บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

บริเวณที่ศึกษา

แม่น้ำท่าจีนมีต้นกำเนิดแยกจากทางฝั่งขวาของแม่น้ำเจ้าพระยาที่ ตำบลมะขามเฒ่า อำเภอวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท ไหลผ่านจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และเปิดสู่อ่าวไทยที่อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร มีความยาวทั้งสิ้น 307 กิโลเมตร สภาพพื้นที่ลุ่มน้ำท่าจีนบริเวณจังหวัดสมุทรสาครโดยทั่วไปเป็นที่ราบลุ่มชายฝั่งทะเลมีที่ดอนเพียงเล็กน้อย พื้นที่ตอนล่างบริเวณอำเภอเมืองเป็นพื้นที่ติดทะเลมีชายฝั่งยาวประมาณ 40 กิโลเมตร ซึ่งเป็นพื้นที่ป่าชายเลน มีการทำนาเกลือและการประมงชายฝั่ง เป็นต้น ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งปีมีค่าระหว่าง 1,110.0-1,120.0 มิลลิเมตร โดยเดือนที่มีฝนตกเฉลี่ยมากที่สุดคือเดือนกันยายน มีปริมาณน้ำฝนระหว่าง 276.0-232.0 มิลลิเมตร ส่วนเดือนมกราคมเป็นช่วงที่มีฝนตกน้อยที่สุดเฉลี่ยประมาณ 6.7-9.8 มิลลิเมตรและมีวันที่ฝนตกประมาณ 108 วันในรอบ 1 ปี (กรมควบคุมมลพิษ, 2540) จากข้อมูลกรมชลประทานอ้างโดยกรมควบคุมมลพิษ (2540) พบว่าปริมาณฝนรายปีเฉลี่ยของลุ่มน้ำท่าจีน บริเวณจังหวัดสมุทรสาครมีปริมาณ 1,232 มิลลิเมตรซึ่งมีปริมาณมากกว่าทางตอนเหนือของลุ่มน้ำ สำหรับจุดที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ตั้งอยู่ที่ละติจูด $13^{o}30'53.4''$เหนือ และลองติจูด $100^{o}16'33.2''$ ตะวันออก (รูปที่ 4) เป็นท่าน้ำของวัดศรีสุทธาราม (วัดกำพร้า) ที่มีสะพานทอดยาวลงไปในแม่น้ำ บริเวณนี้แม่น้ำมีความกว้างประมาณ 625 เมตร (ละออศรี ตีระเดชา, 2524)

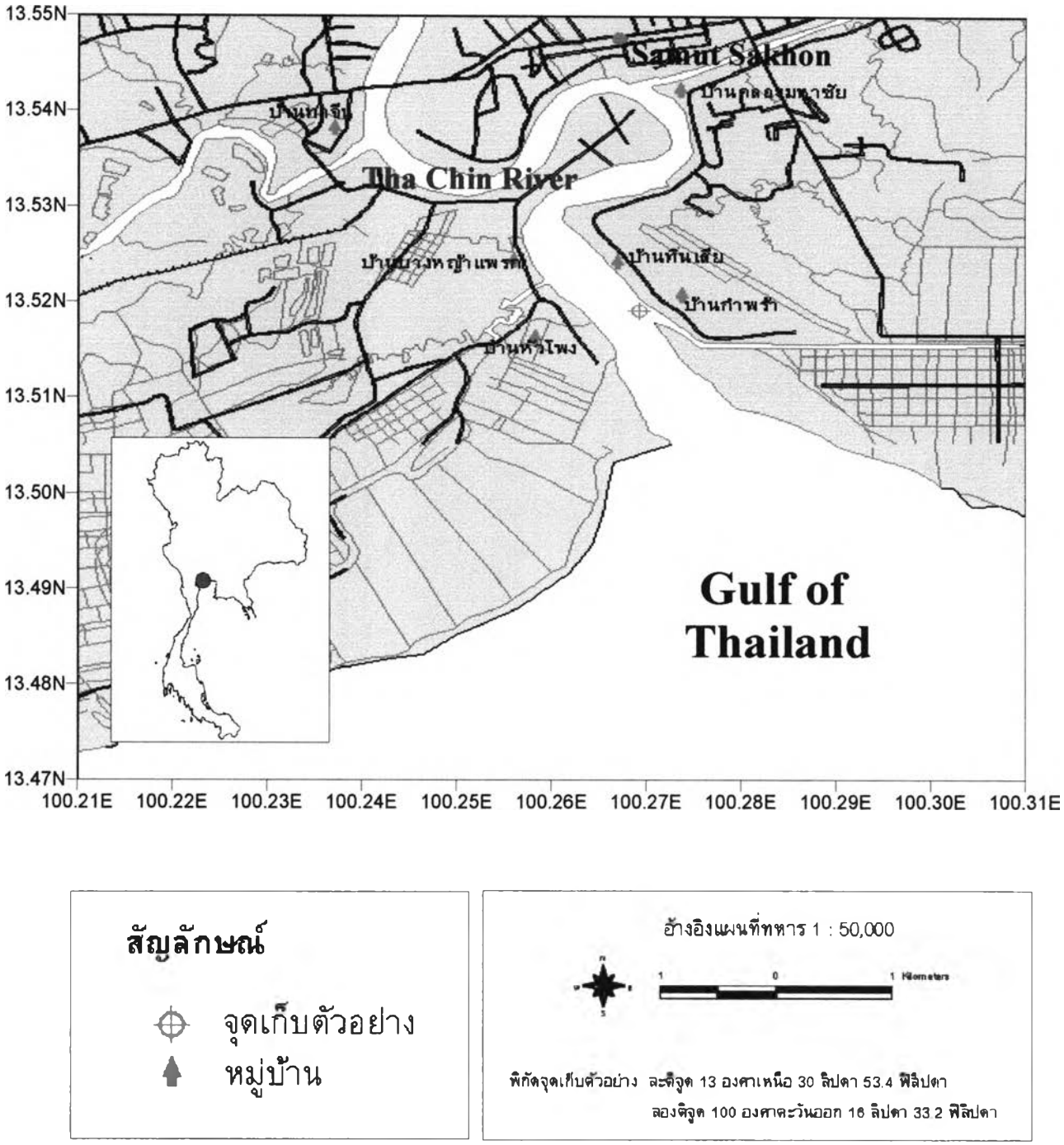
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและตัวอย่างน้ำ

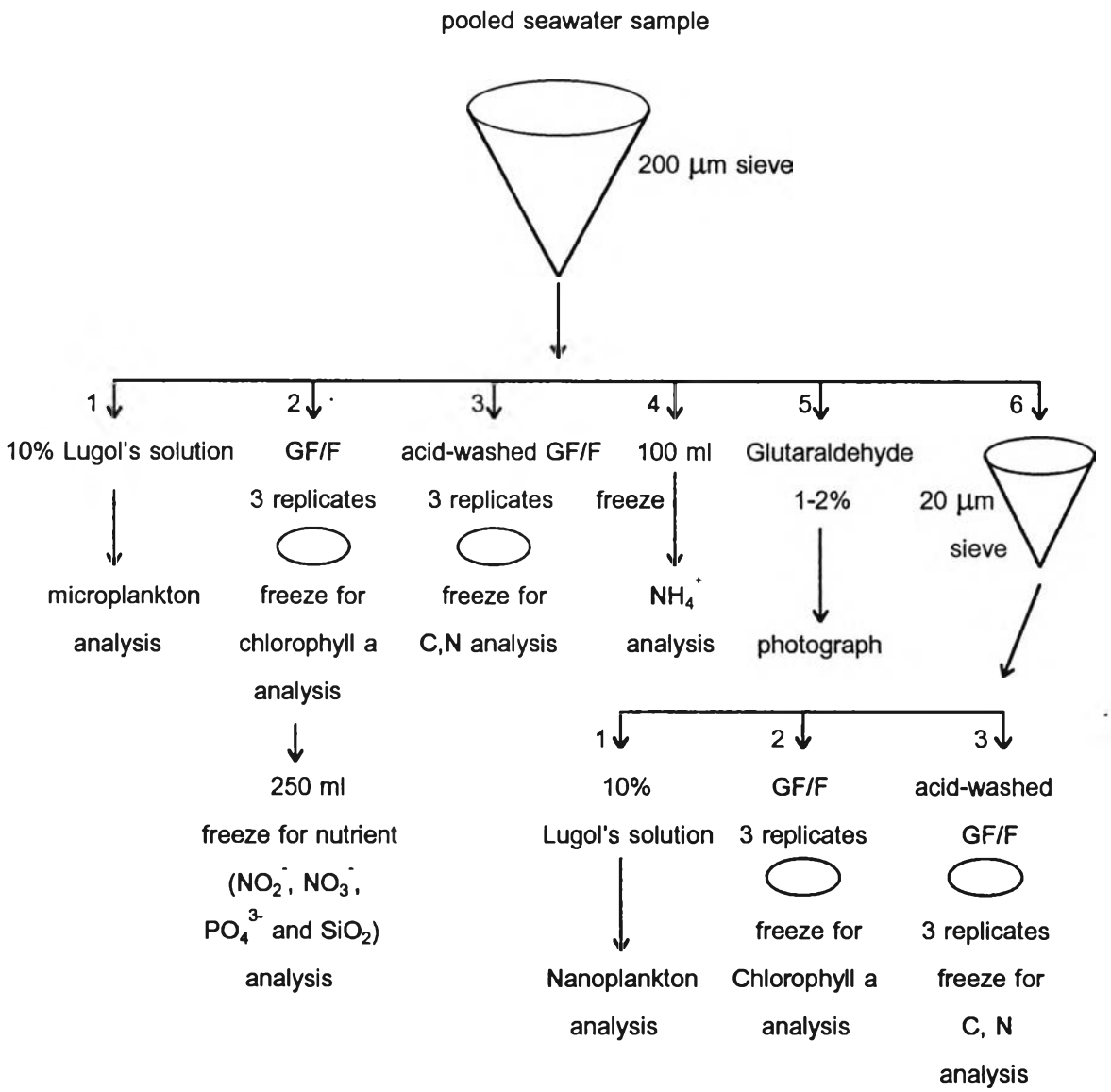
เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณปากแม่น้ำท่าจีนตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2540 ถึงเดือนกรกฎาคม 2541 รวมระยะเวลา 1 ปี เพื่อศึกษาความแปรผันของแพลงก์ตอนพืชในรอบปีโดยเก็บตัวอย่างเดือนเว้นเดือน กำหนดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ฤดูตามข้อมูลปริมาณน้ำฝนจากกรมอุตุนิยมวิทยา (2541) ดังนี้

- เดือนกรกฎาคม กันยายนและพฤศจิกายน 2540 กำหนดในเป็นฤดูฝน 2540
- เดือนมกราคม มีนาคมและพฤษภาคม 2541 กำหนดให้เป็นฤดูแล้ง 2541
- เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2541 กำหนดให้เป็นฤดูฝน 2541

เก็บตัวอย่างน้ำ 5 ลิตรตามแนวดิ่งด้วยกระบอกเก็บน้ำที่ 2 ระดับความลึกคือระดับ 50 เซนติเมตรใต้ผิวน้ำและระดับเหนือผิวดิน 50 เซนติเมตร (ในกรณีที่ความลึกของน้ำไม่ถึง 2 เมตรให้เก็บแต่ที่ระดับใต้ผิวน้ำ 50 เซนติเมตร) ทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 28 ชั่วโมง กรองน้ำแต่ละระดับด้วยผ้ากรองขนาดตา 200 ไมโครเมตรเพื่อเอาแพลงก์ตอนสัตว์และวัตถุใหญ่ออกก่อน หลังจากนั้นแบ่งน้ำที่ผ่านการกรองออกเป็น 6 ส่วน (รูปที่ 5) ดังนี้



รูปที่ 4 จุดเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชบริเวณปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร



รูปที่ 5 ขั้นตอนการแบ่งตัวอย่างเพื่อศึกษาแพลงก์ตอนพืชและปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่างๆ

- ส่วนที่หนึ่ง เก็บรักษาไว้ใน Lugol's solution ในอัตราส่วน 0.4 ถึง 0.8 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างน้ำ 200 มิลลิลิตร (Willén, 1976 อ้างโดย Throndsen, 1978) เพื่อศึกษาชนิดของไมโครแพลงก์ตอน
- ส่วนที่สอง นำตัวอย่างน้ำ 100-300 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง GF/F จำนวน 3 ซ้ำ แช่แข็งไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์คลอโรฟิลล์-เอ และเก็บน้ำที่ผ่านการกรองนี้ 300 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกที่มีฝาปิดแช่แข็งไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร ได้แก่ ไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟตและซิลิเกต
- ส่วนที่สาม กรองตัวอย่างน้ำ 100-300 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง GF/F ที่ผ่านการแช่ 10%HCl จำนวน 3 ซ้ำและแช่แข็งไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์ไนโตรเจน
- ส่วนที่สี่ เก็บตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ไว้ในขวดพลาสติกที่มีฝาปิดแช่แข็งไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์แอมโมเนียม
- ส่วนที่ห้า เก็บรักษาไว้ใน glutaraldehyde ที่มีความเข้มข้น 1-2% สำหรับถ่ายภาพแพลงก์ตอนพืช
- ส่วนที่หก นำตัวอย่างน้ำไปกรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 20 ไมโครเมตร หลังจากนั้นแบ่งตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองนี้ออกเป็น 3 ส่วน
    - ส่วนที่หนึ่ง เก็บรักษาไว้ใน Lugol's solution เพื่อศึกษาชนิดของนาโนแพลงก์ตอน
    - ส่วนที่สอง นำตัวอย่างน้ำ 100-300 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง GF/F จำนวน 3 ซ้ำ แช่แข็งไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์คลอโรฟิลล์-เอ
    - ส่วนที่สาม กรองตัวอย่างน้ำ 100-300 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกรอง GF/F ที่ผ่านการแช่ 10%HCl จำนวน 3 ซ้ำและแช่แข็งไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์ไนโตรเจน

พร้อมกันนี้ได้ตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่เก็บตัวอย่างดังนี้

- วัดความลึกของน้ำด้วยลูกดิ่งวัดความลึก
- วัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำด้วย pocket pH meter
- วัดอุณหภูมิและความเค็มของน้ำด้วย S-C-T meter YSI model 33
- วัดค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำด้วย oxygen meter YSI model 57
- วัดแสงด้วยเครื่องวัดความเข้มแสงใต้น้ำ LI-COR พร้อม Quantum Sensor LI-193 SA ที่ระดับผิวน้ำและที่ความลึกทุก 0.5 เมตร นำค่าความเข้มแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการส่องผ่านของแสงตามสมการของ Beer-Lambert (Day *et al.*, 1989) ดังนี้

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

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

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

K คือ ประสิทธิภาพการส่องผ่านของแสง (attenuation coefficient)

Z คือ ความลึกของน้ำ (เมตร)

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1. การศึกษาชนิดและความชุกชุมของแพลงก์ตอนพืช

เตรียมตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชขนาด 20-200 ไมโครเมตร (ไมโครแพลงก์ตอน) จำนวน 3 ซ้ำโดยการตกตะกอนแพลงก์ตอนพืชที่รักษาไว้ใน 10%Lugol's solution ในกระบอกตกตะกอน (settling chamber) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับไมโครแพลงก์ตอน (Hasle,1978) นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชไปจำแนกถึงระดับสกุลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) ที่กำลังขยาย 150 เท่าโดยใช้เอกสารอ้างอิงประกอบการจำแนกดังนี้ Cupp (1943), Prescott (1978), Yamagishi (1992), Cox (1996), และ Tomas (1997) นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดแล้วหาค่าเฉลี่ยปริมาณแพลงก์ตอนพืชต่อลิตรจากการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งได้จากสมการ

ปริมาณของไมโครแพลงก์ตอนต่อลิตร = (ax1000)/ b

เมื่อ a คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร

b คือ ปริมาตรน้ำที่ใช้ตกตะกอนตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช (มิลลิลิตร)

การศึกษาแพลงก์ตอนพืชขนาด 2-20 ไมโครเมตร (นาโนแพลงก์ตอน) ได้เตรียมตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่รักษาไว้ใน 10%Lugol's solution โดยใช้เทคนิค filter-transfer-freeze (FTF) (Hewes and Holm-Hansen, 1983) นำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชไปจำแนกเป็นกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยใช้เอกสารอ้างอิงประกอบการจำแนกดังนี้ Butcher (1967), Prescott (1978) Yamagishi (1992) และ Tomas (1997) นับจำนวนเซลล์ของสกุล/กลุ่มที่พบเป็นกลุ่มเด่นจนถึง 300 เซลล์ (Kirchman, 1993; Booth, 1993) แล้วหาค่าเฉลี่ยปริมาณนาโนแพลงก์ตอนต่อลิตรจากการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งได้จากสมการ

ปริมาณของนาโนแพลงก์ตอนต่อลิตร = $[(NxX)/(YxZ)]x1000$

เมื่อ N คือ จำนวนเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชที่นับได้ใน Y ฟิลด์

X คือ พื้นที่กรองของกระดาษกรอง polycarbonate (ตารางมิลลิเมตร)

Y คือ จำนวนฟิลด์ที่นับนาโนแพลงก์ตอนกลุ่มเด่นจนครบ 300 เซลล์

Z คือ พื้นที่ใน 1 ฟิลด์ (ตารางมิลลิเมตร)

ในกรณีที่แพลงก์ตอนพืชเป็นโคโลนีหรือสาย นับจำนวนโคโลนีหรือสายแล้วเปลี่ยนเป็นค่าจำนวนเซลล์ โดยคูณค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ต่อโคโลนีหรือสายของแพลงก์ตอนพืชแต่ละสกุลที่ได้ศึกษาไว้

2.2. การศึกษามวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืช

– วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์-เอโดยวิธี Spectrophotometric Method โดยการสกัดด้วยสารละลาย Acetone 90% และแช่ทิ้งไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาค่าปริมาณคลอโรฟิลล์-เอตามสูตรของ Jeffrey and Humphrey (1975) ซึ่งอ้างโดย Parsons *et al.* (1984a)

– วิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนด้วยเครื่อง CHN Analyzer โดยวิธี high temperature combustion (อัมพร อึ้งปกรณ์แก้ว, 2540)

2.3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารหลัก

– วิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมโดยวิธี Alternative method (Parsons *et al.*,1984a)

– วิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟต และซิลิเกต ตามวิธีของ Strickland and Parsons (1972)

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและมวลชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชรวม นาโนแพลงก์ตอนและไมโครแพลงก์ตอน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแพลงก์ตอนพืช นาโนแพลงก์ตอนและไมโครแพลงก์ตอนที่เป็นสกุลหรือกลุ่มเด่นโดยการพิจารณาจากปริมาณที่พบ (เซลล์ต่อลิตร) และจากการเปลี่ยนแปลงในรอบวันและในแต่ละเดือนที่ทำการศึกษาโดยแสดงในรูปของแผนภาพ

3.2. คำนวณดรรชนีความหลากหลาย (H′) และการกระจาย (J′) ตามสูตร

ดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index; H′)

$$H' = -\sum [(n_i/N)\log(n_i/N)]$$

เมื่อ H′ คือ ดรรชนีความหลากหลาย
n_i คือ จำนวนของแพลงก์ตอนพืชแต่ละสกุล/กลุ่ม
N คือ จำนวนของแพลงก์ตอนพืชทั้งหมด

การกระจาย (Evenness; J′)

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

เมื่อ J′ คือ การกระจาย
H′ คือ ดรรชนีความหลากหลาย (Shannon-Wiener Index)

H'_{max} คือ ค่าดรรชนีความหลากหลายสูงสุดที่หาได้จากสูตร H'_{max}= logS
เมื่อ S เท่ากับจำนวนสกุล/กลุ่มของแพลงก์ตอนพืช

3.3. แปลงข้อมูล (data transformation) ความหนาแน่นของนาโนแพลงก์ตอนและไมโครแพลงก์ตอนแต่ละสกุล/กลุ่มที่พบในรอบวันจากทุกเดือนที่ทำการศึกษาให้อยู่ในรูปของการถอดรากที่สี่ (double square root) แล้วคำนวณค่า dissimilarity index ของความหนาแน่นของนาโนแพลงก์ตอนและไมโครแพลงก์ตอนแต่ละสกุล/กลุ่มที่พบในรอบวันจากทุกเดือนในรูปของ euclidean distance จากสมการของ Kreb (1989) ดังนี้

$$\Delta_{jk} = \sqrt{\sum(\chi_{ij}-\gamma_{ik})^2}$$

เมื่อ Δ_{jk} คือ euclidean distance ระหว่างตัวอย่างในเดือน/เวลาที่ j และ k
χ_{ij} คือ ความหนาแน่น (เซลล์ต่อลิตร) ของสกุล i ในเดือน/เวลา j
γ_{ik} คือ ความหนาแน่น (เซลล์ต่อลิตร) ของสกุล i ในเดือน/เวลา k

จากนั้นจัดกลุ่มของนาโนแพลงก์ตอนและไมโครแพลงก์ตอนโดยวิธี clustering analysis ซึ่งใช้การวิเคราะห์แบบ average linkage clustering (within group) และแสดงผลในรูป dendrogram ค่า dissimilarity ที่ได้จากการคำนวณเป็นค่าที่แสดงถึงความคล้ายคลึงกันของลักษณะประชากรแพลงก์ตอนพืชในรอบวัน ถ้าค่า dissimilarity ในรูปของ euclidean diatance มีค่าน้อยแสดงว่าลักษณะประชากรของแพลงก์ตอนพืชที่เปรียบเทียบกันระหว่างเวลาในรอบวันมีความคล้ายคลึงกันมากและในทางตรงกันข้ามถ้าค่า euclidean distance มีค่ามากแสดงว่าลักษณะประชากรที่เปรียบเทียบกันระหว่างเวลาในรอบวันมีความแตกต่างกันมาก

3.4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่วัดในขณะเก็บตัวอย่างและปริมาณสารอาหารหลัก โดยแสดงในรูปของแผนภาพ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมและปริมาณสารอาหารหลักดังกล่าวในแต่ละเดือนและในรอบวันที่ทำการศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลแบบจำแนกสองทาง (ANOVA: Two factors without replicate) รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมและปริมาณสารอาหารหลักกับความหนาแน่นและปริมาณคลอโรฟิลล์-เอของแพลงก์ตอนพืชโดยการหาค่าสหสัมพันธ์ (Pearson Correlation) และหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมและปริมาณสารอาหารหลักกับความหนาแน่นและปริมาณคลอโรฟิลล์-เอของแพลงก์ตอนพืชจาก Multiple Linear Regression ด้วยวิธี Stepwise (ศิริชัย พงษ์วิชัย, 2540)