บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง GF/C
2. กระบอกเก็บน้ำตัวอย่าง ขนาด 2 ลิตร
3. กระบอกตวง ขนาด 10 มิลลิลิตร
4. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
5. กระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
6. ขันน้ำพลาสติก
7. ขวดบีโอดี
8. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
9. ขวดสีชา ขนาด 150 มิลลิลิตร
10. คีมคีบ
11. จานวัดความโปร่งแสง
12. ตลับเมตร
13. ตาข่ายแพลงก์ตอนขนาดช่องตา 10 ไมโครเมตร
14. เทอร์โมมิเตอร์
15. บิวเรต
16. บีกเกอร์
17. ปิเปต
18. แผ่นพาราฟิล์ม
19. แผ่นสไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
20. หลอดหยด
21. หลอดทดลองขนาดกลางพร้อมที่วางหลอดทดลอง
22. อะลูมิเนียมฟรอยด์
23. Chamber
24. Grid

25. Inverted microscope
26. Micrometer
27. Moist chamber

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
3. สารละลายกรดไนตริกเข้มข้นหรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.02 นอร์มัล
5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.025 นอร์มัล
6. สารละลายเมธานอล ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์
7. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต
8. สารละลายลูกอล
9. สารละลายอัคคาไลน์ไอโอไดด์เอไซด์
10. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์
11. อินดิเคเตอร์ ได้แก่ น้ำแป้ง, ฟีนอล์ฟธาลีน, เมธิลออร์เรนจ์

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ
2. กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด
3. เครื่องชั่งน้ำหนัก
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
5. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง
7. เครื่องเหวี่ยง
8. ชุดกรองสุญญากาศ
9. ตู้บ่มบีโอดี
10. ตู้ดูดควัน
11. เครื่องกำเนิดความร้อน

12. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

วิธีการทดลอง

3.1 การสำรวจแหล่งน้ำ การกำหนดจุดเก็บตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

3.1.1 สำรวจแหล่งน้ำ

การสำรวจสระน้ำบริเวณภายในพื้นที่พิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีเพื่อที่จะกำหนดจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 5 จุด (ดังภาพที่ 1,2,3,4 และ 5)

3.1.2 กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง

3.1.2.1 จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 (สระน้ำขนาดใหญ่) มีการเจริญเติบโตของบัวสายพันธุ์ซันไรส์ (*Nymphaea* spp. (hybrid)) และสายพันธุ์มังคลอุบล (*Nymphaea* spp.)

3.1.2.2 จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 (สระน้ำขนาดกลาง) มีการเจริญเติบโตของบัวสายพันธุ์ *Perry five opal* สายพันธุ์ Colorado และสายพันธุ์ *N.Meacicana*

3.1.2.3 จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 (สระน้ำขนาดเล็ก) มีการเจริญเติบโตของบัวสายสีแดง (Nymphaeaceae)

3.1.2.4 จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 (สระน้ำขนาดเล็ก) มีการเจริญเติบโตของบัวสายสีชมพู (Nymphaea “Chompucelon”)

3.1.2.5 จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 (สระน้ำขนาดเล็ก) มีการเจริญเติบโตของบัวสายสีขาว (Nymphaeaceae)

3.1.3 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

3.1.3.1 การเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช

- เก็บเพื่อวินิจฉัยชนิดและศึกษาความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชที่จุดกึ่งกลางน้ำของสระบัวโดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอนขนาดความถี่ 10 ไมโครเมตร ตวงให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชาเพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ

- เก็บเพื่อศึกษาหาปริมาณแพลงก์ตอนพืช โดยการเก็บตัวอย่างที่จุดกึ่งกลางน้ำของสระบัวใส่ในขวดสีชาและเก็บรักษาตัวอย่างแพลงก์ตอนด้วยสารละลายลูกอล 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ

3.1.3.2 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายยึดเกาะ

- เก็บเพื่อวินิจฉัยชนิด ศึกษาความหลากหลายและศึกษาหาปริมาณสาหร่ายยึดเกาะกับพืชน้ำ คือ บัวและสาหร่ายหางกระรอก โดยใช้หลอดดูดสาหร่ายที่ยึดเกาะตามก้านบัวจุดละ

20 มิลลิลิตรใส่ขวดสีชาโดยเก็บบริเวณขอบสระทั้งหมด 3 จุดผสมกันจนได้ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และใช้หลอดดูดเก็บตัวอย่างสาหร่ายยึดเกาะตามช่อของสาหร่ายหางกระรอกในบริเวณขอบสระทั้งหมด 3 จุดใส่ขวดสีชาผสมกันจนได้ปริมาตร 60 มิลลิลิตรเช่นกัน และเก็บรักษาด้วยสารละลายลูกอล 2 มิลลิลิตรเพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ

3.1.4 การเก็บตัวอย่างน้ำ

- เก็บเพื่อศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ จากจุดเก็บตัวอย่างน้ำทั้ง 5 จุดเก็บตัวอย่าง จุดละ 3 ซ้ำ การเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะใช้ขวดพลาสติกขนาด 2 ลิตร ตวงน้ำใส่ให้เต็มปิดฝาให้สนิทเพื่อนำไปตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ

3.2 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ

3.2.1 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ ณ จุดเก็บตัวอย่าง มีวิธีการดังนี้

3.2.1.1 วัดอุณหภูมิน้ำ โดยใช้เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าและปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ (Conductivity/TDS meter) ของ HACH Model Senlon 5

3.2.1.2 วัดค่าการนำไฟฟ้า โดยใช้เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าและปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ (Conductivity/TDS meter) ของ HACH Model Senlon 5

3.2.1.3 วัดความเป็นกรด -ด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด -ด่าง (pH meter) ของ WTW Model pH 330

3.2.1.4 วัดความลึกที่แสงสว่างส่องถึง โดยใช้จานวัดความโปร่งแสง (Secchi disc)

3.2.1.5 ลักษณะของสี โดยใช้ตาในการสังเกต

3.2.1.6 ความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายในน้ำ (TDS) โดยใช้เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าและปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ (Conductivity/TDS meter) ของ HACH Model Senlon 5

3.2.2 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีบางประการ ในห้องปฏิบัติการ มีวิธีการดังนี้

3.2.2.1 ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) (APHA, AWWA and WPCF, 1992) วิเคราะห์โดยวิธี Indicator method

3.2.2.2 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen) (APHA, AWWA and WPCF, 1992) วิเคราะห์โดยวิธี Azide modification of the Winkler method

3.2.2.3 ปริมาณความต้องการออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand) (APHA, AWWA and WPCF, 1992) วิเคราะห์โดยวิธี 5 Day incubation and Azide modification of the Winkler method

3.2.2.4 ปริมาณออร์โธฟอสเฟต (Orthophosphate) (APPH, AWWA and WPCF, 1992) วิเคราะห์โดยวิธี Ascorbic acid method โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของ HACH Model DR/2400

3.2.2.5 ปริมาณแอมโมเนีย - ไนโตรเจน (Ammonia-Nitrogen) (APPH, AWWA and WPCF, 1992) วิเคราะห์โดยวิธี Nesslerization method โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของ HACH Model DR/2400

3.2.2.6 ปริมาณไนเตรต - ไนโตรเจน (Nitrate-Nitrogen) (APPH, AWWA and WPCF, 1992) วิเคราะห์โดยวิธี Nesslerization method โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของ HACH Model DR/2400 โดยทำการวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีเหล่านี้พารามิเตอร์ละ 3 ซ้ำ

3.2.2.7 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ (Nusch, 1975 ดัดแปลงโดย ยุวดีและฉมาภรณ์ , 2538)

3.3 การศึกษาชนิดและปริมาณของสาหร่าย

3.3.1 การศึกษาแพลงก์ตอนพืช

3.3.1.1 วินิจฉัยหาชนิดของแพลงก์ตอนพืช โดยใช้ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชที่เก็บจากจุดเก็บตัวอย่างมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound Microscope และจากภาพถ่ายซึ่งถ่ายภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound Microscope โดยใช้หนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้อง เช่น Prescott (1970), Lenzenweger (1996, 1997 and 1999), Williamson (1998), Coesel (2000), Kanetsuna (2002), Komárek and Anägnostidis (2007), Wolowski and Hindák (2005), Wolowski (1998) และ John *et al.* (2002)

3.3.1.2 การศึกษาปริมาตรของสาหร่ายกลุ่มแพลงก์ตอน โดยการวัดปริมาตรสาหร่ายแต่ละชนิดตามวิธีของ Rott (1981)

3.3.2 การศึกษาสาหร่ายยึดเกาะ

3.3.2.1 วินิจฉัยหาชนิดของสาหร่ายยึดเกาะ โดยการถ่ายรูป และหนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้องเช่น Lenzenweger (1996, 1997 and 1999), Williamson (1998), Coesel (2000), Kanetsuna (2002), Komárek and Anägnostidis (2007) ส่วนการศึกษาสาหร่ายกลุ่มไดอะตอมนั้น

นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาทำความสะอาดไดอะตอมโดยทำการต้มตัวอย่างกับกรดไนตริกเข้มข้นหรือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 15 นาทีแล้วเติมสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ต้มต่ออีก 15 นาที จากนั้นจึงปรับค่า ความเป็นกรด – ด่างให้เป็นกลางโดยใช้น้ำกลั่น

3.3.2.2 ทำการถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ scanning electron microscope (SEM) เพื่อวินิจฉัยถึงระดับชนิดต่อไปโดยใช้หนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้องเช่น Lange-Bertalot (1993, 1995, 2001 and 2007), Baber and Haworth (1981), Vyverman (1991), margarita (1994), และ Rott (1995)

3.4 การคัดแยกสาหร่ายและการเพาะเลี้ยง

3.4.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ใช้อาหารสูตร BG-11 medium สำหรับสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน อาหารสูตร Jaworski's medium สำหรับสาหร่ายกลุ่มสีเขียว อาหารแข็งและอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงสาหร่าย (algal agar และ algal broth) สำหรับสาหร่ายทั่วไป โดยเตรียมทั้งอาหารเหลวและอาหารแข็ง อาหารเหลวจะเตรียมใส่หลอดทดลอง ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร ส่วนอาหารแข็งจะเตรียมใส่จานเพาะเชื้อ และหลอดใส่อาหารวุ้นเอียง

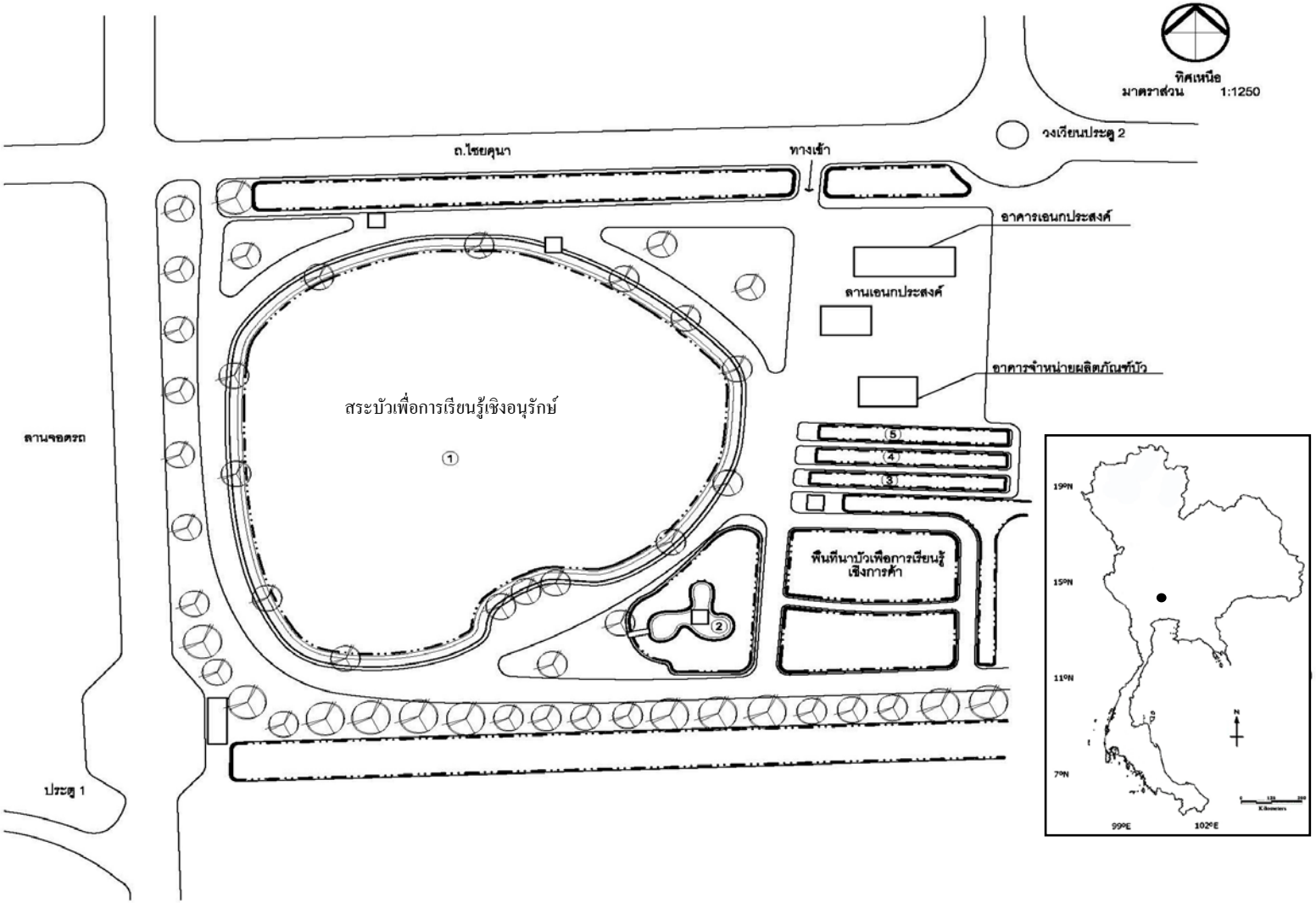
3.4.2 การคัดแยกสาหร่ายและการเพาะเลี้ยง

นำน้ำตัวอย่างจากจุดเก็บตัวอย่างต่างๆ ภายในพิพิธภัณฑ์บัวมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี มาทำการแยกสาหร่ายโดยวิธี micro pipette technique โดยทำการแยกสาหร่ายลงในอาหารชนิดต่างๆ ตามข้อ 13.4.1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่ชั้นเพาะเลี้ยงปรับอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ที่ ความเข้มแสง 0.84-1.20 กิโลลักซ์ จนมีการเจริญของสาหร่าย

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.1 หาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS วิเคราะห์การหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation, r) ชนิด Two-tailed

3.4.2 หาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ โดยใช้โปรแกรม Multivariate Statistical Package (MVSP) เวอร์ชัน 3.1



ภาพที่1 แสดงแผนที่จุดเก็บตัวอย่างทั้งหมดภายในพื้นที่พิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 2 แสดงจุดเก็บตัวอย่าง ที่ 1 ของสระน้ำภายใน พื้นที่พิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 3 แสดงจุดเก็บตัวอย่าง ที่ 2 ของสระน้ำภายใน พื้นที่พิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 4 แสดงจุดเก็บตัวอย่างที่ 3 ของสระน้ำภายในพื้นที่พิพิธภัณฑ์บัวมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 5 แสดงจุดเก็บตัวอย่างที่ 4 ของสระน้ำภายในพื้นที่พิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 6 แสดงจุดเก็บตัวอย่างที่ 5 ของสระน้ำภายในพื้นที่พิพิธภัณฑ์บัวมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

3.5.1 สระบัวพิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

3.5.2 ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

3.6 ระยะเวลาที่ใช้

ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2554