บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินการทดลองวิจัย ทางผู้วิจัยได้ดำเนินการจัดเตรียมและทำการวิจัยตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

ในการศึกษาวิจัย มีวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองวิจัยดังต่อไปนี้

1. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยายสูง
2. กล้องจุลทรรศน์แบบกำลังขยายต่ำ
3. จานแก้วขนาดต่าง ๆ
4. แผ่นกระจกสไลด์และแผ่นปิด
5. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์
6. บีคเกอร์ขนาดต่าง ๆ
7. เข็มผ่าตัดโคพีพอด
8. ห่วงสำหรับตักโคพีพอด
9. ถุงกรองขนาดตา 40 μm.
10. ถุงพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่างสาหร่ายทะเล
12. เครื่องปั๊มลม สายยางและหัวทราย
13. กลีเซอรีน, เอททานอล และฟอร์มาลิน
14. อุปกรณ์วัดความเค็ม
15. อุปกรณ์วัดอุณหภูมิ

16. ปากคีบแบบต่าง ๆ

17. ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงโคพีพอดและสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก

18. หลอดดูดแบบแก้วหรือพลาสติกชนิดปลายเรียวเล็ก

19. ถังพลาสติก, ขวดน้ำพลาสติคขนาดใหญ่

20. เครื่องปรับอากาศและควบคุมอุณหภูมิห้อง

การเก็บตัวอย่างและการตรวจสอบชนิดตัวอย่าง

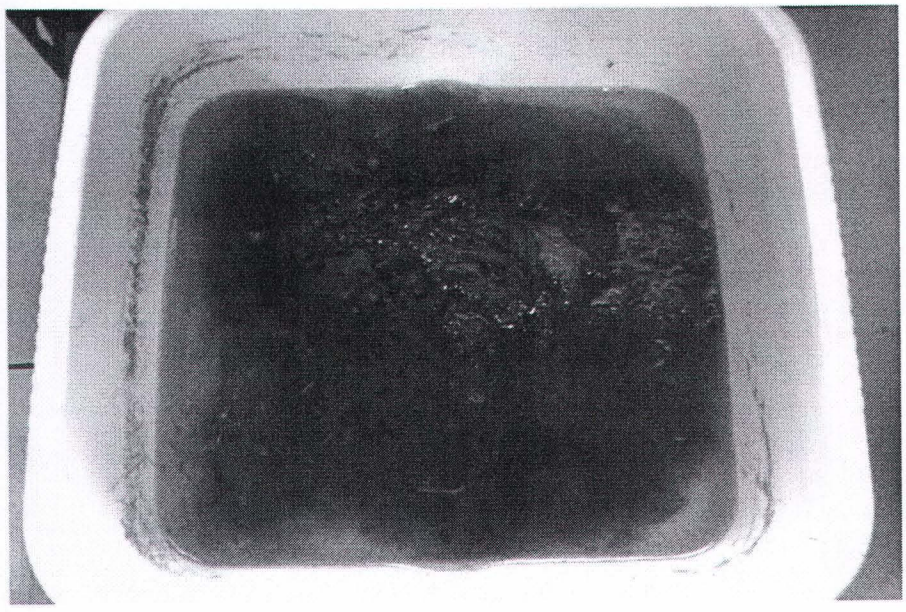
ฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดสกุล *Tigriopus* รวบรวมมาจากตัวอย่างที่พบเจริญอยู่บนสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva clathrata* โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายไส้ไก่จากชายฝั่งทะเลบ้านแสมสาร จังหวัดชลบุรี แล้วนำมาทำการคัดแยกโคพีพอดในห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกเอาเฉพาะเพศเมียตัวที่มีถุงไข่ (ovigerous female) ด้วยหลอดดูด และห่วงสำหรับตักโคพีพอด ภายใต้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope)

การจำแนกฮาร์แพคทิคอยโคพีพอด

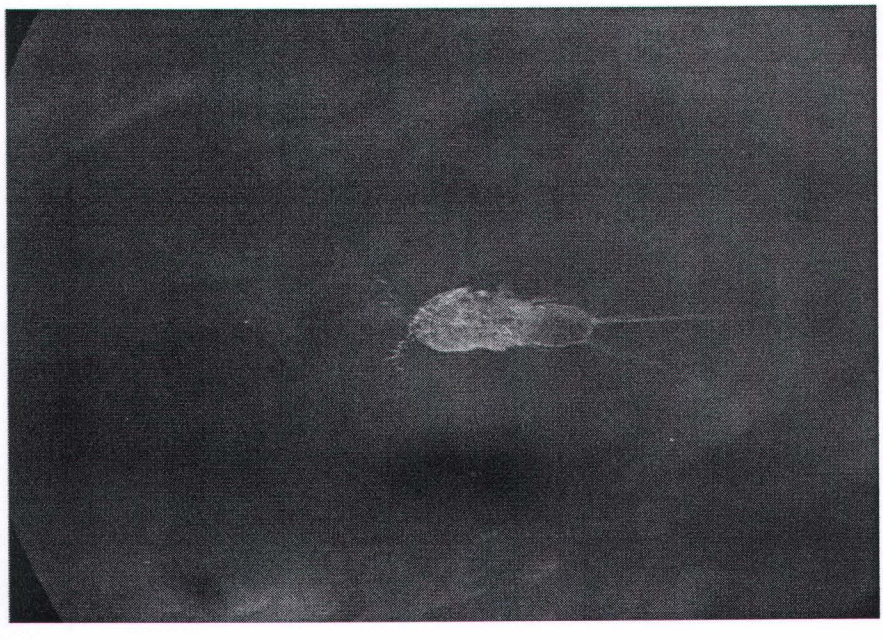
ในการจำแนกฮาร์แพคทิคอยโคพีพอด (Classification of Harpacticoid copepods) จะดำเนินการตามวิธีการของ สุภาวดี จุลละศร (2553ก, หน้า 15-17) เริ่มจากคัดเลือกเพศเมียและเพศผู้ที่โตเต็มวัยแล้วหรือเพศเมียที่มีถุงไข่ ฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดมีขนาดเล็กมากจำเป็นต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่มีคุณภาพดีมาก จึงจะเห็นรายละเอียดทั้งหมดของโคพีพอดได้ถูกต้องครบถ้วน โดยปฏิบัติตามขั้นตอนและจำแนกตามเอกสารของ Boxshall, and Halsey (2004); Ferrari, and Dahms (2007); Huys, and Boxshall (1991); Huys, Gee, Moore, and Hamond (1996); Lang (1948, 1965) ซึ่งมีวิธีการดำเนินการเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

ภาพ 22 ภาพถ่ายแสดงพื้นที่บริเวณชายหาดแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ที่เลือกเก็บสาหร่ายทะเล เพื่อนำมาเลือกหาฮาร์แพคทิคอยโคพีพอด สกุล *Tigriopus* sp.

