

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างภาคสนาม
 - 1.1 กระบอกเก็บน้ำ (Kemmerer Water Bottle)
 - 1.2 ถังน้ำ
 - 1.3 เครื่องชี้ตำแหน่งทางดาวเทียม (GPS)
 - 1.4 เครื่องวัดพารามิเตอร์ในน้ำ รุ่น YSI Model 600xi
 - 1.5 เครื่องมือวัดความโปร่งแสง (Sacchi Dish)
 - 1.6 กระชอนกรองขนาดตา 150, 63 และ 20 ไมครอน
 - 1.7 ขวดแก้วเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนขนาด 100 มิลลิลิตร หรือ 200 มิลลิลิตร
 - 1.8 ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1,000 มิลลิลิตร
 - 1.9 คู่มือวัดความลึก
 - 1.10 สารเคมีที่ใช้ในการรักษาสภาพตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
 - 2.1 กระดาษกรอง GF/F
 - 2.2 ชุดกรองน้ำ
 - 2.3 ปากคีบ (Forceps)
 - 2.4 ไซริงฟิลเตอร์ (Syringe Filter) รุ่น SLFG R04 NL (0.20 μ m Pore Size)
 - 2.5 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Water Alliance HPLC System , WaterTM 600 Pump, Water 996 Photodiode Array Detector, Water 600 Controller และ HPLC Column ของ Picosphere ประเภท C 18 ขนาด 33x4.6 มิลลิเมตร โดยใช้ Sample Loop ขนาด 50 ไมโครลิตร (μ L))
 - 2.6 กล้องจุลทรรศน์ (Compound Microscope)
 - 2.7 สไลด์นับแพลงก์ตอนแบบเซดวิก -ราฟเตอร์ (Sedgwick – Rafter Slide, SR)
 - 2.8 เข็มเย็บ (Needle)
 - 2.9 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Electronic Balance)
 - 2.10 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

2.11 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ และ HPLC

2.12 อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ในการทำการทดลอง

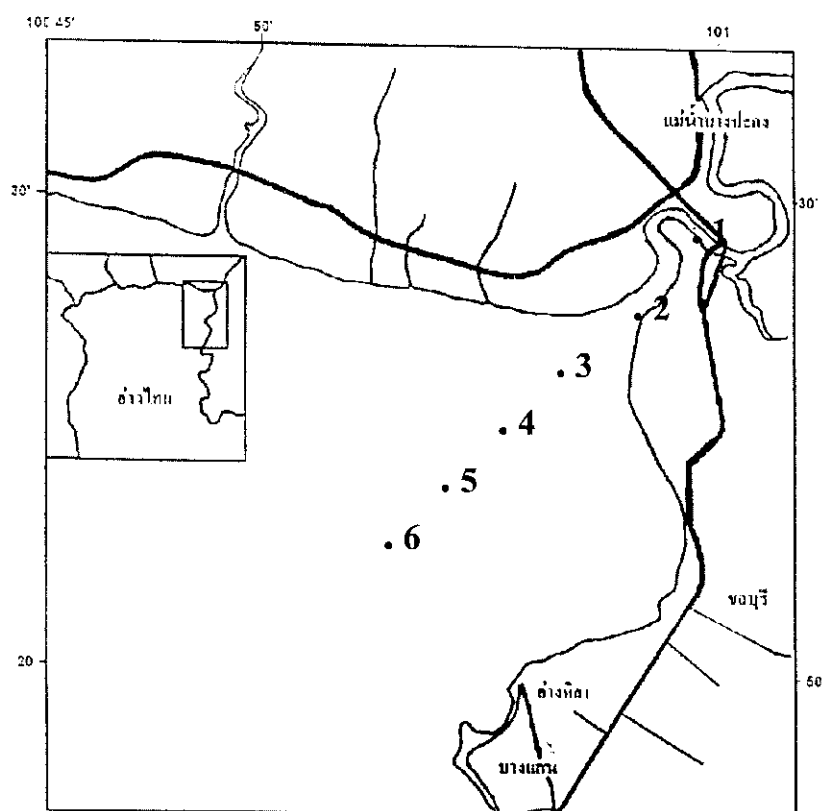
2.13 เครื่องนับ (Counter)

2.14 ตู้ทำความเย็น (Refrigerater)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พื้นที่ทำการศึกษา

ทำการศึกษาระบบปากแม่น้ำบางปะกงโดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 สถานี (ภาพที่ 3-1) ตั้งแต่บริเวณปากแม่น้ำบางปะกงจนออกสู่ทะเล โดยสถานีที่ 1 อยู่บริเวณสะพานข้ามแม่น้ำบางปะกงและสถานีที่ 6 อยู่บริเวณทะเลตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี (พิชาญ สว่างวงศ์ และคณะ, 2541)



ภาพที่ 3-1 สถานีเก็บตัวอย่างน้ำ 6 สถานีบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง

สำหรับทิศทางภูมิศาสตร์ของสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 6 สถานี แสดงในตารางที่ 3-1 ซึ่งเป็นสถานีเก็บตัวอย่างที่อ้างอิงจากจุดเดิมของโครงการวิจัยร่วม NRCT-JSPS ที่เลือกใช้เป็นสถานีศึกษา เป็นจุดที่มีความเหมาะสมโดยเริ่มจาก

สถานีที่ 1 เป็นสถานีตั้งต้นตำแหน่งอยู่บริเวณสะพานบางปะกง ถนนบางนา-ตราดซึ่งอยู่ในเขตของแม่น้ำ ดังแสดงในภาพที่ 3-1

สถานีที่ 2 อยู่ห่างจากสถานีตั้งต้นเป็นระยะทาง 4.19 กิโลเมตร เริ่มเป็นบริเวณปากแม่น้ำ ความกว้างของแม่น้ำมากขึ้น

สถานีที่ 3 อยู่ห่างจากสถานีตั้งต้นเป็นระยะทาง 7.69 กิโลเมตร เป็นบริเวณปากแม่น้ำ ชัดเจนมีการใช้ทุนไฟของการเดินเรือ

สถานีที่ 4 อยู่ห่างจากสถานีตั้งต้นเป็นระยะทาง 11.06 กิโลเมตร เป็นสถานีที่เข้าในเขตทะเลมากขึ้น

สถานีที่ 5 อยู่ห่างจากสถานีตั้งต้นเป็นระยะทาง 15.09 กิโลเมตร เป็นสถานีที่อยู่ในทะเลชัดเจน

สถานีที่ 6 อยู่ห่างจากสถานีตั้งต้นเป็นระยะทาง 19.05 กิโลเมตร เป็นสถานีที่อยู่ในทะเล เริ่มเข้าเขตบริเวณอ่างศิลา

ตารางที่ 3-1 พิกัดตำแหน่งของสถานีเก็บตัวอย่าง

สถานี	ละติจูด	ลองจิจูด	ระยะทาง (กม.)
ST1	N13, 29, 30.9	E 100, 59, 45.2	0
ST2	N 13, 27, 30.3	E 100, 57, 51.4	4.19
ST3	N 13, 26, 52.7	E 100, 56, 57.5	7.69
ST4	N 13, 26, 11.0	E 100, 55, 46.0	11.06
ST5	N 13, 25, 12.8	E 100, 54, 08.2	15.09
ST6	N 13, 24, 20.9	E 100, 52, 45.0	19.05

หมายเหตุ ระยะทางคิดจากระยะห่างระหว่างสถานีกับสถานีที่ 1

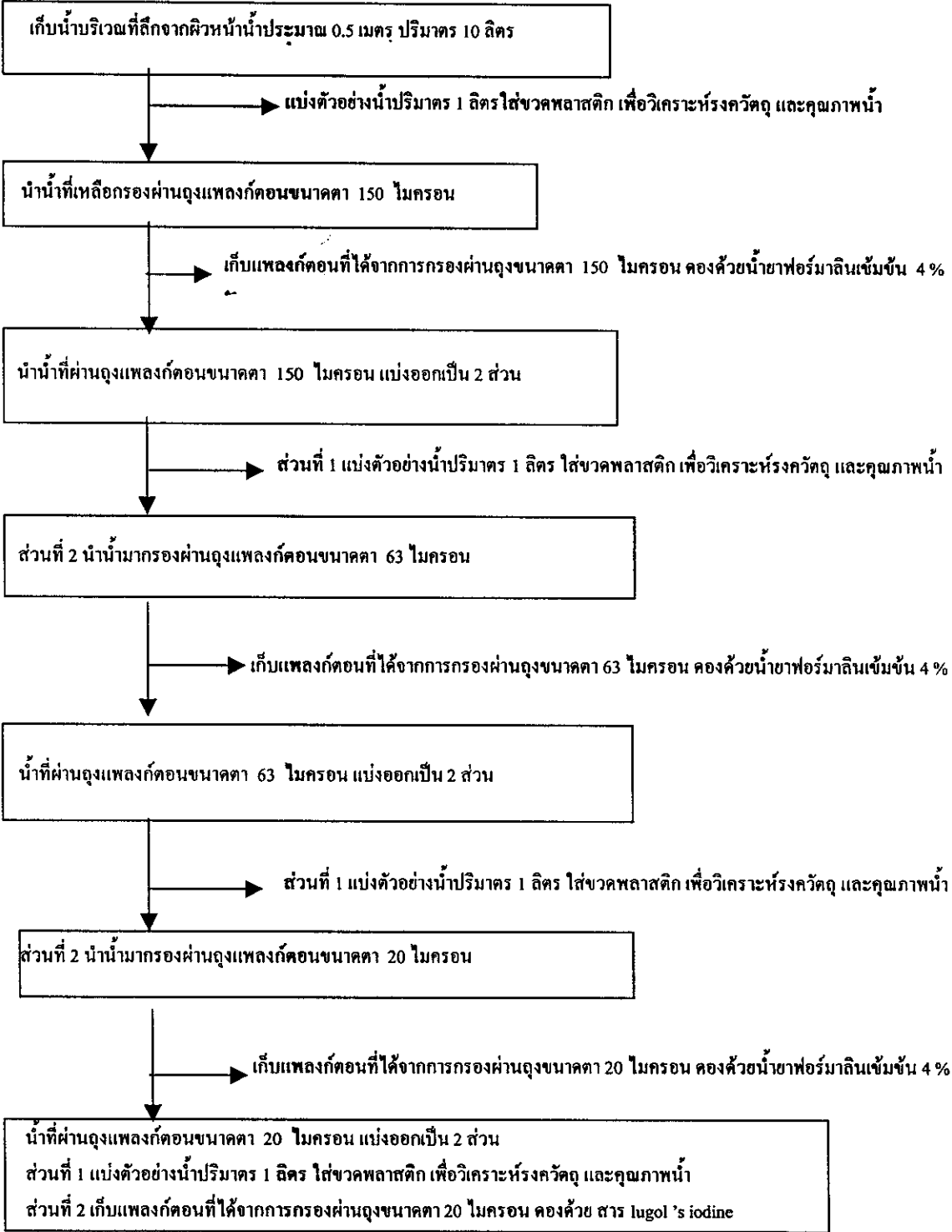
2. การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณสถานีเก็บตัวอย่างทั้ง 6 สถานี ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2544 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2545 เดือนละ 1 ครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 13 เดือน โดยเลือกในช่วงน้ำขึ้น ทำการเก็บตัวอย่างน้ำสถานีละ 3 ข้ำ เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ปริมาณธาตุอาหารในน้ำ และปริมาณรงควัตถุในแพลงก์ตอนพืช โดยใช้ HPLC การตรวจนับแพลงก์ตอนพืช

การเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์รงควัตถุทำโดยการเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 ลิตร จากระดับความลึก 0.5 เมตร ด้วยกระบอกเก็บน้ำ นำมากรองผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนที่มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่ขนาด 150, 63 และ 20 ไมครอน ดังแสดงในภาพที่ 3-2 ซึ่งจากการกรองด้วยถุงกรองขนาดแตกต่างกันจะทำให้ได้ตัวอย่างของแพลงก์ตอนที่มีขนาดต่าง ๆ กัน ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 การจำแนกตัวอย่างแพลงก์ตอนที่ผ่านการกรองแยกขนาดเพื่อนำไปวิเคราะห์รงควัตถุ

วิธีการกรอง	ขนาดของแพลงก์ตอนที่เก็บ	ชื่อเรียกการแยกลำดับส่วนของขนาดแพลงก์ตอน
กรองเก็บด้วยถุงกรอง 150 ไมครอน	ใหญ่กว่า 150 ไมครอน	X
กรองผ่านผ้ากรอง 150 ไมครอน และกรองเก็บด้วยถุงกรอง 63 ไมครอน	ระหว่าง 63 ถึง 150 ไมครอน	L
กรองผ่านผ้ากรอง 63 ไมครอน และกรองเก็บด้วยถุงกรอง 20 ไมครอน	ระหว่าง 20 ถึง 63 ไมครอน	M
กรองผ่านผ้ากรอง 20 ไมครอน และกรองเก็บด้วยแผ่นกรอง GF/F	เล็กกว่า 20 ไมครอน	S



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช และตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์หาคะดัวและคุณภาพน้ำ

3. การวิเคราะห์รังควัตถุในแพลงก์ตอนพืช

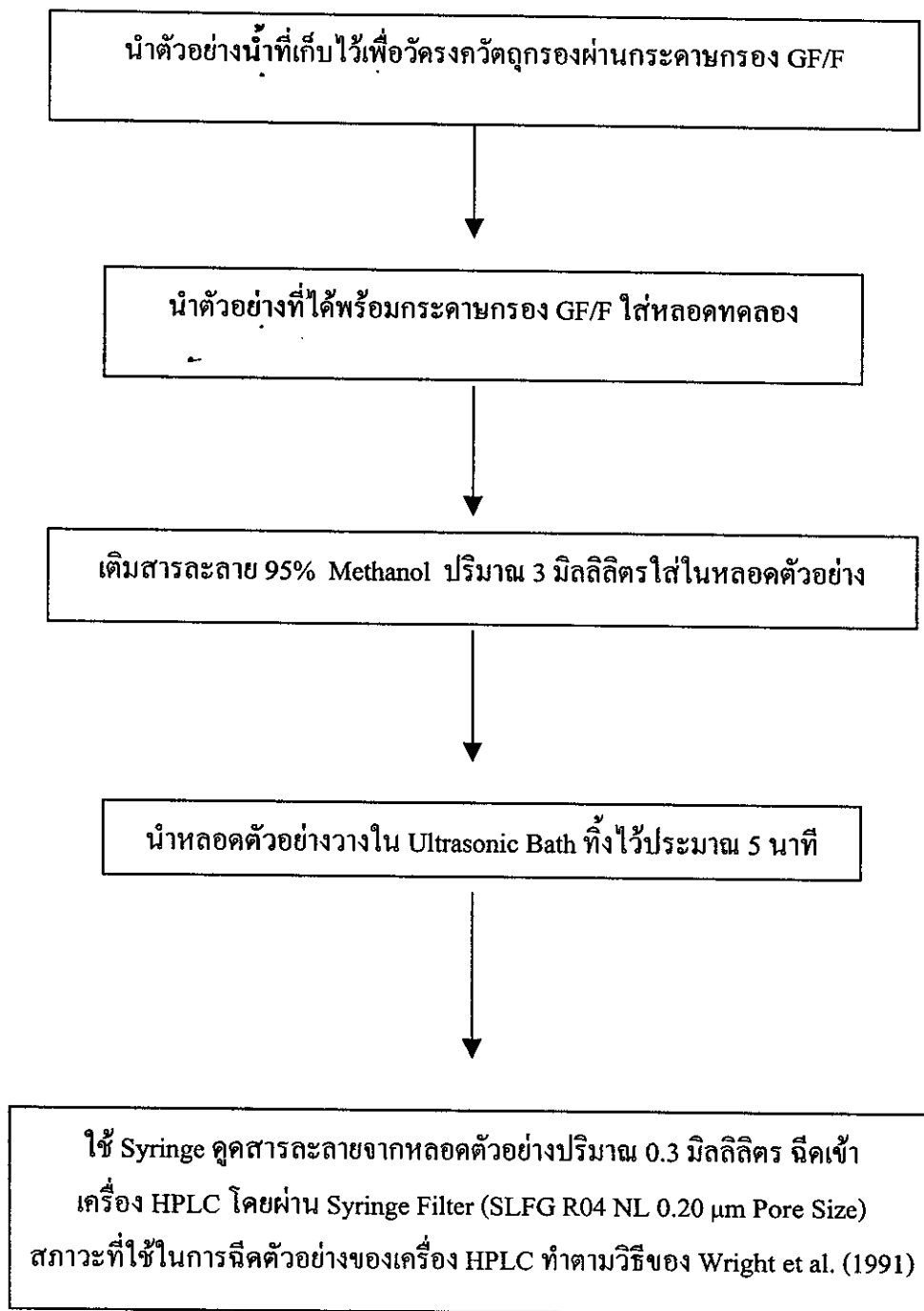
นำตัวอย่างที่ได้จากการกรองผ่านกระดาษกรอง GF/F ไปสกัดเพื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC มีขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 3-3 เมื่อฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC จะแสดงเป็นค่าโครมาโทแกรมที่มีรูปแบบต่าง ๆ กันตามชนิดและความเข้มข้นของสารที่ฉีดจากนั้นทำการจำแนกสเปกตรัม (Spectrum) ที่ได้จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Photodiode Array Detector (350 – 700 นาโนเมตร) หลังจากนั้นเปรียบเทียบค่าสเปกตรัมของรงควัตถุแต่ละชนิดที่แยกได้กับรูปแบบสเปกตรัมของรงควัตถุมาตรฐาน (Spectral Standard) ของรงควัตถุแต่ละชนิดตามเอกสารของ Jeffrey, Mantoura and Bjornland (1997) เพื่อจำแนกชนิดของรงควัตถุที่พบในตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชอยู่ในภาคผนวก ก

การตั้งสภาวะในการวิเคราะห์รงควัตถุของเครื่อง HPLC ทำตามวิธี ของ Zepata et al., (2000)

Eluant	A 80:20 (v/v) MeOH:0.5 M Ammonium Acetate B 90:10 (v/v) MeOH:Acetone
Program	A 0-3 min B 3-17 min
Flow Rates	1.0 ml min ⁻¹
Column	4 µl C-18 Pecosphere
Detector	PDA 996 440 nm
Sample Extract	Methanol 95%
Pre-Injection Mix	3:1 (v/v) Sample:0.5 M Ammonium Acetate
Injection Volume	50µL

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ (Zepata et al., 2000)

1. นำตัวอย่างแพลงก์ตอนในแต่ละกลุ่มที่ศึกษามากกรองด้วยกระดาษกรอง GF/F
2. นำแผ่นกระดาษกรองแพลงก์ตอนที่ได้ใส่ในหลอดแก้วทดลอง เติมนิเมทานอล 95% ประมาณ 3 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม นำไปแช่ตู้แช่แข็ง เป็นเวลา 15-30 นาที
3. หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทำการโซนิเคท (Sonicate) เป็นเวลา 5 นาที
4. เติมนิเมทานอล 0.5 M ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร / เมทานอล 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อเป็นการปรับพีคให้คมชัดยิ่งขึ้น ดูดสารละลายที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยผ่านหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน



ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างรงควัตถุ (ดัดแปลงจากวิธีของ Wright et al., 1991; Zepata et al., 2000)

การคำนวณความเข้มข้นของรงควัตถุโดยใช้ คลอโรฟิลล์-เอ เป็นสารมาตรฐาน
นำคลอโรฟิลล์-เอมาตรฐานมาละลายในอะซีโตน (Acetone) 90% แล้วทำตามขั้นตอน
ดังนี้คือ

1. วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible GBC

Instrument-3127)

2. คำนวณค่าความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์-เอ มาตรฐาน ตาม Jeffrey et al. (1997) หน่วย
ที่ได้เป็นกรัมต่อลิตร -

3. ถีคลอโรฟิลล์-เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าเครื่อง HPLC

4. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของรงควัตถุชนิดต่าง ๆ กัน โดยใช้สมการเทียบจากค่า
ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์-เอ คูณกับค่าแก้ไขในแต่ละชนิดของรงควัตถุ

เนื่องจากการวิเคราะห์รงควัตถุในการวิจัยนี้ใช้คลอโรฟิลล์-เอ เป็นสารมาตรฐานและทำ
การตรวจวัดปริมาณรงควัตถุทุกชนิดด้วยค่าความยาวคลื่นเดียวคือ 436 นาโนเมตร ดังนั้นจะต้องมี
ค่าแก้ไขสำหรับการเทียบพื้นที่ได้ฟิสิกของรงควัตถุแต่ละชนิดในโครมาโทแกรมเพราะรงควัตถุแต่ละ
ชนิดจะตอบสนองต่อความยาวคลื่น 436 นาโนเมตรได้ไม่เท่ากัน ซึ่งการคำนวณจะใช้ค่าแก้ไขตาม
เอกสาร ตาม Mantoura and Repeta (1997) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 ค่าแก้ของรงควัตถุชนิดต่าง ๆ (คัดแปลงจาก Mantoura & Repeta, 1997)

ชนิดของรงควัตถุ	ค่าแก้ของรงควัตถุ
คลอโรฟิลล์-เอ	2.89
คลอโรฟิลล์-บี	2.51
คลอโรฟิลล์-ซี1+ซี2	0.63
คลอโรฟิลล์-ซี3	0.55
ฟูโคแซนธิน	1.09
19'-บูทานอยโลซีฟูโคแซนธิน	1.24
19'-เฮกซานอยฟูโคแซนธิน	1.26
เพริคีนิน	1.49
ลูเทอีน	0.72
ซีอะแซนธิน	0.86
ไดอะไดโนแซนธิน	0.86
เบตา-เบตาแคโรทีน	0.77
แคนตาแซนธิน	1.00

หมายเหตุ ในงานวิจัยนี้ใช้สารมาตรฐานคลอโรฟิลล์-เอ เป็นตัวเปรียบเทียบส่วนงานวิจัยอื่น ๆ ใช้
รงควัตถุมาตรฐานแคนตาแซนธินเป็นตัวเปรียบเทียบ

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณของรงควัตถุชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน
คลอโรฟิลล์-เอ

1. ถ้าค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคของสารคลอโรฟิลล์-เอ มาตรฐานเท่ากับ 491139 โดยมี
ปริมาณ 0.00737 กรัมต่อลิตร

2. ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคของสารคลอโรฟิลล์-เอ ที่วัดได้จากเครื่อง HPLC เท่ากับ
38807.6 จะมีปริมาณเท่ากับ $(0.00737 \times 38807.6) / 491139 = 0.0005823$ กรัมต่อลิตร

3. ในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร จะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์-เอ 0.0005823 กรัม ถ้าเป็น
ปริมาณสารละลาย 3 มิลลิลิตร จะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์-เอ เท่ากับ $(0.0005823 \times 3) / 1000 =$
0.0000017 กรัม หรือเท่ากับ 1.7 ไมโครกรัม สารละลาย 3 มิลลิลิตร ได้จากการกรองน้ำ 500
มิลลิลิตร ถ้ากรองน้ำ 1,000 มิลลิลิตร จะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์-เอ เท่ากับ $(1.7 \times 1000) / 1000 =$
3.4 ไมโครกรัมต่อลิตร

4. การคำนวณปริมาณของไคอะไคโนแซนธิน ซึ่งมีพื้นที่ใต้จากการวัดด้วยเครื่อง HPLC
ได้พื้นที่เฉลี่ยเท่ากับ 106854.66 ต้องทำการแก้ค่าแฟกเตอร์ก่อน จะได้เป็นพื้นที่ตามจริงเท่ากับ
 $(106854.66 \times 0.86) / 2.89 = 31797.58$ จะมีปริมาณเท่ากับ $(0.00737 \times 31797.58) / 491139 =$
0.0000477 กรัมต่อลิตร

5. ปริมาณของไคอะไคโนแซนธิน ในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณ 0.0000477
กรัม ถ้าปริมาณสารละลาย 3 มิลลิลิตร จะมีปริมาณของไคอะไคโนแซนธินเท่ากับ $(0.0000477 \times 3) /$
1000 = 0.0000001 หรือเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากการกรองน้ำ 500 มิลลิลิตร

6. ถ้ากรองน้ำ 1,000 มิลลิลิตร จะมีปริมาณของไคอะไคโนแซนธิน เท่ากับ $(0.1 \times 1000) /$
500 = 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร

7. รงควัตถุชนิดอื่น ๆ จะมีค่าแก้ที่แตกต่างกันออกไปดังตารางที่ 3-3 แล้วจึงทำ
การคำนวณปริมาณออกมา

4. การจำแนกชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืช

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจากตัวอย่างน้ำที่ผ่านขั้นตอนการกรองน้ำตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช มาจำแนกและนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีของ Tomas (1997) และ Jeffrey and Vesk (1997)

4.1 ทำการคนเบา ๆ เพื่อให้แพลงก์ตอนพืชที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นขวดเก็บตัวอย่างมีการผสมและกระจายโดยทั่ว อย่าทำด้วยความรุนแรงเพราะจะสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ของแพลงก์ตอนพืช

4.2 ดูตัวอย่างด้วยการส่องจากจุดภายในขวด นำไปใส่ในสไลด์แบบเซตวีก – ราฟเตอร์ ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเจาะให้ตัวอย่างกระจายทั่วสไลด์จากนั้นปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยอย่าให้มีฟองอากาศ ร่อนตัวอย่างตกลงสู่พื้นสไลด์

4.3 จำแนกกลุ่มและนับจำนวนแพลงก์ตอนพืช บันทึก และวาดรูปหรือถ่ายรูปตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

5.1 ทำการวัดคุณสมบัติของน้ำโดยใช้เครื่อง YSI Model 600x1 ณ สถานที่ทำการเก็บตัวอย่างโดยวัดได้แก่

- อุณหภูมิ (Temperature)
- ความเค็ม (Salinity)
- ความเป็นกรด – ด่าง (pH)
- ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen , DO)
- ปริมาณของแข็งละลายในน้ำ (Total Dissolved Solid , TDS)
- ความโปร่งแสง (Transparency)

5.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารที่ละลายน้ำตามวิธีของ Strickland and Parsons (1972) ได้แก่

- แอมโมเนีย (Total Ammonia) โดยใช้ Phenol – Hypochlorite Method
- ไนไตรท์ (Nitrite) โดยใช้ Diazotization Method
- ไนเตรท (Nitrate) โดยใช้ Cadmium Reduction และ Diazotization Method
- ฟอสเฟต (Phosphate) โดยใช้ Ascorbic acid Method
- ซิลิเกต (Silicate) โดยใช้ Molybdosilicate Method

รายละเอียดในการวิเคราะห์แสดงอยู่ในภาคผนวก จ

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หาความสัมพันธ์โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) ระหว่าง
รงควัตถุกับรงควัตถุ กลุ่มประชากรเพลงก็ตอณพีช และคุณภาพน้ำ และสัมประสิทธิ์การถดถอย
(Regression Coefficient) ของรงควัตถุที่มีความสัมพันธ์กัน