บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับวางแปลงตัวอย่าง

1.1 เหล็กหมุด

1.2 เชือกฟาง

1.3 ตลับเมตร

1.4 เข็มทิศ

1.5 นาฬิกาวัดความสูงจากระดับน้ำทะเล

2. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดินและศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อม

2.1 ถุงพลาสติก

2.2 พลั่วมือ

2.3 กระดาษ label

2.4 moisture can

2.5 เทอร์โมมิเตอร์

2.6 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter Digicon Lx-50)

2.7 เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ดิน

3. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับศึกษาปริมาณสาหร่าย แยกเชื้อสาหร่ายเป็นชนิดเดียวและเก็บรวบรวมพันธุ์สาหร่าย

3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่าย (ภาคผนวก ก)

3.2 เครื่องแก้วต่างๆ

3.3 เครื่องเขย่า

3.4 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

3.5 loop เขี่ยเชื้อสาหร่าย

3.6 เครื่องชั่ง

3.7 ชั้นเลี้ยงสาหร่าย

3.8 กล้องจุลทรรศน์

3.9 สไลด์นับจำนวน (haemacytometer)

วิธีการ

1. กำหนดและสำรวจบริเวณที่ทำการศึกษา

ทำการศึกษาในบริเวณป่าสมบูรณ์และป่าที่ถูกรบกวนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง ซึ่งมีลักษณะเป็นที่ราบเชิงเขาที่มีความสูงไม่เกิน 300 เมตรจากระดับน้ำทะเล และป่าสงวนในบริเวณใกล้เคียง (รูปที่ 2)

1.1 ป่าสมบูรณ์

เป็นป่าที่ไม่เคยมีการบุกรุกเข้าไปใช้ประโยชน์จากพื้นที่ ทำให้ลักษณะของพืชส่วนใหญ่มีลำต้นค่อนข้างโตและทรงพุ่มมีการแผ่ขยายกว้าง แสงส่องผ่านลงสู่พื้นล่างได้น้อยจึงส่งผลให้มีไม้พื้นล่างน้อย พืชวงศ์เด่นคือ วงศ์เปล้า (Euphobiaceae) (รูปที่ 3ก)

1.2 ป่าที่ถูกรบกวน

เป็นป่าที่ในอดีตเคยมีชาวบ้านบุกรุกเข้าไปใช้ประโยชน์ ต่อมาเมื่อมีการประกาศให้พื้นที่นี้เป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้างรัฐจึงยึดพื้นที่จากประชาชน ทำให้พื้นที่ที่ถูกบุกรุกในอดีตได้มีการฟื้นตัวเกิดการแทนที่ตามธรรมชาติจนถึงปัจจุบัน ต้นไม้ส่วนใหญ่ยังมีขนาดเล็กอยู่ วงศ์ไม้เด่นส่วนใหญ่เป็นไม้โตเร็วเช่น วงศ์มะเดื่อ (Maraceae) ไม้พื้นล่างมีความหนาแน่นกว่าในป่าสมบูรณ์ ไม้พื้นล่างได้แก่วงศ์ขิง (Zinngiberaceae) (รูปที่ 3ข)

1.3 ป่าสงวน

เป็นบริเวณป่าสงวนที่ในปัจจุบันยังมีชาวบ้านบุกรุกเข้าไปใช้ประโยชน์จากพื้นที่ พืชที่พบลำต้นมีขนาดเล็กเหมือนในป่าที่ถูกรบกวนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง และในป่าสงวนพบว่ามีไม้พื้นล่างเช่น บอนชนิดต่างๆ กระทือ ปุด จั๋ง และหวายขึ้นอยู่ด้วย เนื่องจากป่าสงวนมีลักษณะโปร่ง แสงสามารถส่องผ่านลงสู่พื้นล่างได้มากทำให้ไม้พื้นป่าเจริญได้ดี
(หัทยา มีเมือง, 2543)

ปัจจุบันนี้พบว่าป่าสงวนยังคงถูกบุกรุกแผ้วถางโดยชาวบ้าน ทำให้ป่าสงวนมีขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นป่าผืนย่อย การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาในป่าสงวน 5 บริเวณ (รูปที่ 3ค) คือ

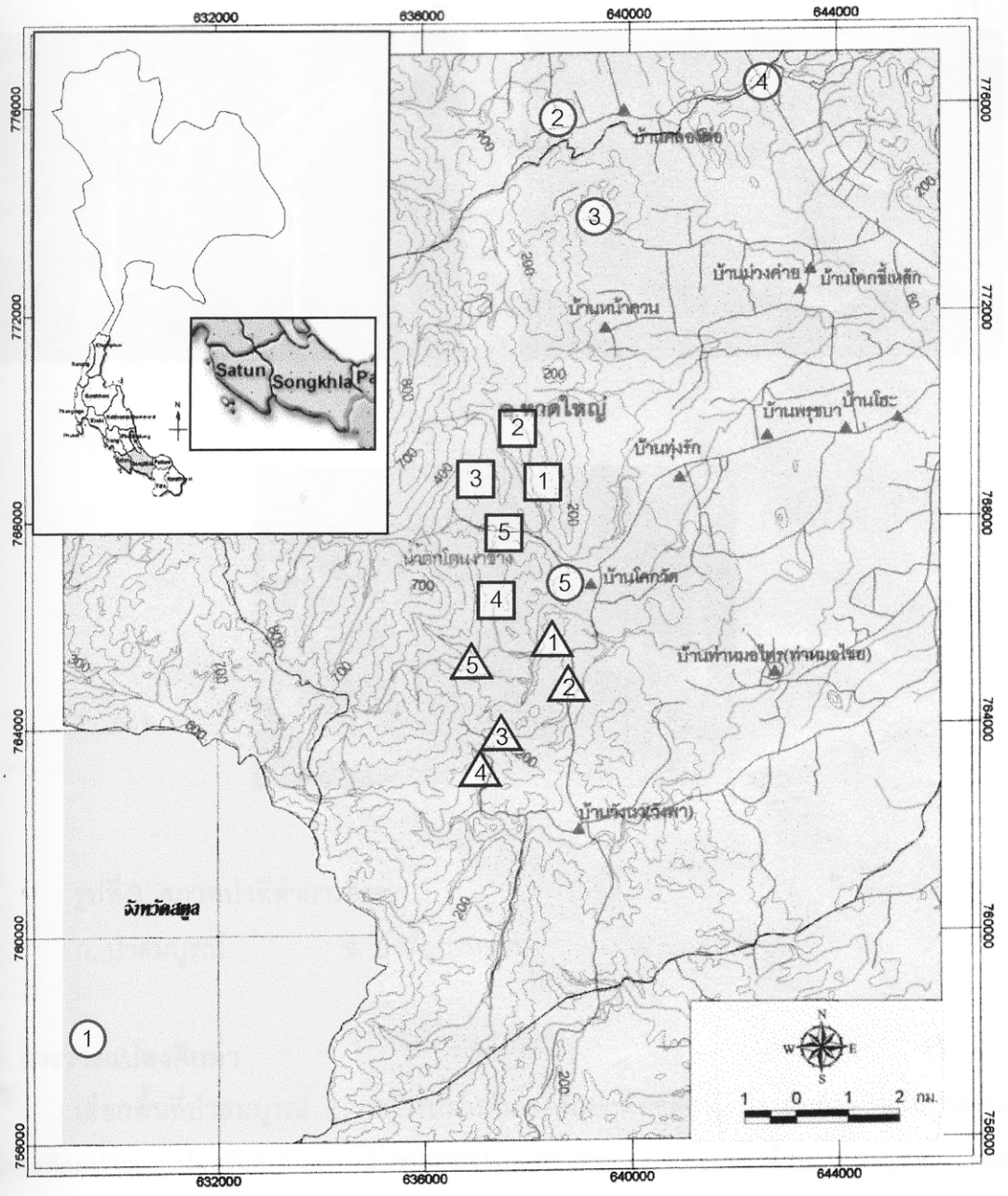
แปลงที่ 1 ป่าดงเทือกช้าง พื้นที่ประมาณ 5 ไร่ ตั้งอยู่ที่หมู่ 5 ตำบลทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล

แปลงที่ 2 ป่าบ้านป่ากล้วย พื้นที่ประมาณ 40 ไร่ ตั้งอยู่หมู่ที่ 1 ตำบลฉลุง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

แปลงที่ 3 ป่าควนตะเคียนหิน พื้นที่ประมาณ 40 ไร่ ตั้งอยู่หมู่ที่ 7 ตำบลท่าชะมวง อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา

แปลงที่ 4 ป่าควนเขาวัง พื้นที่ประมาณ 15 ไร่ ตั้งอยู่หมู่ที่ 1 ตำบลฉลุง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

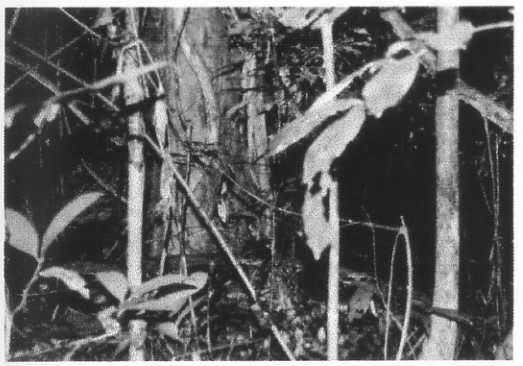
แปลงที่ 5 ป่าควนสวนหมาก พื้นที่ประมาณ 70 ไร่ ตั้งอยู่หมู่ที่ 7 ตำบลทุ่งตำเสา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา



รูปที่ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่าง (แหล่งที่มา : กรมแผนที่ทหาร)

△ คือ ป่าสมบูรณ์ □ คือ ป่าที่ถูกรบกวน ○ คือ ป่าสงวน

ก.



ข.

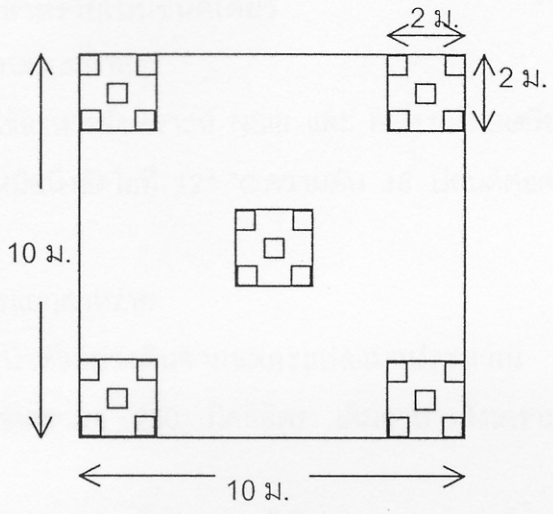
ค.

รูปที่ 3. สภาพป่าที่ทำการศึกษา

ก. ป่าสมบูรณ์ ข. ป่าที่ถูกรบกวน ค. ป่าสงวน

2. การวางแปลงศึกษา

เลือกพื้นที่ป่าสมบูรณ์ ป่าที่ถูกรบกวนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง และป่าสงวน โดยแต่ละป่าวางแปลงตัวอย่างแบบสุ่มขนาดแปลง 10 เมตร x 10 เมตร จำนวน 5 แปลง แต่ละแปลงแบ่งเป็นแปลงย่อยขนาด 2 เมตร x 2 เมตร จำนวน 5 แปลง และในแต่ละแปลงย่อยแบ่งเป็น 5 จุด สำหรับเก็บตัวอย่างดิน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4. ลักษณะแปลงเก็บตัวอย่าง

3. การเก็บตัวอย่างดิน

ในแต่ละแปลง เก็บตัวอย่างดินในแปลงย่อยทั้ง 5 แปลง โดยใช้พลั่วมือขุดบริเวณผิวดินในแปลงย่อยทั้ง 5 จุด ลึก 1-2 เซนติเมตร (Hunt *et al.*, 1979) ตัวอย่างละประมาณ 300 กรัม เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด นำดินทั้ง 5 ตำแหน่งมาผสมกัน ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยเก็บตัวอย่างดิน 2 ครั้ง คือฤดูร้อนและฤดูฝน สำหรับฤดูร้อนเก็บในเดือนพฤษภาคม 2542 และฤดูฝนในเดือนตุลาคม 2542

4. การศึกษาสาหร่าย

4.1 ศึกษาจำนวนสาหร่ายในดินโดยวิธี dilution method

4.1.1 นำตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่อาหารสังเคราะห์ BG11 (Rippka *et al.*, 1979) และ NSIII (Hosakul, 1972) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 มิลลิลิตร และเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที เพื่อนำมาเจือจางแบบ 10-folded dilution ให้ได้ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} (Allen and Stanier, 1968) โดยทำการศึกษา 5 ซ้ำ

4.1.2 นำไปเพาะเลี้ยงบนชั้นเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000-4,000 ลักซ์ ช่วงแสง : สว่าง : มืด เท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 °C และอุณหภูมิห้อง (ฤดูร้อนมีอุณหภูมิระหว่าง 27-33 °C และฤดูฝนมีอุณหภูมิระหว่าง 25.5-31 °C)

4.1.3 ตรวจสอบการเจริญและนับจำนวนสาหร่ายแต่ละสกุลในความเข้มข้น 10^{-3} โดยใช้ haemacytometer หลังจากการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณหาจำนวนสาหร่ายทั้งหมดต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม

4.2 การแยกเชื้อสาหร่ายเป็นชนิดเดียว

4.2.1 การเตรียมอาหาร

ใช้อาหารสังเคราะห์ NSIII และ BG11 โดยเตรียมเป็นอาหารเหลวและอาหารแข็ง ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.2.2 การแยกสาหร่าย

-นำตัวอย่างดินจากแต่ละแปลงมาประมาณ 20 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร เติมอาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงสาหร่าย ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

-นำไปเพาะเลี้ยงบนชั้นเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000-4,000 ลักซ์ ช่วงแสงสว่าง : มืด เท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 °C และอุณหภูมิห้อง

-หลังจากนั้น 4-6 สัปดาห์จะพบสาหร่ายขึ้นอย่างหนาแน่น ใช้ loop ปราศจากเชื้อเขี่ยเชื้อสาหร่ายนำไปลากบนผิวอาหารแข็ง (streak plate) ทำแบบนี้ซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งได้เป็นสาหร่ายชนิดเดียว

4.3 การจำแนกชนิดของสาหร่าย

จำแนกชนิดของสาหร่ายที่ตรวจพบทั้งหมด สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาศัยรูปวิธานจาก Desikachary (1959) และ Rippka *et al.* (1979) สาหร่ายสีเขียวอาศัยรูปวิธานจาก Arce and Bold (1958), Archibold (1988), Deason (1959), Fritsch (1975), Herndon (1958a), Herndon (1958b), Prescott (1962), Prescott (1978), Starr (1955), Trainor and Bold (1953) และ Whitford and Schumacher (1969) ยูกลีนอยด์อาศัยรูปวิธานจาก Prescott (1962) และไดอะตอมอาศัยรูปวิธานจาก Cox (1996)

4.4 การเก็บรวบรวมพันธุ์สาหร่าย

เก็บรวบรวมพันธุ์สาหร่ายที่จำแนกชนิดได้ไว้ในหลอดอาหารเอียงและในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 25 °C ช่วงรับแสง 12 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ 700 ลักซ์

5. การศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อม

การศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมขณะเก็บตัวอย่างดินคือ อุณหภูมิของดินวัดโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ และความเข้มแสงบริเวณผิวดินวัดโดยใช้ lux meter

การศึกษาสมบัติของดินในห้องปฏิบัติการคือ ค่าความความชื้นในดิน (moisture content) หาค่าโดยการอบตัวอย่างดินประมาณ 10 กรัม ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 คืน (Gardner, 1986) ตัวอย่างดินอีกส่วนหนึ่งนำมาผึ่งลมให้แห้งแล้วส่งตัวอย่างดินไปวิเคราะห์ที่หน่วยปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อวิเคราะห์สมบัติของดินได้แก่ ค่า pH ของดินวัดโดยใช้ pH meter (Maclene, 1982) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) โดยวิธี Kjedahl method (Bremner and Mulvaney, 1982) ปริมาณอินทรียวัตถุ (organic matter) โดยวิธี Walkey & Black method (Nelson and Sommers, 1982) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) โดยวิธี Bray no. 2 (Olsen and Sommers, 1982) ปริมาณแคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable Ca , Mg , K) โดยวิธี Ammonium acetate extraction (Thomas, 1982)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

6.1 ปัจจัยสภาพแวดล้อม

เปรียบเทียบค่าปัจจัยสภาพแวดล้อมในแต่ละป่าและแต่ละฤดูกาลโดยใช้ Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ผ่านการแปลงข้อมูลโดยใช้ Log (x+1)

วิเคราะห์ความคล้ายคลึงระหว่างป่าและฤดูกาลที่ทำการศึกษาโดยใช้ค่าปัจจัยสภาพแวดล้อมด้วย Principle Component Analysis (PCA) โดยใช้ correlation-base PCA การวิเคราะห์ PCA เป็นวิธี ordination ที่ง่ายที่สุดและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย (Jakson, 1993) ซึ่ง correlation-base PCA เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลปัจจัยสภาพแวดล้อม (Walker, 1999)

6.2 ปริมาณสาหร่าย

6.2.1 เปรียบเทียบปริมาณสาหร่ายแต่ละกลุ่มในป่าสมบูรณ์ ป่าที่ถูกรบกวน และป่าสงวน และเปรียบเทียบปริมาณสาหร่ายแต่ละฤดูกาล โดยใช้ Analysis of Variance ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ผ่านการแปลงข้อมูลโดยใช้ Log (x+1)

6.2.2 เปรียบเทียบปริมาณสาหร่ายจากทั้ง 3 ป่า

-เปรียบเทียบปริมาณสาหร่ายจากทั้ง 3 ป่า โดยใช้ Multivariate Analysis of Variance ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ผ่านการแปลงข้อมูลโดยใช้ Log (x+1)

-วิเคราะห์ความคล้ายคลึงระหว่างป่าและฤดูกาลที่ทำการศึกษาโดยใช้ข้อมูลชนิดและปริมาณสาหร่ายโดยวิเคราะห์ Detrended Correspondence Analysis (DCA) สาหร่ายที่มีปริมาณน้อยกว่า 5% ของปริมาณทั้งหมดในแต่ละกลุ่มจะถูกตัดออกจากการวิเคราะห์ แปลงข้อมูลโดยใช้ Log (x+1) เพื่อให้มีการกระจายแบบปกติ โดย DCA เป็นการวิเคราะห์แบบ indirect gradient analysis ที่มีการใช้กันแพร่หลายทางด้านนิเวศวิทยา เนื่องจากเป็นวิธีที่เหมาะสมกับข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยาที่สิ่งมีชีวิตไม่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปัจจัยสภาพแวดล้อม (Palmer, 1993)

6.3 ผลของปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อชนิดและปริมาณสาหร่าย

ใช้ Canonical Correspondense Analysis (CCA) ในการวิเคราะห์ผลของปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อชนิดและปริมาณสาหร่าย สาหร่ายที่มีปริมาณน้อยกว่า 5% ของปริมาณทั้งหมดในแต่ละกลุ่มจะถูกตัดออกจากการวิเคราะห์ แปลงข้อมูลปริมาณสาหร่ายและปัจจัยสภาพแวดล้อมด้วย Log(x+1) เพื่อให้มีการกระจายแบบปกติ ใช้ค่า intraset correlation ของ Ter Braak (1986) เพื่อศึกษาผลของปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อชนิดและปริมาณสาหร่าย โดย CCA เป็นการวิเคราะห์ direct gradient analysis ซึ่งวิเคราะห์ผลของปัจจัยสภาพแวดล้อมต่างๆ ต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยตรง เป็นวิธีที่เริ่มมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยา (Palmer, 1993) ในแต่ละขั้นตอนการวิเคราะห์จะเขียนกราฟ Joint plot ของแกนที่ 1 และแกนที่ 2 โดยบริเวณและชนิดของสาหร่ายแทนด้วยจุด ส่วนค่าปัจจัยสภาพแวดล้อมแทนด้วยลูกศร ซึ่งจะพาดผ่าน species score และ site score (Ter Braak ,1986) ความยาวลูกศรแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปัจจัยสภาพแวดล้อมแต่ละค่า ทิศทางของลูกศรแสดงให้เห็นว่าปัจจัยสภาพแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตชนิดไหน มุมระหว่างลูกศรแต่ละอันแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสภาพแวดล้อมที่ทำการศึกษา ตำแหน่งของ site score แต่ละจุดตามลูกศรปัจจัยสภาพแวดล้อมแสดงให้เห็นถึงผลของปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อบริเวณนั้น ตำแหน่งของ species score แต่ละจุดตามลูกศรปัจจัยสภาพแวดล้อมแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น (Palmer, 1993) อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ CCA ด้วยโปรแกรม PC-ORD version 3.20 มีข้อจำกัดคือไม่สามารถตัดปัจจัยร่วม (covariable) ที่มีความสัมพันธ์กันออกจากการวิเคราะห์ได้

6.4 สภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เปรียบเทียบปริมาณสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NSIII และอาหาร BG11 ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 °C และอุณหภูมิห้อง โดยใช้ Multivariate analysis of Variance ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ผ่านการแปลงข้อมูลโดยใช้ Log (x+1)

การวิเคราะห์ Analysis of Variance ใช้โปรแกรม SPSS version 10 ส่วนการวิเคราะห์ multivariate analysis ใช้โปรแกรม PC-ORD version 3.20