บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

3.1.1 แผนการเก็บตัวอย่างน้ำ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำไว้ 3 สถานีตามลักษณะภูมิประเทศอ่างเก็บน้ำ ได้แก่ อ่างสมง อ่างบ้านนาและบริเวณหน้าสันเขื่อน (ดูรูปที่ 3.1) โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี และได้เริ่มเก็บตัวอย่างน้ำตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2528 จนถึงเดือนมิถุนายน 2529

3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ

การเก็บตัวอย่างน้ำได้เก็บที่ระดับความลึกจากผิวน้ำลงไป 1 เมตร ตามกำหนดของ สวล. (38) ตัวอย่างน้ำที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีนั้นได้เก็บแยกจากตัวอย่างน้ำที่ใช้สำหรับทำสาหร่ายวิเคราะห์ สำหรับตัวอย่างน้ำที่ใช้สำหรับสาหร่ายวิเคราะห์นั้นได้จากการผสม (composite) ตัวอย่างน้ำที่เก็บได้จาก 3 สถานีในปริมาตรที่เท่ากัน ตัวอย่างน้ำทั้งหมดได้ทำการเก็บรักษาตามวิธีที่กำหนดไว้ใน Standard Methods (14) ซึ่งมีรายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก

พารามิเตอร์บางตัว ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าอัลคาไลนิตี (alkalinity) ได้ทำการวิเคราะห์ในสนามพร้อมกันไปในขณะเก็บตัวอย่างน้ำทุกครั้ง

3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทางเคมี

พารามิเตอร์ที่เลือกทำการวิเคราะห์ได้ครอบคลุมถึงสารอาหารหลัก (major nutrient) ได้แก่ ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน เป็นต้น สารอาหารรอง (minor nutrient)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 แผนที่แสดงตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างน้ำในอ่างเก็บน้ำภูมิพล (มาตราส่วน 1 : 250,000)

ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ เป็นต้น และสารอาหารปริมาณน้อย (trace nutrient) ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส เป็นต้น ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดของพารามิเตอร์ทั้งหมดที่ได้ทำการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ และวิธีการวิเคราะห์ของแต่ละพารามิเตอร์ด้วย

3.2.1 การวิเคราะห์คลอไรด์

ก. สารเคมี

1. สารละลาย K_2CrO_4 : ละลาย K_2CrO_4 50 g. ในน้ำกลั่น เติมสารละลาย $AgNO_3$ ไปจนได้ตะกอนสีแดง นำมากรองหลังจากตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง และทำให้เป็น 1 L. ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายมาตรฐาน $AgNO_3$, 0.0141 N : ละลาย $AgNO_3$ 2.395 g. ในน้ำกลั่น และทำให้เป็น 1,000 mL. เทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐาน NaCl ตามวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีน้ำตาล

3. สารละลายมาตรฐาน NaCl, 0.0141 N : ละลาย NaCl 824.0 mg. (อบแห้งแล้วที่ 140 องศาเซลเซียส) ในน้ำกลั่น และทำให้เป็น 1,000 mL.

ข. วิธีวิเคราะห์

ใช้ตัวอย่างน้ำ 100 mL. เติมสารละลาย K_2CrO_4 1.0 mL. และไตเตรตกับสารละลาย $AgNO_3$ จนได้สีเหลืองส้ม ใช้น้ำกลั่น 100 mL. สำหรับทำแบลงค์

3.2.2 การวิเคราะห์ซัลเฟต

ก. เครื่องมือ

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก

2. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่อง Spectronic 88 ของบริษัท Bausch & Lomb

ตารางที่ 3.1 แสดงวิธีวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
chloride	Argentometric method
sulfate	Turbidimetric method
ammonia	Distillation and nesslerization method
nitrite	Automated sulfanilic acid-NED dihydrochloride coupling method
nitrate	Automated copper sulfate-hydrazine reduction method
orthophosphate	Ascorbic acid reduction method
calcium	Flame atomic absorption spectrophotometric method
magnesium	Flame atomic absorption spectrophotometric method
sodium	Flame emission spectrometric method
potassium	Flame emission spectrometric method
iron	Chelation with APDC and extraction with MIBK method
manganese	Chelation with APDC and extraction with MIBK method
copper	Chelation with APDC and extraction with MIBK method
Zinc	Chelation with APDC and extraction with MIBK method

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ : ละลาย $MgCl_2 . 6H_2O$ 30 g. $CH_3COONa.3H_2O$ 5 g., KNO_3 1 g., Na_2SO_4 0.111 g. และ CH_3COOH (99%) ในน้ำกลั่น 500 mL. และทำให้เป็น 1,000 mL.

2. $BaCl_2$ (ขนาด 0.2-0.3 mesh)

3. สารละลายมาตรฐานซัลเฟต : ละลาย anhyd. Na_2SO_4 0.1479 g. ในน้ำกลั่นและทำให้เป็น 1,000 mL.

ค. วิธีวิเคราะห์ ถ่ายตัวอย่างน้ำ 100 mL. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL. เติมสารละลายซัลเฟอร์ 20 mL, และนำไปตั้งบนเครื่องกวนแม่เหล็ก เติมผง $BaCl_2$ 1 ช้อน (ความจุ 0.2-0.3 mL.) กวนด้วยความเร็วคงที่เป็นเวลา 60 $\pm$ 2 วินาที นำไปวัดค่าแอบซอบแบนซ์ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าความยาวคลื่น 420 nm. โดยวัดในช่วง 5 $\pm$ 0.5 นาที เตรียมกราฟเปรียบเทียบ (calibration curve) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 0-10 mg/L และทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.2.3 การวิเคราะห์แอมโมเนีย

ก. เครื่องมือ

1. ชุดกลั่น : ประกอบด้วยขวดเคล์ดาล (Kjeldahl flask) ขนาด 750 mL. เครื่องควบแน่น ขนาด 30 cm.

2. เตาหลุม

3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง : รุ่น PHM-83 ของ Radiometer

4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ : รุ่น Spectronic 88 ของ Bausch & Lomb

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. สารเคมี

1. สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ละลาย $Na_2B_4O_7.10H_2O$ 4.75 g. ในน้ำกลั่น 500 mL. เติมสารละลาย NaOH 0.1 N 88 mL. แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 L.

2. สารละลาย NaOH, 6N

3. สารละลาย boric acid : ละลาย H_3BO_3 20 g. ในน้ำกลั่นและทำให้เป็น 1 L.

4. Nessler reagent : ละลาย NaOH 160 g. ในน้ำกลั่น 500 mL. ละลาย HgI 100 g. และ KI 70 g. ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยแล้วค่อย ๆ เทสารผสมลงในสารละลาย NaOH 160 g. ในน้ำกลั่น 500 mL. ละลาย HgI_2 100 g. และ KI 70 g. ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยแล้วค่อย ๆ เทสารผสมลงในสารละลาย NaOH (เย็นแล้ว) อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนไปด้วย แล้วทำให้เป็น 1 L.

5. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย : ละลาย NH_4Cl (อบแห้งแล้วที่ 100 องศาเซลเซียส) 3.819 g. ในน้ำกลั่น และทำให้เป็น 1,000 mL.

ค. วิธีวิเคราะห์ ถ่ายตัวอย่างน้ำ 500 mL. ลงในขวดเคลดาล เติมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 25 mL. ปรับ pH ด้วยเครื่องวัด pH ให้ได้ 9.5 โดยใช้สารละลาย 6N NaOH นำไปกลั่นโดยให้อัตราการกลั่นอยู่ในช่วง 6-10 mL./นาที ใช้สารละลาย boric acid เป็นสารรองรับของเหลวที่กลั่นได้ กลั่นจนได้ของเหลวที่กลั่นได้อย่างน้อย 200 mL. ถ่ายของเหลวที่กลั่นได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 mL. และปรับปริมาตร ปิเปตสารละลายนี้ 50 mL. ลงในขวดรูปชมพู่ เติม Nessler reagent ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัดค่าแอบซอบแบนซ์ที่ความยาวคลื่น 425 nm. เตรียมกราฟเปรียบเทียบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.20 mgN/L และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดังข้างต้นทุกประการ

ข. สารเคมี

1. สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ละลาย $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 4.75 g. ในน้ำกลั่น 500 mL. เติมสารละลาย NaOH 0.1 N 88 mL. แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 L.

2. สารละลาย NaOH, 6N

3. สารละลาย boric acid : ละลาย H_3BO_3 20 g. ในน้ำกลั่นและทำให้เป็น 1 L.

