บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

1) ถุงแพลงก์ตอนขนาดตาข่าย 55 ไมครอน
2) กระบอกเก็บน้ำแบบ Ruttner sampler
3) ถังน้ำขนาด 120 ลิตร
4) ฟอร์มาลีนเข้มข้น
5) ขวดใส่ตัวอย่าง
6) กระบอกตวง

2.1.2 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ

1) เทอร์โมมิเตอร์
2) pH – meter ยี่ห้อ Cole Parmer Model 59002-00
3) รีแฟลกซ์โตมิเตอร์สำหรับวัดความเค็ม ASL-SO ยี่ห้อ ASAHI
4) กระบอกเก็บน้ำแบบ Ruttner sampler
5) ขวดพลาสติก 1 ลิตร สำหรับใส่ตัวอย่างน้ำ

2.1.3 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับจำแนกแพลงก์ตอนพืช

1) Sedgwick Rafter Counting cell ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร
2) กล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์
3) แผ่นสไลด์
4) กระจกปิดสไลด์

2.1.4 วัสดุอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1) เครื่อง spectrophotometer
2) เครื่อง centrifuge
3) เครื่องชั่ง
4) เครื่องแก้ว
5) สารเคมี

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.2.1 พื้นที่ศึกษา

สถานที่ศึกษา ตั้งอยู่ที่ตำบลตันหยงโป อำเภอเมือง จังหวัดสตูล โดยกำหนดสถานีศึกษาดังนี้ (ภาพประกอบ 2-1)

2.2.1.1 บริเวณป่าชายเลน

บ้านบากันเคย ตั้งอยู่ที่เส้นละติจูด 6 องศา 36 ลิปดาเหนือและลองจิจูด 99 องศา 59 ลิปดาตะวันออก พื้นที่ส่วนใหญ่จะปกคลุมด้วยพืชพรรณพวกไม้โกงกาง (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2540) ตัวแทนของพื้นที่ศึกษาประกอบด้วย 6 สถานี ซึ่งอยู่ในคลอง 2 คลอง

สถานีที่ 1-3 บริเวณคลองไร่ มีความยาวประมาณ 4 กิโลเมตร

สถานีที่ 4-6 บริเวณคลองโพงพาง มีความยาวประมาณ 0.6 กิโลเมตร

2.2.1.2 บริเวณหาดทราย

บ้านหาดทรายยาว ตั้งอยู่ที่เส้นละติจูด 6 องศา 36 ลิปดาเหนือ และลองจิจูด 99 องศา 57 ลิปดาตะวันออก พื้นที่เป็นทรายปนโคลนและมีโขดหินเล็กน้อยบริเวณชายฝั่ง โดยกำหนดสถานีที่เป็นตัวแทนของพื้นที่ศึกษาเป็น 6 สถานี

สถานีที่ 7-9 บริเวณหาดทรายทางด้านทิศเหนือ ห่างจากฝั่งประมาณ 0.4 กิโลเมตร

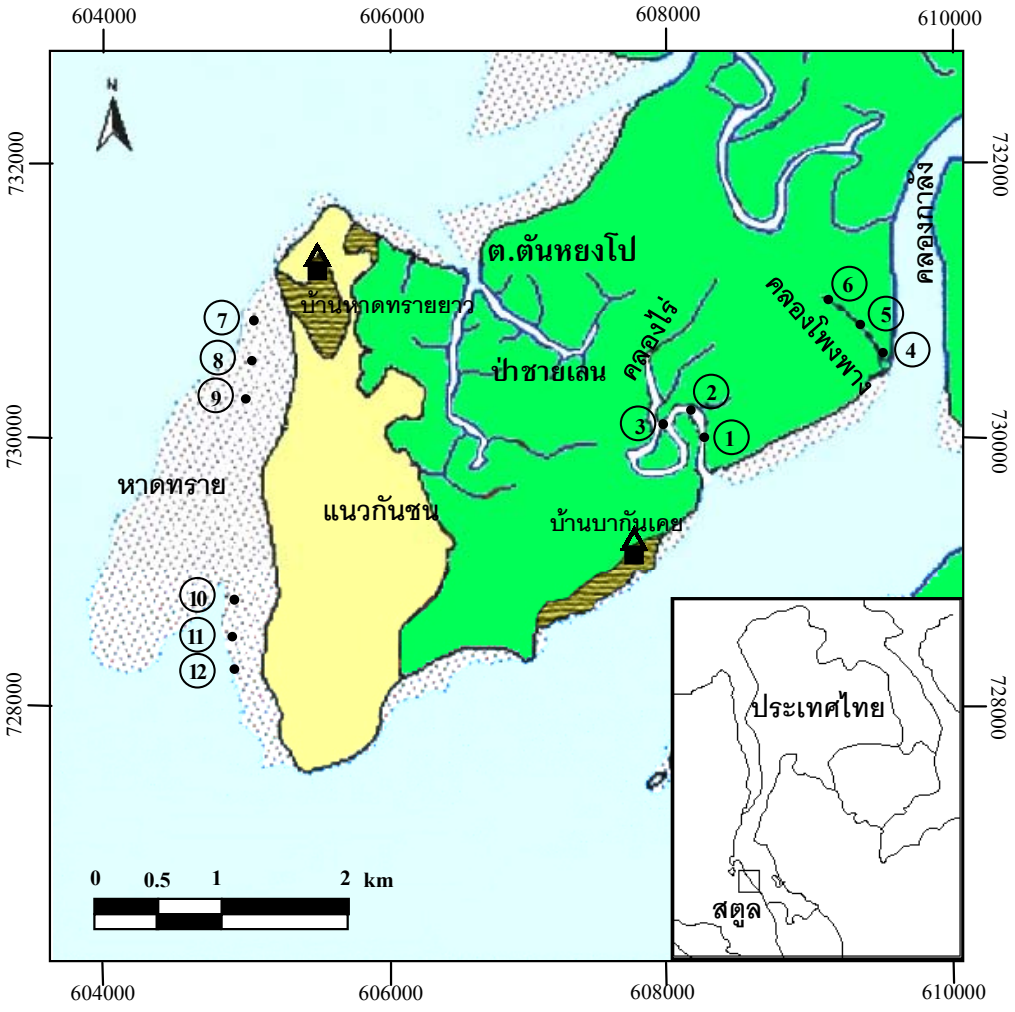
สถานีที่ 10-12 บริเวณหาดทรายทางด้านทิศใต้ ห่างจากหาดทรายทางด้านทิศเหนือประมาณ 0.8 กิโลเมตร

โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนมกราคม2544-มกราคม2545 ซึ่งกรมอุตุนิยมวิทยา (2532) ได้กำหนดให้

ฤดูร้อน ช่วงกลางเดือนกุมภาพันธ์-กลางเดือนพฤษภาคม

ฤดูฝน แบ่งเป็น 2 ช่วง

- ช่วงฝนตกหนัก กลางเดือนพฤษภาคม-กลางเดือนตุลาคม (มรสุมตะวันตกเฉียงใต้)
- ช่วงฝนตกน้อยกลางเดือนตุลาคม-กลางเดือนกุมภาพันธ์ (มรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ)



ภาพประกอบ 2-1 พื้นที่ศึกษาและสถานีเก็บตัวอย่าง ตำบลตันหยงโป อำเภอเมือง จังหวัดสตูล

2.2.2 การเก็บตัวอย่าง

2.2.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำเดือนละ 1 ครั้ง ในขณะน้ำกำลังลง ตั้งแต่เดือนมกราคม 2544–มกราคม 2545 โดยการใช้ขวดเก็บตัวอย่างตักน้ำปริมาตร 1 ลิตรที่ระดับความลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร นำตัวอย่างน้ำเก็บรักษาไว้ใน ice box เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณตะกอนแขวนลอย ปริมาณสารอาหาร และปริมาณคลอโรฟิลล์-เอในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีในภาคสนาม ดังนี้

1) วัดความลึกด้วยลูกดิ่งวัดความลึก

2) วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH-meter ยี่ห้อ Cole Parmer Model 59002-00

3) วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์

4) วัดความเค็มด้วยรีแฟลกซ์โตมิเตอร์ ASL-SO ยี่ห้อ ASAHI

5) วัดปริมาณออกซิเจนละลาย โดยการเก็บตัวอย่างน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำ ใส่ขวด BOD นำไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Strickland และ Parsons (1972)

2.2.2.2 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเดือนละ 1 ครั้ง ในขณะน้ำกำลังลง ตั้งแต่เดือนมกราคม 2544 – มกราคม 2545 โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kramer *et al.* (1994) เก็บตัวอย่างสถานีละ 3 ตัวอย่าง ดังนี้

1) การเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาแพลงก์ตอนพืชกลุ่มนาโนแพลงก์ตอน

โดยการตักน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำแบบ Ruttner ที่ระดับความลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร ปริมาตร 1 ลิตร ใส่ขวดพลาสติกเก็บรักษาตัวอย่างด้วยฟอร์มาลินเข้มข้นที่ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยบอร์แรกซ์ 50 มิลลิลิตร (4% buffered formaldehyde) (Angsupanich and Rakkheaw, 1997) วางตัวอย่างให้ตกตะกอนประมาณ 10 วัน จึงใช้ปิเปตดูดน้ำส่วนใสออกให้เหลือตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิลิตร

2) การเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไมโครแพลงก์ตอน

โดยการตักน้ำที่ระดับความลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร ปริมาตร 120 ลิตร กรองด้วยถุงกรองแพลงก์ตอนขนาดตา 55 ไมครอน เนื่องจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างมีปริมาณตะกอนมาก เก็บรักษาตัวอย่างด้วยฟอร์มาลินเข้มข้นที่ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยบอร์แรกซ์ ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อ

ตัวอย่าง 9 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างไมโครแพลงก์ตอนที่มีขนาด <55 ไมครอน ทำการศึกษาจากตัวอย่างที่เก็บในข้อ 2.2.2.2 (1)

2.3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.3.4.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

นำตัวอย่างน้ำที่เก็บรักษาไว้ใน ice box มาทำการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

1) วัดปริมาณตะกอนแขวนลอยในน้ำ (total suspended solids) โดยนำตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองใยแก้ว GF/C ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส นำแผ่นกรองที่ได้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เพื่อหาน้ำหนักแห้งของตะกอน ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992)

2) วัดปริมาณสารอาหาร ได้แก่ ไนไตรท์-ไนโตรเจน ไนเตรท-ไนโตรเจน ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส และซิลิเกต-ซิลิกอน โดยการเก็บน้ำที่ผ่านการกรองเอาตะกอนแขวนลอยออกมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารตามวิธีการของ Strickland และ Parsons (1972)

3) หาปริมาณของคลอโรฟิลล์-เอ โดยนำตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองใยแก้ว GF/C นำแผ่นกรองที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลด์-เอ โดยวิธี Spectrophotometric method และคำนวณค่าตามสูตรของ SCOR/UNESCO อ้างโดย Strickland และ Parsons (1972)

2.3.4.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกลุ่มนาโนแพลงก์ตอน

นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่ได้มาศึกษาความหนาแน่นของนาโนแพลงก์ตอนโดยการจำแนกออกเป็นกลุ่ม เตรียมตัวอย่างตามวิธี Filter-transfer-freeze (FTF) technique ของ Hewes และ Holm-Hansen (1983) เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อย ทำได้ง่าย สามารถนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้หลายแบบ และตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีนี้เซลล์มีลักษณะเหมือนของจริง โดยนำตัวอย่างมากรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 20 ไมครอน นำตัวอย่างน้ำที่กรองผ่านผ้ากรองจำนวน 1 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรอง polycarbonate ขนาด pore size 1.2 ไมครอน ที่ความดันไม่เกิน 1/3 atm โดยไม่ให้ตัวอย่างแห้ง เพราะจะทำให้เซลล์ตัวอย่างได้รับความเสียหาย จากนั้นนำกระดาษกรองพร้อมตัวอย่างนี้วางโดยคว่ำด้านที่มีตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์ซึ่งได้หยดน้ำกลั่นไว้แล้ว เซลล์ตัวอย่างจะอยู่ในของเหลวระหว่างกระดาษกรองและแผ่นสไลด์ จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปแช่แข็งจนของเหลวที่อยู่ระหว่างกระดาษกรองและแผ่นสไลด์แข็งตัว ลอกกระดาษกรองออกจากแผ่นสไลด์ แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ซึ่ง

หยดด้วย 30% glycerol วางแผ่นสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวอย่างที่แข็งตัวอยู่ละลาย จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า นับจำนวนนาโนแพลงก์ตอนที่พบแต่ละกลุ่ม และจำนวนฟิลด์ที่ดูตัวอย่างจนจำนวนนาโนแพลงก์ตอนที่เป็นกลุ่มเด่นได้ 400 เซลล์ จึงหยุดนับ (Lund *et al*., 1958 อ้างโดย Venrick , 1978) โดยใช้เอกสารอ้างอิงประกอบการจำแนกของลัดดา (2542) Tomas (1997) Kuylenstierna (1989) และ Butcher (1967)

คำนวณหาความหนาแน่นของนาโนแพลงก์ตอน โดยใช้สูตร

ความหนาแน่นนาโนแพลงก์ตอน (เซลล์ต่อลิตร) = [(NxA)/(BxX)]x1000

เมื่อ N = จำนวนเซลล์ของนาโนแพลงก์ตอนที่นับได้ใน B ฟิลด์

A = พื้นที่กรองของกระดาษกรอง (ตารางมิลลิเมตร)

B = จำนวนฟิลด์ที่นับนาโนแพลงก์ตอนกลุ่มเด่นครบ 400 เซลล์

X = พื้นที่ใน 1 ฟิลด์ (ตารางมิลลิเมตร)

2.3.4.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไมโครแพลงก์ตอน

ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่ได้นำมาศึกษาหาความหนาแน่นไมโครแพลงก์ตอน ในระดับสกุล และทำการนับจำนวนเพื่อหาความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไมโครแพลงก์ตอนด้วย Sedgwick Rafter Counting cell ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เอกสารประกอบการจำแนกของ ลัดดา(2542) Tomas(1997) และ Cupp (1943)

คำนวณหาความหนาแน่นของไมโครแพลงก์ตอนโดยใช้สูตร ดังนี้

- กรณีที่นับตัวอย่างจากการเก็บด้วยถุงแพลงก์ตอนขนาด 55 ไมครอน

ความหนาแน่นของไมโครแพลงก์ตอน(เซลล์ต่อลิตร) = (AxB)/120

- กรณีที่นับตัวอย่างจากการตกตะกอน

ความหนาแน่นของไมโครแพลงก์ตอน(เซลล์ต่อลิตร) = (AxB)

เมื่อ A = ความหนาแน่นเฉลี่ยของไมโครแพลงก์ตอนที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

B = ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.4.1 ศึกษาองค์ประกอบของชนิดและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชที่พบ โดยแสดงในรูปตารางและแผนภาพ

2.4.2 ศึกษาการจัดกลุ่มของแพลงก์ตอนพืช โดยการวิเคราะห์ cluster analysis ในรูป Euclidean distance แบบ Ward's method ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PC-ORD Version 3.2 ของ MjM Software Design (McCune and Grace, 2002) โดยใช้ข้อมูลความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชของสถานีและเดือน ทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป Log(X+1) เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ

2.4.3 เปรียบเทียบค่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ ในรูปของแผนภาพ

2.4.4 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมกับความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชบริเวณป่าชายเลนและหาดทราย โดยการวิเคราะห์ Canonical Correspondense Analysis (CCA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PC-ORD Version 3.2 ของ MjM Software Design (McCune and Grace, 2002) โดยใช้ข้อมูลความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชที่เป็นสกุลเด่น 10 สกุลของแต่ละเดือน ทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป Log(X+1) เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ และใช้ค่า intraset correlation ของ Ter Braak (1986) ศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อแพลงก์ตอนพืช

การใช้ข้อมูลความหนาแน่นของสิ่งมีชีวิตที่เก็บตัวอย่างจากสถานีต่าง ๆ และปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ตรวจวัดจากจุดเก็บตัวอย่างเดียวกัน มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์มักพบว่าเป็นปัญหาในการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา เนื่องจากข้อมูลสิ่งมีชีวิตและปัจจัยสิ่งแวดล้อมไม่สัมพันธ์แบบเส้นตรง ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิคที่ขึ้นกับสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) จึงควรหาทางเลือกอื่นในการวิเคราะห์ข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี ordination (การศึกษาการกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตร่วมกับปัจจัยสิ่งแวดล้อม) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยา (Ter Braak, 1986)

การวิเคราะห์ด้วย CCA ordination เป็นการวิเคราะห์ direct gradient analysis ซึ่งวิเคราะห์ผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยตรง เป็นวิธีที่เริ่มมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยา (Palmer, 1993) ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปของกราฟ joint plot ของแกนที่ 1 และ แกนที่ 2 โดยสกุลของแพลงก์ตอนพืชแทนด้วยจุด ปัจจัยสิ่งแวดล้อมแต่ละปัจจัยที่สัมพันธ์กับแพลงก์ตอนพืชแทนด้วยลูกศรที่ออกจากจุดศูนย์กลางของกราฟ ซึ่งจะพาดผ่านจุดที่แทนแพลงก์ตอนพืชแต่ละสกุล (Ter Braak , 1986) ความยาวลูกศรแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปัจจัย

สิ่งแวดล้อมแต่ละค่าในกราฟ ทิศทางลูกศรแสดงให้เห็นว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับแพลงก์ตอนพืชชนิดไหน ตำแหน่งของแพลงก์ตอนพืชแต่ละจุดตามลูกศรที่แทนปัจจัยสิ่งแวดล้อมแต่ละตัวแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อแพลงก์ตอนพืชชนิดนั้น ๆ (Palmer, 1993) อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ CCA ด้วยโปรแกรม PC-ORD version 3.2 มีข้อจำกัดคือ สามารถใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตได้ แต่ไม่สามารถตัดปัจจัยร่วม (covariable) ที่มีความสัมพันธ์ต่อกันออกจากการวิเคราะห์ได้ (Ter Braak ,1986)