

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

- 1.1 ถังแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 20 และ 70 ไมโครเมตร
- 1.2 ขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างขนาด 135 มิลลิลิตร
- 1.3 ถังพลาสติกขนาด 10 ลิตร
- 1.4 เรือ
- 1.5 ตุ่มน้ำหนัก
- 1.6 น้ำยาฟอร์มัลดีไฮด์

2. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ชนิด ทำความสะอาดเซลล์ไดอะตอมและทำสไลด์ถาวร

- 2.1 หลอดทดลอง หลอดหยด
- 2.2 สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- 2.3 สไลด์นับจำนวนแพลงก์ตอน (Sedgwick-Rafter counting slide) ความจุ 1

ลูกบาศก์เซนติเมตร

- 2.4 บีกเกอร์
- 2.5 กระบอกตวง
- 2.6 พาสเจอร์ปีเปต
- 2.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 2.8 น้ำกลั่น
- 2.9 โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4)
- 2.10 แอลกอฮอล์
- 2.11 Naphrax (mounting medium)
- 2.12 น้ำยาทาเล็บสีใส
- 2.13 เต้าไฟฟ้า
- 2.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.15 เครื่องเหวี่ยง
- 2.16 ตู้ดูดควัน
- 2.17 กระจกกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

- 2.18 เครื่องนับจำนวน (counter)
- 2.19 ไมโครมิเตอร์สำหรับวัดขนาด ได้แก่ eyepiece micrometer และ stage micrometer
- 2.20 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดสองตา (compound microscope, LM) ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX 60 ที่ติดอุปกรณ์ Differential Interference Contrast (DIC) พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- 2.21 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดสองตารุ่น BX 40 ที่ติดอุปกรณ์ Phase contrast พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ และอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida)
- 2.22 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดทกกลับ (inverted compound microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น IX 70 พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- 2.23 กล้องถ่ายภาพระบบดิจิทัล ยี่ห้อ Olympus รุ่น C5050
- 2.24 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) JEOL รุ่น JSM-35CF และ รุ่น JSM 5600LV

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 จุดเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ศึกษา บริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 27 สถานี รอบเกาะช้าง (ตารางที่ 5 และภาพที่ 1)

1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนไดอะตอมในเดือนมีนาคม 2546 โดยกรองน้ำทะเล ปริมาตร 100 ลิตร ผ่านถุงแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 20 ไมโครเมตร และลากถุงแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 70 ไมโครเมตร ในแนวราบที่ระดับลึกใต้ผิวน้ำประมาณ 10 เซนติเมตร นานประมาณ 3 นาที และลากในแนวเฉียงจากระดับเหนือพื้นทะเลประมาณ 2 เมตรถึงผิวน้ำ ตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาตัวอย่างในสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 ตำแหน่งของสถานีเก็บตัวอย่างแหล่งกักต่อนบริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด

สถานีที่ เก็บตัวอย่าง	ที่ตั้งของสถานี	ความลึก (เมตร)
1	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศตะวันตกของเกาะหลาวยาใน	10
2	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศเหนือของเกาะคลุ้ม	14.5
3	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะคลุ้ม	18
4	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศตะวันออกของเกาะคลุ้ม	15.5
5	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศเหนือของเกาะหวาย	13
6	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศเหนือของเกาะใบตัง	13
7	ทิศตะวันออกเฉียงใต้ของเกาะช้าง, ทิศตะวันตกของเกาะไม้ซี้ใหญ่	12
8	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศตะวันออกเฉียงใต้ของเกาะพร้าวนอก	7.3
9	ทิศใต้ของเกาะช้าง, ทิศตะวันออกระหว่างเกาะพร้าวนอก และ เกาะพร้าวใน	6
10	ทิศใต้ของเกาะช้าง, แหลมบังเบาของเกาะช้าง	13.5
11	ทิศตะวันตกเฉียงใต้ของเกาะช้าง	10
12	ทิศตะวันตกของเกาะช้าง, ทิศตะวันออกของเกาะร่ม	7.6
13	ทิศตะวันตกของเกาะช้าง, อ่าวคลองพร้าวของเกาะช้าง	13
14	ทิศตะวันตกของเกาะช้าง, ทิศใต้ของเกาะพลี	14
15	ทิศตะวันตกของเกาะช้าง, อ่าวโบลานของเกาะช้าง	9.7
16	ทิศตะวันตกของเกาะช้าง, อ่าวคลองโปรงของเกาะช้าง	9
17	ทิศเหนือของเกาะช้าง, ปลายแหลมสนของเกาะช้าง	11.5
18	ทิศเหนือของเกาะช้าง, อ่าวตะกรัน, อ่าวสนของเกาะช้าง	8.7
19	ทิศเหนือของเกาะช้างน้อย	15
20	ทิศเหนือของเกาะช้าง, อ่าวสับปะรด	10.5
21	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะช้าง	5.8
22	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะช้าง	4.5
23	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะช้าง, อ่าวโกลก	5.3
24	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะช้าง, ทิศตะวันตกของเกาะสลักและเกาะลิ้ม	7.2
25	ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะช้าง, บ้านอ่าวสลักคอก	2.3
26	ทิศตะวันออกเฉียงใต้ของเกาะช้าง	7.5
27	ทิศตะวันออกเฉียงใต้ของเกาะช้าง, ในอ่าวสลักคอก	3



ภาพที่ 1 จุดเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนบริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด

2. การทำความสะอาดเซลล์ไตอะตอม

การทำความสะอาดเซลล์ไตอะตอมจำเป็นอย่างมากในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ชนิดของไตอะตอมต้องศึกษารูปร่างลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ บนผนังเซลล์ของไตอะตอม ซึ่งตัวอย่างที่ผ่านการทำความสะอาดจะเห็นโครงสร้างต่าง ๆ ชัดเจนมากขึ้น ในที่นี้จะใช้วิธีของ Simonsen (โสภณา, 2528) ซึ่งอรรชนี (2541) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีของ Cupp (1943), Hasle and Fryxell (1970) และ Simonsen (1974) พบว่าวิธีของ Simonsen เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ประหยัดสารเคมี และล้างเซลล์ได้สะอาด สามารถเห็นรายละเอียดของโครงสร้างบนผนังเซลล์ได้ชัดเจน โดยวิธีดังกล่าวมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 ล้างเซลล์ไตอะตอมด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งเพื่อล้างสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์และเกลือออกจนหมด

2.2 เติมสารละลายอิมมูโนยวโดโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4) ปริมาตรใกล้เคียงกับปริมาตรตัวอย่างในข้อ 2.1 และตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

2.3 ค่อยๆ หยดกรดเกลือเข้มข้น (conc. HCl) ปริมาตรเท่ากับปริมาตรตัวอย่างในข้อ 2.2 และนำไปต้มไฟอ่อน ๆ จนกระทั่งเกือบเดือด สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว และสีเหลือง ขั้นตอนนี้ควรทำในตู้ดูดควัน

2.4 นำตัวอย่างจากข้อ 2.3 ไปล้างด้วยน้ำกลั่นทำซ้ำหลายครั้งเพื่อล้างกรดเกลือออกจนหมด

3. การทำสไลด์ถาวร

3.1 ล้างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ให้สะอาด

3.2 คัดเลือกตัวอย่างไตอะตอมที่เตรียมไว้ (ข้อ 2.4) ภายใต้อ่างหากลลับ หยดตัวอย่างไตอะตอมลงบนสไลด์ และนำไปอังความร้อนเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างแห้ง

3.3 หยดสารละลาย Naphrax เพียงเล็กน้อยลงบนตัวอย่าง ในข้อ 3.2

3.4 นำกระจกปิดสไลด์วางปิดทับลงบนตัวอย่างในข้อ 3.3

3.5 นำแผ่นสไลด์ไปให้ความร้อนเพื่อไล่ฟองอากาศ วางไว้ 1-2 ชั่วโมง และใช้น้ำยาทาเล็บสีใสทาบริเวณขอบกระจกปิดสไลด์

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1 จำแนกชนิดแพลงก์ตอนไดอะตอมทะเล

ทำการจำแนกชนิดไดอะตอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด การจำแนกหมวดหมู่ของไดอะตอมใช้ตามหลักที่ลัตดา (2542) รวบรวมไว้ โดยจัดไดอะตอมอยู่ใน Division Chromophyta, Class Bacillariophyceae และในบางวงศ์ใช้ตาม Round *et al.* (1990) โดยแบ่งไดอะตอมออกเป็น 2 Orders คือ Order Biddulphiaceae (centric diatoms) และ Order Bacillariales (pennate diatoms) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 Suborder คือ Suborder Fragilariineae และ Suborder Bacillariineae สำหรับการวิเคราะห์ชนิดใช้เอกสารของ Allen and Cupp (1935); Cupp (1943); Hustedt (1959); Hendey (1964); Peragallo (1965); Simonsen (1974); Foged (1975); Jensen (1985); Dexiang *et. al.* (1985); Sundström (1986); Ricard (1987); Sims (1996); Hasle and Syvertsen (1997) และ Nina and Maestrup (2003) ประกอบการวิเคราะห์ชนิด

4.2 นับจำนวนแพลงก์ตอนพืช

ทำการนับจำนวนแพลงก์ตอนพืชที่เก็บจากถุงแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 20 ไมโครเมตร โดยวิธีสุ่มนับจำนวนในสไลด์นับจำนวน (Sedgwick-Rafter counting cell) ความจุ 1 มิลลิลิตร นำมาคำนวณจนมีหน่วยเป็น หน่วยต่อลิตร ชนิดที่เป็นโคโลนีและเส้นสายนับ 1 โคโลนี/เส้นสาย เท่ากับ 1 หน่วย และชนิดที่เป็นเป็นสายเซลล์และเซลล์เดี่ยว นับ 1 เซลล์ เท่ากับ 1 หน่วย

$$\text{จำนวนแพลงก์ตอนพืช (หน่วยต่อลิตร)} = \frac{vn}{V}$$

v = ปริมาตรน้ำในขวดเก็บตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

n = จำนวนแพลงก์ตอนที่นับได้ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V = ปริมาตรน้ำก่อนผ่านถุงกรอง (ลิตร)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์หาค่าความถี่ในการพบชนิดแพลงก์ตอนไดอะตอมทะเลคำนวณจากข้อมูลชนิดของแพลงก์ตอนไดอะตอมทะเลที่เก็บจากถังกกรองแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 20 และ 70 ไมโครเมตร สำหรับการวิเคราะห์หาค่าดัชนีความหลากหลาย (Diversity Index) คำนวณจากข้อมูลชนิดและจำนวนแพลงก์ตอนพืชที่กรองผ่านถังกกรองแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 20 ไมโครเมตร และเนื่องจากการจำแนกไดอะตอมบางชนิดจำเป็นต้องเห็นรายละเอียดบนเซลล์ให้ชัดเจน แต่ในบางตัวอย่างไม่สามารถเห็นรายละเอียดได้ชัดเจนในขณะนับตัวอย่าง จึงรายงานในระดับสกุล เช่น *Pleurosigma* spp. *Chaetoceros* spp. เป็นต้น ซึ่งในการคำนวณคิดเป็น 1 ชนิด

5.1 ค่าความถี่ในการพบชนิดแพลงก์ตอนไดอะตอมทะเล

$$\text{ความถี่ในการพบ (เปอร์เซ็นต์)} = n/N \times 100$$

n = จำนวนสถานีที่พบแพลงก์ตอนไดอะตอมทะเลในแต่ละชนิด

N = จำนวนสถานีทั้งหมดที่เก็บตัวอย่าง

จัดกลุ่มการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนไดอะตอมทะเลตามความถี่ในการพบ ดังนี้

ระดับที่มีการแพร่กระจายมาก = ความถี่ในการพบระหว่าง 70-100 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่มีการแพร่กระจายปานกลาง = ความถี่ในการพบระหว่าง 30-69 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่มีการแพร่กระจายน้อย = ความถี่ในการพบระหว่าง 1-29 เปอร์เซ็นต์

5.2 ค่าดัชนีความหลากหลาย (Diversity Index)

การหาค่าดัชนีความหลากหลายใช้สมการ Shannon-Weaner diversity index (Pielou, 1976) ดังนี้

$$H' = \sum_{i=1}^k P_i (\log P_i)$$

เมื่อ H' = ค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิด

P_i = สัดส่วนความหนาแน่นของชนิดที่ i^{th} ในสถานีนั้น คำนวณได้จากสูตร

$$P_i = n_i / N$$

N = ผลรวมจำนวนตัวทั้งหมดของทุกชนิดที่พบในสถานีนั้น คำนวณได้จากสูตร

$$N = \sum_{i=1}^k n_i \quad i = 1, \dots, k$$

n_i = จำนวนตัวของชนิดที่ i^{th}

k = จำนวนชนิดที่พบในแต่ละสถานี

ในการคำนวณดัชนีความหลากหลายทางชนิดจะใช้ natural log ($\log_e$) ทำให้ผลที่ได้มีหน่วยเป็น nat

5.3 ค่าดัชนีความสม่ำเสมอ (evenness index)

การหาค่าดัชนีความสม่ำเสมอใช้ Shannon-Weaver's evenness ซึ่งคำนวณได้จากสูตรของ Hurlbert (1971) ดังนี้

$$J = H' / H_{\max}$$

เมื่อ H' = ค่าดัชนีความหลากหลายทางชนิด

$H_{\max} = \ln S$ (โดย S = จำนวนชนิดในแต่ละสถานี)

การหาค่าดัชนีความหลากหลายของเพลงก่ตอนพีชใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

6. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ห้องปฏิบัติการหน่วยกล้องจุลทรรศน์ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ระยะเวลาที่ทำการศึกษาดังแต่เดือนมีนาคม 2546 สิ้นสุดเดือน พฤษภาคม 2549