บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. พื้นที่ศึกษา

ป่าชายเลนของตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (13° 21' N, 100° 56' E) มีพื้นที่ประมาณ 300 ไร่ และได้รับการจัดตั้งเป็นศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มีพันธุ์ไม้ชนิดเด่น 2 ชนิดได้แก่ โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) และแสมขาว (*A. alba*) บริเวณรอบนอกป่าชายเลนเป็นพื้นที่หาดเลน และเป็นพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรม (*S. commercialis*) และหอยแครง (*A. granosa*) โดยหอยนางรมเป็นการเลี้ยงแบบให้หอยยึดเกาะกับกองหินส่วนหอยแครงเป็นการเลี้ยงบนพื้นเลน ซึ่งหอยทั้งสองชนิดเป็นหอยเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงกันในพื้นที่ชายฝั่งใกล้เคียงกับป่าชายเลน (ภาพที่ 3-1)

สภาพพื้นที่โดยทั่วไปของพื้นที่เลี้ยงหอยเป็นหาดเลนที่มีขนาดดินตะกอนเล็ก เนื่องจากคลื่นไม่รุนแรงและอยู่ใกล้กับปากคลองห้วยกะปิทำให้ดินตะกอนจากทะเลและบนบกมาตกตะกอนและสะสมอยู่บริเวณนี้เป็นจำนวนมากซึ่งพื้นที่หาดเลนดังกล่าวมีความชันน้อย และค่อนข้างราบมากกว่าหาดทราย เนื่องจากหาดเลนมีดินตะกอนขนาดเล็ก รวมกับลักษณะของหาดไม่ชัน ทำให้น้ำในดินไหลไปยังบริเวณอื่นได้ยาก และถูกเก็บกักไว้ภายในดิน (ชุบ เข็มนาค และคณะ, 2543) ส่วนบริเวณที่อยู่ใกล้กับป่าชายเลนประมาณ 500 เมตร เป็นพื้นที่เลี้ยงหอยแครงมีลักษณะเป็นดินเลนค่อนข้างละเอียดกว่าพื้นที่เลี้ยงหอยนางรมที่มีลักษณะเป็นดินเลนปนทราย ซึ่งอยู่ห่างจากป่าชายเลนประมาณ 1,000 เมตร จุดเก็บตัวอย่างมีทั้งหมด 9 สถานีครอบคลุมทั้งในป่าชายเลน (MG3, MG4, MG6) พื้นที่เลี้ยงหอยแครง (C4, C5) และหอยนางรม (O2, O3, O6, O7) ตามภาพที่ 3-1และตารางที่ 3-1

แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันป่าชายเลนดังกล่าวได้รับผลกระทบจากน้ำเสียที่ปล่อยมาจากแหล่งชุมชนและการเพาะเลี้ยงกุ้งส่งผลให้ต้นไม้ป่าชายเลนที่อยู่ใกล้กับริมตลิ่งยืนต้นตายเป็นจำนวนมาก

2. การเก็บตัวอย่าง

2.1 ทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรม (*S. commercialis*) 10 ตัวและหอยแครง (*A. granosa*) 10 ตัวต่อหนึ่งสถานีจากพื้นที่เพาะเลี้ยงในช่วงเวลาน้ำลงต่ำสุดในรอบวัน ซึ่งตัวอย่างหอยทั้งสองชนิดเป็นหอยที่อยู่ในพื้นที่เลี้ยงมาแล้วไม่น้อยกว่าสี่เดือน การเก็บตัวอย่างจะเลือกเก็บหอยที่มีขนาด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไม่น้อยกว่า 2.5 x 2.5 เซ็นติเมตร (หอยแครง) และ 6 x 10 เซ็นติเมตร (หอยนางรม) ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถจับขายได้ (Market size)

2.2 เก็บตัวอย่างดินตะกอนตามความลึก 5 ระดับ ได้แก่ 0 – 3, 3 – 6, 6 – 9, 9 – 12 และ 12 - 15 เซนติเมตร โดยใช้ Core Sampler แทงลงไปตามแนวดิ่ง ทั้งในป่าชายเลนและในพื้นที่เลี้ยงหอยในช่วงเวลาน้ำลง

2.3 ใบไม้ป่าชายเลน 2 ชนิด ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ชนิดเด่นของป่าชายเลนตำบลเสม็ด ได้แก่ โกงกางใบใหญ่ (*R. mucronata*) และแสมขาว (*A. alba*) อย่างละ 10 ใบต่อหนึ่งสถานี

