บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

หอยสองฝา ที่ใช้ในการทดลอง 5 ชนิด คือ หอยแครง Anadara granosa (Linn.) หอยแมลงภู่ Mytilus viridis (Linn.) หอยนางรม Crassostrea commercialis (Iredale & Roughly) หอยเสียบ Donax faba (Chemnitz) และ หอยลาย Paphia undulata (Born)

หอยเหล่านี้ได้นำมาจากบริเวณต่าง ๆ กันตามแหล่งที่พบชุกชุม หอยแครงและหอยลายได้มาจาก บางตะบูน จ. เพชรบุรี หอยนางรม, หอยเสียบและหอยแมลงภู่ นำมาจาก ต. อ่างศิลา จ. ชลบุรี

เมื่อได้หอยแล้วนำมาล้างให้สะอาด แล้วพักไว้ในตู้เลี้ยงที่มีน้ำทะเลความเค็มประมาณ 28 - 30 ‰ แล้วให้อาหารพวกแพลงตอนพืช ทิ้งไว้ข้ามคืน จึงนำหอยมา acclimate ที่อุณหภูมิที่จะทดลองที่กำหนดไว้ 6 ระดับ คือ 17 °c 20°c 25°c 30 °c 35 °c และ 38 °c โดยนำหอยมาใส่ในภาชนะซึ่งมีน้ำทะเลความเค็มเท่าเดิม น้ำทะเลที่ใช้ผ่านการกรองด้วย millipore filter (0.45 μ) แล้ว Water bath ไว้ในอ่างสี่เหลี่ยม ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิจากเดิมอย่างช้า ๆ จนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ (35 °c และ 38 °c) ภายในเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องปรับระดับอุณหภูมิอัตโนมัติแบบ Polytemp (ของ Polyscience Corporation Illinoids USA) ส่วนที่อุณหภูมิ 30 °c นั้นใช้อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 - 30 °c) สำหรับที่อุณหภูมิต่ำนั้นนำหอยเข้าไปเลี้ยงในห้องซึ่งปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศ (25°c และ 20°c) ซึ่งได้ตั้งไว้ล่วงหน้าแล้ว ส่วนที่ 17 °c นั้น ได้ใช้หอยที่ acclimate ไว้ที่ 20°c

มา Water bath ด้วยน้ำซึ่งแช่น้ำแข็ง เพื่อให้อุณหภูมิลดต่ำลงจนถึงประมาณ 17°c เฉพาะอุณหภูมินี้ acclimate ไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำหอยไปทดลอง ส่วนที่อุณหภูมิอื่น ๆ ได้ acclimate ไว้นาน 3-4 วัน จึงเริ่มทดลอง เปลี่ยนน้ำให้ทุกวัน แต่ไม่ให้อาหารตลอดระยะเวลาของการ acclimate

การวัดอัตราการกรองของหอยสองฝาสำหรับการวิจัยนี้ ได้ใช้วิธีออม โดยเลือกใช้อนุภาคที่จะเป็นดัชนีในการวัด 2 ชนิด คือ

1. แพลงตอนพืช 3 ชนิด คือ Chlorella A, Chlorella T และ Chaetoceros calcitran ซึ่งได้พันธุ์จากกองประมงทะเล สาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน เลี้ยงโดยใช้อาหารสูตร D-1 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

KNO_3	200 มล.	1 %	solution
K_2HPO_4	2 "	10 %	"
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	10 "	10 %	"
Thiamine	4 "	0.1 %	"
B_{12}	2 "		
Biotin	2 "		
Trace element	20 "		
น้ำกลั่น	20 "		

ใช้ส่วนประกอบ D-1 นี้ 12 มล. ต่อน้ำทะเล 1 ลิตร

003979

ส่วนผสมของ Trace element (1,000 มล.)

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2	กรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.62	"
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25	"
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.13	"
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.004	"
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.004	"
EDTA	6	"

วัด pH สุดท้ายได้ 7.8 - 8.0

2. สี Neutral Red ซึ่งเป็นสีย้อมที่ไม่เป็นอันตรายหรือรบกวนต่อการกรองของหอย

1. <u>การหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาหร่ายกับ Optical Density (O.D.)</u>

ในการวัดความเข้มข้นของสาหร่ายโดยใช้ spectrophotometer (Spectronic 20 ของ Buch & Lomb.) ได้ใช้ตามวิธีของ Ali (1970) ซึ่งเขาใช้วัดด้วย Spekler photoelectric absorptiometer (Model H-760) แทนที่จะใช้วิธีนับเซลล์ด้วย Haemacytometer ทุกครั้งของการทดลอง ซึ่งเปลืองเวลาและแรงงานมาก

น้ำ Culture ของแพลงตอนพืชแต่ละชนิดที่จะใช้ในการทดลองมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันประมาณ 5-6 ระดับ นำไปวัด O.D. ที่ช่วงคลื่น 760 nm

และนำเอาแพลงตอนพืชที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันนั้นมานับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer คำนวณหาความเข้มข้นเป็นเซลล์/มล. แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง O.D. กับความเข้มข้นของแพลงตอนพืชทั้ง 3 ชนิด และหาความสัมพันธ์โดยวิธี least square method. โดยใช้สูตร

$$y = \bar{y} + b\ (x-\bar{x})$$

$$b = \frac{\Sigma\ (x-\bar{x})(y-\bar{y})}{(x-\bar{x})^2}$$

2. <u>การหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Neutral Red กับ Optical Density (O.D.)</u>

ในการหาความเข้มข้นของ Neutral Red นั้นใช้วิธีวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 20 ของ Buch &Lomb) เพื่อหา Curve มาตรฐานไว้ใช้ในการเปลี่ยนจากค่า O.D. ที่วัดได้ให้เป็นความเข้มข้นโดยชั่ง Neutral Red 0.009 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 250 มล. เป็น stock solution (ซึ่งจะมีความเข้มข้น 3.6×10^{-5} กรัม/มล.) แบ่งสารละลายจาก stock solution มาจำนวนหนึ่ง แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 250 มล. จะสามารถคำนวณความเข้มข้นได้ดังนี้

ขวดที่	ปริมาณ Stock solution (มล.)	ความเข้มข้น (กรัม/มล.)
1	10	14.4×10^{-7}
2	7	10.1×10^{-7}
3	4	5.7×10^{-7}
4	3	4.3×10^{-7}
5	2	2.9×10^{-7}
6	1	1.4×10^{-7}
7	0.5	0.72×10^{-7}

นำสารละลายทั้ง 7 ขวด มาเติมกรดเกลือ (HCl)1 N ขวดละ 4-5 หยด เขย่าให้ทั่ว เมื่อสารละลายเป็นสีแดงอย่างถาวรแล้ว นำไปวัด O.D. ที่ช่วงคลื่น 520 nm แล้วเขียนกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่าง O.D. กับความเข้มข้นของ Neutral Red หาความสัมพันธ์โดยวิธี least square Method โดยใช้สูตร

$$y = \bar{y} + b\,(x-\bar{x})$$

$$b = \frac{\Sigma (x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\Sigma (x-\bar{x})^2}$$

3. วิธีการวัดอัตราการกรองของหอยสองฝา

3.1 ใช้แพลงตอนพืช

ใช้แพลงตอนพืชที่ทดลองครั้งละ 1 ชนิด ผสมกับน้ำทะเลซึ่งผ่านการกรองด้วย millipore fillter แล้ว ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.3 - 0.5 เซลล์/มล. ซึ่งความเข้มข้นในช่วงนี้จะไม่สูงเกินไปที่จะระงับการกรองอาหารของหอย และไม่ต่ำเกินไปจนเครื่องมือวัดไม่ได้

ตวงสาหร่ายที่ผสมไว้แล้วนี้ใส่โหลทดลอง 4 โหล ๆ ละ 2 ลิตร (V) ตั้งไว้ในอ่างน้ำ ซึ่งปรับอุณหภูมิให้เท่ากับที่จะทดลอง แล้วนำหอยที่ acclimate ไว้ล่วงหน้าใส่ลงในโหลทดลอง 3 โหล เพื่อทำการทดลองอย่างเดียวกันซ้ำ 3 ชุด ที่เหลืออีก 1 โหล ไม่ต้องใส่หอย เก็บไว้เป็น Control เพื่อหาค่าแก้ อันเนื่องจากการตกตะกอนของสาหร่าย หรือการแบ่งเซลล์ของสาหร่ายระหว่างการทดลอง

เมื่อเริ่มต้นทดลอง sampling สาหร่ายในโหล Control ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้ปิเปตดูดตรงบริเวณส่วนกลางของขวดน้ำ แล้ววัดด้วย Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 760 nm เมื่อสังเกตุเห็นว่าหอยเริ่มอ้าปากกรองน้ำ ก็เริ่มจับเวลา ปล่อยให้หอยกรอง

น้ำนาน 1 ชั่วโมง (t) แล้ว Sampling สาหร่ายในโหลทั้ง 4 ไปวัดO.D. อีกครั้ง (C_t) เสร็จแล้วนำหอยจากโหลทั้งสามแกะเนื้อออก ซับน้ำให้แห้งพอประมาณ ชั่งน้ำหนักหอยแต่ละโหล

คำนวณหาอัตราการกรองของหอย โดยถือหลักว่า ถ้าหอยมีอัตราการกรองคงที่แล้ว ความเข้มข้นของ suspension จะลดลงอย่างสม่ำเสมอ และต่อเนื่องตลอดเวลาที่หอยกรอง ซึ่งจะเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$\frac{dc}{dt} = -C_o\left(\frac{F}{V} + a\right) \text{ ----------(1)}$$

เมื่อ $\frac{dc}{dt}$ คือ อัตราการลดลงของความเข้มข้นเมื่อเริ่มต้นจาก C_o

t คือ ช่วงเวลาที่หอยกรอง

F คือ อัตราการกรองของหอยในภาชนะทดลอง

a คือ อัตราการตกตะกอนของ suspension

V คือ ปริมาณ susponsion

จากสมการ (1) จะได้ $C_t = C_o \exp^{-(\frac{F}{V} + a).t}$

ใส่ ลอการิทึมธรรมชาติและจัดพจน์ใหม่ จะได้

$$F = V \left\{\frac{(\ln C_o - \ln C_t)}{t} - a\right\} \text{ ----------(2)}$$

ซึ่งจะหาค่า a จากโหล Control ที่ไม่มีหอย ได้ $a = \frac{\ln Co - \ln C_t}{t}$ ------(3)

ใช้สมการ (2) และ (3) คำนวณหาค่าอัตราการกรองของหอย และคำนวณหาค่าอัตราการกรองต่อ 1 หน่วยน้ำหนักเปียกของหอย (ลิตร/ช.ม./กรัม) ค่าที่คำนวณได้นี้นำมาวิเคราะห์

ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ Variance แบบ Fixed Effect, Completely Randomized, 2- Way Classification, n- observation Per Cell Model โดยตั้งสมมุติฐานว่า

1. อัตราการกรองที่แต่ละระดับอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน
2. อัตราการกรองไม่มีความแตกต่างกันเนื่องมาจากชนิดของสาหร่าย
3. อัตราการกรองไม่มีความแตกต่างกันเนื่องมาจากชนิดของสาหร่าย และอุณหภูมิซึ่งจะมีอิทธิพลร่วมกัน

โดยใช้ตารางวิเคราะห์ Variance ดังนี้

Source of Variation	Sum of Square	Degree of freedom	Means Square	F
อุณหภูมิ (A)	$S_A=\frac{1}{bn}\sum^{a} T_{i...}^2-\frac{T_{...}^2}{abn}$	a-1	$S_A=\frac{S_A}{a-1}$	$F_A=\frac{S_A}{S_E}$
ชนิดของสาหร่าย(B)	$S_B=\frac{1}{an}\sum^{b} T_{.J.}^2-\frac{T_{...}^2}{abn}$	b-1	$S_B=\frac{S_B}{b-1}$	$F_B=\frac{S_B}{S_E}$
A X B	$S_{AB}=\Sigma\Sigma\Sigma X_{ijk}^2-\frac{T_{...}^2}{abn}-S_A-S_B$	(a-1)(b-1)	$S_{AB}=\frac{S_{AB}}{(a-1)(b-1)}$	$E_{AB}=\frac{S_{AB}}{S_E}$
Error	$S_E=S_T-(\Sigma\Sigma\Sigma X_{ijk}^2-\frac{T_{...}^2}{abn})$	ab(n-1)	$S_E=\frac{S_E}{ab(n-1)}$	
Total	$S_T=\Sigma\Sigma\Sigma X_{ijk}^2-\frac{T_{...}^2}{abn}$		abn-1	

ถ้าค่า $F_A < F^{a-1}_{an(n-1)}$ ที่เปิดได้จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ 99 % แสดงว่ายอมรับสมมุติฐานข้อ 1. ทำนองเดียวกันถ้า F_B และ F_{AB} มีค่าน้อยกว่า $F^{b-1}_{bn(n-1)}$ และ $F^{(a-1)(b-1)}_{ab(n-1)}$ ที่เปิดได้จากตาราง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ 99 % แสดงว่ายอมรับสมมุติฐานข้อ 2 และ 3 ตามลำดับ

3.2 ใช้สี Neutral Red

ผสม Neutral Red กับน้ำทะเลที่อุณหภูมิที่ต้องการ ให้มีความเข้มข้นประมาณ 7.4×10^{-7} ถึง 9.5×10^{-7} กรัม/มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะ ตวงน้ำผสม Neutral Red ใส่โหล 4 โหล ปรับระดับอุณหภูมิแล้วทำเช่นเดียวกับที่ใช้ทดลองด้วยสาหร่าย เพียงแต่เปลี่ยนจากการใช้ Phytoplankton เป็นสี Neutral Red เท่านั้น ในการวัด Optical Density ของ Neutral Red ต้องทำให้เป็นกรดด้วย HCl 1 N 2-3 หยด เพื่อให้เกิดสีแดงอย่างถาวร แล้วเอาหอยจากโหลทั้ง 3 แกะเนื้อออก ซับ น้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักหอยแต่ละโหล

เนื่องจากหอย 5 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองมีขนาดตัวต่าง ๆ กัน และอัตราการกรองมากน้อยต่างกัน จึงใส่หอยลงในโหลทดลองจำนวนต่างกันดังนี้ หอยแมลงภู่ (ขนาดประมาณ 2.5 - 3 ซ.ม.) หอยนางรม (ขนาดประมาณ 3 - 4 ซ.ม.) หอยลาย (ขนาดประมาณ 3 - 3.5 ซ.ม.) ชนิดละ 5 ตัว/โหล ส่วนหอยแครง (ขนาดประมาณ 2.5 - 3 ซ.ม.) หอยเสียบ (ขนาดประมาณ 1.5 - 2 ซ.ม.) 6 ตัว/โหล

จากผลการทดลองที่ได้ นำมาคำนวณหาค่าอัตราการกรองจากสูตร $F=V\left\{\frac{(\ln C_o - \ln C_t)}{t} - a\right\}$ และหาค่าอัตราการกรองต่อ 1 หน่วยน้ำหนักเปียกของหอย (ลิตร/ช.ม./กรัม) ค่าที่คำนวณได้นี้ นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ Variance แบบ Fixed effect, Completely Randomized, 1-Way Classification Model โดยตั้งสมมุติฐานว่า ค่าเฉลี่ยของอัตราการกรองของหอย

แต่ละระดับอุณหภูมิมีค่าเท่ากัน โดยใช้ตารางวิเคราะห์ Variance ดังนี้

Source of Variance	Sun of Square	Degree of freedom	Means Square	F
Treatment	$S_A = \sum \frac{X_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{n}$	a-1	$S'_A = S_A/a-1$	$F = \frac{S'_A}{S_E}$
Error	$S_E = S_T - S_A$	n-a	$S'_E = S_E/n-a$	
Total	$S_T = \sum\sum X_{ij}^2 - \frac{T^2}{n}$	n-1		

ถ้าค่า F น้อยกว่า F_{n-a}^{a-1} ที่เปิดได้จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ก็ถือว่ายอมรับสมมุติฐานที่ตั้งขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ดูว่าที่ระดับอุณหภูมิคู่ใดบ้างที่ที่ค่าอัตราการกรองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้วิธีทดสอบ Pairwise ถ้า

$|X_{i.} - X_{.j}| \geq \sqrt{2n.S_E F_{n-a}^{1}(0.05)}$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