บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ดำเนินการวิจัย

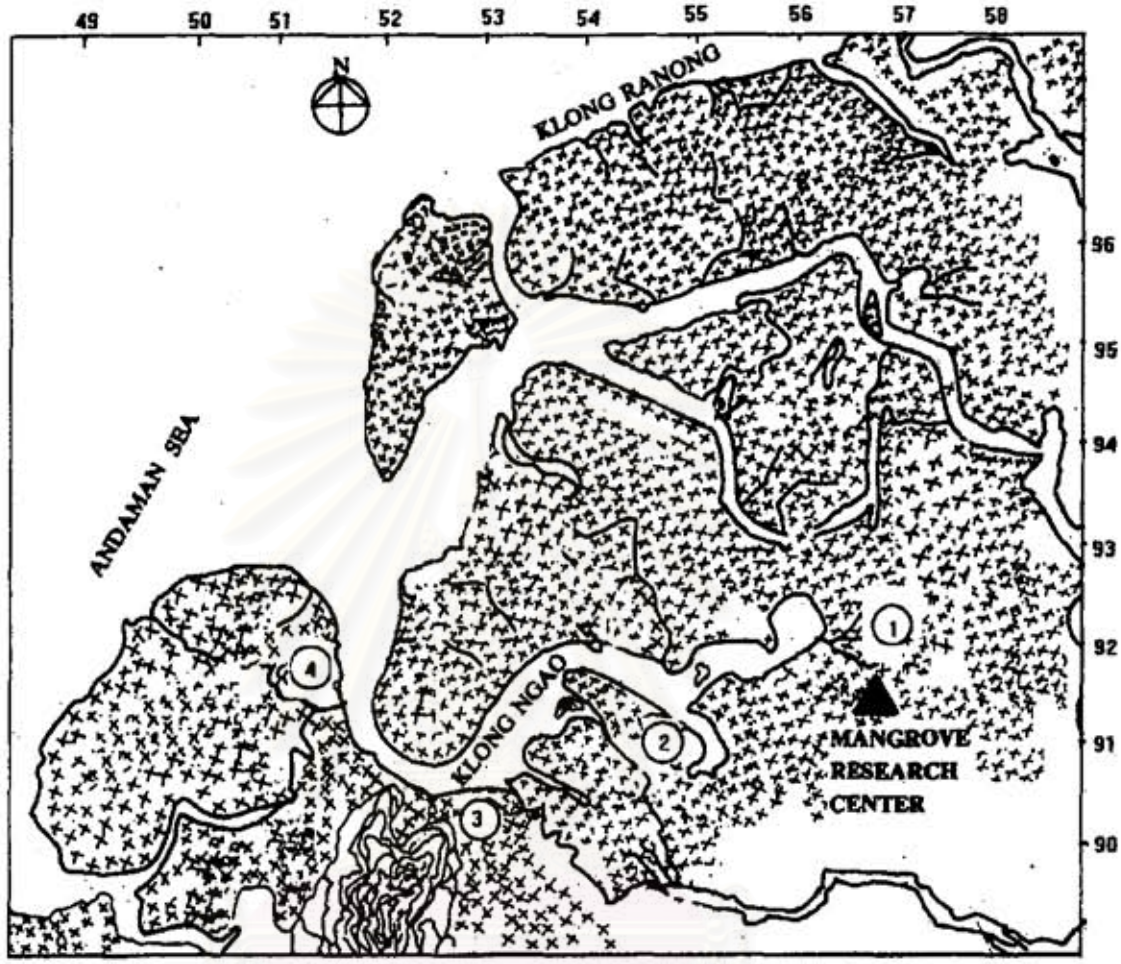
ป่าชายเลนบริเวณคลองหงาวเป็นส่วนหนึ่งของป่าชายเลนในจังหวัดระนอง มีอาณาบริเวณตั้งแต่เส้นละติจูด 9°50′ ถึง 9°58′ เหนือและเส้นลองจิจูด 98°31′ ถึง 98°37′ ตะวันออก มีพื้นที่ป่าทั้งหมดประมาณ 38,000 ไร่ พรรณไม้ชนิดเด่นที่พบในบริเวณนี้ได้แก่ โกงกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* โกงกางใบใหญ่ *R. mucronata* ถั่วขาว *Bruguiera cylindrica* ถั่วดำ *B. parviflora* โปรงแดง *Ceriops tagal* ลำพู *Sonneratia alba* แสมขาว *Avicennia alba* และตะบูนขาว *Xylocarpus granatum* ป่าชายเลนในบริเวณนี้ส่วนหนึ่งเป็นป่าที่ปลูกขึ้นทดแทนได้แก่ โกงกางใบเล็ก ถั่วขาว ถั่วดำ โปรงแดง เป็นต้น รายละเอียดของบริเวณที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 6.

บริเวณ 1. ป่าชายเลนธรรมชาติ แปลงที่ทำการศึกษาอยู่บริเณคลองเล็กๆ ที่เชื่อมระหว่างคลองโสภณกับคลองสนใจ พรรณไม้ในบริเวณนี้ประกอบด้วยโกงกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* โกงกางใบใหญ่ *R. mucronata* แสมขาว *Avicennia alba* ถั่วขาว *Bruguiera cylindrica* โปรงขาว *Ceriops decandra* ลำแพน *Sonneratia ovata* ตะบูนขาว *Xylocarpus granatum* และตาตุ่ม *Excoecaria agallocha* รายละเอียดของบริเวณที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 7.

บริเวณ 2. ป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุ 8 ปี แปลงที่ศึกษาเป็นป่าโกงกางใบใหญ่ *Rhizophora mucronata* ซึ่งปลูกในบริเวณที่ผ่านการทำเหมืองแร่ดีบุกมาก่อน ป่ามีลักษณะทึบมีต้นโกงกางสูงประมาณ 8-10 เมตรขึ้นเบียดกันแน่น และมีแสมขาว *Avicennia alba* ลำแพน *Sonneratia ovata* ขึ้นประปราย รายละเอียดของบริเวณที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 8.

บริเวณ 3. ป่าชายเลนที่เพิ่งปลูกทดแทน แปลงที่ศึกษาอยู่บริเวณด้านซ้ายของคลองหงาว สภาพพื้นที่เดิมเป็นป่าเสื่อมโทรม โดยได้ทำการปลูกกล้าไม้โกงกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* โกงกางใบใหญ่ *R. mucronata* โปรงแดง *Ceriops tagal* และถั่วขาว *Bruguiera cylindrica* เป็นเนื้อที่ประมาณ 10 ไร่ พรรณไม้ที่ขึ้นอยู่เดิมได้แก่ ถั่วขาว *Bruguiera cylindrica* ถั่วดำ *B. parviflora* รายละเอียดของบริเวณที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 9.

บริเวณ 4. ป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุ 1 ปี ซึ่งเดิมเคยเป็นบริเวณที่มีการทำนากุ้งมาก่อน และได้เลิกประกอบกิจการได้ 3 ปี พรรณไม้ที่ปลูกคือ โกงกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* โกงกางใบใหญ่ *R. mucronata* ถั่วขาว *Bruguiera cylindrica* และโปรงแดง *Ceriops tagal* ป่ามีลักษณะโปร่ง พื้นที่ป่ามีประมาณ 10 ไร่ รายละเอียดของบริเวณที่ศึกษาดังแสดงในรูปที่ 10.



รูปที่ 6. บริเวณป่าชายเลนคลองหงาว จังหวัดระนอง

1.) ป่าชายเลนธรรมชาติ

2.) ป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุ 8 ปี บนพื้นที่ที่ผ่านการทำเหมืองแร่

3.) ป่าชายเลนที่เพิ่งปลูกทดแทน บนพื้นที่ป่าเสื่อมโทรม

4.) ป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุ 1 ปี บนพื้นที่นากุ้งร้าง

รูปที่ 7. ป่าชายเลนธรรมชาติ

รูปที่ 8. ป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุ 8 ปี บนพื้นที่ที่ผ่านการทำเหมืองแร่

รูปที่ 9. ป่าชายเลนที่เพิ่งปลูกทดแทน บนพื้นที่ป่าเสื่อมโทรม

รูปที่ 10. ป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุ 1 ปี บนพื้นที่นากุ้งร้าง

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การเลือกแหล่งอาศัยของปูทะเลระหว่างป่าชายเลนธรรมชาติกับป่าชายเลนที่ปลูกทดแทนอายุต่าง ๆ

เก็บข้อมูลขนาดและจำนวนปูทะเลที่อาศัยในป่าชายเลนธรรมชาติและป่าชายเลนที่ปลูกทดแทนอายุต่างๆ ทุกเดือนตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2537 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2538 เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยจ้างชาวประมงพื้นบ้านที่ทำประมงปูทะเลในบริเวณคลองหงาวสุ่มจับปูทะเลที่อาศัยในป่าชายเลนในแต่ละแปลงด้วยลอบปูแบบพับได้ขนาด 40x55x25 เซนติเมตร ขนาดตาอวนของลอบ 3.5 เซนติเมตร แปลงละ 50 ลอบ ภายในลอบบรรจุเหยื่อจำพวกปลาหมักเพื่อล่อให้ปูทะเลเข้ามากินอาหารในลอบ นำลอบไปวางตอนกลางวันก่อนน้ำขึ้นสูงสุดของวันขึ้น 15 ค่ำของทุกเดือนในบริเวณป่าชายเลนที่น้ำท่วมถึงและทำการกู้ลอบหลังจากน้ำลงเพื่อรวบรวมปูทะเล นำปูทะเลที่จับได้ในแต่ละแปลงมานับจำนวน วัดขนาดความกว้างของกระดอง (carapace width) ของปูทะเลโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์แบบดิจิตัล (digital vernier caliper) ความกว้างของกระดองคือ ความกว้างระหว่างปลายหนามที่ขอบข้างของกระดอง (antero-lateral teeth) คู่สุดท้าย (คู่ที่ 9) หน่วยที่วัดเป็นมิลลิเมตรและชั่งน้ำหนักปูทะเลโดยใช้เครื่องชั่งสปริงพลาสติก หน่วยน้ำหนักเป็นกรัม รวมทั้งจำแนกเพศ โดยพิจารณารูปทรงของจับปิ้ง (abdomen) ที่แตกต่างกันระหว่างปูเพศผู้และปูเพศเมีย จับปิ้งของปูเพศผู้ มีลักษณะเรียวแหลม ขอบด้านนอกของจับปิ้งเว้าเข้าหากัน ส่วนจับปิ้งของปูเพศเมียมีลักษณะกลมป้าน ขอบด้านข้างของจับปิ้งนูนออกภายนอกทั้งสองด้าน (ชูชาติ ชัยรัตน์, 2531) ในกรณีที่เห็นความแตกต่างของจับปิ้งไม่ชัด ต้องอาศัยความแตกต่างของรยางค์เพศที่อยู่ใต้จับปิ้งในการจำแนกเพศ รยางค์เพศเป็นรยางค์ว่ายน้ำ (pleopod) ที่เปลี่ยนมาทำหน้าที่ด้านการสืบพันธุ์ โดยเพศผู้จะมีรยางค์เพศ 2 คู่ ไม่มีแขนงใช้สำหรับสอดใส่และถ่ายเทน้ำเชื้อแก่ปูเพศเมียระหว่างการผสมพันธุ์ ส่วนเพศเมียจะมีรยางค์เพศ 4 คู่ทุกอันมีแขนงด้านนอกและด้านในสมบูรณ์ดี เมื่อถึงระยะสมบูรณ์เพศ รยางค์เหล่านี้จะมีขนที่ยาว เพื่อรอรับไข่ที่ปูเพศเมียจะปล่อยออกมาและเป็นที่ยึดเกาะของไข่ก่อนที่จะฟักเป็นตัว บันทึกข้อมูลปูทะเลที่จับได้ของแต่ละแปลงแยกออกจากกัน

นำข้อมูลปริมาณของปูทะเลที่จับได้จากป่าชายเลนธรรมชาติและป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุต่างๆ มาวิเคราะห์หาความแตกต่างและนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้สูตรการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance : ANOVA) และวิเคราะห์หาความแตกต่างและนัยสำคัญทางสถิติในการเลือกแหล่งอาศัยของปูทะเลระหว่างป่าชายเลนธรรมชาติและป่าชายเลนปลูกทดแทนอายุต่างๆ โดยใช้สูตรการวิเคราะห์ chi-square

2. การศึกษาองค์ประกอบอาหารของปูทะเล

การศึกษาองค์ประกอบอาหารของปูทะเลในแหล่งอาศัยบริเวณป่าชายเลนคลองหงาว จังหวัดระนอง แบ่งเป็น 3 ส่วนย่อยได้ดังนี้

2.1. ศึกษาจากข้อมูลองค์ประกอบสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่ (macrofauna) ที่พบในป่าชายเลนธรรมชาติและป่าชายเลนที่ปลูกทดแทนอายุต่างๆ

โดยแบ่งระยะการเก็บตัวอย่างเป็น 4 ครั้ง ตามฤดูกาล คือ

-ช่วงฤดูฝน เก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม พ.ศ.2537

-ช่วงเปลี่ยนฤดูฝน เก็บตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2537

-ช่วงฤดูร้อน เก็บตัวอย่างในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2538

-ช่วงเปลี่ยนฤดูร้อน เก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2538

ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่ที่พบในสถานีเก็บตัวอย่างในป่าชายเลนแต่ละแปลงตามแนว line transect ที่กำหนดไว้ซึ่งยาวแนวละ 50 เมตร สถานีเก็บตัวอย่างแต่ละสถานีห่างกันสถานีละ 10 เมตร โดยใช้ตารางสี่เหลี่ยมนับสัตว์ (quadrat) ขนาด 0.25 ตารางเมตร วางสุ่มลงบนพื้นดินตามสถานีที่กำหนดไว้สถานีละ 3 อัน ทำจนครบทุกสถานี เก็บสัตว์ทะเลหน้าดินที่มองเห็นใน quadrat ใส่ในถุงพลาสติก แล้วจึงขุดดินในแต่ละ quadrat ลึกประมาณ 25 เซนติเมตรนำดินทั้งหมดใส่ในถุงพลาสติกนำมาร่อนผ่านตะแกรงที่ขนาดตาของตะแกรงเท่ากับ 1.0 มิลลิเมตรเพื่อเก็บตัวอย่างสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่ที่อาศัยอยู่ในดินแล้วจึงนำตัวอย่างมาเก็บรักษาไว้ในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปจำแนกชนิดอย่างละเอียดโดยอาศัยเอกสารและเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล หลังจากทำการจำแนกชนิดสัตว์ทะเลหน้าดินแต่ละตัวอย่างแล้วจึงนำมานับจำนวนและชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบความหนาแน่น (density) และมวลชีวภาพ (biomass) ของสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบในป่าชายเลนแต่ละแปลง การศึกษามวลชีวภาพต้องใช้กระดาษซับตัวอย่างสัตว์ทะเลหน้าดินที่เปียกน้ำให้แห้งก่อนที่จะนำไปชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้จะเป็นน้ำหนักเปียก (wet weight) เมื่อคูณค่าน้ำหนักเปียกที่ได้ด้วยค่า dry weight conversion factor ของสัตว์ทะเลหน้าดินกลุ่มต่างๆ (ตารางที่ 6) และหารด้วย 100 ก็จะเป็นน้ำหนักแห้งของสัตว์ทะเลหน้าดินกลุ่มนั้นๆ ซึ่งค่า dry weight conversion factor ได้จากการอบสัตว์ทะเลหน้าดินในแต่ละกลุ่มอย่างน้อย 40 ตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างสัตว์ทะเลหน้าดินจำพวกหอยและครัสตาเซียน จะต้องนำมาผ่านขบวนการละลายแคลเซี่ยมที่เป็นโครงสร้างของเปลือกก่อนโดยแช่ในสารละลาย HCl 20 เปอร์เซ็นต์ (Tantichodok, 1981)

ตารางที่ 6. ค่า dry weight conversion factor ของสัตว์ทะเลหน้าดินกลุ่มต่างๆ

Sea anemone	12%
Nemertea	23%
Sipuncula	16%
Polychaeta	18%
Crustacea	17%
Gastropoda	5%
Pelecypoda	4%
Fishes	24%

ที่มา : Tantichodok (1981)

นำข้อมูลมาเปรียบเทียบความแตกต่างและนัยสำคัญทางสถิติของความหนาแน่นและมวลชีวภาพของสัตว์ทะเลหน้าดินที่อาศัยในป่าชายเลนแต่ละแปลงและแต่ละฤดูกาลโดยใช้สูตรการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance; ANOVA) รวมทั้งเปรียบเทียบค่าดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index) ค่า Evenness และค่าดรรชนีความคล้ายคลึง (Jaccard's Similarity Index) ของสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบในป่าชายเลนแต่ละแปลงและในแต่ละฤดูกาล (Krebs, 1989)

ค่าดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index; H')

$$H' = - \sum (n_i/N) \log (n_i/N)$$

เมื่อ H'= ค่าดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index)
n_i = จำนวนของสัตว์ทะเลหน้าดินแต่ละชนิด
N = จำนวนสัตว์ทะเลหน้าดินทั้งหมด

ค่า Evenness (J')

$$J' = H'/ H'max$$

เมื่อ J' = ค่า Evenness
H' = ค่าดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index)
$H'max$ = ค่าดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index) สูงสุดที่หาได้จากสูตร $H'max = \log S$ เมื่อ S เท่ากับจำนวนชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดิน

ค่าดรรชนีความคล้ายคลึง (Jaccard's Similarity Index)

$$S_j = (a/(a+b+c))$$

เมื่อ S_j = ค่าดรรชนีความคล้ายคลึง (Jaccard's Similarity Index)
a = จำนวนชนิดที่พบในสถานี A และ B
b = จำนวนชนิดที่พบในสถานี B แต่ไม่พบในสถานี A
c = จำนวนชนิดที่พบในสถานี A แต่ไม่พบในสถานี B

จากนั้นเปลี่ยนค่าดรรชนีความคล้ายคลึง (Jaccard's Similarity Index) เป็น Jaccard's dissimilarity Index และแสดงในรูป Dendrogram เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างป่าชายเลนในแต่ละแปลง (Bakus, 1990)

2.2. ศึกษาองค์ประกอบอาหารจากกระเพาะอาหารของปูทะเล

วิธีศึกษาดัดแปลงจากวิธีของ Woods (1993) ใช้ลอบปูแบบพับได้สุ่มจับปูทะเลที่อาศัยในป่าชายเลนธรรมชาติและป่าชายเลนที่ปลูกทดแทนอายุต่างๆ คล้ายกับวิธีการรวบรวมปูทะเลในข้อ 1. แต่เหยื่อที่ใช้ล่อปูทะเลต้องใส่ในท่อพีวีซีเจาะรูด้านข้างและปิดด้านหัวท้ายให้มิดชิดเพื่อป้องกันไม่ให้ปูทะเลกินเหยื่อที่ล่อไว้ ร่วมกับการใช้สวิงสุ่มจับปูทะเลในตอนกลางคืนขณะน้ำลงจากแหล่งอาศัยบริเวณป่าชายเลนแปลงต่างๆ ปูทะเลที่จับได้ต้องแช่ในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10% ทันทีเพื่อยุติการย่อยของอาหารภายในกระเพาะ จากนั้นนำไปผ่าวิเคราะห์หาประเภทอาหารของปูทะเลในห้องปฏิบัติการ ก่อนที่จะทำการผ่าต้องวัดขนาดความกว้างของกระดอง บันทึกเพศ แล้วจึงเปิดด้านบนของกระดองออกตัดส่วนกลางของกระเพาะอาหารแล้วใช้น้ำกลั่นชะล้างส่วนประกอบของอาหารในกระเพาะลงใน petri dish นำส่วนประกอบของอาหารดังกล่าวมาศึกษาและจำแนกประเภทด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบอาหารของปูทะเลที่ศึกษาจากกระเพาะอาหารของปูทะเลด้วยวิธี points method และ frequency of occurence method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Williams (1981) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.2.1. วิธี points method โดยการจัดระดับคะแนนของกระเพาะอาหารปูทะเลตามปริมาณอาหารที่มีในกระเพาะของปูแต่ละตัวตั้งแต่ 0-20 คะแนน ถ้ากระเพาะอาหารของปูทะเลตัวใดมีอาหารเต็มกระเพาะอาหารจะได้คะแนนเท่ากับ 20 คะแนน หากมีอาหารสามในสี่ส่วนหนึ่งในสองส่วนหรือหนึ่งในสี่ส่วนของกระเพาะอาหารก็จะได้คะแนนเท่ากับ 15, 10 และ 5 คะแนนตามลำดับ ส่วนกระเพาะอาหารของปูที่ไม่มีอาหารอยู่ในกระเพาะอาหารเลย จะได้คะแนนเท่ากับศูนย์ และใช้วิธีนี้กับสัตว์ทะเลหน้าดินชนิดต่างๆ ที่ปรากฏในกระเพาะอาหารของปูทะเลด้วย เช่นกระเพาะอาหารมีระดับคะแนนเท่ากับ 16 คะแนนและมีองค์ประกอบของอาหารเป็นพวกหอยฝาเดียวอยู่ถึงสามในสี่ส่วน หอยฝาเดียวก็จะได้คะแนน 12 คะแนนนำผลที่ศึกษาจากตัวอย่างกระเพาะปูทะเลทั้งหมดไปหาอัตราส่วนชนิดของอาหารโดยใช้สูตร

I17409299

$$P = (F / A) * 100$$

เมื่อ p = เปอร์เซ็นต์ของอาหารชนิดใดๆ ที่พบในกระเพาะอาหารปูทะเล

F = ผลรวมคะแนนของอาหารชนิดใดๆ ที่พบในกระเพาะอาหารของปูทะเล

A = ผลรวมคะแนนของอาหารทุกชนิดที่พบในกระเพาะอาหารของปูทะเล

2.2.2. วิธี *frequency of occurence method* เป็นการหาข้อมูลความถี่ชนิดของอาหารที่พบในกระเพาะอาหารปูทะเล โดยใช้สูตร

$$PO = (O / N) * 100$$

เมื่อ PO = เปอร์เซ็นต์ความถี่ของอาหารชนิดใดๆ ที่พบในกระเพาะอาหารปูทะเล

O = จำนวนปูทะเลที่มีอาหารชนิดใดๆ อยู่ในกระเพาะอาหาร

N = จำนวนปูทะเลที่ศึกษาทั้งหมดไม่รวมปูที่ไม่มีอาหารอยู่ในกระเพาะอาหาร

นำข้อมูลที่ได้มาทดสอบอิทธิพลขนาดและเพศต่อความถี่ของอาหารปูทะเลชนิดใดๆ ด้วย chi-square

2.3. ศึกษาจากข้อมูลองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงปูทะเลในห้องปฏิบัติการ

วิธีทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Dearborn และ Ojeda (1991) และ Poovachiranon และ Tantichodok (1991) โดยใช้ลอบปูแบบพับได้รวบรวมปูทะเลที่อาศัยในป่าชายเลนแปลงต่างๆ ทุกเดือนตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2537 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2538 ดังวิธีการที่ใช้ในข้อ 1. นำปูทะเลที่รวบรวมได้มาขังเลี้ยงไว้ในคอกไม้ไผ่ขนาด 2x3 เมตร และทำการเก็บรวบรวมสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่ในขณะน้ำลงด้วยเช่นกัน โดยใช้อุปกรณ์เช่น เสียม พลั่ว ช่วยในการขุดและเก็บรวบรวมสัตว์ทะเลหน้าดินที่พบในบริเวณดังกล่าว ซึ่งพบเห็นบ่อยๆ ได้แก่ สัตว์จำพวกปูและหอย เช่น ปูก้ามดาบ หอยขี้นก หอยขมทะเล เป็นต้น ส่วนปูแสมจะทำการจับในเวลากลางคืนในขณะที่น้ำลง เนื่องจากปูจำพวกนี้มีความว่องไว หลบหลีกได้เร็ว นำสัตว์ทะเลหน้าดินที่รวบรวมได้มาขังเลี้ยงไว้ในถังไฟเบอร์ขนาด 2x2 เมตร เพื่อนำไปใช้ในการทดลองศึกษาชนิดของอาหารและพฤติกรรมการกินอาหารของปูทะเล ซึ่งได้ทำการศึกษาตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2538 โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้น

2.3.1. การทดลองขั้นต้น ใช้ตู้กระจกขนาด 30x40x30 เซนติเมตร ภายในตู้กระจกใส่ทรายและให้มีความลาดเอียงคลุมพื้นที่ 3/4 ส่วนของตู้ทดลอง ใส่น้ำทะเลสะอาดและผ่านการให้อากาศให้ท่วมพื้นทราย 1/3 ส่วน นำปูทะเลที่รวบรวมไว้มา วัดขนาด บันทึกเพศแล้วใส่ในตู้ทดลองตู้ละ 1 ตัว และต้องงดให้อาหารแก่ปูทะเลก่อนที่นำมาทดลอง 2 วัน หลังจากให้ปูทะเลปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในตู้ทดลอง 1 วัน นำสัตว์ทะเลหน้าดินที่รวบรวมไว้มาวัดขนาดแล้วจึงใส่ในตู้ทดลองครั้งละ 1 ชนิด ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เพื่อดูว่าปูทะเลยอมรับสัตว์ทะเลหน้าดินชนิดนั้น

เป็นอาหารหรือไม่ ทำการทดลองกับสัตว์ทะเลหน้าดินที่รวบรวมได้ทุกชนิด บันทึกชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่ปูทะเลกินเป็นอาหารเพื่อเป็นข้อมูลในการทดลองขั้นถัดไป

2.3.2. การทดลองเพื่อทราบชนิดของอาหารที่ปูทะเลชอบมากที่สุด จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองขั้นต้นในข้อ 2.3.1. นำสัตว์ทะเลหน้าดินที่เป็นอาหารของปูทะเลใส่ในตู้ทดลองที่เตรียมไว้เหมือนข้อ 2.3.1. พร้อมๆ กัน หลังจากนั้นสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารและชนิดของอาหารที่ปูทะเลเลือกกินในระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการทดลอง แล้วจึงทำการนับจำนวนสัตว์ทะเลหน้าดินที่ใส่ลงในตู้ทดลองทุกๆ 24 ชั่วโมง ติดตามผลการทดลองจนครบ 3 วัน บันทึกผลและนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแตกต่างและนัยสำคัญในการเลือกสัตว์ทะเลหน้าดินชนิดต่างๆ เป็นอาหารของปูทะเลด้วย Manly's Alpha Preference Index (α) (Krebs, 1989) โดย

$$\alpha i = Ri/Ni * (1/ \Sigma(Rj/Nj))$$

เมื่อ Ri,Rj = สัดส่วนของสัตว์ทะเลหน้าดินชนิด i หรือ j ที่เป็นอาหารของปูทะเล (i และ j = 1,2,3,.....,n)

n = จำนวนชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่เป็นอาหารของปูทะเล

Ni,Nj = สัดส่วนของสัตว์ทะเลหน้าดินชนิด i หรือ j ที่ใส่ลงในตู้ทดลอง

หากสัตว์ทะเลหน้าดินชนิดใดมีค่าของ α มากกว่าค่าของความน่าจะเป็นที่สัตว์ทะเลหน้าดินชนิดนั้นจะถูกกินโดยปูทะเล (1/ m, เมื่อ m เท่ากับผลรวมชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดิน) แสดงว่าปูทะเลชอบกินสัตว์ทะเลหน้าดินชนิดนั้นเป็นอาหารและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดและขนาดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่ปูทะเลเลือกกินเป็นอันดับแรกด้วย chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \sum i (Oi - Ei)^2 / Ei$$

เมื่อ Ei = จำนวนครั้งของสัตว์ทะเลหน้าดินแต่ละชนิดที่คาดว่าปูทะเลจะเลือกกินเป็นอันดับแรก

Oi = จำนวนครั้งของสัตว์ทะเลหน้าดินแต่ละชนิดที่ปูทะเลเลือกกินเป็นอันดับแรก

หากค่า chi-square (χ^2) ที่ได้จากการคำนวณมากกว่าค่า chi-square (χ^2) ในตาราง chi-square ของระดับองศาอิสระใดๆ (df, df = n – 1 เมื่อ n เท่ากับผลรวมของจำนวนชนิดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่ใช้ในการทดลอง) แสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างระหว่างชนิดและขนาดของสัตว์ทะเลหน้าดินที่ปูทะเลเลือกกินเป็นอันดับแรก

3. การศึกษาชีววิทยาการประมงของปูทะเล

3.1. อัตราส่วนระหว่างเพศของปูทะเล

สุ่มเก็บข้อมูลจำนวนของปูทะเลแต่ละเพศของแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2537 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ.2538 มาหาอัตราส่วนระหว่างเพศและทดสอบอัตราส่วนระหว่างเพศด้วยวิธี chi-square ซึ่งมีสูตร

$$\chi^2 = \sum_i (O_i - E_i)^2 / E_i$$

เมื่อ χ^2 = ค่า chi-square จากการคำนวณ

O_i = จำนวนตัวของแต่ละเพศจากการสุ่มตัวอย่าง

E_i = จำนวนตัวที่คาดหวังของแต่ละเพศ

นำค่า chi-square ของปูทะเลจากการสุ่มตัวอย่างในแต่ละเดือนและตลอดปีที่ได้จากการคำนวณไปเปรียบเทียบกับค่า chi-square ที่ได้จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยตั้งสมมติฐานว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างจำนวนของปูทะเลเพศผู้และปูทะเลเพศเมีย

3.2. การศึกษาการพัฒนาของรังไข่ของปูทะเล

ข้อมูลการพัฒนาของรังไข่ของปูทะเลตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2537 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ.2538 เป็นระยะเวลา 1 ปี ได้จากการนำปูทะเลเพศเมียที่สุ่มจับจากบริเวณคลองหงาวมาวัดขนาดความกว้างของกระดองและชั่งน้ำหนักตัว แล้วจึงทำการผ่ากระดองเพื่อนำรังไข่ของปูทะเลมาจำแนกระยะการพัฒนาของรังไข่ปูทะเลตามวิธีของ สมบัติ ภู่วิรานนท์ (2530) ซึ่งได้ดัดแปลงจากวิธีของ Shanmugam และ Bensam (1980) โดยจำแนกระยะการพัฒนาของรังไข่ของปูทะเลเพศเมียออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 รังไข่ปรากฏให้เห็นไม่ชัดเจน ลักษณะรังไข่เป็นเส้นบางใสขนาดเล็ก อยู่เหนือ digestive gland ซึ่งมีลักษณะเป็นริ้วสีเหลืองอ่อนยาวไปตามความโค้งและอยู่ใต้กระดองด้านขอบหนามส่วนหน้า

ระยะที่ 2 สภาพรังไข่เริ่มปรากฏเห็นเป็นท่อลักษณะเป็นรอยหยัก รังไข่เปลี่ยนจากสีใสเป็นสีครีมหรือสีเหลืองอ่อน อยู่บน digestive gland

ระยะที่ 3 สภาพรังไข่มีขนาดใหญ่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปกคลุมบน digestive gland ประมาณ 1/3 ถึง 3/4 ของ digestive gland ทั้งหมด

ระยะที่ 4 สภาพรังไข่มีขนาดใหญ่เต็มที่ มีสีส้มหรือสีส้มอมแดง ปกคลุมมิดส่วนบนของ digestive gland ทั้งหมด

หลังจากนั้นนำรังไข่ไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ที่อ่านค่าได้ถึงเลขทศนิยม 2 ตำแหน่ง บันทึกผลเพื่อนำไปคำนวณหาค่า Gonad-Somatic Index (GSI) โดยใช้ข้อมูลน้ำหนักตัวและน้ำหนักรังไข่ของปูทะเลมาคำนวณหาค่า GSI ตามวิธีของ Quinn และ Kojis (1987)

GSI = (น้ำหนักของรังไข่ปูทะเล / น้ำหนักของปูทะเล) * 100

นำค่า GSI ของปูทะเลที่คำนวณได้ทุกเดือนมาแสดงรวมกันด้วยกราฟเพื่อประมาณช่วงฤดูกาลวางไข่ของปูทะเลในรอบปีและศึกษาการพัฒนาการของรังไข่ของปูทะเลระยะต่างๆ ด้วยกระบวนการมิญชวิทยา (histology) โดยนำรังไข่ของปูทะเลแต่ละระยะมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และแช่ในน้ำยา Bouin's fixing solution นานประมาณ 18-24 ชั่วโมง แล้วล้าง picric acid ที่เป็นส่วนผสมของ Bouin's fixing solution ออกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเก็บรักษาเนื้อเยื่อรังไข่ของปูทะเลในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์และต้องเปลี่ยนแอลกอฮอล์ที่ใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อทุกๆ 2 สัปดาห์ แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนทางด้านมิญชวิทยาดังนี้

ก. การขจัดน้ำ (dehydration) โดยนำเนื้อเยื่อแช่ใน ethyl alcohol 90 % นาน 6 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาแช่ใน ethyl alcohol 95 % นาน 18-22 ชั่วโมง และแช่ใน n-butyl alcohol นาน 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

ข. การ clearing นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการขจัดน้ำ (dehydration) มาแช่ใน xylene นาน 1 ชั่วโมง

ค. การ Impregnation นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการ clearing มา Impregnation โดยแช่ในส่วนผสม xylene กับ molton wax (Melted parafin) อัตราส่วน 1:1 นานประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วจึงแช่เนื้อเยื่อใน wax (Melted parafin) ครั้งที่ 1 นานประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วจึงนำเนื้อเยื่อมาแช่ใน wax (Melted parafin) ครั้งที่ 2 นานประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งขั้นตอนการ Impregnation ทำในเตาอบ (oven) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส

ง. นำเนื้อเยื่อไป embed และตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 4-6 ไมครอนด้วยเครื่อง microtomeจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ติดกับสไลด์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมงแล้วนำไปย้อมสี Haematoxylin &Eosin

จ. การย้อมสี Haematoxylin & Eosin โดยผ่านกระบวนการ

1. การขจัด parafin (deparafinization) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน xylene 2 ครั้งนาน ครั้งละ 3-5 นาที

2. ล้าง xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 3-5 นาที หลังจากนั้นแช่สไลด์ใน alcohol 95%, 90%, 70% นาน 3-5 นาที ตามลำดับ

3. ล้างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลานาน 5 นาที

4. ย้อมสไลด์ด้วยสี Haematoxylin นาน 10-12 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปานาน 3 นาที

5. นำสไลด์มา differentiate ในกรด (0.5 HCl alcohol solution) นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปาที่ไหลตลอดนาน 10-15 นาที

6. นำสไลด์มาแช่ใน alcohol 70%, 90%, 95% นาน 3-5 นาที ตามลำดับ

7. ย้อมสไลด์ด้วยสี Eosin นาน 1-2 วินาที และ differentiate ด้วย alcohol 95% นาน 1-2 วินาที

8. แช่สไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 3-5 นาที แล้วจึงนำมาแช่ใน xylene นาน 3-5 นาที

9. นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมด้วยสี Haematoxylin & Eosin ไป mount

10. ศึกษาการพัฒนาการของรังไข่ โดยพิจารณาจากส่วนของนิวเคลียสที่ติดสีน้ำเงิน และไซโตพลาสซึมที่ติดสีชมพูอมแดง

3.3. ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างของกระดอง (CW) และน้ำหนัก (W) ของปูทะเล

สุ่มเก็บข้อมูลขนาดความกว้างของกระดอง (carapace width) และน้ำหนักของปูทะเลเพศผู้และเพศเมียจากตัวอย่างปูทะเลที่พ่อค้าคนกลางรับซื้อจากชาวประมง ซึ่งใช้เครื่องมือประเภทลอบปูแบบพับได้ทำประมงปูทะเลบริเวณคลองหงาว ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2537 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2538 เป็นเวลา 1 ปี เพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างของกระดอง (CW) และน้ำหนัก (W) ของปูทะเลจากข้อมูลความกว้างของกระดองและน้ำหนักของปูทะเลแต่ละเพศด้วยสมการ

$$W = a\,(CW)^{b}$$

ประมาณหาค่า a และ b จากการวิเคราะห์เส้นถดถอยโดยเปลี่ยนสมการให้อยู่ในรูปลอการิธึมธรรมชาติ

$$\ln(W) = \ln(a) + b^{*}\ln(CW)$$

นำค่าความชัน b มาทดสอบสมมติฐานการเจริญเติบโตของปูทะเล หากปูทะเลมีการเจริญเติบโตแบบไอโซเมตริก ค่าของ b ต้องเท่ากับ 3 โดยใช้ t-test

$$t = |b-3| / s_b$$

เมื่อ $s_b = \left((s^2_{y.x} / (\sum(x_1-x)^2)^{1/2} \right.$

ค่า t ที่คำนวณได้นำไปเปรียบเทียบกับค่า t ในตารางที่ df = n-2 เพื่อนำผลที่ได้ไปหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความกว้างของกระดอง และน้ำหนัก โดยใช้สมการการเติบโตของ Von Bertalanffy (1938 อ้างถึงใน Sparre and Venema, 1992)

$$L_t = L_\infty (1-e^{-K(t-t_0)})$$

$$W_t = W_\infty (1-e^{-K(t-t_0)})^3$$

ในกรณีที่สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตแบบอัลโลเมตริก (allometric growth) กล่าวคือน้ำหนักไม่เป็นสัดส่วนกับความยาวยกกำลังสามเพราะสัตว์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และความถ่วงจำเพาะซึ่งหมายถึง $W = CW^n$ โดยที่ n ไม่เท่ากับสาม ซึ่งกรณีเช่นนี้ Gulland (1969 อ้างถึงในปรีชา สมมณี 2520) แนะนำให้ใช้

$$W_t = W_\infty (1-e^{-K(t-t_0)})^n \quad \text{.....(20)}$$

3.4. การประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโต (growth parameter) การตาย (mortality parameter) และลักษณะการทดแทนที่ (recruitment pattern)

โดยนำข้อมูลการกระจายความถี่ของความกว้างกระดองปูทะเล ที่ทำการสุ่มวัดทุกเดือนตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2537 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2538 มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FiSAT (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools) (Gayanilo, Sparre and Pauly, 1994) ดังนี้

- ประมาณค่าสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโต (K) และความกว้างกระดองสูงสุดที่ปูทะเลสามารถเจริญเติบโตได้ (L_∞) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FiSAT มาวิเคราะห์จำแนกกลุ่มประชากรของปูทะเลรุ่นต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบอยู่แต่ละเดือนตามวิธีของ Bhattacharya (1967 อ้างถึงใน Sparre and Venema, 1992) ซึ่งใช้หลักการพื้นฐานที่ว่าการกระจายความถี่ของขนาดความกว้างกระดองของประชากรปูทะเลในแต่ละรุ่นจะอยู่ในรูปการกระจายเส้นโค้งปกติ (normal distribution) และสามารถหาค่าความกว้างกระดองเฉลี่ยของเส้นโค้งปกติ จากการวิเคราะห์เส้นถดถอย (linear regression analysis) จากค่าความกว้างกระดองกึ่งกลาง (ML) กับผลต่างของ logarithm ของจำนวนปูทะเล (N) ดังสมการที่ 21

$$\Delta \ln N = \alpha + \beta ML \quad \text{.....(21)}$$

เมื่อ α = ค่าคงที่ที่ตัดกับแกน Y (Y-intercept)

β = ค่าความชัน (slope)

จะได้ความกว้างกระดองเฉลี่ยเท่ากับ $(-\alpha/\beta)+h/2$ และค่าความเบี่ยงเบนเท่ากับ $-h/\beta$ เมื่อ h คือค่าอันตรภาคชั้น (class interval) ซึ่งในที่นี้มีค่าเท่ากับ 0.5 และนำค่าความกว้างกระดองเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละเดือนมาวิเคราะห์เพื่อประมาณค่าสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโต (K) และความกว้างกระดองสูงสุดที่ปูทะเลสามารถเจริญเติบโตได้ (L_∞) โดยใช้ความกว้างกระดองที่เพิ่มขึ้นในหนึ่งหน่วยเวลาต่อความกว้างกระดองเฉลี่ยในช่วงเวลานั้นมาวิเคราะห์เส้นถดถอย (linear regression analysis) ตามวิธีของ Gulland and Holt plot (Sparre and Venema, 1992) จากสมการ

$$\Delta L/\Delta t = a + b\bar{L}$$

- ประมาณอายุของปูทะเลเมื่อมีความกว้างกระดองเท่ากับศูนย์ (t_0) เนื่องจากไม่สามารถประมาณอายุของปูทะเลเมื่อมีความกว้างกระดองเท่ากับศูนย์จากข้อมูลการกระจายความถี่ของความกว้างของกระดอง จึงต้องประมาณค่า t_0 จากค่าพารามิเตอร์การเติบโตคือค่า L_∞ และค่า K ที่วิเคราะห์ได้ตามวิธีการของ Gulland and Holt plot โดยดัดแปลงเส้นการเจริญเติบโตของ Von Bertalanffy เพื่อหาค่า t_0 จากสมการ

$$t_0 = t + 1/K * \ln (1 - L_t / L_\infty)$$

- ประมาณอายุสูงสุดของปูทะเล (t_m) คืออายุของปูทะเลที่เจริญเติบโตมาถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของความกว้างกระดองสูงสุด (L_∞) ซึ่งสามารถหาได้จากสมการที่ 22.

$$t_m = t_0 + 2.9957/K \quad \text{.....(22)}$$

- ประมาณค่าสัมประสิทธิ์การตายรวม (Z) ของปูทะเล ด้วยวิธี linearized length converted catch curve (Sparre and Venema, 1992) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FISAT

- วิเคราะห์รูปแบบการทดแทนที่ (recruitment pattern) ของปูทะเล โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป FISAT