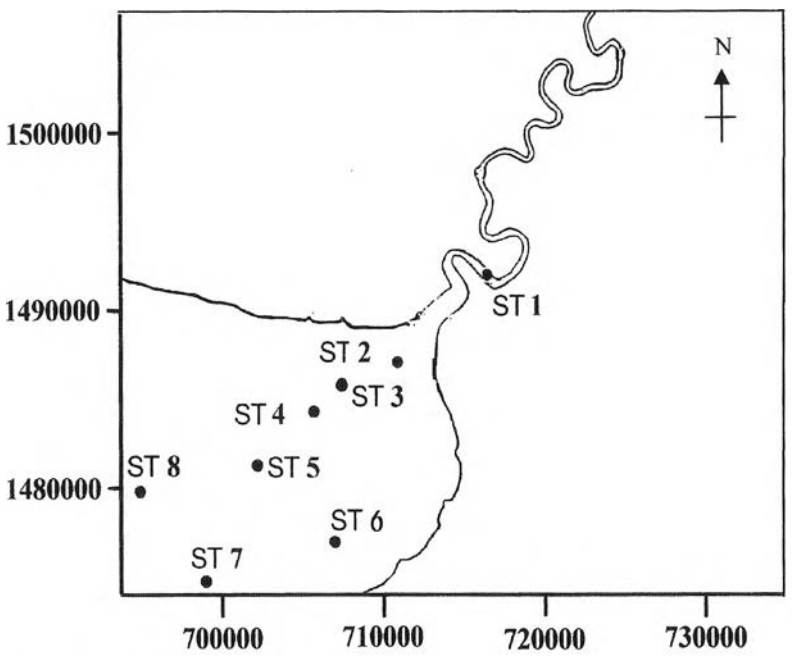
บทที่ 2

วิธีการศึกษา

วิธีการดำเนินศึกษา

สถานที่ทำการศึกษา

ทำการศึกษาบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 8 สถานี ครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่ในแม่น้ำบางปะกงบริเวณใต้สะพานบางปะกงคือ สถานีที่ 1 บริเวณปากแม่น้ำบางปะกงคือ สถานีที่ 2-4 และในทะเลคือ สถานีที่ 5-8 โดยมีตำแหน่งของสถานีเก็บตัวอย่างดังรูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 จุดเก็บตัวอย่างบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา

ตารางที่ 2.1 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา

สถานี	Easting (UTM)	Northing (UTM)	สภาพพื้นที่
1	717000	1491500	บริเวณสะพานบางปะกงที่ กม. ที่ 6 จากปากแม่น้ำบางปะกง
2	711014	1487408	อยู่บริเวณร่องน้ำของปากแม่น้ำบางปะกง
3	708716	1484246	อยู่บริเวณร่องน้ำของปากแม่น้ำบางปะกง
4	705819	1484246	อยู่บริเวณร่องน้ำของปากแม่น้ำบางปะกง
5	702325	1481334	บริเวณในทะเล ห่างจากสถานีที่ 7 7.13 กม.
6	707000	1477000	บริเวณในทะเล ห่างจากชายฝั่งอ่างศิลา 2.12 กม.
7	699000	1475000	บริเวณในทะเล ห่างจากชายฝั่งอ่างศิลา 9.2 กม.
8	695000	1480000	บริเวณในทะเล ห่างจากชายฝั่งอ่างศิลา 14 กม.

ระยะเวลาการศึกษา

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช 6 ครั้ง คือ เดือนกุมภาพันธ์ เมษายน ธันวาคม พ.ศ.2547 และกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 เป็นตัวแทนของฤดูแล้ง และในเดือนกรกฎาคม และกันยายน พ.ศ. 2547 เป็นตัวแทนของฤดูฝน

วิธีการเก็บและศึกษาตัวอย่าง

1. การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ทำการวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมในแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างดังตารางที่ 2.2

