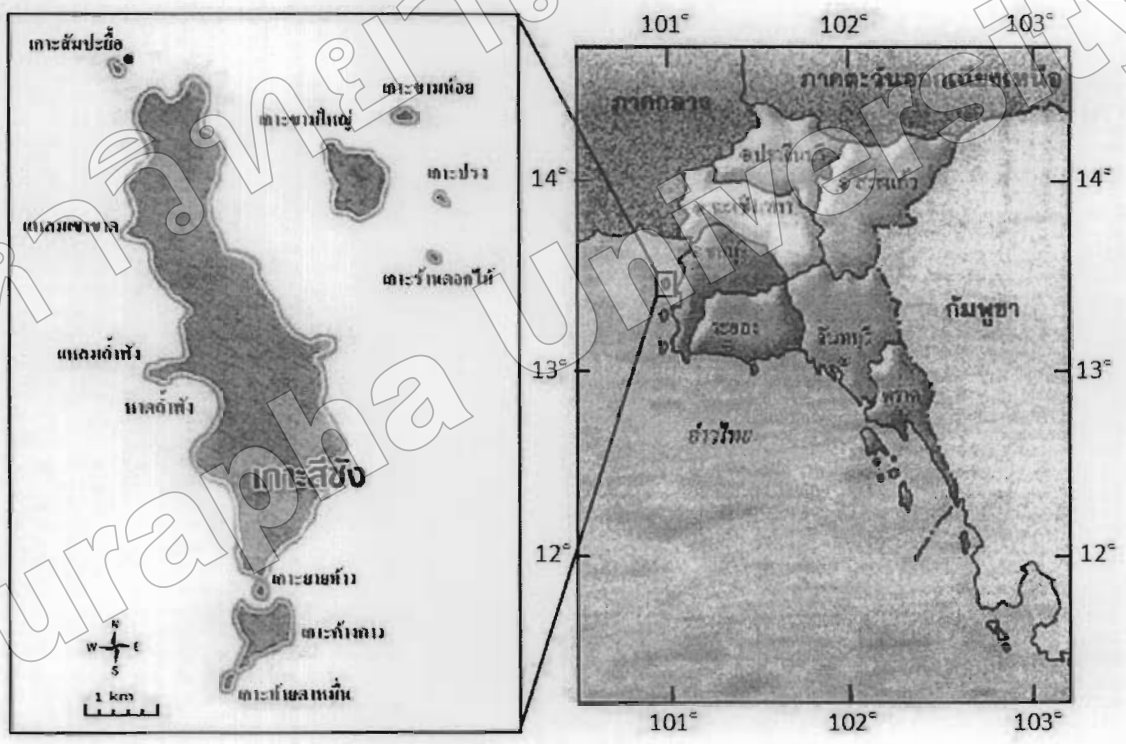
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พื้นที่การวิจัย

ชุมชนปะการังที่ทำการศึกษาอยู่ในพื้นที่ของเกาะสัมปะยื้อ ซึ่งอยู่ทางทิศเหนือของเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ตั้งอยู่ที่ละติจูด 13° 10' 54" เหนือ ลองติจูด 100° 48' 01" ตะวันออก ในอ่าวไทยตอนใน โดยพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างอยู่ทางด้านทิศตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะสัมปะยื้อ ซึ่งได้รับอิทธิพลของน้ำจืดจากแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำบางปะกง และไม่ได้รับผลกระทบจากกิจกรรมต่าง ๆ จากเกาะสีชังและจากชายฝั่ง (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณเกาะสัมปะยื้อ หมู่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2551 (ฤดูฝน) และวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2552 (ฤดูแล้ง)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ดำน้ำแบบใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA)
2. อุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่าง
   2.1 ค้อน กรรไกร ถุงตาข่าย ถุงซิป
3. อุปกรณ์สำหรับการเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่าง
   3.1 ปากคีบ (Stainless steel forceps)
   3.2 อุปกรณ์เครื่องแก้วพื้นฐาน
   3.3 กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำ (Water sampler) แบบ Kitahara ขนาด 1 ลิตร
   3.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
   3.5 เครื่องวัดคุณภาพน้ำ Multi-parameter probes (YSI sonde v6600)
   3.6 กระดาษกรอง
   3.7 โกร่งบดยา
   3.8 เครื่องฉีดอัดอากาศแรงดันสูง
   3.9 เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (Homogenizer)
   3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
   3.11 ตู้อบความร้อน (Oven)
   3.12 โถดูดความชื้น (Desiccator)
   3.13 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter toledo รุ่น XS205 Dualrange
   3.14 อลูมิเนียมฟอยล์สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง (Tin capsules 5 mm. x 3.5 mm.)
   3.15 เครื่อง Isotope ratio mass spectrometer
4. สารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอย่าง
   4.1 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionization water)
   4.2 เมทานอล (Methanol)
   4.3 คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
   4.4 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
   4.5 อะซีโตน (Acetone)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตชนิดเด่นที่พบในบริเวณเกาะสันปันยื้อ หมู่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และคณะ, 2545) ในแนวปะการังส่วนราบ (Reef flat) ที่ระดับน้ำความลึกประมาณ 1 – 3 เมตร โดยการดำน้ำแบบ SCUBA ซึ่งตัวอย่างที่เก็บมีดังต่อไปนี้

1. ปะการังแข็ง ได้แก่ ปะการังดอกไม้ (*Goniopora* sp.), ปะการังโขด (*P. lutea*), ปะการังช่องเล็กแบบแผ่น (*M. hispida*) และปะการังลายดอกไม้ (*P. frondifera*) ทำการเก็บตัวอย่างปะการังแต่ละชนิดโดยใช้ค้อนทุบก้อนปะการังให้มีขนาดของตัวอย่างประมาณ 10 เซนติเมตร สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อปะการังและซูแซนเทลลี จำนวนชนิดละ 5 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างปะการังรวม (ไม่แยกเนื้อเยื่อและซูแซนเทลลี) จำนวนชนิดละ 3 ตัวอย่าง

2. ปะการังอ่อน (*Sarcophyton* sp.) ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้กรรไกรตัดเนื้อเยื่อปะการังให้มีขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อปะการังและซูแซนเทลลี จำนวน 5 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างปะการังรวม(ไม่แยกเนื้อเยื่อและซูแซนเทลลี) จำนวน 3 ตัวอย่าง

3. ดอกไม้ทะเล (*H. magnifica*) ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้กรรไกรตัดเนื้อเยื่อดอกไม้ทะเลให้มีขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อดอกไม้ทะเลและซูแซนเทลลี จำนวน 5 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างดอกไม้ทะเลรวม (ไม่แยกเนื้อเยื่อและซูแซนเทลลี) จำนวน 3 ตัวอย่าง

4. หอยพัดปะการัง (*P. spondyloideum*) ทำการเก็บตัวอย่างโดยการแงะตัวอย่างหอยให้หลุดออกจากโครงร่างแข็งของปะการัง จำนวน 5 ตัวอย่าง

5. สารอินทรีย์แขวนลอยในน้ำทะเล ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล 500 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกเก็บน้ำ (Water sampler) แบบ Kitahara ขนาด 1 ลิตร ที่ระดับน้ำความลึก 0.5 เมตร จากผิวน้ำทะเลในบริเวณชุมชนปะการังของเกาะสันปะยื้อ กรองด้วยกระดาษกรองใยแก้ว Whatman GF/F ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 450 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 3 ตัวอย่าง พร้อมทั้งวัดคุณภาพน้ำต่าง ๆ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิของน้ำ ด้วยเครื่อง Multi-parameter probes (YSI sonde v6600) และความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter จากนั้นนำตัวอย่างน้ำทะเลมาทำการหาปริมาณสารแขวนลอยโดยวิธี Gravimetric ในห้องปฏิบัติการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การจำแนกตัวอย่าง

ปะการังที่พบในบริเวณเกาะสัมปะยื้อและอ่าวไทยตอนในมีหลายชนิด แต่ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างปะการังชนิดเด่นที่พบในบริเวณหมู่เกาะสัมปะยื้อ (ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และคณะ, 2545) ได้แก่

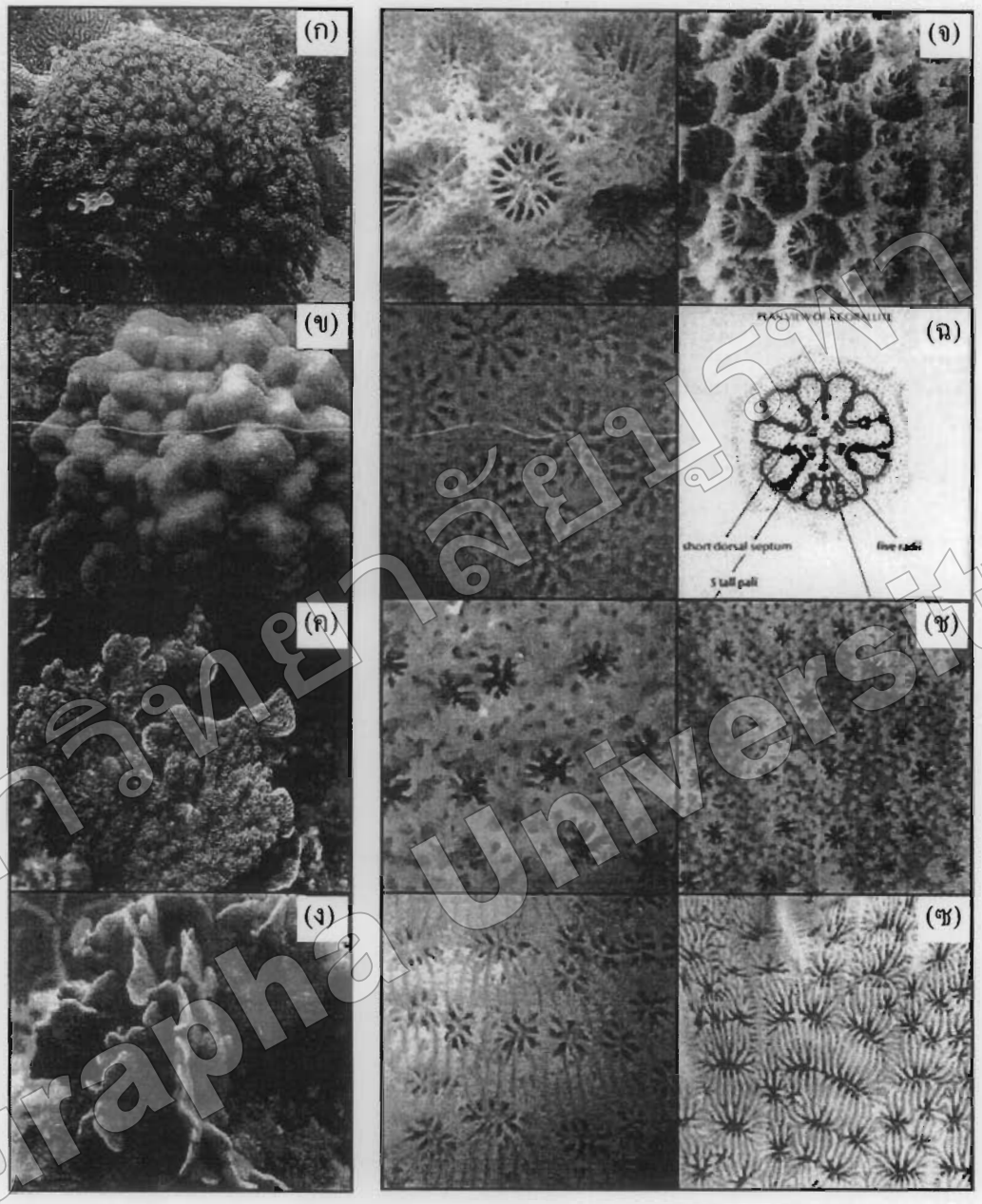
- ปะการังดอกไม้ (*Goniopora* sp.) โคโลนีมีลักษณะค่อนข้างกลม โพลิปมีขนาดใหญ่และสามารถยืดยาวออกมาได้ทั้งกลางวันและกลางคืน มีสีน้ำตาลหรือสีเขียว คอรอลไลท์ (Corallites) หนาแต่ผนังโครงร่างมีรูพรุน โดยแคลไลซ์ (Calices) จะเต็มไปด้วยด้วยเซพตา (Septa) และคอลัมเมลลา (Columella) ขนาดเล็ก (ภาพที่ 3-2 ก และ จ)

- ปะการังโขด (*P. lutea*) โคโลนีมีลักษณะเป็นก้อนขนาดใหญ่คล้ายโขดหิน มีผิวเรียบ สีน้ำตาล คอรอลไลท์มีขนาดเล็กและถูกฝังอยู่ในโครงร่าง โดยแคลไลซ์จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3-2 ข และ ฉ)

- ปะการังช่องเล็กแบบแผ่น (*M. hispida*) โคโลนีมีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ หรือมีส่วนยื่นคล้ายนิ้วมือ หรืออาจมีรูปร่างที่หลากหลายรวมกัน โดยทั่วไปจะพบในบริเวณน้ำขุ่น ซึ่งจะเปราะบาง แตกหักง่ายและมีผิวหยาบ สีน้ำตาล คอรอลไลท์เต็มไปด้วยเซพตาและมีโครงสร้างที่เกี่ยวเนื่องกัน โดยภายในเซพตาจะประกอบด้วยหนามที่ยื่นออกมาเป็นแถวแนวตั้ง (ภาพที่ 3-2 ค และ ช)

- ปะการังลายดอกไม้ (*P. frondifera*) โคโลนีมีลักษณะเป็นแผ่นแนวตั้งเหมือนลายดอกไม้ ตั้งขึ้นในแนวดิ่ง มีสีน้ำตาลซีดหรือน้ำตาลแกมเขียว คอรอลไลท์ไม่มีผนังโครงร่างคั่น ซึ่งศูนย์กลางของคอลัมเมลลาจะมีขนาดเล็กและเป็นรอยเว้าลงไป คอรอลไลท์จะถูกเชื่อมต่อกันโดยเซพโตคอสเตีย (Septo-costae) ที่ยื่นออกมา (ภาพที่ 3-2 ง และ ซ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-2 รูปร่างและโครงร่างของปะการังแข็งที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

รูปร่างปะการังแข็งที่ทำการศึกษา (ซ้าย)

(ก) ปะการังดอกไม้ (*Goniopora* sp.) (ข) ปะการังโขด (*P. lutea*)

(ค) ปะการังช่องเล็กแบบแผ่น (*M. hispida*) (ง) ปะการังลายดอกไม้ (*P. frondifera*)

โครงร่างปะการังแข็งที่ทำการศึกษา (กลาง) เปรียบเทียบกับโครงร่างปะการังแข็งตามลักษณะอนุกรมวิธาน (ขวา) (Veron, 1986)

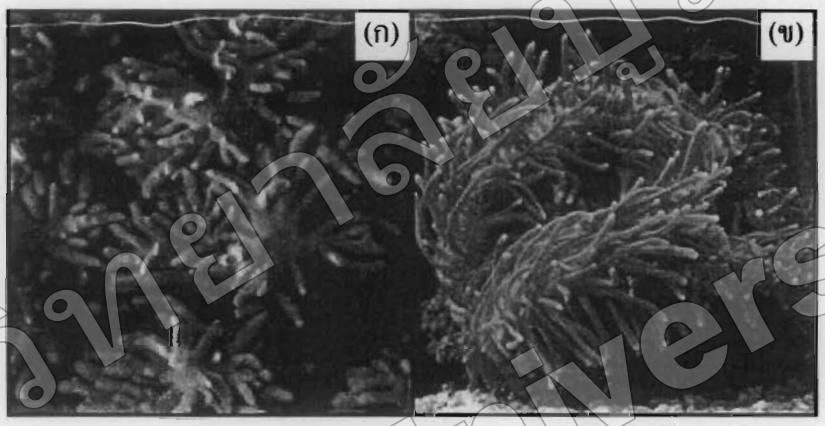
(จ) ปะการังดอกไม้ (*Goniopora* sp.) (ฉ) ปะการังโขด (*P. lutea*)

(ช) ปะการังช่องเล็กแบบแผ่น (*M. hispida*) (ซ) ปะการังลายดอกไม้ (*P. frondifera*)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปะการังอ่อน (*Sarcophyton* sp.) จะไม่สร้างหินปูนแบบปะการังแข็ง แต่สร้างหินปูนเหมือนผลึกขนาดเล็กซึ่งอาจมองเห็นด้วยตาเปล่า หรือในบางชนิดต้องส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงจะเห็นได้ชัดเจน ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นต้นอ่อนนุ่ม และบางชนิดจะขึ้นเคลือบตามโขดหินใต้น้ำทางชายฝั่งที่รับแรงปะทะจากคลื่นและลมมรสุม (ภาพที่ 3-3 ก)

ดอกไม้ทะเล (*Heteractis magnifica*) จัดอยู่ในประเภทสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีลักษณะของลำตัวที่มีรูปร่างคล้ายถุง และมีรูเปิดออก 1 รู มีอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายกับหนวดอยู่รอบ ๆ บริเวณรูเปิดนั้นมีสีสันที่แตกต่างกัน เช่น สีแดง สีส้ม (ภาพที่ 3-3 ข) (Veron, 1986)



ภาพที่ 3-3 รูปร่างของ (ก) ปะการังอ่อน (*Sarcophyton* sp.) และ (ข) ดอกไม้ทะเล (*H. magnifica*) ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

การเตรียมตัวอย่าง (Swart et al., 2005)

1. ตัวอย่างปะการังแข็ง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ฉีดอัดตัวอย่างด้วยอากาศแรงดันสูงเพื่อแยกเนื้อเยื่อปะการังออกจากโครงร่างแข็ง ปั่นเหวี่ยงเนื้อเยื่อปะการังด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกซูแซนเทลลีออกจากเนื้อเยื่อปะการัง จากนั้นนำไปกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตออกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อปะการังด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C บดให้ละเอียด สกัดไขมันออกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 อบให้แห้งอีกครั้ง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$

2. ตัวอย่างปะการังอ่อน นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้นปั่นเหวี่ยงเนื้อเยื่อปะการังด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกซูแซนเทลลีออกจากเนื้อเยื่อปะการัง จากนั้นนำไปกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตออกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อปะการังด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C บดให้ละเอียด สกัดไขมันออกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 อบให้แห้งอีกครั้ง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$

3. ดอกไม้ทะเล นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้นปั่นเหวี่ยงเนื้อเยื่อดอกไม้ทะเลด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกซูแซนเทลลีออกจากเนื้อเยื่อดอกไม้ทะเล อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C บดให้ละเอียด สกัดไขมันออกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 อบให้แห้งอีกครั้ง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$

4. หอยพัดปะการัง นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แกะเปลือกหอยเอาเฉพาะเนื้อเยื่อมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C บดให้ละเอียด สกัดไขมันออกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 อบให้แห้งอีกครั้ง และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$

5. สารอินทรีย์แขวนลอยในน้ำทะเล นำตัวอย่างกระดาษกรองที่ผ่านการกรองตัวอย่างน้ำทะเลไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นทำการกำจัดคาร์บอเนตออกจากกระดาษกรองโดยการอบด้วยไอกรดไฮโดรคลอริก และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปริมาณสารแขวนลอยของตัวอย่างน้ำทะเลโดยวิธี gravimetric (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2543)

นำกระดาษกรองใยแก้ว GF/F ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 103-105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้ว กรองน้ำทะเลตัวอย่างผ่านกระดาษกรองใยแก้วพร้อมทั้งบันทึกปริมาตรน้ำทะเลตัวอย่าง นำกระดาษกรองใยแก้วไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103-105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของกระดาษกรองใยแก้วอีกครั้ง

$$SS = (A - B) \times 1000 / C$$

เมื่อ SS = ปริมาณสารแขวนลอย (มิลลิกรัม/ลิตร)

A = น้ำหนักกระดาษกรองใยแก้วและสารแขวนลอย (มิลลิกรัม)

B = น้ำหนักของกระดาษกรองใยแก้ว (มิลลิกรัม)

C = ปริมาตรน้ำทะเลตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การวิเคราะห์ปริมาณไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจน

นำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$ ด้วยเครื่อง Isotope ratio mass spectrometer ซึ่งความแตกต่างของสัดส่วน $^{13}C/^{12}C$ และ $^{15}N/^{14}N$ จะถูกคำนวณให้อยู่ในค่า Delta ใช้สัญลักษณ์ δ มีหน่วยส่วนในพันส่วน (Per mil, ‰) เป็นความสัมพันธ์ของความแตกต่างระหว่างปริมาณไอโซโทปเสถียรของตัวอย่างและสารมาตรฐาน

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

เมื่อ X = ปริมาณไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจน (^{13}C หรือ ^{15}N)

R = ปริมาณสัดส่วนไอโซโทป ($^{13}C/^{12}C$ หรือ $^{15}N/^{14}N$)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จะใช้สถิติ T-test เป็นเครื่องมือในการทดสอบความแตกต่างของปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$ ในตัวอย่างเนื้อเยื่อและซูแซนเทลลีในทั้ง 2 ฤดูกาล และใช้สถิติพาราเมตริกวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ของปริมาณ $\delta^{13}C$ และ $\delta^{15}N$ ในตัวอย่างสิ่งมีชีวิตทั้ง 6 ชนิด จากนั้นทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Post hoc Comparison) ด้วยวิธี Duncan เพื่อทำการจำแนกกลุ่มตัวอย่าง และใช้วิธี Fisher's LSD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกลุ่มประชากรที่ให้ความไว (Sensitive) ในการทดสอบได้ชัดเจน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University