4. Nessler reagent : ละลาย NaOH 160 g. ในน้ำกลั่น 500 mL. ละลาย HgI 100 g. และ KI 70 g. ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยแล้วค่อย ๆ เทสารผสมลงในสารละลาย NaOH 160 g. ในน้ำกลั่น 500 mL. ละลาย HgI_2 100 g. และ KI 70 g. ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยแล้วค่อย ๆ เทสารผสมลงในสารละลาย NaOH (เย็นแล้ว) อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนไปด้วย แล้วทำให้เป็น 1 L.

5. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย : ละลาย NH_4Cl (อบแห้งแล้วที่ 100 องศาเซลเซียส) 3.819 g. ในน้ำกลั่น และทำให้เป็น 1,000 mL.

ค. วิธีวิเคราะห์ ถ่ายตัวอย่างน้ำ 500 mL. ลงในขวดเคล์ดาล เติมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 25 mL. ปรับ pH ด้วยเครื่องวัด pH ให้ได้ 9.5 โดยใช้สารละลาย 6N NaOH นำไปกลั่นโดยให้อัตราการกลั่นอยู่ในช่วง 6-10 mL./นาที ใช้สารละลาย boric acid เป็นสารรองรับของเหลวที่กลั่นได้ กลั่นจนได้ของเหลวที่กลั่นได้อย่างน้อย 200 mL. ถ่ายของเหลวที่กลั่นได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 mL. และปรับปริมาตร ปิเปตสารละลายนี้ 50 mL. ลงในขวดรูปชมพู่ เติม Nessler reagent ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัดค่าแอบซอบแบนซ์ที่ความยาวคลื่น 425 nm. เตรียมกราฟเปรียบเทียบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.20 mgN/L และทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดังข้างต้นทุกประการ

3.2.4 การวิเคราะห์ไนไตรต์และไนเตรต

กรองตัวอย่างน้ำด้วยแผ่นกรองใยแก้ว (GF/C) แล้วนำไปวิเคราะห์หาไนไตรต์และไนเตรตด้วยเครื่อง Automated Analyzer (Chemlab MK 3)

3.2.5 การวิเคราะห์ออโธฟอสเฟต

ก. เครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ : Spectronic 88 ของ Bausch & Lomb

ข. สารเคมี

1. H_2SO_4, 5 N : เจือจาง H_2SO_4 เข้มข้น 70 mL. ให้เป็น 500 mL. ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลาย K (SbO) C_4H_4O : ละลาย $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ 1.3715 g. ด้วยน้ำกลั่น 400 mL. ในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 mL. แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 mL.

3. สารละลาย $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$: ละลาย $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 20 g. ในน้ำกลั่น 500 mL.

4. สารละลาย ascorbic acid, 0.01 โมลาร์ : ละลาย ascorbic acid 1.76 g. ในน้ำกลั่น 100 mL. สารละลายนี้เก็บได้นาน 7 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. combined reagent : ผสมสารเคมีดังข้างต้นตามสัดส่วนดังนี้ สำหรับการเตรียม combined reagent 100 mL. : 5N H_2SO_4 50 mL., สารละลาย $K(SbO)C_4H_4O$ 5 mL., สารละลาย $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 15 mL. และสารละลาย ascorbic acid 30 mL. สารละลายผสมนี้เก็บได้นาน 4 ชั่วโมง

6. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต : ละลาย anhyd. KH_2PO_4 219.5 mg. ในน้ำกลั่น และทำให้เป็น 1,000 mL.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. วิธีวิเคราะห์ กรองตัวอย่างน้ำผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอน (Whatman, membrane filter, CN 7184-004) ปิเปตตัวอย่างน้ำที่กรองแล้วลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 mL. หยด phenolphthalein 1 หยด ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นให้หยด 5N H_2SO_4 ทีละหยดจนกระทั่งสีหายไป เติม combined reagent 8.0 mL. และผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าแอบซอบแบนซ์ที่ความยาวคลื่น 880 nm. หลังจากทิ้งไว้ 10 นาที แต่อย่าให้เกิน 30 นาที เตรียมกราฟเปรียบเทียบจากสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.200 mgP/L และดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างทุกประการ (แต่ไม่ต้องกรองสารละลายมาตรฐาน)

3.2.6 การวิเคราะห์แคลเซียมและแมกนีเซียม

ก. เครื่องมือ

1. อะตอมมิกแอบซอบชั่นสเปกโตรโฟมิเตอร์ : Perkim-Elemer Model 4000

2. เครื่องผสมแบบหมุนวน (vortex mixer)

ข. สารเคมี

1. สารละลาย lanthanum : ละลาย La_2O_3 58.65 g. ใน HCl เข้มข้น 250 mL. โดยเติมกรดลงไปช้า ๆ จนกระทั่งละลายหมด และทำเป็น 1,000 mL. ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายมาตรฐานแคลเซียม : BDH Chemical Ltd., Spectrosol grade (Product No. 14136) ความเข้มข้น 1,000 mg./L.

ค. วิธีวิเคราะห์ ใช้ตัวอย่างน้ำที่กรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอนแล้ว 10 mL. ถ่ายลงในหลอดทดสอบขนาด 15 X 120 mm. เติมสารละลาย lanthanum 1 mL. ผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน นำไปวัดแคลเซียมและแมกนีเซียมโดยตรงจากเครื่องอะตอมมิกแอบซอบชั่นฯ ที่ความยาวคลื่น 422.7 และ 285.2 nm. ตามลำดับ โดยใช้อากาศ/ก๊าซอะเซทีลีนเป็นเชื้อเพลิง

3.2.7 การวิเคราะห์โซเดียมและโปแตสเซียม

ก. เครื่องมือ : เช่นเดียวกับข้อ 3.2.6 ก. 1

ข. สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียม : BDH, Spectrosol grade (Product No. 14148) ความเข้มข้น 1,000 mg/L

2. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียม : BDH, Spectrosol grade (Product No. 14146) ความเข้มข้น 1,000 mg/L

ค. วิธีวิเคราะห์ นำตัวอย่างน้ำที่กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอนไปวัดค่าโซเดียมและโปแตสเซียมได้โดยตรงจากเครื่องอะตอมมิกแอบซอบชั่นฯ ที่ได้ปรับให้มาทำงานในแบบ (mode) เฟลมอีมิชชั่น (flame emission) โดยวัดที่ความยาวคลื่น 589.0 และ 766.5 nm. ตามลำดับ โดยใช้อากาศ/ก๊าซอะเซทีลีนเป็นเชื้อเพลิง

3.2.8 การวิเคราะห์เหล็ก ทองแดง และสังกะสี

ก. เครื่องมือ : เช่นเดียวกับข้อ 3.2.6 ก. 1

ข. สารเคมี

1. methyl isobutyl ketone (MIBK)

2. สารละลาย ammonium pyrolidine dithiocarbamate : ละลาย APDC 4 g. ในน้ำกลั่น 100 mL. ทำให้บริสุทธิ์โดยเขย่ากับ MIBK โดยใช้ปริมาตรที่เท่ากัน

3. สารละลายมาตรฐานเหล็ก : BDH, Spectrosol grade (Product No. 14140) ความเข้มข้น 1,000 mg/L.

4. สารละลายมาตรฐานทองแดง : BDH, Spectrosol grade (Product No. 14139) ความเข้มข้น 1,000 mg/L

5. สารละลายมาตรฐานสังกะสี : BDH, Spectrosol grade (Product No. 14150) ความเข้มข้น 1,000 mg/L

ค. <u>วิธีวิเคราะห์</u> กรองตัวอย่างน้ำด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำ 100 mL. ถ่ายลงในบีคเกอร์ขนาด 150 mL. ใช้ 1N NaOH ปรับ pH ให้ได้ 3 (วัดด้วยเครื่องวัด pH) ถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 200 g. เติมสารละลาย APDC 1 mL. เขย่าให้เข้ากันเติม MIBK 10 mL. และเขย่าอย่างแรง 30 วินาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้นและค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปจนกระทั่งชั้นของ MIBK ขึ้นมาอยู่บนคอขวด นำไปวัดหาค่าแอบซอบแบนซ์ของเหล็ก ทองแดง และแมงกานีส ที่ความยาวคลื่น 248.8, 324.8, และ 213.9 nm. ตามลำดับ โดยใช้อากาศ/ก๊าซอะเซทิลีนเป็นเชื้อเพลิง เตรียมกราฟเปรียบเทียบจากสารละลายมาตรฐานเหล็ก ทองแดง และสังกะสี ในช่วงความเข้มข้น 0-0.030 mg/L. และดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทุกประการ ยกเว้นขั้นตอนของการกรอง

3.2.9 <u>การวิเคราะห์แมงกานีส</u>

ก. <u>เครื่องมือ</u> : เช่นเดียวกับข้อ 3.2.6 ก. 1.

ข. <u>สารเคมี</u>

1. เช่นเดียวกับข้อ 3.2.8 ข. 1.

2. เช่นเดียวกับข้อ 3.2.8 ข. 2.

3. สารละลายมาตรฐานแมงกานีส : BDH, Spectrosol grade (Product No. 14144) ความเข้มข้น 1,000 mg/L

ค. <u>วิธีวิเคราะห์</u> ทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.8 ค. 1. ทุกประการ แต่ในการปรับ pH ให้ปรับ pH เป็น 5.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การทดสอบตัวอย่างน้ำโดยใช้สาหร่ายวิเคราะห์

ก. เครื่องมือ

1. ห้องเลี้ยงสาหร่าย (incubation room) : ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ในช่วง 24 ± 2 องศาเซลเซียส

2. ชุดให้แสง (illumination) : ติดตั้งโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนท์ชนิดแสงสีขาว ซึ่งจะทำให้แสงสว่างประมาณ 4,304 ลักส์ (± 10 เปอร์เซนต์)

3. ตู้ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) : Market Forge

4. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) : Olympus รุ่น BH

5. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ : Spectronic 88, Bausch & Lomb

6. เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance) 4 ตำแหน่ง Sartorius 2462

7. เครื่องนับเซล (hemacytometer) : Bright-Line, ลึก 0.1 มิลลิเมตร

8. เครื่องเหวี่ยงตะกอน (centrifuge) : Hettich, Universal II

9. ตู้อบ (oven) : Memert V 30

ข. การเตรียมเครื่องแก้ว

เครื่องแก้วทั้งหมดที่ใช้ต้องทำจากแก้วเนื้อแข็ง (borosillicate glass) และใช้จากแหล่งผลิตเดียวกัน (ในการทดลองนี้ใช้เครื่องแก้ว Pyrex, U.S.A.) เครื่องแก้วทั้งหมดล้างด้วยน้ำยาล้างที่ปราศจากฟอสเฟต (non-phosphate detergent, BDH, Decon-90) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยนำไปใส่ในตู้ฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำนาน 15 นาที ที่ความดัน 108 kPa ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

ค. การเตรียมและรักษาพันธุ์สาหร่าย

สายพันธุ์ของสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ Selenastrum Capricornutum Printz เพื่อให้มีสาหร่ายพอใช้ตลอดระยะเวลาในการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องมีการเตรียม (stock culture) ในสารอาหารมาตรฐาน (standard complete media) สำหรับสูตรของสารอาหารแสดงไว้ในภาคผนวก และเพื่อให้พันธุ์สาหร่ายที่ใช้ปราศจากการปนเปื้อนจึงต้องทำการ subculture ทุก ๆ สัปดาห์ในสภาพที่ปราศจากเชื้อ (aseptic condition) นอกจากนี้ยังได้ทำการ subculture บนสารอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid media) โดยผสมวุ้นลงในสารอาหารมาตรฐาน 1 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) การเลี้ยงแบบนี้ทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์สาหร่ายได้นานขึ้น

ง. การเตรียมสาหร่ายสำหรับการเติมเชื้อ

นำสาหร่ายที่เพาะพันธุ์ไว้มาทำการแยกส่วนที่เป็นสารละลายออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงตะกอน ล้างเซลสาหร่ายด้วยสารละลาย $NaHCO_3$ (ความเข้มข้น 15 mg/L) แยกสารละลายออกทิ้งโดยใช้เครื่องเหวี่ยงตะกอน เติมสารละลาย $NaHCO_3$ จนได้ความเข้มข้นของสาหร่ายตามที่ต้องการ โดยสาหร่ายที่ใช้เติม (inoculum) ลงในตัวอย่างน้ำนั้นต้องมีปริมาณ 1,000 เซล ต่อตัวอย่างน้ำ 1 mL.

