

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์ภาคสนาม

1. ขวดโพลีเอธิลีนเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1 ลิตร
2. ขวด BOD
3. กระป๋องพลาสติกขนาด 60 ml
4. มีดขนาดเล็ก
5. ปากคีบ
6. ไม้เมตร
7. ขวด medical flat (150 ml)
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. velocity meter
10. conductivity meter
11. pH meter
12. ชุดตรวจวัดออกซิเจนละลายน้ำ

1.2 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

1. ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ค่าความขุ่น
2. ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง
3. ชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณสารอาหาร
4. ชุดอุปกรณ์ศึกษาสาหร่ายขนาดใหญ่
5. ชุดอุปกรณ์ศึกษาไดอะตอมพื้นท้องน้ำ

ลักษณะทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 แม่น้ำกก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย (MKK)

พิกัด 19 องศา 54.714 ลิปดาเหนือ 99 องศา 47.108 ลิปดาตะวันออก ความสูงจากระดับน้ำทะเล 401 เมตร ลักษณะจุดเก็บตัวอย่างมีการคมนาคมทางน้ำเพื่อการท่องเที่ยว เนื่องจากบริเวณจุดเก็บตัวอย่างเป็นสถานที่ท่องเที่ยว และยังมีกิจกรรมอื่นๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ เช่น การประมง และการเกษตร บริเวณตลิ่งของจุดเก็บตัวอย่างเป็นหาดหินทอดยาวลงไปสู่แม่น้ำ รวมทั้งมีทรายและกรวดปนอยู่เล็กน้อย จึงเป็นจุดเก็บตัวอย่างที่มีความเหมาะสมในเรื่องของสัณฐานสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการยึดเกาะอย่าง ไคอะตอมพื้นท้องน้ำและสาหร่ายขนาดใหญ่ (ภาพ 2)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 แม่น้ำเหือง อำเภอท่าลี่ จังหวัดเลย (MHG)

พิกัด 17 องศา 43.882 ลิปดาเหนือ 100 องศา 33.071 ลิปดาตะวันออก ความสูงจากระดับน้ำทะเล 736 เมตร เป็นแม่น้ำที่เป็นเส้นกั้นเขตแดนระหว่างประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวบริเวณโดยรอบของจุดเก็บตัวอย่างมีลักษณะเป็นป่าภูเขา มีการถางป่าเพื่อทำการเกษตร ในส่วนของจุดเก็บตัวอย่างพื้นท้องน้ำเป็นก้อนหิน เป็นลำน้ำที่ตื้นมีวัชพืชและไมยราพปกคลุมพื้นที่ค่อนข้างมาก มีกระแสน้ำค่อนข้างแรงเกือบทุกฤดู (ภาพ 2)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 แม่น้ำจิม เขตเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (MNG)

พิกัด 18 องศา 31.457 ลิปดาเหนือ 102 องศา 30.781 ลิปดาตะวันออก ความสูงจากระดับน้ำทะเล 200 เมตร บริเวณตลิ่งของจุดเก็บตัวอย่างเป็นดินละเอียดมีวัชพืชปกคลุม รวมทั้งพื้นท้องน้ำของจุดเก็บตัวอย่างก็เป็นดินละเอียดเช่นเดียวกัน น้ำบริเวณทางด้านเหนือเป็นเขื่อนเก็บและมีการรวมตัวกันของแม่น้ำอีกสายหนึ่งชื่อว่าแม่น้ำลึก โดยรอบของจุดเก็บตัวอย่างเป็นชุมชนและมีการประมงของชาวประชาชนในละแวกนั้น (ภาพ 2)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 แม่น้ำสงคราม อำเภอคำตากล้า จังหวัด นครพนม (MSK)

พิกัด 17 องศา 52.016 ลิปดาเหนือ 103 องศา 46.445 ลิปดาตะวันออก ความสูงจากระดับน้ำทะเล 132 เมตร จุดเก็บตัวอย่างอยู่ปากคลองหน้าดิน พื้นที่ท้องน้ำมีลักษณะเป็นดิน โดยรอบเป็นชุมชนซึ่งนิยมทำนาเกลือสินเธาว์จึงทำให้บริเวณดังกล่าวมีค่าการนำไฟฟ้าที่ค่อนข้างสูงตลอดปี นอกจากนั้นแล้วแม่น้ำสงครามจะมีกระแสน้ำที่ค่อนข้างไหลเอื่อย (ภาพ 2)

จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 แก่งสะพือ แม่น้ำมูล อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัด อุบลราชธานี (MSP)

พิกัด 15 องศา 14.732 ลิปดาเหนือ 105 องศา 14.628 ลิปดาตะวันออก ความสูงจากระดับน้ำทะเล 105 เมตร แม่น้ำมูลเป็นแม่น้ำที่มีความกว้างค่อนข้างมาก มีการคมนาคมทางน้ำไปมาของประชาชนไทย และ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว การประมง และการประกอบกิจการการค้าขาย และร้านอาหารบริเวณริมฝั่งแม่น้ำ บริเวณด้านใต้จุดเก็บตัวอย่างมีเขื่อนกักเก็บน้ำ มีกระแสน้ำค่อนข้างแรง พื้นที่ท้องน้ำเป็นลานหิน และก้อนหินขนาดใหญ่ (ภาพ 2)



ภาพ 1 แผนที่ประเทศไทยแสดงจุดเก็บตัวอย่างของลำน้ำสาขาในแม่น้ำโขง

- (1) จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 แม่น้ำกก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย
- (2) จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 แม่น้ำเหือง อำเภอท่าลี่ จังหวัดเลย
- (3) จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 แม่น้ำจัน เขตเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
- (4) จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 แม่น้ำสงคราม อำเภอคำตากล้า จังหวัดนครพนม
- (5) จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 แม่น้ำมูล อำเภอพิบูลย์มังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี



ภาพ 2 ลักษณะทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง

- (1) จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 แม่น้ำกก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย
- (2) จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 แม่น้ำเหือง อำเภอท่าลี่ จังหวัดเลย
- (3) จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 แม่น้ำจิม เขตเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
- (4) จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 แม่น้ำสงคราม อำเภอลำดัก จังหวัดนครพนม
- (5) จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 แม่น้ำมูล อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี

2.2 การเก็บน้ำตัวอย่างและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในภาคสนาม

ทำการเก็บตัวอย่างตามจุดที่กำหนดไว้ เพื่อเป็นตัวแทนในแต่ละฤดู คือ ฤดูร้อน ฤดูฝน และ ฤดูหนาว โดยเก็บตัวอย่างฤดูกาลละหนึ่งครั้ง โดยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างทำการศึกษาสภาพแวดล้อมโดยรอบจุดเก็บตัวอย่าง รวมทั้งศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีบางประการ ดังนี้

- 2.2.1 วัดพิกัดทางภูมิศาสตร์
- 2.2.2 วัดค่าความสูงจากระดับน้ำทะเล
- 2.2.3 วัดระดับความลึกของจุดเก็บตัวอย่างโดยใช้ไม้เมตร
- 2.2.4 วัดอุณหภูมิของน้ำและอากาศ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์
- 2.2.5 วัดความเร็วกระแสน้ำ โดยใช้ velocity meter
- 2.2.6 ศึกษาลักษณะของพื้นที่ท้องน้ำ ตามวิธีของ Robert (1996)
- 2.2.7 วัดค่าการนำไฟฟ้า โดยใช้ conductivity meter
- 2.2.8 วัด pH ของน้ำ โดยใช้ pH meter
- 2.2.9 วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen:DO) ตามวิธี iodometric แบบ azide modification method (Greenberg *et al.*, 1992)

2.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมีในห้องปฏิบัติการ (Greenberg *et al.*, 1992)

- 2.3.1 วัดความเป็นด่างของน้ำ โดยใช้ phenolphthalein methyl orange indicator method
- 2.3.2 วัดปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (biochemical oxygen demand:BOD) ตามวิธี iodometric แบบ azide modification method
- 2.3.3 วัดค่าความขุ่นของน้ำโดยใช้ spectrophotometer รุ่น DR 2010 ของบริษัท Hach
- 2.3.4 ตรวจวัดปริมาณสารอาหาร โดยใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีเฉพาะกับ spectrophotometer รุ่น DR 2010 ของบริษัท Hach ซึ่งได้แก่
 - Soluble reactive phosphorus หรือ ออร์โธฟอสเฟต โดย ascorbic acid method
 - ไนเตรท ไนโตรเจน โดยวิธี cadmium reduction
 - แอมโมเนียม ไนโตรเจน โดยวิธี nesslerization

ซึ่งดำเนินการตาม Greenberg *et al.* (1992)

2.3.5 หาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยวิธี multiple tube (Greenberg *et al.*, 1992)