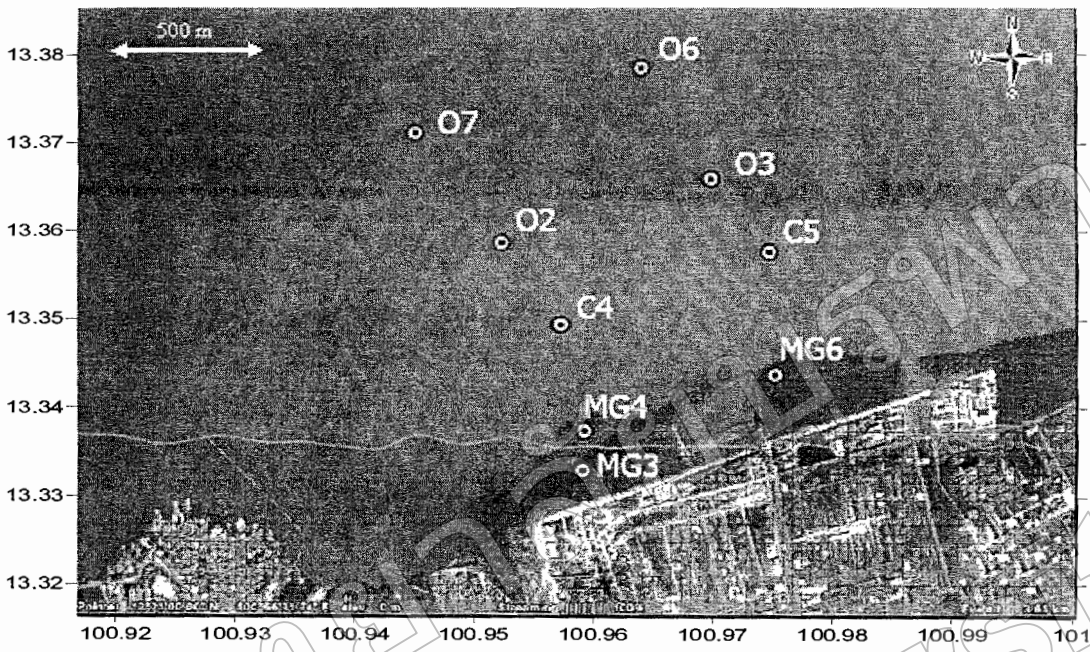
2.4 สาหร่ายหน้าดิน (*C. crassa*) ซึ่งเป็นพวกสาหร่ายสีเขียว เกาะติดกับ Substrate ตาม หิน รากไม้หรือพื้นผิวดินที่อยู่ต่ำกว่าระดับน้ำขึ้นน้ำลง สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Macro algae) เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะเป็นเส้นสายเรียงต่อกัน และมีขนาดประมาณ 300 ไมโครเมตร การเก็บตัวอย่างสาหร่ายหน้าดินจะเลือกเก็บสาหร่ายที่อยู่ภายในป่าชายเลน โดยใช้ช้อนสแตนเลสขูดเอาเฉพาะสาหร่ายที่อยู่บริเวณผิวหน้าดินในช่วงเวลาน้ำลง แล้วจึงนำสาหร่ายหน้าดินไปล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกดินตะกอนออกจากตัวอย่าง

2.5 อินทรีย์แขวนลอย Particulate organic matter (POM) โดยใช้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำทะเลมาประมาณ 500 ml ทั้งในป่าชายเลนและพื้นที่เลี้ยงหอยแครงและหอยนางรมในช่วงเวลาน้ำขึ้น แล้วจึงนำมากรองในห้องปฏิบัติการต่อไป

2.6 ตรวจวัดคุณภาพน้ำทะเลภาคสนามในช่วงเวลาน้ำขึ้น ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรดเป็นด่าง ออกซิเจนละลายน้ำและอุณหภูมิของน้ำทะเล ทั้งในป่าชายเลนและพื้นที่เลี้ยงหอยแครงและหอยนางรมโดยใช้เครื่อง YSI 6820 Multiprobe ส่วนค่าความโปร่งแสงใช้ Secchi Disc ในการตรวจวัด

โดยทำการเก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม 2551 (ฤดูฝน) และเดือนมีนาคม 2552 (ฤดูแล้ง) ทั้งในป่าชายเลน พื้นที่เลี้ยงหอยแครงและหอยนางรม ซึ่งในการเก็บตัวอย่างในแต่ละฤดูจะทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดในช่วงเวลาเดียวกัน (ตามภาพที่ 3-1และตารางที่3-1)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-1 จุดเก็บตัวอย่างบริเวณป่าชายเลน (MG) พื้นที่เพาะเลี้ยงหอยแครง (C) และหอยนางรม (O)

ตารางที่ 3-1 สถานีเก็บตัวอย่างและระยะห่างจากป่าชายเลน

สถานี	พื้นที่	ระยะห่างจากป่าชายเลน (เมตร)
MG3	ป่าชายเลน	ภายในป่าชายเลน
MG4		ภายในป่าชายเลน
MG6		ภายในป่าชายเลน
C4	เลี้ยงหอยแครง	500
C5		500
O2	เลี้ยงหอยนางรม	1,000
O3		1,000
O6		1,500
O7		1,500

3. ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ตรวจวัดภาคสนาม

ทำการตรวจวัดปัจจัยต่าง ๆ ของคุณภาพน้ำในขณะปฏิบัติการภาคสนาม โดยมีรายละเอียดของปัจจัยสิ่งแวดล้อม และเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดดังนี้ (ตารางที่ 3-2)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-2 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ตรวจวัดและเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	เครื่องมือวิเคราะห์
ความเค็ม	YSI 6820 Multiprobe
ความเป็นกรดเป็นด่าง	YSI 6820 Multiprobe
ความโปร่งแสง	Secchi Disc
ออกซิเจนละลายน้ำ	YSI 6820 Multiprobe
อุณหภูมิ	YSI 6820 Multiprobe

4. การเตรียมตัวอย่าง

4.1 Particulate organic matter (POM) หรือสารอินทรีย์แขวนลอย

นำตัวอย่างน้ำทะเลประมาณ 100 มิลลิลิตร มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/F ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำกระดาษกรองไป decarbonate ด้วยไอกรดไฮโดรคลอริกเป็นเวลา 3 วันแล้วจึงใช้เครื่องดูดไอกรดออกจากกระดาษกรอง แล้วจึงนำกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสอีกครั้ง แล้วจึงนำกระดาษกรองมาบรรจุใน Tin capsules นำไปวิเคราะห์ $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ และสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ด้วยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer ต่อไป

4.2 เนื้อเยื่อหอย

โดยนำตัวอย่างหอยมาแกะเปลือกเอาส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำเนื้อเยื่อหอยมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นบดให้ละเอียดและนำไปสกัดไขมันออกด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและ เมทานอลในอัตราส่วน 2:1 หลังจากนั้นกรองเอาแต่สิ่งที่ตกค้างบนกระดาษกรองนำมาชั่งใส่ Tin capsules ประมาณ 0.3 – 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ และสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ด้วยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer ต่อไป

4.3 ดินตะกอน

นำตัวอย่างดินมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำดินมาบดให้ละเอียด แล้วจึงนำไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 นอร์มอล เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงนำตัวอย่างดินมากำจัดกรดออกโดยใช้น้ำกลั่นล้างจนไม่มีกรดเหลืออยู่ในตัวอย่าง แล้วจึงนำดินมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกครั้งจากนั้นนำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตัวอย่างดินมาบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างให้ได้ประมาณ 5 – 10 มิลลิกรัม ใส่ Tin capsules นำไปวิเคราะห์ $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ และสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) โดยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer ต่อไป

4.4 ใบไม้จากป่าชายเลนและสาหร่ายหน้าดิน (Benthic algae)

นำตัวอย่างใบไม้และสาหร่ายหน้าดินไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียดชั่งใส่ Tin capsules นำไปวิเคราะห์ $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ และสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) โดยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer

5. การวิเคราะห์ปริมาณไอโซโทปเสถียรของคาร์บอน ไนโตรเจนและสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อหอย ดิน ใบไม้ สาหร่ายหน้าดิน และ Particulate organic matter (POM) ที่เก็บมาในเดือนตุลาคม 2551 (ฤดูฝน) และเดือนมีนาคม 2552 (ฤดูแล้ง) ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโซโทปเสถียรของคาร์บอน ไนโตรเจนและ C:N ด้วยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer ที่มหาวิทยาลัยปูซาน (Pusan National University) ประเทศเกาหลี ซึ่งสัดส่วนของ $^{13}C/^{12}C$ และ $^{15}N/^{14}N$ ที่รายงานออกมานั้นมีหน่วยเป็น “mil (‰)” เป็นความสัมพันธ์ของความแตกต่างระหว่างค่าของตัวอย่างและสารมาตรฐาน

$$\delta X\ (‰) = [(R_{sample}/R_{standard}) - 1] \times 10^3$$

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

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

ค่ามาตรฐานของตัวอย่างคือ alamine $\delta^{13}C = -23.20‰$ vs. PDB, $\delta^{15}N = -1.69‰$ vs. air N_2

โดยให้สาหร่ายหน้าดิน ดินตะกอนจากพื้นที่เลี้ยงหอย และBenthic diatom (Riera & Richard, 1996) เป็นแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ที่สำคัญ ซึ่งคาร์บอนในตัวอย่างทั้งหมดจะถูกคำนวณโดยใช้ simple three sources mixing model

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

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

$$f_1 + f_2 + f_3 = 1$$

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

C_1 , C_2 และ C_3 แทน ค่าของคาร์บอนไอโซโทปของแหล่งกำเนิดทั้ง 3 แหล่ง ตามลำดับ

N_1 , N_2 และ N_3 แทน ค่าของไนโตรเจนไอโซโทปของแหล่งกำเนิดทั้ง 3 แหล่ง ตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบความแตกต่างระหว่างสัดส่วนไอโซโทปเสถียรของสถานี ชนิดตัวอย่าง และฤดูกาล โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เป็นตัวทดสอบทางสถิติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University