Central Library
Prince of Songkla University

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

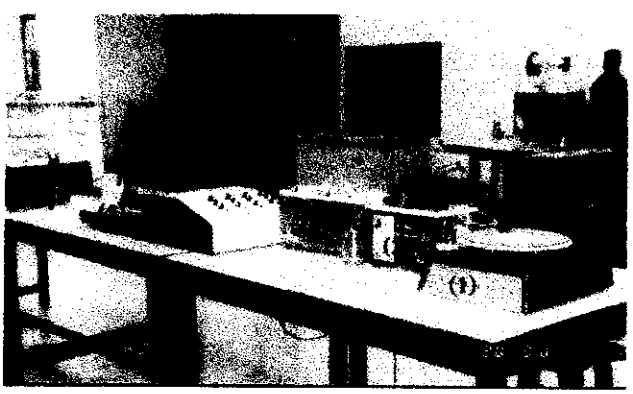
2.1. การจัดตั้งเครื่องมือวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1.1. เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารด้วยเทคนิคการไหลแบบต่อเนื่อง

เครื่องมือวิเคราะห์การไหลแบบต่อเนื่อง ChemLab Instrument Ltd. (England)รุ่น CPP15SB ประกอบด้วย

- เครื่องดูดสารอัตโนมัติ รุ่น Mk4 Sampler
- ปั๊มแบบเพอริสตาติค (peristatic pump) รุ่น CPP30SB
- ระบบการไหลสำหรับวิเคราะห์หาสารอาหารชนิดต่าง ๆ ดังนี้
  - Ammonia Analysis Cartridge สำหรับแอมโมเนีย รุ่น CW2-008-11
  - TON Analysis Cartridge สำหรับไนเตรต–ไนไตรต์ รุ่น CW2-066-24
  - Phosphate Analysis Cartridge สำหรับฟอสเฟต รุ่น CW2-075-01
- ตัวตรวจวัด (detector) รุ่น Chemlab Multi-Channel Colorimeter Mark III
- เครื่องรายงานผล (Recorder) รุ่น R-OX
- สายยางต่อเข้าปั๊ม (pump tubing) กับ สายยาง (tubing) ชนิด ไทกอน (tygon turbing) เชื่อมต่อในแต่ละระบบ

การจัดเรียงส่วนประกอบต่าง ๆ แสดงไว้ในรูปที่ 2-1



(1) Autosampler
(2) Peritaltic pumps
(3) Analysis cartridge
(4) Multi- channel colorimeter
(5) Recorder

รูปที่ 2–1 เครื่องมือวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยแบบการไหลแบบต่อเนื่อง

ในการวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยแต่ละชนิดจะใช้ส่วนประกอบของเครื่องมือเหมือนกัน ยกเว้นส่วนที่ (3) ซึ่งจะต้องเปลี่ยนให้เหมาะสม รายละเอียดการจัดชุดเครื่องมือ แสดงในรูปที่ 2-2 สำหรับออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวม รูปที่ 2-3 สำหรับ แอมโมเนีย และ รูปที่ 2-4สำหรับฟอสเฟต

2.1.2. วิธีการใช้เครื่องมือ

รายละเอียดของขั้นตอนต่างๆในการใช้เครื่องมือ แสดงใน ภาคผนวก ก

2.2. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยแต่ละชนิด

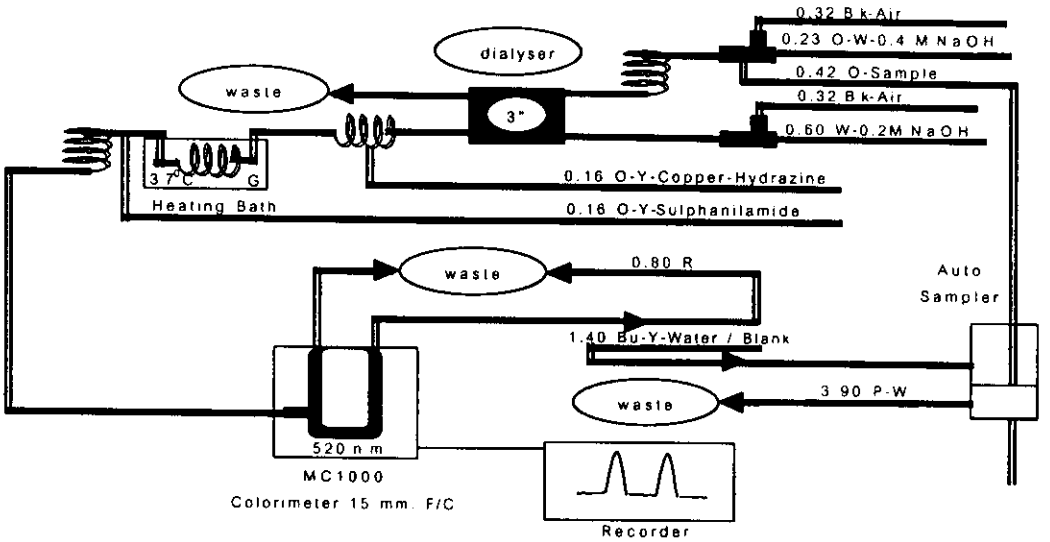
2.2.1. ปริมาณออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวม (total oxidised nitrogen:TON) และไนไตรต์ (NO_2^-)

การหาปริมาณ ออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวม (TON) และ ไนไตรต์ (NO_2^-) ใช้ระบบการไหลชุดเดียวกัน คือ ชุดวิเคราะห์ TON ในการหา TON อาศัยปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรตเป็นไนไตรต์ โดยใช้คอปเปอร์ไฮดราซีน และไนไตรต์ที่เกิดทำปฏิกิริยากับซัลฟานิลาไมด์ และแนฟทิลเอทิลีนไดเอมีน การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู (azo dye) ดังสมการ 1-8 และ 1-9 ในบทที่ 1 วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สำหรับการหาปริมาณไนไตรต์ ใช้น้ำดีไอออไนซ์ แทนคอปเปอร์ไฮดราซีน ส่วนปริมาณไนเตรตได้จากผลต่างระหว่างปริมาณออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวมกับไนไตรต์

สารเคมีที่ใช้และวิธีการเตรียมสารเคมีแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข ระบบการไหลสำหรับวิเคราะห์ไนไตรต์ และ ออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวม แสดงในรูปที่ 2-2 ทำการเปิดปั๊มดูดรีเอเจนต์น้ำดีไอออไนซ์ และอากาศเข้าสู่ระบบไหลผ่านเซลล์ตัวตรวจวัด จนกระทั่งเส้นฐานบนเครื่องรายงานผลคงที่ (ค่าแบลงค์) จึงเริ่มศึกษาหา สภาวะการทดลองที่เหมาะสม

2.2.1.1. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการดูดตัวอย่าง (sampling time) และล้างสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้ง (washing time)

ศึกษาเวลาที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายมาตรฐาน ไนไตรต์ 142.8 µmol/L ทำการปรับเวลาในการดูดตัวอย่างตั้งแต่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 วินาที ตามลำดับ และปรับเวลาในการล้างตั้งแต่ 80,100 และ 120 วินาที ตามลำดับ โดยให้สภาวะการทดลองอื่น ๆ คงที่ เช่น อุณหภูมิ (37 °C) และอัตราการไหลของรีเอเจนต์และอากาศ ตลอดเวลาที่ทำการศึกษา บันทึกค่าการตอบสนอง



*** 0.32 Bk-Air เมื่อ 0.32 คือ flow rate, Bk คือ tygon pumping tubes (แต่ละสีระบุอัตราเร็ว เมื่อปั๊มมีความเร็วมาตรฐาน ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก) Air คือ air/reagents/samples

รูปที่ 2-2 ระบบการไหลของตัวอย่างและรีเอเจนต์สำหรับการวิเคราะห์ออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวม (manual of ChemLab Instrument Ltd.)

เวลาดูดตัวอย่างที่เหมาะสม คือ เวลาที่ให้ค่าการตอบสนองของสัญญาณที่มีค่าสูง (พีคสูงสุด) เพื่อให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ดีที่สุด และสัญญาณคงที่ (หรือ แม่นยำสูงสุด) ส่วนเวลาในการล้างระบบที่เหมาะสม คือ ต้องให้พีคกลับมายังเส้นฐานได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสัมพันธ์กับเวลาในการดูดตัวอย่าง เพื่อให้เกิดความสมดุลระหว่างเวลาในการดูดและล้างตัวอย่าง

2.2.1.2. การศึกษาปริมาณรีดิวซิงค์เอเจนต์ (copper hydrazine) ที่เหมาะสม

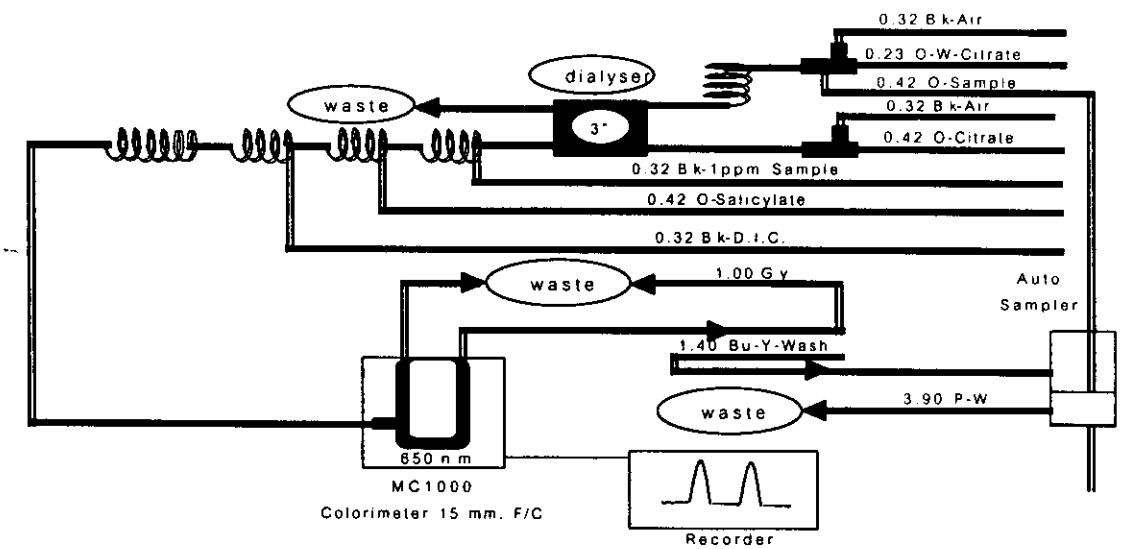
ศึกษาความเข้มข้นของคอปเปอร์ไฮดราซีน ที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบค่าการตอบสนองของไนเตรต 357.14 µmol/L กับไนไตรต์ 357.14 µmol/L ความเข้มข้น ของ copper hydrazine ที่ศึกษา คือ 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 และ 1.8 mg/L ตามลำดับ โดยให้สภาวะการทดลองอื่น ๆ คงที่ เช่น อุณหภูมิ 37 °C และอัตราการไหลของรีเอเจนต์และอากาศ ตลอดเวลาที่ทำการศึกษา บันทึกค่าการตอบสนอง รายละเอียดขั้นตอนการทดลองแสดงในภาคผนวก ค

2.2.2. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนีย

วิธีที่ใช้ตาม คู่มือของเครื่อง ซึ่งปรับปรุงมาจากปฏิกิริยาเบอร์โทรเล็ต (bertholet reaction) แต่ใช้ ซาลิไซเลต (2- ไฮดรอกซีเบนโซเอต) แทน ฟีนอล และ ไดคลอโรไอโซไซยาโนเรต (dichloroisocyanurate) ในสารละลายด่าง (alkaline solution) ซึ่งสลายตัว ให้ไฮเปอร์คลอไรต์ ไอออน (hyperchlorite ions) แทน เกลือไฮเปอร์คลอไรต์ ซึ่งไม่คงสภาพ แอมโมเนียที่มีในตัวอย่าง จะทำปฏิกิริยากับอัลคาไลน์ฟีเนต และ ไฮเปอร์คลอไรต์ไอออน ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (indophenol blue) โดยมีไนโตรพลัสไซด์ (nitroprusside) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และวัดการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร (ดังสมการ 1-10 ถึง 1-12 ในบทที่ 1)

สารเคมีที่ใช้ และวิธีการเตรียมสารเคมี แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก ก ระบบการไหลสำหรับวิเคราะห์แอมโมเนีย แสดงในรูปที่ 2-3 ทำการเปิดปั๊มดูดสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาเข้าในระบบการไหล จนกระทั่งได้เส้นฐานคงที่ คือ ระบบพร้อมที่จะทำการวิเคราะห์

ศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย 357.14 µmol/L ปรับเวลาในการดูดตัวอย่าง ตั้งแต่ 20, 30, 40, 50 และ 60 วินาที ตามลำดับ และปรับเวลาในการล้างตั้งแต่ 80, 100 และ 120 วินาที ตามลำดับ โดยให้ อัตราการไหลของรีเอเจนต์และอากาศคงที่ การทดลองทำที่อุณหภูมิห้อง บันทึกค่าการตอบสนอง

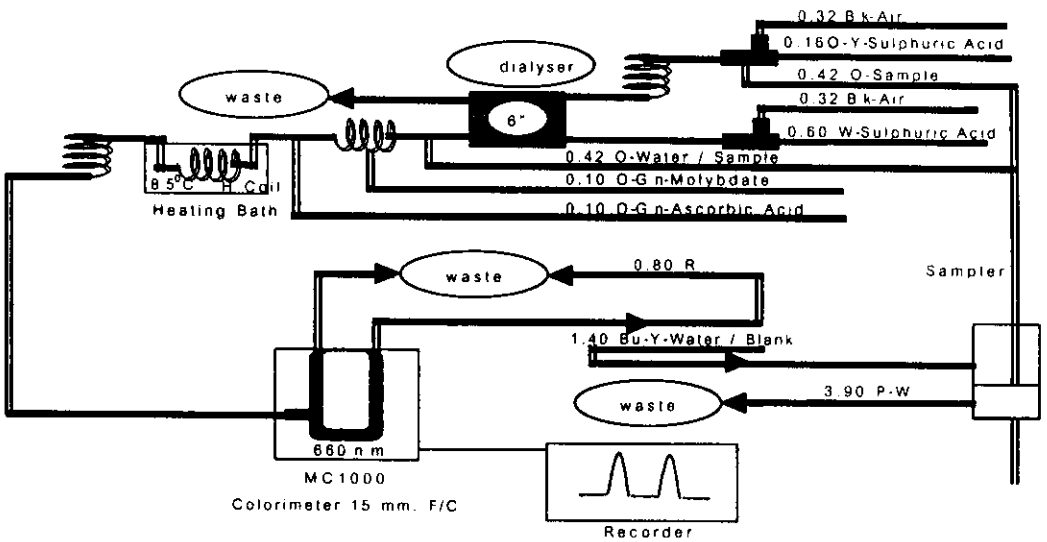


รูปที่ 2-3 ระบบการไหลของตัวอย่างและรีเอเจนต์สำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนีย (manual of ChemLab Instrument Ltd.)

2.2.3. ปริมาณฟอสเฟต

ออร์โธฟอสเฟตทำปฏิกิริยากับโมลิบเดต (molybdate) ในสภาวะกรดเกิดเป็นกรดฟอสฟอ-โมลิบดิค (phosphomolybdic acid) แล้วถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอบิค (ascorbic acid) โดยมีแอนติโมนี III (antimony III) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (molybdenum blue) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ดังสมการ 1-13 และ 1-14 ในบทที่ 1

สารเคมีที่ใช้ และวิธีการเตรียมสารเคมี แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก ก ระบบการไหลสำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต แสดงในรูปที่ 2-4 จากนั้นเปิดปั๊มดูดสารเคมีที่ในปฏิกิริยาเข้าในระบบการไหล จนกระทั่งได้เส้นฐานคงที่ ซึ่งก็คือ ระบบพร้อมที่จะทำการวิเคราะห์



รูปที่ 2-4 ระบบการไหลของสารตัวอย่างและสารเคมีของการวิเคราะห์ฟอสเฟต (manual of ChemLab Instrument Ltd.)

2.2.3.1. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการดูดตัวอย่างและล้างสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้ง

วิธีศึกษา คือ ใช้สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 322.89 µmol/L ปรับเวลาในการดูดตัวอย่างตั้งแต่ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 วินาที ตามลำดับ และปรับเวลาในการล้าง 80, 100 และ

120 วินาที ตามลำดับ โดยให้สภาวะการทดลองอื่น ๆ คงที่ เช่น อุณหภูมิ (85 °C) และอัตราการไหลของรีเอเจนต์และอากาศ ตลอดเวลาที่ทำการศึกษา บันทึกค่าการตอบสนอง

2.2.3.2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ศึกษาโดยใช้ สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 322.89 µmol/L ปรับอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างและรีเอเจนต์เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน ตั้งแต่ 75, 80, 85 และ 90°C ตามลำดับ โดยให้สภาวะการทดลองอื่น ๆ คงที่ เช่น เวลาในการดูดและล้างตัวอย่างที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2.2.3.1 และอัตราการไหลของรีเอเจนต์และอากาศตลอดเวลาที่ทำการศึกษา บันทึกค่าการตอบสนอง

2.3. ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) ช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) ความถูกต้อง (accuracy) และค่าความแม่นยำ (precision) ของสารอาหารแต่ละชนิด

2.3.1. ขีดจำกัดการตรวจวัด

ศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ให้สัญญาณค่าการตอบสนองเหนือแบลงค์ของไนไตรต์ ไนเตรต และแอมโมเนียคือ 0.025, 0.10 และ 0.25mg-N/L ตามลำดับ และสำหรับฟอสเฟต คือ 0.025 mg-P/L (หรือเท่ากับ 1.79, 7.14, 17.8,และ 0.81 µmol/L ตามลำดับ) ทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสารอาหารแต่ละชนิดตามข้อ 2.2 จำนวน15 ครั้ง ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของแต่ละสารอาหาร หาได้จาก 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Sheldon and Wiebe, 1997)

2.3.2. ช่วงความเป็นเส้นตรง

ศึกษาช่วงความเข้มข้นของ ไนไตรต์ ไนเตรต แอมโมเนีย และฟอสเฟต ที่ให้ผลการตอบสนองเป็นเส้นตรงในการสร้างกราฟมาตรฐาน ช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษามีดังนี้ ไนไตรต์ 1.8-3,000 µmol/L ไนเตรต 7.1-3,000 µmol/L แอมโมเนีย 17.8-12,000 µmol/L และฟอสเฟต 0.8-2000 µmol/L ทำการทดลองที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับสารอาหารแต่ละชนิดตามข้อ 2.2

2.3.3. ความถูกต้อง

ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ ไนไตรต์ ไนเตรต แอมโมเนียและฟอสเฟต ความเข้มข้น 85.71, 92.86, 180 และ 29.06 µmol/L ตามลำดับ ตามสภาวะการทดลองที่เหมาะ

สมสำหรับสารอาหารแต่ละชนิดตามข้อ 2.2 จำนวน 3 ครั้ง คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (Sheldon and Wiebe, 1997)

