บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกพื้นที่ชุ่มน้ำที่มีความสำคัญระดับนานาชาติ 2 แห่ง ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.1 พื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์

ลักษณะภูมิประเทศเป็นหนองน้ำขนาดใหญ่ บริเวณโดยรอบมีพื้นที่ชุ่มน้ำ 5 ประเภทคือ บึง ที่ลุ่มชื้นแฉะ บริเวณเกาะ บริเวณป่าพรุและป่าละเมาะ และบริเวณทุ่งนา พืชน้ำที่พบในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ต้นกก บัวหลวง บัวสาย บัวบา ผักตบชวา แพงพวยน้ำ จอกหูหนู แหน ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด สาหร่ายหางกระรอก สาหร่ายข้าวเหนียว บริเวณที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ห่างไกลจากชุมชน มีบางพื้นที่ที่ถูกรบกวนโดยการกระทำของมนุษย์ในการใช้ประโยชน์บริเวณพื้นที่รอบบึง การทำเกษตรกรรม และจากการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติของแหล่งน้ำ เกิดสภาพตื้นเขินจากการสะสมตะกอน สภาพนิเวศโดยรวมของบึงเกิดการเปลี่ยนแปลงไปบ้างแต่ยังคงความอุดมสมบูรณ์ (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2546)

1.2 พื้นที่ชุ่มน้ำบึงโขงหลง จังหวัดหนองคาย

ลักษณะภูมิประเทศเป็นบึงน้ำขนาดใหญ่ เนื้อที่ของตัวบึงขึ้นอยู่กับฤดูกาล ในฤดูฝนระดับน้ำเอ่อล้นทำให้ตัวบึงมีเนื้อที่เพิ่มขึ้น ส่วนในฤดูแล้ง มีปริมาณน้ำน้อย ทำให้ตัวบึงมีเนื้อที่ลดลง พืชน้ำที่พบในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กกเหลี่ยม กกกลม แห้วทรงกระเทียม บัวหลวง บัวสาย บัวบา แพงพวยน้ำ จอกหูหนู ผักบุ้ง ผักแว่น สาหร่ายหางกระรอก สาหร่ายข้าวเหนียว สาหร่ายไฟ ตาลปัตรฤาษี ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง บริเวณที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ห่างไกลจากชุมชน มีการใช้ประโยชน์บริเวณพื้นที่รอบบึงโดยมนุษย์ทำการเกษตรกรรม สภาพนิเวศโดยรวมค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2545)

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอด

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดจากบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ (ภาพที่ 6 และภาพที่ 7) และบึงโขงหลง จังหวัดหนองคาย (ภาพที่ 8 และภาพที่ 9) โดยใช้วิธีการสุ่มแบบอาศัยท้องที่ทางภูมิศาสตร์เป็นหลัก (area sampling) แบ่งออกเป็น 5 สถานี ได้แก่ ทิศเหนือ ทิศใต้ ทิศตะวันออก ทิศตะวันตก และกลางบึง ในการกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างใน 3 ฤดูกาล เป็นระยะเวลา 2 ปี (เริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2545 ถึงเมษายน พ.ศ. 2547) รวม 6 ครั้งๆ ละ 5 สถานีต่อแหล่งน้ำ เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนชนิดในเชิงคุณภาพ (qualitative) โดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 30 และ 60 ไมโครเมตร และเชิงปริมาณ (quantitative) โดยใช้เครื่องมือ Schindler Plankton trap มีความจุ 5 ลิตร เก็บที่ระดับความลึกของน้ำ 1 เมตร จำนวน 4 ครั้ง ได้ตัวอย่างน้ำ 20 ลิตร กรองน้ำผ่านถุงลากแพลงก์ตอน เก็บรักษาตัวอย่างด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน (formalin) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งตรวจวัดค่าทางกายภาพและเคมีของน้ำบางประการในทุกสถานีเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช (pH) การนำไฟฟ้า (conductivity) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) และความเค็ม โดยใช้เครื่องมือวัดคุณภาพน้ำยี่ห้อ HORIBA รุ่น U-10 และวัดความลึกของแหล่งน้ำในทุกสถานีเก็บตัวอย่าง

2.2 การวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 วิธีการจำแนกชนิดโรติเฟอร์

2.2.1.1 ใช้หลอดหยดดูดตัวอย่างโรติเฟอร์ที่ก้นขวดเก็บตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในจานหลุมแก้ว (chamber) เติมน้ำกลั่นให้เจือจางตัวอย่างจากนั้นใช้เข็มเขี่ย ๆ ให้ตะกอนตัวอย่างกระจาย นำไปตรวจจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 100 เท่า เพื่อคัดแยกตัวอย่างโรติเฟอร์ที่ต้องการจำแนกชนิด