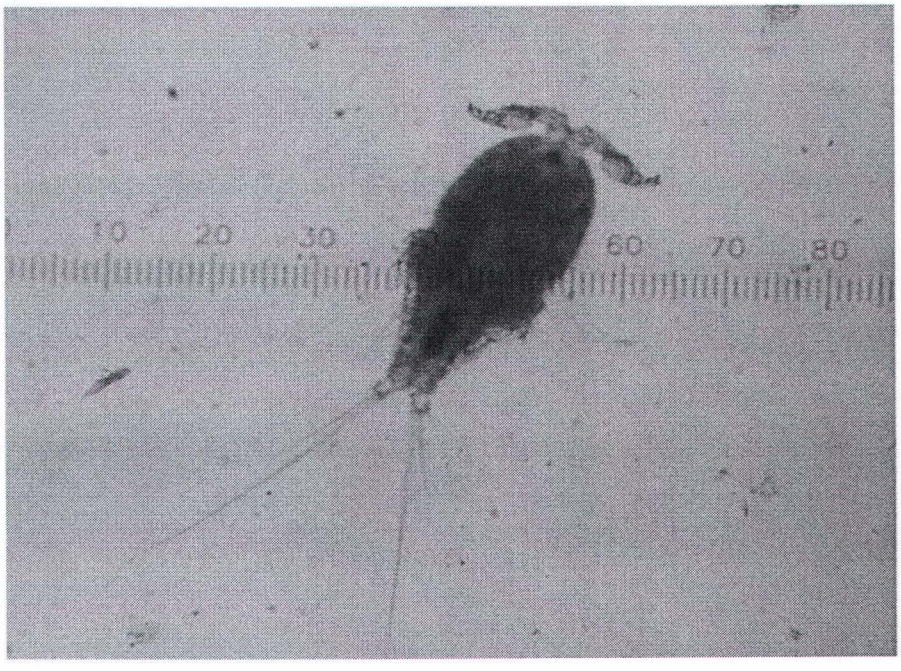
ภาพ 23 ภาพถ่ายแสดงกอสาหร่ายทะเล *Caulerpa* sp.และ *Ulva clathrata* ในพื้นที่ชายทะเล อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี



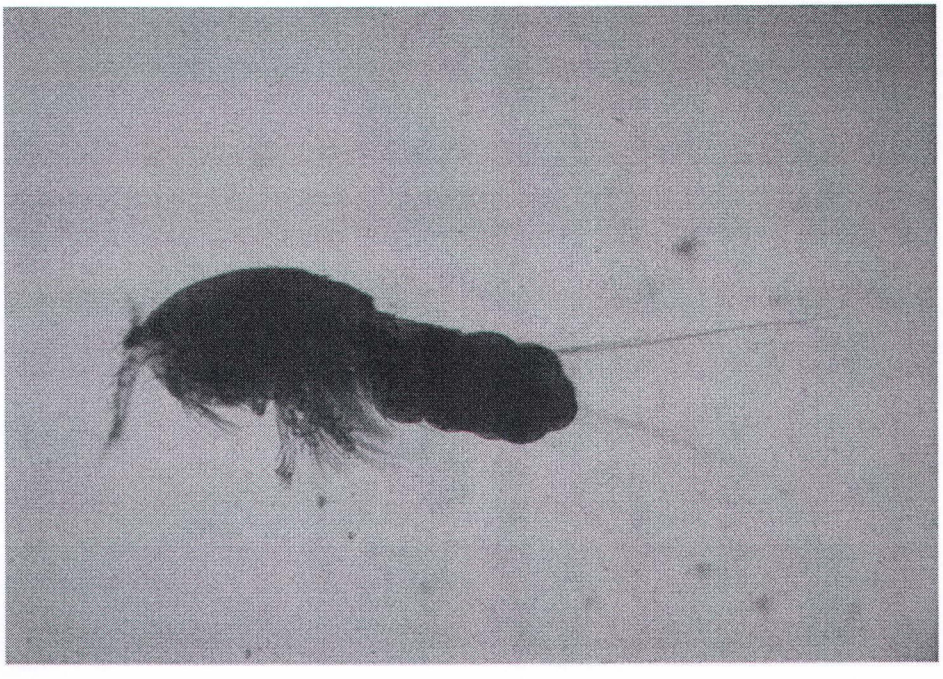
ภาพ 24 ภาพถ่ายแสดงสาหร่าย *Ulva clathrata* ที่เก็บมาแยกหาฮาร์แพคทิคอยโคพีพอด



ภาพ 25 ภาพถ่ายแสดงตัวอย่างฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดเพศเมียที่ถุงไข่เป็น ovigerous female ที่ได้ทำการคัดแยกด้วยหลอดดูดและห่วงตักโคพีพอด จากสาหร่ายที่เก็บมา



ภาพ 26 ภาพถ่ายแสดงฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดเต็มตัวด้านหลัง (เพศผู้)



ภาพ 27 ภาพถ่ายแสดงฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดเต็มตัวด้านข้าง (เพศเมีย)

1. นำฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดตัวที่ต้องการจำแนกมาเม้าท์บนสไลด์ชั่วคราวที่มีน้ำยากลีเซอรีน: แอลกอฮอล์ = 50 : 50 แล้วนำมาถ่ายภาพแบบเต็มตัวด้านหลัง (Habitus, dorsal) และเต็มตัวด้านข้าง (Habitus, lateral) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบถ่ายภาพได้ (microphotography)

2. การผ่าตัด (dissecting) ในที่นี้หมายความถึง การดึงและแยกรยางค์ของโคพีพอดออกเป็นส่วน ๆ ได้แก่ ส่วนหัว-อก (cephalothorax, เซฟาโลทอแรกซ์) และส่วนท้อง (abdomen หรือ metasome, เมทาโซม) กับส่วนท้ายลำตัว (urosome, ยูโรโซม) เพื่อนำมาสังเกตลักษณะเฉพาะโดยมีรายละเอียดในการศึกษาดังนี้

สำหรับรยางค์ส่วนหัว-อก ได้แก่ โรสตรัม (rostrum, R), หนวดคู่ที่ 1 (antennules, A1), หนวดคู่ที่ 2 (antennae, A2), แมนดิเบิล (mandibles, Md), แมกซิลลูล (maxillule, Mx1), แมกซิลลา (maxilla, Mx2)และแมกซิลลิเพด (maxilliped, Mxp) นำรยางค์แต่ละส่วนมาเม้าท์บนสไลด์แบบถาวรด้วยกลีเซอรีนเข้มข้น การวาดภาพลายเส้นต้องดูด้วย objective lens 100X เนื่องจากรยางค์ข้างต้นมีขนาดเล็กมาก ๆ ลำดับต่อไปเป็นรยางค์ขา (pereiopods, P) มีทั้งหมด 6 คู่ ได้แก่ P1, P2, P3, P4, P5 และ P6 รวมทั้ง Urosome ทั้งหมดนี้มักใช้ objective lens 40X เนื่องจากชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่กว่ามาก เมื่อวาดทุกส่วนถูกต้องดีแล้ว นำมาวาดลงบนกระดาษไขด้วยหมึกต่อจากนั้น ทำการเลเบิล (label) เพื่อจะได้ทราบว่าภาพที่วาดมีรยางค์อะไรบ้าง และที่สำคัญต้องระบุมาตราส่วนด้วย

3. นำภาพถ่ายชิ้นส่วนของฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดแต่ละตัวมาศึกษาอย่างละเอียดเพื่อทำการจำแนก สกุล และชนิด โดยเปรียบเทียบกับกุญแจ (keys) และภาพ (figures) จากหนังสือและวารสารต่าง ๆ ในหัวข้อที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

ในการทดลองวิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก 2 ชนิด ได้แก่ *Isochrysis galbana* และ *Tetraselmis* sp. เพื่อให้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงฮาร์แพคติคอยโคพีพอด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการงานวิจัยของรองศาสตราจารย์ สุภาวดี จุลละศร แล้วนำมาขยายการเพาะเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้มีสาหร่ายขนาดเล็กเป็นอาหารเพาะเลี้ยง มากเพียงพอและตลอดช่วงระยะเวลาทดลอง โดยใช้อาหารตามสูตรอาหาร f/2 Medium (Guillard, 1975; Guillard, & Ryther, 1962) ซึ่งรองศาสตราจารย์สุภาวดี จุลละศร (2553ก) ได้นำมาดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานดังต่อไปนี้

สูตรอาหาร f/2 นี้มีความเหมาะสำหรับใช้เพิ่มคุณค่าอาหารของน้ำทะเลเพื่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กแถบชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะไดอะตอม ซึ่งได้ลดความเข้มข้น

ตาราง 3

สารละลายธาตุอาหารหลัก (f/2 Solution)

สารประกอบ	ปริมาตรที่ใช้เตรียม StockSolution (g./L.)	ปริมาตรที่ใช้ในอาหารเลี้ยง (ml./L.)
$NaNO_3$	75 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1.0 มิลลิลิตร
$NaH_2PO_4H_2O$	5 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1.0 มิลลิลิตร
$Na_2SiO_39H_2O$	30 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1.0 มิลลิลิตร
สารละลายธาตุอาหารรอง	ตารางที่ 4	1.0 มิลลิลิตร
สารละลายวิตามิน	ตารางที่ 5	0.5 มิลลิลิตร

ที่มา. จาก *การศึกษาความหลากหลายของฮาร์แพคติคอยโคพีพอดที่อาศัยอยู่กับสาหร่ายทะเลและเพาะเลี้ยงเป็นอาหารมีชีวิตของลูกกุ้ง* (หน้า 17), โดย สุภาวดี จุลละศร, 2553, กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยรามคำแหง, คณะวิทยาศาสตร์, ภาควิชาชีววิทยา.

ของสูตรอาหารดั้งเดิมของ " f-Medium " (Guillard, & Ryther, 1962) ลงครึ่งหนึ่งวิธีการเตรียมเริ่มจากใช้น้ำทะเลธรรมชาติที่ต้มฆ่าเชื้อแล้ว 950 มิลลิลิตรนำมาเติมสารอาหารต่อไปนี้ลงไป ได้แก่ ธาตุอาหาร และสารละลายวิตามิน ตามรายละเอียดในตาราง 3

ที่สำคัญ ให้เพิ่มน้ำทะเลธรรมชาติที่ต้มฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ต่อจากนั้น นำเข้าอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันเพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนเติมสารละลาย ธาตุอาหารรอง และสารละลายวิตามิน ต่างๆ มีส่วนผสมดังนี้

สารละลายธาตุอาหารรอง (f/2 Trace metal solution)

วิธีการเตรียม เริ่มจากใช้น้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร เติมส่วนผสมสารเคมีดังตารางข้างล่าง (ตาราง 4) และเติมน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร จากนั้นนำเข้าอบ

ตาราง 4

สารละลายธาตุอาหารรอง (f/2Trace Metal Solution)

สารประกอบ	ปริมาตรที่ใช้เตรียม Stock Solution (g./L.)	ปริมาตรที่ใช้ในอาหารเลี้ยง (ml./L.)
$FeCl_3.6H_2O$	3.15 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
$Na_2EDTA.2H_2O$	4.36 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
$CuSo_4.5H_2O$	9.80 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	6.30 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
$ZnSo_4.7H_2O$	22.00 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
$CoCl_2.6H_2O$	10.00 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	180.00 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร

ที่มา. จาก *การศึกษาความหลากหลายของฮาร์แพคติคอยโคพีพอดที่อาศัยอยู่กับสาหร่ายทะเลและเพาะเลี้ยงเป็นอาหารมีชีวิตของลูกกุ้ง* (หน้า 18), โดย สุภาวดี จุลละศร, 2553, กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยรามคำแหง, คณะวิทยาศาสตร์, ภาควิชาชีววิทยา.

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายวิตามิน *(f/2 Vitamin Solution)*

ในการเตรียมสารละลายวิตามินอันดับแรก ต้องเตรียมสารละลายธาตุอาหารก่อน แล้วจึงเตรียมสารละลายวิตามินเป็นอันดับสุดท้าย โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้นำน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตรมาละลายไทอามิน แล้วเติมสารละลายหัวเชื้อธาตุอาหารเบื้องต้นตามที่ระบุ

ตาราง 5

สารละลายวิตามินอาหาร (f/2 Vitamin Solution)

สารประกอบ	ปริมาตรที่ใช้เตรียม Stock Solution (g./L.)	ปริมาตรที่ใช้ในอาหารเลี้ยง (ml./L.)
วิตามินบี 1 (thiamine HCI)	200.0 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
ไบโอติน (biotin)	0.1 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	10 มิลลิลิตร
วิตามินบี12 (cyanocobalamin)	1.0 กรัม/ลิตร น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร

ที่มา. จาก *การศึกษาความหลากหลายของฮาร์แพคติคอยโคพีพอดที่อาศัยอยู่กับสาหร่ายทะเลและเพาะเลี้ยงเป็นอาหารมีชีวิตของลูกกุ้ง* (หน้า 18), โดย สุภาวดี จุลละศร, 2553, กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยรามคำแหง, คณะวิทยาศาสตร์, ภาควิชาชีววิทยา.

ปริมาณส่วนผสมไว้ในตาราง (ตาราง 5) แล้วจึงเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตรแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองและเก็บไว้ในตู้เย็นหรือตู้แช่แข็ง หลังจากได้อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเรียบร้อยแล้ว ก็ทำการเพาะเพิ่มจำนวนสาหร่ายให้มีปริมาณมากขึ้น โดยปฏิบัติดังนี้

1. นำขวดแก้วปริมาตรความจุ 2,000 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบความร้อนที่ 120°C. เพื่อฆ่าเชื้อโรคนำมาบรรจุน้ำทะเลกรองที่ผ่านการต้มเดือดและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ

ห้องโดยมีปริมาตรน้ำทะเลในขวดที่ประมาณ 1,500 มิลลิลิตร

2. ทำการเติมหัวเชื้อสาหร่ายขนาดเล็ก 400 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายธาตุอาหารหลักจำนวน 4 มิลลิลิตร เติมสารละลายธาตุอาหารรองจำนวน 4 มิลลิลิตร และสารละลายวิตามินอีก 2 มิลลิลิตรต่อจากนั้นเติมน้ำทะเลให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 มิลลิลิตร

3. ปิดปากขวดด้วยสำลี ใส่สายยางให้อากาศโดยเป่าลมลงไปในขวดแก้ว ตั้งไว้ในที่มีแสงสว่างจากหลอดไฟตลอด 24 ชั่วโมง เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก

4. สาหร่ายที่นำไปใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงโคพีพอดจะมีความเข้มมากจนแสงไม่สามารถส่องผ่านขวดที่ใช้เพาะเลี้ยงได้ เนื่องจากมีปริมาณเซลของสาหร่ายอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น

วิธีการเลี้ยงและเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

เลี้ยงแม่พันธุ์ฮาร์แพคติคอยโคพีพอดน้ำทะเลที่กำจัดสิ่งปนเปื้อนเช่น ไข่โรติ-เฟอร์และฆ่าเชื้อแล้วนำมาปรับระดับความเค็มที่ 30-33‰ เพียง 1 ตัว ต่อหลอดเพื่อคัดแยกฮาร์แพคติคอยโคพีพอดสกุล *Tigriopus* ชนิดเดียวตามวิธีการของ Supawadee Chullasorn, Dahms, Schizas, and Pawana Kangtia. (2009) ในจานแก้วหลังจากนั้นไข่ที่ฟักออกมาในระยะ นอเพลียส I (N-I) นำมาขยายเลี้ยงในขวดทดลองจำนวนขวดละ 20 ตัว ฮาร์แพคติคอยโคพีพอดที่เลี้ยงได้นำมาขยายเพิ่มจำนวนเมื่อสังเกตเห็นฮาร์แพคติ-คอยโคพีพอดที่มีการสร้างถุงไข่ซึ่งเป็นเพศเมียนำไปขยายเลี้ยงต่อในขวดที่มีความจุ 200 มิลลิลิตรขวดละ 20 ตัว เพื่อนำมาทดลองเลี้ยงด้วยสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก 2 ชนิด โดยในการทดลองได้แบ่งออกเป็น 3 ทรีตเมนต์ ได้แก่

1. เลี้ยงฮาร์แพคติคอยโคพีพอดด้วยสาหร่ายทะเล *Isochrysis galbana*

2. เลี้ยงฮาร์แพคติคอยโคพีพอดด้วยสาหร่ายทะเล *Tetraselmis* sp.

3. เลี้ยงฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดด้วยสาหร่ายทะเลผสมระหว่าง *Isochrysis galbana* กับ *Tetraselmis* sp. (1 : 1 v/v)

ในแต่ละทรีตเมนต์มีการให้อาหารทุกวันระหว่างทดลองสังเกตการณ์เพิ่มจำนวนฮาร์แพคทิคอยโคพีพอด และนับจำนวนตัวโคพีพอดเมื่อทำการเลี้ยงจนครบช่วงระยะเวลา 60 วัน

การนับจำนวนฮาร์แพคทิคอยโคพีพอด

โคพีพอดที่ได้หลังจากเลี้ยงไปได้ 60 วันนำมานับจำนวนโดยเริ่มต้นจากการหยดฟอร์มาลินพร้อมกับสารละลายสีโรสเบ็งกอล ลงในขวดที่ใช้เพาะเลี้ยงแล้วทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงเพื่อให้สีแทรกซึมเข้าในเซล แล้วจึงนำมาล้างแยกเอาเศษมูลของตัวฮาร์แพคทีคอยโคพีพอด ด้วยตะแกรงร่อนขนาดช่องตา 40 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำมานับจำนวนด้วยกล้อง สเตอริโอซูม ซึ่งจะได้ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดต่อช่วงเวลาการเลี้ยงและนำไปคำนวณตามวิธีการคำนวณของ นฤมล และคนอื่น ๆ (2551)

การนับจำนวนฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดที่เลี้ยงได้โดยแยกเพศและระยะการเจริญเติบโต ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ ระยะนอเพลียส, ระยะโคพีพอดิด และตัวเต็มวัย

ขั้นตอนการนับสามารถสรุปตามขั้นตอนได้ดังนี้.

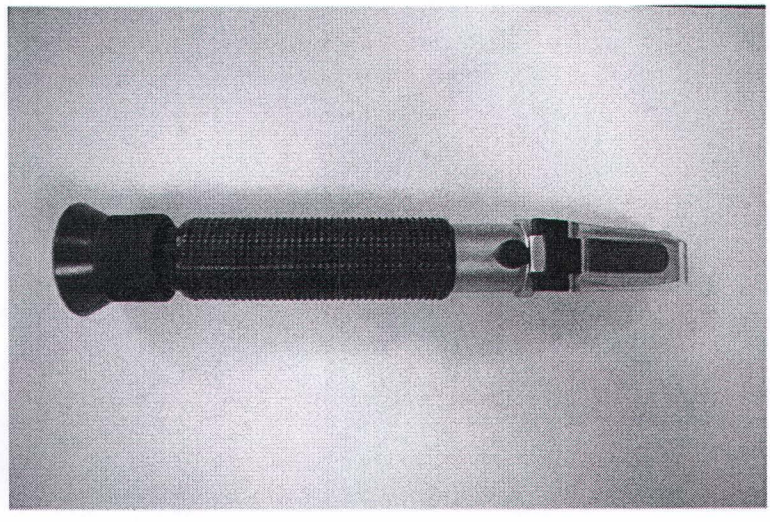
1. นำเอาห่วงตักโคพีพอดมาคัดแยกออกเป็นกลุ่ม ๆ โดยแบ่งออกเป็น เพศผู้, เพศเมีย และ ตัวอ่อน (นอเพลียส)

2. นำไปนับโดยใช้กระดาษกราฟวางรองด้านใต้เพื่อป้องกันความผิดพลาดและสับสนในขณะนับจำนวน

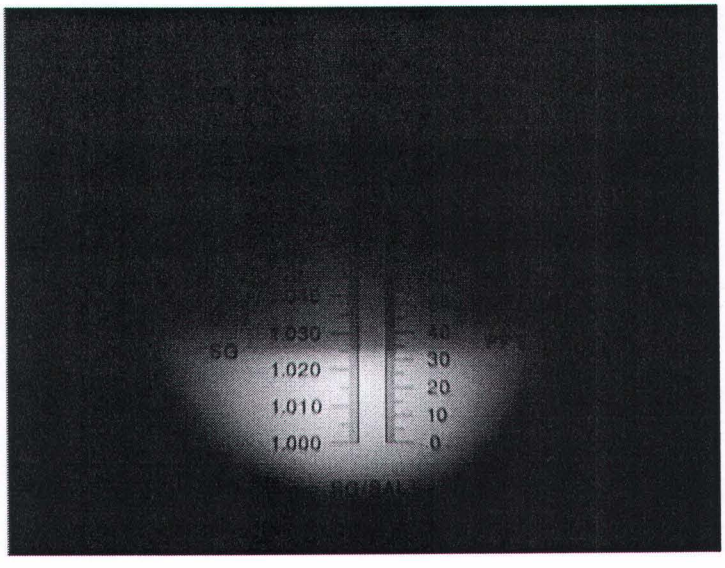
3. นำผลการทดลองไปหาความสัมพันธ์ต่าง ๆ เช่น อัตราการเจริญเติบโต, เพศและระยะการเติบโต

4. ทำการคำนวณข้อมูลด้วยวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติ

ภาพ 28 ภาพแสดงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดต่อไป

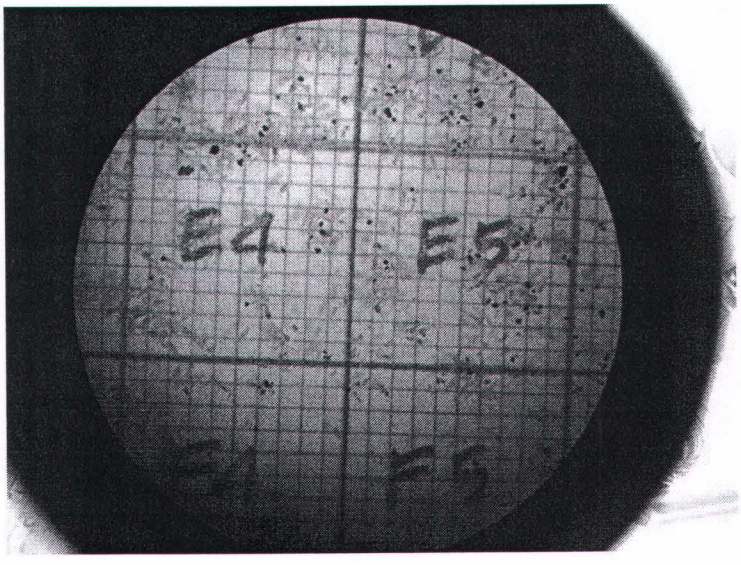


ภาพ 29 ภาพถ่ายแสดงเครื่องวัดความเค็ม



ภาพ 30 ภาพถ่ายแสดงการอ่านค่าในเครื่องวัดความเค็มซึ่งในภาพจะแสดงค่าความเค็มที่ 33 (ขอบสีน้ำเงิน)

ภาพ 31 ภาพถ่ายแสดงการการทดลองเพาะเลี้ยง โดยขวดที่เรียงจะทำ เครื่องหมายและเรียงลำดับตามทรีตเมนต์



ภาพ 32 ภาพถ่ายแสดงการนับจำนวนฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยกล้องสเตอริโอซูม

การตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโต

อัตราการเจริญเติบโตของฮาร์แพคทิคอยโคพีพอดที่เลี้ยงได้ คำนวณตามสมการดังต่อไปนี้ (นฤมล และคนอื่น ๆ, 2551)

$$\mu = \frac{ln\ G2 - ln\ G1}{\Delta t}$$

เมื่อ $G1$ = จำนวนตัวของโคพีพอดที่เริ่มเพาะเลี้ยง

$G2$ = จำนวนตัวของโคพีพอดที่เพาะเลี้ยงได้

Δt = ช่วงระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้อมูลที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองโดยการทดสอบ *t*-test ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป Spss. ซึ่งรายละเอียดผลการคำนวณได้แสดงไว้ใน ภาคผนวก.