บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเลี้ยงหอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus)

หอยเม่นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้รวบรวมมาจากบริเวณชายฝั่งอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยนำมาเลี้ยงไว้ในอ่างแก้ว ที่บรรจุด้วยน้ำทะเล ซึ่งมีความเค็ม 30 ppt และมีระบบกรองน้ำที่มี filter plate (ภาพที่ 5) จำนวนหอยเม่นที่เลี้ยงรวมกันจะต้องไม่หนาแน่นจนเกินควร มิฉะนั้นหอยเม่นจะกินกันเอง (cannabalism) มีการให้อากาศแก่หอยเม่นที่นำมาเลี้ยงตลอดเวลาโดยการใช้เครื่องพ่นอากาศ

อาหารที่ใช้เลี้ยงหอยเม่น ได้แก่ปลาหมึกสดที่นำมาต้มแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ การให้อาหารแก่หอยเม่นทำวันละครั้งโดยโรยชิ้นอาหารลงบนตัวหอยเม่นแต่ละตัว ก่อนการให้อาหารทุกครั้งจะทำการดูดน้ำเพื่อดูดอาหารที่ตกค้างจากวันก่อนให้หมด เพื่อป้องกันน้ำเสีย นอกจากนี้หอยเม่นที่ตายตกค้างในแต่ละถังเลี้ยง สามารถเป็นอาหารของหอยเม่นที่ยังมีชีวิตอยู่ มีการวัดความเค็มของน้ำทุกวัน เพื่อมิให้ความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลง ถ้าความเค็มของน้ำสูงกว่าเดิมจะทำการเติมน้ำจืดลงไป เพื่อรักษาระดับความเค็มของน้ำคงเดิม เพราะถ้าความเค็มของน้ำสูงเกินไปจะทำให้หอยเม่นสลัดหนามที่ตัวออกมีผลทำให้หอยเม่นตายได้ น้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยเม่นต้องเปลี่ยนสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในการเปลี่ยนน้ำทะเลแต่ละครั้ง ต้องให้น้ำทะเลใหม่มีความเค็มเท่ากับน้ำทะเลเดิม เพราะถ้าน้ำทะเลความเค็มต่ำจากระดับเดิมจะมีผลกระตุ้น ทำให้หอยเม่นปล่อยเซลสืบพันธุ์ออกมาซึ่งเป็นไข่ หรือตัวอสุจิออกมาก่อนการทดลอง อุณหภูมิของน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยเม่นใช้อุณหภูมิห้องปกติ หอยเม่นที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสามารถมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 1 - 2 เดือน

2. การกระตุ้น (induced) ให้ปล่อยไข่ และตัวอสุจิ

ก่อนที่จะทำการทดลองทุกครั้งจะต้องกระตุ้นให้ปล่อยไข่ และตัวอสุจิ โดยวิธีของ Giudice (1973) ใช้ KCL ความเข้มข้น 0.5 M จำนวน 0.5-1มิลลิลิตร ฉีดผ่านเนื้อเยื่อที่อยู่รอบบริเวณปากของหอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus) เข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแล้วหงายเอาด้านตรงข้ามปากจุ่มลงบนบีคเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร (ภาพที่ 6) ซึ่งบรรจุด้วยน้ำทะเลที่กรองแล้ว โดยให้ช่องสืบพันธุ์ซึ่งเป็นรูเล็ก ๆ อยู่รอบบริเวณทวารจมอยู่ใต้น้ำประมาณ 1 - 5 นาที จะมีไข่หรืออสุจิไหลออกจากช่องสืบพันธุ์ ไข่มีสีเหลืองอ่อน อสุจิมีสีขาวขุ่น

ไข่หอยเม่นก่อนที่จะนำมาผสมกับอสุจิทุกครั้งจะทำการล้างให้สะอาดด้วยน้ำทะเลที่กรองแล้ว โดยผ่านไข่หอยเม่นลงบนผ้ากรองแพลงค์ตอนเบอร์ 130 T (330 ช่องใน 1 นิ้ว) ซึ่งไข่หอยเม่นสามารถผ่านลงบนผ้ากรองแพลงค์ตอนลงไปได้ ส่วนเศษของสารแขวนลอยที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนผ้ากรองแพลงค์ตอน ไข่หอยเม่นที่ได้มานี้จะมีลักษณะเป็นไข่จม ไข่หอยเม่นจะจมอยู่รวมกันทั้งหมด ทำการดูดน้ำส่วนบนทิ้ง สามารถนำไข่หอยเม่นไปใช้ในการทดลองต่อไป

ไข่และอสุจิ ที่ได้มาต้องนำมาผสมภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เปอร์เซนต์ของการปฏิสนธิของไข่มากที่สุด

3. การเตรียมน้ำทะเลสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน

การเตรียมน้ำทะเลสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน (filtered sea water) ทำโดยนำน้ำทะเลจากอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี มาเก็บตุนไว้ในบ่อพักที่แผนกวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วนำน้ำทะเลมาทำการอุ่นด้วย hot plate ให้ได้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อไม่ให้คุณภาพน้ำเสียไป เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง เพื่อฆ่าจุลินทรีย์บางชนิด ความเค็มของน้ำที่เพิ่มขึ้นโดยการระเหย แก้ได้โดยการเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ความเค็มเท่าเดิม คือ 30 ppt แล้วนำมากรอง 2 ครั้ง ในครั้งแรกใช้กระดาษกรอง No.1 ของ Whatman เพื่อกำจัดเศษของสารแขวนลอยที่มีขนาดปานกลาง และครั้งที่ สองใช้กระดาษ

กรอง No. 5 เพื่อกำจัดเศษของสารแขวนลอยที่มีขนาดเล็ก แล้วทำการวัด pH ของน้ำทะเลที่ได้นี้ด้วย pH meter ควรจะมี pH ประมาณ 8.2 หากน้ำที่ใช้สำหรับการเลี้ยงทดลองนี้ใช้ไม่หมดในเวลา 1 อาทิตย์ จะนำมาอุ่นด้วย hot plate ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงอีกครั้งหนึ่ง

4. การเตรียม stock solution

การเตรียม stock solution ใช้วิธีของ APHA (1965) เป็นมาตรฐาน โดยชั่งสารประกอบของเกลือโลหะหนัก 5 ชนิด คือ ปรอทคลอไรด์, ทองแดงคลอไรด์, สังกะสีซัลเฟต, ตะกั่วไนเตรต และแคดเมี่ยมคลอไรด์ ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า โดยใช้กระดาษชั่งสารและกำหนดให้สารประกอบดังกล่าวแต่ละชนิดมีน้ำหนักต่าง ๆ กัน คือ 0.01, 0.1, 1.0 และ 10.0 กรัม แล้วนำแต่ละหน่วยไปละลายในน้ำทะเลซึ่งได้ผ่านการกรองอย่างสะอาดและมีความเค็มที่ 30 ppt ในปริมาตร 1 ลิตรเท่า ๆ กันหมด ในการนี้จะได้stock solution ซึ่งมีความเข้มข้น 10, 100, 1000, 10000 ppm ตามลำดับ

stock solutionจะเตรียมใหม่ทุก 2 อาทิตย์

ส่วนค่าความเข้มข้นของโลหะหนัก ปรอท, ทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และแคดเมี่ยม จะคำนวณหาจาก stock solution เหล่านี้

5. การหาระดับความเข้มข้นสูงสุดของปรอท, ทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และแคดเมี่ยม ที่ไม่มีผลกระทบต่อการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น(Temnopleurus toreumaticus) ที่อุณหภูมิ 23, 28 และ 33 องศาเซลเซียส

5.1 การหาระดับความเข้มข้นสูงสุดของปรอทที่ไม่มีผลกระทบต่อการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น เมื่อเทียบกับการปฏิสนธิของไข่ในน้ำทะเลปกติ ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ มีวิธีการคือ

5.1.1 จัดหาเครื่องมือตามภาพที่ 7 ใช้อ่างแก้วใสขนาดยาว 20 นิ้ว กว้าง 12 นิ้ว และสูง 9 นิ้ว ที่พื้นก้นอ่างภายในวางอิฐดินเผาขนาดพอประมาณ จำนวน 9 ก้อน เพื่อใช้เป็นที่รองขวดแก้วใสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 6 นิ้ว ซึ่งต่อไปจะใช้เป็นที่ใส่น้ำทะเล

ทดลอง บรรจุน้ำประปาลงในอ่างแก้วจนมีระดับพอที่จะท่วมถึงครึ่งหนึ่งของขวดทดลอง

5.1.2 ใช้ stock solution ของปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 10 ppm นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำทะเลที่กรองสะอาดแล้ว โดยให้มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.24, 0.27, 0.31, 0.36, 0.41, 0.48, 0.55 และ 0.64 ppm (ดัดแปลงตามวิธีของ APHA, 1965) เพื่อใช้สำหรับทดลองว่า ที่ความเข้มข้นระดับใดจะไม่มีผลกระทบต่อการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น

5.1.3 นำสารละลายปรอทที่เตรียมขึ้นทั้ง 8 อย่าง แยกใส่ลงในขวดแก้วที่เตรียมไว้เป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในแต่ละขวด แล้วปิดฝาและทำเครื่องหมายไว้ที่ขวดแต่ละใบตามลำดับ ส่วนขวดใบที่ 9 ใช้เป็นขวดเปรียบเทียบ (control) โดยใส่น้ำทะเลปกติจำนวน 100 มิลลิลิตร

5.1.4 ทำการปรับและควบคุมอุณหภูมิในอ่างแก้วทดลอง โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียก thermostat เพื่อให้ได้อุณหภูมิตามที่ต้องการ โดยใช้เวลาข้ามคืนหรือ 12 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermometer) ตรวจสอบเพื่อให้ได้อุณหภูมิที่ต้องการอีกครั้ง

5.1.5 เตรียมทดลองให้มีการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น ในสารละลายปรอทความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้รวมทั้งในน้ำทะเลปกติ โดยการนำไข่หอยเม่นจำนวน 5,000 ฟอง (นับจำนวนไข่โดยใช้ micropipette ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร) ใส่ในแต่ละขวดแล้วหยดอสุจิที่เข้มข้นลงไป 3 หยด เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิขึ้น ในขั้นนี้ฝาขวดไม่จำเป็นต้องใช้อีก

5.1.6 ตรวจดูไข่หอยเม่นที่ได้รับการปฏิสนธิจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 x 10 ไข่หอยเม่นที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจะสังเกตเห็น fertilization membrane หุ้มรอบไข่ ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจะเหมือนเดิมไม่เกิด fertilization membrane

5.1.7 ทำการเก็บตัวอย่างไข่ 5,000 ฟองทั้งหมดนี้ โดยการนำสารละลายทั้งหมดไป centrifuge เบา ๆ 20 รอบต่อนาที และดูดน้ำทิ้ง และเก็บไข่ทั้งหมดไว้ในเฟอร์มาลิน 1 เปอร์เซนต์ ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.1.8 การนับจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิและไม่ได้รับการปฏิสนธิ ทำได้โดยการสุ่มตัวอย่างมาครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาใส่ใน slide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.1.9 นับจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิและไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ รวมกันให้ได้จำนวน 500 ฟอง และนำมาเฉลี่ยหาค่าเปอร์เซนต์ของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิและเปอร์เซนต์ของไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ

5.1.10 ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

5.2 การหาระดับความเข้มข้นสูงสุดของทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และแคดเมี่ยม ที่ไม่มีผลกระทบต่อการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น ที่อุณหภูมิ 23, 28 และ 33 องศาเซลเซียส ทำตามวิธีข้อ 5.1

6. <u>การหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของปรอท, ทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และแคดเมี่ยม ที่มีผลในการยับยั้ง การปฏิสนธิของไข่หอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus) ที่อุณหภูมิ 23, 28 และ 33 องศาเซลเซียส</u>

6.1 การหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของปรอทที่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ มีวิธีการ คือ

6.1.1 เหมือนข้อ 5.1.1

6.1.2 ใช้ stock solution ของปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 100 ppm นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำทะเลที่เตรียมไว้ โดยให้มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 27.33, 31.03, 36.19, 41.37, 48.02, 55.41, 64.27 และ 73.88 ppm (ดัดแปลงตามวิธีของ APHA, 1965)

6.1.3 การหาระดับความเข้มข้นของปรอทที่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น ทำตามวิธีเดียวกับข้อ 5.1.3 - 5.1.5

6.1.4 ทำการสุ่มตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร 10 ครั้ง ที่แต่ละความเข้มข้น เพื่อที่จะหาว่าความเข้มข้นของปรอทระดับไหน ที่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิของไข่ ซึ่งจะทำให้เห็นไข่เหมือนกับครั้งแรกที่ยังไม่ได้รับการผสมด้วยอสุจิ โดยที่ไม่มี fertilization membrane เกิดขึ้น

6.1.5 ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

6.2 การหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และแคดเมี่ยม ที่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ ดังกล่าว ทำตามวิธีข้อ 6.1

7. <u>การศึกษาผลกระทบของปรอท, ทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และ แคดเมี่ยม ที่อุณหภูมิ 23, 28 และ 33 องศาเซลเซียส ที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอถึงตัวอ่อนระยะพลูเทียสของหอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus)</u>

7.1 การศึกษาผลของปรอทที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอ ถึงตัวอ่อนระยะพลูเทียสของหอยเม่น ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ มีวิธีการดังต่อไปนี้

7.1.1 ใช้ความเข้มข้นของปรอทเป็น 0.36 ppm ศึกษาผลการเจริญของไข่หอยเม่นตั้งแต่ปฏิสนธิถึงตัวอ่อนระยะพลูเทียส ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ ดังกล่าว

7.1.2 เตรียมสารละลายของปรอท 0.36 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 6 นิ้ว และเตรียมน้ำทะเลที่กรองสะอาดแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วเช่นเดียวกัน

7.1.3 นำไข่หอยเม่น 10^5 ฟอง ผสมกับอสุจิที่เข้มข้น 1 มิลลิลิตร ในสารละลายปรอท 0.36 ppm และในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ในระยะเวลาเพียง 10 นาที ไข่หอยเม่นจะได้รับการปฏิสนธิ จะทำการดูดน้ำส่วนบนทิ้ง เพื่อกำจัดอสุจิที่เหลือออก เพื่อป้องกันการเกิด polyspermy

7.1.4 ทำการแยกไข่หอยเม่นที่กำหนดให้มีการปฏิสนธิในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปเลี้ยงในสารละลายปรอท 0.36 ppm และอีกส่วนหนึ่งนำไปเลี้ยงในน้ำทะเลปกติ ส่วนไข่หอยเม่นที่ได้รับการปฏิสนธิในสารละลายปรอท 0.36 ppm จะนำไปเลี้ยงต่อในสารละลายปรอท 0.36 ppm เช่นเดิม

7.1.5 เอมบริโอทั้งหมดนี้จะเลี้ยงไว้ในขวดแก้วใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 6 นิ้ว ด้วยปริมาตรสารละลาย 100 มิลลิลิตร และมีการให้อากาศโดยใช้เครื่องเป่าอากาศอย่างเบา ๆ ตลอดเวลา (ตามภาพที่ 8) การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และจะมีการเก็บตัวอย่างทุกระยะเวลา 1 ชั่วโมง

7.1.6 ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ (23, 28 และ 33 องศาเซลเซียส) จะศึกษาผลของปรอทที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอ โดยการติดตามผลการศึกษาตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้วเจริญถึงตัวอ่อนขั้นพลูเทียส ซึ่งแบ่งการเจริญเป็น 7 ระยะ คือ ระยะ cleavage, ระยะ blastula, ระยะ swimming blastula ระยะ mesenchyme blastula, ระยะ gasttrula ระยะ pyramid (prism) และระยะ pluteus พร้อมทั้งศึกษาการตายของเอมบริโอในระยะเวลาที่พร้อมกับศึกษาการเจริญของเอมบริโอด้วย

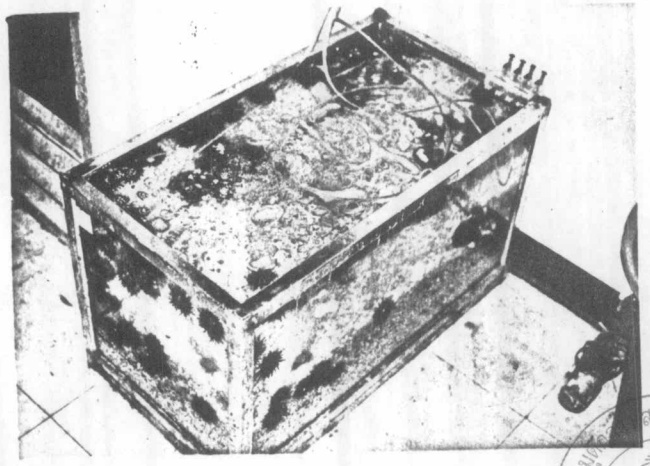
7.2 การศึกษาผลของทองแดง, สังกะสี, ตะกั่ว และแคดเมี่ยม ที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอ ถึงตัวอ่อนระยะพลูเทียสของหอยเม่น ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ เช่นเดียวกัน ทำตามวิธีการเดียวกับข้อ 7.1 แต่ใช้ความเข้มข้นของทองแดงเป็น 0.38 ppm ความเข้มข้นของสังกะสีเป็น 0.40 ppm ความเข้มข้นของตะกั่วเป็น 5.44 ppm และความเข้มข้นของแคดเมี่ยมเป็น 27.56 ppm

ภาพที่ 5 หอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus) ถูกเลี้ยงไว้ในอ่างแก้ว ขนาด 100 ลิตร เพื่อไว้ใช้ในการทดลอง

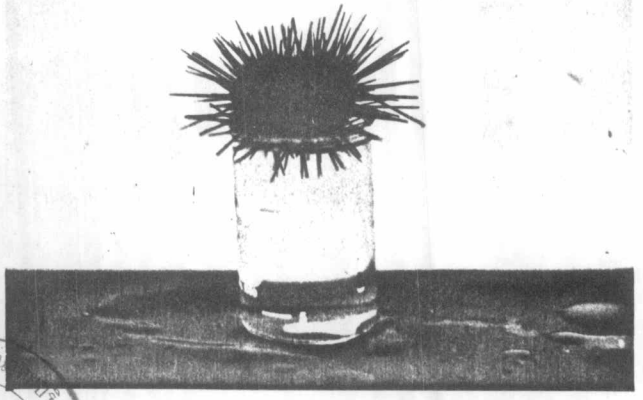
ภาพที่ 6 หอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 0.5 M KCL จะนำจุมลงบีคเกอร์ขนาด 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลไว้เต็มแล้ว เพื่อให้ปล่อยไข่หรือตัวอสุจิ

ภาพที่ 7 อ่างแก้วขนาด 25 ลิตร พร้อมด้วยขวดทดลอง และเครื่องปรับอุณหภูมิ (thermostat) เพื่อใช้ศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนักที่มีผลต่อการปฏิสนธิของไข่หอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus)

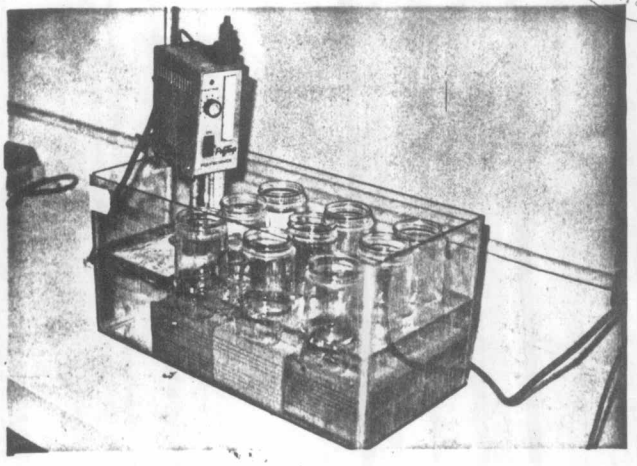
ภาพที่ 8 อ่างแก้วขนาด 25 ลิตร พร้อมด้วยขวดที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งมีเครื่องพ่นอากาศ (aeration) เพื่อใช้ศึกษาการเจริญของเอมบริโอถึงตัวอ่อนระยะพลูเทียสของหอยเม่น (Temnopleurus toreumaticus)



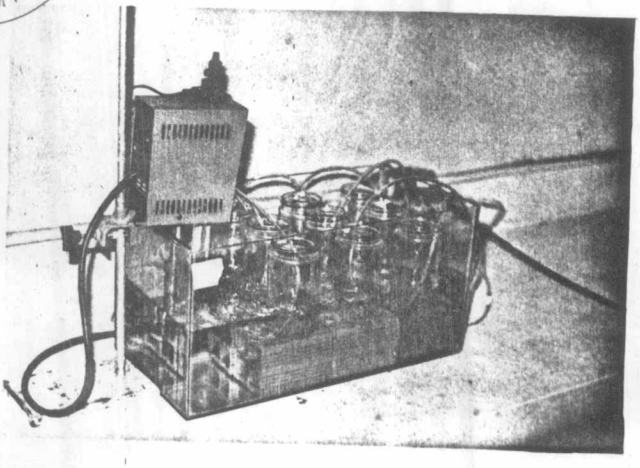
ภาพที่ 5



ภาพที่ 6



ภาพที่ 7



ภาพที่ 8

8. สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลคือ

ใช้วิธีวิเคราะห์วาเหรียนซ์ (Analysis of Variance) กับ treatment และ replication treatment เมื่อทำการทดสอบด้วย Analysis of Variance แล้วพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จะทำการทดสอบอีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test การทดสอบทางสถิติทั้ง 2 แบบนี้ จะทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซนต์

วิธีวิเคราะห์วาเหรียนซ์ (Analysis of Variance)

สำหรับ Randomized Complete Block Design

Treatment $i = 1,2,3$	Replication $j = 1,2,3$			Total
	1	2	3	
ปฏิสนธิและเลี้ยงเอมบริโอในน้ำทะเลปกติ	X_{11}	X_{12}	X_{13}	$X_{1\cdot}$
ปฏิสนธิในน้ำทะเลปกติแล้วเอมบริโอถูกนำมาเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีโลหะหนัก	X_{21}	X_{22}	X_{23}	$X_{2\cdot}$
ปฏิสนธิและเลี้ยงเอมบริโอในน้ำทะเลที่มีโลหะหนัก	X_{31}	X_{32}	X_{33}	$X_{3\cdot}$
รวม	X_1	X_2	X_3	

(1) Total SS = $X_{ij}^2 - (X_{ij})^2/rt$

(2) Treatment SS = $(X_i^2)/r - CT$

(3) Replication SS = $(X_j^2)/t - CT$

(4) Error SS = (1) - (2) - (3)

CT = correct term

r = จำนวนซ้ำในแต่ละทรีทเมนต์

t = จำนวนทรีทเมนต์

ผลการวิเคราะห์วาเหรียนซ์

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	(t-1)	(2)	(2)/(t-1)	MS/df
Replication	(r-1)	(3)	(3)/(r-1)	
Error	(t-1)(r-1)	(4)	(4)(t-1)(r-1)	
Total				

การเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range Test

วิธีคำนวณโดยใช้

$S\bar{x}$ = $\sqrt{\text{error mean square}/r}$