2.2.1.2 หยดกลีเซอรีน 1-2 หยด ลงบนสไลด์ จากนั้นใช้คาปิลลารีปิเปตดูดตัวอย่างโรติเฟอร์ที่อยู่ในจานหลุมแก้วใส่ลงบนสไลด์ที่มีกลีเซอรีนอยู่ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า โดยเทียบลักษณะของตัวอย่างกับเอกสารประกอบการจำแนกชนิด ระบุชนิดโรติเฟอร์ และบันทึกผล

2.2.1.3 ตรวจตัวอย่างโรติเฟอร์ที่เหลืออยู่ในจานหลุมแก้วทั้งหมด นำตัวอย่างที่ตรวจแล้ว เทลงในขวดแก้วที่มีฝาปิด

2.2.1.4 ตรวจตัวอย่างโรติเฟอร์ที่เหลือจนครบทั้งขวดตามขั้นตอนข้อ 2.2.1.1-2.2.1.2 จากนั้นเทตัวอย่างจากขวดแก้วในข้อ 2.2.1.3 ลงในขวดเก็บตัวอย่างตามเดิม เติมน้ำยาฟอร์มาลินลงในขวดตัวอย่างอีกเพื่อให้ตัวอย่างถูกเก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เช่นเดิม

2.2.1.5 สำหรับโรติเฟอร์สกุลที่ต้องใช้โทรฟีในการจำแนกชนิดต้องทำการย่อยเนื่อเยื่อ ตามขั้นตอนดังนี้

(1) นำโรติเฟอร์ที่ต้องการย่อยเนื้อเยื่อใส่ลงในสไลด์ที่มีหยดกลีเซอรีนอยู่ จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

(2) หยดโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ที่บริเวณขอบของกระจกปิดสไลด์ทางด้านซ้ายมือ ใช้กระดาษชำระค่อย ๆ ซับที่ขอบของกระจกปิดสไลด์ทางด้านขวามือ

(3) รอจนโซเดียมไฮโปคลอไรท์ย่อยเนื้อเยื่อโรติเฟอร์หมดคงเหลือแต่โทรฟี

(4) หยดน้ำกลั่นเพื่อล้างโทรฟี ทำตามขั้นตอนเดียวกับข้อ (2)

(5) หยดกลีเซอรีนที่ขอบด้านใดด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์เพื่อเก็บรักษาโทรฟีเป็นสไลด์ถาวร

(6) นำตัวอย่างโทรฟีไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า โดยเทียบลักษณะของโทรฟีกับเอกสารประกอบการจำแนกชนิด

2.2.1.6 นำสไลด์ที่มีตัวอย่างโรติเฟอร์ที่ระบุชนิดได้ และตัวอย่างอยู่ในสภาพที่ดีมาผนึกขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วย DePeX เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างในรูปของสไลด์ถาวร

2.2.1.7 ถ่ายภาพตัวอย่างโรติเฟอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX51) ที่ต่อเข้ากับอุปกรณ์สำหรับย้ายภาพลงคอมพิวเตอร์ได้

2.2.1.8 วาดภาพลายเส้นตัวอย่างโรติเฟอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีกำลังขยายสูงสุดติดกับอุปกรณ์สำหรับวาดภาพ (camera lucida)

2.2.2. วิธีการจำแนกชนิดคลาโดเซอรา

2.2.2.1 ใช้หลอดหยดดูดตัวอย่างคลาโดเซอราที่ก้นขวดเก็บตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในจานหลุมแก้ว เติมน้ำกลั่นให้เจือจางแล้วใช้เข็มเขี่ยๆ ให้ตะกอนตัวอย่างกระจาย จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายต่ำ เพื่อคัดแยกตัวอย่างคลาโดเซอราที่ต้องการจำแนกชนิด

2.2.2.2 หยดกลีเซอรีน 1-2 หยด ลงบนสไลด์ จากนั้นใช้คาปิลลารีปิเปตหรือหลอดหยดดูดตัวอย่างคลาโดเซอราที่อยู่ในจานหลุมแก้วใส่ลงบนสไลด์ที่มีกลีเซอรีนอยู่ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่รองด้วยดินน้ำมันที่มุมทั้ง 4 มุม เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเสียรูปทรง จากนั้นนำไปตรวจจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า โดยเทียบลักษณะของตัวอย่างกับเอกสารประกอบการจำแนกชนิดระบุชนิดคลาโดเซอรา และบันทึกผล

2.2.2.3 ตรวจตัวอย่างคลาโดเซอราที่เหลือตามขั้นตอนหัวข้อที่ 2.2.2.1 และ 2.2.2.2

2.2.2.4 เก็บรักษาตัวอย่างในรูปสไลด์ถาวร พร้อมทั้งถ่ายภาพ และวาดภาพตัวอย่างคลาโดเซอราตามขั้นตอนหัวข้อที่ 2.2.1.6-2.2.1.8

2.2.3 วิธีการจำแนกชนิดโคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์และไซโคลพอยด์

คัดแยกตัวอย่างโคพีพอดทำเช่นเดียวกับวิธีการคัดแยกตัวอย่างคลาโดเซอรา (หัวข้อที่ 2.2.2.1) การจำแนกชนิดโคพีพอดกลุ่มคาลานอยด์ใช้เพศผู้ กลุ่มไซโคลพอยด์ใช้เพศเมีย

2.2.3.1 นำตัวอย่างโคพีพอดจากขวดตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในจานหลุมแก้ว เติมน้ำกลั่นให้เจือจางแล้วใช้เข็มเขี่ยๆ ให้ตะกอนตัวอย่างกระจาย จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายต่ำ เพื่อคัดแยกตัวอย่างโคพีพอดที่ต้องการจำแนกชนิด

2.2.3.2 หยดกลีเซอรีน 1 หยด ลงบนสไลด์ ใช้เข็มปักแมลงเสียบตัวโคพีพอดที่ต้องการให้ติดขึ้นมาวางบนสไลด์ที่มีกลีเซอรีน กลุ่มคาลานอยด์โคพีพอดใช้เข็มปักแมลงขนาดเล็กตัดหนวดคู่ที่ 1 ข้างขวา และขาคู่ที่ 5 (P5) ของเพศผู้ ส่วนไซโคลพอยด์โคพีพอดใช้เข็มปักแมลงขนาดเล็กตัดขาคู่ที่ 5 ที่ติดกับปล้องยูโรโซมเพื่อจำแนกระดับสกุล ขาคู่ที่ 4 และหนวดคู่ที่ 2 เพื่อจำแนกระดับสปีชีส์ ภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายสูง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่รองด้วยดินน้ำมันที่มุมทั้ง 4 มุม นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 และ 1,000 เท่า เทียบลักษณะตัวอย่างกับเอกสารประกอบการจำแนกชนิด ระบุชนิดโคพีพอด และบันทึกผล

2.2.3.3 ตรวจตัวอย่างโคพีพอดที่เหลืออยู่ตามขั้นตอนหัวข้อที่ 2.2.3.1 และ 2.2.3.2

2.2.3.4 เก็บรักษาตัวอย่างในรูปของสไลด์ถาวร พร้อมทั้งถ่ายภาพ และวาดภาพตัวอย่างโคพีพอดตามขั้นตอนหัวข้อที่ 2.2.1.6-2.2.1.8

2.3 การวิเคราะห์ความชุกชุมของโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอด

การนับจำนวนโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอด ทำได้โดยเขย่าขวดตัวอย่างแพลงก์ตอนที่เก็บด้วยเครื่องมือ Schindler Plankton Trap ให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างจากขวดที่เขย่าแล้วใส่ลงบนสไลด์ Sedgwich Rafter Counting Cell สำหรับนับจำนวนแพลงก์ตอน นับจำนวน โรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอด จนหมดสไลด์ ทำซ้ำเช่นนี้ โดยนับจำนวนโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดจากตัวอย่างที่เหลือในขวด จำนวน 5 ซ้ำ บันทึกข้อมูล

2.4 การเตรียมตัวอย่างโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.4.1 คัดเลือกตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ใส่ในจานเพาะเชื้อ (petridich) เติมน้ำให้ท่วมตัวอย่าง ใช้คาพิลลารีปิเปตเป่าเบา ๆ และดูดน้ำออก ในบางครั้งอาจต้องทำการล้างตัวอย่างโดยใช้พู่กันขนาดเล็กเขี่ยเศษสิ่งสกปรกที่เกาะตามพื้นผิวตัวอย่าง ทำเช่นนี้หลายครั้งเพื่อล้างตัวอย่างให้สะอาด ในกรณีของตัวอย่างโคพีพอด ใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็กตัดระยางค์ขา ปลายหนวด และอวัยวะอื่นที่ต้องการศึกษาออกก่อน