2.3.4. ความแม่นยำ

ศึกษาโดยวิเคราะห์ สารละลายมาตรฐาน ไนไตรต์ ไนเตรต แอมโมเนียและฟอสเฟต ความเข้มข้น 14.29, 142.96, 710 และ 322.89 µmol/L ตามลำดับ ชนิดละ 10 ซ้ำ ตามสภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับสารอาหารแต่ละชนิดตามข้อ 2.2 หาค่าเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD)

2.4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการเก็บตัวอย่างตะกอนในภาคสนาม

2.4.1. คุณภาพน้ำภาคสนาม

คุณภาพน้ำภาคสนามทำการตรวจวัดทันที ขณะเก็บตัวอย่างแต่ละสถานี (รูปที่ 2-5) โดยใช้เครื่องวัดคุณภาพน้ำภาคสนาม HORIBA รุ่น U-22 (Japan) ตัวแปรคุณภาพน้ำที่ทำการตรวจวัด คือ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ความเค็ม อุณหภูมิ ความขุ่น และศักย์-ไฟฟ้ารีดอกซ์

2.4.2. การเก็บตัวอย่างตะกอน

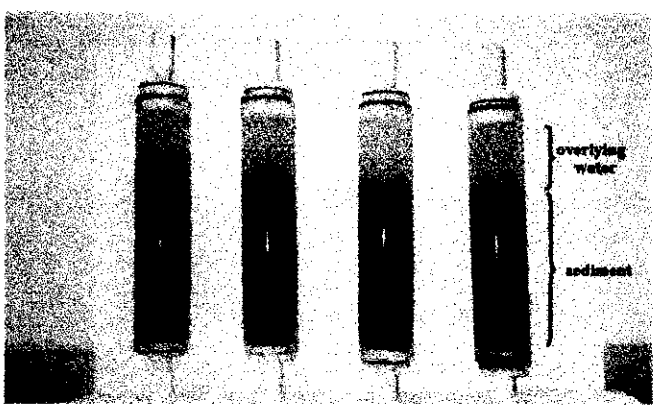
เครื่องมือเก็บตัวอย่างตะกอน เป็นคอร์แบบกดลง (push corer) ทำด้วยพลาสติคใส ประเภทเพล็กซิกลาส (plexiglass) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร มีฝาปิดบน-ล่าง ซึ่งทำจากเทฟลอน (สร้างขึ้นโดยคุณเวียงชัย จงศรีรัตนกุล)

ทำการเก็บตัวอย่างตะกอน สถานีละ 2 คอร์ โดยการดำน้ำลงไปกดคอร์ในตะกอน และให้มีน้ำเหนือตะกอนไว้บริเวณส่วนบนสุดของคอร์ ปิดฝาคอร์ให้สนิทภายใต้น้ำ เพื่อป้องกันการรบกวนผิวหน้าตะกอนและป้องกันออกซิเจนแทรกซึม บรรจุคอร์ตัวอย่างลงในลังไม้ เพื่อให้คอร์อยู่ในแนวตั้งตลอดเวลา (ดูรูปที่ 2-6) เก็บตัวอย่างสถานีละ 2 คอร์ (2 ซ้ำ) ลักษณะคอร์และตะกอนที่เก็บได้แสดงในรูปที่ 2-7

หลังจากนำตัวอย่างตะกอนกลับเข้าห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการแยกน้ำเหนือตะกอนและน้ำระหว่างตะกอน ซึ่งกระทำทันทีที่มาถึงห้องปฏิบัติการ

รูปที่ 2-5 การวัดคุณภาพน้ำในภาคสนาม

รูปที่ 2-6 คอร์ตัวอย่างตะกอนที่บรรจุในกล่องไม้สำหรับการเคลื่อนย้าย



รูปที่ 2-7 ลักษณะคอร์ตัวอย่างตะกอนและน้ำเหนืออนุภาคตะกอน

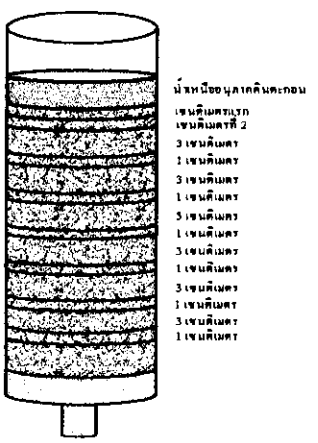
2.5. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการแยกตัวอย่างน้ำเหนือตะกอนกับน้ำระหว่างตะกอน

2.5.1. การเตรียมเครื่องมือ

สอดคอร์ตัวอย่างตะกอน (ทำที่ละคอร์) เข้าทางด้านล่างของกระโจม ตรึงให้แน่น จากนั้นบรรจุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการตัดแบ่งตัวอย่างเข้าไปในกระโจมไนโตรเจน ไล่อากาศออกให้หมด ปิดปากกระโจม แล้วผ่านก๊าซไนโตรเจน เข้าไปเพื่อให้บรรยากาศภายในกระโจมเป็นก๊าซเฉื่อย

2.5.2. การตัดแบ่งและแยกตัวอย่างแต่ละชั้นความลึก

ทุกขั้นตอนกระทำในกระโจมไนโตรเจน โดยเก็บน้ำเหนือตะกอน และแยกตัวอย่างน้ำระหว่างตะกอนทุกระยะ 3 เซนติเมตร โดยทำการการตัดแบ่งเพื่อเก็บตัวอย่างทุกระยะลึก 3 เซนติเมตร (รูปที่ 2-8) จากนั้นทำการแยกตัวอย่างตามขั้นตอน ดังนี้

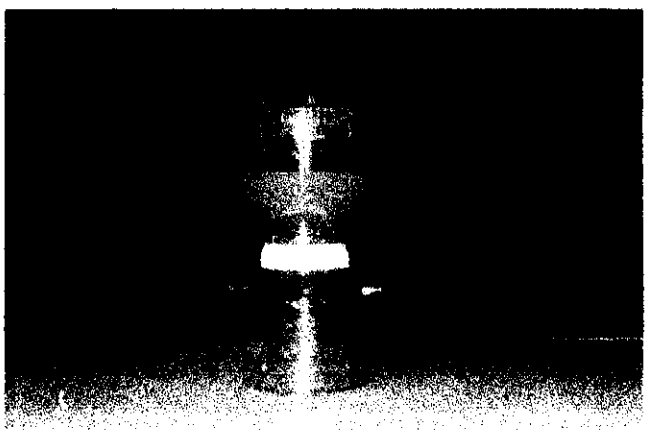


รูปที่ 2-8 การแบ่งชั้นตะกอนตามระดับความลึก

1. เปิดฝาคอร์ด้านบนออก จากนั้นดูดน้ำเหนือตะกอนทั้งหมดออกด้วยกระบอกฉีดยาระมัดระวังอย่าให้รบกวนผิวหน้าตะกอน
2. กรองน้ำเหนือตะกอนที่ได้ด้วยแผ่นกรอง GF/C (Whatman) ขนาด 1.0 ไมครอน โดยใช้ชุดกรอง NALGENE (รูปที่ 2-9) แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเหนือตะกอนที่กรองได้ในขวดโพลีเอทธีลีน รอการวิเคราะห์
3. ใช้แม่แรงดันฝาปิดคอร์ด้านล่างให้ตะกอนถูกดันขึ้นมาเหนือปากคอร์ ตัดตะกอนโดยใช้มีดพลาสติค (รูปที่ 2-10) ชั้นละ 1 เซนติเมตร และเก็บตะกอนลงในหลอดหมุนเหวี่ยง

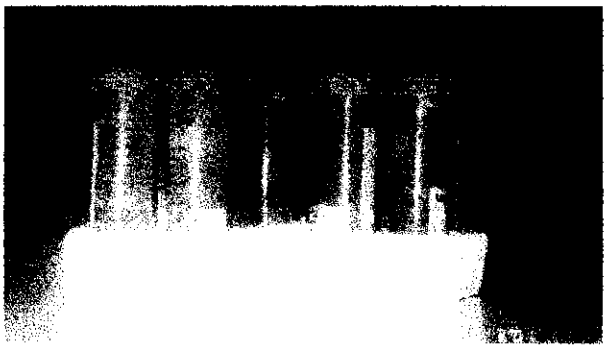
(centrifuge tube) โดยเก็บตัวอย่างที่ระดับ 1 และ 2 เซนติเมตรแรก จากนั้นเว้นไปเก็บทุกระยะ 3 เซนติเมตร ดังรูปที่ 2-8

4. นำตะกอนแต่ละระดับความลึกในหลอด (รูปที่ 2-11) ออกจากกระโจมไนโตรเจน ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อสกัดน้ำระหว่างตะกอนออกจากตะกอน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Sorvall (USA) รุ่น RT7 ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4°C (Ullman and Sandstrom, 1987)



รูปที่ 2-9 อุปกรณ์และวิธีการกรองน้ำเหนืออนุภาคตะกอน

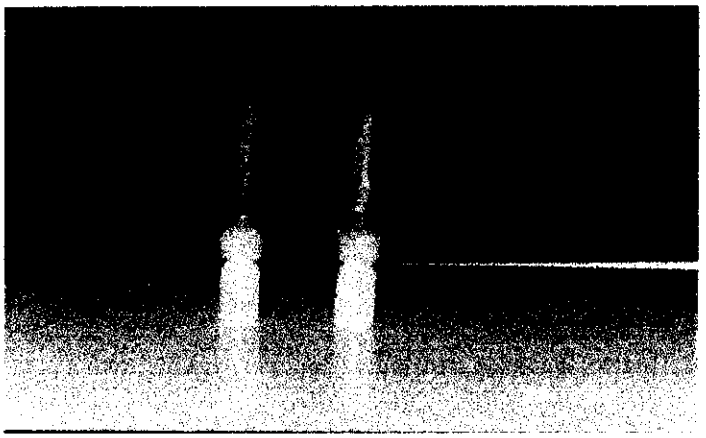
รูปที่ 2-10 การแยกชั้นตะกอนตามระดับความลึก ภายในกระโจมไนโตรเจน



รูปที่ 2-11 ลักษณะตะกอนและน้ำระหว่างอนุภาคตะกอนหลังการหมุนเหวี่ยง

5. นำหลอดหมุนเหวี่ยงแยกน้ำและตะกอนแล้ว กลับเข้ากระโจมไนโตรเจน เพื่อดูดน้ำระหว่างตะกอนออกกรอง (รูปที่ 2-12) ด้วยแผ่นกรอง GF/C (Whatman) ซึ่งบรรจุอยู่ในชุดกรอง Millipore (Ireland) ดังรูปที่ 2-13
6. เก็บน้ำระหว่างตะกอนที่กรองได้ บรรจุในขวดโพลีเอทธีลีน รอการวิเคราะห์
7. ตะกอนที่เหลือทำให้แห้งด้วยวิธีฟรีสดาร์ย (freeze dry) แล้วเก็บในถุงพลาสติก รอการวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์

รูปที่ 2-12 การกรองน้ำระหว่างตะกอน ภายในกระโจมไนโตรเจน



รูปที่ 2-13 อุปกรณ์และวิธีการกรองน้ำระหว่างอนุภาคตะกอน

2.5.3. การเก็บรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำเหนือตะกอนและน้ำระหว่างตะกอน ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดโพลีเอทธิลีนแล้ว เก็บรักษาโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิดังกล่าวจะลดประสิทธิภาพแบคทีเรียบางตัว ทำให้การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวภาพลดลง จากนั้นทำการวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยให้เสร็จสิ้นภายใน 24 ชั่วโมง กรณีที่ทำไม่ทัน ตัวอย่างที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C ซึ่งจะเก็บรักษาตัวอย่างได้นานประมาณ 1 เดือน (Sadler, 1997)

2.6. การศึกษาเปรียบเทียบ วิธีการแยกตัวอย่างน้ำระหว่างตะกอนออกจากตะกอน ภายใต้บรรยากาศปกติ (มีออกซิเจน) และบรรยากาศไนโตรเจน (ในกระโจมไนโตรเจน)

ในขั้นตอนนี้ ได้แยกตัวอย่างน้ำระหว่างตะกอนในสภาวะการเตรียมที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาผลกระทบของออกซิเจนที่มีต่อชนิดและปริมาณของสารอาหารปริมาณน้อยในตะกอน โดยทำการตัดแยกตัวอย่างตะกอนในบรรยากาศที่มีออกซิเจน คือ บรรยากาศปกติในห้องปฏิบัติการ และในบรรยากาศของก๊าซเฉื่อย คือ ในกระโจมไนโตรเจน ดังวิธีการต่อไปนี้

1. เก็บตัวอย่างตะกอนด้วยคอร์จำนวน 4 คอร์ ดังในหัวข้อ 2.4
2. นำกลับเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อแยกน้ำระหว่างตะกอน
3. ตะกอนจำนวน 2 คอร์ นำมาเตรียมตะกอน และสกัดน้ำระหว่างตะกอน ภายในกระโจมไนโตรเจน โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการเตรียมเหมือนกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.5

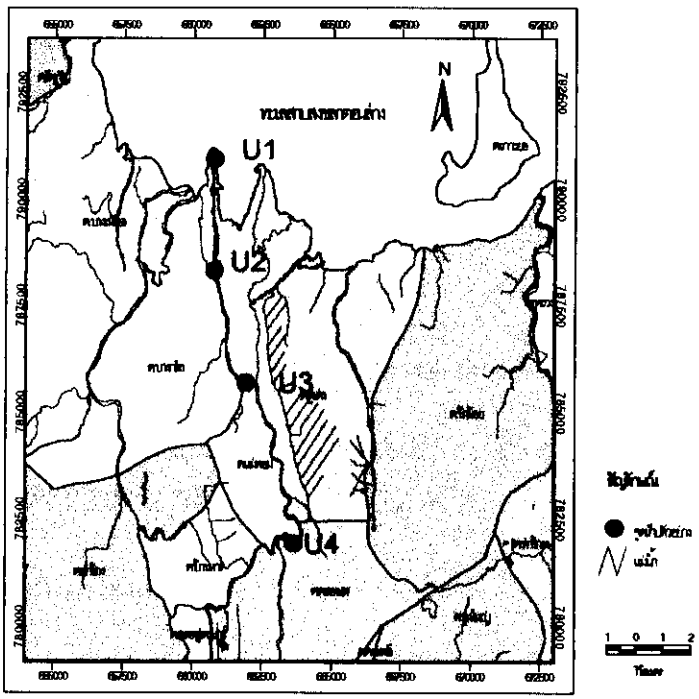
4. ตะกอนอีก 2 คอร์ นำมาเตรียมดินตะกอน และสกัดน้ำระหว่างตะกอน ภายใต้บรรยากาศปกติ (นอกกระโจมไนโตรเจน)
5. นำตัวอย่างน้ำระหว่างตะกอนที่สกัดได้แต่ละระดับความลึก ซึ่งได้จากการสกัดแยกทั้ง 2 วิธี มาวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยแต่ละชนิด ด้วยเครื่องมือดังอธิบายในหัวข้อ 2.1 ณ สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 2.2
6. เปรียบเทียบปริมาณของสารอาหารที่วิเคราะห์ได้ จากการเตรียมตัวอย่างในข้อ 3 และ 4 ในแต่ละระดับความลึกว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบจำแนก 2 ทาง (two-way classification ANOVA (analysis of variance))เนื่องจากการทดลองนี้มีปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง 2 ปัจจัย คือ ความลึกของตัวอย่าง และสภาวะการเตรียมตัวอย่าง

2.7. พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษา คือ ปากคลองอู่ตะเภาที่เปิดออกสู่ทะเลสาบสงขลา และลึกเข้ามาในคลองประมาณ 10 กิโลเมตร ซึ่งจัดเป็นเขตเอสทูรี ในบางฤดูมีน้ำทะเลหนุนเข้าคลองอู่ตะเภาลึกไปถึง 15 กิโลเมตร บริเวณนี้จึงเป็นบริเวณที่มีการผสมผสานระหว่างน้ำจืดกับน้ำเค็ม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการธรณีเคมีขึ้น

ในการศึกษาได้แบ่งพื้นที่เก็บตัวอย่างเป็น 4 สถานี เริ่มจากปากคลองอู่ตะเภาที่ต่อกับทะเลสาบสงขลา ลึกเข้ามาจนถึงหน้าวัดนารังนก (รูปที่ 2-14) แต่ละสถานีจะห่างกันประมาณ 2-2.5 กิโลเมตร ดังนี้

สถานีที่ 1 (U1) : บริเวณปากคลองอู่ตะเภาต่อกับทะเลสาบสงขลา
สถานีที่ 2 (U2) : บริเวณวัดท่าเมรุ
สถานที่ 3 (U3) : บริเวณวัดคูเต่า
สถานที่ 4 (U4) : บริเวณวัดนารังนก



รูปที่ 2–14 สถานีเก็บตัวอย่างตะกอนในคลองอู่ตะเภา

2.8. การศึกษาวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยแต่ละชนิดตามระดับความลึก

ในขั้นตอนนี้ ได้หาปริมาณสารอาหารปริมาณน้อยเพื่อหาชนิดและการแพร่กระจายของสารอาหารปริมาณน้อย ตามระดับความลึก ดังนี้

1. ตรวจวัดคุณภาพน้ำเหนือตะกอนในภาคสนาม และเก็บตัวอย่างตะกอน จาก 4 สถานี ในพื้นที่ศึกษา (หัวข้อ 2.7) สถานีละ 2 คอร์ ด้วยวิธีการในหัวข้อ 2.4
2. นำกลับเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อแยกน้ำระหว่างตะกอน
3. เตรียมตะกอน และสกัดน้ำระหว่างตะกอน ภายในกระโจมไนโตรเจน โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการเตรียม ดังอธิบายในหัวข้อ 2.5

4. ตัวอย่างตะกอนที่สกัดน้ำระหว่างตะกอน (เพื่อนำไปวิเคราะห์ในข้อ 5) ออกแล้ว นำไปทำให้แห้งด้วยวิธีฟรีสดาร์ย แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ ที่ออกซิไดซ์ง่าย ตามวิธีการในหัวข้อ 2.9
5. นำตัวอย่างน้ำระหว่างตะกอนที่สกัดได้แต่ละระดับความลึก มาวิเคราะห์สารอาหารปริมาณน้อยแต่ละชนิด ด้วยเครื่องมือดังอธิบายในหัวข้อ 2.1 ณ สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 2.2
6. ศึกษาความเข้มข้นและแนวโน้มการแพร่กระจายของสารอาหารที่เปลี่ยนแปลงตามระดับความลึก

2.9. การวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในน้ำเหนือตะกอนและน้ำระหว่างตะกอน

ด้วยเทคนิคการวัดการดูดกลืนแสงของอะตอม Flame Atomic Absorbtion Spectrophotometry (Varain รุ่น SpectrAA 220, Australia) ที่ ความยาวคลื่น 248.3 นาโนเมตร

2.10. การวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในตัวอย่างตะกอน

ตัวอย่างตะกอนหลังจากสกัดน้ำระหว่างตะกอนออก ซึ่งทำให้แห้งแล้ว นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ด้วยวิธีการ Walkey–Black (Loring and Rantala, 1995) รายละเอียดการเตรียมสารเคมี วิธีการวิเคราะห์ และการคำณวนหาปริมาณสารอินทรีย์ แสดงไว้ในภาคผนวก ง