บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

งานวิจัยทำการทดลองโดยแบ่งออกเป็น 2 ตอนคือ

การวิจัยและทดลองในห้องปฏิบัติการ

ไบร์นชริมในสภาพธรรมชาติตัวอ่อนจะอาศัยอยู่หนาแน่น 1 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 83 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Helfrich และคณะ 1973) แต่ในการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ Teramoto (1961) เลี้ยงตัวอ่อน 1 ตัวต่อน้ำ 1.6 ลูกบาศก์เซนติเมตร Sorgeloos (1973) สรุปว่า การเลี้ยงตัวอ่อนของไบร์นชริมในห้องปฏิบัติการ 1 ตัวต่อน้ำ 10 - 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นการเลี้ยงในความหนาแน่นน้อย ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ใช้ไบร์นชริมในความหนาแน่น 1 ตัวต่อน้ำ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร

การทดลองเริ่มโดยการฟักไข่ของไบร์นชริมสายพันธ์คาลิฟอร์เนีย (California Strain) ในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 32 ppt โดยใส่ไข่ไบร์นชริมลงไปในโหลกลมขนาด 5000 มิลลิลิตร ให้อากาศอย่างแรงด้วยเครื่องให้อากาศ (Air pump) ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไข่จะฟักออกเป็นตัว แยกตัวอ่อนออกจากไข่โดยอาศัยลักษณะการเคลื่อนที่เข้าหาแสง (Possitive phototactic) ของตัวอ่อนด้วยการปิดเครื่องให้อากาศ แล้วใช้แสงไฟจากโคมไฟขนาด 40 วัตต์ ล่อให้ตัวอ่อนว่ายมาเล่นแสงไฟเป็นกลุ่ม ทิ้งไว้ประมาณ 5 - 10 นาที แยกตัวอ่อนด้วยวิธีกาลักน้ำ (Siphon) โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร กรองแยกตัวอ่อนออกจากน้ำด้วยผ้ากรองขนาด 100 ไมครอน นำตัวอ่อนที่ได้ใส่ในโหลกลมขนาด 2000 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเค็ม 32 ppt แยกตัวอ่อนอีกครั้งหนึ่งด้วยวิธีเดียวกัน นำตัวอ่อนที่ได้มาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน เพื่อทำการทดลองดังนี้คือ

ส่วนที่ 1 ใช้ความเค็ม 32 ppt เป็นความเค็มปรกติ (Control) เพื่อศึกษาว่า ความเค็มจะมีผลต่อการเจริญเติบโตโดยการเพิ่มขนาดความยาวหรือไม่ และความเค็มมีผลต่อการรอดตายอย่างไร โดยการนำเอาไบร์นชริมไปเลี้ยงในโหลกลม ซึ่งตั้งอยู่บนชั้นไม้ที่มีขนาดความกว้าง 0.5 เมตร ยาว 2 เมตร สูง 1.25 เมตร บรรจุน้ำ 2000 มิลลิลิตร ที่มีความเค็ม 20 ppt 32 ppt 40 ppt และ 50 ppt ตามลำดับ จำนวน 16 ใบ โดยแยกออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 4 ใบ ใส่ตัวอ่อนของไบร์นชริม ลงไปโหลละ 40 ตัว ให้สาหร่ายเซลเดียว (Chaetoceros calcitrans) เป็นอาหารจนมากเกินพอ สุ่มไบร์นชริมออกมาโหลละ 10 ตัว แบบไม่มีการแทนที่ (Without replacement) เพื่อวัดขนาดตั้งแต่เริ่มการทดลองด้วยสแตนดาร์ด **ไมโครมิเตอร์** (Standard micrometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้หลอดดูดปากยาว (Dropper) ดูดไบร์นชริมขึ้นมาวางบนสไลด์ (Slide) ดูดน้ำให้เหลือน้อยที่สุด เพื่อไม่ให้ไบร์นชริมเคลื่อนไหวได้อย่างสดวก ทำการวัดขนาดทุกวัน จนกระทั่งไบร์นชริมโต เป็นตัวเต็มวัยเกินกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนที่รอดตาย เก็บข้อมูลความยาว และนับจำนวนที่รอดตายเพื่อวิเคราะห์ผล

ส่วนที่ 2 เพื่อศึกษาอัตราส่วนเพศของตัวเต็มวัยของไบร์นชริม และศึกษาลักษณะการวางไข่เมื่อกระตุ้นด้วยความเค็มต่าง ๆ รวมถึงเปอร์เซนต์การฟักตัวของไข่ที่ได้จากการกระตุ้นโดยการเลี้ยงตัวอ่อนของไบร์นชริมในอ่างแก้วสี่เหลี่ยมขนาดกว้าง 25 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร สูง 25 เซนติเมตร บรรจุน้ำที่มีความเค็ม 32 ppt จำนวน 15000 มิลลิลิตร จำนวน 2 อ่าง ให้อาหารจนมากเกินพอ จนกระทั่งโตเป็นตัวเต็มวัย ทำการแยกเพศโดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของหนวดคู่ที่ 2 ซึ่งเพศผู้จะมีการขยายใหญ่ออก และส่วนปลายจะโค้งงอเข้าหากันเพื่อใช้เป็นอวัยวะในการจับตัวเมียในเวลาผสมพันธุ์ นับจำนวนแต่ละเพศแล้วแยกทดลองดังต่อไปนี้

2.1 นำเอาไบร์นชริมตัวเต็มวัยที่เริ่มมีไข่จำนวน 40 ตัว เพศผู้และเพศเมียอย่างละเท่า ๆ กันมาเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 1000 มิลลิลิตร ใส่น้ำที่มีความเค็ม 32ppt จำนวน 300 มิลลิลิตร เติมน้ำที่มีความเค็ม 100 ppt ลงไปทุกวัน วันละ 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งไบร์นชริมวางไข่ ศึกษาแบบของการวางไข่

2.2 ใช้ไบร์นชริมที่เลี้ยงไว้จนกระทั่งมีไข่แก่แล้วจำนวน 100 คู่ นำมาทดลองผลของการกระตุ้นด้วยความเค็มที่มีผลต่อการวางไข่ดังนี้คือ

2.2.1 กระตุ้นด้วยความเค็ม 55 ppt เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วยความเค็ม 90 ppt โดยใช้ไบร์นชริมที่มีไข่แก่จำนวน 20 คู่ ใส่ใน Beaker ขนาด 30 มิลลิลิตร ใส่น้ำ 25 มิลลิลิตร Beaker ละ 1 คู่ จนกระทั่งไบร์นชริมออกไข่ นับจำนวนไข่ที่ได้

2.2.2 ใช้ไบร์นชริมจำนวน 20 คู่ กระตุ้นด้วยความเค็ม 90 ppt อย่างทันทีทันใดใน Beaker ขนาด 30 มิลลิลิตร ใส่น้ำ 25 มิลลิลิตร Beaker ละ 1 คู่ นับจำนวนไข่ที่ได้เปรียบเทียบผลการทดลองกับ 2.2.1

2.2.3 ดำเนินการทดลองโดยวิธีเดียวกัน ด้วยการกระตุ้นไบร์นชริมที่มีไข่แก่จำนวน 20 คู่ ด้วยความเค็ม 70 ppt เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วยความเค็ม 100 ppt เปรียบเทียบจำนวนไข่ที่ได้กับไข่ของไบร์นชริมอีก 20 คู่ที่กระตุ้นด้วยความเค็ม 100 ppt อย่างทันทีทันใด

2.2.4 เลี้ยงไบร์นชริมที่มีไข่แก่จำนวน 20 คู่ ในน้ำที่มีความเค็ม 32 ppt เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Control) ปรกติ

2.2.5 นำไข่ที่รวบรวมได้มาทดลองฟักเพื่อศึกษาเปอร์เซนต์การฟักออกเป็นตัว

<u>การศึกษาในนาเกลือ</u>

เพื่อศึกษาถึงชนิดของแพลงตอนที่พบในนาเกลือ และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในนาเกลือ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ตลอดจนความเร็วและทิศทางลม โดยใช้นาเกลือตัวอย่างในการศึกษา ใช้นาเกลือ หมู่ที่ 3 ตำบลโคกขาม