2.4 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อการศึกษาโดย วิธีดังนี้

ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะกำหนดความยาวของลำน้ำบริเวณริมฝั่งเป็นระยะ 20 เมตร ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างสาหร่ายตามลักษณะพื้นที่ท้องน้ำแบบต่างๆ เช่น ก้อนหิน กรวด และบริเวณข้างเคียงโดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดใหญ่และไดอะตอมพื้นท้องน้ำชนิดละ 5 ซ้ำ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 เก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดใหญ่ โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มในพื้นที่ที่กำหนดไว้ตามพื้นที่ท้องน้ำโดยสาหร่ายขนาดใหญ่ที่เก็บจะมีลักษณะเป็นเมือก เส้นสาย ทลัสส์ หรือเกาะตัวเป็นแพ ใช้เข็มคีบและมีดขูดมาจากพื้นผิวที่เกาะติด บรรจุตัวอย่างสาหร่ายลงในกระป๋องพลาสติก 2 กระป๋อง กระป๋องที่หนึ่งเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส กระป๋องที่สองคงด้วย 2% glutaraldehyde เพื่อนำไปวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการและประเมินความมากมายของสาหร่ายขนาดใหญ่ที่พบโดยปรับปรุงจาก Enwistle (1989) โดยจัดระดับความมากมายดังนี้ หากตรวจพบสาหร่ายชนิดนั้นน้อยมาก แทนด้วยเครื่องหมาย ดังนี้

- + แทนปริมาณสาหร่ายที่พบน้อยมาก
- ++ แทนปริมาณสาหร่ายที่พบบ้างแต่ไม่มาก
- +++ แทนปริมาณสาหร่ายที่พบได้ทั่วไป
- ++++ แทนปริมาณสาหร่ายที่พบมากที่สุด

2.4.2 ไดอะตอมพื้นท้องน้ำเลือกเก็บตัวอย่างไดอะตอมชนิดที่เกาะอยู่บนหิน (epilithic diatom) โดยเลือกก้อนหินที่มีเมือกสีน้ำตาลเข้มหรือมีสีดำซึ่งมีไดอะตอมพื้นท้องน้ำอยู่เป็นจำนวนมาก โดยสุ่มเลือกมาประมาณ 9-10 ก้อนให้ครอบคลุมพื้นที่การเก็บตัวอย่าง นำแผ่นพลาสติกใสที่เจาะรูเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสพื้นที่ 3x3 เซนติเมตร ทาบลงบนหินแล้วใช้แปรงสีฟันใหม่ปัดคราบสีน้ำตาลเข้มบนก้อนหินภายในพื้นที่ดังกล่าวแล้วชะด้วยน้ำแล้วเก็บคราบสีน้ำตาลที่ปัดออกมาในกระป๋องพลาสติก (Rott, 1997)

2.5 การศึกษาสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ มีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 ทำการศึกษาสาหร่ายขนาดใหญ่โดยนำตัวอย่างสาหร่ายขนาดใหญ่มาทำการถ่ายภาพ และวินิจฉัยชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยใช้หนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้อง เช่น Desikachary (1959), Entwistle (1989) และ Kumano (2002) เป็นต้น

2.5.2 การทำความสะอาดฟอสฟอรัสของโคอะตอมพื้นท้องน้ำ โดยทำการต้มตัวอย่างกับ HNO_3 เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารออกซิไดซ์ คือ H_2O_2 ลงไปแล้วต้มต่ออีก 15 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างที่ทำความสะอาดแล้วมาทำให้เป็นกลางโดยใช้น้ำกลั่นจากนั้นนำมาเตรียมเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้ naphrax เป็น mounting reagent (Barber and Haworth, 1981) จากนั้นนำมาศึกษาด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทำการถ่ายรูปและวินิจัยชนิดโดยใช้หนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้อง เช่น Barber and Haworth (1981), Lange-Bertalot (2001) และ Kelly and Haworth (2002) เป็นต้น

2.5.3 การวิเคราะห์ข้อมูล โดยนำข้อมูลทางด้านชนิด ปริมาณสาหร่าย และคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ บางประการมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MVSP (multivariate statistic package) ซึ่งเป็นโปรแกรมวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของสาหร่ายขนาดใหญ่และโคอะตอมกับคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพเคมีและชีวภาพเพื่อหาชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำได้ รวมทั้งหาความแตกต่างของฤดูกาลและจุดเก็บตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16

2.6 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

2.6.1 ลำน้ำสาขาของแม่น้ำโขงในส่วนของประเทศไทย และประเทศลาวบางส่วน

2.6.2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

12 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2550 – เมษายน 2551