จ. การศึกษาช่วงการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ถ่ายสารอาหารมาตรฐาน 50 mL. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL. เติมสาหร่ายลงไป 50,000 เซล นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงสาหร่าย วัดความเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกวัน โดยเริ่มวัดตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 14 ในรูปของค่า OD (optical density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วาดกราฟแสดงความเจริญเติบโต (standard growth curve) ของสาหร่ายบนกระดาษกราฟกึ่งล็อการิทึม (semi-logarithmic paper) เพื่อหาวันที่ให้ผลผลิตสูงสุด (maximum standing crop) ซึ่งปกติจะอยู่ในช่วง 7-14 วัน

ฉ. <u>การเตรียมตัวอย่างน้ำก่อนทดสอบ</u>

เมื่อได้ตัวอย่างน้ำแล้วให้กรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกำจัดสาหร่ายท้องถิ่น (indigenous algae) ที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น (มีด) ที่ 4 องศาเซลเซียส

ช. <u>การทดลองแบบเติมสารอาหาร</u>

1. แบบแผนการทดลองแบ่งออกได้ 9 ชุด ตามลักษณะการเติมสารอาหาร ซึ่งเป็นทั้งแบบเติมชนิดเดียว (single addition) และเติมแบบผสม (combined addition) ดังนี้คือ

ชุดที่ 1 ตัวอย่างน้ำ (ชุดควบคุม)
ชุดที่ 2 ตัวอย่างน้ำ + ฟอสฟอรัส
ชุดที่ 3 ตัวอย่างน้ำ + ไนโตรเจน
ชุดที่ 4 ตัวอย่างน้ำ + ธาตุอาหารปริมาณน้อย
ชุดที่ 5 ตัวอย่างน้ำ + ฟอสฟอรัส + ไนโตรเจน
ชุดที 6 ตัวอย่างน้ำ + ฟอสฟอรัส + ธาตุอาหารปริมาณน้อย
ชุดที่ 7 ตัวอย่างน้ำ + ไนโตรเจน + ธาตุอาหารปริมาณน้อย
ชุดที่ 8 ตัวอย่างน้ำ + ฟอสฟอรัส + ไนโตรเจน + อีดีทีเอ
ชุดที่ 9 ตัวอย่างน้ำ + ฟอสฟอรัส + ไนโตรเจน + ธาตุอาหารปริมาณน้อย

การเติมฟอสฟอรัสให้เติมลงไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในตัวอย่างน้ำเป็น 0.05 mgP/L โดยใช้ KH_2PO_4 สำหรับไนโตรเจนเติมลงไปเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1.00 mgN/L โดยใช้ $NaNO_3$ ธาตุอาหารปริมาณน้อยเติมลงไปเท่ากับปริมาณที่ใช้เตรียมสารอาหารมาตรฐาน สำหรับอีดีทีเอ (EDTA) เติมลงไปให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/L

2. วิธีการทดลอง : ถ่ายตัวอย่างน้ำ 50 mL. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL. เติมสารอาหารตามข้อ 1. เติมสาหร่ายลงไป 50,000 เซล นำไปเพาะเลี้ยงในห้อง

เลี้ยงสาหร่าย วัดความเจริญเติบโตของสาหร่ายในวันที่ให้ผลผลิตสูงสุด (ตามผลการทดลองในข้อ จ.) โดยวิธีนับเซลและ/หรือการวัดค่า OD. แล้วแต่ความเหมาะสม การทดลองนี้ทำแบบ 3 ซ้ำ (triplicate) และทุกชุดการทดลองจะมีอีก 1 ชุดที่เป็นสารอาหารมาตรฐานเพื่อใช้สำหรับเป็นตัวเทียบอ้าง (reference) และควบคุมสภาพการทดลองในแต่ละครั้ง

ช. <u>การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของหน่วยวัดความเจริญเติบโตของสาหร่าย</u>

โดยปกติแล้วการรายงานความเจริญเติบโตของสาหร่ายนิยมให้รายงานเป็นน้ำหนักแห้ง (dry weight) ถึงแม้ว่าขณะทดลองอาจใช้หน่วยวัดความเจริญเติบโตในรูปอื่น ดังนั้น จึงจำต้องหาค่าดัชนีสหสัมพันธ์เส้นตรง (r) ระหว่างการวัดความเจริญเติบโตของสาหร่ายในรูปของจำนวนเซลและค่า OD. กับน้ำหนักแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย