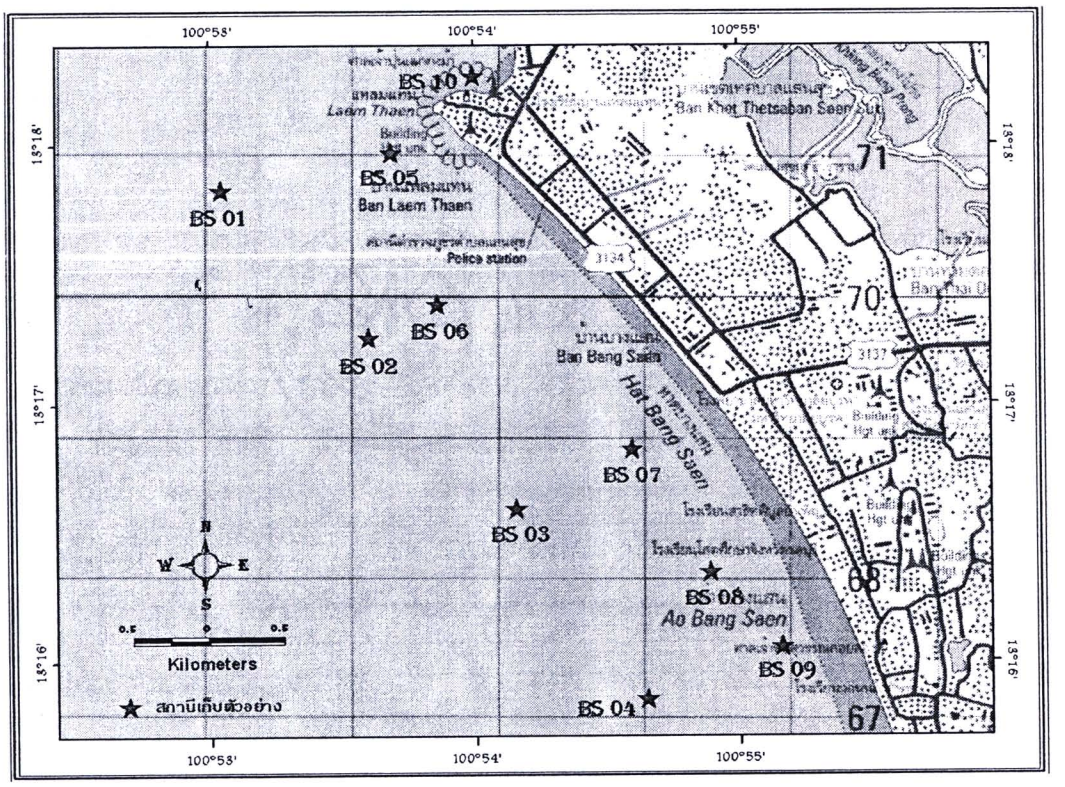
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

บริเวณที่ทำการศึกษา

ศึกษาและเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณหาดวอนนภาถึงหาดบางแสนจ.ชลบุรี ในสถานีต่าง ๆ ทั้งหมด 10 สถานี ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณหาดวอนนภาถึงหาดบางแสน จ.ชลบุรี

ระยะเวลาดำเนินการศึกษา

ทำการศึกษาตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2550 – พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 รวมการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 65 ครั้ง โดยในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 – 9, 12-16, 20-22, 54-56 จะทำการเก็บตัวอย่างทุกสถานี นอกนั้นจะทำการเก็บตัวอย่างเฉพาะสถานี BS05 และ BS09

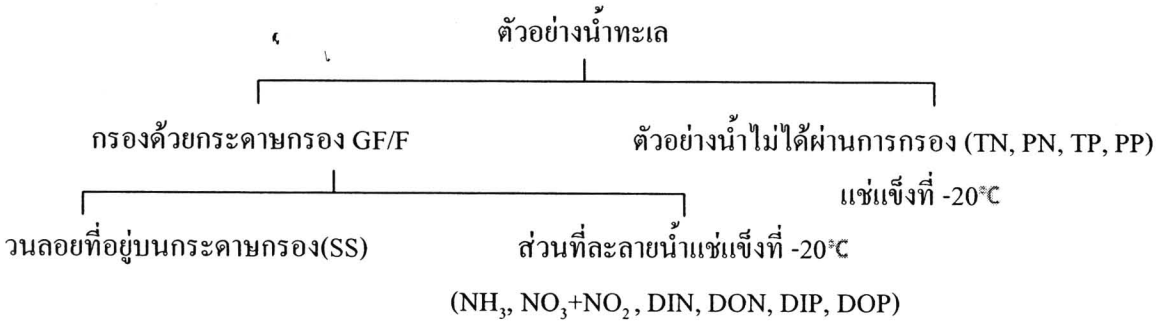
วิธีการศึกษา

3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลที่ระดับความลึก 0.5 เมตรจากผิวน้ำโดยใช้กระบอกเก็บน้ำแบบ Kitahara ขนาด 1 ลิตรทำการถ่ายน้ำตัวอย่างใส่ขวดเก็บตัวอย่างเพื่อนำตัวอย่างน้ำกลับไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์คุณภาพน้ำต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ ออกซิเจนละลายน้ำ การนำไฟฟ้า และความเค็ม โดยใช้เครื่อง Multi probe YSI 85

3.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำในห้องปฏิบัติการ

นำน้ำตัวอย่างไปกรองทันทีภายใน 1 ชม. หลังการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/F และใส่ขวดโพลิเอทิลีนปริมาตร 50 มล. จำนวน 2 ขวด ทำการแช่ตัวอย่างน้ำที่ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์



ขั้นตอนการกรองและเก็บรักษาตัวอย่างน้ำ

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนีย(NH_3) ไนเตรท(NO_3) ไนโตรเจนรวม(TN) สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ละลายน้ำ(DON) ไนโตรเจนแขวนลอย(PN) และสารอาหารฟอสฟอรัสในรูปของฟอสฟอรัสรวม(TP) สารอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ(DOP) และฟอสฟอรัสแขวนลอย(PP) ด้วยเครื่อง Auto analyzer3 ตามวิธีของ Grasshoff et al. (1983)

3.3 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่ระดับผิวน้ำทะเล

ทำการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชโดยใช้ถุงลากแพลงก์ตอนขนาดตา 60 ไมครอน พร้อมทั้งวัดพารามิเตอร์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (อุณหภูมิ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความนำไฟฟ้า และความโปร่งแสง)

3.4 การจำแนกชนิดของแพลงก์ตอนพืช

จำแนกชนิดของแพลงก์ตอนพืชโดยเทียบจากคู่มือแพลงก์ตอนพืชของลัดดา วงศ์รัตน์ (2542) ซึ่งทำการนับตัวอย่างสดภายใต้กล้องจุลทรรศน์และระบุความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดที่พบ (เซลล์ต่อลิตร) จากการนับใน Sedgewick Rafter Chamber ขนาด 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เช่นกัน

การคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช (กรมควบคุมมลพิษและสถาบันวิจัย ทรัพยากรทางน้ำ, 2545)

1. คำนวณปริมาตรน้ำที่กรองผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนพืชโดยใช้สูตร

$$V = \P R^2 h$$

V = ปริมาตรน้ำที่กรองผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนพืช (ลิตร)

R = รัศมีของปากถุงลากแพลงก์ตอนพืช

h = ระยะทางที่ลากถุงลากแพลงก์ตอนพืช

2. คำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชโดยใช้สูตร

$$D = N \times \left| \frac{d \times v \times 1000}{V} \right|$$

D = ความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช (เซลล์ต่อลิตร)

N = จำนวนเซลล์ที่ตรวจนับได้ใน Sedgewick Rafter Chamber

d = จำนวนเท่าที่เจือจาง (ถ้ามี)

v = ปริมาตรน้ำในขวดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรน้ำที่กรองผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนพืช (ลิตร)

3.5 การเก็บและเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ตามวิธีของ Parsons *et al.* (1984) อ้างโดยกรมควบคุมมลพิษและสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ (2545)

การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ จะเก็บน้ำทะเลที่ระดับความลึกเดียวกันกับการเก็บแพลงก์ตอนพืชด้วยกระบอกเก็บน้ำ หลังจากนั้นนำตัวอย่างซึ่งผสมกันดีแล้วมากรองผ่านผ้ากรองไนลอนขนาดตาประมาณ 200 ไมครอนเพื่อกำจัดแพลงก์ตอนขนาดใหญ่ที่ติดมาในตัวอย่างออก แล้วจึงกรองลงบนกระดาษกรองใยแก้ว GF/F เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร (จดบันทึกปริมาตรน้ำที่ใช้ในการกรองไว้สำหรับคำนวณต่อไป) เก็บแผ่นกรองที่ได้ไว้สำหรับวิเคราะห์หาคลอโรฟิลล์เอ โดยวิธี spectrophotometry (Parsons *et al.* 1984)

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ(ไมโครกรัม/ลิตร) Chlorophyll a ($\mu g / l$) = $\frac{26.7(665_0 - 665_a) \times V}{v}$

665_0 แทน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่นต่าง 665 นาโนเมตรก่อนการเติมกรดเกลือ

665_a แทน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่นต่าง 665 นาโนเมตรหลังการเติมกรดเกลือ

V แทน ปริมาตรของน้ำที่กรอง (ลิตร)

v แทน ปริมาตรของ acetone ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

3.6 การเก็บและเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแขวนลอยโดยวิธี gravimetric

(มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2543) เก็บตัวอย่างน้ำด้วยกระบอกเก็บน้ำ หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว GF/F เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (จดปริมาตรน้ำที่ผ่านการกรอง) นำแผ่นกรองที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (หรือจนกว่าจะแห้ง) เก็บในโถทำแห้งจนเย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองใหม่

$$\text{ปริมาณสารแขวนลอย (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น (กรัม) X } 10^6}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ (มล.)}}$$

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช นำกระดาษกรองที่ผ่านการกรองจากถุงเก็บแพลงก์ตอนขนาด 60 ไมโครเมตร ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำกระดาษกรองไป decarbonate ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นทำการกำจัดกรดออก แล้วนำกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีกครั้งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นลอกชั้นกระดาษกรองออกให้บางที่สุด นำไปบรรจุในฟลอยล์ (tin capsule) นำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer

การวิเคราะห์ปริมาณไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจนด้วยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer ที่มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งข้อมูลของค่าไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจนที่รายงานออกมานั้นเป็นความพันธ์ที่แตกต่างกันระหว่างสัดส่วนของตัวอย่างและสารมาตรฐาน

$$\delta X(‰) = [\ (Rsample/Rstandard)-1\ ]\times 10^3$$

เมื่อ X แทน ไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจน (^{13}C และ ^{15}N)

R แทน ค่าของสัดส่วนไอโซโทป ($^{13}C/^{12}C$ และ $^{15}N/^{14}N$)

นำข้อมูลที่ได้ไปทำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\delta^{13}C$ และ$\delta^{15}N$ ซึ่งใช้เปรียบเทียบกับค่า $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$ ของแหล่งกำเนิดสารอินทรีย์ที่สำคัญ เช่น น้ำทิ้งจากกิจกรรมของมนุษย์ อนุภาคสารอินทรีย์จากบนบก และอนุภาคสารอินทรีย์จากน้ำทะเล โดยทำ Fractional contributions Diagram เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสัดส่วนแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในสิ่งมีชีวิต น้ำและดินตะกอน โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\delta^{13}C_s = f_1 d^{13}C_1 + f_2 d^{13}C_2 + f_3 d^{13}C_3$$

$$\delta^{15}N_s = f_1 d^{15}N_1 + f_2 d^{15}N_2 + f_3 d^{15}N_3$$

$$f_1 + f_2 + f_3 = 1$$

เมื่อ f_1, f_2 และ f_3 แทน ค่าของคาร์บอนและไนโตรเจนในตัวอย่างที่มาจากแหล่งกำเนิดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

C_1, C_2 และ C_3 แทน ค่าของคาร์บอนไอโซโทปของแหล่งกำเนิดทั้ง 3 แหล่ง ตามลำดับ

N_1, N_2 และ N_3 แทน ค่าของคาร์บอนไอโซโทปของแหล่งกำเนิดทั้ง 3 แหล่ง ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลปริมาณความเข้มข้นของ แอมโมเนีย(NH_3) ไนเตรท(NO_3) ปริมาณสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ละลายน้ำ(DIN) ปริมาณสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ละลายน้ำ(DON) ปริมาณไนโตรเจนรวม (TN) ปริมาณไนโตรเจนแขวนลอย(PN) ปริมาณสารอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ(DIP) ปริมาณสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ(DOP) ปริมาณฟอสฟอรัสรวม(TP) ปริมาณฟอสฟอรัสแขวนลอย(PP) ที่ได้ทำการศึกษามาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) แบบ Factorial design โดยทำการทดสอบสมมติฐาน (Assumption) เพื่อตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลว่ามีการกระจายตัวแบบปกติหรือไม่โดยวิธี Kolmogorov – Smirnov Test และทำการหาความสัมพันธ์ปริมาณสารอาหารกับความเค็มโดยใช้ pearson correlation และ spearman correlation