บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 พื้นที่ศึกษา

กำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างแอมฟิพอดบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนบนทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ให้มีพื้นที่ที่มีสภาพ microhabitat หลายรูปแบบ โดยกำหนดเป็น 4 แนวทั้งหมด 11 สถานี ซึ่งแต่ละสถานีมีระยะห่างกันค่อนข้างสม่ำเสมอและพยายามกำหนดจุดให้ได้ microhabitat ที่แตกต่างกันเท่าที่พบในบริเวณทะเลสาบหลังจากการสำรวจเบื้องต้น การเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะใช้ระบบกำหนดตำแหน่งบนโลกหรือจีพีเอส (Global Positioning System : GPS) ช่วยในการค้นหาสถานีตามที่กำหนดไว้ (รูปที่ 2) ซึ่งมีลักษณะของแต่ละสถานีดังนี้ คือ

สถานี 1 ใกล้ชายหาดและปากคลองขนาดเล็ก มีชุมชนอาศัยอยู่ประปราย มีพืชน้ำค่อนข้างมาก (พิกัด 7° 31.060′ เหนือและ 100° 12.004′ ตะวันออก)

สถานี 2 ใกล้ปากคลองขนาดเล็ก มีพืชน้ำค่อนข้างมาก โดยเฉพาะสาหร่ายหางกระรอกและบัว มีชุมชนอาศัยอยู่ประปราย (พิกัด 7° 34.678′ เหนือและ 100° 11.348′ ตะวันออก)

สถานี 3 ชายฝั่งเป็นโขดหิน พื้นท้องน้ำเป็นทราย มีเครื่องมือประมงจำพวกลอบวางกระจายกันห่างๆ มีชุมชนอาศัยอยู่ประปราย (พิกัด 7° 35.708′ เหนือและ 100° 17.257′ ตะวันออก)

สถานี 4 ใกล้ชายหาดและปากคลองขนาดใหญ่ คือคลองลำปำ พื้นท้องน้ำเป็นทรายปนกรวด (พิกัด 7° 37.584′ เหนือและ 100° 09.430′ ตะวันออก)

สถานี 5 อยู่กลางทะเลสาบตอนบนค่อนมาทางทิศใต้ น้ำค่อนข้างลึกกว่าสถานีอื่นๆ พื้นท้องน้ำเป็นโคลนปนเลน (พิกัด 7° 38.500′ เหนือและ 100° 15.907′ ตะวันออก)

สถานี 6 ใกล้ปากคลองและเขื่อนกั้นน้ำขนาดเล็ก บริเวณริมฝั่งมีต้นลำพู และธูปฤาษีขึ้นอยู่ค่อนข้างหนาแน่น น้ำค่อนข้างตื้น (พิกัด 7° 41.584′ เหนือและ 100° 19.430′ ตะวันออก)

สถานี7 ใกล้ปากคลองขนาดเล็ก ห่างฝั่งออกไปมีกระชังเลี้ยงกุ้งก้ามกรามกระจายกันห่างๆ บริเวณริมฝั่งมีชุมชนอาศัยอยู่ประปรายตลอดแนวชายฝั่ง (พิกัด 7° 42.000′ เหนือและ 100° 09.457′ ตะวันออก)

สถานี 8 อยู่กลางทะเลสาบตอนบนค่อนมาทางทิศเหนือ น้ำลึกกว่าสถานีอื่นๆ พื้นท้องน้ำเป็นโคลนปนเลน (พิกัด 7° 43.758′ เหนือและ 100° 14.329′ ตะวันออก)

สถานี 9 ใกล้ปากคลองขนาดเล็ก บริเวณริมฝั่งมีต้นลำพู และธูปฤาษีขึ้นอยู่ประปราย (พิกัด 7° 46.376′ เหนือและ 100° 18.496′ ตะวันออก)

สถานี 10 อยู่เหนือสุดของทะเลสาบตอนบน พื้นท้องน้ำมีเศษซากพืชปนที่ยังย่อยสลายอยู่มาก บริเวณริมฝั่งเป็นที่ราบ มีคูน้ำและคลองขนาดเล็กหลายสาย มีทุ่งหญ้าและการเลี้ยงปศุสัตว์จำนวนมาก (พิกัด 7° 47.012′ เหนือและ 100° 12.568′ ตะวันออก)

สถานี11 ใกล้ปากคลองขนาดเล็ก มีพืชน้ำขึ้นประปรายริมชายฝั่ง บริเวณริมฝั่งเป็นทุ่งนา มีชุมชนอาศัยอยู่ประปราย (พิกัด 7° 47.376′ เหนือและ 100° 15.496′ ตะวันออก)

2.2 การศึกษาคุณภาพน้ำ

วัดคุณภาพน้ำสถานีละ 3 ซ้ำทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างแอมฟิพอด โดยวัดความลึกด้วยลูกดิ่ง วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ และวัดตะกอนแขวนลอยในน้ำ โดยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 °C (APHA-AWWA and WEF, 1998) ส่วนคุณภาพน้ำทางเคมีวัดเฉพาะที่ความลึกเหนือผิวดินไม่เกิน 50 ซม. โดยวัดความเค็มด้วย hand refractometer (ATAGO) วัดพีเอชของน้ำโดยใช้ พีเอชมิเตอร์ (pH meter) (Grasshoff, 1976) และวัดออกซิเจนละลายน้ำ โดยวิธี Azide-modification method (APHA-AWWA and WEF, 1998)

2.3 การศึกษาคุณภาพดินตะกอน

เก็บตัวอย่างดินตะกอนด้วย Tamura's grab ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างแอมฟิพอดจำนวน 3 ซ้ำต่อสถานีใส่ถุงพลาสติกเก็บในที่เย็นแล้วนำกลับไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเม็ดดินโดยวิธีไฮโดรมิเตอร์ (Gee and Bauder, 1986) และปริมาณอินทรีย์คาร์บอนตามวิธี Walkley and Black ที่ดัดแปลงแล้ว (Nelson and Sommers, 1986)

2.4 การศึกษาความหลากหลายและความชุกชุมของแอมฟิพอด

การเก็บตัวอย่างแอมฟิพอดในแต่ละสถานีทุกสองเดือนตั้งแต่เดือนเมษายน 2546 – กุมภาพันธ์ 2547 โดยใช้ Tamura's grab (0.05 ตร.ม.) สถานีละ 7 ซ้ำ เนื่องจาก อำนาจ ศิริเพชร (2543) พบว่าจำนวนซ้ำที่เหมาะสมในการศึกษาสัตว์หน้าดินขนาดใหญ่ในกลุ่ม Crustacea ในทะเลสาบสงขลาตอนใน คือ 7 ซ้ำ แต่ละซ้ำเก็บตัวอย่างห่างกันประมาณ 0.5-1.0 ม. หลังจากนั้นร่อน

ตัวอย่างแต่ละ grab ด้วยตะแกรงร่อนที่มีขนาดตา 5, 1 และ 0.5 มม. ดองตัวอย่างทันทีด้วยฟอร์มาลินเป็นกลาง 10% โดยใช้ borax (Sodiumtetraborate) 1.5 กรัม/ลิตร จำแนกแอมฟิพอดถึงระดับสกุลและ/หรือชนิด โดยเปรียบเทียบกับเอกสารประกอบการจำแนก (Barnard, 1969, 1972a, 1972b; Bousfield, 1973; Lincoln, 1979; Barnard and Banard, 1983; Myers, 1985; Williams and Barnard, 1988; Barnard and Karaman, 1991a; 1991b) ถ่ายภาพด้วยกล้อง SLR (Single Lens Reflex) ที่ติดกับกล้องจุลทรรศ์ พร้อมทั้งวาดภาพ monograph ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบตาประกอบและ camera lucida ส่วนความชุกชุมจะนับจำนวนตัวจากการเก็บตัวอย่างทั้ง 7 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อหาความหนาแน่นของแอมฟิพอดแต่ละชนิดในแต่ละสถานี/เดือน

2.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอมฟิพอดด้วยกล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscopy, SEM)

การเตรียมตัวอย่างแอมฟิพอดเพื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM โดยนำตัวอย่างแอมฟิพอดที่สะอาดมาเก็บรักษาในglutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5% แล้วล้างด้วย phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งแช่ไว้นาน 15 นาที จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำตัวอย่างมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยเติมเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 60 70 80 และ 90% โดยในแต่ละความเข้มข้นแช่ 2 ครั้งๆละ 15 นาที สุดท้ายจึงเติมเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 100% จำนวน 2 ครั้งๆละครึ่งชั่วโมง แล้วทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drying (CPD) นาน 2.5 ชั่วโมง นำแอมฟิพอดที่แห้งมาวางบนด้านหนึ่งของแผ่นกาว 2 หน้า แล้วนำไปวางบนแท่นทองเหลือง (stub) ภายใต้กล้องจุลทรรศ์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) หลังจากนั้นนำ stub ไปเคลือบด้วยทองเป็นเวลา 2 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาศึกษารายละเอียดด้วยกล้อง SEM (รุ่น JEOL, JSM-5800LV) (Andrade-Morraye *et al*., 2004)

2.6 การศึกษาพฤติกรรมการสร้างแหล่งที่อยู่และการกินอาหารของแอมฟิพอด

ศึกษาพฤติกรรมการสร้างแหล่งที่อยู่โดยการสังเกตพฤติกรรมดังกล่าวในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติขณะเก็บตัวอย่าง การนำแอมฟิพอดมีชีวิตมาใส่ในจานแก้วพร้อมด้วยน้ำในทะเลสาบและตะกอนดินแล้วคอยสังเกตพฤติกรรมการสร้างแหล่งที่อยู่ รวมทั้งสังเกตจากรูปร่างลักษณะของรยางค์ต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการสร้างแหล่งที่อยู่ตลอดจนเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงเคยที่มีการศึกษาแล้ว ส่วนพฤติกรรมการกินอาหารศึกษาตามพฤติกรรมการสร้าง

แหล่งที่อยู่ ลักษณะการดำรงชีพ รูปร่างลักษณะของรยางค์ต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหารตลอดจนเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงเคยที่มีการศึกษาแล้วในแอมฟิพอดแต่ละกลุ่ม สกุลและ/หรือชนิด

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

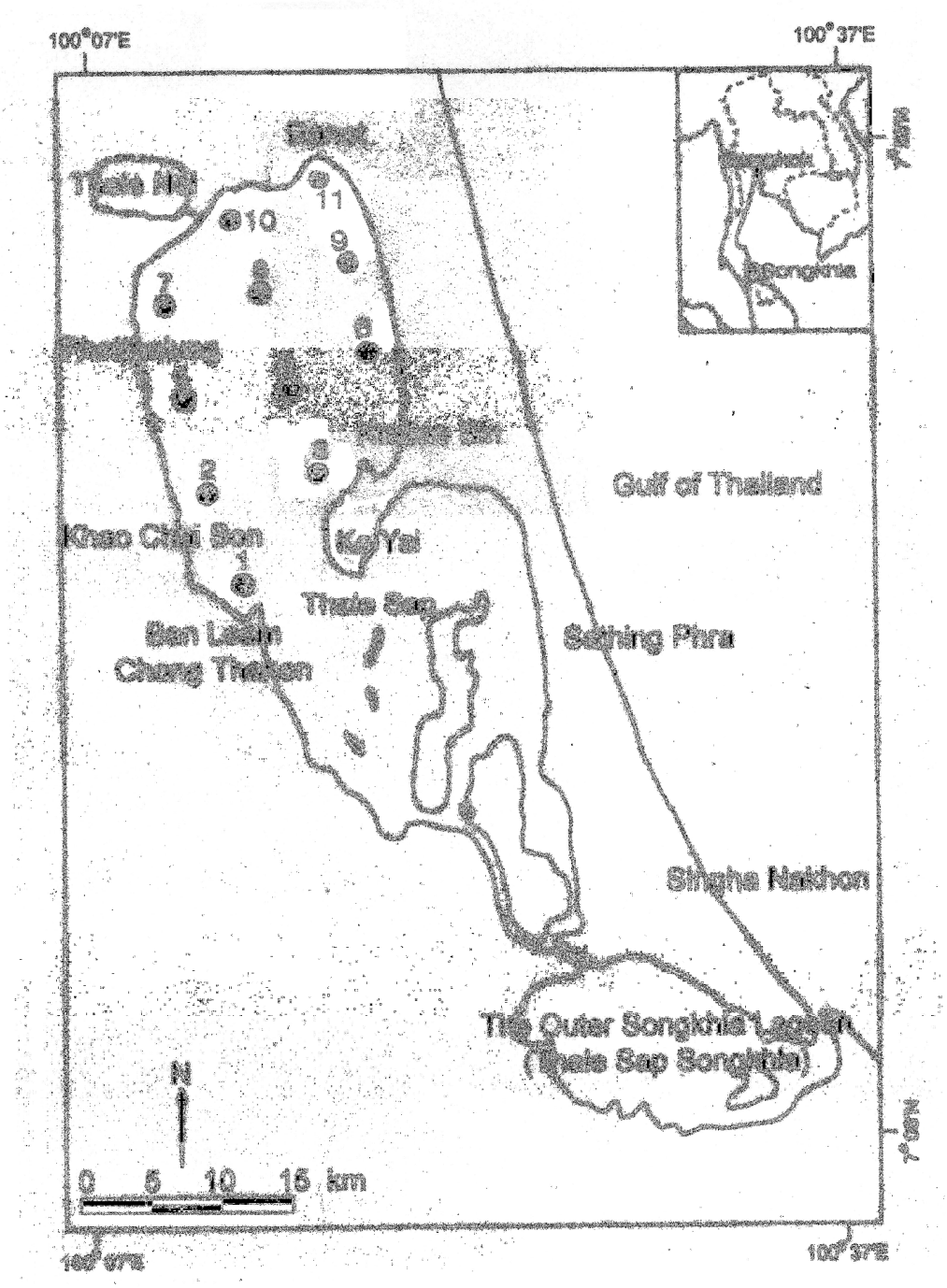
ใช้โปรแกรม PRIMER 4.0 (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research) ตามวิธีของ Clarke and Warwick (1994) โดยวิเคราะห์ multivariate indices ของประชาคมแอมฟิพอด เพื่อแสดงถึงการจัดโครงสร้างทางสังคม ได้แก่

2.7.1 วิเคราะห์การจัดกลุ่ม โดยแปลงข้อมูลแบบ double square root แล้ววัดความคล้ายคลึงแบบ Bray-Curtis (Bray-Curtis similarity) ข้อมูลที่นำเข้าคือแฟ้มข้อมูลชนิดและปริมาณแอมฟิพอดทั้งในเชิงสถานีและเวลา (Species-samples file) ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในรูปของเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้โปรแกรมย่อย CLUSTER และ DENPLOT

2.7.2 สร้างภาพ 2 มิติ (non-metric Multidimensional Ordination Scaling, MDS) โดยแปลงข้อมูลแบบ double square root เช่นเดียวกับการจัดกลุ่ม ข้อมูลที่นำเข้าคือแฟ้มข้อมูลความคล้ายคลึง(similarity file) ที่สร้างจากโปรแกรมย่อย CLUSTER (2.7.1)แสดงผลที่ได้ลงบนระนาบ 2 มิติโดยใช้โปรแกรมย่อย MDS และ CONPLOT

2.7.3 ทดสอบความแตกต่างของการจัดกลุ่มแอมฟิพอด ด้วยวิธี One Way Analysis of Similarities (ANOSIM test) แบบ Simulation/permutation test แฟ้มข้อมูลแมทริกซ์ความคล้ายคลึง (similarity matrix) ที่สร้างจากโปรแกรมย่อย CLUSTER (2.7.1)โดยใช้โปรแกรมย่อย ANOSIM

2.7.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อม (10 ปัจจัย) แบบ harmonic rank correlation coefficient (weighted Spearman) โดยหาค่าสหสัมพันธ์ (best variable combination, ρ_w) ข้อมูลที่นำเข้ามี 2 แฟ้มข้อมูลคือ แฟ้มข้อมูลความคล้ายคลึง(similarity file) ที่สร้างจากโปรแกรมย่อย CLUSTER (2.7.1) และแฟ้มข้อมูลปัจจัยสิ่งแวดล้อม (Environmental file) โดยใช้โปรแกรมย่อย BIO-ENV.



รูปที่ 2. พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนบน