลี่ยนอาหารเป็นให้อาร์ทีเมียวัยอ่อน

(*Artemia* sp.) ปริมาณ 40 กรัมต่อบ่อ วันละ 4 ครั้ง (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของอาร์ทีเมีย 3-5 ตัวต่อกุ้ง 1 มิลลิเมตร)

อาหารทุกสูตรทำการแบ่งให้วันละ 4 ครั้ง ในเวลา 08.00, 14.00, 20.00 และ 02.00 น. ตามลำดับ หลังจากถูกปลูกเป็นด้ว จึงทำการเพิ่มน้ำที่เตรียมไว้ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ ลงในแต่ละบ่อ ทดลองปริมาตรวันละ 200 ลิตร จนกระทั่งได้ปริมาตรน้ำในบ่อ 2,600 ลิตร จึงทำการถ่ายเปลี่ยนน้ำวันละ 400 ลิตร (15 % ของปริมาตรน้ำทั้งบ่อ) ทุกวัน

การบันทึกผลการทดลอง

- การรอดตาย ทำการสุ่มนับลูกปูในแต่ละบ่อทุกวัน โดยการสุ่มตัวอย่างด้วยปิเกตเตอร์ ขนาด 100 มิลลิเมตร 3 จุดตามแนวยาวของบ่อ เพื่อคำนวณปริมาณลูกปูทั้งหมดในบ่อ และสุ่มนับด้วยวิธีนี้จนกว่าลูกปูจะเปลี่ยนระยะเป็นเมกาโลปา
- ระยะเวลาของการพัฒนาการ ทำการตรวจสอบระยะการพัฒนาการของลูกปูทุกบ่อ โดยการบันทึกวันที่พบว่าลูกปูในบ่อทดลองใดเริ่มมีการเปลี่ยนระยะเป็นเมกาโลปา และวันที่พบว่า เป็นเมกาโลปาหมดทั้งบ่อ
- การเจริญเติบโต เมื่อพบว่าบ่อทดลองใดมีการพัฒนาเปลี่ยนระยะเป็นซูเอีย 4 ทั้งหมด จึงทำการสุ่มตัวอย่างลูกปูการทดลองละ 30 ตัวต่อซ้ำ เพื่อมาตรวจสอบการเจริญเติบโตโดยการวัดความยาวทั้งหมดของลำตัว (Body length) ตั้งแต่ปลายสุดของหัวถึงปลายสุดของหาง (Telson) ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์โดยใช้ไมโครมิเตอร์ (Micrometer) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ความยาวลำตัว (Body length) ของลูกปูมีระยะซูเอีย

การอนุบาลลูกปูระยะเมกาโลปา

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Design) แบ่งออกเป็น 6 การทดลอง (Treatment) ตามปัจจัยจำกัด 2 ประการ ได้แก่ความเค็มน้ำ 3 ระดับ และการใส่วัสดุหลบซ่อน 2 รูปแบบ ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 วิธีการอนุบาลลูกปูมีระยะเมกาโลปา 1 ถึงเมกาโลปา 3 ภายใต้ความเค็มน้ำ 3 ระดับ และการใส่วัสดุหลบซ่อน 2 รูปแบบ

การทดลอง	ความเค็มน้ำ(ppt)	วิธีการใส่วัสดุหลบซ่อน
1	24	แขวนแนวตั้ง
2	24	วางที่พื้นบ่อ
3	27	แขวนแนวตั้ง
4	27	วางที่พื้นบ่อ
5	30	แขวนแนวตั้ง
6	30	วางที่พื้นบ่อ

การดำเนินการทดลอง

ใช้ลูกปูม้าที่พัฒนาเข้าสู่ระยะเมกาโลปาระยะที่ 1 วันแรก จากการอนุบาลลูกปูในระยะซู่เอีย โดยการสุ่มเลือกจากความเค็มน้ำ 3 ระดับ โดยมีความหนาแน่นของลูกปูระยะเมกาโลปาเฉลี่ย 20 ตัวต่อลิตร และในแต่ละความเค็มน้ำจะทำการใส่วัสดุหลบซ่อน 2 รูปแบบ รูปแบบการใส่วัสดุหลบซ่อนโดยวิธีแขวนแนวตั้ง โดยการนำเปลือกหอยนางรมที่ผ่านการรื้อยเชือกในตอนความยาว 50 เซนติเมตร ผูกกับไม้ไผ่ซึ่งพาดอยู่บนขอบบ่อ บ่อละ 3 ลำ ไม้ไผ่ 1 ลำผูกเชือกร้อยหอยนางรมจำนวน 13 เส้น (เชือก 1 เส้นมีเปลือกหอยประมาณ 13 -15 ชิ้น) แต่ละเส้นผูกห่างกัน 25 เซนติเมตร คิดเป็น 20 % ของพื้นที่บ่อ (ภาพที่ 9)

รูปแบบการใส่วัสดุหลบซ่อนโดยวิธีวางที่พื้น โดยการนำเปลือกหอยนางรมที่รื้อยเชือกในตอนเช่นเดียวกับวิธีแรก ผูกกันเป็นกลุ่ม ๆ ละ 3 เส้น วางเป็นจุดที่พื้นบ่อ ๆ ละ 13 กลุ่ม โดยจัดวางกระจายเต็มพื้นที่บ่อคิดเป็น 20 % ของปริมาตรน้ำทั้งบ่อ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 การใส่วัสดุหลบซ่อนโดยวิธีแขวนแนวดิ่ง



ภาพที่ 10 การใส่วัสดุหลบซ่อนโดยวิธีวางที่พื้น

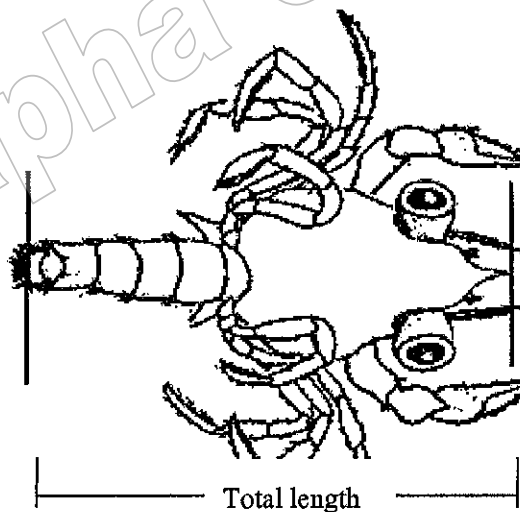
ระหว่างการทดลองของการอนุบาลลูกปูระยะเมกาโลปาทุกการทดลองให้ไรแดงแช่เย็น ปริมาณ 40 กรัมต่อบ่อ (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของไรแดง 0.5 – 1 ตัวต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร) รวม ด้วยอาร์ทีเมียตัวเต็มวัยมีชีวิตปริมาณ 25 กรัมต่อบ่อ (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของอาร์ทีเมียตัวเต็มวัย 2-3 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร) แบ่งการให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ในเวลา 08.00, 14.00, 20.00 และ 02.00 น. ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในแต่ละบ่อทุกการทดลอง 15 % ของปริมาณน้ำในแต่ละบ่อทุกวัน

การบันทึกผลการทดลอง

- การรอดตาย ทำการชั่งน้ำหนักปูในแต่ละบ่อทุกวัน โดยการชั่งตัวอย่างด้วยสวิงวงกลม พื้นที่ 64 ตารางนิ้ว 3 บริเวณ ได้แก่ ที่พื้น ผิวน้ำ และในพวงหอย บริเวณละ 3 ซ้ำ เพื่อคำนวณปริมาณ ลูกปูทั้งหมดในบ่อ

- ระยะเวลาของการพัฒนาการ ทำการตรวจสอบระยะการพัฒนาการของลูกปูทุกบ่อ โดยการบันทึกวันที่พบว่าลูกปูในบ่อทดลองใดเริ่มมีการเปลี่ยนระยะเป็นตัวปูวันแรก และวันที่พบว่าเป็นตัวปูหมดทั้งบ่อ

- การเจริญเติบโต เมื่อพบว่าบ่อทดลองใดมีการพัฒนาเปลี่ยนระยะเป็นเมกาโลปา 3 ทั้งหมดจึงทำการชั่งตัวอย่างลูกปูการทดลองละ 30 ตัวต่อซ้ำ เพื่อมาตรวจสอบการเจริญเติบโตโดยการวัดความยาวทั้งหมดของลำตัว (Total length) จากปลายสุดของกริ (Rostrum) ถึงปลายสุดของหางภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ไมโครมิเตอร์ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ความยาวทั้งหมด (Total length) ของลูกปูระยะเมกาโลปา

การอนุบาลลูกปูระยะเป็นตัวปูวันแรกถึงลูกปูอายุ 5 วัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Design) แบ่งออกเป็น 6 การทดลอง (Treatment) ตามปัจจัยจำกัด 2 ประการ ได้แก่ความเค็มน้ำ 3 ระดับ และ การใส่วัสดุหลบซ่อน 2 รูปแบบ ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 วิธีการอนุบาลลูกปูระยะเป็นตัวปูวันแรกถึงลูกปูอายุ 5 วัน ภายใต้ความเค็มน้ำ 3 ระดับ และการใส่วัสดุหลบซ่อน 2 รูปแบบ

การทดลอง	ความเค็มน้ำ(ppt)	วิธีการใส่วัสดุหลบซ่อน
1	24	แขวนแนวตั้ง
2	24	วางที่พื้นบ่อ
3	27	แขวนแนวตั้ง
4	27	วางที่พื้นบ่อ
5	30	แขวนแนวตั้ง
6	30	วางที่พื้นบ่อ

การดำเนินการทดลอง

ใช้ลูกปูม้าที่พัฒนาเข้าสู่ระยะตัวปูวันแรก จากข้อ 3.7 โดยอนุบาลที่ความหนาแน่นเฉลี่ย 2 ตัวต่อตารางนิ้ว ระหว่างการทดลองให้ไรแดงแช่เย็นปริมาณ 30 กรัมต่อบ่อ (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของไรแดง 0.5 ตัวต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร) ร่วมกับอาร์ทีเมียตัวเต็มวัยมีชีวิตปริมาณ 40 กรัมต่อบ่อ (ระดับความหนาแน่นเฉลี่ยของอาร์ทีเมียตัวเต็มวัย 3 – 4 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร) แบ่งการให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ในเวลา 08.00, 14.00, 20.00 และ 02.00 น. ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในแต่ละบ่อทุกการทดลอง 15 %ของปริมาตรน้ำในแต่ละบ่อทุกวัน

การบันทึกผลการทดลอง

หลังจากทำการอนุบาลลูกปูเป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจสอบการรอดตายโดยการนับลูกปูที่เหลือในแต่ละซ้ำของการทดลอง และตรวจสอบการเจริญเติบโต โดยการสุ่มตัวอย่างลูกปูการทดลองละ 30 ตัว / ซ้ำ มาวัดความกว้างของกระดอง (External Carapace Width) ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การวัดความกว้างของกระดองลูกปู

การตรวจสอบคุณภาพน้ำ

ก่อนการเปลี่ยนน้ำทุก ๆ วัน จะทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำในบ่ออนุบาลลูกปู ได้แก่ พีเอช (pH) ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) อุณหภูมิ, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ด้วยเครื่อง YSI model 85 และเก็บตัวอย่างน้ำลูกปูไปตรวจสอบคุณสมบัติในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้แก่ ค่าความเป็นด่างของน้ำตามวิธีการของ APHA (1980) ปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจน (NO_3) และ แอมโมเนีย (NH_3) ตามวิธีการของ Stickland & Parson (1972)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ ความยาวตัวที่เพิ่มขึ้น การรอดตาย และระยะเวลาที่ใช้พัฒนาการเปลี่ยนระยะของลูกปูมาในแต่ละระยะของการพัฒนาการไปทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างของข้อมูลระหว่างชุดการทดลองด้วย Analysis of Variance แล้วจึงทดสอบความแตกต่างระหว่างการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม SPSS 11.0 for Window