

## บทที่ 2

### วิธีการศึกษา

#### 1. ตัวอย่างหอยน้ำจืด

ตัวอย่างของหอยน้ำจืด (Nerites) วงศ์ Neritidae ที่ใช้ในการศึกษา เป็นหอยในสกุล Nerita 3 ชนิดและ Neritina 2 ชนิด คือ

- *Nerita lineata* Gmelin, 1791
- *Nerita planospira* Anton, 1839
- *Nerita chameleon* Linnaeus, 1758
- *Neritina violacea* Gmelin, 1791
- *Neritina* sp.

#### 2. วัสดุอุปกรณ์

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| - อ่างควบคุมอุณหภูมิ            | - กรรไกรผ่าตัด   |
| - เวอเนียร์คาลิเปอร์            | - มีดผ่าตัด  |
| - ไม้บรรทัด                     | - ถาดเทียบ   |
| - ปีกเกอร์                      | - เข็มหมุด   |
| - จานแก้ว                       | - ค้อน   |
| - แท่งแก้วคน                    | - กระจกปิดฉาก  |
| - เข็มเย็บ                      | - แท่นวางตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน |
| - ฟู่กัน                        | - กระจกทาบสองหน้าสำหรับติดแร่ดูลา                            |
| - ขวดดองตัวอย่าง                | - กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ                                  |
| - ขวดเก็บแร่ดูลา                | - กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEOL JSM 5800                     |
| - กล่องใส่ตัวอย่าง              | - กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEOL JSM 8800                     |
| - ถังเก็บตัวอย่างพร้อมตาข่ายปิด |  |
| - ปากคืบ                        |  |

### 3. สารเคมี

- 3.1 สารละลายเอทานอล 70%
- 3.2 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10%
- 3.3 สารละลายฟอร์มาลิน 10%
- 3.4 น้ำกลั่น

### 4. วิธีการวิจัย

แบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆดังนี้

#### 4.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยน้ำพริกทั้ง 5 ชนิด จากตำบลตันหยงโป อำเภอเมือง จังหวัดสตูล ซึ่งมีลักษณะพื้นที่เป็นหาดเลน หาดทรายปนเลน และมีพื้นที่บางส่วนเป็นหาดหิน โดยตัวอย่างหอยน้ำพริกที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด มีที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1, รูปที่ 12 (a)-(d))

#### 4.2 การวัดขนาด

จากการศึกษาขนาดเบื้องต้น โดยการเก็บตัวอย่างหอยน้ำพริกทั้ง 5 ชนิดที่มีขนาดเล็กที่สุดและใหญ่สุดเท่าที่จะสามารถหาได้ ทำการวัดขนาดความสูงของเปลือกโดยทำการวัดระยะตั้งแต่ยอด (apex) จนถึงขอบของ columella ด้านที่หอยใช้ยึดเกาะและคืบคลาน และทำการวัดความยาวของเปลือกโดยทำการวัดระยะที่กว้างที่สุดของเปลือกตามเส้นผ่านศูนย์กลาง โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Morris, 1973 และ Oliver, 1981 (ดังรูปที่ 13) นำขนาดของเปลือกที่มีค่ามากที่สุด (maximum dimensions) มาจัดขนาดของเปลือก (interval of shell sizes) ของหอยแต่ละชนิด ให้แต่ละชนิดมีขนาดของเปลือกที่แตกต่างกันชัดเจน โดย *Nerita lineata* และ *Nerita planospira* แต่ละขนาดมีขนาดความยาวของเปลือกช่วงละ 5 มิลลิเมตร *Nerita chameleon* แต่ละขนาดมีขนาดความยาวของเปลือกช่วงละ 4 มิลลิเมตร *Neritina* sp. และ *Neritina violacea* แต่ละขนาดมีขนาดความสูงของเปลือกช่วงละ 3 มิลลิเมตร ขนาดละ 20 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงขอบเขตที่อยู่อาศัยของหอยน้ำพริกทั้ง 5 ชนิด

เลนโคลน	ทรายปนเลน	หาดหิน
<i>Nerita lineata</i>	<i>Nerita lineata</i>	<i>Nerita lineata</i>
<i>Nerita planospira</i>	<i>Nerita planospira</i>	<i>Nerita planospira</i>
<i>Neritina violacea</i>	<i>Nerita chameleon</i> <i>Neritina sp.</i>	<i>Nerita chameleon</i>

ตารางที่ 2 แสดงการจัดกลุ่มขนาดของหอยน้ำพริกแต่ละชนิด

Species	N	Snails sizes (mm) at maximum dimensions		
		Small	Medium	Large
<i>Nerita lineata</i> *	60	15.00-19.99	20.00-24.99	25.00-29.99
<i>N. planospira</i> *	60	15.00-19.99	20.00-24.99	25.00-29.99
<i>N. chameleon</i> *	60	15.00-18.99	19.00-22.99	23.00-26.99
<i>Neritina sp.</i> *	60	7.00-9.99	10.00-12.99	13.00-14.99
<i>Neritina violacea</i> **	60	10.00-12.99	13.00-15.99	16.00-18.99

\* maximum dimension is shell length

\*\* maximum dimension is shell height



(a)



(b)



(c)



(d)

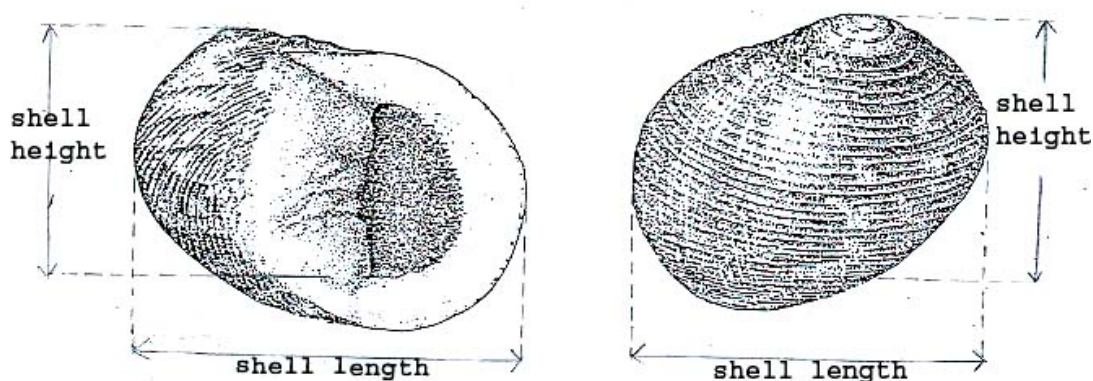
รูปที่12 ลักษณะพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่าง ตำบลตันหยงโป อำเภอเมือง จังหวัดสตูล

(a) ลักษณะพื้นที่ที่เป็นหาดทรายปนหิน

(b) ลักษณะพื้นที่ที่เป็นทรายปนเลน

(c) ลักษณะพื้นที่ที่เป็นหาดหิน

(d) ลักษณะพื้นที่ที่เป็นหาดหิน



รูปที่ 13 การวัดขนาดของเปลือกหอยน้ำจืด (ดัดแปลงจาก Tananasiriwong, 1978)

#### 4.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

##### 4.3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโครงสร้างของแรดูลาตามวิธีการของ Jeong และ Burch (1984)

- ทำความสะอาดและกะเทาะเปลือกหอยออกเพื่อนำเอาลำตัวของหอยแต่ละขนาดมาวัดความยาว นำมาหาค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวของหอยในแต่ละขนาด
- นำลำตัวหอยที่วัดขนาดแล้ว ตัดเอาเนื้อเยื่อส่วน buccal mass ใส่ในบีกเกอร์ ละลาย buccal mass ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10% (10% KOH) นำไปต้มที่ 60-100°C นาน 5 นาที หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-24 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อหลุดออกจากแรดูลา
- ในระหว่างที่ละลาย buccal mass ต้องนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นระยะๆ เพื่อป้องกันไม่ให้ radula ribbon สลายตัวไป
- คีบแรดูลาอย่างระมัดระวังลงในน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ใช้ฟู่กันทำความสะอาดเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนแรดูลาออกให้หมดอย่างระมัดระวังภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และล้างในสารละลายเอทานอล 70% (70% ethanol) หลายๆ ครั้ง จากนั้นเก็บไว้ในสารละลายเอทานอล 70% เพื่อเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- เตรียมแร่ดูลาที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนให้แห้ง โดยทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งต้องแผ่และตรึงแร่ดูลาให้อยู่ในสภาพที่มองเห็นรายละเอียดได้อย่างชัดเจน โดยแร่ดูลาไม่ม้วนงอ ในกรณีที่แร่ดูลายาวเกินกว่าแท่นวางตัวอย่าง (stap) ก็ตัดแบ่งออกเป็นส่วนๆ ในขณะที่แร่ดูลายังไม่แข็งตัว การตัดต้องตัดด้วยมีดที่คม เพื่อไม่ให้แร่ดูลาฉีกขาด หรือแตกเสียหาย
- นำแร่ดูลาติดบนแท่นวางตัวอย่าง นำไปพ่นเคลือบด้วยทอง (gold coating)

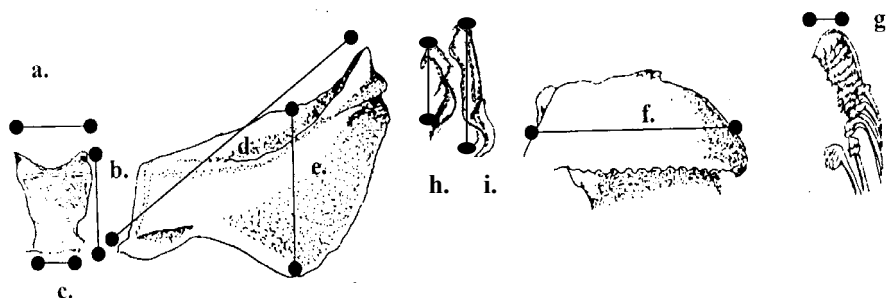
#### 4.3.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาธาตุที่เป็นองค์ประกอบในแร่ดูลา

นำแร่ดูลาที่ผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดแร่ดูลาเรียบร้อยแล้ว มาทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำชิ้นแร่ดูลาที่แห้งดีแล้วติดบนแท่นวางตัวอย่างด้วยกาวสองหน้า ในกรณีที่แร่ดูลา มีขนาดเล็กและบางจะใช้วิธีการบดแร่ดูลาแล้วติดบนแท่นวางตัวอย่าง

#### 4.4 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

##### 4.4.1 การศึกษาโครงสร้างของแร่ดูลา

- นำแร่ดูลาที่อยู่บนแท่นวางตัวอย่างเรียบร้อยแล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ( JEOL JSM-5800 LV)
- ทำการศึกษาแร่ดูลาโดย
  1. บันทึกภาพของแร่ดูลาเป็นส่วนๆ โดยพิจารณาส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้าย และบันทึกภาพของพื้นที่ต่างๆ คือ พื้นที่กลาง พื้นที่ข้าง และพื้นริม ในหอยแต่ละขนาด และแต่ละชนิด
  2. นับจำนวนพื้นที่ในแต่ละแถว ในหอยแต่ละขนาด และแต่ละชนิด
  3. พิจารณารายละเอียดพร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของพื้นที่ในแร่ดูลา ทั้ง 3 ชนิดในหอยแต่ละขนาด และแต่ละชนิด โดยทำการวัด ความกว้าง ความยาว ขนาดของซี่พื้น และนับจำนวนหยัก (cusp) บนพื้นที่แต่ละชนิด (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 การวัดขนาดของพินบนแระดูลา a. ความกว้างของพินกลาง b. ความสูงของพินกลาง  
c. ความกว้างของฐานพินกลาง d. ความยาวของพินข้างที่ 1 e. ความกว้างของพินข้างที่ 1  
f. ความกว้างของพินข้างที่ 4 g. ความกว้างของพินริม h. ความยาวของพินข้างที่ 2  
i. ความยาวของพินข้างที่ 3

#### 4.4.2 การศึกษาธาตุที่เป็นองค์ประกอบของแระดูลา

นำแระดูลาที่แห้งมาบดแล้ววางบนแท่นวางตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ธาตุที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่อง scanning electron microanalyzer (JEOL JSM 8800)

#### 4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

4.5.1 การวิเคราะห์สัดส่วน (ratio) ของลักษณะต่างๆของหอยน้ำจืด โดยนำความค่าเฉลี่ยความยาวของเปลือก ความสูงของเปลือก ความยาวแระดูลา และค่าเฉลี่ยความกว้าง ความยาว ของลักษณะพินแบบต่างๆบนแระดูลามาเปรียบเทียบสัดส่วนให้เห็นเด่นชัดขึ้น โดยนำค่าที่ได้มาหาสัดส่วน (ratio) ของลักษณะต่างๆ

- นำค่าความยาวของเปลือกและความยาวของแระดูลาโดยเฉลี่ยมาคำนวณสัดส่วนของความยาวของเปลือกต่อความยาวของแระดูลา shell length : radula length ratio (sl : rl) โดย  

$$sl : rl = \text{ความยาวของเปลือก(mm)} : \text{ความยาวแระดูลา (mm)}$$
- นำค่าความสูงของเปลือกและความยาวของแระดูลาโดยเฉลี่ยมาคำนวณสัดส่วนของความสูงของเปลือกต่อความยาวของแระดูลา shell height : radula length ratio (sh : rl) โดย  

$$sh : rl = \text{ความยาวของลำตัว(mm)} : \text{ความยาวแระดูลา (mm)}$$

- นำค่าความกว้างและความสูงของฟันกลางโดยเฉลี่ยมาคำนวณสัดส่วนของ ความกว้างกับความสูงของความกว้างและความสูงของฟันกลาง rachidian width : rachidian height ratio (rw : rh) โดย  
 $rw : rh = \text{ความกว้างของฟันกลาง } (\mu\text{m}) : \text{ความสูงของฟันกลาง } (\mu\text{m})$
  - นำค่าความกว้างของหยักและความกว้างของฐานของฟันกลางโดยเฉลี่ยมา คำนวณสัดส่วนของความต่างของหยัก (cusp) และของฐาน broad of cusp : broad of base ratio (bc : bb) โดย  
 $bc : bb = \text{ความกว้างของหยัก } (\mu\text{m}) : \text{ความกว้างของฐาน } (\mu\text{m})$
  - นำค่าความกว้างและความสูงของ first lateral teeth โดยเฉลี่ยมาคำนวณ สัดส่วนของความกว้างกับความสูง lateral width : lateral height ratio (lw : lh) โดย  
 $lw : lh = \text{ความกว้าง } (\mu\text{m}) : \text{ความสูง } (\mu\text{m})$
- 4.5.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของขนาดเปลือก ความยาวแรดูลาและจำนวน แถวฟันบนแรดูลาของหอยแต่ละชนิดที่มีขนาดแตกต่างกัน เพื่อหาแนวโน้ม ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation)
- หาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเปลือกและความยาวแรดูลาของหอยแต่ละขนาดในแต่ละชนิด
  - หาความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของเปลือกและความยาวแรดูลาของหอยแต่ละขนาดในแต่ละชนิด
  - หาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างและความสูงของฟันกลาง
  - หาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างฟันกลางและความกว้างของฐานฟัน กลาง
  - หาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างและความสูงของฟันข้างซี่ที่ 1
- 4.5.3 การวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความยาวแรดูลาของหอยแต่ละ ขนาดในหอยแต่ละชนิด โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One - Way ANOVA (Analysis of Variance)



4.5.4 การวิเคราะห์หาความแตกต่างของจำนวนแถวพื้นของหอยแต่ละขนาดใน  
หอยแต่ละชนิด โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One - Way  
ANOVA (Analysis of Variance)

#### 5. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย

พฤศจิกายน 2543 – ตุลาคม 2545

#### 6. สถานที่ที่ใช้ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการ B 303 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขล  
นครินทร์