ดารางที่ 2.2 เครื่องมือที่ใช้วัดค่าปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	เครื่องมือวัด
ความลึก	Depth Sounder (ยี่ห้อ Honda รุ่น Aqua-Scope จากเรือจุฬาวิจัย1)
ความโปร่งแสง	Secchi disc
ปริมาณแสง	Quantum radiometer พร้อมหัววัดแสงใต้น้ำแบบทรงกลม (LI-COR)
ความเค็ม	SCT meter (YSI model 30)
ปริมาณออกซิเจนละลาย	DO meter (YSI model 55)
ความเป็นกรด – เบส	Pocket pH meter (HANNA)
อุณหภูมิ	SCT (YSI model 30)

นำค่าความเข้มแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การส่องผ่านของแสงตามสมการ Beer-Lamberg (Day *et al.*, 1989)

$$I_Z = I_0 (e^{-KZ})$$

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

I_0 คือ ความเข้มแสงที่ผิวน้ำ ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)

K คือ สัมประสิทธิ์การส่องผ่านของแสง (attenuation coefficient)

Z คือ ความลึกของน้ำ (เมตร)

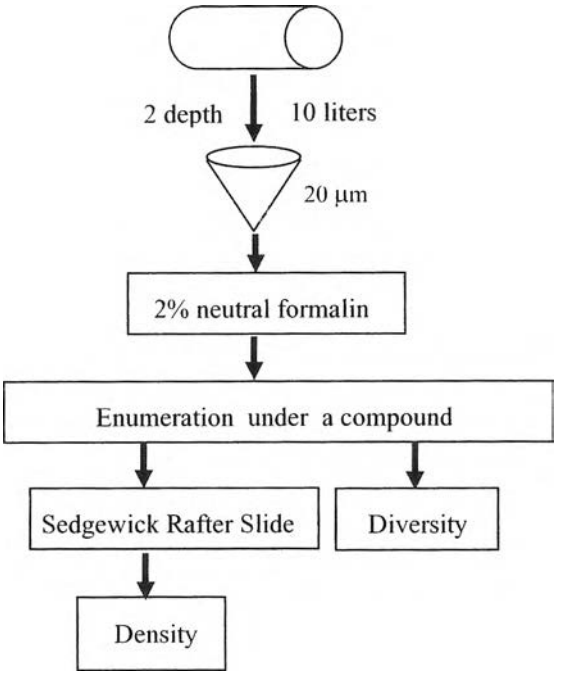
2. การเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเชิงปริมาณ

2.1 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

เก็บตัวอย่างน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำขนาด 10 ลิตร โดยเก็บ 2 ระดับความลึก คือ ความลึก 50 เซนติเมตรจากผิวน้ำ และเหนือพื้นท้องน้ำ 50 เซนติเมตร เก็บน้ำปริมาตร 10 ลิตร นำมากรองผ่านถุงกรองขนาดตา 20 ไมโครเมตร จากนั้นรักษาสภาพตัวอย่างด้วยฟอร์มาลินที่เป็นกลางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2% (รูปที่ 2.2)

2.2 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชเชิงคุณภาพ

ใช้ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมโครเมตร ลากในแนวเฉียง ณ จุดเก็บตัวอย่างแต่ละจุด รักษาสภาพตัวอย่างด้วยฟอร์มาลินที่เป็นกลางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2%



รูปที่ 2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อศึกษาแพลงก์ตอนพืช

2.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

2.3.1 นับจำนวนแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างที่เก็บด้วยกระบอกเก็บน้ำ โดยใช้ Sedgewick Rafter Counting Slide ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณแพลงก์ตอนพืช ตามสูตร

ปริมาณแพลงก์ตอนพืช (เซลล์ต่อลิตร) = $(a \times b)/c$

เมื่อ a คือ ปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร

b คือ ปริมาตรน้ำในขวดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

c คือ ปริมาตรน้ำที่กรองตัวอย่าง (ลิตร)

2.3.2 จำแนกชนิดของแพลงก์ตอนพืชแต่ละกลุ่ม จากตัวอย่างในรูปที่ 2.2 และ/หรือตัวอย่างที่เก็บแบบเชิงคุณภาพ โดยทำการเตรียมตัวอย่างดังนี้