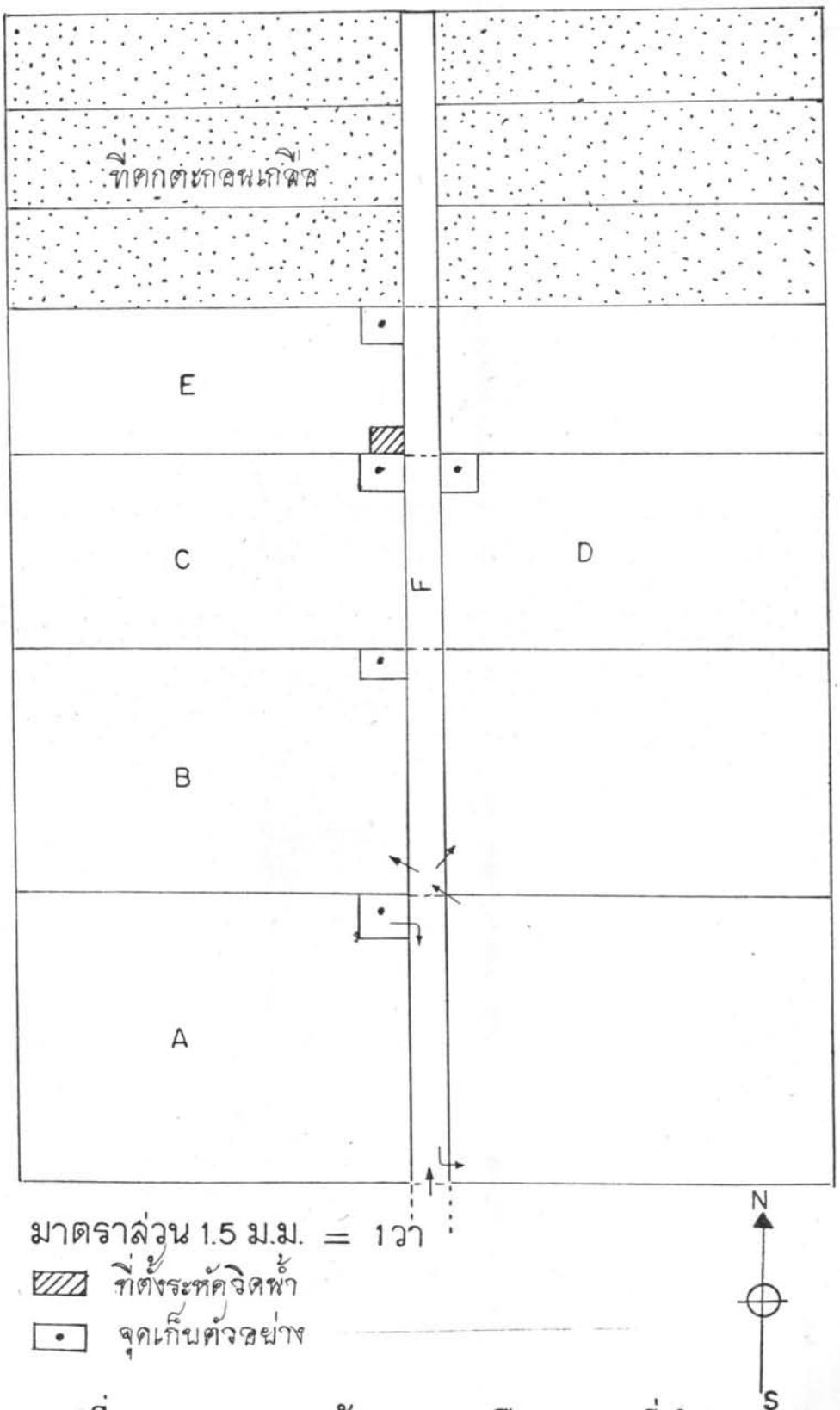
อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเป็นของ นายยอด แสสกุล มีพื้นที่ในในการทำนาเกลือ จำนวน 25 ไร่ ในการทำนาเกลือ น้ำที่ใช้นำมากักไว้ครั้งแรก เป็นน้ำที่ได้จากการทำนากุ้ง ซึ่งอยู่บริเวณตอนล่างซึ่งติดกับคลองซอย ที่รับน้ำจากทะเล

ตัวอย่างแพลงตอนเก็บตามจุดที่กำหนดในภาพ (ภาพที่ 10) ซึ่งแปลง ก. จะเป็นแปลงที่เริ่มรับน้ำมาจากนากุ้ง นำเข้ามาเก็บทิ้งไว้ให้ระเหยจนมีความเค็มสูง แล้วปล่อยน้ำเข้าแปลงต่อไปโดยผ่านทางคูเล็กข้าง(F) จนกระทั่งถึงตอนบนของแปลง น้ำจะมีความเค็มสูงประมาณ 250 ppt จะตกตะกอนเป็นเกลือ ทำการเก็บตัวอย่าง 30 วัน โดยเก็บ 3 วันต่อครั้งตามจุดที่กำหนด ด้วยการใช้ถุงลากแพลงตอนที่มีขนาดตา 200 ไมครอน ซึ่งดัดแปลงคล้ายสวิงจับปลา ลากเป็นระยะทางประมาณ 10 เมตร เก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ด้วยฟอร์มาลิน 5 เปอร์เซนต์ นำตัวอย่างที่ได้มาแยกชนิดในห้องปฏิบัติการด้วยกล้องจุลทรรศน์

ทำการวัดอุณหภูมิของน้ำในนาเกลือทุกวัน วันละ 2 ครั้ง ในเวลา 09.30 น. และ 14.00 น. ด้วยเทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) วัดความเค็ม ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ปริมาณออกซิเจน ทิศทาง และความเร็วลม ทุกวันด้วย Salinometer, Water checker และ Anemometer ตามลำดับ

<u>การเตรียมน้ำทะเลให้มีความเข้มข้นสูงและการเตรียมอาหารสำหรับไบร์นชริม</u>

ในการเตรียมน้ำทะเลที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมด ในห้องปฏิบัติการ ใช้น้ำทะเลซึ่งนำมาจากบริเวณเกาะลอย อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี เก็บไว้ในบ่อพัก ที่แผนกวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วจึงนำไปเตรียมให้มีความเค็มสูงขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองตามวิธีของ Teinsongrusmee (1965) โดยใส่น้ำทะเลในอ่างแก้วสี่เหลี่ยมขนาดความจุ 3200 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิของน้ำให้ได้สูงถึง 45 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermostat)วัดความเค็มด้วย Salinometer จนกระทั่งน้ำมีความเค็มถึง 100 ppt แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับความเค็มของน้ำให้ได้ตามความต้องการโดยการเติมน้ำกลั่นที่คำนวณได้จากสูตร



รูปที่ 10 แสดงแผนผังของนาเกลือและจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

$S_1V_1 = S_2V_2$

S_1 = ความเค็มของน้ำทะเลที่จะใช้เตรียม

V_1 = ปริมาตรของน้ำทะเลที่จะใช้เตรียม

S_2 = ความเค็มของน้ำที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของน้ำที่ต้องการ

การเพาะเลี้ยงไดอะตอมเพื่อใช้เป็นอาหารของไบร์นชริม ใช้ Chaetoceros calcitrans โดยทำการเพาะในโหลกลมที่มีขนาดความจุ 15,000 มิลลิลิตร ใส่ในตู้ไม้รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้าง 60 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร ใช้หลอดฟลูออเรสเซนเป็นตัวให้แสง ในการวิจัยนี้ใช้สูตรอาหารเลี้ยงไดอะตอมตามแบบของ Miquel-Allen-Nelsen's Solution ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ

Solution A

Potassium nitrate (KNO_3)	20.2 กรัม
Distilled Water	100 มิลลิลิตร

Solution B

Sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	4 กรัม
Calcium chloride ($CaCI_2 \cdot 6H_2O$)	4 กรัม
Ferric chloride (MELTED)	2 มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (PURE,CONC)	2 มิลลิลิตร
Distilled Water	80 มิลลิลิตร

ในการเตรียมสารละลาย B ต้องระวังมิให้เกิดการตกตะกอนของสารที่ใช้ ในการเตรียมสารละลายB ต้องละลาย Sodium phosphate ในน้ำ 40 มิลลิลิตร เติม

Hydrochloric acid 2 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Ferric chloride 4 กรัม ในน้ำ 40 มิลลิลิตร แล้วจึงนำเอาสารละลายทั้งสองมาทำการผสมกันอย่างช้า ๆ เขย่าให้เข้ากัน ในการนำเอาสารละลายไปใช้ใส่สารละลาย A 2 มิลลิลิตร สารละลาย B 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำทะเล 1000 มิลลิลิตร ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น กรองเอาตะกอนออก นำส่วนที่ใสไปใช้เลี้ยงไดอะตอมได้

<u>สถิติที่ใช้ในการวิจัย</u>

การวิเคราะห์ผลการศึกษาอัตราส่วนเพศ ใช้การวิเคราะห์ไคสแควร์ (Chi - square) โดยตั้งข้อสมมุติฐานว่าในประชากรที่ทำการศึกษาจะมีจำนวนเพศผู้เท่ากับเพศเมีย หรือมีเป็นจำนวนอัตราส่วนที่เท่ากัน คือ 1:1 หรือเขียนเป็นสัญญาลักษณ์คือ

H_0 = F = M F:M = 1:1

H_1 = F + M F:M + 1:1

โดยคำนวณค่า ไคสแควร์ ได้จากสูตร คือ

เมื่อ $\chi^2 = \frac{(O - E)^2}{E}$

O = จำนวนของค่าที่ได้จากการสังเกตุ

E = จำนวนของค่าที่คาดว่าจะเป็นตามสมมุติฐาน