บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยตึงเฒ่า

1. ขวดโพลีเอสเตอร์ขนาดความจุ 2 ลิตร
2. ขวด BOD สีดำ ขนาดความจุ 300 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร
3. ขวดสีชาใส่ตัวอย่างแพลงตอนพืชขนาดความจุ 100-150 มิลลิลิตร
4. เครื่องมือเก็บตัวอย่างน้ำ (water sampler) ขนาดความจุ 2 ลิตร พร้อมเชือก
5. ถังพลาสติก ขนาดความจุ 5 ลิตร
6. ลูกดิ่งพร้อมเชือก
7. ตลับเมตร
8. Secchi disc
9. ชุด electrode kit ประกอบด้วย oxygen meter และ pH meter ของบริษัท WTW
10. ตาข่ายแพลงตอน (plankton net) ขนาด 20 ไมโครเมตร
11. สารละลาย Lugol (Lugol's solution)
12. เรือยาง
13. อุปกรณ์สำหรับบันทึกผล

อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. ชุดเครื่องแก้ว ได้แก่ ปิเปต ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ชุดไตเตรท
2. water bath
3. เครื่องกรองน้ำระบบสูญญากาศ
4. กระดาษกรอง GF/C (Glass fiber filter) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 อลูมินั่มฟอล์ย
5. สารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95%
6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 N
7. สารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.02 N

8. เครื่องวัดความขุ่น (turbidity meter)

9. Spectophotometer รุ่น DR2000ของบริษัท Hach พร้อมสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้สำหรับตรวจสอบปริมาณไนเตรท ไนโตรเจน แอมโมเนียม ไนโตรเจน และออร์โธฟอสเฟต

10. Autopipette

11. กระจกสไลด์และ cover slip ขนาด 22 x 22 มิลลิเมตร

12. Spectophotometer รุ่น UV-160 A พร้อม cuvette ขนาด 4 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

วิธีการ

1. **การกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง**

การกำหนดจุดเก็บตัวอย่างจะเลือกเก็บน้ำที่เป็นตัวแทนจากบริเวณต่างๆ กัน 4 จุด อันดับแรกคือ หาจุดลึกที่สุดของแหล่งน้ำแล้วทำเครื่องหมาย โดยใช้ทุ่นผูกกับก้อนหินถ่วงไว้ ณ จุดนี้จะเก็บตัวอย่างน้ำที่ 2 ระดับความลึกคือ

จุดที่ 1 เก็บจากระยะกึ่งกลางระหว่างผิวน้ำและจุดสุดท้ายที่แสงส่องถึง

จุดที่ 2 เก็บจากระยะกึ่งกลางระหว่างจุดสุดท้ายที่แสงส่องถึงจนถึงก้นอ่างเก็บน้ำ

ทั้งจุดที่ 1 และ 2 นี้ อาจมีระยะที่เปลี่ยนแปลงไปในทุกครั้ง การกำหนดความลึกที่จะเก็บน้ำจะใช้ Secchi disc และตลับเมตรเป็นอุปกรณ์สำคัญในการวัดทุกครั้ง จุดที่ 1 และ 2 นี้จะเป็นตัวแทนของน้ำในอ่างเก็บน้ำ

จุดเก็บน้ำอีก 2 จุด จะเลือกดังนี้ (ทั้ง 2 จุดนี้เก็บน้ำที่ระดับ 30 เซนติเมตรจากผิวน้ำ)

จุดที่ 3 จุดร้านค้า ซึ่งประกอบแพอาหารและแพตกปลา ซึ่งจุดนี้จะเป็นตัวแทนของน้ำที่ได้รับผลกระทบจากชุมชน

จุดที่ 4 จุดทางน้ำออก เป็นจุดเดียวที่ทำการเก็บน้ำที่ออกมาจากอ่างเก็บน้ำ เป็นตัวแทนของน้ำภายนอกอ่างเก็บน้ำ (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 แผนที่บริเวณที่ตั้งอ่างเก็บน้ำห้วยตึงเฒ่า อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

แสดงจุดเก็บน้ำ 4 จุด

จุดที่ 1 บริเวณที่ลึกที่สุดเก็บจากระยะกึ่งกลางระหว่างผิวน้ำและจุดสุดท้ายที่แสงส่องถึง

จุดที่ 2 ระยะกึ่งกลางระหว่างจุดสุดท้ายที่แสงส่องถึงจนถึงก้นอ่างเก็บน้ำ

จุดที่ 3 บริเวณแพอาหารและแพตกปลา

จุดที่ 4 บริเวณทางน้ำออก

2. การเก็บและศึกษาคุณภาพน้ำบางประการ ณ บริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยตึงเฒ่า

ในจุดที่ 1 และ 2 จะใช้เรือยางเป็นพาหนะไปยังทุ่นที่ทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นใช้ Secchi disc วัดความลึกที่แสงส่องถึง และใช้ลูกดิ่งวัดความลึกของแหล่งน้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาระดับความลึกของจุดที่ 1 และ 2 หย่อน electrode kit ลงไปที่ระดับความลึกที่ได้ทำการบันทึกค่าต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ เปอร์เซ็นต์ออกซิเจนอิ่มตัว จาก oxygen meter ค่า pH ของน้ำจาก pH meter ต่อจากนั้นหย่อนเครื่องมือเก็บตัวอย่างน้ำลงไปเก็บน้ำในระดับที่ต้องการ น้ำที่เก็บขึ้นมาจะถูกบรรจุในภาชนะต่างๆ ตามสิ่งที่ต้องการศึกษาดังนี้

2.1 ศึกษาค่า BOD_5 ค่อยๆ เทน้ำลงในขวด BOD สีดำจนล้นขวดโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศในขวด ปิดฝาให้แน่นนำมายังห้องปฏิบัติการ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 5 วัน

2.2 ศึกษาคุณภาพน้ำทางเคมีและศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ โดยใช้ขวดโพลีเอสเตอร์ขนาด 2 ลิตร บรรจุน้ำตัวอย่างให้เต็ม ปิดฝาให้สนิท นำกลับมาศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ

2.3 ศึกษาชนิดและปริมาณแพลงตอนพืช เติมตัวอย่างน้ำลงในถังพลาสติคความจุ 2 ลิตรให้เต็มโดยจุดที่ 1 และ 2 ใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างน้ำส่วนจุดที่ 3 และ 4 ใช้ถังพลาสติกตักน้ำในระดับต่ำกว่าผิวน้ำประมาณ 30 เซนติเมตร เทน้ำจากถังพลาสติกผ่านการข่ายแพลงตอนเขย่าเบาๆ ให้น้ำไหลออกจากตาข่ายจนเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยใช้น้ำที่เหลือลงในขวดเก็บแพลงตอนพืช เติม Lugol's solution ลงไปประมาณร้อยละ 2 ของปริมาตรน้ำในขวด ปิดฝาให้แน่นนำมาทำการตรวจนับที่ห้องปฏิบัติการ

3. **การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมี และชีวภาพในห้องปฏิบัติการ**

3.1 **การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ**

ศึกษาความขุ่นของน้ำโดยวิธีแนฟฟีโลเมตริก (naphelometric method) เปรียบเทียบความเข้มของแสงที่กระจัดกระจายระหว่างตัวอย่างน้ำกับสารมาตรฐานภายใต้สภาวะต่างๆ ที่เหมือนกัน (กรรณิการ์, 2525) โดยใช้ Turbidity meter เป็นอุปกรณ์การวัด

3.2 การศึกษาคุณภาพน้ำทางเคมี

3.2.1 ความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity) ใช้ potentiometric method (กรรณิการ์, 2525) ทำโดยตวงน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่นำมาไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริก ความ

เข้มข้น 0.02 N โดยใช้ pH meter หาจุดยุติที่อยู่ในช่วง pH 4.3-4.7 บันทึกปริมาณกรดที่ใช้แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{alkalinity, mg/l as } CaCO_3 = \frac{A \times N \times 50{,}000}{\text{ml. sample}}$$

เมื่อ A เป็นมิลลิลิตรของกรดมาตรฐาน (H_2SO_4 0.02 N) จนถึงจุดยุติที่ใช้ในการไตเตรท

N เป็นนอร์มัลลิตี้ของกรดมาตรฐาน = 0.02 N

3.2.2 ปริมาณสารอาหาร นำตัวอย่างน้ำมากรองเอาสารแขวนลอยออกเสียก่อน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารต่างๆ คือ ออร์โธฟอสเฟต (PO_4^{3-}-P) ไนเตรท ไนโตรเจน (NO_3-N) และแอมโมเนียม ไนโตรเจน (NH_4^+-N) โดยใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างน้ำครั้งละ 25 มิลลิลิตร กับสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับทดสอบสารอาหารเหล่านั้น ในช่วงเวลาที่กำหนดไว้ของสารแต่ละชนิด ปริมาณสารอาหารที่แสดงออกมาตรวจสอบโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่นจำเพาะเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่กำหนดไว้ในคู่มือการใช้เครื่อง Spectrophotometer รุ่น DR2000 ซึ่งกล่าวโดยสรุปได้ดังตารางนี้

สารอาหาร	สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบสารอาหาร (reagents)	ความยาวช่วงคลื่น	สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ (Blank solution)
NO_3^--N	HR NITRATE MOOO19F25	500 นาโนเมตร	น้ำตัวอย่างที่ไม่เติม reagents
NH_4^+-N	-Mineral stabilizer -Polyvinyl Alcohol Dispersing Agent -Nessler Reagent	425 นาโนเมตร	deionized water ที่เติม reagents
PO_4^{3-}-P	PHOSPHATE RGT MOOO35F25	890 นาโนเมตร	น้ำตัวอย่างที่ไม่เติม reagents

3.3 การศึกษาคุณภาพน้ำทางชีวภาพ

การศึกษาคุณภาพน้ำทางชีวภาพแบ่งออกได้ ดังนี้

3.3.1 การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ กรองน้ำตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร ผ่านกระดาษกรอง GF/C โดยใช้เครื่องกรองน้ำแบบสูญญากาศ นำกระดาษกรองที่ได้นี้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ โดยวิธีของ Nusch (1980) ซึ่งดัดแปลงโดย ยุวดี และฉมาภรณ์ (2538) โดยบดกระดาษกรองให้ละเอียดและสกัดคลอโรฟิลล์ เอ โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส เก็บในภาชนะแก้วทึบแสงแล้วนำไปแช่ตู้เย็น เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง นำมากรองเอาเศษกระดาษกรอง GF/C ออกจนได้สารละลายสีเขียวใสทำการปรับปริมาตรให้เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ เทสารละลายที่ได้ลงใน cuvette ขนาด 4 เซนติเมตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร บันทึกไว้เทสารละลายจาก cuvette คืนหลอดเดิมทำการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 N 0.06 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ในที่มืดประมาณครึ่งชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีข้างต้นอีกครั้งบันทึกผล แล้วนำค่าที่ได้ทั้งสองค่ามาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัม/ลิตร)} = 29.6 \times (A-B) \times \frac{v}{V \times l}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงก่อนเติมกรดเกลือ

B = ค่าการดูดกลืนแสงหลังเติมกรดเกลือ

v = ปริมาตรของเอธิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ทั้งหมด (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรน้ำที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (1 ลิตร)

l = ความยาวของหลอดใส่สารสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (cuvette) = 4 เซนติเมตร

3.3.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของแพลงตอนพืช

หาปริมาตรที่แน่นอนของตัวอย่างน้ำซึ่งเก็บโดยวิธีกรองด้วยตาข่าย แพลงตอนและเก็บรักษาในขวดเก็บแพลงตอนพืชที่เติม Lugol's solution ไว้ แล้วเขย่าขวดให้แพลงตอนพืชในน้ำกระจายพึ่งกันใช้ Autopipette ดูดน้ำจากขวดออกมา 0.02 ml. หยดลงตรงๆ บนกระจกสไลด์ปิด

ด้วย cover slip นำไปตรวจนับแบบนับหมด (whole count) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยายสูง การจำแนกแพลงตอนพืชออกเป็นสกุลหรือชนิดต่างๆ ใช้หนังสือประกอบการวิเคราะห์ที่สำคัญคือ แล้ว Belcher and Swale (1979), Deisinger and Marz (1984), Foged (1976), Islam (1947), Komarek (1983), Pestalozzi (1938 1955), Popovsky and Pfiester (1990), Prescott (1951, 1970), Starmarch (1985), Teiling (1966), Whitford and Schumacher (1969) และลัดดา (2538) นับทั้งหมด 3 ซ้ำ เมื่อนับแพลงตอนพืชแล้ว นำค่าที่ได้จากการนับแต่ละสไลด์จากน้ำขวดเดียวกันมาเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณปริมาณแพลงตอนพืชต่อลิตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณของแพลงตอนพืช(เซลล์/ลิตร)} = \frac{a \times \text{ค่าเฉลี่ยของปริมาณแพลงตอนพืชที่นับได้ใน 0.02 ml.}}{\text{0.02 มิลลิลิตร} \times b}$$

เมื่อ a = ปริมาตรน้ำในขวดเก็บแพลงตอนพืช

b = ปริมาตรน้ำทั้งหมดที่กรองผ่านตาข่ายแพลงตอน = 5 ลิตร

-ทำการบันทึกผลการวิเคราะห์ พร้อมทั้งถ่ายภาพและวาดภาพแพลงตอนพืชที่พบ

4. **การหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของแพลงตอนพืชกับสารอาหารบางชนิด**

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปริมาณสารอาหารอันประกอบด้วย NO_3^-N, NH_4^+-N และ PO_4^{3-}P กับปริมาณแพลงตอนพืช แต่ละสกุลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% โดยใช้โปรแกรม SPSS for window จากเครื่อง Micro computer รุ่น 486 D x 2-66

สถานที่ทำการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูล

การจำแนกสกุลและชนิด รวมทั้งนับปริมาณแพลงตอนพืช ศึกษาคุณภาพน้ำบางประการที่หน่วยวิจัยสาหร่ายประยุกต์ (Applied Algal Research Unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้คอมพิวเตอร์ที่ห้องคอมพิวเตอร์ ณ หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2 ถึงเดือนธันวาคม 2538 รวม 6 เดือน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University