บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง

1.1 กระดาษเลเบล

1.2 กระบอกเก็บตัวอย่างดิน (soil core sampler)

1.3 ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างน้ำพร้อมฝาปิด

1.4 ช้อนปลูก

1.5 ถุงพลาสติก

1.6 มีด

1.7 รองเท้าบู๊ตยาง

1.8 หลอดพลาสติกเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช และสาหร่ายยึดเกาะ

2. เครื่องแก้ว

2.1 กรวยแก้ว (funnel)

2.2 กระบอกตวง (measuring cylinder)

2.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

2.4 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

2.5 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

2.6 บิกเกอร์ (beaker)

2.7 บิวเรตต์ (burette)

2.8 ปิเปตต์ (pipette)

2.9 หลอดทดลอง (test tube)

2.10 หลอดหยด (dropper)

2.11 หลอดฝาเกลียว (screw cap tube)

3. **เครื่องมือวิเคราะห์**

3.1 กล้องจุลทรรศน์เลนส์เดี่ยว (stereomicroscope) Olympus TL2

3.2 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope) Olympus CH3-TR45

3.3 เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (shaker)

3.4 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) Sartorius BP 310S

3.5 เครื่องดูดอากาศ (suction pump) GAST DOA-P104-BN

3.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) spectronic-21

3.7 เครื่องวัดความขุ่น 2001N (turbidimeter) Hach 2100N

3.8 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Jenway 3051

3.9 เครื่องวัดพีเอชดิน (soil pH meter) Takemura electric work LTD.

3.10 เครื่องวัดแสง (light meter)

3.11 เตาอบ (oven)

3.12 เตาไฟฟ้า (hot plate)

3.13 เตาเผา (muffle furnace)

3.14 โถทำแห้ง (desiccators)

3.15 เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

3.16 ปิเปตต์ขนาดเล็ก (micropipette)

3.17 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)

4. **สารเคมี**

4.1 Agar

4.2 Aluminium sulfate $AlSO_4$

4.3 Ammonium chloride NH_4Cl

4.4 Ammonium fluoride NH_4F

4.5 Ammonium hydroxide NH_4OH

4.6 Ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$

4.7 Ammonium vanadate NH_4VO_3

4.8 Ascorbic acid

4.9 Bromoresol green $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$

4.10 Boric acid H_3BO_3

4.11 Calcium chloride $CaCl_2.2H_2O$

4.12 Citric acid $C_6H_8O_{10}$

4.13 Cobalt nitrate $Co(NO_3)_2.6H_2O$

4.14 Copper sulphate $CuSO_4.5H_2O$

4.15 Crystal iodine I_2

4.16 Devarda's alloy

4.17 Ethyl alcohol C_2H_5OH

4.18 Ferric ammonium citrate $FeNH_4$ citrate

4.19 Hydrochloric acid HCl

4.20 Magnesium oxide MnO_3

4.22 Magnesium sulfate $MnSO_4.H_2O$

4.23 Mercury iodide HgI_2

4.24 Methyl orange

4.25 Methyl red

4.26 Molybdenum oxide MoO_3

4.27 Nickel sulfate $NiSO_4.6H_2O$

4.28 Nitric acid HNO_3

4.29 Phenol

4.30 Phenolphthalein

4.31 Potassium antimony tratate $KsbO.C_4H_4O_6$

4.32 Potassium chloride KCl

4.33 Potassium dichromate $K_2Cr_2O_7$

4.34 Potassium hydrogen phosphate K_2HPO_4

4.35 Potassium iodide KI

4.36 Potassium nitrate KNO_3

4.37 Silver sulphate Ag_2SO_4

4.38 Sodium carbonate Na_2CO_3

4.39 Sodium EDTA Na_2EDTA

4.40 Sodium hydroxide NaOH

4.41 Sodium tungstate $Na_2WO_4.2H_2O$

4.42 Stannous chloride $SnCl_2.2H_2O$

4.43 Sulfuric acid H_2SO_4

4.44 Titanium dioxide TiO_2

4.45 Zinc sulfate $ZnSO_4.7H_2O$

5. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ

5.1 กระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman filter paper No.1)

5.2 กล้องถ่ายรูป และฟิล์มสี

5.3 ช้อนตักสาร (spatula)

5.4 ชุดอุปกรณ์ให้แสงสว่างสาหร่าย

5.5 แท่นวางหลอด (rack)

5.6 พาราฟิล์ม (parafilm)

5.7 ลูกยางดูดสาร (syringe ball)

5.8 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (glass slides and cover slip)

5.9 อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil)

แผนการดำเนินงานและวิธีการวิจัย

1. สำรวจพื้นที่และกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง บริเวณอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ แบ่งออกเป็น 6 จุดเก็บตัวอย่าง (รูป 5) ดังนี้

จุดที่ 1 บ้านป่าติ้ว ม.2 ต.สันโป่ง

จุดที่ 2 บ้านสันโป่ง ม.3 ต.สันโป่ง

จุดที่ 3 บ้านอ้อย ม.1 ต.ห้วยทราย

จุดที่ 4 บ้านห้วยทราย ม.3 ต.ห้วยทราย

จุดที่ 5 บ้านต้นผึ้ง ม.2 ต.เหมืองแก้ว

จุดที่ 6 บ้านทุ่งข้าวเน่า ม.8 ต.เหมืองแก้ว

2. จดบันทึกสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมของพื้นที่เก็บตัวอย่าง เดือนละ 1 ครั้ง

2.1 วัดความเข้มแสง ใช้ Light meter

2.2 วัดอุณหภูมิอากาศ ใช้ Thermometer

3. เก็บตัวอย่างน้ำ ดิน และสาหร่าย

3.1 กำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างประมาณ 1 ไร่ สุ่มเก็บตัวอย่างดิน 10 จุด โดยใช้ soil core sampler หรือช้อนปลูก เก็บตัวอย่างดินความลึก 5 เซนติเมตร จากผิวดิน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสาหร่ายอาศัยอยู่มาก เนื่องจากเป็นบริเวณที่แสงส่องถึง (Wood, 1989) นำตัวอย่างดินมาผสมให้เข้ากันดี

เก็บดินประมาณ 1 กิโลกรัม จากแต่ละจุดเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกนำกลับมาศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการวิเคราะห์ดินและเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป

3.2 เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณใกล้เคียงกับจุดเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 จุด จุดละ 200 ml นำตัวอย่างน้ำมาผสมกัน เก็บใส่ขวดโพลีเอทธีลีน เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารและตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชต่อไป

3.3 เก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพวกยึดเกาะ (benthic algae) สุ่มเก็บตัวอย่างบริเวณผิวดิน บนต้นพืช และสาหร่ายที่ลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ สาหร่ายที่ยึดเกาะใช้มีดแซะตัวอย่างสาหร่ายให้มีพื้นที่ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร เก็บตัวอย่างสาหร่ายที่ได้ในหลอดเก็บตัวอย่าง

4. ศึกษาคุณภาพน้ำและคุณภาพดิน ทางกายภาพและเคมี โดยเริ่มเก็บตัวอย่างจุดที่ 1 เวลาประมาณ 09.00 น. และสิ้นสุดจุดที่ 6 เวลาประมาณ 13.30 น.

- อุณหภูมิของน้ำและดิน ใช้ Thermometer
- ความเป็นกรด-ด่างของน้ำและดิน ใช้ pH meter
- ความขุ่น ใช้ Turbidimeter
- ความชื้น ใช้วิธี Gravimetric method (Pramer and Schmidt, 1964)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ศิริเพ็ญ, 2543 ; APHA, 1998)

- แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N) วิธี Direct Nesslerization
- ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N) วิธี Phenoldisulfonic acid method
- ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (PO_4-P) วิธี Stannous chloride
- ความเป็นด่าง (Alkalinity) วิธี Phenolpthalein methylorange indicator

การวิเคราะห์สารอาหารในดิน (เนาวรัตน์, 2527 ; นงลักษณ์, 2537)

- แอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) วิธี Magnesium oxide-Devada alloy method
- ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO_3-N) วิธี Magnesium oxide-Devada alloy method
- ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (PO_4-P) วิธี Chlorostannous-reduced molybdophosphoric blue colour method

5. การศึกษาสาหร่าย

5.1 แพลงก์ตอนพืช นำน้ำจากนาข้าวมาทำการตกตะกอน โดยใช้ Lugol's solution (ภาคผนวก ค) อัตราส่วนของ Lugol's solution : น้ำตัวอย่าง เท่ากับ 1 : 100 (Boney, 1975) ใช้น้ำตัวอย่าง 500 ml เติม Lugol's solution 5 ml เก็บในที่มืดป้องกันการเสื่อมของ Lugol's solution ทิ้งให้สาหร่ายตกลงมาที่ก้นภาชนะ เวลาประมาณ 15 วัน ดูดน้ำด้านบนทิ้ง เก็บน้ำที่มีตะกอนสาหร่ายอยู่ปริมาตร 10 ml เพื่อตรวจวินิจฉัยชนิดต่อไป

5.2 สาหร่ายยึดเกาะ เก็บสาหร่ายในขวดพลาสติกและใช้ Lugol's solution รักษาสภาพ

5.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายจากดินนาข้าว นำตัวอย่างดินที่เก็บมาทำการเจือจาง ใช้ดินตัวอย่าง 10 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 95 ml ได้สารละลายดิน (soil suspension) เข้มข้น 10^{-1} จากนั้นนำสารละลายนี้ 1 ml ไปเจือจางในหลอดทดลองที่เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงสาหร่ายไว้แล้ว (N-free BG-11 medium, ภาคผนวก ค) ปริมาตร 9 ml ได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-2} ทำเช่นนี้จนกระทั่งได้ความเข้มข้น 10^{-5} หรือ 10^{-6} จึงทำการศึกษาต่อไป

5.3.1 การแยกเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ และการนับ colony นำสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาใส่ในจานเพาะเชื้อ ที่เตรียมอาหารวุ้นไว้แล้วโดยใช้อาหารสูตรเดียวกัน ใช้ความเข้มละ 1 ml จำนวน 2 plate เพื่อเป็นการทำซ้ำ หลังจากนั้นให้แสงสว่างโดยใช้หลอดไฟเรืองแสง (Fluorescent lamp) อุณหภูมิ 32-35 °C เป็นเวลา 3 – 4 สัปดาห์ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ และทำการนับจำนวน colony

5.3.2 การศึกษาปริมาณโดยวิธี Most Probable Number (MPN) (Parmer and Schmidt, 1964) ซึ่งเป็นการประเมินปริมาณสาหร่ายที่อยู่ในดิน โดยการเตรียมอาหารเหลวสูตร BG-11 ใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 9 ml จากนั้นนำสารละลายดินแต่ละความเข้มข้นมาใส่ 1 ml ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2}- 10^{-7} จำนวน 3 ซ้ำ ให้แสงสว่างโดยใช้หลอดไฟเรืองแสง อุณหภูมิ 32-35 °C เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 – 4 สัปดาห์ จึงทำการนับจำนวนหลอดทดลองในความเข้มข้นต่างๆ ที่สาหร่ายเจริญ นำมาคำนวณตามตาราง MPN (ภาคผนวก ค)

5.4 ตรวจวินิจฉัยชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (ลัดดา, 2542 ; Desikachary, 1959 ; Prescott 1975 ; Anagnostidis K. and Komarek J. 1988 ; Komarek J. and Anagnostidis K.1989 ; Anagnostidis K. and Komarek J. 1990 ; Komarek and Anagnostidis, 1998) วัดขนาดสาหร่ายด้วยไมโครมิเตอร์ (micrometer) จดบันทึกลักษณะรูปร่างของสาหร่าย นับสาหร่ายโดยใช้วิธี Drop microtranset method (ศิริเพ็ญ, 2537) และถ่ายภาพสาหร่ายที่พบ

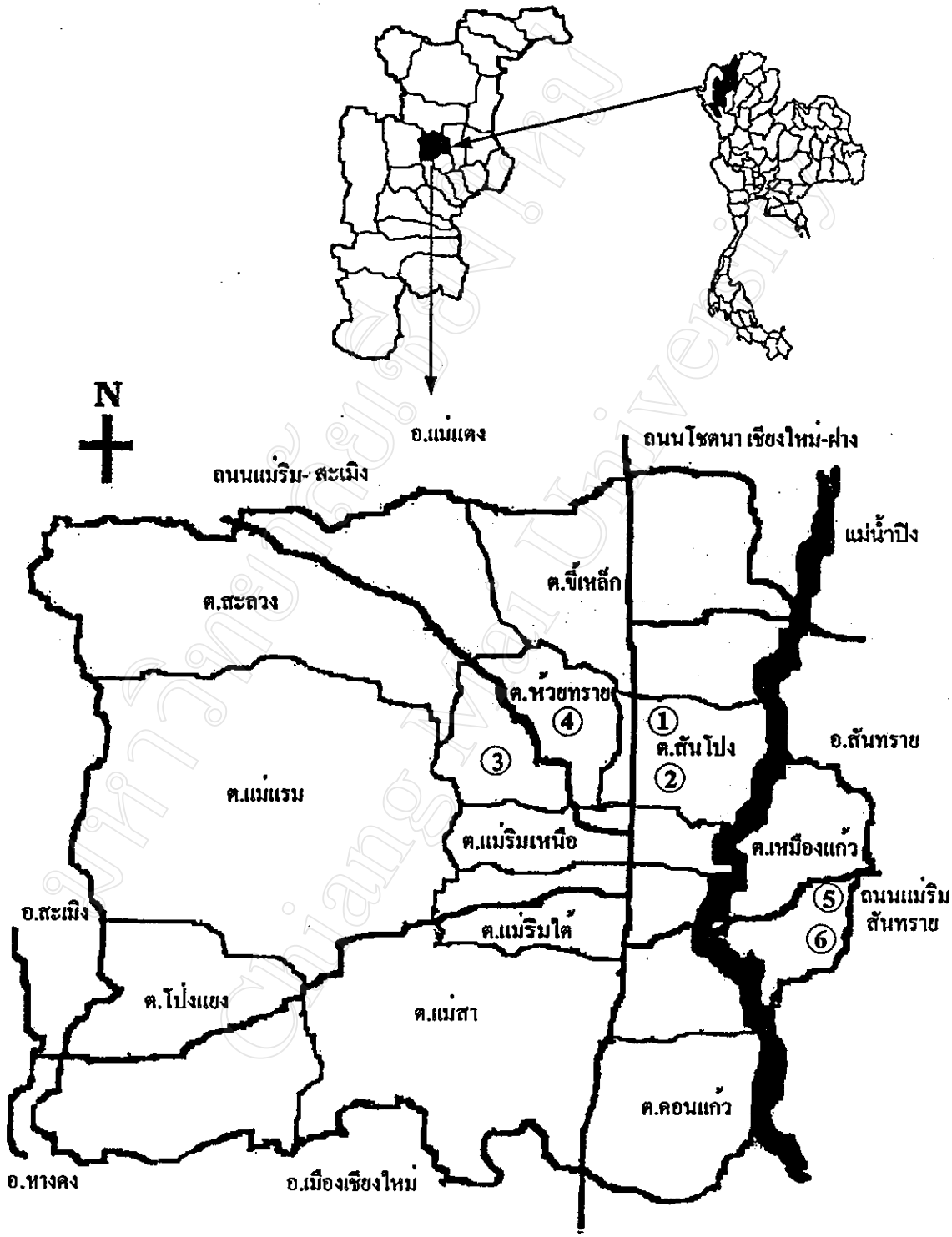
6. หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ และเคมี ที่มีผลต่อชนิด และปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และ Correlation Coefficient

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. นาข้าวบริเวณอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่
2. หน่วยวิจัยแพลงก์ตอนพืชและคุณภาพน้ำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

12 เดือน ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2542 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2543



รูป 5 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่าง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

1 : 57,000