บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

สถานที่ศึกษา

สถานที่ศึกษาอยู่ในป่าชายเลนคลองแพรกใหญ่ ตำบลบ้านคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม ระหว่างเส้นรุ้งที่ 13° 20′ N และ 13° 31′ N และเส้นแวงที่ 99° 52 ′E และ 100° 05′ E แบ่งการศึกษาออกเป็น 5 สถานี ตามต้นโกงกางที่มีอยู่ 5 ต้นในคลองแพรกใหญ่ คือ สถานี R1, R2, R3, R4 และ R5 (รูปที่ 24)

สถานี R1 อยู่ด้านในสุดของคลองใกล้กับนากุ้ง เป็นบริเวณป่าชายเลนธรรมชาติอายุมากกว่า 27 ปีในช่วงเวลาที่ศึกษา พบต้นแสมขาว *(Avicennia alba)* เป็นพรรณไม้เด่น ถัดออกมาประมาณ 4 20 40 และ 50 เมตร เป็นสถานี R2 R3 R4 และ R5 ตามลำดับ โดยบริเวณสถานี R4 อยู่ใกล้กับทางระบายน้ำจากนากุ้ง

ระยะเวลาการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างครอบคลุมการผันแปรของฤดูกาลในรอบปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2547 รวม 4 ครั้ง คือ

เดือนมิถุนายน 2546 เป็นตัวแทนของฤดูลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (SW)

เดือนตุลาคม 2546 เป็นตัวแทนของช่วงเปลี่ยนฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้เป็นลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (SW – NE)

เดือนกุมภาพันธ์ 2547 เป็นตัวแทนของฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (NE)

เดือนเมษายน 2547 เป็นตัวแทนของฤดูร้อน-แล้ง (NE – SW)

วิธีการเก็บและศึกษาตัวอย่าง

1. ความหลากหลายของชนิดสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็ก

เก็บตัวอย่างสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กในแต่ละสถานีโดยเก็บตัวอย่างจาก 4 ถิ่นที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน (microhabitats) คือ

1.1 ตักดินบริเวณผิวหน้าดินที่มีสี (รูปที่ 25)

1.2 ตัวอย่างในน้ำใกล้พื้นลากด้วยถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมโครเมตรที่ปล่อยลงไปใกล้พื้นท้องน้ำ (รูปที่ 25)

1.3 รากไม้ ใบไม้ และกิ่งไม้ที่ตกทับถมเก็บมาปัดด้วยแปรงขนอ่อน (รูปที่ 25)

1.4 ชุดทดลองที่ประกอบด้วยตาข่ายดำ จำนวน 3 แผ่นซึ่งขึงให้ตึง เพื่อให้สาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กลงเกาะ โดยชุดทดลองตาข่ายจะแขวนไว้เฉพาะที่สถานี R1 เป็นเวลา 1 สัปดาห์

(รูปที่ 26) ทั้งนี้เนื่องจากในบริเวณสถานีอื่นเป็นเส้นทางที่มีการคมนาคมทางเรือของชาวบ้านค่อนข้างสูง ซึ่งอาจทำให้ชุดทดลองได้รับความเสียหาย จึงทำการแขวนชุดทดลองเฉพาะที่สถานี R1 ที่อยู่ด้านในสุดและได้รับผลกระทบน้อยที่สุดเท่านั้น

ทำการเก็บตัวอย่างขณะที่น้ำลง เพื่อให้ได้เฉพาะตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่อยู่ที่หน้าดินเท่านั้น นำตัวอย่างที่เก็บได้กรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 200 ไมโครเมตร เพื่อที่จะแยกขยะและแพลงก์ตอนสัตว์ออก แล้วรักษาสภาพตัวอย่างด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2-4 เปอร์เซ็นต์

จำแนกชนิดของตัวอย่างด้วยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราดสำหรับสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมและไดโนแฟลกเจลเลต โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1. ล้างเซลล์ไดอะตอมเพื่อกำจัดสารอินทรีย์และเกลือออกจากเซลล์ตามวิธีของ Hasle and Fryxell (1970, อ้างโดย โสภณา บุญญาภิวัฒน์, 2526) ส่วนไดโนแฟลกเจลเลตล้างด้วยน้ำทะเลกรองหลายครั้ง

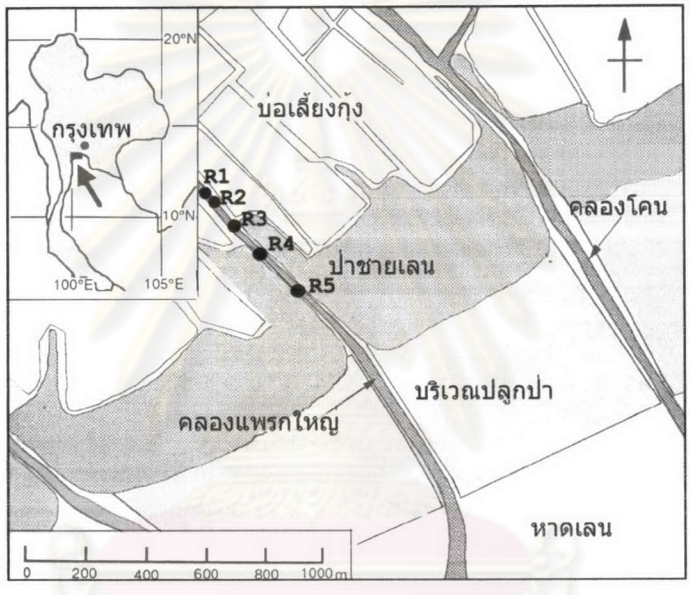
2. กรองตัวอย่างที่กำจัดสารอินทรีย์ออกแล้วลงบนกระดาษกรอง polycarbonate ขนาดตา 0.8 ไมครอน ทำให้ตัวอย่างแห้งโดยเซลล์ในกลุ่มไดอะตอมใช้วิธี air dry และเซลล์กลุ่มไดโนแฟลกเจลเลตใช้วิธีการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการแทนที่ด้วยแอลกอฮอล์ และทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer ซึ่งจะแทนที่แอลกอฮอล์ในเซลล์ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง

3. ติดกระดาษกรองบนแท่นติดตัวอย่างด้วยเทปกาวนำตัวอย่างไปเคลือบด้วยทองและทำการศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5410 LV)

การจำแนกชนิดของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กในแต่ละกลุ่มใช้เอกสารอ้างอิง ดังนี้ ไซยาโนแบคทีเรียใช้หลักการจำแนกในระดับสกุลตาม Desikachary (1959) ไดโนแฟลกเจลเลตใช้หลักการจำแนกในระดับสกุลและชนิดตาม Steidinger and Tanger (1996) และ Fukuyo *et al.* (1990) ไดอะตอมใช้หลักการจำแนกในระดับสกุลตาม Round *et al.* (1990) และในระดับชนิดตาม Barber and Haworth (1981) Dexiang *et al.* (1985) Fukuyo *et al.* (1990) Hartley (1996) Hasle and Syvertsen (1996) และ Vyverman (1991)

สถานี R1

สถานี R4

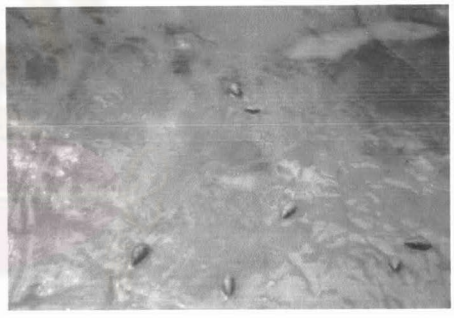


สถานี R5

บริเวณปากทางเข้าคลองแพรกใหญ่

<u>รูปที่ 24</u> สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณป่าชายเลนคลองแพรกใหญ่ บ้านคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม

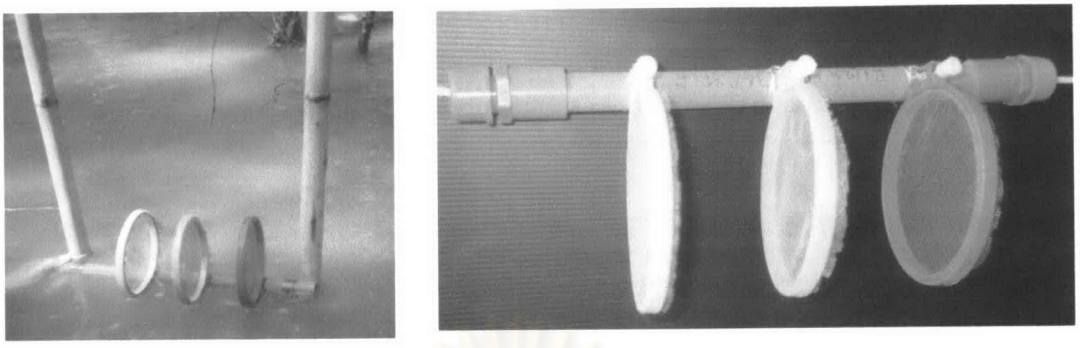
1



2

3

<u>รูปที่ 25</u> บริเวณและการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็ก
1. รากไม้ 2. ผิวหน้าดิน 3. มวลน้ำ



รูปที่ 26 ชุดทดลองตาข่ายดำ

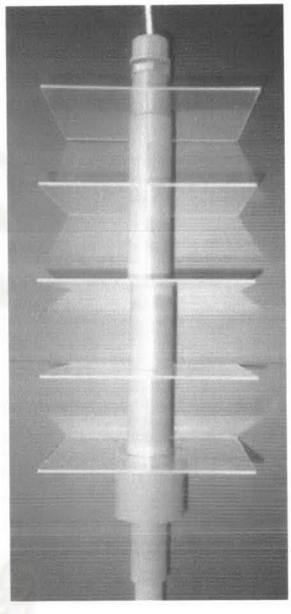
2. การศึกษามวลชีวภาพของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็ก

ศึกษาเฉพาะในสถานี R1 (ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับข้อ 1.4) โดยใช้ชุดทดลองที่ประกอบด้วยแผ่นพลาสติกใสขนาด 15x15 ตารางเซนติเมตรทั้งหมด 5 ชั้น จำนวน 4 ชุด เป็นวัสดุล่อให้สาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กลงเกาะ (รูปที่ 27) โดยนำชุดทดลองไปตั้งทิ้งไว้ในมวลน้ำเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงเก็บขึ้นมาวิเคราะห์ค่าปริมาณคลอโรฟิลล์_เอต่อพื้นที่ พร้อมทั้งทำซ้ำในสัปดาห์ที่ 2 อีกหนึ่งครั้ง เพื่อให้ค่ามวลชีวภาพที่วิเคราะห์ได้เป็นตัวแทนของฤดูกาลที่ศึกษาอย่างแท้จริง

วิเคราะห์มวลชีวภาพของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กขนาดพิโคแพลงก์ตอน นาโนแพลงก์ตอน และไมโครแพลงก์ตอนในรูปของคลอโรฟิลล์_เอ โดยนำแผ่นพลาสติกปัดลงน้ำที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อและทราบปริมาตรที่แน่นอน กรองน้ำที่ได้ผ่านผ้ากรองขนาดตา 200 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดขยะและแพลงก์ตอนสัตว์ จากนั้นแบ่งตัวอย่างน้ำเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำมากรองลงบนกระดาษกรอง GF/F สำหรับการสกัดคลอโรฟิลล์_เอของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กทั้งหมด ส่วนที่ 2 นำมากรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 20 ไมโครเมตร แล้วกรองน้ำที่ได้ลงบนกระดาษกรอง GF/F เพื่อเป็นตัวแทนของค่าคลอโรฟิลล์_เอของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กขนาดพิโคแพลงก์ตอนและนาโนแพลงก์ตอน แช่กระดาษกรองที่ได้ลงใน 90% อะซีโตน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เซลล์แตกด้วย ultrasonic probe แยกกระดาษกรองออกจากอะซีโตนโดยปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,500-3,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปวัดค่าการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์_เอด้วยเครื่อง fluorometer (Turner Designs model 10 AU) และทำการคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์_เอ ตามวิธีการของ USEPA (Arar and Collins, 1992) สำหรับค่าผลผลิตในหน่วยกรัมคาร์บอนใช้วิธีการคำนวณกลับจากค่าปริมาณคลอโรฟิลล์_เอคูณด้วย conversion factor 40 ตาม De jonge (1980, อ้างโดย Puscedu *et al.*,1999)

ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมในการแขวนชุดทดลองโดยทำการแขวนชุดทดลองในแนวตั้งและแนวนอนเปรียบเทียบกันพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ของปริมาณคลอโรฟิลล์_เอที่ได้จากการชุดทดลองทั้ง 2 แบบ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้วิธีการแขวนแนวนอน และทำการทดสอบความแตกต่างของปริมาณคลอโรฟิลล์_เอที่วิเคราะห์ได้จากแผ่นพลาสติกในชุดทดลองเดียวกันพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้วิธีการเฉลี่ยค่าคลอโรฟิลล์_เอจากทั้ง 5 แผ่นเป็นตัวแทนของแต่ละหน่วย

1



2

รูปที่ 27 การศึกษามวลชีวภาพของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็ก
1. การแขวนชุดทดลองพลาสติกในแนวตั้ง 2. ชุดทดลองพลาสติก

3. การศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลัก

เก็บตัวอย่างน้ำระดับความลึกใต้ผิวน้ำและที่ระดับความลึก 1 เมตร หรือ 50 เซนติเมตรจากพื้นน้ำ (ขึ้นอยู่กับความลึกของน้ำ) ด้วยกระบอกเก็บน้ำ นำน้ำที่เก็บได้มารวมกัน (pooled samples) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนเตรท ไนไตรท์ ฟอสเฟต แอมโมเนีย และซิลิเกตตามวิธีของ Parsons *et al.* (1984)

โดยทำการศึกษาเบื้องต้นด้วยการเก็บน้ำจากทุกสถานีมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารแล้วทำการทดสอบผลที่ได้ทางสถิติว่ามีการผันแปรของปริมาณธาตุอาหารตามสถานีต่างๆ หรือไม่ ถ้าไม่พบความแตกต่างระหว่างสถานีจะเลือกเก็บตัวอย่างมาศึกษาประมาณ 3 สถานีให้เป็นตัวแทนของมวลน้ำในคลองแพรกใหญ่แห่งนี้

ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปริมาณธาตุอาหารหลักในสถานี R1, R2, R3, R4 และ R5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณธาตุอาหารจากตัวอย่างเพียง 3 สถานีคือ R1, R3 และ R5

4. การตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางสกายะ

ทำการตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่เก็บตัวอย่างทั้ง 5 สถานี ดังนี้

- อุณหภูมิและความเค็มของน้ำด้วยเครื่อง S-C-T meter (YSI model 30)
- ปริมาณออกซิเจนละลายด้วย Oxygen meter (YSI model 55)
- ค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำโดย pocket pH meter
- ความเข้มแสงในน้ำวัดด้วยเครื่องวัดแสงประเภท Quantum radiometer (Li cor) ที่ระดับผิวน้ำและที่ความลึกทุกๆ 0.5 เมตร นำค่าความเข้มแสงที่ได้คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การส่องผ่านของแสงตามสมการของ Beer- Lambert (Day *et al.*, 1989) ดังนี้

$$I_Z = I_o (E^{-KZ})$$

เมื่อ I_Z คือ ความเข้มแสงที่ความลึก Z ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)

Io คือ ความเข้มแสงที่ผิวน้ำ ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)

K คือ สัมประสิทธิ์การส่องผ่านของแสง (attenuation coefficient)

Z คือ ความลึกของน้ำ (เมตร)

- ค่าความโปร่งแสงด้วย Secchi disc

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 นำข้อมูลปริมาณธาตุอาหารและปัจจัยสิ่งแวดล้อมมาคำนวณหาความสัมพันธ์กับมวลชีวภาพ โดยการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ (Pearson Correlation)

5.2 เปรียบเทียบความหลากหลายชนิดของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กที่พบในแต่ละฤดูกาลและแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง ด้วยการคำนวณค่า Species richness (Margalef's Index) จากข้อมูลแบบ present-absent ด้วยโปรแกรม PRIMER 5 ของ Plymouth Marine Laboratory (Clarke and Gorley, 2001) ตามสมการดังนี้

$$d = (S-1) / \log N$$

เมื่อ d คือ Margalef's Index

S คือ จำนวนชนิดของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กทั้งหมด

และ N คือ จำนวนชนิดของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กที่พบในแต่ละบริเวณ และในแต่ละฤดูกาลที่ศึกษา

ค่า species richness ที่มีค่าสูงหมายถึงมีความหลากหลายชนิดของสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กในบริเวณและฤดูกาลนั้นๆ สูง

5.3 วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของประชากรสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กที่พบในแต่ละฤดูกาลและแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง (โดยใช้ข้อมูล present-absent ดังข้อ 5.2) ด้วยโปรแกรม PRIMER 5 ของ Plymouth Marine Laboratory (Clarke and Gorley, 2001) โดยวิเคราะห์ clustering analysis และแสดงผลด้วย dendrogram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย