หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีการวิเคราะห์

การเตรียมการวิเคราะห์

ก. การเตรียมเครื่องแก้ว

เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟอสเฟตและเครื่องแก้วที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย เพื่อศึกษาอิทธิพลของฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จะต้องล้างด้วยผงซักฟอกพิเศษชนิดที่ไม่มีฟอสเฟต เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสาร และล้างเครื่องแก้วตามลำดับขั้นของวิธีการมาตรฐาน (U.S. EPA, 1978; APHA, AWWA, and WPCF, 1980)

ข. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายไว้ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ Selenastrum capricornutum Printz ได้มาจาก Norwegian Institute for Water Research (NIVA) ประเทศนอรเวย์ เลี้ยงไว้ในสารอาหารมาตรฐานซึ่งมีธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองครบถ้วนตามสูตรอาหารมาตรฐาน (U.SEPA, 1978; APHA, AWWA and WPCF, 1980) ที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส ความเข้มของแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 2,700-3,200 ลักซ์ เขย่าขวดวันละครั้ง เพื่อให้สาหร่ายได้รับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยทั่วถึงกัน และขจัดปัญหาสาหร่ายหยุดการเจริญเติบโตเนื่องจากขาดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2-limitation) เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 1 สัปดาห์โดยถ่ายเซลสาหร่ายในสารอาหารเก่า 2 มิลลิลิตรลงในสารอาหารใหม่ 50 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลสาหร่ายได้รับอาหารสมบูรณ์ดีระหว่างรอการทดลอง

ค. การเตรียมเซลสาหร่ายสำหรับการทดลอง

เซลสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองทุกครั้งเป็นสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไว้จนมีอายุ 7-14 วัน นำมาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,000 g (ประมาณ 2,400 รอบต่อนาที) และล้างด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 15 มิลลิกรัม/ลิตร 2 ครั้ง แล้วจึงเจือจางเพื่อให้ได้จำนวนเซลเริ่มต้นในการทดลองตามต้องการ คือ 10^3 เซล/มิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ในการนับจำนวนเซล

การวิเคราะห์

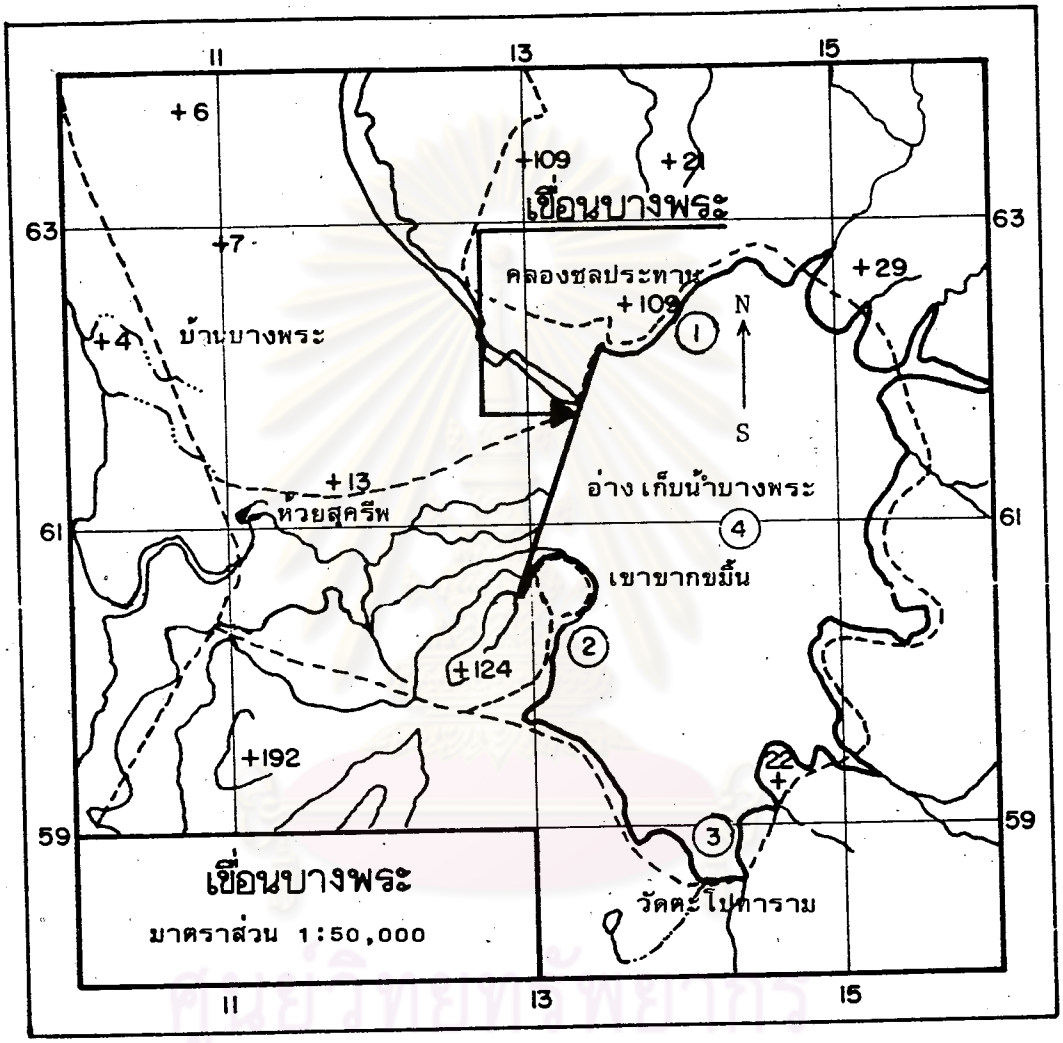
ก. การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างน้ำที่เป็นตัวแทนของน้ำในอ่างเก็บน้ำบางพระ 4 สถานี คือ สถานีริมฝั่งอ่างเก็บน้ำ 3 แห่ง ได้แก่ บริเวณสถานีสูบน้ำเพื่อการประปาของโครงการอ่างเก็บน้ำบางพระ (สถานีที่ 1) บริเวณใกล้เขาขากขมิ้น (สถานีที่ 2) และบริเวณใกล้วัดตะโปทาราม (สถานีที่ 3) ส่วนอีกสถานีหนึ่งคือ บริเวณกลางอ่างเก็บน้ำ (สถานีที่ 4) ดังแสดงในรูปที่ 1 ใช้เครื่องเก็บตัวอย่างน้ำของ Wildco Alpha Series (PVC type) เก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณความลึกที่แสงส่องถึง ซึ่งเป็นบริเวณที่สาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงได้มีความลึกจากผิวน้ำประมาณ 1 เมตร ใส่ในขวดโพลีเอทธิลีนเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่สำคัญ ได้แก่ พีเอ็ช (pH) อุณหภูมิ ความเป็นด่าง(alkalinity) การนำไฟฟ้า (conductivity) transparency ออกซิเจนละลาย (DO) ซีโอดี (COD) บีโอดี (BOD) แอมโมเนีย (NH_3) ไนเตรต (NO_3^-) ไนไตรต์ (NO_2^-) ออโธฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ (ortho soluble phosphorus) คลอไรด์ (Cl^-) ซัลเฟต ($SO_4^=$) และโลหะหนักที่สำคัญคือ เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu)

วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการที่จำเป็นต้องวิเคราะห์ทันทีในภาคสนาม ได้แก่ พีเอ็ช ของน้ำโดยใช้เครื่องวัด พีเอ็ชของ La Motte (HA series) ความเป็นด่างและออกซิเจนละลายโดยเครื่องวิเคราะห์ของ Hach (model DR-EL/2) อุณหภูมิและ transparency โดยเทอร์โมมิเตอร์และ secchi dish ตามลำดับ ส่วนคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เหลือซึ่งจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้เก็บรักษาตัวอย่างน้ำตามวิธีการมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 1980) เพื่อรอการวิเคราะห์ในภายหลัง สำหรับตัวอย่างน้ำที่เก็บเพื่อการวิเคราะห์ทางชีวภาพโดยการใช้สาหร่ายทดลอง ก็เก็บจากบริเวณเดียวกันโดยวิธีเดียวกันและแช่เย็นทันทีจนกว่าจะกลับถึงห้องปฏิบัติการ จึงกรองด้วยกระดาษกรอง GF/C ก่อนแช่แข็งเพื่อรอการวิเคราะห์

ในการเก็บข้อมูลเพื่อประเมินคุณภาพน้ำโดยศึกษาการเจริญเติบโตของ S. capricornutum ในห้องปฏิบัติการได้เก็บตัวอย่างสาหร่ายพันธุ์พื้นเมืองของอ่างเก็บน้ำบาง-

013139



① สถานีสูบน้ำของโครงการอ่าง เก็บน้ำบางพระ

② สถานีริมฝั่งใกล้เขาขากขมิ้น

③ สถานีริมฝั่งใกล้วัดตะโปทาราม

④ สถานีกลางอ่าง เก็บน้ำบางพระ

รูปที่ 1 แสดงสถานี เก็บตัวอย่างน้ำ 4 แห่งในอ่าง เก็บน้ำบางพระ

พระควบคู่ไปด้วย เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณสาหร่ายในสภาวะสมดุลย์ตามธรรมชาติซึ่งอยู่นอกเหนือจากขอบข่ายของงานวิจัยที่เสนอมานี้ แต่อาจใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบเพื่อให้การประเมินคุณภาพน้ำเป็นไปอย่างถูกต้องยิ่งขึ้น

ข. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ</u>

1. <u>การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี</u>

องค์ประกอบคุณภาพน้ำทางเคมีส่วนใหญ่วิเคราะห์โดยตรงจากตัวอย่างน้ำที่เก็บมา ส่วนองค์ประกอบที่เป็นสารอาหารหลักของพืช ได้แก่ แอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์ ออโธฟอสฟอรัส และโลหะหนัก คือ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง วิเคราะห์ในรูปที่ละลายน้ำได้โดยกรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรอง GF/C (0.45 μm) และวิเคราะห์ตามวิธีการมาตรฐาน (APHA, AWWA, AWWA, and WPCF, 1980) ดังต่อไปนี้

ซีโอดี	วิเคราะห์โดยวิธี	Dichromate Reflux Method
บีโอดี	"	Azide Modification of Iodometric Method
คลอไรด์	"	Argentometric Titration
ซัลเฟต	"	Turbidimetric Titration
แอมโมเนีย	"	Direct Nesslerization Method
ไนเตรตและไนไตรต์	"	Automated Cadmium Reduction Method โดยเครื่อง Technicon Auto Analyzer II
ออโธฟอสฟอรัส	"	Ascorbic Acid Method
โลหะหนัก (เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง)	"	Atomic Absorption Spectrophotometry โดยเครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrophotometer Perkin-Elmer 4000

2. <u>การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางชีวภาพโดยใช้สาหร่ายทดลอง</u> แบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.1 <u>การทดลองขั้นแรก</u> เพื่อศึกษาปฏิกริยาตอบสนองของ <u>S. capricornutum</u> ต่อการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารหลัก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นสรุปต่อไป โดย

เลี้ยง S. capricornutum ในสารอาหารมาตรฐานซึ่งมีธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ฟอสฟอรัสในปริมาณ 0, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/ลิตร ส่วนไนโตรเจนในปริมาณ 0, 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร การทดลองทุกชุดและทุกความเข้มข้นของสารอาหารทำ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ วัดผลการเจริญเติบโตของ S. capricornutum ทุกวันโดยนับจำนวนเซลด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ บันทึกผลเป็นจำนวนเซล/มิลลิลิตร ในแต่ละวันในรูปของกราฟเส้นแสดงการเจริญเติบโตจนกว่า S. capricornutum จะให้จำนวนเซลซึ่งแสดงการเจริญเติบโตสูงสุด

2.2 การทดลองขั้นสรุป ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายทดลองในตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำบางพระเพื่อวิเคราะห์ศักยภาพของอ่างเก็บน้ำทางด้านสารอาหาร รวมทั้งธาตุที่เป็นปัจจัยจำกัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอ่างเก็บน้ำ โดยนำตัวอย่างน้ำที่แช่แข็งไว้มาทำให้ละลายอย่างรวดเร็ว กรองอีกครั้งหนึ่งด้วยกระดาษกรอง GF/C แล้วนำมาเติมธาตุอาหารหลัก คือ ฟอสฟอรัสในรูปของสารละลาย K_2HPO_4 และไนโตรเจนในรูปของสารละลาย $NaNO_3$ และธาตุอาหารรอง (micronutrients) ในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อมูลที่ได้จากการทดลองในขั้นแรก โดยจัดการทดลองเป็น 5 ชุดซึ่งเรียกว่า Enrichment Experiments ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ตัวอย่างน้ำไม่เติมธาตุอาหารเลย (Control Water)

" 2 ตัวอย่างน้ำเติมฟอสฟอรัส (K_2HPO_4) 0.050 มิลลิกรัม/ลิตร (P spike)

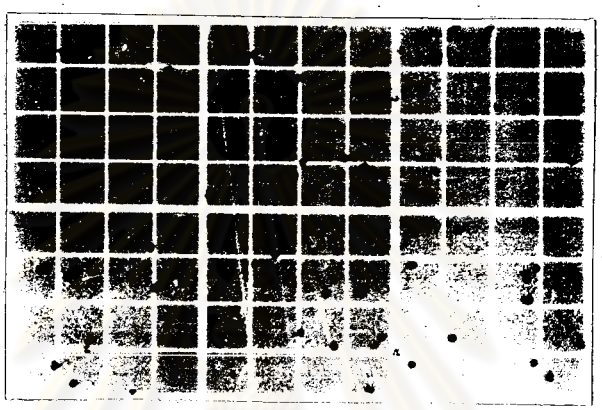
" 3 ตัวอย่างน้ำเติมไนโตรเจน ($NaNO_3$) 0.200 มิลลิกรัม/ลิตร (N spike)

" 4 ตัวอย่างน้ำเติมฟอสฟอรัส 0.050 มิลลิกรัม/ลิตร และไนโตรเจน 0.200 มิลลิกรัม/ลิตร (P+N spike)

" 5 ตัวอย่างน้ำเติมฟอสฟอรัส 0.050 มิลลิกรัม/ลิตร และไนโตรเจน 0.200 มิลลิกรัม/ลิตร และธาตุอาหารรองซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับในสารอาหารมาตรฐาน (P+N+micronutrients spike)

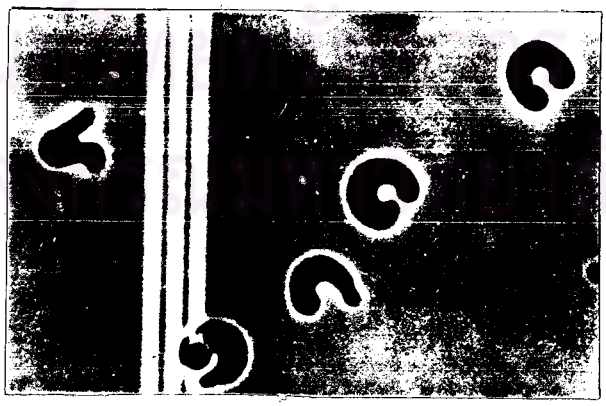
ใช้ตัวอย่างน้ำในการทดลอง 50 มิลลิลิตรใน Erlemeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนเซลสาหร่ายเริ่มต้นเป็น 1,000 เซล/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,700 - 3,200 ลักซ์ การทดลองทุกชุดทำ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ

วัดผลการทดลองโดยการนับจำนวนเซลของ S. capricornutum ในวันที่ให้จำนวนเซลสูงสุดตามที่ได้จากการทดลองขั้นแรก บันทึกการเจริญเติบโตของ S. capricornutum ในการทดลองแต่ละชุดโดยกราฟแท่ง เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายในตัวอย่างน้ำที่เติมสารอาหารแต่ละชนิด กับตัวอย่างน้ำที่ไม่ได้เติมสารอาหารเลย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงการนับจำนวนเซลสาหร่าย Selenastrum capricornutum บนฮีมาไซโตมิเตอร์ กำลังขยาย 375 เท่า



รูปที่ 3 ภาพขยายของ Selenastrum capricornutum ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน กำลังขยาย 3,750 เท่า