บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างประชากรหอยหลอดและแพลงก์ตอน

1.1 สถานีและระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง

การศึกษาประชากรหอยหลอด และประชากรแพลงก์ตอนที่ดอนหอยหลอด ทำการศึกษาในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2539 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2540 โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือนยกเว้นในเดือนกันยายน พ.ศ.2539 ในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่าง คือเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคม และเดือนกุมภาพันธ์ การเก็บตัวอย่างประชากรหอยหลอดจะทำในช่วงกลางวันซึ่งเป็นช่วงที่น้ำจะลง การเก็บตัวอย่างประชากรแพลงก์ตอนจะทำในช่วงเช้าซึ่งเป็นช่วงที่น้ำขึ้น ส่วนการเก็บตัวอย่างในช่วงหลัง คือเดือนตุลาคม ถึง เดือนมกราคม การเก็บตัวอย่างประชากรหอยหลอดจะทำในช่วงกลางคืนซึ่งเป็นช่วงที่น้ำจะลง การเก็บตัวอย่างประชากรแพลงก์ตอนจะทำในช่วงเย็นซึ่งเป็นช่วงที่น้ำขึ้น ซึ่งมีรายละเอียดคือ

1.1.1 การเก็บตัวอย่างประชากรหอยหลอด บริเวณที่ทำการศึกษา คือ ดอนหอยหลอดที่อยู่ใกล้ชายฝั่งและปากแม่น้ำแม่กลอง บริเวณที่อยู่หน้าศาลกรมหลวงชุมพร เขตอุดมศักดิ์ โดยแบ่งแนวเส้นการเก็บตัวอย่างเป็น 3 แนว คือแนว a b และ c ให้แต่ละแนวห่างกัน 25 เมตร โดยแนว a เป็นแนวที่อยู่เป็นแนวกลาง ส่วนแนว b และ c เป็นการทำซ้ำ (replicate) ของแนว a จากนั้นใช้เครื่องหาตำแหน่งจากดาวเทียม (Global Positioning System ; GPS) ในการหาตำแหน่งเพื่อที่จะสามารถกำหนดตำแหน่งในการเก็บในแต่ละเดือนให้อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยในแต่ละแนวจะเก็บตัวอย่าง 10 จุด จุดแรกจะเป็นจุดที่อยู่ใกล้ชายฝั่งที่สุด และจุดสุดท้ายเป็นจุดที่ห่างจากฝั่งมากที่สุด โดยแต่ละจุดมีระยะห่าง 100 เมตร รวมเป็นจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 จุด จุดละ 3 ซ้ำ

1.1.2 การเก็บตัวอย่างประชากรแพลงก์ตอน เก็บตัวอย่างในช่วงน้ำขึ้นสูงสุด โดยแบ่งสถานีการเก็บตัวอย่างประชากรแพลงก์ตอนพืชเป็น 4 สถานี ในบริเวณที่เก็บหอยหลอด ซึ่งแต่ละสถานีห่างกันประมาณ 250 เมตร และเก็บตัวอย่างประชากรแพลงก์ตอนสัตว์

โดยการลากถุงลากแพลงก์ตอน เป็นเวลา 5 นาทีจากสถานีหนึ่งไปอีกสถานีหนึ่ง รวมเป็นสถานีแพลงก์ตอนสัตว์ 3 สถานี โดยแนวเส้นของสถานีเหล่านี้จะเป็นแนวเส้นเดียวกับบริเวณแนว A ของแนวเส้นการเก็บตัวอย่างประชากรหอยหลอด นอกจากนั้นเก็บตัวอย่างประชากรแพลงก์ตอนพืชอีก 2 สถานี และแพลงก์ตอนสัตว์ 1 สถานี ที่ปากแม่น้ำแม่กลองบริเวณใกล้ปากคลองดู่ฉี่ (รูปที่ 3-1)

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

1.2.1 การเก็บตัวอย่างหอยหลอดในแต่ละจุด เก็บตัวอย่างในแต่ละจุดโดยใช้ตารางสี่เหลี่ยมนับสัตว์ (quadrat) ขนาด 1x1 เมตร โดยเก็บตัวอย่างหอยหลอดและหอยหินที่พบทั้งหมดที่พบในตารางสี่เหลี่ยมนับสัตว์ ด้วยการใช้ปูนขาวหยอดตามรูหอยหลอดให้หอยหลอดโผล่ขึ้นมาจากรู หลังจากนั้นใช้พลั่วขุดดินในตารางให้ลึกประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อเก็บตัวอย่างหอยหลอดที่หลงเหลืออยู่ หลังจากนั้นจึงนำไปรักษาสภาพด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปศึกษาความหนาแน่น ขนาด และองค์ประกอบของอาหารที่พบในกระเพาะ (stomach content) ของประชากรหอยหลอดและหอยหิน

1.2.2 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอน

1.2.2.1 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ตักน้ำตัวอย่าง 20 - 40 ลิตร ขึ้นมากรองด้วยถุงกรองขนาดตา 20 ไมครอน รักษาสภาพด้วยฟอร์มาลิน 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป

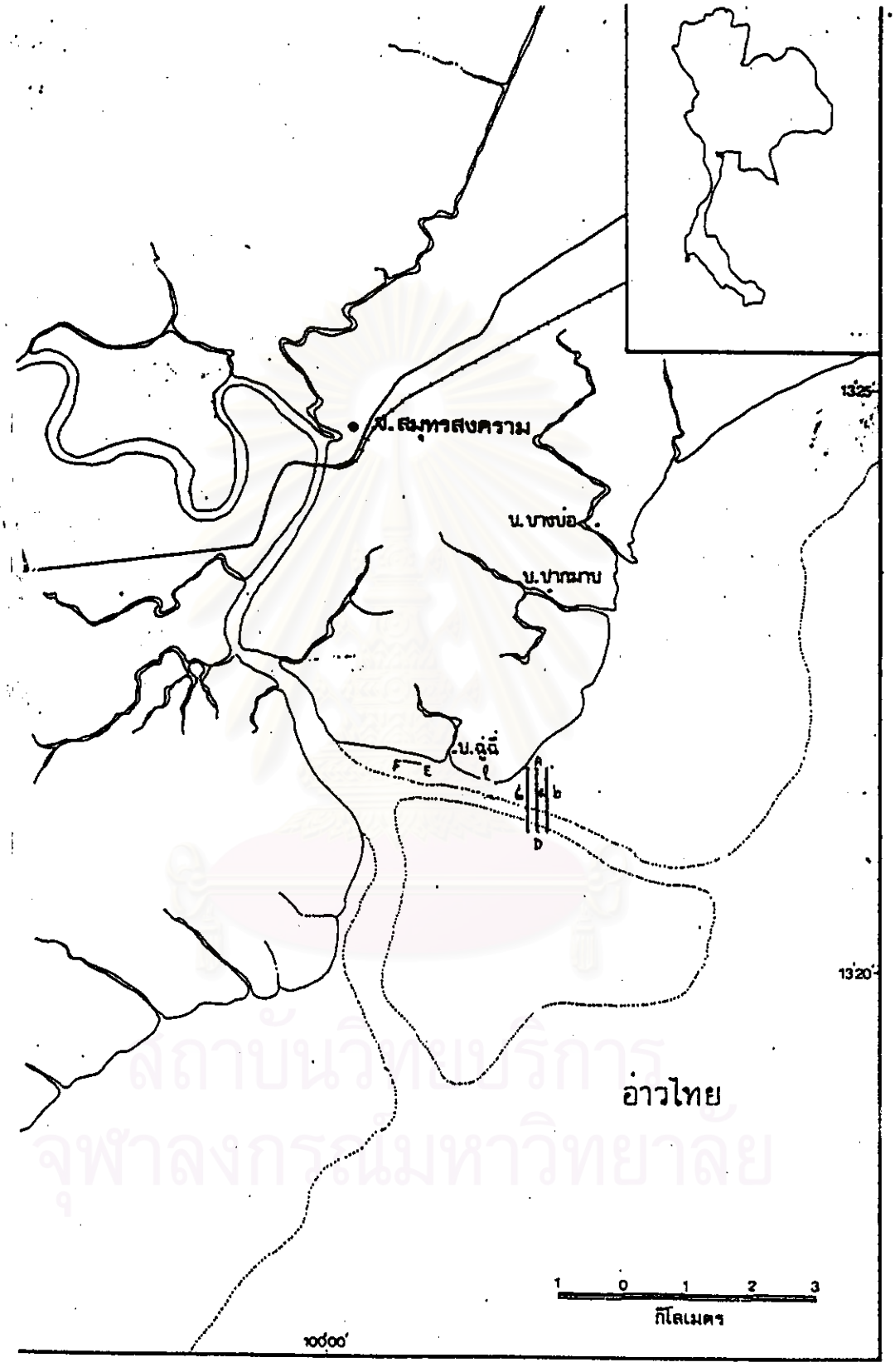
1.2.2.2 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ การเก็บตัวอย่าง ด้วยการลากถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตาอวน103ไมครอนที่ติด flow meter เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาตรน้ำที่ผ่านปากถุงลาก แล้วรักษาสภาพตัวอย่างด้วย ฟอร์มาลิน 4-6 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2.3 การตรวจวัดคุณภาพน้ำบางประการ ขณะเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอน คือ

1.4.3.1 อุณหภูมิ โดยใช้ Thermometer

1.4.3.2 สภาพกรด-เบส โดยใช้ pH meter

1.4.3.3 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ YSI



รูปที่ 3-1 แผนผังบริเวณที่เก็บหอยสกุล *Solen* และแพลงก์ตอน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.3.4 ความเค็มและค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ โดยใช้เครื่องวัดความเค็มและการนำไฟฟ้า YSI

1.4.3.5 ความลึก โดยใช้ไม้วัดความลึก

2. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.1 การศึกษาประชากรหอยหลอดและหอยหิน นำหอยหลอดและหอยหินมานับจำนวน และวัดขนาดความยาวของหอยทุกตัว เพื่อศึกษาความหนาแน่นประชากร และโครงสร้างประชากรหอยหลอด และหอยหิน ส่วนการศึกษาฤดูกาลสืบพันธุ์โดยนำอัตราส่วนของหอยที่มีขนาด 0.1-2.0 เซนติเมตรและประชากรหอยที่มีขนาดโตพอจะสืบพันธุ์ได้ มาพิจารณา คือถ้าหากเดือนใดพบอัตราส่วนของหอยที่มีขนาด 0.1-2.0 เซนติเมตร และเดือนก่อนหน้านั้นพบประชากรหอยที่มีขนาดโตพอจะสืบพันธุ์ได้ในอัตราส่วนที่เหมาะสม แสดงว่าเดือนที่จะหอยที่มีขนาด 0.1-2.0 เซนติเมตรเหล่านั้นน่าจะเกิดก่อนหน้านั้น 1 เดือน

2.2 การศึกษาประชากรแพลงก์ตอนพืช โดยทำการหาปริมาตรน้ำที่อยู่ในขวดเพื่อใช้ในการคำนวณหาความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชทั้งหมดในภายหลัง จากนั้นจึงทำการสุ่มตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากในขวดที่เก็บตัวอย่าง โดยเริ่มจากการหมุนขวดค่อย ๆ และเอียงขวดไปมาเพื่อให้แพลงก์ตอนพืชมีการผสมทั่วทั้งหมด และมีการแตกหักน้อยที่สุด แล้วใช้ปิเปต ดูดตัวอย่างมาใส่ใน Sedgwick Rafter Cell ขนาดความจุ 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์แล้วจึง นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการแยกถึงระดับสกุล โดยใช้เอกสารของ Cupp (1943) , Prescott (1978) , Shirota (1966), Yamaji (1980) และลัดดา วงศ์รัตน์(2538) ประกอบการศึกษาพร้อมทั้งทำการนับและบันทึกจำนวนแพลงก์ตอนพืชในแต่ละสกุล

2.3 การศึกษาประชากรแพลงก์ตอนสัตว์ ทำการศึกษาโดยการจำแนกกลุ่มและนับจำนวนทั้งหมด แต่ถ้าตัวอย่างมีความหนาแน่นในแต่ละสถานีมากจะนำมาทำการแบ่งด้วยเครื่องแบ่งจำนวน(Folsom plankton splitter) จากนั้นดูดตัวอย่างด้วยปิเปตใส่ในจานเพาะเชื้อ แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการแยกกลุ่มโดยใช้เอกสารของ Shirota (1966) ,Yamaji (1980) และ ลัดดา วงศ์รัตน์(2538)ประกอบการศึกษา พร้อมทั้งทำการนับและบันทึกจำนวนแพลงก์ตอนในแต่ละกลุ่ม

2.4 การวิเคราะห์แพลงก์ตอนในกระเพาะอาหารของหอยหลอดและหอยหิน ใช้วิธีการของสุนันท์ ทวยเจริญ และคณะ (2526) โดยการนำตัวอย่างหอยหลอดและหอยหิน มาทำการตัดบริเวณที่เป็นกระเพาะอาหารลงบนสไลด์ ใช้น้ำกลั่นหยดลงไป แล้วใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเพื่อให้แพลงก์ตอนในกระเพาะอาหารกระจาย แล้วจำแนกกลุ่มของแพลงก์ตอนด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การคำนวณความหนาแน่นแพลงก์พืช นำปริมาตรน้ำในขวดและจำนวนแพลงก์ ตอนพืชที่นับได้จากการสุ่มตัวอย่างมาคำนวณหาความหนาแน่นในน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการคำนวณ ดังต่อไปนี้

$$N1 = No\frac{V1}{V2}$$

โดยที่

N1 = ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชที่พบต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร

No = ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชที่นับได้ในน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

V1 = ปริมาตรน้ำในขวดเก็บตัวอย่าง(มิลลิลิตร)

V2 = ปริมาตรน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่าง(มิลลิลิตร)

3.2 การคำนวณความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์ หาได้โดยการนำความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์ที่นับได้ทั้งหมดจากตัวอย่าง แล้วนำมาหารด้วยปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ผ่านปากถุงลากแพลงก์ตอน จะได้จำนวนแพลงก์ตอนต่อปริมาตรน้ำ 1 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นจึงคำนวณให้เป็นความหนาแน่นแพลงก์ตอนต่อ 100 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งปริมาตรน้ำที่ผ่านปากถุงลากแพลงก์ตอนสามารถคำนวณได้โดย

$$V = \frac{3.14xR^2xD}{4}$$

โดยที่

V = ปริมาตรน้ำที่ผ่านปากถุงลากแพลงก์ตอน (ลูกบาศก์เมตร)

R = เส้นผ่าศูนย์กลางของปากถุงลากแพลงก์ตอน (เมตร)

D = ระยะทางที่ลาก (เมตร) ซึ่งหาได้จากสูตร

$$D = \frac{FxC}{999999}$$

โดยที่

F = ค่าความแตกต่างของตัวเลข flow meter ที่อ่านก่อน และหลังลาก

C = ค่าคงที่ของโรเตอร์ ซึ่งเท่ากับ 26873

3.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้หลักการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of Variance) ด้วยใช้โปรแกรม Microsoft Excel เพื่อวิเคราะห์ว่าข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติหรือไม่ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล

3.3.1 ประชากรแพลงก์ตอนพืชแต่ละเดือน และในรอบปี

3.3.2 ประชากรแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละเดือน และในรอบปี

ถ้าผลการทดสอบปรากฏว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญก็ทำการทดสอบเพื่อหาความแตกต่างของคู่เฉลี่ยทุก ๆ คู่โดยใช้ F-Test

เนื่องจากในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ เป็นข้อมูลที่ไม่มีการแพร่กระจายแบบปกติ (normal distribution) ดังนั้นจึงต้องนำมาแปลงค่าโดยวิธี logarythm transformation จนได้ผลการทดสอบการแพร่กระจายของข้อมูลอยู่ในรูปโค้งปกติ (normal curve) จากนั้นจึงนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ความแปรปรวนต่อไป (Zar , 1974)

3.4 Cluster Analysis วิเคราะห์ และทำการเขียน เดนโดรแกรม (dendrogram) เพื่อทำการจัดกลุ่มของแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ในแต่ละสถานีและในแต่ละเดือน โดยใช้วิธี Euclidean ด้วยโปรแกรม Statistica

3.5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ โดยใช้วิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (Multiple Linear Regression) โดยใช้โปรแกรม Statistica เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ

3.5.1 ความหนาแน่นประชากรหอยหลอดกับ

3.5.1.1 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชรวม และแพลงก์ตอนสัตว์รวม

3.5.1.2 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชแต่ละไฟลัม

3.5.1.3 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละไฟลัม

3.5.1.4 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชทุกสกุล

3.5.1.5 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์ทุกกลุ่ม

3.5.2 ความหนาแน่นประชากรหอยหินกับ

3.5.2.1 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชรวม และแพลงก์ตอนสัตว์รวม

3.5.2.2 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชแต่ละ ไฟลัม

3.5.2.3 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละไฟลัม

3.5.2.4 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชทุกสกุล

3.5.2.5 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์ทุกกลุ่ม

3.5.3 อัตราส่วนของความหนาแน่นประชากรหอยหลอดที่มีขนาด 0.1 - 2.0 เซนติเมตรกับ

3.5.3.1 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชรวมและแพลงก์ตอนสัตว์รวม

3.5.3.2 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชแต่ละไฟลัม

3.5.3.3 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละไฟลัม

3.5.3.4 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชทุกสกุล

3.5.3.5 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์ทุกกลุ่ม

3.5.4 อัตราส่วนของความหนาแน่นประชากรหอยหินที่มีขนาด 0.1 - 2.0 เซนติเมตรกับ

3.5.4.1 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชรวมและแพลงก์ตอนสัตว์รวม

3.5.4.2 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชแต่ละไฟลัม

3.5.4.3 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละไฟลัม

3.5.4.4 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชทุกสกุล

3.5.4.5 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนสัตว์ทุกกลุ่ม

3.5.5 ความหนาแน่นแพลงก์ตอนรวมกับ ความหนาแน่นแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

โดยใช้สูตร

$$Y_j = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \ldots + b_k x_k$$

กำหนดให้

Y_j = ความหนาแน่นของประชากรหอยหลอดหรือหอยหินหรืออัตราส่วนหอยหลอดที่มีขนาด 0.1-2.0 เซนติเมตรหรืออัตราส่วนหอยหินที่มีขนาด 0.1-2.0 เซนติเมตร

X_{1-k} = log ของความหนาแน่นแพลงก์ตอนในระดับกลุ่มอนุกรมวิธานต่างๆ

a และ b เป็นสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยพหุคูณ

แล้วทดสอบสมการที่ได้โดยวิธี การทดสอบความแปรปรวนแบบทางเดียว ภายใต้สมมติฐาน $H_0: \beta = 0$ นั่นคือตัวแปรตาม (Y) ไม่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระ (X) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$