BRT 539034

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด HYRIOPSIS (LIMNOSCAPHA) DESOWITZI ระยะโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ

IN VITRO CULTURE OF THE GLOCHIDIA OF FRESHWATER PEARL MUSSEL [HYRIOPSIS (LIMNOSCAPHA) DESOWITZI]

โดย

นางสาวนฤมล เดชะประเสริฐ

พ.ศ. ๒๕๔๐

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
ปริญญา

สัตววิทยา
สาขา

สัตววิทยา
ภาควิชา

เรื่อง การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi ระยะโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ

- In vitro Culture of the Glochidia of Freshwater Pearl Mussel [Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi]

นามผู้วิจัย นางสาวนฤมล เดชะประเสริฐ

ได้พิจารณาเห็นชอบให้เป็นวิทยานิพนธ์ระดับ ดี

โดย ประธานกรรมการ อุทัยวรรณ โกวิทวที วันที่ 27 เดือน ต.ค พ.ศ 2540

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุทัยวรรณ โกวิทวที , วท.ม.)

กรรมการ

(นางอรภา นาคจินดา , วท.ม.)

กรรมการ

(นางกัญญา สุจริตวงศานนท์ , วท.ม.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ประมาณ พรหมสุทธิรักษ์ , Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิณทิพย์ กรรณสูตร , วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ศาสตราจารย์ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ , Ph.D.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 เดือน ตุลาคม พ.ศ 2540

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Culture of the Glochidia of Freshwater Pearl Mussel [*Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*]

โดย

นางสาวนฤมล เดชะประเสริฐ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
พ.ศ. ๒๕๔๐

BRT 539034

นฤมล เดชะประเสริฐ 2540 : การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อุทัยวรรณ โกวิทวที, วท.ม. 56 หน้า

การเลี้ยงโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืดในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหาร 2 สูตร อาหารแต่ละสูตรมีส่วนประกอบของ M199 แหล่งโปรตีน และยาปฏิชีวนะ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 0.5 สำหรับยาปฏิชีวนะประกอบด้วย carbenicillin, gentamycin sulfate, rifampin ซึ่งแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม และ amphotericin B 5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยอาหารสูตรที่ 1 และ 2 จะใช้แหล่งโปรตีนที่แตกต่างกัน คือ ซีรัมม้า และพลาสมาปลานิล ตามลำดับ เลี้ยงโกลคิเดียในจาน (tissue culture dishes) ที่มีขนาด 60 x 15 มิลลิเมตร โดยแต่ละจานใส่อาหาร 3.5 มิลลิลิตร และโกลคิเดียจำนวน 50-100 ตัว นำจานเลี้ยงโกลคิเดียทั้งหมดใส่ในกล่องพลาสติก แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ พร้อมทั้งให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เข้าไปภายในกล่องพลาสติก วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) มีอาหาร 2 สูตร สูตรละ 33 ซ้ำ ทำการเลี้ยงจนกระทั่งโกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ นับจำนวนโกลคิเดียที่ตาย และจำนวนโกลคิเดียที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น ลูกหอยระยะจูวีไนล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีค่าเท่ากับ 89.64 และ 80.99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปอร์เซ็นต์การรอดตาย มีค่าเท่ากับ 96.60 และ 91.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ และเปอร์เซ็นต์การรอดตายในอาหารสูตรที่ 1 มีค่าสูงกว่าสูตรที่ 2 และมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P< 0.01$) ระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของอาหารทั้งสองสูตร อยู่ในช่วง 10-11 วัน

นฤมล เดชะประเสริฐ
ลายมือชื่อนิสิต

อุทัยวรรณ โกวิทวที
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

21 / ต.ค. / 40

Narumon Dachaprasert 1997 : *In vitro* Culture of the Glochidia of Freshwater Pearl Mussel [*Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*]. Master of Science (Zoology), Major Field Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor : Asistant Professor Uthaiwan Kovitvadhi, M.S. 56 pages.

In vitro culture of the glochidia of freshwater pearl mussel was conducted in two artificial media formula. Each artificial medium contained a mixture of M199, protein source and antibiotics in the ratio of 2 : 1 : 0.5. Antibiotics were prepared by mixing 100 μg each of carbenicillin, gentamycin sulfate, rifampin and amphotericin B at 5 μg /ml. The formula 1 and 2 differed in protein sources, horse serum and fish (*Oreochromis niloticus*) plasma respectively. Glochidia were cultured in tissue culture dishes (60 x15 mm.). Each culture dish contained 3.5 ml. of artificial media with 50-100 glochidia. All glochidia culture dishes were transferred into plastic box and 5%CO_2 input. Then they were kept in the incubator at temperature of 23 ± 2 $^{\circ}$C under sterile condition. The experiment was designed in CRD (Completely Randomized Design) with two artificial media. Each artificial media consisted of 33 replications. Glochidia were reared until juvenile. The maturity and transformation (glochidia into juvenile) were examined under light microscope (40x). The percentages of glochidia transformation cultured in formula 1 and 2 were 89.64 and 80.99 % and the survival rates were 96.60 and 91.39 % respectively. The percentages of transformation and survival rate for formula 1 were higher than that reared in formula 2 and were significantly different ($p< 0.01$). The duration for glochidia transformation, in both artificial media were ranged from 10-11 days.

Narumon Dachaprasert — Student's signature

Uthaiwan Kovitvadhi — Thesis Advisor's signature

21 / Oct. / 97

คำนิยม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างสูงจากผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำในการศึกษาวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. อุทัยวรรณ โกวิทวที ประธานกรรมการที่ปรึกษา รศ.ดร. ประมาณ พรหมสุทธิรักษ์ อาจารย์อรภา นาคจินดา และอาจารย์กัญญา สุจริตวงศานนท์ กรรมการที่ปรึกษาพร้อมทั้ง รศ. ดวงสมร สินเจิมศิริ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. อนันต์ชัย เขื่อนธรรม อ.ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย อาจารย์สาธิต โกวิทวที อาจารย์วิน เชยชมศรี อาจารย์ปานเทพ รัตนากร อาจารย์จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ และอาจารย์วิกรม รังสินธุ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดจนอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณอ้อมเดือน มีจุ้ย คุณวิชัย ตินะโส คุณสงกรานต์ เผือกจีน และเจ้าหน้าที่ของศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และอำนวยความสะดวกในการคัดเลือกและขนส่งแม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืด

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

นฤมล เดชะประเสริฐ

ตุลาคม 2540

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผล	30
วิจารณ์	31
สรุป	34
ข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	41

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเจริญและสัณฐานวิทยาของโกลคิเดียในสกุล *Anodonta, Unio* และ *Margaritifera*	10
2	ส่วนประกอบในอาหารสูตร Isom and Hudson	15
3	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ในอาหารสูตร Isom and Hudson โดยมีแหล่งโปรตีน และซีรัมที่แตกต่างกัน	17
4	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ที่เลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบธรรมดา และใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน	18
5	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ที่เลี้ยงในอาหารของ Isom and Hudson เปรียบเทียบกับ อาหาร M199, DMEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมม้า	19
6	ส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะ และยากำจัดเชื้อราที่ใช้ผสมอาหารเลี้ยงโกลคิเดีย	23
7	ส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 1 (M1) และสูตรที่ 2 (M2)	24
8	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย(S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*	30

ตารางผนวกที่

1	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยการรอดตาย (S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ที่สุ่มนับในแต่ละวันของแม่หอยที่ทำการทดลอง	43
2	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยการรอดตาย (S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ที่สุ่มนับในแต่ละวันของแม่หอยที่ทำการทดลองเบื้องต้น	44

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
3	เปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวีไลน์ที่เลี้ยงในอาหาร M1 และ M2 ของแม่หอยที่ทำการทดลอง	45
4	เปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวีไลน์ที่เลี้ยงในอาหาร M1 และ M2ของแม่หอยที่ทำการทดลองเบื้องต้น	47

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ที่สมบูรณ์	6
2	ลักษณะเปลือกภายในของโกลคิเดียหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* เพอริโอสตราคัม (p) บานพับ (h)	7
3.	ตำแหน่งของกล้ามเนื้อ adductor muscle(a)	7
4.	ตำแหน่งของเส้นเลือด caudal vein ของปลา	24
5.	แสดงการเจาะเลือดปลานิลที่เส้นเลือด caudal vein บริเวณหาง	25
6.	ลักษณะของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*	26
7.	แสดง marsupia ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*	27
8.	หอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะจูวีไนล์ อายุ 1 วัน	28

ภาพผนวกที่

1.	กล่องพลาสติกสำหรับใส่จานเลี้ยงโกลคิเดียซึ่งมีการเจาะรูทั้งสองข้าง	53
2.	ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อม regulator	54
3.	แสดง Flow meter สำหรับปรับปริมาตรแก๊ส	54
4.	แผนภาพแสดงการประกอบอุปกรณ์ทดลอง	55

การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro Culture of the Glochidia of Freshwater Pearl Mussel [*Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*]

คำนำ

หอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* จัดเป็นหอยกาบน้ำจืดชนิดหนึ่งมีเปลือกหนา เปลือกด้านในมีความแวววาวเป็นมุก ซึ่งสามารถนำมาเพาะเลี้ยงไข่มุกได้จึงเรียกชื่อหอยกาบน้ำจืดชนิดนี้ว่า"หอยมุกน้ำจืด" (freshwater pearl mussel) จัดอยู่ในวงศ์ Amblemidae อันดับ Unionoida ชั้น Bivalvia ไฟลัม Mollusca (Brandt, 1974) แต่ละส่วนของหอยกาบน้ำจืดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ส่วนของเนื้อนำมาบริโภค ส่วนเปลือกนำมาทำเครื่องประดับตกแต่งเครื่องเรือนหรือเฟอร์นิเจอร์ที่มีราคาแพง และยังมีการนำมาใช้ทำเป็นนิวเคลียส (nucleus) ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำเค็มด้วย ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมได้เปลี่ยนแปลงไป อันเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ อาทิเช่นการขยายตัวของโรงงานอุตสาหกรรม การเกษตรกรรมหรือการสร้างเขื่อนกั้นน้ำ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะก่อให้เกิดมลภาวะ และผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำรวมทั้งปลา ซึ่งมีความสัมพันธ์กับหอยกาบน้ำจืดโดยทำหน้าที่เป็นโฮสต์ (host) ให้แก่หอยกาบน้ำจืดระยะโกลคิเดีย (glochidia) ดังนั้นเมื่อปลามีจำนวนลดลงโอกาสที่โกลคิเดียจะเข้าไปเกาะที่ตัวปลาก็น้อยลงไปด้วย จึงได้มีการพยายามเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดเพื่อการอนุรักษ์ และเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น ส่วนใหญ่การเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดระยะโกลคิเดียทำได้โดยนำปลา และหอยกาบน้ำจืดเพศเมียที่มีไข่แก่มาเลี้ยงไว้ในตู้เดียวกัน จากนั้นหอยกาบน้ำจืดจะปล่อยโกลคิเดียออกมาซึ่งโกลคิเดียเหล่านี้จะเข้าไปเกาะปลา แล้วมีการพัฒนาอยู่ในตัวปลาจนกระทั่งกลายเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (juvenile) ผลปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของหอยกาบน้ำจืดระยะจูวีไนล์ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการเลี้ยงด้วยวิธีดังกล่าวมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา ซึ่งควบคุมดูแลค่อนข้างลำบาก นอกจากนี้ยังมีความยุ่งยากในการเลี้ยงอีกด้วย ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิตของลูกหอยกาบน้ำจืดระยะจูวีไนล์

ให้สูงขึ้น รวมทั้งเพื่อความสะดวก และง่ายต่อการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ โดยในปี ค.ศ. 1982 Isom และ Hudson ได้ทำการทดลองเลี้ยงโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbicilis* ในอาหารสังเคราะห์ (artificial media) ใช้แทนตัวปลา อาหารสังเคราะห์ประกอบด้วย เกลือ กรดอะมิโน กลูโคส วิตามิน ยาปฏิชีวนะ ยากำจัดเชื้อรา และพลาสมาปลา พบว่าโกลคิเดียสามารถเจริญ และเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยเฉพาะปัญหาที่เกิดจากการรบกวนของโปรโตซัว และแบคทีเรีย ต่อมา Keller และ Zam (1990) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบชนิดอาหาร ได้แก่ M199 , DMEM และ Isom and Hudson พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของอาหาร M199 และ DMEM มีค่าเท่ากับ 65.8 และ 65.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่า อาหาร Isom and Hudson ซึ่งมีค่าเท่ากับ 51.2 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นการศึกษาวิธีการเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์เพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงขึ้น จึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดอย่างครบวงจร และในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษา ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดชนิดต่าง ๆ ที่มีความสำคัญในประเทศไทย เพื่อใช้ในการอนุรักษ์ทรัพยากรหอยกาบน้ำจืดชนิดต่างๆ ซึ่งปัจจุบันมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก และอาจจะมีผลกระทบต่อระบบนิเวศในอนาคต อีกทั้งเป็นแหล่งอาหารโปรตีนสูงชนิดใหม่ที่มีราคาถูกแก่ประชาชน โดยสามารถนำมาบริโภคแทนอาหารโปรตีนที่มีราคาแพงได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มอาชีพ และรายได้ให้แก่ประชาชน ในด้านการผลิตเพื่อนำมาบริโภค ซึ่งต้นทุนในการเลี้ยงค่อนข้างต่ำ วิธีการเลี้ยงสะดวกง่ายต่อการดูแล และที่สำคัญสามารถเลี้ยงโดยใช้อาหารจากธรรมชาติ โดยนำหอยกาบน้ำจืดที่จะเลี้ยงใส่ในตะกร้าหรือภาชนะที่เลี้ยงแล้วนำไปแขวนไว้ในแหล่งน้ำ หอยกาบน้ำจืดจะกินแพลงก์ตอนซึ่งเป็นอาหารที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ นอกจากการเลี้ยงเพื่อใช้เป็นอาหารแล้วยังมีการเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดบางชนิดเพื่อใช้ผลิตไข่มุกที่มีราคาสูงได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาจากโกลคิเคียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์

2. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกหอยระยะวูวีไนล์ของแต่ละสูตรอาหาร

3. ศึกษาระยะเวลาในการพัฒนาจากโกลคิเคียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ของแต่ละสูตรอาหาร

การตรวจเอกสาร

หอยมุกน้ำจืดเป็นหอยสองฝา มีเปลือกหนา เปลือกด้านในมีความแวววาวเป็นมุก (Brandt,1974) การเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดเริ่มขึ้นครั้งแรกในประเทศจีน ต่อมาแพร่หลายออกไปอีกหลายประเทศ หอยกาบน้ำจืดที่มีการนำมาผลิตไข่มุกได้แก่ *Margaritifera margaritifera*, *Cristaria plicata*, *Anodonta woodiana*, *Hyriopsis cumingii*, *H. schlegelii*, *H .(Limnoscapha) myersiana* และ *Chamberlainia hainesiana* (อรภา, 2532)

หอยกาบน้ำจืดในประเทศจีนมีประมาณ 100 ชนิด แต่มีเพียง 10 ชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดได้ และหอยกาบน้ำจืดที่นำมาผลิตไข่มุกน้ำจืดได้ดีที่สุด ได้แก่ *C. plicata* และ *H. cumingii* (Binhe, 1984) ในประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีความก้าวหน้าทางอุตสาหกรรมใช้หอยกาบน้ำจืด *H. schlegelii* ในการเพาะเลี้ยงไข่มุก (ธนิษฎา, 2522) สำหรับประเทศไทยหอยกาบน้ำจืดที่รวบรวมได้ในจังหวัดกาญจนบุรี มี 2 ชนิด ที่มีเปลือกหนา มีความแวววาวเป็นมุก พิจารณาว่าสามารถนำมาเพาะเลี้ยงไข่มุกได้ คือ *C. hainesiana* และ *H. (Limnoscapha) myersiana* (อรภาและคณะ, 2529) โดยในปี พ.ศ. 2532 อรภาและคณะ ได้ทำการเพาะเลี้ยงไข่มุกแบบไม่มีนิวเคลียส (non-nucleus) โดยใช้หอยกาบน้ำจืดทั้งสองชนิดนี้ พบว่าหลังจากทำการผ่าตัดฝังเนื้อเยื่อ 6 วัน จะมีการสร้างถุงมุกขึ้น และตรวจสอบการสร้างสารมุก พบว่า *C. hainesiana* จะมีการสร้างสารมุกในวันที่ 30 ในขณะที่ *H. (Limnoscapha) myersiana* มีการสร้างสารมุกในวันที่ 40 ไข่มุกที่ได้จะมีรูปร่างลักษณะและสีสันแตกต่างกันไปตามสีของเปลือกด้านในของหอยกาบน้ำจืดแต่ละชนิด นอกจากนี้การศึกษาอนุกรมวิธานของหอยกาบน้ำจืด ในเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น พบว่าหอยกาบน้ำจืด *H. bialatus* มีลักษณะของเปลือกที่คาดว่าน่าจะนำมาเพาะเลี้ยงไข่มุกได้ (อรภา, 2529) และขณะนี้ที่ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี ได้นำหอยกาบน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* มาทำการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืด ซึ่งมีแนวโน้มในการผลิตไข่มุกได้ดี

H. (Limnoscapha) desowitzi จัดเป็นหอยกาบน้ำจืดซึ่งสามารถนำมาผลิตไข่มุกน้ำจืดได้ มีการจัดลำดับอนุกรมวิธานตาม Brandt (1974) ได้ดังนี้

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Subclass Schizodontida

Order Unionoida

Superfamily Unionacea

Family Amblemidae

Subfamily Hyriopsinae

Genus *Hyriopsis*

Subgenus *Limnoscapha*

Species *desowitzi*

ลักษณะโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi*

อัมพร (2535) ศึกษาอัลตราสตรัคเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียหอยกาบน้ำจืด 12 ชนิดของวงศ์ Amblemidae ที่พบในประเทศไทย พบว่าโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* (ภาพที่ 1) มีลักษณะดังนี้

โครงร่างของเปลือก เป็นรูปกึ่งวงรี (semioval) ที่มีฝาเปลือกทั้งสองข้างเท่ากัน และมีซีกข้างเท่ากัน มีความยาว 165.76 ± 0.03 ไมครอน ความสูง 153.33 ± 0.03 ไมครอน มีค่า Glochidial Index = 0.0255 จัดว่ามีขนาดกลาง เปลือกแต่ละข้างมีความโค้งนูน 57.93 ± 0.02 ไมครอน และบริเวณตรงกลางมีความโค้งนูนมากที่สุด

โครงสร้างของเปลือกภายใน บานพับ (hinge line) เป็นแนวตรง มีเอ็นยึดเปลือกภายนอกอยู่ระหว่างเปลือกทั้งสอง ความยาวของเอ็นยึด 99.55 ไมครอน ไม่มีฟันยึดเปลือก (ภาพที่ 2)

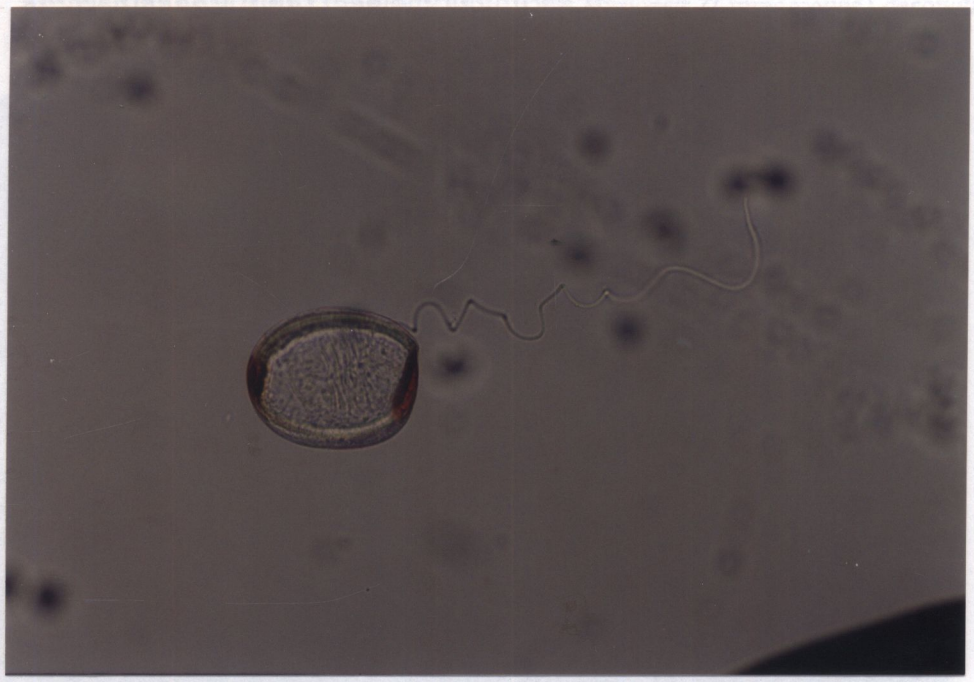
เพอริโอสตราคัมภายใน (Periostracum) มีลักษณะเป็นแผ่นบางงอเข้าด้านใน และบริเวณตรงกลางของขอบเปลือกด้านล่างมีระยะกว้างที่สุด 15.09 ไมครอน มีผิวด้านบนปกคลุมด้วยหนาม

เรียงติดกันประมาณ 7 แถว พื้นที่ของเยื่อที่เหลือถัดเข้ามาเป็นเส้นสันแนวขนานกัน ระยะที่มีหนามกว้าง 8.79 ไมครอน โครงสร้างของหนามมีลักษณะเรียบ ปลายแหลม ขนาดเฉลี่ยของหนาม 0.69-1.64 ไมครอน หนามเรียงตัวห่างกันช่วงละ 0.54 ไมครอน และเพอริโอสตราคัมภายในของขอบเปลือกด้านข้างปกคลุมด้วยตุ่มขนาดเล็กประมาณ 0.03 ไมครอน ที่มีช่องว่างระหว่างกัน 0.17 ไมครอน

ผิวเปลือกภายใน มีรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.55-1.30 ไมครอน กระจายทั่วไป

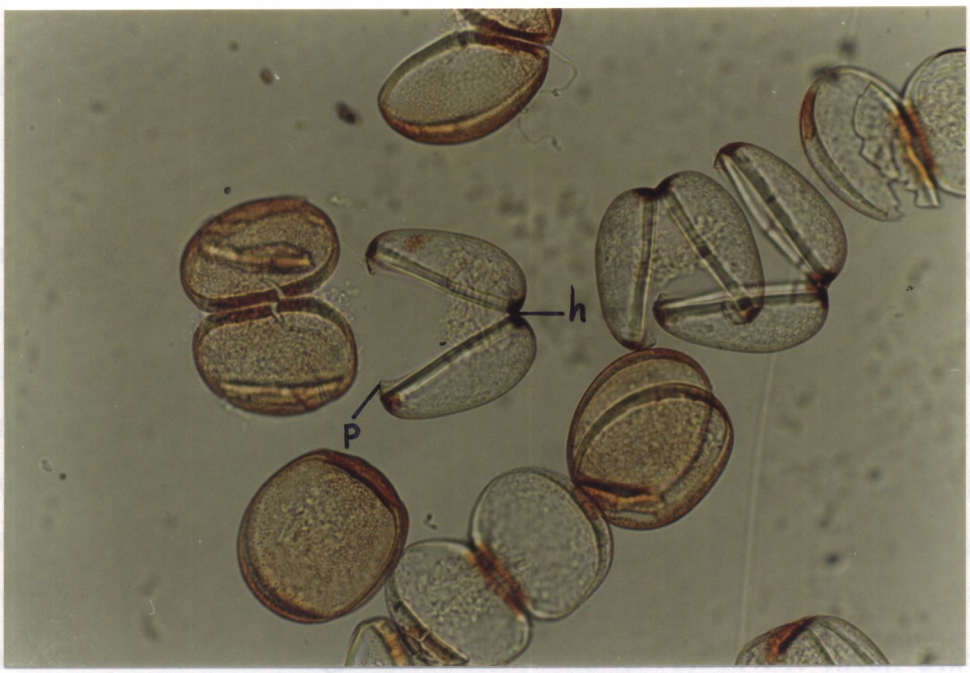
ผิวเปลือกด้านนอก มีผิวเรียบ และมีหลุมซึ่งเป็นแอ่งลึกลงไป

นอกจากนี้ยังมีกล้ามเนื้อ adductor 1 มัด มี thread 1 เส้น ไม่มีส่วนของ hook (ภาพที่ 3)



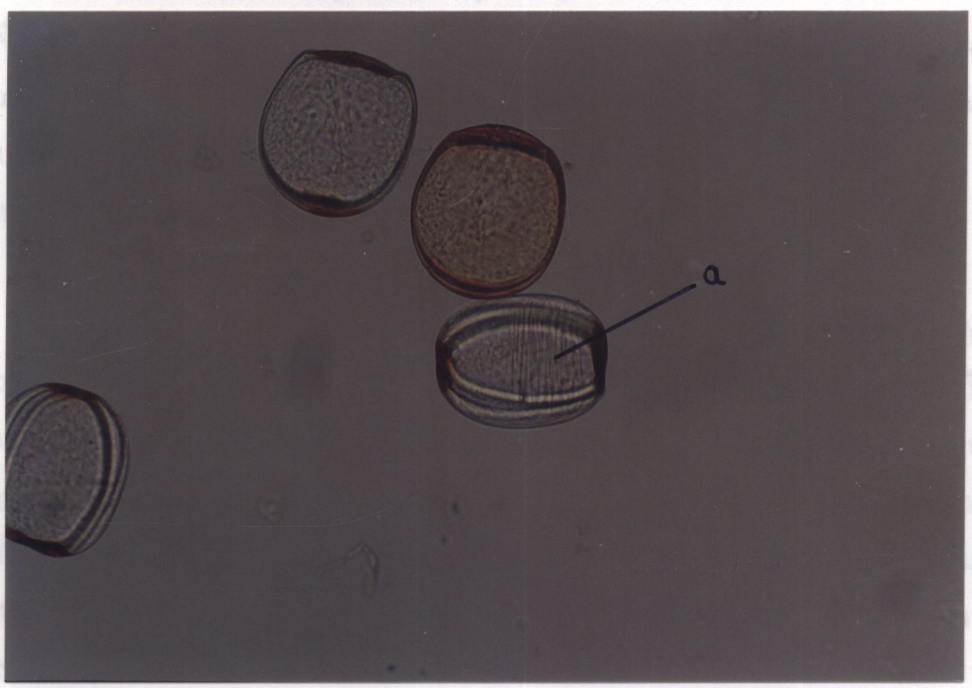
1 มม.

ภาพที่ 1 โกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ที่สมบูรณ์



1 มม.

ภาพที่ 2 ลักษณะเปลือกภายในของโกลคิเดียหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* เพอริโอสตราคัม (p) บานพับ (h)



1 มม.

ภาพที่ 3 ตำแหน่งของกล้ามเนื้อ adductor (a)

วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด

หอยกาบน้ำจืดมีการสืบพันธุ์แบบภายใน ไข่ที่อยู่ในหอยกาบน้ำจืดเพศเมีย จะถูกผสมจากน้ำเชื้อเพศผู้ที่ปนมากับน้ำแล้วเข้ามาในตัวทางท่อน้ำเข้า ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะอาศัยอยู่ในเหงือกของหอยกาบน้ำจืดเพศเมีย เหงือกบริเวณนี้จะพองออกเรียกว่า "marsupia" หรือ"brood chamber"ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีการพัฒนาอยู่ภายในจนกลายเป็นตัวอ่อนระยะโกลคิเดียที่สมบูรณ์ (mature) จึงถูกปล่อยออกมาทางท่อน้ำออก แล้วเข้าไปอาศัยเป็นปรสิตอยู่ในตัวปลาน้ำจืด โดยเกาะอยู่บริเวณเหงือกและครีบ แล้วจะฝังตัว (encystment) ในเนื้อเยื่อบริเวณนั้นจนกระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (transformation) ที่มีรูปร่างลักษณะเหมือนพ่อแม่แล้วหลุดจากตัวปลา (excystment) ตกลงสู่พื้นท้องน้ำหากินเป็นอิสระ วันทนา (2526) ได้กล่าวถึงวิธีการกินอาหารเป็นแบบกรอง (filter feeding) อวัยวะที่ทำหน้าที่ในการกรองอาหารคือ เหงือก อาหารจะเข้าสู่ปาก คอหอยกระเพาะ ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และออกมาสู่ภายนอกทางทวารหนัก

Wiles (1975) ศึกษาฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืดในอันดับ Unionidae พบว่าหอยกาบน้ำจืดแต่ละชนิดจะมีฤดูกาลสืบพันธุ์แตกต่างกัน หอยกาบน้ำจืด *A. implicata*, *A. cataracta cataracta* และ *A. c. fragilis* มีโกลคิเดียที่สมบูรณ์อยู่ในช่วงเดือนกันยายน ถึงเดือนพฤษภาคม ส่วนหอยกาบน้ำจืด *Elliptio complanatus* พบว่ามีอยู่ในช่วง 5-6 สัปดาห์ ในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกรกฎาคม

Borcherding (1991) ศึกษาฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด *Dreissena polymorpha* พบว่าเริ่มต้นขึ้นในฤดูหนาว ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส และสามารถวางไข่ได้หลายครั้งใน 1 ฤดูกาล นอกจากนี้การวางไข่จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความลึกของน้ำ ส่วนฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษา แต่มีการศึกษาการพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ และฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด *H. (Limnoscapha) myersiana* ซึ่งเป็นหอยมุกน้ำจืดที่อยู่ในสกุลเดียวกันนี้ พบว่ามีเกือบตลอดทั้งปี ยกเว้นเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกันยายน (อรภา และคณะ, 2531)

D' Eliscu (1972) ทำการศึกษาลักษณะโกลคิเดีย และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ของหอยกาบน้ำจืด *A. californiensis* พบว่าโกลคิเดียจะมีขนาดประมาณ 0.2 มิลลิเมตร มี teeth อยู่ที่ฝาทั้งสองข้าง มี thread ค่อนข้างยาว 1 เส้น มีกล้ามเนื้อ adductor 1 มัด อยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถอยู่ในอ่างน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิ 15-16 องศาเซลเซียสได้นานถึง 36 ชั่วโมง ปลาที่เป็นโฮสต์ของโกลคิเดีย *A. californensis* มีหลายชนิด เมื่อโกลคิเดียเข้ามาเกาะที่ก้านเหงือกหรือซี่เหงือกของโฮสต์ โฮสต์จะเริ่มมีการตอบสนองต่อโกลคิเดีย โดยจะมีการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการเกาะ เนื้อเยื่อจะเจริญอย่างรวดเร็วและล้อมรอบโกลคิเดียทั้งตัวแสดงว่าการสร้างซีสต์ (cyst) เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ การเข้าซีสต์ของโกลคิเดียใช้เวลา 3-4.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่จะออกจากซีสต์ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยพบว่า ใช้เวลาในการเป็นซีสต์อยู่ในปลา *Gambusia affinis* 26-27 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ลักษณะของโกลคิเดียในระหว่างที่เป็นซีสต์ซึ่งฝังอยู่ในตัวโฮสต์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์โดยมีลักษณะ และอวัยวะใกล้เคียงกับหอยระยะตัวเต็มวัยซึ่งมีลักษณะดังนี้

1. โครงสร้างที่ปรากฏในระยะนี้จะมีเป็นคู่
2. มี trilobed หรือ digestive gland
3. มีกล้ามเนื้อ adductor 2 มัด
4. ส่วนของแมนเติลจะมี ซิเลียอยู่ที่ขอบ
5. ส่วนของเท้ามี 2 lobe มีซิเลียอยู่รอบ ๆ และมี adhesive structure (basal gland)
6. มีเหงือก 1 คู่

ส่วนของไซฟอน และ immature gonad ยังไม่เห็นชัดในช่วงนี้ ส่วน teeth ที่อยู่ที่ฝาทั้งสองข้างและ thread จะหายไปในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ basal gland เริ่มลดขนาดลงเมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ส่วนของ outer gill ยังไม่มีความจำเป็น จนกว่าหอยกาบน้ำจืดจะมีอายุถึง 2 ปี ซึ่งจะเป็นช่วงที่เหงือกมีความสำคัญมากต่อพวก Anodontinae เพื่อใช้ทำหน้าที่เป็น marsupia ให้โกลคิเดียเจริญอยู่ภายในนั้นในช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ บริเวณ hinge ที่ยาวเริ่มยกตัวสูงขึ้นและเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะจูวีไนล์

พฤติกรรมและการเจริญเติบโตของลูกหอยระยะวีไลเจอ เมื่อเริ่มออกจากซีสต์ส่วนของเท้าจะยาวและมีซิเลีย เท้าสามารถยื่นออกไปได้ยาวถึง 2 เท่าของเปลือกเมื่อยื่นเท้าออกไปปลายด้านหน้าที่มีซิเลียจะโบกพัดซิเลียจะหยุดโบกเมื่อเท้าไปสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมและหดเท้าอย่างรวดเร็วเพื่อให้ลำตัวถูกดึงไปข้างหน้าส่วนของฝาจะเปิดทำมุม 45 องศาในระหว่างที่มีการเคลื่อนที่แต่จะปิดอย่างรวดเร็วถ้ามีสัตว์อื่นมารบกวนหรือเมื่อมีการหมุนตัวลูกหอยจะทรงตัวอยู่โดยใช้เท้าและ adhesive foot

Wood (1974) ศึกษาการเจริญของโกลคิเดีย *A. cygnea* และเปรียบเทียบลักษณะโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด 3 สกุล คือ *Anodonta*, *Unio* และ *Margaritifera* พบว่าหอยกาบน้ำจืด *A. cygnea* จะมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นในปลายฤดูร้อน ไข่ที่ถูกผสมจะเจริญอยู่ในเหงือกชั้นนอกของหอยกาบน้ำจืดเพศเมีย ตัวอ่อนระยะแรกจะอยู่ในไข่ที่มีเยื่อหุ้มบาง ๆ ล้อมรอบ จนกระทั่งโกลคิเดียสมบูรณ์เต็มที่ ซึ่งใช้ระยะเวลาอย่างช้าที่สุดไม่เกินปลายเดือนตุลาคมแต่โกลคิเดียจะยังคงอยู่ในเหงือกชั้นนอกจนกระทั่งถึงเดือนพฤษภาคม โกลคิเดียจะถูกปล่อยออกมาจะเข้าสู่ระยะปรสิต โดยพบว่า thread, adductor muscle, sensory hair cell และ hook มีความสำคัญต่อการเข้าเกาะโฮสต์ นอกจากนี้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด 3 สกุล ได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเจริญ และ สัณฐานวิทยาของโกลคิเดียในสกุล *Anodonta*, *Unio* และ *Margaritifera*

	สกุล			
	Anodonta	*Unio*	*Margaritifera*	
ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ	ส.ค.	มี.ค.	ช่วงที่1 ก.ค.	ช่วงที่2 ส.ค.
โกลคิเดียออกจากแม่หอย	พ.ค.	ก.ค.	ส.ค.	มี.ค.
hook	มี	ไม่มี	ไม่มี	
thread	มี	มี	เริ่มลดรูปไปเมื่อเข้าสู่ระยะ premature	
ความยาวของโกลคิเดียวัดจาก hingeถึงปลายสุดทางด้าน ventral (ไมครอน)	360	200	50	

การศึกษาชนิดของปลาที่พบโกลคิเดีย

อรภาและคณะ (2530) รายงานว่า ไข่ของหอยกาบน้ำจืด *H. (Limnoscapha) myersiana* มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.14 มิลลิเมตร ไข่ที่ถูกผสมแล้วเจริญอยู่ใน marsupia เป็นเวลา 9-10 วัน ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นแม่หอยก็จะปล่อยโกลคิเดียที่มีขนาด 0.25 มิลลิเมตร เข้าไปอาศัยอยู่ในตัวปลา เป็นเวลา 12-14 วัน แล้วตกลงมาเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์อยู่ตามพื้นท้องน้ำ ส่วนโกลคิเดียที่ไม่ได้เกาะตัวปลา จะมีชีวิตอยู่ได้เพียง 2-3 วัน ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 26 องศาเซลเซียส

บุญช่วย และคณะ (2534) รายงานว่า โกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *C. hainesiana* และ *H. (Limnoscapha) myersiana* ที่เกาะตัวปลา พบเฉพาะเดือนธันวาคม และจะเกาะอยู่ที่บริเวณเหงือกมากกว่าอวัยวะอื่น ชนิดของปลาที่พบว่ามีโกลคิเดียเข้าไปอาศัยอยู่ได้แก่ ปลาสร้อยนกเขา (*Osteochilus hasselti*) , (*O. schlegeli*) และ ปลากระทุงเหว (*Xenentodon cancila*)

Tedla และ Fernando (1969) รายงานว่า โกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *Lampsilis radiata* เป็นปรสิตอยู่ในปลา *Perca flavescens* จะใช้เวลาในการเข้าเกาะและฝังตัวในเนื้อเยื่อของปลา 2-3 ชั่วโมง และอยู่ในตัวปลาจนกระทั่งหลุดออกจากตัวปลาเป็นเวลา 50 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

Meyers และ Millemann (1977) รายงานว่าโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *M. margaritifera* จะเข้าไปเกาะอยู่ที่ ปลา Coho salmon มากกว่า ปลา Chinook salmon

Fustish และ Millemann (1978) รายงานว่าโกลคิเดียของ *M. margaritifera* จะเกาะปลา *Oncorhynchus kisutch* มากกว่าปลา *O. tshawytscha* โกลคิเดียจะมีการพัฒนาและหลุดออกมาจากตัวปลา *O. kisutch* เริ่มตั้งแต่วันที่ 4.5 ในขณะที่ปลา *O. tshawytscha* โกลคิเดียยังคงฝังตัวต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 12 จึงเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์

Dudgeon และ Morton (1984) รายงานว่าในทะเลจีนใต้โกลคิเดียของ *A. woodiana* ชอบเกาะปลา *Gambusia affinis* และพบว่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการเปลี่ยนแปลงไป

เป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ถึง 14.4 วัน ในขณะที่ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสใช้เวลาเพียง 6 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โกลคิเดียไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ ในขณะที่เกาะฮ่องกงโกลคิเดียชนิดเดียวกันนี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ ก็ต่อเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสขึ้นไป

Kondo (1984) รายงานว่าจะพบหอยกาบน้ำจืด *Moncetia lavigeriana* เพศเมีย ที่มีไข่แก่อยู่ในช่วงเดือน สิงหาคม ถึง ต้นเดือนธันวาคม หอยกาบน้ำจืดเพศผู้และเพศเมียที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์ (mature) มีความยาวอย่างน้อย 22.7 และ 24.4 มิลลิเมตร ตามลำดับไข่ที่ถูกผสมแล้วจะเจริญเป็นโกลคิเดีย อยู่ที่เหงือกด้านใน (inner gill) จำนวนไข่ใน marsupia จะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดความยาวของเปลือก พบว่ามีอยู่ในช่วง 3,000-22,000 ฟอง โกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *M. lavigeriana* มีความยาวของเปลือกเท่ากับ 0.26 มิลลิเมตร มีสีขาว รูปร่างเป็นแบบ semi-elliptical ไม่มี hook อยู่บนฝา มี thread และพบว่าโกลคิเดียเกาะอยู่มาก ในปลา *Lobochilotes labiatus* และ ปลา *Lamprologus tretocephalus*

Bauer และ Vogel (1987) รายงานว่าความหนาแน่นของโกลคิเดีย *M. margaritifera* ที่เกาะตัวปลาจะขึ้นอยู่กับขนาดของตัวปลา โดยโกลคิเดียจะมักเกาะปลาที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากปลาที่มีขนาดใหญ่สามารถนำน้ำผ่านเหงือกได้มาก และมีพื้นที่ผิวของเหงือกที่สามารถสัมผัสกับโกลคิเดียได้มากกว่าปลาขนาดเล็ก

Waller และ Holland-Bartels (1988) รายงานว่าโกลคิเดียของ *L. higginsi (L.)* มีความจำเพาะเจาะจงในการเกาะโฮสต์สูงมาก และพบว่ามีโฮสต์ที่เหมาะสม 4 ชนิด ได้แก่ *Micropterus salmonides, M. dolomieui, Stizostedion vitreum vitreum* และ *Perca flavescens* นอกจากนี้ยังศึกษาการเกาะของโกลคิเดียของ *L higginsi (L.)* ในปลา *Cyprinus carpio* และ *Pimephalas promelas* พบว่าโกลคิเดียจะใช้เวลาเข้าเกาะตัวปลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและลูกหอยระยะจูวีไนล์จะพบมากที่สุดในวันที่ 18-24 ที่อุณหภูมิ 19-21 องศาเซลเซียส

Panha (1990) ศึกษาชนิดของหอยมุกน้ำจืด Amblemid ที่พบในจังหวัด นครสวรรค์ ลพบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี สระบุรี อยุธยา อ่างทอง และ ปทุมธานี พบว่ามีปลา 14 ชนิดที่เป็นโฮสต์ให้

แก่โกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด Amblemid โดยที่ปลาส่วนใหญ่อยู่ใน ครอบครัว Cyprinidae ได้แก่ ปลา *Puntius schwannenfeldi, P. gonionotus, Puntioplites proctozysron , Cirrhinus jullieni* และ *Rasbora heteromorpha* และครอบครัว Bagridae ได้แก่ปลา *Mystus nemurus* และ ปลา *M. vittatus*

Weaver และ คณะ (1991) รายงานว่า หอยกาบน้ำจืด *Pleurobema oviforme* จะมีไข่ที่ถูกผสมแล้วเจริญอยู่ที่เหงือกด้านนอก (outer gill) จนกระทั่งเป็นโกลคิเดียที่สมบูรณ์ ใช้เวลา 3-5 สัปดาห์ และเมื่อโกลคิเดียถูกปล่อยออกมาก็จะเข้าไปเกาะปลาใน สกุล *Cyprinid*

Panha (1992) ได้ศึกษาโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) myersiana* ที่เกาะในปลา 11 ชนิด พบว่าปลาที่ให้ผลผลิตลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงที่สุดคือ ปลาหมอช้างเหยียบ *(Pristolepis fasciatus)*

Yeager และ Saylor (1995) ทำการศึกษาชนิดของปลาที่เป็นโฮสต์ของหอยกาบน้ำจืด Unionid 4 ชนิด ได้แก่ *Epiblasma brevidens, E. capsaceformis, E. triquetra และQuadrula intermedia* พบว่าโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืดเหล่านี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อโฮสต์สูงมาก โดยปลาที่เป็นโฮสต์ของ *Epiblasma spp.* ได้แก่ ปลาในกลุ่ม Cottid, Banded sculpin และ Percids ส่วนปลาที่เป็นโฮสต์ของ Q. *intermedia* คือปลา *Erimystax dissimilis* และ ปลา *E. insignis*

Tompa (1979) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ของหอยกาบน้ำจืด *Lasmigona compressa* โดยใช้ปลา *Lebister reticulatus* เป็นโฮสต์ พบว่าโกลคิเดียที่ปล่อยออกมาจากแม่พันธุ์ จะมีขนาด 320 x 260 ไมครอน และมี hook 1 อัน ยาว 90 ไมครอนโกลคิเดียจะเข้าไปเกาะเฉพาะส่วนครีบของปลาโดยไม่พบในเหงือก ในระยะแรกพบว่าบริเวณที่โกลคิเดียเข้าไปเกาะตัวปลา มีเชื้อราเกิดขึ้น ภายใน 4-6 วัน โกลคิเดียจะหลุดออกมาและตายลง ดังนั้นจึงได้นำปลามาทำการกำจัดเชื้อราก่อน พบว่าโกลคิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ โดยใช้ระยะเวลา 10-12 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสในห้องปฏิบัติการ นำลูกหอยระยะจูวีไนล์ที่ได้มาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุน้ำ 50 มิลลิลิตร มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา และให้ไดอะตอม *Navicula pelliculosa* เป็นอาหารนาน 2 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญของส่วนเปลือกโดยมี growth line ปรากฏเห็นได้ชัดเจน และมีความกว้างเพิ่มขึ้นเป็น 46 ไมครอน

การเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์

Isom และ Hudson (1984 a) กล่าวว่าการพัฒนาของโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สามารถเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องใช้ปลาเป็นโฮสต์ แต่อาหารสังเคราะห์จะต้องมีส่วนผสมของพลาสมาปลาอยู่ด้วยโดยนำพลาสมาปลาที่นำมาจากปลาได้หลายชนิด มาทำการเลี้ยงโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด 1 ชนิด เช่น โกลคิเดียของ *Ligumia recta* สามารถเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ ในพลาสมาปลา Channel catfish และ Smallmouth buffo ส่วนโกลคิเดียของ *Pleurobema cordatum* ก็สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในอาหารที่มีส่วนผสมของพลาสมาปลาที่กล่าวมาได้เช่นเดียวกัน และยังสามารถใช้พลาสมาของปลา Flathead catfish และ Common carp ได้อีกด้วย ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นว่า พลาสมาปลามีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ และการเปลี่ยนแปลงนี้จะไม่เกิดขึ้นถ้าในอาหารสังเคราะห์ไม่มีส่วนผสมของพลาสมาปลา หรือใช้พลาสมาปลาเป็นอาหารอย่างเดียว หรือใช้ bovine serum, fetal bovine serum แทนที่พลาสมาปลาในอาหารสังเคราะห์

Isom และ Hudson (1984 b) ทำการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ของพลาสมาปลาที่ผสมลงในอาหารสังเคราะห์ พบว่าการใช้พลาสมาปลาผสมในอาหารสังเคราะห์ 20-80 เปอร์เซ็นต์ โกลคิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ โดยพบว่าพลาสมาปลา 80 เปอร์เซ็นต์ทำให้โกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์เกิดเร็วขึ้นและมากที่สุด ส่วนการใช้พลาสมาปลา 100, 10 และ 0 เปอร์เซ็นต์ โกลคิเดียไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ และจะตายภายในวันที่ 4 ของการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ อย่างไรก็ตามพบว่าถ้าเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์โดยมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่ดี การปนเปื้อน (contaminate) เกิดขึ้นน้อยมาก หรือไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นเลย สามารถใช้พลาสมาปลาเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ โกลคิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ดี เช่นเดียวกับการใช้พลาสมาปลา 80 เปอร์เซ็นต์

ต่อมาในปี 1990 Keller และ Zam ได้ทำการทดลองเลี้ยงโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *A. imbecilis* ในอาหารของ Isom and Hudson (ตารางที่ 2) โดยการเปรียบเทียบแหล่งโปรตีนและซีรัมต่างชนิดกัน ได้แก่ neonatal calf serum, horse serum, salmon liver, trout liver, fish plasma, rabbit pancreas และ casein ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในอาหารสูตร Isom and Hudson

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (,มิลลิกรัม./ลิตร)
Inorganic Salts	
$CaCl_2$	1200
$MgCl_2 .6H_2O$	1000
NaCl	1530
KCL	99
$NaHCO_3$	2200
Essential Amino Acids	
L-arginine	105
L-cystine	24
L-histidine	31
L-isoleucine	52
L-leucine	52
L-lysine	58
L-methionine	15
L- phenylalanine	32
L- threonine	48
L-tryptophane	10
L-tyrosine	36
L-valine	46
Nonessential Amino Acids	
L-alanine	8.9
L-asparagine	13.2
L- aspartic acid	13.3
glysine	7.5
L-glutamic acid	14.7

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
L-proline	11.5
L-serine	10.5
taurine	31.0
L-ornithine	10.0
Vitamins	
choline chlorine	1.0
folic acid	1.0
inosital	2.0
nicotinamide	1.0
calcium pantothenate	1.0
pyridoxal	1.0
riboflavin	0.1
thiamine	1.0
Other Compounds	
glucose	1000.0
phenol red, optional	10.0

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ในอาหารสูตร Isom and Hudson โดยมีแหล่งโปรตีน และซีรัม ที่แตกต่างกัน

Serum or protein sourse	Mean % (SD)
Neonatal calf serum	95.5[a] (1.9)
Horse serum	94.7[a] (4.0)
Salmon liver	91.5[a] (5.4)
Trout liver	83.0[ab] (13.8)
Fish plasma	81.8[b] (7.5)
Rabbit pancreas	67.5[b] (7.5)
Casein	0[c]
Stock medium without protein	0[c]

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันของแต่ละแถว แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จากตารางจะพบว่า neonatal calf serum ทำให้โกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้มากที่สุด คือ 95.5 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์เกิดขึ้นเลยเมื่อใช้ casein และ กลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการใส่แหล่งโปรตีน แต่จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ที่ใช้ neonatal calf serum, horse serum, salmon liver และ trout liver เป็นแหล่งโปรตีนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการใช้สารเคมีเพื่อเป็นบัฟเฟอร์ โดยใช้ $NaHCO_3$, MOPS และ HEPES เพื่อปรับ pH ของอาหารสังเคราะห์ ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ พร้อมทั้งศึกษาการเลี้ยงโกลคิเดียในตู้ควบคุม

อุณหภูมิ ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ไม่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ที่เลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบธรรมดา และใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน

Growth medium	Mean % transformation(SD)	
	CO_2 incubator	Ambient air
Fish plasma, $NaHCO_3$	86.8^{a} (6.4)	42.0^{de} (2.0)
Horse serum, $NaHCO_3$	76.0^{ab} (9.6)	35.7^{e} (8.5)
Neonatal calf, $NaHCO_3$	60.0^{bcd} (40.1)	8.5^{fg} (11.4)
Fish plasma, MOPS	78.5^{ab} (15.6)	74.1^{ab} (22.6)
Horse serum, MOPS	48.2^{cde} (8.7)	24.5^{ef} (12.8)
Neonatal calf, MOPS	76.7^{ab} (9.5)	0
Fish plasma, HEPES	73.2^{ab} (25.0)	75.7^{ab} (23.6)
Horse serum, HEPES	77.7^{ab} (14.1)	43.2^{cde} (20.7)
Neonatal calf, HEPES	68.7^{abc} (10.4)	0

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จากตารางผลการทดลองจะพบว่าอาหารสังเคราะห์ ที่ใช้ $NaHCO_3$ เป็นบัฟเฟอร์และใช้พลาสมาปลาเป็นแหล่งโปรตีน จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงที่สุด และการใช้ $NaHCO_3$ กับ Neonatal calf serum มีอัตราการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์น้อยที่สุด และการเลี้ยงโกลคิเดียในตู้ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีกว่าการไม่ให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และยังทำการทดลองเปรียบเทียบอาหาร (tissue culture media) 3 ชนิดได้แก่ M199, DMEM และIsom and Hudson พบว่า M199 และ DMEM

มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ไม่แตกต่างกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์มากกว่าอาหาร Isom and Hudson (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ที่เลี้ยงในอาหารของ Isom and Hudson เปรียบเทียบ กับ อาหาร M199, DMEM ที่มีส่วนผสมของซีรัมม้า

Medium	% transformation (SD)
DME	65.8[a] (16.7)
M199	65.4[a] (12.9)
Isom and Hudson	51.2[b] (11.6)

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันของแต่ละแถว แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

นอกจากนี้ยังพบว่าหอยกาบน้ำจืดแต่ละชนิดมีความต้องการโปรตีนแตกต่างกันไป ถ้าใช้แหล่งโปรตีนที่เหมาะสมจะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ดีและมากกว่าการใช้แหล่งโปรตีนที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้อัตราการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ลดลง

Hudson และ Isom (1984) ได้นำลูกหอยระยะจูวีไนล์ของหอยกาบน้ำจืด *A. imbecilis* ที่ประสบผลสำเร็จจากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในภาชนะหรือบีกเกอร์โดยใช้น้ำในทะเลสาบเลี้ยงและให้อาหาร ได้แก่ *Gonium*, *Navicula* และ *Stentor* เป็นต้น ผลปรากฏว่า ขนาดของลูกหอยที่เลี้ยงมีความยาวมากกว่า 5.1 มิลลิเมตร จากความยาวเริ่มต้น 0.28 มิลลิเมตร ในเวลา 74 วัน แสดงว่า หอยกาบน้ำจืดระยะจูวีไนล์มีความยาวเพิ่มขึ้นเป็น 18 เท่า และส่วนของพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น 110 เท่า ส่วนของอวัยวะภายในมีการเจริญมากขึ้น

ในปี ค.ศ.1987 Isom ได้รายงานความสำเร็จในการนำหอยกาบน้ำจืดระยะจูวีไนล์ที่ได้จากการเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์ มาอนุบาลต่อในห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำจากแม่น้ำมากรองด้วยผ้ากรองขนาด 5 ไมครอน ซึ่งน้ำที่ได้จากการกรองนี้จะมีแพลงก์ตอนพืชมากมายหลายชนิด ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งแพลงก์ตอนมีความหนาแน่นประมาณ 100,000 เซลล์ หรือมากกว่านี้ ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงไประยะหนึ่ง ถ้าพบว่าปริมาณอาหารลดลงจะทำการเปลี่ยนน้ำใหม่ ใช้เวลาในการเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ประมาณ 50-60 วัน ลูกหอยจะมีขนาด 3.0 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถนำไปเลี้ยงต่อในธรรมชาติได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis [Limnoscapha] desowitzi* เพศเมียที่มีโกลคิเดีย หนัก 99.88 กรัม ความยาว 90.00 มิลลิเมตร ความกว้าง 40.10 มิลลิเมตร ความสูง 51.00 มิลลิเมตร
2. ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) หนัก 0.5-1.0 กิโลกรัม
3. อาหาร M199
4. ซีรัมม้า
5. น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
6. อุปกรณ์ผ่าตัด เช่น คีมเปิดเปลือกหอย มีด กรรไกร และปากคีบ เป็นต้น
7. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ แท่งแก้ว และ ปิเปต เป็นต้น
8. เครื่องชั่งไฟฟ้า
9. กล้องจุลทรรศน์
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (low temperature incubator)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงภายใต้ความเย็น (refrigerated centrifuge)
12. เครื่องมือนับลูกหอย (hand counting number)
13. pH meter
14. Sterile filter
15. Sterile hood
16. จานเลี้ยงโกลคิเดีย (tissue culture dishes) ขนาด 60 x 15 มิลลิเมตร
17. กล่องพลาสติกสำหรับบรรจุจานเลี้ยงโกลคิเดีย พร้อมอุปกรณ์
18. กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.20 ไมครอน
19. เข็มฉีดยา เบอร์ 18 พร้อมหลอดฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร
20. ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Carbenicillin, Gentamycin sulfate และ Rifampin

21. ยากำจัดเชื้อรา ได้แก่ Amphotericin B
22. สารเคมีสำหรับปรับความเป็นกรดเป็นด่าง ได้แก่ $NaHCO_3$, NaOH และ HCl
23. Sodium heparin
24. ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อมทั้ง regulator
25. Flow meter
26. เวอร์เนียคาลิปเปอร์แบบดิจิตอล

วิธีการ

การเตรียมอาหารเลี้ยงโกลคิเคีย

1. การเตรียมพลาสมาปลานิล

1.1 นำปลานิลมาทำการชั่งน้ำหนัก เพื่อกะปริมาณเลือดที่จะดูดให้ได้ปริมาณที่เหมาะสม จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ปลาที่มีน้ำหนัก 0.5-1.0 กิโลกรัม สามารถดูดเลือดได้ 5-8 มิลลิลิตร และไม่ทำให้ปลาตาย

1.2 ทำความสะอาดตัวปลา และใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดบริเวณที่จะทำการเจาะเลือด ทำการเจาะเลือดปลาที่เส้นเลือด caudal vein บริเวณหาง ดังภาพที่ 4 และ 5 โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 และหลอดฉีดยาที่เคลือบด้วย Sodium heparin ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเลือดที่ได้ไปปั่นที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 1000 และ 3000 rpm อย่างละ 10 นาที

1.3 นำน้ำเลือดที่ได้ จากข้อ 1.2 มาใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 rpm อีก10 นาที แยกเอาส่วนของพลาสมาซึ่งมีสีเหลืองใส มากรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.20 ไมครอน ตามลำดับ พลาสมาที่ได้จะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการเลี้ยงโกลคิเคียต่อไป

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงโกลคิเคียแต่ละสูตร

อาหารแต่ละสูตรจะมีการเติมแหล่งโปรตีน (พลาสมาปลา หรือ ซีรัมม้า) ยาปฏิชีวนะ และยากำจัดเชื้อรา (ตารางที่6)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะ และยากำจัดเชื้อราที่ใช้ผสมในอาหารเลี้ยงโกลคิเคีย

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
Carbenicillin	100
Gentamycin sulfate	100
Rifampin	100
Amphotericin B	5

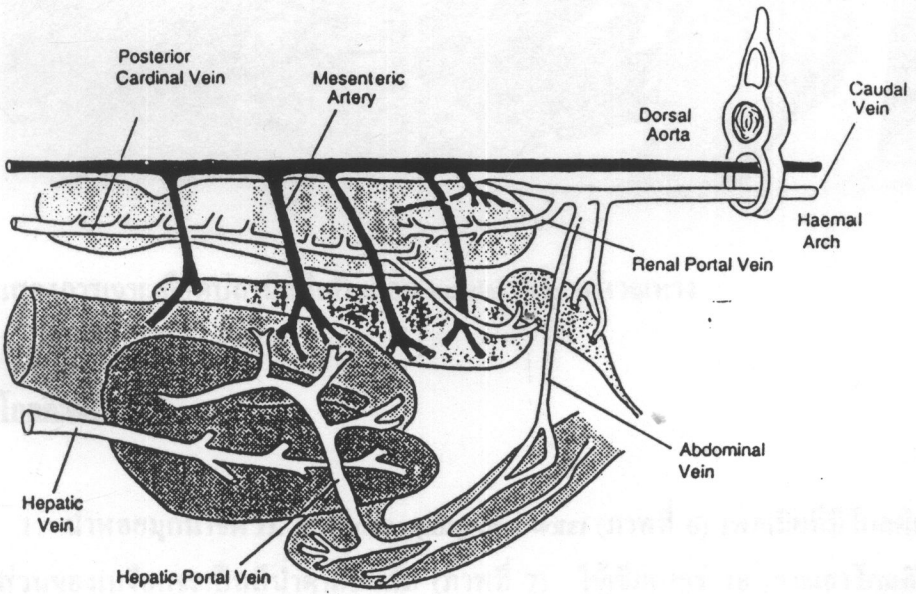
โดยอาหารแต่ละสูตรมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. อาหาร M199	2.0	มิลลิลิตร
2. เติมแหล่งโปรตีน	1.0	มิลลิลิตร
3. เติมยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อรา	0.5	มิลลิลิตร

เมื่อผสมสารในข้อ 1-3 เข้าด้วยกันแล้ว ทำการปรับ pH อยู่ในช่วง 7.3-7.6 ด้วย NaOH 1.25 M หรือ HCl 1 M ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโกลคิเคีย (Keller และ Zam,1990) อาหารที่เตรียมได้นี้จะมีปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ซึ่งใช้สำหรับเลี้ยงโกลคิเคีย 1 ซ้ำ ดังนั้นจะได้อาหารเลี้ยงโกลคิเคีย 2 สูตร ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 1 (M1) และ สูตรที่ 2 (M2)

ส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์	สูตรอาหาร (มล.)	
	M1	M2
อาหาร M199	2.0	2.0
ซีรัมม้า	1.0	-
พลาสมาปลานิล	-	1.0
ยาปฏิชีวนะและ ยากำจัดเชื้อรา	0.5	0.5



ภาพที่ 4 ตำแหน่งของเส้นเลือด caudal vein ของปลา

ที่มา : Jobling (1995)

ภาพที่ 5 แสดงการเจาะเลือดปลานิลที่เส้นเลือด caudal vein บริเวณหาง

การเตรียมโกลคิเดีย

1. นำหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* (ภาพที่ 6) เพศเมียที่มีโกลคิเดีย สังเกตได้โดยดูที่ส่วนของเหงือกจะเป็นสีน้ำตาลอมส้ม (ภาพที่ 7) ใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะเอาโกลคิเดียออกมาตรวจดูความแข็งแรง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยโกลคิเดียที่แข็งแรงจะมีการขยับฝาเปิดปิด เป็นระยะ ๆ เมื่อได้หอยมุกน้ำจืดที่มีโกลคิเดียที่แข็งแรงแล้ว นำหอยมุกน้ำจืดนั้นมาทำการเปิดฝาโดยการใช้มีดตัดกล้ามเนื้อ anterior adductor และกล้ามเนื้อ posterior adductor หลังจากนั้นใช้กรรไกรตัดเอาส่วนของเหงือกออกมา แล้วนำไปทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1 ซม.

ภาพที่ 6 ลักษณะของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*

2. ใช้มีดตัดบริเวณขอบของเหงือกทุกด้าน ใช้คีมกดเบา ๆ บริเวณขอบเหงือกด้านใดด้านหนึ่ง แล้วค่อย ๆดันให้โกลคิเดียออกมาจากเหงือก โกลคิเดียที่ได้นำมาใส่ในบีกเกอร์ ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นไว้แล้ว ทำการแกว่งบีกเกอร์เพื่อให้โกลคิเดียกระจายออกและตกลงที่พื้นบีกเกอร์ ทำการล้างโกลคิเดียให้สะอาดโดยการใช้หลอดหยดดูดน้ำแล้วพ่นน้ำให้ฟุ้งกระจายแล้วเปลี่ยนน้ำใหม่ ทำซ้ำกันหลายๆครั้ง จนกระทั่งน้ำในบีกเกอร์ใส โกลคิเดียที่แข็งแรง จะตกลงไปอยู่ที่พื้นบีกเกอร์ก่อน ในขณะที่เศษเนื้อเยื่อของเหงือก และเปลือกไข่ จะตกลงที่พื้นบีกเกอร์ทีหลัง

3. ใช้ปิเปตดูดโกลคิเดียที่แข็งแรงออกมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นจนสะอาดอีกครั้ง โดยสังเกตจากความใสของน้ำที่ล้างโกลคิเดียจะต้องให้ใสมากที่สุด

ภาพที่ 7 แสดง marsupia ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*

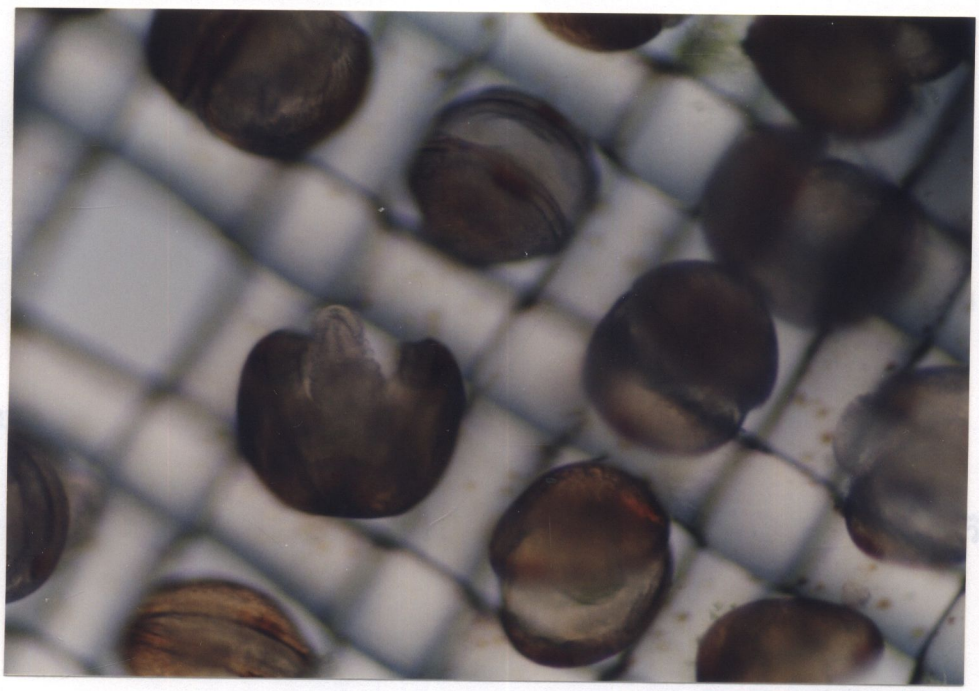
การเลี้ยงโกลคิเดีย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) อาหารที่ใช้เลี้ยงโกลคิเดียมี 2 สูตร (treatment) แต่ละสูตรทำการทดลอง 33 ซ้ำ (replication) โดยจะใช้ระยะเวลาในการทดลองเลี้ยงตั้งแต่ระยะโกลคิเดียจนกระทั่งเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้น พบว่าโกลคิเดียจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในวันที่ 10-11 ดังนั้นจานเลี้ยงโกลคิเดียที่ใส่อาหารแต่ละสูตรจึงต้องใช้ทั้งหมด สูตรอาหารละ 33 จาน

จานเลี้ยงโกลคิเดียแต่ละจานจะมีอาหารซึ่งประกอบด้วย M199 แหล่งโปรตีน ยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อรา บรรจุอยู่ จานละ 3.5 มิลลิลิตร มีขั้นตอนการเลี้ยงต่อไปนี้

1. สุ่มโกลคิเดียใส่ในจานเลี้ยงโกลคิเดีย จานละ 50-100 ตัว ภายใต้ sterile hood

2. นำจานเลี้ยงโกลคิเดียทั้งหมดใส่ในกล่องพลาสติกที่มีช่องสำหรับปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เข้าไป แล้วนำกล่องพลาสติกนี้ไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงจนกระทั่งโกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้เอง สังเกตเห็นส่วนเท้า (foot) ยื่นออกมาจากเปลือก (ภาพที่ 8) แล้วจึงทำการนับจำนวนโกลคิเดียที่ตายและโกลคิเดียที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ทั้งหมดทุกซ้ำ(ตารางผนวกที่ 3) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า



1 มม.

ภาพที่ 8 หอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะวูวีไนล์ อายุ 1 วัน

3. ในแต่ละวันจะทำการสุ่มจานเลี้ยงโกลคิเดียของอาหาร ทั้ง 2 สูตร สูตรละ 3 จาน นับจำนวนโกลคิเดียที่ตายและสังเกตว่ามีลูกหอยระยะวูวีไนล์เกิดขึ้นก่อนกำหนดหรือไม่ โดยจานเลี้ยงโกลคิเดียที่นับแล้วจะนำไปเลี้ยงไว้ที่เดิม ข้อมูลที่ได้นี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงลูกหอยระยะวูวีไนล์ต่อไปในอนาคต (ตารางผนวกที่ 1)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง มาทำการวิเคราะห์ โดยวิธี ANOVA (Analysis of variance)

สำหรับวิธีการเลี้ยงโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด ในสภาพปลอดเชื้อ แต่ละขั้นตอนพบว่ามีปัญหาค่อนข้างมาก เนื่องจากเอกสารที่มีอยู่จะบอกรายละเอียดของวิธีการน้อยมาก ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมซึ่งมีรายละเอียดดังภาคผนวก ข

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่

1. ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี

2. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย

ทำการวิจัยตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2539 ถึงเดือน มิถุนายน 2540 รวมระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

ผล

จากการทดลองนำโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* จากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี มาทำการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารทดลอง 2 สูตร ซึ่ง สูตรที่ 1 ประกอบด้วย M199 ซีรัมม้า และยาปฏิชีวนะ สูตรที่ 2 ประกอบด้วย M199 พลาสมาปลานิล และยาปฏิชีวนะ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 0.5 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียสและมีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายและเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ของอาหารทั้ง 2 สูตร ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*

อาหารสูตร	S (SD)	T (SD)
M1	96.60[a] (2.84)	89.64[a] (6.58)
M2	91.39[b] (7.63)	80.99[b] (12.84)

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันของแต่ละแถวในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

จากตารางที่ 8 พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของโกลคิเดียในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เท่ากับ 96.60, 91.39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เท่ากับ 89.64, 80.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อาหารสูตรที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงกว่าอาหารสูตรที่ 2 ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ของอาหารทั้งสองสูตรอยู่ในช่วง 10-11 วัน

วิจารณ์ผล

จากการทดลองเลี้ยงโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารทดลอง 2 สูตร ซึ่งมีความแตกต่างกันที่แหล่งโปรตีน คือ ซีรัมม้า และ พลาสมาปลานิล พบว่าโกลคิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ในอาหารทั้งสองสูตร แต่ในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีซีรัมม้าเป็นแหล่งโปรตีนจะมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงกว่า สูตรที่ 2 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Keller และ Zam (1990) ที่ได้ทดลองเปรียบเทียบแหล่งโปรตีนที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารของ Isom and Hudson โดยใช้เลี้ยงโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ผลที่ได้ปรากฏว่าการใช้ซีรัมม้าจะให้ผลผลิตลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงกว่าการใช้พลาสมาปลาและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งการเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารที่มีพลาสมาปลานิลเป็นแหล่งโปรตีน น่าจะได้ผลดีกว่าการใช้ซีรัมม้าเนื่องจากในธรรมชาติโกลคิเดียอาศัยอยู่ในตัวปลาและใช้แหล่งโปรตีนจากตัวปลา แต่จากการทดลองครั้งนี้ได้ผลตรงกันข้าม สาเหตุอาจเกิดมาจากพลาสมาปลานิลที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่เหมาะสมกับการพัฒนาการของโกลคิเดียหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ดังรายงานของ Yeager และ Saylor (1995) กล่าวว่า หอยกาบน้ำจืดบางชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อโฮสต์สูงมาก และการที่โกลคิเดียเกาะโฮสต์ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตลูกหอยระยะจูวีไนล์สูง และระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ก็เร็วขึ้นเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Fustish และ Millemann (1978) ที่พบว่าโกลคิเดียของ *Margaritifera margaritifera* ที่เกาะปลา *Oncorhynchus kisutch* จะใช้ระยะเวลาในการพัฒนาไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ 4.5 วัน ส่วนโกลคิเดียที่เกาะปลา *O. tshawytscha* ใช้ระยะเวลาในการพัฒนาไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ถึง 12 สัปดาห์

นอกจากนี้แล้วความแข็งแรงของโกลคิเดียก็เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงเช่นกันซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นได้นำโกลคิเดียที่มีความแข็งแรงน้อยกว่ามาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ทั้งสองสูตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในอาหารสูตร M1 และ M2 เท่ากับ 93.22, 87.27 และ 62.02, 56.16 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าโกลคิเดียดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ต่ำกว่าโกลคิเดียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ใน

อาหารทั้งสองสูตร และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ก็ใช้ระยะเวลานานกว่า คือ 12-13 วัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายและการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ในอาหารสูตร M1ก็ยังสูงกว่าอาหารสูตร M2 เช่นเดิม และระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์หมดก็ยังคงใช้เวลาเพียง 2 วัน เช่นกัน (ตารางผนวกที่ 2 และ 4)

นอกจากแหล่งของพลาสมาปลาที่เหมาะสมและความแข็งแรงของโกลคิเดียแล้วอุณหภูมิก็ยังมีส่วนทำให้การพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ เกิดขึ้นช้าหรือเร็วได้เช่นเดียวกัน จากรายงานของ Dudgeon และ Morton (1984) กล่าวว่า โกลคิเดียของ *A. woodiana* ที่เกาะปลา *Gambusia affinis* ใช้ระยะเวลา 14.4 วันในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่ใช้เวลาเพียง 6 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองครั้งนี้ ใช้อุณหภูมิในการทดลองเหมือนกับการทดลองของ Keller และ Zam (1990) คือ 23 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อราด้วย

นอกจากนี้การเลือกสารเคมีที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ในอาหารสังเคราะห์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์มากหรือน้อย ดังการทดลองของ Keller และ Zam (1990) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสารเคมีที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ ได้แก่ $NaHCO_3$, HEPES และ MOPS ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงโกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *A. imbicilis* พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ $NaHCO_3$ เป็นบัฟเฟอร์ มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ได้สูงที่สุด ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงใช้ $NaHCO_3$ เป็นบัฟเฟอร์ซึ่งก็ให้ผลดีเช่นเดียวกัน

การทดลองเลี้ยงโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารทดลอง 2 สูตรครั้งนี้ พบว่าลูกหอยระยะโกลคิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ ได้ในวันที่ 10-11 ของการเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์หมดใช้เวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 23 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในขณะที่การทดลองของอรภา และคณะ (2537) พบว่าการเพาะพันธุ์หอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* โดยใช้ปลานิลเป็นโฮสต์ ระยะเวลาที่โกลคิเดียเปลี่ยนแปลง

ไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ใช้เวลา 6-12 วัน ที่อุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 24.63 ± 4.58 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงเวลาค่อนข้างกว้าง ส่วนผลการทดลองครั้งนี้พบว่าใช้เวลาอยู่ในช่วงสั้นเพียงแค่ 2 วันโกลคิเดียก็สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ได้หมด จะเห็นได้ว่าโกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ในเวลาที่ใกล้เคียงกันมากกว่าการเลี้ยงแบบที่ใช้ปลาเป็นโฮสต์ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ และนอกเหนือจากการได้ลูกหอยระยะวูวีไนล์ที่ไม่มีการปนเปื้อนแล้วยังสามารถกำหนดเวลาในการรวบรวมลูกหอยระยะวูวีไนล์ได้ ซึ่งสะดวกในการจัดการสำหรับการอนุบาลลูกหอยมุกน้ำจืดต่อไป

สรุป

การทดลองเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารทดลอง 2 สูตร สูตรที่ 1 ประกอบด้วย M199 ซีรัมม้า และยาปฏิชีวนะ สูตรที่ 2 ประกอบด้วย M199 พลาสมาปลานิล และยาปฏิชีวนะ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 0.5 เลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส และให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ สรุปผลได้ดังนี้

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ คือ อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีซีรัมม้าเป็นแหล่งโปรตีน มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงถึง 89.64 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีพลาสมาปลานิลเป็นแหล่งโปรตีน มีค่าเท่ากับ 80.99 เปอร์เซ็นต์

2. เปอร์เซ็นต์การรอดตายของโกลคิเดีย *H. ((Limnoscapha) desowitzi* ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 มีค่าสูงกว่าสูตรที่ 2 โดยคิดเป็น 96.60 และ 91.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3. ระยะเวลาที่โกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ในอาหารทั้งสองสูตรเท่ากัน คืออยู่ในช่วง 10-11 วัน

4. สามารถประยุกต์ใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำแบบธรรมดาให้เป็นอุปกรณ์ที่ใช้งานได้มากยิ่งขึ้น และผลการทดลองที่ได้ก็ไม่แตกต่างจากการใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์

ข้อเสนอแนะ

การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานโดยมีจุดประสงค์ที่จะนำโกลคิเดียที่สมบูรณ์แล้วมาทำการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพื่อให้โกลคิเดียเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์ซึ่งสามารถทำการทดลองได้สำเร็จ แต่เนื่องจากว่ายังมีปัจจัยอื่นๆ ที่น่าสนใจทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อที่จะได้ใช้เป็นข้อมูลในการประกอบการเลี้ยงหอยกาบน้ำจืด และการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดอย่างครบวงจรได้ดียิ่งขึ้น โดยปัจจัยเหล่านี้ได้แก่

1. คัดเลือกโกลคิเดียที่มีความแข็งแรงก่อนนำไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อที่จะได้ผลผลิตลูกหอยระยะซูวีไนล์จำนวนมาก และอาจจะทำให้ระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์สั้นลง

2. แหล่งโปรตีน เช่นการศึกษาในเรื่องของพลาสมาปลาที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์ ซึ่งจากการศึกษาชนิดของโฮสต์พบว่าถ้าโฮสต์มีความเหมาะสมต่อโกลคิเดียมากเท่าใด เปอร์เซ็นต์การรอดตาย และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์จะสูงขึ้น นอกจากนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์อาจจะใช้ระยะเวลาสั้นลงด้วย ดังนั้นถ้านำพลาสมาปลาที่เหมาะสมต่อโกลคิเดียมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนจะทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตของลูกหอยระยะซูวีไนล์ได้มากขึ้น

3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* เพื่อลดเวลาในการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะซูวีไนล์

4. ความหนาแน่นของโกลคิเดียที่จะเหมาะสมต่อปริมาณอาหาร เพื่อที่จะได้ใช้อาหารเลี้ยงโกลคิเดียคุ้มค่ามากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

ชนิษฎา ณ. นคร. 2522. การทำฟาร์มหอยมุก. เอกสารรายงานวิชาการ. กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง, กรุงเทพฯ. 113 น.

บุญช่วย ชาวปากน้ำ, เกษมชาติ ธูปบูชา และ อรภา นาคจินดา. 2534. การศึกษาชีววิทยาและสภาพแวดล้อมบางประการของหอยมุกน้ำจืดในแม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี. ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 24 น.

วันทนา อยู่สุข. 2526. ลักษณะทั่วไปและการกรองอาหารในหอยสองฝา. รายงานสัมนาเชิงปฏิบัติการเลี้ยงหอย, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 51 น.

อรภา นาคจินดา. 2529. การศึกษาค้านอนุกรมวิธานและรูปร่างลักษณะของหอยกาบน้ำจืดจากจังหวัดขอนแก่น, น. 29-35. *ใน* รายงานประจำปี 2529. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาญจนบุรี กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

_____. 2532. ไข่มุก. วารสารกรมประมง 4 (42) : 311-315.

อรภา นาคจินดา, นาฎยา พิศพิจิต และ วิจิตรา อินทร์เกลี้ยง. 2529. การศึกษาชีวประวัติบางประการของหอยมุกน้ำจืดในจังหวัดกาญจนบุรี, น. 17-28. *ใน* รายงานประจำปี 2529. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาญจนบุรี กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา และ เกรียงไกร สหัสสานนท์. 2530. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์และวงจรชีวิตของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856), น. 311-333. *ใน* รายงานประจำปี 2530. สถานีประมงน้ำจืด จังหวัดกาญจนบุรี กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา, เกรียงไกร สหัสสานนท์ และ นาฏยา พิศพิจิต. 2532. การศึกษาเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงไข่มุกจากหอยกาบน้ำจืด 2 ชนิด, น. 395-454. *ใน* รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 27. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา, สุวีณา บานเย็น และ เกรียงไกร สหัสสานนท์. 2531. การพัฒนาการและฤดูกาลวางเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบน้ำจืด *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) บริเวณแม่น้ำแม่กลองใต้เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, น. 24-44. *ใน* รายงานประจำปี 2531. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาญจนบุรี กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา, วชิระ กิติมศักดิ์ และ เสน่หา ขุนชัย. 2537. การเพาะพันธุ์หอยมุกน้ำจืด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2537. กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 27 น.

อัมพร อึ้งปรณ์แก้ว. 2535. อัลตราสตรัคเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียมหอยกาบน้ำจืดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Bauer, G. and C. Vogel. 1987. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel. Arch. Hydrobiol. 76 (4) : 393-402.

Binhe, G. 1984. Freshwater Pearl Culture. Fourth Training Course for Senior Aquaculture in Asia and Pacific Region, Tigbauan Phillippines, October 14, 1984. 20 p.

Borcherding, J. 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. Oecologia 87 : 208-218.

Brandt, R.A.M. 1974. The Non - Marine Aquatic Mollusca of Thailand. Archiv fur Molluskenkunde 105 : 1-463.

D' Eliscu, P.N. 1972. Observation of the glochidium, metamorphosis and juvenile of *Anodonta californiensis* (Lea, 1857). The Veliger 15 (11) : 57-58.

Dudgeon, D. and B. Morton. 1984. Site selection and attachment duration of *Anodonta woodiana* (Bivalvia : Unionacea) glochidia on fish hosts. J. Zool. Lond. 204 : 355-362.

Fustish, C.A. and R.E. Millemann. 1978. Glochidiosis of salmonid fishes. II comparision of tissue response of coho and chinook salmon to experimental infection with *Margaritifera margaritifera* (L.) (Pelecypoda : Margaritanidae). J. Parasit. 64 (1) : 155-157.

Hick, C.P. and L.S. Roberts. 1995. Animal Diversity. Wm. C. Communications, Inc., The United State of America. 392 p.

Hudson, R.G. and B. G. Isom. 1984. Rearing juveniles of the freshwater mussels (Unionidae) in a laboratory setting. The Nautilus 98 (4) : 129-135.

Isom, B. G. 1987. Systems culture of freshwater shellfish (Bivalves), pp. 197-208. *In* Proceeding, world Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, vol.1. Bordeaux, France, May 27-30, 1986.

Isom, B.G. and R.G. Hudson. 1982. *In vitro* culture of parasitic freshwater mussel glochidia. The Nautilus 96 (4) : 147-151.

Isom, B.G. and R.G. Hudson. 1984 a. Freshwater mussels and their fish hosts; physiological aspects. J. Parasit. 70 (2) : 318-319.

_____ 1984 b. Culture of freshwater mussel glochidia in an artificial habitat utilizing complex liquid growth media. U.S. patent. 4,449,480. 18 p.

Jobling, M. 1995. Enviromental Biology of Fishes. T.J. Press(Padstow) Ltd., Padstow, Cornwall, Great Britain. 445 p.

Keller, A.E. and S.G. Zam. 1990. Simplification of *in vitro* culture techniques for freshwater mussels. Environ. toxicol. and Chem. 9 : 1291-1296.

Kondo, T. 1984. Hosts of the larvae of *Moncetia lavigeriana* (Bivalvia : Mutelidae) in Lake Tanganyika. Venus 43 (4) : 347-352.

Meyers, T.R. and R.E. Millemann. 1977. Glochidiosis of salmonid fishes. I comparative susceptibility to experimental infection with *Margaritifera margaritifera* (L.) (Pelecypoda : Margaritanidae). J. Parasit. 63 (4) : 728-733.

Panha, S. 1990. The site survey and the study on reproductive cycles of freshwater pearl mussel in the central part of Thailand. Venus 49 (3) : 240-257.

_____. 1992. Infection experiment of the glochidium of a freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). Venus 51 (4) : 303-314.

Tedla, S. and C.H. Fernando. 1969. Observations on the glochidia of *Lampsilis radiata* (Gmelin) infesting yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill) in the Bay of Quinte, Lake Ontario. Can. J. Zool. 47 : 705-712.

Tompa, A.S. 1979. Life-cycle completion of the freshwater clam *Lasmigona compressa* (Bivalvia : Unionidae) in an experimental host, *Lebistes reticulatus*. The Veliger 22 (2) : 188-190.

Waller, D.L. and L.E. Holland-Bartels. 1988. Fish hosts for glochidia of the endangered freshwater mussel *Lampsilis higginsi* Lea (Bivalvia : Unionidae). Malacol. Rev. 21 : 119-122.

Weaver, L.B.,G.B. Pardue and R.J. Neves. 1991. Reproductive biology and fish hosts of Tennessee Clubshell *Pleurobema oviforme* (Mollusca : Unionidae) in Virginia. Am. Mild. Nat. 126 : 82-89.

Wiles, M. 1975. The glochidia of certain Unionidae (Mollusca) in Nova Scotia and their fish hosts. Can. J. Zool. 53 : 33-41.

Wood, E.M. 1974. Development and morphology of the glochidium larva of *Anodonta cygnea* (Mollusca ; Bivalvia). J. Zool. Lond. 173 : 1-13.

Yeager, B. and C.F. Saylor. 1995. Fish hosts for four species of freshwater mussels (Pelecypoda : Unionidae) in the upper Tennessee River Drainage. Am. Mild. Nat. 133 : 1-6.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยการรอดตาย (S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ที่สุ่มนับในแต่ละวันของแม่หอยที่ทำการทดลอง

วันที่	อาหาร M1 (เปอร์เซ็นต์)		อาหาร M2 (เปอร์เซ็นต์)	
	S	T	S	T
0	100.00	0	100.00	0
1	97.99	0	98.34	0
2	96.66	0	92.06	0
3	98.77	0	90.90	0
4	95.73	0	89.66	0
5	96.60	0	92.45	0
6	93.93	0	94.56	0
7	96.05	0	95.03	0
8	97.99	0	98.34	0
9	96.65	0	80.06	0
10	98.80	82.34	91.93	72.66
11	95.29	95.28	86.38	76.54

ตารางผนวกที่ 2 เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยการรอดตาย (S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ที่สุ่มนับในแต่ละวัน ของแม่หอยที่ทำการทดลองเบื้องต้น

วันที่	อาหาร M1 (เปอร์เซ็นต์)		อาหาร M2 (เปอร์เซ็นต์)	
	S	T	S	T
0	100.00	0	100.00	0
1	90.52	0	49.17	0
2	93.91	0	82.00	0
3	93.05	0	70.58	0
4	92.88	0	48.09	0
5	95.17	0	67.65	0
6	95.31	0	64.24	0
7	92.12	0	67.57	0
8	90.52	0	49.17	0
9	93.91	0	65.33	0
10	93.05	0	60.01	0
11	92.88	0	48.09	0
12	95.17	89.38	67.65	63.79
13	94.55	91.29	64.26	54.60

ตารางผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (S)และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ (T) ที่เลี้ยงในอาหาร M1 และ M2 ของแม่หอยที่ทำการทดลอง

ซ้ำที่	อาหาร M1 (เปอร์เซ็นต์)		อาหาร M2 (เปอร์เซ็นต์)	
	S	T	S	T
1	95.83	87.50	97.87	91.49
2	98.15	94.44	97.14	91.43
3	100.00	88.37	100.00	83.33
4	100.00	91.30	90.91	90.00
5	98.08	94.23	96.00	95.83
6	91.89	83.78	90.91	90.00
7	96.30	92.59	76.92	66.67
8	100.00	83.33	84.48	81.82
9	100.00	71.11	97.22	78.37
10	94.44	94.44	87.50	81.25
11	93.33	93.33	100.00	70.58
12	98.08	98.08	81.48	77.78
13	94.55	87.27	87.10	32.26
14	96.94	92.31	95.00	90.00
15	98.33	85.00	95.24	90.48
16	95.45	95.65	93.55	77.42
17	91.23	91.94	96.00	94.00
18	95.12	93.02	94.12	64.71
19	98.72	79.75	94.12	88.20
20	92.23	92.45	97.96	89.76
21	93.18	84.09	93.02	93.02

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ซ้ำที่	อาหาร M1 (เปอร์เซ็นต์)		อาหาร M2 (เปอร์เซ็นต์)	
	S	T	S	T
22	95.83	91.67	97.87	91.49
23	98.15	94.44	97.14	91.49
24	100.00	83.37	100.00	84.38
25	100.00	91.30	72.28	72.28
26	98.04	96.15	72.00	72.00
27	91.88	89.19	90.01	90.01
28	96.33	92.59	80.00	57.78
29	100.00	83.33	98.48	81.82
30	100.00	71.11	97.30	78.38
31	94.44	94.44	81.25	81.25
32	93.34	93.34	85.29	70.59
33	98.08	98.08	92.59	77.78

ตารางผนวกที่ 4 เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (S) และการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ (T) ในอาหาร M1และ M2 ของแม่หอยที่ทำการทดลองเบื้องต้น

ซ้ำที่	อาหาร M1 (เปอร์เซ็นต์)		อาหาร M2 (เปอร์เซ็นต์)	
	S	T	S	T
1	92.45	79.25	60.94	53.13
2	93.83	87.65	55.06	47.19
3	85.29	80.88	31.52	20.65
4	95.95	72.09	93.91	93.91
5	95.20	75.96	92.00	92.00
6	91.18	91.18	63.00	51.85
7	89.62	83.02	92.08	92.08
8	93.44	91.80	62.03	50.63
9	96.08	90.20	57.63	50.85
10	89.29	83.33	58.72	55.05
11	93.33	93.33	57.73	51.49
12	96.00	94.00	31.82	22.73
13	96.77	90.32	63.93	59.02
14	93.75	82.81	69.70	69.69
15	95.00	95.00	69.33	62.67
16	91.81	91.81	77.10	77.10
17	97.33	97.33	68.75	65.63
18	96.77	90.32	46.87	31.25
19	97.33	91.80	67.74	67.74
20	86.61	86.61	69.00	69.00
21	92.42	89.39	65.96	65.96

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ซ้ำที่	อาหาร M1(เปอร์เซ็นต์)		อาหาร M2 (เปอร์เซ็นต์)	
	S	T	S	T
22	92.45	79.25	60.94	53.13
23	93.83	87.65	55.06	47.19
24	85.29	80.88	31.52	20.65
25	95.35	72.09	60.98	60.98
26	95.20	75.96	72.00	72.00
27	91.78	91.18	63.00	51.85
28	88.89	83.02	63.37	63.37
29	93.44	91.80	62.03	50.63
30	96.08	90.20	54.63	50.85
31	89.29	83.33	58.72	55.05
32	92.86	93.33	53.73	51.49
33	93.62	94.00	31.82	22.73
34	96.77	90.32	63.93	62.29
35	93.75	82.81	69.70	66.67
36	95.00	95.00	69.33	56.00
37	96.72	90.16	69.33	56.00
38	95.00	95.00	60.94	45.31
39	91.94	88.70	62.50	62.50

ภาคผนวก ข

การพัฒนาวิธีการทดลอง

ในการแก้ไขปัญหาและพัฒนาวิธีการทดลอง ซึ่งได้ใช้ระยะเวลานานพอสมควรกว่าจะได้วิธีการดังกล่าวมา เริ่มตั้งแต่การเตรียมอาหารสังเคราะห์ วิธีการดูดเลือดปลา การตรวจสอบแม่พันธุ์ที่มีโกลคิเดียที่แข็งแรงและพร้อมที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ การนำเอาโกลคิเดียออกจากเหงือก การสุ่มนับจำนวนโกลคิเดีย และที่สำคัญคือการพัฒนาตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำแบบธรรมดา (low temperature incubator) มาใช้แทนตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 - incubator) ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

<u>การเตรียมอาหารสังเคราะห์</u>

การเตรียมอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีส่วนผสมของ M199 : แหล่งโปรตีน : ยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อรา ในอัตราส่วน 2 : 1 : 0.5 จะพบว่าถ้าแหล่งโปรตีนที่ใช้เป็นซีรัมม้าสามารถใช้แบบที่มีขายสำเร็จรูปได้เลย ในขณะที่พลาสมาปลานิลจะต้องทำการเตรียมเอง ซึ่งวิธีการเตรียมพลาสมาปลาของ Isom และ Hudson (1984 b) จะทำการเจาะเลือดปลาจากหัวใจ แล้วเอาเฉพาะส่วนของพลาสมามาใช้ โดยพลาสมาที่ได้นี้จะมีการเติมยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อรา ในอัตราส่วนของยาต่อพลาสมาปลา ดังตารางที่ 6 หลังจากนั้นจึงจะนำเอาพลาสมาปลาที่ได้นี้มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนผสมในอาหารสังเคราะห์ แต่ในการทดลองครั้งนี้พลาสมาปลานิลที่เตรียมได้จะไม่ใส่ยาปฏิชีวนะลงไป ทั้งนี้เนื่องจากในการทดลองเบื้องต้นได้มีการเติมยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อราในพลาสมาปลานิลเช่นเดียวกัน แล้วจึงนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสังเคราะห์ ผลปรากฏว่าโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้เลย และเปอร์เซ็นต์การตายจะเริ่มมีมากตั้งแต่วันที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 81.94, 82.08 และ 99.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และโกลคิเดียจะตายหมดในวันที่ 5 ของการทดลอง ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองใหม่โดยการเตรียมพลาสมาปลานิลที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ และยากำจัดเชื้อรา แล้วนำ
มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสังเคราะห์ ผลปรากฏว่าโกลคิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูง

วิธีการดูดเลือดปลา

ตำแหน่งที่ทำการเจาะเลือดปลา เนื่องจากการเจาะเลือดปลาจากหัวใจทำให้ได้เลือดปลาในปริมาณน้อยและทำให้ปลาตาย มีผลให้ต้องใช้ปลาเป็นจำนวนมากตามไปด้วย ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการเจาะเลือดปลาที่เส้นเลือด caudal vein บริเวณหางแทนโดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดบริเวณที่จะเจาะเลือด ซึ่งการเจาะเลือดที่เส้นเลือด caudal vein จะทำให้ได้เลือดในปริมาณมาก พบว่าการดูดเลือดปลานิลที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 0.5-1.0 กิโลกรัมต่อตัวสามารถเจาะเลือดได้ 5-8 มิลลิลิตร โดยปริมาณเลือดขึ้นอยู่กับขนาดของตัวปลาและโอกาสที่ปลาจะตายก็มีน้อย

วิธีการเตรียมโกลดิเดีย

การเตรียมโกลดิเดียเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษานานพอสมควรเพื่อที่จะให้ได้โกลดิเดียที่สมบูรณ์ (mature) และแข็งแรงมาทำการทดลอง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ทำความสะอาดแม่พันธุ์ หอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* ที่จะนำมาทำการตรวจสอบโกลดิเดีย โดยการล้างดินโคลนที่ติดอยู่ที่เปลือกออกให้หมด

2. การคัดเลือกแม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืด ใช้คีมเปิดฝาแม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืด แล้วสังเกตดูที่ส่วนของเหงือกจะต้องมีสีน้ำตาลอมส้ม ถ้ามีสีเหลืองอ่อน หรือเหลืองเข้ม แสดงว่าโกลดิเดียยังไม่สมบูรณ์ (immature) ถ้านำมาทดลองโกลดิเดียจะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ได้เลย และถ้าเหงือกมีสีน้ำตาลอมส้มแต่มีอยู่เพียงบางส่วนบนแผ่นเหงือก แสดงว่าโกลดิเดียถูกปล่อยออกไปบ้างแล้ว ก็ไม่ควรนำมาทำการทดลองเพราะมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่จะนำมาคัดเลือกเพื่อทำการเลี้ยง และมักจะเป็นโกลดิเดียที่ไม่ค่อยแข็งแรงและมีการพัฒนาการช้า

3. การตรวจสอบความสมบูรณ์ของโกลดิเดีย เมื่อได้แม่พันธุ์ที่ต้องการแล้ว นำโกลดิเดียออกมาทดสอบ activity ถ้าโกลดิเดียมีการขยับฝาเปิด ปิด อยู่เป็นระยะ ๆ แสดงว่าโกลดิเดียแข็งแรงสมบูรณ์ดี แต่ถ้าพบว่าโกลดิเดียยังอยู่ในเปลือกแสดงว่าโกลดิเดียยังไม่สมบูรณ์เต็มที่ หรือถ้าโกลดิเดียปิดฝาสนิทและมีเศษเนื้อเยื่อปนอยู่มาก แสดงว่าโกลดิเดียไม่แข็งแรงและมีการตายของโกลดิเดียบางตัว โกลดิเดียแบบนี้จะใช้ไม่ได้ ต้องคัดเลือกแม่หอยตัวใหม่ ซึ่งในการทดลองระยะแรกได้นำโกลดิเดียที่ยัง

ไม่สมบูรณ์ซึ่งจะเป็นโกลคิเดียที่ยังอยู่ในเปลือกมาทำการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์พบว่าโกลคิเดียระยะนี้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ได้ อาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงมีสารอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโกลคิเดียระยะนี้ ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบโกลคิเดียโดยไม่ต้องฆ่าแม่พันธุ์ โดยการใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 เจาะเข้าไปในเหงือกของแม่พันธุ์ที่มีโกลคิเดียดูดเอาโกลคิเดียออกมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่าโกลคิเดียใช้ได้ จึงค่อยทำการตัดเหงือกออกมา ซึ่งวิธีการนี้จะเป็นการช่วยอนุรักษ์แม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืดเอาไว้ได้ดียิ่งขึ้น

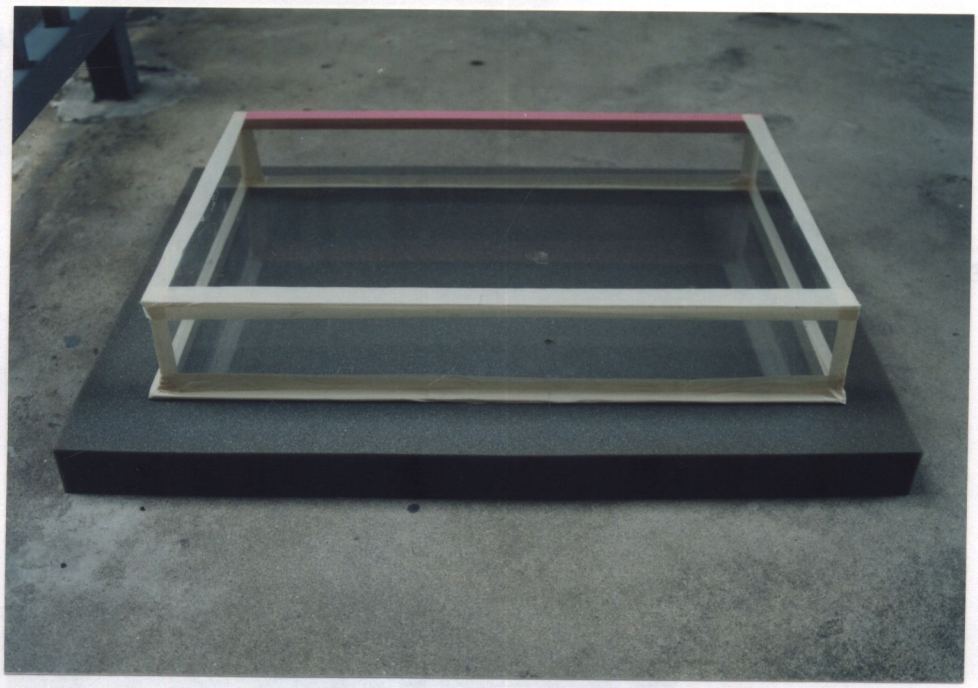
4. <u>การขนย้ายแม่พันธุ์</u> การทดลองครั้งนี้จะต้องนำแม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืดจากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี มาทำการทดลองที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการในการขนส่งแม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืด โดยนำแม่พันธุ์หอยมุกน้ำจืดมาห่อด้วยผ้าที่ชุบน้ำให้ชุ่ม ใส่ไว้ในกล่องโฟมแล้วใส่น้ำแข็งไว้พอให้มีความเย็นเล็กน้อย (26- 28 องศาเซลเซียส) แม่พันธุ์สามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานหลายวันโดยไม่มีการปล่อยโกลคิเดียออกมาในระหว่างนี้เลย จากการทดลองพบว่าแม่พันธุ์ที่ถูกขนย้ายมาถึงห้องปฏิบัติการ ภายในระยะเวลา 5 ชั่วโมงโกลคิเดียยังคงแข็งแรงอยู่แต่หลังจาก 5 ชั่วโมงไปแล้ว พบว่าโกลคิเดียจะเริ่มมีการตายมากขึ้น ส่วนวิธีการขนย้ายแม่พันธุ์โดยการใส่ในถังที่มีน้ำและให้ออกซิเจน พบว่าแม่พันธุ์จะมีการปล่อยโกลคิเดียออกมาระหว่างทาง

5. <u>การทำความสะอาดโกลคิเดีย</u> เนื่องจากโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *H. (Limnoscapha) desowitzi* เมื่อถูกนำออกมาจากเหงือกจะมีเมือกปนอยู่มากทำให้โกลคิเดียเกาะกันเป็นกลุ่ม ต้องทำการล้างทำความสะอาด โดยการใช้หลอดหยดดูดน้ำแล้วพ่นให้น้ำในบีกเกอร์ที่มีโกลคิเดียบรรจุอยู่ฟุ้งกระจายเพื่อที่จะให้โกลคิเดียแยกออกจากกัน และต้องมีการเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อกำจัดพวกเศษเนื้อเยื่อของเหงือก เมือก และเปลือกของโกลคิเดียที่ปนมา ซึ่งต้องใช้เวลาในการทำความสะอาดอยู่นานพอสมควร ดังนั้นการทำความสะอาดจึงต้องทำอย่างระมัดระวัง เพราะถ้าทำการพ่นน้ำแรงมากเกินไปแรงดันน้ำที่เกิดขึ้นจะทำให้เปลือกของโกลคิเดียแตกและตายได้ โกลคิเดียที่ทำความสะอาดแล้วจะมี activity เห็นได้ชัด ไม่ควรปล่อยให้โกลคิเดียอยู่ในน้ำนาน ๆ ควรรีบทำการสุ่มเลี้ยงต่อไป เนื่องจากถ้ามีเมือกปนอยู่ในน้ำถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเล็กน้อยแต่เมื่อวางบีกเกอร์ทิ้งไว้จะเกิดการตกตะกอนและรวมตัวกัน เมื่อทำการสุ่มจะทำให้โกลคิเดียไปเกาะอยู่กับกลุ่มเมือกนั้นได้ นอกจากนี้ส่วน thread ของโกลคิเดีย อาจจะพันกันได้อีกด้วย

การพัฒนาอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

การเลี้ยงโกลคิเดียในสภาพปลอดเชื้อจะต้องทำการเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (Keller และ Zam, 1990) แต่การทดลองครั้งนี้จะมีการประยุกต์ใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำแบบธรรมดา (low temperature incubator) เพื่อใช้ในการทดลองเลี้ยงโกลคิเดียในสภาพที่ต้องมีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ประกอบกล่องพลาสติก ที่มีฝาปิด มีการเจาะรูที่ด้านข้างของกล่องทั้งสองด้าน โดยกล่องพลาสติกจะมีขนาดความกว้าง ความยาว และความสูงตามขนาดของชั้นภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำแบบธรรมดาที่มีอยู่ ดังภาพผนวกที่ 1



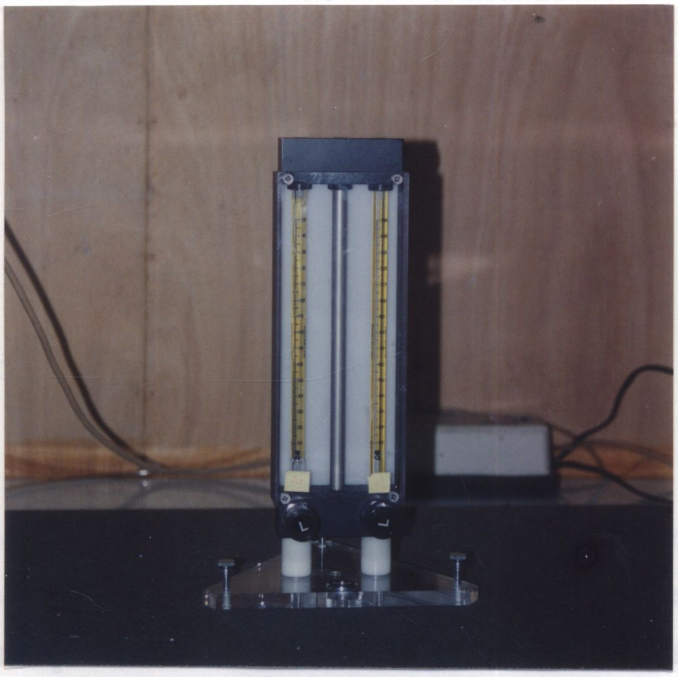
ภาพผนวกที่ 1 กล่องพลาสติกสำหรับใส่จานเลี้ยงโกลคิเดีย ซึ่งมีการเจาะรูทั้งสองข้าง

2. ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อม regulator (ภาพผนวกที่ 2)

ภาพผนวกที่ 2 ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อม regulator

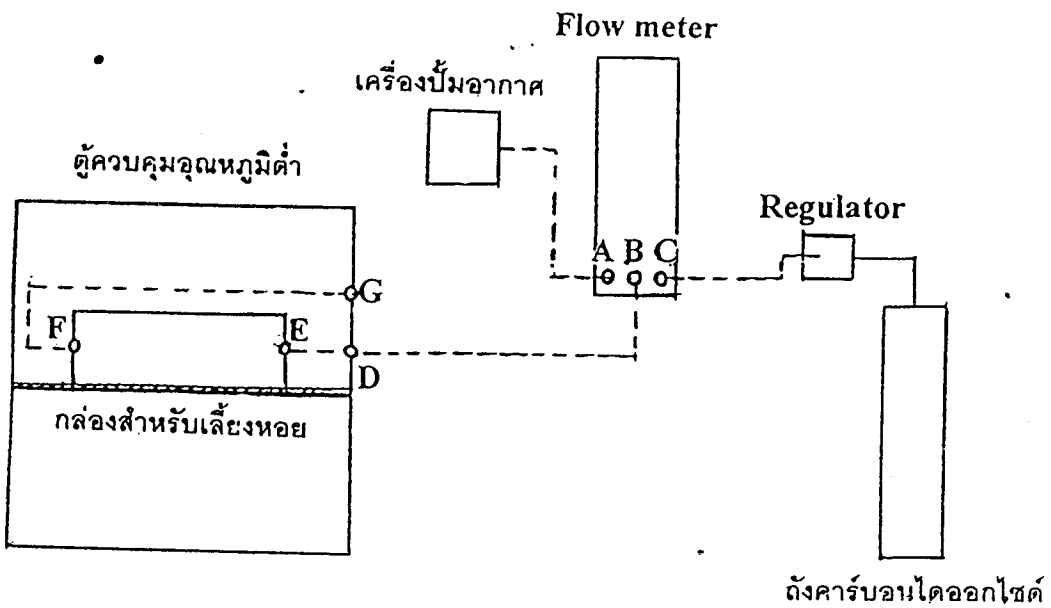
3. เครื่องปั๊มอากาศ

4. Flow meter ที่ใช้ควบคุมปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพผนวกที่ 3)



ภาพผนวกที่ 3 แสดง Flow meter สำหรับปรับปริมาตรแก๊ส

5. นำอุปกรณ์จากข้อ 4.1-4.4 มาประกอบดังภาพผนวกที่ 4



<u>ภาพผนวกที่ 4</u> แผนภาพแสดงการประกอบอุปกรณ์ในการทดลอง

เครื่องหมาย ---- = ท่อลม

A = ช่องสำหรับอากาศเข้า

B = ช่องรวมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์กับอากาศ

C = ช่องสำหรับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้า

D = ช่องสำหรับท่อลมเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ

E และ F = รูด้านข้างของกล่องพลาสติก

G = ช่องสำหรับท่อลมออกจากตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ

ขั้นตอนการประกอบอุปกรณ์

1. นำท่อลมด้านหนึ่งมาต่อกับ regulator ซึ่งติดกับถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปลายอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับเครื่อง Flow meter (C) ปรับปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ให้ได้ 5 เปอร์เซ็นต์

2. นำท่อลมอีกเส้นหนึ่งมาต่อกับเครื่องปั๊มอากาศ (aerator) ที่ใช้สำหรับเลี้ยงปลา แล้วนำปลายอีกด้านหนึ่งมาต่อเข้ากับเครื่อง Flow meter (A) ปรับให้ปริมาตรอากาศอยู่ที่ 95 เปอร์เซ็นต์

3. นำท่อลมอีกเส้นต่อเข้าที่ช่องสำหรับปล่อยอากาศออก (B) ซึ่งช่องนี้จะมีอากาศที่มีส่วนผสมของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ นำปลายท่อลมอีกด้านหนึ่งผ่านเข้าไปในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (D) แล้วต่อท่อลมเข้าไปในรูด้านข้างของกล่องพลาสติก (E) ส่วนรูอีกด้านหนึ่ง (F) นำท่อลมอีกเส้นมาต่อเข้า เพื่อนำอากาศออกจากกล่องพลาสติกแล้วนำส่วนปลายของท่อลมนี้ผ่านออกมานอกตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (G) นำจานเลี้ยงโกลดิเดียไปวางไว้ในกล่องแล้วปิดฝากล่องให้สนิทด้วยกระดาษกาวอีกครั้งหนึ่ง

ผลจากการทดลองพบว่า โกลดิเดียสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นลูกหอยระยะวูวีไนล์ได้เช่นเดียวกับการใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2- incubator) ซึ่งการประยุกต์ใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำแบบธรรมดา แล้วนำมาใช้ได้ในการทดลองนี้ นับว่าเป็นการช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายที่จะต้องไปซื้อตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบมีคาร์บอนไดออกไซด์ใหม่ซึ่งมีราคาแพงประมาณ 4 เท่า และยังเป็นการใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วได้อย่างคุ้มค่าและเกิดประโยชน์สูงสุด