2.4.2 นำตัวอย่างใส่ในแคปซูลที่เจาะรูหัวท้าย ปิดด้วยผ้ากรองขนาดตา 60 ไมโครเมตร เพื่อให้สารเคมีสามารถผ่านได้ ขณะที่ใส่ตัวอย่างลงในแคปซูล ๆ ต้องแช่ในภาชนะที่มีน้ำตลอดเวลา

2.4.3 ขั้นตอนการขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) นำแคปซูลที่มีตัวอย่างใส่ลงในขวดแก้วที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ละระดับความเข้มข้นใช้เวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในเอมิลอาซีเตท 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ในระหว่างกระบวนการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างนั้นสามารถพักตัวอย่างไว้ได้ที่เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.4.4 ทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยวิธี Critical Point Drying (CPD) ใช้เวลาประมาณ 90 นาที

2.4.5 ใช้เข็มปักแมลงที่แห้งและสะอาด แตะตัวอย่างให้ติดกับเข็ม นำมาวางติดบนแท่นรองรับตัวอย่าง (stub) ที่มีกระดาษกาวสองหน้าติดอยู่

2.4.6 นำแท่นรองรับตัวอย่างที่ติดตัวอย่างแล้วไปฉาบผิวด้วยทองโดยใช้เครื่องพ่นสูญญากาศ

2.4.7 ตรวจสอบตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น LEO 1450VP) และบันทึกภาพ

2.5 การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์ 2 สปีชีส์ เพื่อศึกษาชีววิทยา

2.5.1 การคัดเลือกชนิดของโรติเฟอร์จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างโรติเฟอร์ที่มีชีวิตจากแหล่งน้ำในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 60 ไมโครเมตร ทำการแยกโรติเฟอร์ชนิดที่ต้องการนำมาศึกษา โดยคัดเลือกโรติเฟอร์ที่เป็นชนิดเดียวกับที่พบในบึงบอระเพ็ดและบึงโขงหลง โดยมีขนาดและรูปร่างที่เหมือนกันกับที่พบในบึง นำมาเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

2.5.2 การคัดแยกชนิดแพลงก์ตอนพืช (สาหร่ายสีเขียว) ให้บริสุทธิ์

2.5.2.1 ทำการแยกชนิดของสาหร่ายด้วยวิธีการเพาะบนอาหารวุ้น โดยใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลนไฟ เมื่อห่วงลวดเย็นนำมาแตะกับน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากบึงบอระเพ็ด ลากไปมาบนอาหารวุ้นจนทั่วจานแก้ว (petri dish) วางจานแก้วบนชั้นเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์คูลไวท์ จำนวน 6 หลอด ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ให้แสงสว่าง:มืด เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง เพื่อให้สาหร่ายเจริญเติบโต ใช้ระยะเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์

2.5.2.2 นำโคโลนีของสาหร่ายที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้น โดยใช้ห่วงลวดเขี่ยเชื้อลนไฟ เมื่อห่วงลวดเย็นนำมาแตะกับโคโลนีของสาหร่ายสีเขียว นำไปเลี้ยงในหลอดแก้วที่มีสารละลายอาหาร นำหลอดแก้ววางบนชั้นเพาะเลี้ยง ภายใต้สภาวะเดียวกันกับข้อ 2.5.2.1 สาหร่ายจะใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 2-4 สัปดาห์

2.5.2.3 ตรวจเช็คว่าสาหร่ายที่เกิดขึ้นในหัวข้อที่ 2.5.2.2 นั้นเป็นสาหร่ายที่บริสุทธิ์หรือไม่ ถ้ามีการปนเปื้อนของสาหร่ายมากกว่า 1 ชนิด ต้องนำไปทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 2.5.2.1 และ 2.5.2.2 จนกว่าจะได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนจากชนิดอื่น ๆ

2.5.3 การศึกษาชีววิทยาของการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์ 2 สปีชีส์

2.5.3.1 การศึกษาอายุขัยของโรติเฟอร์

(1) คัดเลือกโรติเฟอร์แม่พันธุ์ที่มีไข่แล้ว 10 ตัวต่อ 1 ชนิดของโรติเฟอร์ แยกเลี้ยงในภาชนะละ 1 ตัว ที่อุณหภูมิห้อง ให้แพลงก์ตอนพืช (*Chlorella* sp.) เป็นอาหาร จนกระทั่งให้ลูก (F1) แยกลูกโรติเฟอร์ที่ได้นี้นำมาเป็นตัวเริ่มต้นของการศึกษาในขั้นต่อไป

(2) ศึกษาโรติเฟอร์ตั้งแต่แรกเกิด จนถึงการเจริญเติบโต และให้ลูก (F2) เช็คผลทุกชั่วโมง จดบันทึกจำนวนลูกที่ได้ทั้งหมดจนกระทั่งโรติเฟอร์ (F1) ตาย

2.5.3.2 ศึกษาชนิดของอาหาร (แพลงก์ตอนพืช) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ใช้อาหาร 3 ชนิด ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชที่คัดแยกมาได้จากขั้นตอนที่ 2.5.2 จำนวน 2 ชนิด และชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดคือ *Chlorella* sp. นำโรติเฟอร์ที่คัดเลือกได้ตามขั้นตอนข้อ 2.5.1 จำนวน 2 สปีชีส์ แยกเลี้ยงในภาชนะละ 1 ตัว จำนวน 5 ซ้ำ ต่อทุก ๆ 1 วันที่เก็บตัวอย่างแยกออกมาโดยไม่นำกลับไปเลี้ยงต่อ (ชนิดของอาหาร 3 ชนิด x โรติเฟอร์ 2 สปีชีส์ x 5 ซ้ำ x จำนวนชุดข้อมูลที่แยกออกมาในเวลาที่เช็คผล) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้อาหารทุกวัน โดยมีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชอยู่ในช่วง $2.5-5.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ่ายน้ำทุกวัน ๆ ละ 10-20 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเติมแพลงก์ตอนพืชเข้าไป เมื่อเลี้ยงครบทุก 1 วัน ทำการเก็บตัวอย่างโรติเฟอร์แยกออกมาดองด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จดบันทึกจำนวนตัวทั้งหมดในแต่ละช่วงเวลา ทำการสุ่มวัดขนาดของโรติเฟอร์จากการเพาะเลี้ยงข้างต้น โดยวัดขนาดของความกว้างและความยาวของลำตัว ความกว้างและความยาวของไข่ ความยาวของหนามด้านข้างส่วนต้น (antero-lateral spine) หนามตรงกลางส่วนต้น (antero-medial spine) และหนามส่วนท้าย (posterior spine) ของลำตัว โดยโรติเฟอร์ *Brachionus angularis* ที่นำมาวัดขนาดนั้นได้มาจากการเลี้ยงในวันที่ 6 ของการทดลอง ส่วน *B. caudatus* ที่นำมาวัดขนาดนั้นมาจากการเลี้ยงในวันที่ 2 ของการทดลอง จดบันทึกข้อมูล

2.5.3.3 ศึกษาระดับความหนาแน่นของชนิดแพลงก์ตอนพืชที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์

นำชนิดแพลงก์ตอนพืชที่ดีที่สุดจากการเพาะเลี้ยงในหัวข้อที่ 2.5.3.2 มาศึกษาความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์ชนิดที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แบ่งความหนาแน่นของชนิดอาหารออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ $2.5x10^4$, $5x10^4$, $1x10^5$, $5x10^5$ และ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำในทุกระดับความหนาแน่นของชนิดอาหาร โดยในแต่ละซ้ำใช้โรติเฟอร์แรกเกิด 10 ตัว (1ตัวต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้อาหารทุกวัน ถ่ายน้ำทุกวัน ๆ ละ 10-20 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเติมแพลงก์ตอนพืชให้คงระดับความหนาแน่นเช่นเดิม เมื่อเลี้ยงครบทุก 24 ชั่วโมง จึงเก็บรักษาตัวอย่างโรติเฟอร์ด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ จดบันทึกจำนวนตัวโรติเฟอร์ทั้งหมด

3. เอกสารที่ใช้ประกอบการจำแนกชนิด

3.1 โรติเฟอร์ใช้เอกสารดังต่อไปนี้ ละออศรี เสนาะเมือง (2537), De Smet (1996b), De Smet and Pourriot (1997), Koste (1978, 1989a, 1989b, 1989c), Koste and Shiel (1987), Sanoamuang (1993b, 1996, 1998a), Sanoamuang, Segers and Dumont (1995), Sanoamuang and Segers (1997), Sanoamuang and Savatenalinton (1999, 2001a, 2001b), Segers (1993a, 1993b, 1994, 1995), Segers and Sanoamuang (1994), Segers, Kotethip and Sanoamuang (2004), Shiel (1993, 1995), Shiel and Koste (1992) และ Shiel and Sanoamuang (1993) เป็นต้น

3.2 คลาโดเซอราใช้เอกสารดังต่อไปนี้ Idris (1983), Korovchinsky (1992), Kotov, Maiphae and Sanoamuang (2005), Sanoamuang (1998b), Smirnov (1996) และ Smirnov and Timms (1983) เป็นต้น

3.3 โคพีพอดใช้เอกสารดังต่อไปนี้ ละออศรี เสนาะเมือง (2545), Dumont and Reddy (1994), Dumont, Reddy and Sanoamuang (1996), Dussart and Defaye (1995), Reddy (1994), Reddy, Sanoamuang and Dumont (1998, 1999), Sanoamuang (1999, 2001a, 2001b, 2001c), Sanoamuang and Athibai (2002) และ Sanoamuang and Yindee (2001) เป็นต้น

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 วิเคราะห์ตัวอย่างความหลากชนิดของโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดใช้สถิติพรรณนา เช่น ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เป็นต้น

4.2 วิเคราะห์และเปรียบเทียบความหลากชนิดและความชุกชุมของโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดที่พบในฤดูกาลเดียวกันของทั้งสองปีด้วยแบบทดสอบ Wilcoxon Sign Rank test เปรียบเทียบความหลากชนิดและความชุกชุมของโรติเฟอร์ที่พบในทั้งสามฤดูกาลของปีแรกและปีที่สองด้วยแบบทดสอบ Friedman test และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Dunn เนื่องจากข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ (อโนทัย ตรีวานิช, 2545)

4.3 วิเคราะห์และเปรียบเทียบความหลากชนิดและความชุกชุมของโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดที่พบในทุกฤดูกาล ในทั้ง 2 แหล่งน้ำ ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยการทดสอบความเป็นเอกพันธ์ (Test of Homogeneity) (อโนทัย ตรีวานิช, 2545)

4.4 การหาค่าดัชนีความหลากชนิด (Species Diversity Index) ใช้

สูตรของ Shannon- Wiener information theory index (H') = $-\sum p_i \log p_i$

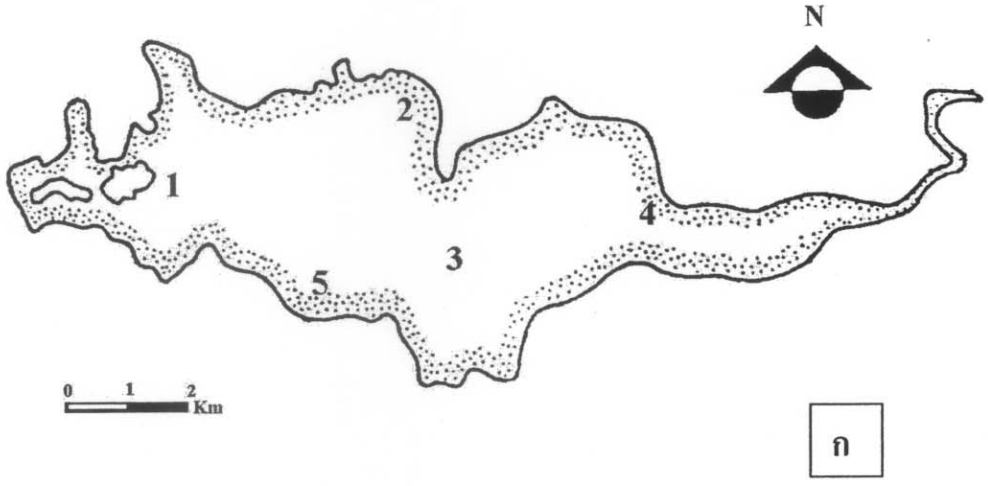
เมื่อ p_i = จำนวนตัวของแต่ละสปีชีส์ต่อจำนวนตัวรวมของทุกสปีชีส์

(Hauer and Resh, 1996)

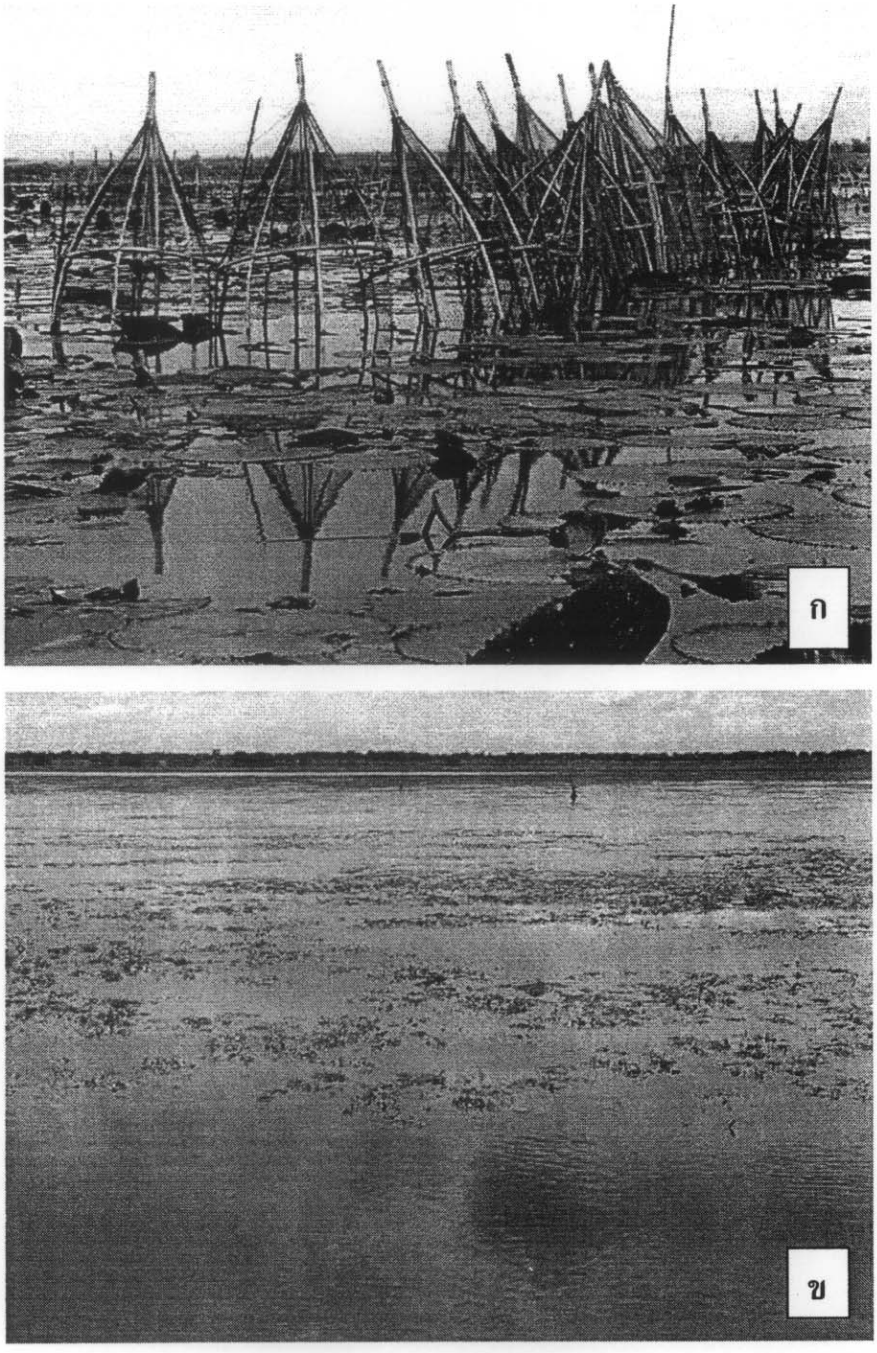
4.5 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและเคมีบางประการของแหล่งน้ำ เช่น อุณหภูมิ พีเอช การนำไฟฟ้า ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ ความเค็ม และความลึกของแหล่งน้ำว่ามีผลต่อความชุกชุมของโรติเฟอร์ คลาโดเซอรา และโคพีพอดที่พบหรือไม่ ใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สเปียร์แมน (Spearman Correlation Coefficients) เนื่องจากข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ (อโนทัย ตรีวานิช, 2545)

4.6 วิเคราะห์และเปรียบเทียบชนิดอาหาร 3 ชนิด โดยนำตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารจำนวน 5 ซ้ำ ระยะเวลาที่เช็คผลทุก ๆ 1 วัน ในการเลี้ยงโรติเฟอร์ 2 สปีชีส์ ไม่สามารถใช้การทดสอบแบบแฟกตอเรียล (Factorial design) ได้ เนื่องจากความแปรปรวนไม่เท่ากัน และข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ จึงทดสอบด้วยแบบทดสอบ Kruskal-Wallis test และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Dunn (อโนทัย ตรีวานิช, 2545)

4.7 วิเคราะห์ชนิดของอาหารที่ดีที่สุดแบ่งออกเป็น 5 ระดับความหนาแน่นของอาหารในการเลี้ยงโรติเฟอร์ชนิดที่ดีที่สุด ด้วยแบบทดสอบ Kruskal-Wallis test และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธี Dunn เนื่องจากข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ (อโนทัย ตรีวานิช, 2545)



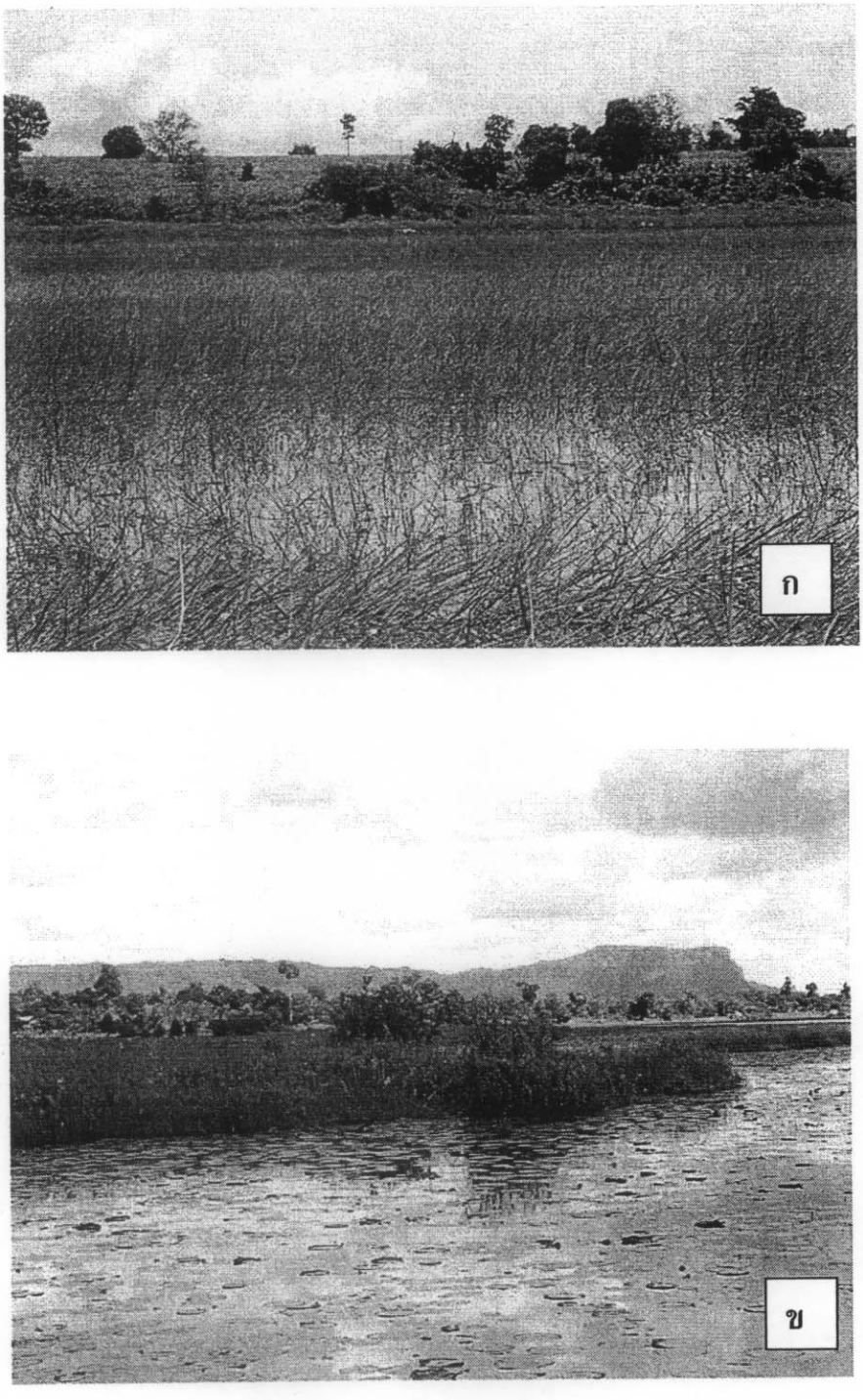
ภาพที่ 6 แผนที่พื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์
ก. สถานีเก็บตัวอย่างบึงบอระเพ็ด ข. สภาพแวดล้อมของสถานีเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 7 สภาพแวดล้อมของพื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ (ก และ ข)

ภาพที่ 8 แผนที่พื้นที่ชุ่มน้ำบึงโขงหลง จังหวัดหนองคาย

ก. สถานีเก็บตัวอย่างบึงโขงหลง ข. สภาพแวดล้อมของสถานีเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 9 สภาพแวดล้อมของพื้นที่ชุ่มน้ำบึงโขงหลง จังหวัดหนองคาย (ก และ ข)