บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาคุณภาพน้ำ

2.1.1 บริเวณทำการศึกษา

ทำการตรวจวัดและเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณอ่าวป่าตอง รวมทั้งสิ้น 6 สถานี ดังแสดงในภาพที่ 2 ได้แก่

-สถานีที่ 1 บริเวณปากคลองปากบาง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการระบายน้ำทิ้งจากโรงงานบำบัดน้ำเสียเทศบาลป่าตองลงสู่ทะเล

-สถานีที่ 2 บริเวณแนวปะการังตอนใต้ของอ่าวป่าตองด้านหน้าโรงแรมคอรัลบีช

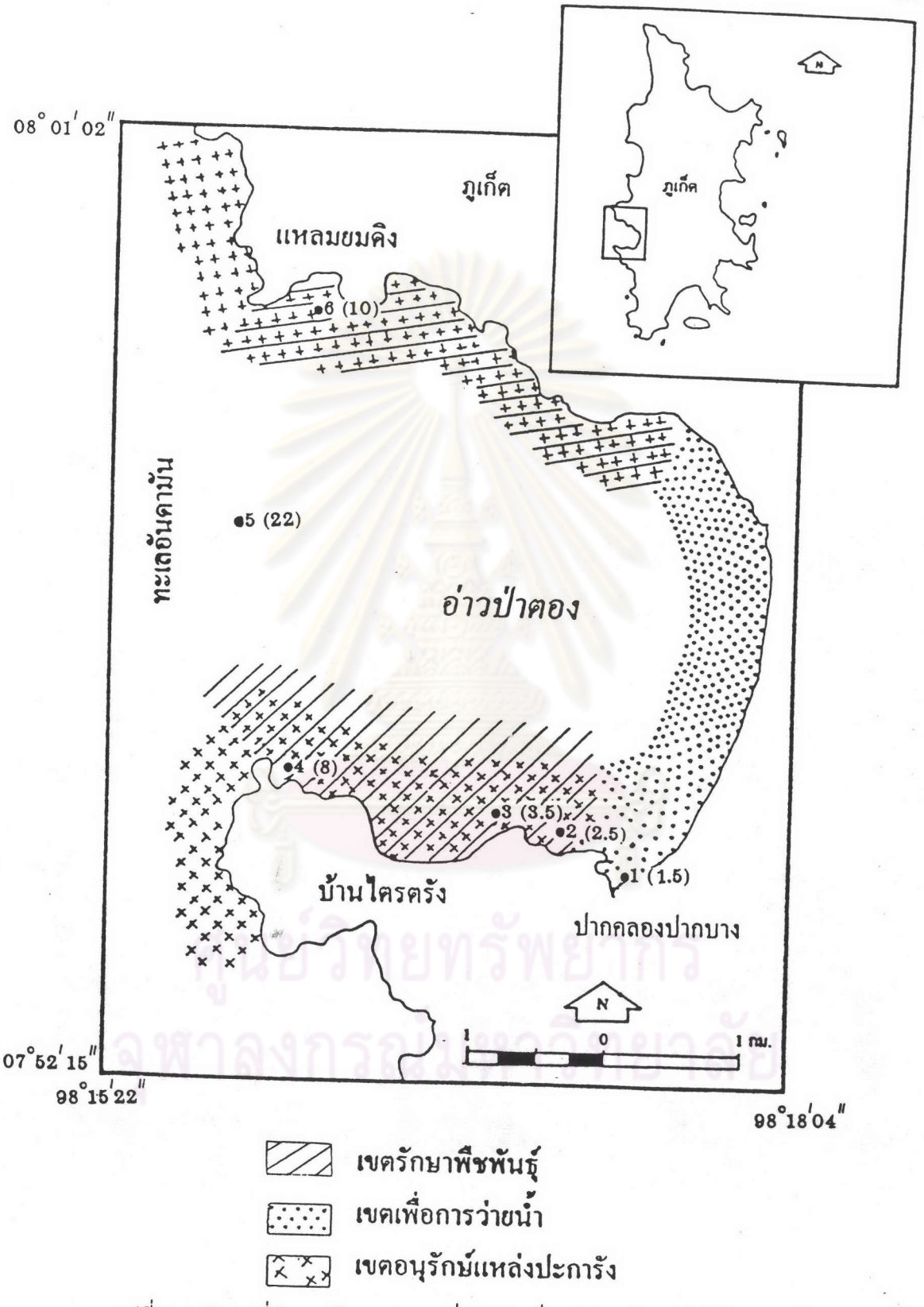
-สถานีที่ 3 บริเวณแนวปะการังตอนใต้ของอ่าวป่าตองใกล้สะพานหน้าโรงแรมคอรัลบีช

-สถานีที่ 4 บริเวณแหลมคอใสรอด

-สถานีที่ 5 บริเวณกลางอ่าว

-สถานีที่ 6 บริเวณแนวปะการังด้านเหนือของอ่าวป่าตอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 บริเวณที่ทำการศึกษาและจุดที่เก็บตัวอย่าง (ตัวเลขในวงเล็บคือความลึกเฉลี่ยของจุดที่ทำการศึกษาเมื่อน้ำขึ้นสูงสุด มีหน่วยเป็นเมตร)

2.1.2 วิธีดำเนินการศึกษา

ทำการวัดคุณภาพและเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณใต้ผิวน้ำ 1 เมตร และเหนือระดับหน้าดิน 1 เมตรจากจุดทำการศึกษาดังกล่าว ในกรณีที่น้ำลึกน้อยกว่า 5 เมตรจะเก็บน้ำที่ความลึกใต้ผิวน้ำ 1 เมตร เพียงระดับเดียว โดยใช้ขวดเก็บน้ำแบบ Kitahara ในกรณีที่ไม่ลึกนักจะใช้การเดินเก็บ ส่วนการหาปริมาณโคลิฟอร์มและฟีคอลโคลิฟอร์มจะใช้ขวดสีชาความจุ 100 มิลลิลิตรที่อบฆ่าเชื้อแล้วเก็บน้ำตัวอย่างที่ระดับใต้ผิวประมาณ 1 เมตร หลังจากเก็บตัวอย่าง แช่น้ำตัวอย่างในน้ำแข็งจนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล นำน้ำตัวอย่างส่วนหนึ่งมากรองโดยใช้ GF/C และ millipore filter เพื่อหาปริมาณตะกอนแขวนลอยในน้ำ น้ำที่ได้จากการกรองดังกล่าวจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในน้ำต่อไป น้ำอีกส่วนหนึ่งจะกรองด้วย GF/F เพื่อหาค่าปริมาณคลอโรฟิล เอ ในน้ำทะเล โดยจะเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้งในช่วงน้ำลงต่ำสุด ยกเว้นในช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ซึ่งคลื่นลมค่อนข้างรุนแรงจนไม่สามารถออกเก็บตัวอย่างได้

คุณภาพน้ำทางกายภาพที่ทำการตรวจวัดขณะออกเก็บตัวอย่างได้แก่

- อุณหภูมิน้ำทะเล ใช้ YSI model 33 S-C-T meter วัดที่ความลึกเดียวกับความลึกที่เก็บตัวอย่างน้ำ (หน่วยเป็นองศาเซลเซียส)

- ความเค็ม ใช้ YSI model 33 S-C-T meter วัดที่ความลึกเดียวกับความลึกที่เก็บตัวอย่างน้ำ (หน่วยเป็นส่วนในพันส่วน)

- ความโปร่งใส ใช้ sechi-disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร วัดความลึกที่แสงสามารถส่องลงไปได้ (หน่วยเป็นเมตร)

- ความเป็นกรดด่าง ใช้ GEM pH meter model GEM10 วัดที่ความลึกเดียวกับความลึกที่เก็บตัวอย่างน้ำ

- ปริมาณออกซิเจนละลาย ใช้ YSI model 51B Dissolved Oxygen meter วัดที่ความลึกเดียวกับความลึกที่เก็บตัวอย่างน้ำ (หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร)

คุณภาพน้ำอื่นๆ ที่ต้องเก็บน้ำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้แก่ ปริมาณตะกอนแขวนลอย (suspended solids), แอมโมเนีย (NH_3-N), ไนไตรท์-ไนโตรเจน (NO_2-N), ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N), ฟอสเฟต (PO_4^+) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีของ Strickland and Parsons, 1972 ปริมาณคลอโรฟิล เอ (Chlorophyll a) วิเคราะห์โดยวิธีของ Parsons et. al.,1984.), ค่ารวมของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total Coliform Bacteria) และฟีคอลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Faecal Coliform Bacteria) วิเคราะห์โดยวิธี Multiple Tube Fermentation (American Public Health Association, 1975.)

2.2 การศึกษาสภาพแนวปะการัง

2.2.1 บริเวณทำการศึกษา

ทำการศึกษาแนวปะการังบริเวณตอนใต้ของอ่าวป่าตอง จำนวน 3 สถานี คือแนวปะการังบริเวณสถานีที่ 2 (บริเวณหน้าโรงแรมคอรัลบีช) สถานีที่ 4 (บริเวณปลายแหลมคอใสรอด) และตอนเหนือของอ่าวป่าตองบริเวณสถานีที่ 6 (ป่าตองเหนือ) ซึ่งจุดทำการศึกษาดังกล่าวเป็นจุดทำการศึกษาเดียวกับที่สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเลได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงสภาพแนวปะการังบริเวณอ่าวป่าตองมาตั้งแต่ปี 2531 จนถึงปัจจุบัน

2.2.2 วิธีดำเนินการศึกษา

2.2.1 ศึกษาสภาพปะการังโดยวิธี line-transect

ทำการศึกษาโดยดัดแปลงจากวิธีการสำรวจสภาพปะการังในโครงการอาเซียน-ออสเตรเลีย (Dartnall and Jones, 1987) โดยวางเทปวัดระยะทางยาว 100 เมตร บริเวณแนวปะการังที่ทำการสำรวจให้ขนานกับชายฝั่ง จากนั้นทำการบันทึกองค์ประกอบสิ่งมีชีวิตหน้าดินตามลักษณะรูปทรง (Benthic lifeform) ที่เทปวัดระยะทางลากผ่าน โดยแบ่งองค์ประกอบสิ่งมีชีวิตหน้าดินที่พบได้เป็น

ปะการังเขากวาง (ปะการังในสกุล Acropora) มีชีวิต ใช้สัญญลักษณ์ AC

ปะการังมีชีวิตชนิดอื่นๆ (Live coral) ใช้สัญญลักษณ์ LC

สิ่งไม่มีชีวิตอื่นๆ เช่น หิน ทราย (Abiotic component) ใช้สัญญลักษณ์ ABT

ปะการังตาย (Dead coral) ใช้สัญญลักษณ์ DC

สาหร่าย (Algae) ใช้สัญญลักษณ์ ALG

องค์ประกอบสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น ปะการังอ่อน กัลปังหา (Other fauna) ใช้สัญญลักษณ์ OT

โดยเทปวัดระยะทาง 100 เมตรนี้จะถือว่าเป็นพื้นที่ที่กำหนดไว้เป็นจุดทำการศึกษาในบริเวณสถานีนั้นๆ และใช้แท่งเหล็กตอกเป็นแนวไว้เพื่อให้สามารถเก็บข้อมูลที่จุดเดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุดในทุกๆครั้งที่มาทำการศึกษา ข้อมูลที่ได้นำมาคำนวนเปอร์เซนต์ครอบคลุมพื้นที่ของปะการัง และองค์ประกอบอื่นๆต่อ 1 line-transect โดยจะติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 3 เดือน

2.2.2 ศึกษาสภาพปะการังโดยวิธี permanent quadrat

ในบริเวณแนวปะการังที่ทำการศึกษา จะกำหนดพื้นที่ถาวรโดยการสุ่มและใช้ตะปูคอนกรีตตอกยึดและขึงเส้นลวดไว้ในพื้นที่ขนาด 0.5*0.5 เมตร ต่อ 1 quadrat ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ 0.25 ตารางเมตร จำนวน 30 อันต่อ 1 จุดทำการศึกษา

การติดตามการเปลี่ยนแปลงจะทำโดยใช้กล้อง Nikonos V และเลนส์ 28 มม. ยึดติดกับกรอบ (frame) เพื่อให้เลนส์กับพื้นที่ที่จะถ่ายภาพอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันทุกๆภาพ ทำการถ่ายภาพปะการัง และองค์ประกอบสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ภายใน quadrat ดังกล่าว เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงอย่าง

ละเอียด โดยจะนำมาแยกตัดชิ้นส่วนปะการังมีชีวิตและปะการังตาย แยกชั่งและคำนวนหาค่าเฉลี่ยของอัตราการครอบคลุมพื้นที่ของปะการังมีชีวิตและปะการังตาย โดยทำการศึกษาทุกๆเดือน

2.3 การศึกษาองค์ประกอบและปริมาณแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

2.3.1 การศึกษาแพลงก์ตอนพืช

ใช้ถุงแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 25 ไมครอน ลากตามแนวตั้ง (vertical) จากระดับต่ำกว่าผิวน้ำประมาณ 4 เมตร หรือแล้วแต่ระดับความลึกในแต่ละสถานีที่ทำการศึกษา (ยกเว้นสถานีที่ 1 ซึ่งมีปริมาณตะกอนแขวนลอยสูง และระดับน้ำตื้นมาก) นำแพลงก์ตอนพืชจากถุงที่มีขนาดตาดังกล่าวมาเก็บ (fix) ในฟอร์มาลิน 5% รักษาสภาพ (preserve) ในฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้น 3% เพื่อนำมาจำแนกจนถึงระดับสกุล (genus) และจัดเรียงลำดับทางอนุกรมวิธานตาม Cupp, 1943., Simonsen,1974 และ Fukuyo et al., 1990) จากนั้นคำนวนหาปริมาณแพลงก์ตอนต่อปริมาตรน้ำ 1 ลูกบาศก์เมตร โดยทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้ง

2.3.2 การศึกษาแพลงก์ตอนสัตว์

ใช้ถุงแพลงก์ตอนที่มีขนาดตา 330 ไมครอน ทำการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช โดยเก็บ (fix) ในฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้น 10% และรักษาสภาพตัวอย่างในฟอร์มาลิน 5% นำมาจำแนกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ และจัดเรียงลำดับทางอนุกรมวิธานตาม Barnes, 1980

2.4 การศึกษาดินตะกอนและปริมาณแบคทีเรียในดินตะกอน

2.4.1 การศึกษาอัตราการตกตะกอน

ทำการศึกษาอัตราการตกตะกอนในสถานีที่เก็บตัวอย่างน้ำ (ยกเว้นสถานีที่ 5) โดยใช้ขวดดักตะกอนซึ่งมีลักษณะเป็นขวดแก้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซ.ม.วางบนแท่นดักตะกอนซึ่งหล่อด้วยคอนกรีต มีแกนเหล็กสำหรับยึดให้ปากขวดสูงจากพื้นประมาณ 40 เซนติเมตร และนำขวดใหม่ไปเปลี่ยนทุกๆ 2 สัปดาห์ นำตะกอนที่อยู่ในขวดมาล้างแช่น้ำจืดเพื่อล้างเกลือ นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งและคำนวนหาอัตราการตกตะกอนต่อพื้นที่ต่อวัน

2.4.2 การวิเคราะห์ขนาดตะกอนดิน

เก็บตัวอย่างดินในสถานีที่เก็บตัวอย่างน้ำ (ยกเว้นสถานีที่ 5) ด้วยท่อเก็บดิน (core) นำตัวอย่างตะกอนดินประมาณ 150 กรัม มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนกระทั่งมีน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในภาชนะดูดความชื้น หลังจากนั้นนำตะกอนดินที่ทราบน้ำหนัก มาร่อนโดยใช้วิธีการร่อนแบบแห้ง (machanical dry seiving method) ผ่านตะแกรงร่อนอัตโนมัติที่มีตะแกรงขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.063 มิลลิเมตร เรียงเป็นชั้นตามลำดับ เป็นเวลา 10 นาที

นำตะกอนดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงแต่ละชั้นมาชั่งน้ำหนัก และคำนวนเปอร์เซนต์เฉลี่ยของตะกอนดินขนาดต่างๆ และนำค่าดังกล่าวมาคำนวนโดยวิธี moment methods (McManus, 1988) เพื่อหาเฉลี่ยขนาดของตะกอนดิน

2.4.3 การหาปริมาณสารอินทรีย์ในดิน

การหาปริมาณสารอินทรีย์จะทำโดยการเผา (ignition loss) โดยนำตัวอย่าง ดินอบแห้งที่ทราบน้ำหนักมาทำการเผาในเตาอบที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เอาออกจากเตาอบทิ้งให้เย็นในภาชนะดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักที่หายไป ซึ่งน้ำหนักที่หายไปนี้คือปริมาณของสารอินทรีย์ในดิน จากนั้นคำนวนปริมาณสารอินทรีย์คิดเป็นเปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง โดยใช้สูตร

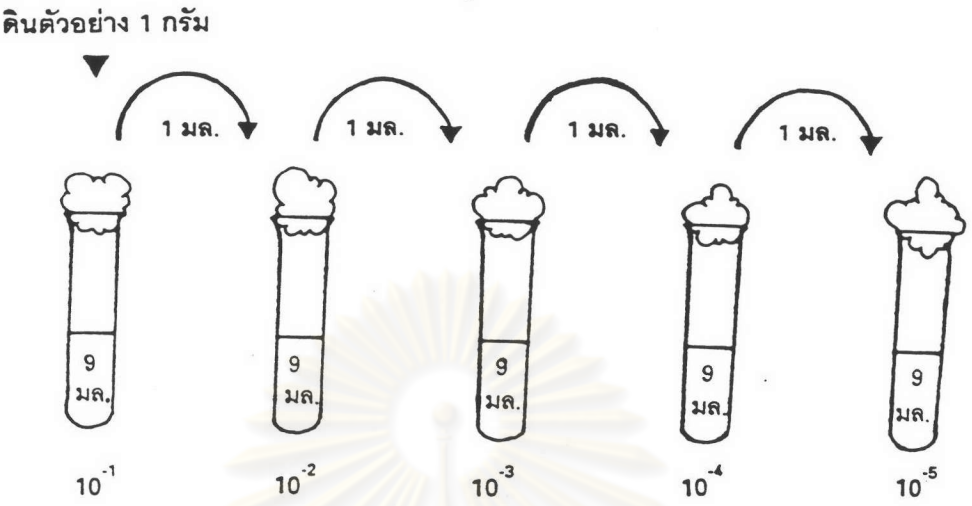
$$\text{ปริมาณสารอินทรีย์คิดเป็นเปอร์เซนต์} = \frac{\text{น้ำหนักดินที่หายไป}}{\text{น้ำหนักของดินก่อนเผา}} \times 100$$

2.4.4 การหาปริมาณแบคทีเรียในดิน

เก็บตัวอย่างดินในสถานีที่เก็บตัวอย่างน้ำ (ยกเว้นสถานีที่ 5) โดยใช้ท่อเก็บดินพลาสติกที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% ปิดฝาแล้วแช่เย็นจนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการ

ชั่งดินบริเวณผิวหน้า และที่ระดับลึกลงไป 5 เซนติเมตร อย่างละ 1 กรัม ซึ่งทุกขั้นตอนของการศึกษาจะต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ นำตัวอย่างดินที่ชั่งได้มาใช้ในการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้เกิดโคโลนีของแบคทีเรียในจานเพาะเชื้ออยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี การเจือจางดังกล่าวทำโดยใส่ดินที่ชั่งได้ลงใน Peptone buffer solution ซึ่งมีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ 7% 9 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ โดยใช้เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง (mixer) เป็นเวลา 3 นาที การเจือจางในขั้นนี้จะได้ความเข้มข้น 1:10 ซึ่งจะใช้ในการเจือจางในขั้นต่อไป ซึ่งทำได้โดยใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารผสมในหลอดที่มีความเข้มข้น 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Peptone buffer solution 9 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง ในขั้นนี้จะได้ความเข้มข้น 1:100 ทำการเจือจางต่อในความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1:100 1:1000 1:10000 1:100000 ด้วยวิธีเดียวกัน ซึ่งการเจือจางจะแสดงได้ดังรูปที่ 2.2

ใช้ปิเปตดูดน้ำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยยกฝาจานให้สูงเพียงให้ปิเปตสอดเข้าไปได้ เอียงปิเปตทำมุม 45 องศา โดยให้ปลายแตะด้านในของจาน แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacto Marine Agar ที่ทำให้เหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส จำนวน 10-12 มิลลิลิตรลงในจาน หมุนจานไปมาเพื่อให้ตัวอย่างผสมกับอาหารกระจายไปทั่วจาน



รูปที่ 2.2 การเจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ (ดัดแปลงจาก:Colwell and Zambruski, 1972)

ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้แข็งตัว จึงไปเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง โดยพลิกกลับให้จานเพาะเชื้อคว่ำลง

เมื่อครบตามกำหนดเวลาแล้ว ทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยจะนับเฉพาะจานที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีเท่านั้น เมื่อนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อได้แล้ว ให้คำนวนจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่นับได้ต่อน้ำหนักเปียกของดิน 1 มิลลิกรัม โดยคูณจำนวนโคโลนีด้วยส่วนกลับของอัตราการเจือจางที่ใช้ แล้วรายงานผลเป็น "colony-forming units" (CFU)/mg. จากนั้นคำนวนให้เป็นจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียต่อน้ำหนักแห้งของดิน 1 กรัม (CFU/mg. dry weight)

ในการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในดิน จะทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้ง

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลจากการศึกษาคุณภาพน้ำ อัตราการตกตะกอน ปริมาณแบคทีเรียในดิน มาหาความแตกต่างของแต่ละสถานีในแต่ละช่วงฤดูมรสุม คือมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (เดือนธันวาคม-เมษายน) ซึ่งเป็นฤดูร้อน และมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (เดือนพฤษภาคม-พฤศจิกายน) ซึ่งเป็นฤดูฝน โดยใช้ ANOVA (Two-factor with Replication) ที่ α = 0.05 เพื่อพิจารณาว่าพารามิเตอร์ดังกล่าวมีความแตกต่างระหว่างสถานีหรือมรสุมหรือไม่ โดยพิจารณาจากค่า F_{column} และ F_{sample} ตามลำดับ หรืออาจพิจารณาได้จาก P-value ซึ่งหากมีความแตกต่างเกิดขึ้น (คือค่า F ที่ได้จากการคำนวนมีค่าสูงกว่าค่า $F_{critical}$ หรือ P-value มีค่าน้อยกว่าระดับความเชื่อมั่น) จะทำการทดสอบต่อไปโดยใช้ α = 0.001 เพื่อพิจารณาว่าเป็นความ

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติหรือไม่ โดยพิจารณาจากหลักเดียวกัน การวิเคราะห์ดังกล่าวใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft EXCEL version 4.0

นอกจากนี้ยังหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างพารามิเตอร์บางประการ เพื่อดูแนวโน้มและความสัมพันธ์ที่น่าจะเป็นไปได้ของพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft EXCEL version 4.0 เช่นเดียวกัน

2.6 ระยะเวลาทำการศึกษา

เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมีนาคม 2536 จนถึงเดือนกันยายน 2537 รวมเวลา 1 ปี 9 เดือน โดยออกเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาตามช่วงเวลาที่กำหนดไว้ในแต่ละหัวข้อที่ทำการศึกษา ยกเว้นในบางกรณีที่มีมรสุมหรือคลื่นลมรุนแรงจนไม่สามารถออกทำการเก็บตัวอย่างหรือทำการศึกษาได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย