วิธีการ

1. สถานที่เพาะเลี้ยง ช่วงเวลา และสภาพแวดล้อมระหว่างการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยา อาคาร 2 ชั้น 2 ห้อง 2210 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงระหว่าง 30.7 ± 3.75°ซ ในระหว่างเดือนเมษายน-พฤษภาคม 2527 เป็นเวลา 40 วัน แบ่งช่วงการทดลองออกเป็น 2 ช่วงการทดลองดังนี้ ช่วงการทดลองที่ 1 เลี้ยง Ectocyclops sp. ด้วยโปรโตซัว (Paramecium sp.) ตั้งแต่วันที่ 1-20 เมษายน 2527 ที่อุณหภูมิ 31.7 ± 2.8°ซ และช่วงการทดลองที่ 2 เลี้ยง Ectocyclops sp. ด้วยสาหร่ายสีเขียว (Chlorella sp.)ตั้งแต่วันที่ 26 เมษายน -15 พฤษภาคม 2527 ที่อุณหภูมิ 30 ± 3°ซ ได้จัดสภาพที่อยู่สัตว์ทดลองดังนี้

- Chlorella sp. ตั้งเพาะเลี้ยงไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ ตลอดเวลา
- Paramecium sp. ตั้งเพาะเลี้ยงไว้ในสภาพแสงธรรมชาติในห้องทดลองโดยตรง และไม่อยู่ในทิศทางที่มีลมพัดผ่านมากนัก เพราะอาจทำให้เกิดการระเหยของน้ำมากเกินไป
- ควรวัดอุณหภูมิทำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์สูงสุด-ต่ำสุด วัดในตอนเช้าระหว่างช่วง 8.30 ± 1.00 น. บันทึกอุณหภูมิที่ได้และตอนเย็นระหว่าง 17.00 ± 1.00 น.

2. การเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตเพื่อไว้ใช้ในการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยง Ectocyclops sp.

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ใช้กระบวยตักน้ำ ตักน้ำตามบริเวณขอบสระน้ำที่มีพืชน้ำพวกสาหร่าย จอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหน ค่อย ๆ ตักน้ำ โดยพยายามไม่ให้น้ำกระเพื่อนหรือกวนน้ำเสียก่อน จากนั้นนำมาถ่ายในภาชนะที่มีน้ำสะอาด เพื่อตรวจแยกชนิดของไรน้ำที่ใช้ในการวิจัยตามการจำแนก dichotomous keys ของ Pratt (1951) ดังแสดงในภาคผนวก ข หน้า 72-76

2.1.2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็น stock culture

โดยอาศัยแนวการเพาะเลี้ยงของ Coker (1967) ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสัตว์กลุ่ม copepods และ Brandle (1973) ได้เพาะเลี้ยง cyclopoid copepods ในห้องปฏิบัติการ ทำได้โดยแยกการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน

- เตรียมขวดแก้วใสปากกว้างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. จำนวน 1 ใบ
- ใช้ไมโครปิเปตดูด *Ectocyclops* sp. จากข้อ 2.1.1 มาจำนวน 1 ตัว ใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้ข้างต้น
- เลี้ยงด้วย *Paramecium* sp. ผสมกับ *Chlorella* sp. ในปริมาณที่เกินพอ

ขั้นตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็น stock culture

- ใช้ไมโครปิเปตดูด *Ectocyclops* sp. ตัวเมียจากการเลี้ยงชุดแรกมาจำนวน 6 ตัว
- ใส่ *Ectocyclops* sp. ในขวดแก้วใสปากกว้างที่บรรจุน้ำจากธรรมชาติที่กรองแล้ว 20 มล.
- เลี้ยงด้วย *Paramecium* sp. ผสมกับ *Chlorella* sp. ในปริมาณที่เกินพอ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงนี้ควรตรวจอาหารเพื่อให้แน่ใจว่า *Paramecium* sp. และ *Chlorella* sp. มีอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ตั้งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ ไม่ให้ได้รับแสงส่องมาตรง ๆ แล้วตรวจอาหารว่ามีอยู่เสมอ ถ้ามีการระเหยของน้ำก็เติมน้ำกลั่นลงไป ส่วนตะกอนของสาหร่ายและของเสียก็ดูดออกบ้าง

2.1.3 การจำแนกชนิดของ Ectocyclops sp.

นำ Ectocyclops sp. ที่เพาะเลี้ยงเก็บไว้จากข้อ 2.1.2 มาจำแนกชนิดเริ่มจาก Class Subclass Order Suborder และ Genus ตามลักษณะ dichotomous keys ที่ Pratt (1951) บรรยายไว้ตามลำดับจนถึง Genus และเพื่อให้มั่นใจว่าเป็นลักษณะดังกล่าวแล้วได้ศึกษาลักษณะ type description ไว้ท้าย dichotomous keys ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ข หน้า 76-83 ประกอบด้วย

2.2 การเพาะเลี้ยง Paramecium sp.

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนสัตว์เซลล์เดียว (ฟองจันทร์, 2522)

โดยวิธีการหมักใบไม้แห้งรวมกับน้ำที่ศักมาจากธรรมชาติใส่ในขวดแก้วใสปากกว้างและตื้น โดยไม่ให้แน่นจนเกินไป ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน

2.2.2 การแยก Paramecium sp. โดยอาศัยวิธีการของ Kudo (1966) ทำได้โดย

- ดูดน้ำที่หมักไว้จากข้อ 2.2.1 ลงบนสไลด์ ตรวจหา Paramecium sp. โดย Low power ของกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า
- ใช้ไมโครปิเปตดูดเอา Paramecium sp. จากสไลด์ขณะที่สังเกตโดย low power ซึ่งจะได้โปรโตซัวต่าง ๆ มา 2-3 ชนิดเข้าไปในไมโครปิเปต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หยดน้ำที่มี Paramecium sp. ในไมโครปิเปตลงในอาหารน้ำต้มฟาง ที่บรรจุไว้ในขวดแก้วใสที่ปรับ pH 7-8 ด้วย NaOH เพราะเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงโปรโตซัวจำพวกซิลิเอต (Kudo, 1966) ตั้งทิ้งไว้ 4-5 วัน จะได้โปรโตซัว 1-2 ชนิด
- ทำเนินการซ้ำโดยดูด Paramecium sp. จากอาหารน้ำต้มฟางบนสไลด์ แล้วนำไปเลี้ยง ทำหลายครั้งผลสุดท้ายจะได้ Paramecium sp. ที่เป็นโปรโตซัวจำพวกซิลิเอต

2.2.3 การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็น stock culture

- ใช้หลอดหยดดูด Paramecium sp. ที่แยกได้ เลี้ยงในน้ำต้มฟางที่บรรจุไว้ในขวดแก้วใส มี pH 7-8 ตั้งเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- เปลี่ยนอาหารเมื่อตรวจพบว่ามี Paramecium sp. เป็นจำนวนมากใน culture อาจเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ เพื่อกำจัดปัญหาเกี่ยวกับการสะสมของเสียโดยทำการถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่
- ใช้กระดาษ pH ตรวจ pH ของอาหารใน culture อยู่เสมอ พยายามรักษาระดับ pH ให้มี 7-8 และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ทำโดยเติมอาหารใหม่ลงไปในปริมาณเท่ากับอาหารที่ดูดออกมา และเป็นการเพิ่มอาหารให้แก่ culture ด้วย

2.2.4 การจำแนกชนิดของ Paramecium sp.

นำ Paramecium sp. ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็น stock จากข้อ 2.2.3 มาจำแนกชนิดตามลักษณะ dichotomous keus ของ Farmer (1980) ที่บรรยายไว้ดังในภาคผนวก ค หน้า 84-89 ตามลำดับ จนถึง Genus ซึ่งมีลักษณะตรงตามของ Paramecium sp. ที่ใช้ในการวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาลักษณะของ Paramecium sp. อาศัยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาประกอบในการศึกษาลักษณะรายละเอียด

2.3 การเพาะเลี้ยง Chlorella sp.

2.3.1 การเก็บตัวอย่าง

ใช้กระบวยตักน้ำ ตักน้ำตามบริเวณสระน้ำที่มีสีน้ำพวก จอก แหน หรือตามคูน้ำที่มีน้ำออกสีเขียว ๆ แล้วนำมาถ่ายในภาชนะ เพื่อตรวจหาสาหร่ายสีเขียวด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วตั้งน้ำทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

2.3.2 การแยก Chlorella sp.

โดยใช้วิธีการของ Stein (1973) ที่ดัดแปลงโดยอิสระ (2522) เลี้ยงบนอาหารแข็งด้วยวิธีการ spread plate และ streak plate ดังนี้

- เตรียมอาหารแข็งโดยใช้ algae agar 17 กรัม ละลายในน้ำ 100 มล. ต้มแล้วใส่จานเพาะเลี้ยง ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว อาหารวุ้นหนาประมาณ $\frac{1}{2} - \frac{2}{3}$ ของจาน
- ใช้หลอดหยดดูดตะกอนของน้ำที่มีสาหร่ายอยู่จากข้อ 2.3.1 จำนวน 2 หยด หยดตรงกลางของจานที่เตรียมไว้ แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหารวุ้น
- ปิดฝาจานแล้วคว่ำ นำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ กำลังส่องสว่าง 40 วัตต์ ที่อุณหภูมิห้อง คอยตรวจดูการเจริญของสาหร่ายด้วยสายตา หรือด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- แยกสาหร่ายซ้ำจากที่เพาะเลี้ยงไว้แล้ว โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อทำ streak plate บนผิวอาหารวุ้นอีกครั้งหนึ่ง หรือหลายครั้งจนกระทั่งได้ Chlorella sp. ที่เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดหนึ่ง

2.3.3 การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็น stock culture

- เตรียมอาหารเหลวโดยใช้ algae agar ปริมาณ 9.3 กรัม ละลายในน้ำ 500 มล. ต้มพักไว้ให้เย็น กรองด้วยกระดาษกรอง เทใส่ขวดแก้วใสที่มีฝาปิด ประมาณขวดละ 20 มล.
- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ เขี่ยสาหร่ายจากอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.2
- นำขวดแก้วไปวางไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ สังเกตดูระยะเวลาการเจริญ โดยสังเกตสีของสาหร่ายจะซีดลง แล้วจึงทำการถ่ายลงในอาหารใหม่ แล้วนำไปตั้งไว้ยังที่เหมาะสมต่อการเจริญ

2.3.4 การจำแนกชนิดของ Chlorella sp.

- นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไว้เป็น stock จากข้อ 2.3.3 มาจำแนกชนิดตาม dichotomous keys ของ Whitford and Schumacher (1968) ที่บรรยายไว้ในภาคผนวก ง หน้า 90-98 ตามลำดับจนถึง Genus ซึ่งปรากฏลักษณะตรงกับของ Chlorella sp. ที่ใช้ในการวิจัย

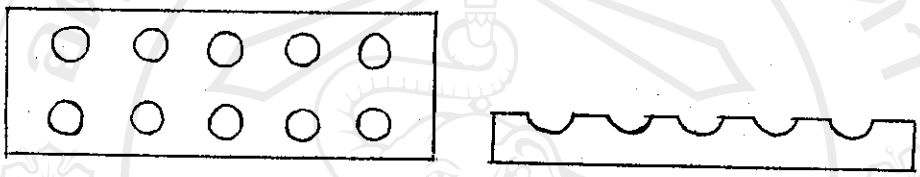
การศึกษาลักษณะของสาหร่าย อาศัยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาประกอบในการศึกษาลักษณะรายละเอียด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดลองเลี้ยงเปรียบเทียบการเพิ่มประชากรของ Ectocyclops sp. ที่เลี้ยงด้วย Paramecium sp. กับที่เลี้ยงด้วย Chlorella sp.

3.1 การทดลองเลี้ยง Ectocyclops sp. ด้วย Paramecium sp. ทำได้โดย

3.1.1 เตรียมสไลด์หลุม 1 สไลด์ ซึ่งมีจำนวนหลุม 10 หลุม แต่ละหลุมมีความลึกประมาณ 0.5 มล. ดังแผนผัง



ด้านบน ด้านข้าง

ภาพที่ 5 แผนภาพแสดงสไลด์หลุม

3.1.2 ใส่น้ำจากธรรมชาติที่กรองแล้วประมาณ 0.4 มล. ลงในสไลด์หลุมเพียง 1 หลุม

3.1.3 ใช้ปิเปตดูด Ectocyclops sp. ตัวเมีย 1 ตัว ที่มีไข่ 20 ฟอง จากที่เพาะเลี้ยงไว้เป็น stock ใส่ในสไลด์หลุม 1 หลุม ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2

3.1.4 เลี้ยง Ectocyclops sp. ด้วย Paramecium sp. จากที่เพาะเลี้ยงไว้เป็น stock ในปริมาณที่เกินพออยู่เสมอ ซึ่งจะมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจปริมาณอาหารทุกครั้งก่อนให้ครั้งต่อไป เพื่อให้แน่ใจว่ายังคงมีอาหารอยู่

3.1.5 ตั้งภาชนะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจทุกวัน เมื่อพบว่ามีการฟักไข่จนเป็น nauplius ก็ทำการแยก nauplius ออกไปเลี้ยงในสไลด์หลุมจำนวน 1 ตัวต่อ 1 หลุม

3.1.6 เลี้ยงด้วย Paramecium sp. ในปริมาณที่เกินพอคยู่เสมอ

3.1.7 สังเกตการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับ

- สภาพร่างกายของ Ectocyclops sp. ในรูปร่างและขนาด
- ขั้นตอนการเจริญและการเพิ่มประชากรของ nauplius หลังจากการฟักไข่ของ Ectocyclops sp. จนเจริญเป็นตัวเต็มวัย

3.2 การทดลองเลี้ยง Ectocyclops sp. เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.1 แต่เลี้ยงด้วย Chlorella sp.

4. การคำนวณทางสถิติ (กนกทิพย์, 2525)

4.1 การคำนวณค่าเฉลี่ย (average) ใช้คำนวณค่ากลางระยะเวลา การเจริญของตัวอ่อนแต่ละขั้นในแง่ของช่วงเวลาการเจริญและการรอดตาย

วิธีการคำนวณ

สูตร $\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ย

N = ผลรวมของระยะเวลาการเจริญของตัวอ่อนในแต่ละขั้น

N = จำนวนตัวอ่อนทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ใช้คำนวณความแตกต่างของจำนวนวัยในแต่ละขั้นการเจริญจากไข่ 6 ชุด

วิธีการคำนวณ

สูตร $SD = \sqrt{\frac{\sum(X-\bar{X})^2}{N}}$

SD = รากที่สองของค่าความแปรปรวน (variance) ของตัวอ่อนแต่ละขั้น

$(X-\bar{X})^2$ = ผลรวมของผลต่างกำลังสองของระยะเวลาการเจริญของตัวอ่อนในแต่ละขั้นจากค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการเจริญ

N = จำนวนตัวอ่อนในแต่ละขั้นการเจริญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved