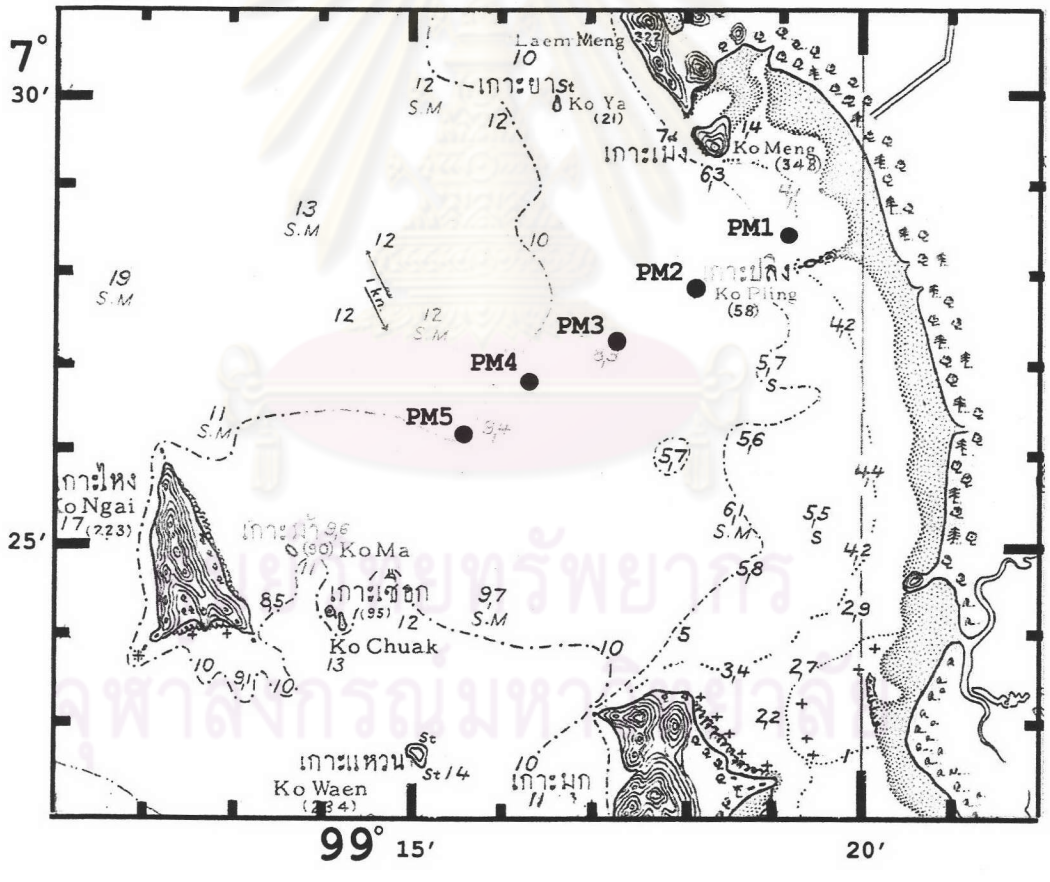
บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

สถานที่ศึกษา

ทำการศึกษาบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ใกล้กับบริเวณปากคลองปากเมง โดยเริ่มจากบริเวณที่อยู่ใกล้เกาะปลิงไปจนถึงเกาะม้า โดยเก็บตัวอย่างเป็นแนวตั้งฉากกับชายฝั่งออกไป (รูปที่ 11) จำนวน 5 สถานี ซึ่งระยะห่างของแต่ละสถานีประมาณ 2 กิโลเมตร ตำแหน่งและสภาพพื้นที่ของแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างแสดงในตารางที่ 8



รูปที่ 11 จุดเก็บตัวอย่างในบริเวณชายฝั่งทะเล คลองปากเมง จังหวัดตรัง

ตารางที่ 8 สถานีศึกษาในบริเวณชายฝั่งทะเลคลองปากเมง จังหวัดตรัง

สถานี	ละติจูด	ลองติจูด	สภาพพื้นที่
PM1	7° 28′ 24.3″ N	99° 19′ 10.1″ E	เป็นบริเวณที่อยู่ใกล้เกาะปลิง ซึ่งห่างจากชายฝั่งประมาณ 2 กม.
PM2	7° 27′ 46.6″ N	99° 18′ 9.88″ E	บริเวณที่อยู่ในทะเล ห่างจากชายฝั่งประมาณ 4 กม.
PM3	7° 27′ 12.7″ N	99° 17′ 17.8″ E	บริเวณที่อยู่ในทะเล ห่างจากชายฝั่งประมาณ 6 กม.
PM4	7° 26′ 44.1″ N	99° 16′ 16.1″ E	บริเวณที่อยู่ในทะเล ห่างจากชายฝั่งประมาณ 8 กม.
PM5	7° 26′ 13.6″ N	99° 15′ 33.9″ E	บริเวณที่อยู่ในทะเลใกล้เกาะม้า ห่างจากชายฝั่ง ประมาณ 10 กม.

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาน้ำขึ้นจำนวน 2 ครั้ง คือครั้งที่ 1 ในเดือนเมษายน 2546 เพื่อเป็นตัวแทนในช่วงก่อนฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (Pre-Southwest Monsoon Period) และครั้งที่ 2 ในเดือนธันวาคม 2546 เพื่อเป็นตัวแทนในช่วงหลังฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (Post-Southwest Monsoon Period)

1. การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ทำการวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพในแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างดังนี้คือ

1.1 ความลึก วัดโดยเครื่องมือวัดความลึกของน้ำด้วยเสียงสะท้อน Hand Depth Sounder

1.2 อุณหภูมิ วัดโดยเครื่อง SCT (YSI model 30) ตามความลึกของน้ำทุกๆ ระยะ 1 เมตร

1.3 ความเค็ม วัดโดยเครื่อง SCT (YSI model 30) ตามความลึกของน้ำทุกๆ ระยะ 1 เมตร

1.4 ปริมาณออกซิเจนละลาย วัดโดยเครื่อง DO meter (YSI model 55) ตามความลึกของน้ำทุกๆ ระยะ 1 เมตร

1.5 pH วัดโดยเครื่อง pH meter แบบพกพา ที่ความลึก 1 เมตร จากผิวน้ำ

1.6 ความโปร่งแสงของน้ำวัดโดย Secchi disc

นอกจากนี้ยังได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำโดยใช้กระบอกเก็บน้ำแนวดิ่งที่ระดับความลึก 1 เมตรและ 5 เมตร ใต้ผิวน้ำในแต่ละสถานีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ *เอ* และสารอาหารในน้ำคือปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟต และซิลิเกต ตามวิธีการของ Parsons *et al.* (1984) ในห้องปฏิบัติการ

2. การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์โดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดตา 100 และ 330 ไมครอน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ที่ครอบคลุมทั้งขนาดไมโครแพลงก์ตอนและขนาดเมโซแพลงก์ตอนรวมทั้งขนาดใหญ่กว่าเมโซแพลงก์ตอน ใช้วิธีการลากแพลงก์ตอนในแนวดิ่ง (vertical tow) จำนวน 3 ซ้ำ โดยจะติดเครื่องวัดอัตราการไหลผ่านของกระแสน้ำ (flow meter) ที่ปากถุงลากแพลงก์ตอน ค่อยๆ ปล่อยถุงลากแพลงก์ตอนลงไปในน้ำอย่างช้าๆ จนถึงพื้นทะเลโดยให้ปลายถุงลากแพลงก์ตอนอยู่ติดพื้นท้องทะเลเพื่อให้สามารถเก็บแพลงก์ตอนสัตว์บางกลุ่มซึ่งอาจอาศัยอยู่บริเวณหน้าดินได้ด้วย ทิ้งถุงแพลงก์ตอนไว้ประมาณ 3 นาทีแล้วค่อยๆ ดึงถุงลากแพลงก์ตอนขึ้นมา บันทึกค่าจาก flow meter แล้วเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก รักษาตัวอย่างด้วยน้ำยาฟอร์มาลินที่เป็นกลางความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 4-6 %

การวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์

วิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ในห้องปฏิบัติการ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope ทำการจำแนกแพลงก์ตอนสัตว์ถึงระดับกลุ่มและรายงานความหนาแน่นเป็นจำนวนตัวของแพลงก์ตอนสัตว์ต่อปริมาตรน้ำ 100 ลูกบาศก์เมตร สำหรับแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่ม Copepod และ Chaetognath จะทำการแยกออกจากตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์อื่นๆ แล้วจึงจำแนกถึงระดับชนิด (species) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงขึ้น โดยอ้างอิงตามเอกสารของ สุนีย์ สุวภีพันธ์ (2527), ลัดดา วงศ์รัตน์ (2543), Scott (1909), Davis (1955), Newell and Newell (1963), Alvarino (1967), Smith (1977), Yamaji (1984), Nishida (1985), Suwanrumpha (1987), Bradford (1994), Guglielmo and Ianora (1995), Huys *et al.* (1996), Chihara and Murano (1997), Boltovskoy (1999), Bradford (1999), Pinkaew (2003), Mulyadi (2003) และ Mulyadi (2004)

พลสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนสัตว์ใช้สมการดังนี้

$$T = \frac{100 \times t}{V}$$

เมื่อ T = จำนวนตัวของแพลงก์ตอนสัตว์ ในหน่วย ตัวต่อปริมาตรน้ำ100 ลูกบาศก์เมตร

t = จำนวนตัวของแพลงก์ตอนสัตว์ที่ได้จากการนับตัวอย่าง หน่วยเป็น ตัว

V = ปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ผ่านถุงลากแพลงก์ตอน หน่วยเป็น ลูกบาศก์เมตร

โดย $V = a \times n \times N_1$ หรือ $\frac{n \times a}{N}$

เมื่อ a = พื้นที่หน้าตัดของถุงลากแพลงก์ตอนเป็นตารางเมตร

n = จำนวนรอบของเครื่องวัดอัตราการไหลผ่านของกระแสน้ำ

N = ค่าคงที่ของจำนวนรอบของเครื่องวัดอัตราการไหลผ่านของกระแสน้ำในระยะ 1 เมตร

N_1 = ค่าคงที่มีระยะทางเป็นเมตรเมื่อเครื่องวัดอัตราการไหลผ่านของกระแสน้ำหมุนไป 1 รอบ

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน

สำหรับแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มเด่นคือ Copepods และ Chaetognaths จะทำการคำนวณหามวลชีวภาพในรูปของปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนด้วยเครื่อง CHN Analyzer (ยี่ห้อ Perkin Elmer: Model PE 2400 Series II CHNS/O Analyzer) สำหรับตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์สามารถทำได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Theilacker and Kimball, 1984: Harris *et al.*, 2000: Uye *et al.*, 2000)

1. คัดแยกตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ที่ต้องการวิเคราะห์คือ Copepods และ Chaetognaths โดยแยกชนิดและทำการวัดความกว้างและความยาว (width and total length) ของแต่ละตัวแต่ละชนิด
2. ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นและสารละลาย Isotonic Ammonium Formate (ความเข้มข้น 1 M) ประมาณ 30-40 มิลลิลิตร

3. นำตัวอย่างที่ล้าง formalin และเกลือออกแล้วใส่ลงใน tin capsules ซึ่งรู้น้ำหนักมาก่อนแล้ว (น้ำหนัก tin caps เปล่า, b) โดยใส่ตัวอย่างลงใน tin capsule ประมาณ 50-500 ตัวต่อ 1 tin capsule (น้ำหนักแห้งประมาณ 1-7 มิลลิกรัม)
4. นำ Tin capsule ที่มีตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์อยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่ แล้วจึงชั่งน้ำหนัก (น้ำหนัก tin caps + ตัวอย่าง, a) นำค่าน้ำหนัก a-b จะได้น้ำหนักของตัวอย่าง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CHN Analyzer ต่อไป
5. เปิด Gas Helium ที่ความดัน 20 psi Oxygen ที่ความดัน 18 psi และอากาศที่ความดัน 60 psi จากนั้นจึงเปิดเครื่อง CHN Analyzer โดย Combustion tube จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 925 องศาเซลเซียส Reduction tube ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 640 องศาเซลเซียส และความดันในระบบประมาณ 740 มิลลิเมตรปรอท เมื่อตรวจสอบค่าสภาวะต่างๆ ของเครื่องแล้วให้เปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงแล้วจึงจะเริ่มใช้จริง
6. หลังจากเปิดเครื่องไว้ครบ 2 ชั่วโมงแล้วจะต้องทดสอบ blank ก่อนโดยใช้อากาศเป็นค่า blank ซึ่งค่าผลต่างของค่า CHN ที่ได้จากการทดสอบ blank แต่ละครั้งนั้นจะต้องอยู่ในช่วง C$\pm$30, H$\pm$100 และ N$\pm$16 ถ้าค่าที่ได้มีผลต่างในการวัดแต่ละครั้งไม่อยู่ในช่วงนี้ให้ทำซ้ำจนกว่าจะได้
7. หาความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์โดยวัดค่า K factor โดยใช้สาร Acetaniline ($C_6H_5NHCOCH_3$) ซึ่งมีค่า %C=71.09, %H=6.71 และ%N=10.36 เป็นสารมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างเพื่อหาค่า K1 ประมาณ 4-5 ครั้ง แล้วเทียบค่า C H และ N โดยค่า K1 ที่วิเคราะห์ได้จะต้องมีค่า C 16.5$\pm$3.5, H 50.0$\pm$20.0 และ N 6.0$\pm$3.0 และค่าความผิดพลาดไม่ควรเกิน C$\pm$0.15, H$\pm$3.75 และ N$\pm$0.16
8. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยวิเคราะห์สารมาตรฐาน Acetaniline แทนตัวอย่าง นำค่าที่ได้จากการวัดสารมาตรฐานไปเทียบกับค่า %C, %H และ %N ที่แน่นอนของสาร Acetaniline (%C=71.09, %H=6.71 และ %N=10.36) ถ้าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันจึงจะสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไปได้ แต่ถ้าค่าไม่ใกล้เคียงต้องเริ่มทดสอบค่า blank และค่า K1 ใหม่
9. เมื่อได้ค่า blank ค่า K1 และตรวจสอบความถูกต้องเรียบร้อยแล้วจึงเริ่มวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างที่ทราบน้ำหนัก (a-b) ใส่ค่าน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้นเครื่องจะทำการวัดค่าและแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณคาร์บอน ไฮโดรเจนและไนโตรเจน (หน่วยเป็นไมโครกรัม) เทียบกับสารมาตรฐานต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. คำนวณค่าดัชนีความหลากหลาย (Diversity index) และดุลยภาพของการกระจาย (Evenness index) ของแพลงก์ตอนสัตว์ในบริเวณศึกษา ตามสมการดังนี้

Shannon and Wiener diversity index (1949)

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} P_i \ln P_i$$

เมื่อ H' คือค่าดัชนีความหลากหลาย

S คือจำนวนชนิด/กลุ่มทั้งหมด

P_i คือสัดส่วนของจำนวนตัวของชนิด/กลุ่มที่ i ต่อจำนวนตัวทั้งหมด

โดยค่า Shannon diversity index จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง ค่าอนันต์ ขึ้นอยู่กับจำนวนชนิดและจำนวนตัวของแพลงก์ตอนสัตว์ที่พบ ถ้าบริเวณใดมีค่า Diversity index สูง แสดงว่ามีความหลากหลายของแพลงก์ตอนสัตว์สูง

Pielou's evenness component diversity (1976)

$$E1 = \frac{H'}{\ln (S)}$$

เมื่อ E1 คือค่า Pielou's evenness

H' คือค่า Shannon's diversity index

S คือจำนวนชนิด/กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่พบทั้งหมดในตัวอย่าง

โดยค่า Evenness index จะมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้าบริเวณใดมีค่าต่ำแสดงว่าแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละชนิด/กลุ่มมีความหนาแน่นไม่เท่ากันและมีบางชนิด/กลุ่มเป็นชนิด/กลุ่มเด่นในบริเวณนั้น ถ้าบริเวณใดมีค่าใกล้เคียงกับ 1 แสดงว่าแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละชนิด/กลุ่มมีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน

2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของแพลงก์ตอนสัตว์กับคุณภาพน้ำและปัจจัยสิ่งแวดล้อมในแต่ละสถานี โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation coefficient)
3. จัดกลุ่มประชากรแพลงก์ตอนสัตว์ในแต่ละสถานีและแต่ละช่วงเวลา (Clustering analysis) โดยพิจารณาจากค่าความคล้ายคลึง (Bray-Curtis Similarity) ของกลุ่มประชากรด้วยโปรแกรม PRIMER 5 (Clarke and Gorley, 2001)