2.3.2.1 แพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดอะตอม

ทำความสะอาดฝาไดอะตอมเพื่อกำจัดสารอินทรีย์และเกลือออกจากเซลล์ ตามวิธีการของ Hasle and Fryxell, 1970 อ้างถึงในโสภณา บุญญาภิวัฒน์, 2526 จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง polycarbornate ขนาดตา 0.8 ไมโครเมตร ทำให้ตัวอย่างแห้งโดยวิธี air dry ติดกระดาษกรองบนแท่นติดตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้มีการนำไฟฟ้าได้ดี และศึกษาตัวอย่างโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL รุ่น JSM-5410LV)

2.3.2.2 แพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต

ทำการย้อมแผ่นเปลือกไดโนแฟลกเจลเลตด้วย Calcoflour white M2R ตามวิธีการของ Lawrence and Triemer (1985) อ้างถึงใน Andersen and Kristensen (1995)

2.3.2.3 แพลงก์ตอนพืชกลุ่มสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว กลุ่มสาหร่ายสีเขียว และกลุ่มซิลิโคแฟลกเจลเลต จำแนกชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

ทำการจำแนกแพลงก์ตอนพืชแต่ละกลุ่มถึงระดับชนิด (species) โดยการจำแนกไซยาโนแบคทีเรียใช้เอกสารประกอบการจำแนกของ Desikachary (1959), Humm and Wicks (1980) และ Yamagishi (1992) การจำแนกสาหร่ายสีเขียวใช้เอกสารประกอบการจำแนกของ John *et al.* (2002) และ Yamagishi (1992) การจำแนกไดอะตอมใช้เอกสารของ Hasle (1965), Foged (1971), John (1983), Richard (1987), Round *et al.* (1990), Fukuyo *et al.* (1990), Vyverman (1991), Hasle and Syvertsen (1996), Hartley *et al.* (1996), Dexing *et al.* (1985) และ Hornor (2002) และการจำแนกไดโนแฟลกเจลเลตใช้เอกสารประกอบการจำแนกของ Dodge (1975), Taylor (1976), Balech (1988), Fukuyo *et al.* (1990), Steidinger and Tangen (1996) ลัดดา วงศ์รัตน์ (2525) และลัดดา วงศ์รัตน์ (2544)

3. การศึกษามวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช

3.1 การศึกษามวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช

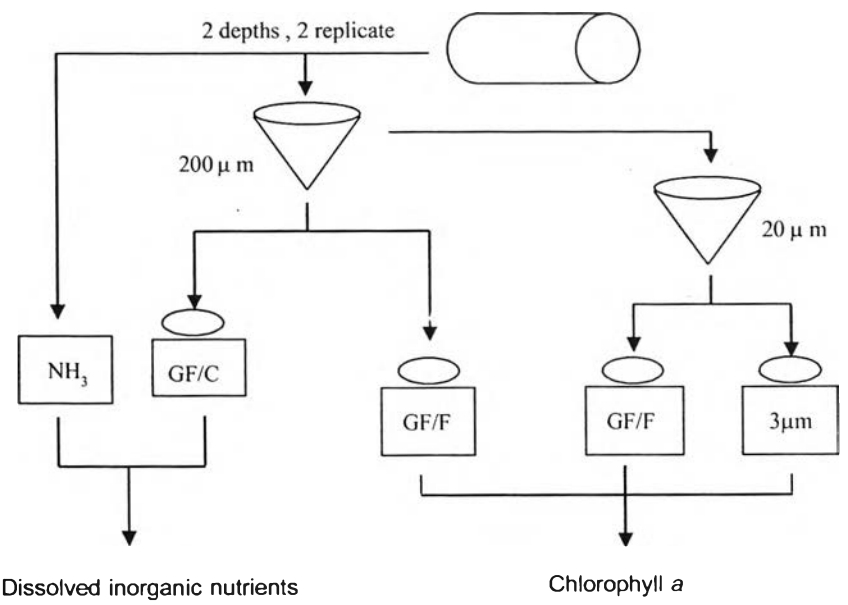
เก็บตัวอย่างน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำ 10 ลิตร ที่ระดับความลึก 2 ระดับ คือ ความลึก 50 เซนติเมตรจากผิวน้ำ และเหนือพื้นท้องน้ำ 50 เซนติเมตร โดยเก็บตัวอย่างน้ำระดับละ 2 ซ้ำ นำน้ำตัวอย่างมากรองผ่านถุงกรองขนาดตา 200 ไมโครเมตรเพื่อแยกแพลงก์ตอนสัตว์ออก

การวิเคราะห์มวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช ใช้วิธีกรองแยกส่วน (size fraction) ตามขนาดของแพลงก์ตอนพืช โดยแบ่งน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยถุงกรองขนาดตา 200 ไมโครเมตรแล้วออกเป็น 2 ส่วน น้ำส่วนที่ 1 นำมากรองด้วยกระดาษกรอง GF/F สำหรับการสกัดเพื่อหาค่ามวลชีวภาพรวมของแพลงก์ตอนพืชทุกขนาด น้ำตัวอย่างส่วนที่ 2 นำมากรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 20 ไมโครเมตร แบ่งน้ำที่ได้ ออกเป็นสองส่วนคือ หนึ่งนำมากรองด้วยกระดาษกรอง GF/F เพื่อหาค่ามวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มพิโคแพลงก์ตอนรวมกับกลุ่มนาโนแพลงก์ตอน น้ำอีกส่วนหนึ่งนำมากรองด้วยกระดาษกรอง polycarbornate ขนาดตา

3 ไมโครเมตรดังรูปที่ 2.3 ในส่วนนี้เป็นการสกัดเพื่อหาค่ามวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มนาโนแพลงก์ตอน จากนั้นแช่กระดาษกรองแต่ละแผ่นใน 90% อะซิโตน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เซลล์แตกด้วย ultrasonic probe จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อวินาที วิเคราะห์มวลชีวภาพโดยวิธี fluorometric method โดยการวัดค่าการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์_เอด้วยเครื่อง fluorometer (Turner Designs model 10 AU) เทียบกับสารละลายมาตรฐานคลอโรฟิลล์_เอ นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ _เอ ตามวิธี USEPA method (Arar and Collins, 1992)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ละลายน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำ 10 ลิตร ที่ระดับความลึก 2 ระดับ คือ ความลึก 50 เซนติเมตรจากผิวน้ำ และเหนือพื้นท้องน้ำ 50 เซนติเมตร เก็บน้ำระดับละ 2 ซ้ำ โดยนำมากรองผ่านถุงกรองขนาดตา 200 ไมโครเมตรเพื่อกรองแพลงก์ตอนสัตว์ออก จากนั้นกรองตัวอย่างน้ำโดยใช้กระดาษกรอง GF/C เพื่อขจัดสารแขวนลอย นำตัวอย่างน้ำจากการกรองไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟต และซิลิเคต ส่วนการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์แอมโมเนียโดยการเก็บน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำ 1 ลิตร โดยไม่ต้องกรองตัวอย่างน้ำ ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารตามวิธีการของ Parsons *et al.* (1984) ดังรูปที่ 2.3และตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำเพื่อศึกษาปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ที่ละลายในน้ำและปริมาณคลอโรฟิลล์_เอ

ตารางที่ 2.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างน้ำและวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารอนินทรีย์ที่ละลายในน้ำ (Parsons *et al.*, 1984)

สารอาหาร	การเก็บตัวอย่าง	การรักษาสภาพตัวอย่าง	วิธีการวิเคราะห์
ไนเตรท-ไนโตรเจน	เก็บน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำแล้วกรองผ่านด้วยกระดาษกรอง GF/C	แช่แข็งตัวอย่างน้ำไว้จนกว่าจะทำการวิเคราะห์	Cadmium reduction method
ไนไตรท์-ไนโตรเจน	เก็บน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำแล้วกรองผ่านด้วยกระดาษกรอง GF/C	แช่แข็งตัวอย่างน้ำไว้จนกว่าจะทำการวิเคราะห์	Colorimetric method
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน	เก็บตัวอย่างด้วยกระบอกเก็บน้ำใส่ขวดเก็บตัวอย่างโดยหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอากาศ	แช่แข็งตัวอย่างน้ำไว้จนกว่าจะทำการวิเคราะห์	Phenate method
ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส	เก็บน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำแล้วกรองผ่านด้วยกระดาษกรอง GF/C	แช่แข็งตัวอย่างน้ำไว้จนกว่าจะทำการวิเคราะห์	Ascorbic acid method
ซิลิเคต-ซิลิกอน	เก็บน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำแล้วกรองผ่านด้วยกระดาษกรอง GF/C	แช่แข็งตัวอย่างน้ำไว้จนกว่าจะทำการวิเคราะห์	Silicomolybdic acid method

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 วิเคราะห์ความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืช โดยคำนวณค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon - Weiner diversity index : H′) (Krebs, 1817)

ดัชนีความหลากหลาย (Shannon-Weiner index: H′)

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} (p_i)(\log_2 p_i)$$

เมื่อ H′ คือ ดัชนีความหลากหลาย

p_i คือ จำนวนแพลงก์ตอนพืชแต่ละสกุลต่อจำนวนแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด

S คือ จำนวนสกุลของแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด

ค่าดัชนีความหลากหลายจะมีค่าอยู่ระหว่างค่า 0 ถึง ค่าอนันต์ ถ้าค่าดัชนีความหลากหลายมีค่าสูง แสดงว่าจำนวนสกุลและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชในแต่ละชนิดมีค่าสูงใกล้เคียงกัน

4.2 วิเคราะห์การกระจายของแพลงก์ตอนพืช โดยคำนวณค่าดุลยภาพการกระจาย (Pielou evenness index : J') (Krebs, 1817)

$$J' = H' / H'_{max}$$

เมื่อ J' คือ การกระจาย

H' คือ ดัชนีความหลากหลาย

H'_{max} คือ ค่าดัชนีความหลากหลายสูงสุดที่หาได้จากสูตร

$$H'_{max} = \log S$$

S คือ จำนวนสกุลของแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด

ค่าการกระจายจะมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้าค่าการกระจายมีค่าต่ำแสดงว่าแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดมีความหนาแน่นแตกต่างกันและมีความหลากหลายต่ำ เนื่องจากแพลงก์ตอนพืชบางชนิดเป็นชนิดเด่น ถ้าค่าการกระจายมีค่าใกล้เคียง 1 แสดงว่าแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดมีความหนาแน่นใกล้เคียงกันและมีความหลากหลายสูง

4.3 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆได้แก่ ปริมาณแพลงก์ตอนพืช ปริมาณคลอโรฟิลล์_เอ ปริมาณสารอาหารและปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความลึก ความโปร่งแสง ปริมาณแสง ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายและความเป็นกรด-เบส โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation)

4.4 วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของประชากรแพลงก์ตอนพืชในแต่ละฤดูกาลและแต่ละสถานี โดยใช้เทคนิค Cluster analysis วิเคราะห์ข้อมูลความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชที่แปลงให้อยู่ในรูปของ log (x+1) แสดงผลด้วย dendrogram โดยใช้โปรแกรม PRIMER 5 ของ Plymounth Marine Laboratory (Clarke and Gorley, 2001)

4.5 วิเคราะห์ความแตกต่างของปัจจัยสิ่งแวดล้อม ปริมาณคลอโรฟิลล์_เอและปริมาณสารอาหารระหว่างสถานีและระหว่างช่วงเวลาโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลทางเดียว (One way-ANOVA)