บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์จำลองสภาพแวดล้อม
   1.1 ตู้กระจก 30x30x60 เซนติเมตร
   1.2 Bioball
   1.3 หัวทราย
2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง
   2.1 ขวดโพลีโพรไพลีนเก็บตัวอย่างดินตะกอน
   2.2 หลอดโพลีโพรไพลีน เก็บตัวอย่างน้ำทะเล
   2.3 Freeze Dry Heto LyoLab 3000
   2.4 ตู้แช่แข็ง (Freezer Revco รุ่น ULT 1050-5-v31)
3. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ทางเคมีสารประกอบบิวทิลทิน
   3.1 แกสโครมาโตกราฟฟีโฟโตเมตริกดีเทคเตอร์ (GC-FPD) Perkin Elmer Autosystem XL
   3.2 เครื่องลดปริมาตรแบบแกนหมุน (Rotary Evaporator Buchi)
   3.3 เครื่องเขย่าอ่างน้ำ (Water Bath Shaker)
   3.4 เครื่องเขย่า (Shaker)
   3.5 กรวยแยก (Separatory Funnel)
   3.6 ขวดจุกแก้ว (Stopper Flask)
   3.7 ขวดชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
   3.8 คอลัมน์และกรวยแยกสำหรับทำความสะอาดสารละลาย (Clean up)
   3.9 ขวดเก็บสารสกัด (Vial)
   3.10 ใยแก้ว (Glass Wool)
4. อุปกรณ์ในการวัดการเจริญและแยกเชื้อจุลินทรีย์
   4.1 จานเพาะเชื้อ (Petri-Dish)
   5.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
   5.3 กล้องจุลทรรศน์

4.4 แผ่นสไลด์

4.5 ห่วงเขี่ยเชื้อ

4.6 ตะเกียงอัลกอฮอล์

4.7 หลอดทดลองฝาเกลียว

4.8 ปิเปตที่มีขีดวัดปริมาตร

4.9 กระบอกฉีดยา

4.10 หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

4.11 ขวดซีรั่ม

4.12 Vortex Mixer

4.13 Autoclave

4.14 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

5. เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

5.1 เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำและอุณหภูมิ (YSI 58: USA)

5.2 เครื่องวัดความเค็มของน้ำ (Refractometer)

5.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH 330/ Set-1: Weilheim, Germany)

5.4 UV/VIS Spectrophotometer (1001 Plus: Milton Roy Spectronic)

6. เครื่องมือวัดค่า Oxidation-Reduction Potential ของชั้นดินตะกอน คือ Conductivity Pocket Testers (TI TDS-3)

สารเคมี

สารเคมีในการวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทิน

1. Tributyltin Chloride 97% (Fluka)
2. Dibutyltin Dichloride 97% (Fluka)
3. Butyltin Trichloride 95% (Aldrich)
4. Tropolone (Aldrich)
5. Hexane (Analytical Grade, Fisher)
6. Benzene (Analytical Grade, BDH)
7. Acetone (Analytical Grade, Merck)
8. Dimethyl Sulfoxide (Riedel)
9. Sodium Sulfate Anhydrous (Carlo)

10. Propyl Magnesium Chloride 2 mol/l in Diethyl Ether (Fluka)
11. Florisil 60-100 Mesh Pr (Mallinckrodt)
12. Hydrochloric Acid (Merck)
13. Sulfuric Acid (Merck)
14. Methanol (J.T.Baker)

สารเคมีสำหรับแยกเชื้อจุลินทรีย์

1. Crystal Violet
2. Ammonium Oxalate
3. Iodine
4. Potassium Iodide
5. Ethanol 95%
6. Safranin O
7. Paraffin Liquid
8. Sodium Chloride
9. Butyl Alcohol
10. *p*-Dimethylaminobenzoldehyde
11. Hydrogen Peroxide
12. Tetramethyl-p-Phenylenediamine Dihydrochloride

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย
   1.1 Sodium Hypochlorite
   1.2 Sodium Hydroxide
   1.3 Sodium Citrate
   1.4 Sodium Nitropusside
   1.5 Phenol
   1.6 Ammonium Chloride
2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์
   2.1 Sulphanilamide
   2.2 N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine Dichroride
   2.3 Sodium Nitrite ($NaNO_2$)

3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนเทรต

3.1 Sodium Arsenite

3.2 Brucine Sulfate

3.3 Sulfanilic Acid

3.4 Sulfuric Acid

3.5 Sodium Chloride

3.6 Potassium Nitrate (KNO_3)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic Soy Agar
2. Nutrient Agar
3. BT Medium
4. Tryptophan Broth
5. Lysine Iron Agar

วิธีทดลอง

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพของไตรบิวทิลทิน, ไดบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน ในดินตะกอนและน้ำทะเล

จำลองสภาพแวดล้อมโดยนำดินตะกอนซึ่งเก็บมาจากชายหาดบางเสร่ อ.สัตหีบ จ.ชลบุรี โดย Grab Sampler ซึ่งมีลักษณะเป็นดินทราย นำมาใส่ในตู้กระจกขนาด 30x30x60 เซนติเมตร ให้มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ใส่น้ำทะเล 34 ลิตร มีการหมุนเวียนน้ำระบบปิด โดยใช้ Bioball เป็นตัวกรอง (ดังแสดงในภาพที่ 10) แบ่งการทดลองเป็น 11 ชุด คือ

ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 ดินตะกอน+น้ำทะเล+ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 ดินตะกอน+น้ำทะเล+ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 ดินตะกอน+น้ำทะเล+ไดบิวทิลทินไดคลอไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 ดินตะกอน+น้ำทะเล+ไดบิวทิลทินไดคลอไรด์10ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 ดินตะกอน+น้ำทะเล+ บิวทิลทินไตรคลอไรด์ 5 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 6 ดินตะกอน+น้ำทะเล+ บิวทิลทินไตรคลอไรด์ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดควบคุม ชุดละ 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมสารลงไป

ชุดการทดลองที่ 7 ดินตะกอน+น้ำทะเล

ชุดควบคุม Bioball ชุดละ 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาการย่อยสลายในน้ำทะเลโดยที่ไม่มีดินตะกอน และการดูดซับสารของ Bioball มี 3 ชุด คือ

ชุดการทดลองที่ 8 น้ำทะเล + ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 9 น้ำทะเล + ไดบิวทิลทินไดคลอไรด์ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 10 น้ำทะเล + บิวทิลทินไตรคลอไรด์ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดควบคุมที่ไม่มี Bioball ชุดละ 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาการดูดซับสารของดินตะกอน

ชุดการทดลองที่ 11 ดินตะกอน+ น้ำทะเล+ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ 10ไมโครกรัมต่อลิตร

1.1 วัดค่า Oxidation-Reuction Potential ของดินตะกอนชั้นบนและชั้นล่าง ก่อนเติมสารลงในตู้ทดลอง

1.2 เก็บตัวอย่างดินตะกอน, น้ำทะเลในวันแรก, วันที่ 2, 4, 6, 10, 14, 22, 38, 56 และ 77 เพื่อวิเคราะห์หา ไตรบิวทิลทิน, ไดบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน โดยเก็บ น้ำทะเลที่บริเวณจุดกลางตู้ทดลองและต่ำกว่าระดับพื้นผิวน้ำ ส่วนดินตะกอนเก็บตัวอย่างจาก 3 จุดของตู้ทดลองและนำมารวมกัน โดยเก็บดินตะกอนชั้นบนก่อนและชั้นล่างตามลำดับด้วยเครื่องมือดังแสดงในภาพที่ 8

1.3 ตัวอย่างน้ำทะเลและดินตะกอนเก็บไว้ในขวดพลาสติก Polypropylene นำไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันที สำหรับตัวอย่างดินตะกอนก่อนจะนำไปวิเคราะห์ต้องนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ (Freeze Dry)

2. การวิเคราะห์ปริมาณ ไตรบิวทิลทิน, ไดบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน

การวิเคราะห์ปริมาณ ไตรบิวทิลทิน, ไดบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน ตามวิธีของ Iwata, Tanabe, Miyazaki and Tatsukawa (1994)

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ ไตรบิวทิลทิน, ไดบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน ในน้ำทะเล

2.1.1 นำตัวอย่างน้ำทะเล 50 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โทรโพโลนในเบนซิน 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.1.2 แยกชั้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โทรโพโลนในเบนซินมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 35 กรัม เพื่อกำจัดน้ำออกจากสารละลาย

2.1.3 แยกชั้นสารละลายมาลดปริมาตรให้เหลือ 3-5 มิลลิลิตร นำสารละลายใส่ในขวดชมพู่ 50 มิลลิลิตรที่มีจุกแก้วปิด และเติมสารละลายโพรพิลแมกนีเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร

2.1.4 เขย่าขวดชมพู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น และเติมสารละลาย 1 นอร์มัลกรดซัลฟุริก 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

2.1.5 ย้ายสารละลายไปใส่กรวยแยก ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์เบนซินในเฮกเซน 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ล้างด้วยเฮกเซน 40 มิลลิลิตร ล้างสารละลายที่อยู่ในขวดชมพู่ด้วยเมธานอล 10 เขย่าให้เข้ากัน และแยกชั้นของ 10 เปอร์เซนต์เบนซินในเฮกเซนไปลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 3-5 มิลลิลิตร

2.1.6 นำสารละลายมา Clean up ด้วยฟลอริซิลโดยการแพ็คคอลัมน์ นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แล้วไปลดปริมาตรให้เหลือ 5 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟีที่ต่อกับเฟลมโฟโตเมตริก ดีเทคเตอร์

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ ไตรบิวทิลทิน, ไดบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน ในดินตะกอน

2.2.1 นำตัวอย่างดินตะกอน 10 กรัม (น้ำหนักแห้ง) เติมสารละลาย 1 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์โทรโพโลนในอะซิโตน 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยง

2.2.2 นำส่วนสารละลายมาใส่ในกรวยแยก ที่มี 0.1 เปอร์เซนต์โทรโพโลนในเบนซิน 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ล้างด้วยเฮกเซน 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

2.2.3 แยกชั้นสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์โทรโพโลนในเบนซิน ใส่ในขวดชมพู่ 250 มิลลิลิตร เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 35 กรัม เพื่อกำจัดน้ำออกจากสารละลาย

2.2.4 นำสารละลายมาลดปริมาตรให้เหลือ 3-5 มิลลิลิตร และใส่ในขวดชมพู่ 50 มิลลิลิตรที่มีจุกแก้วปิด เติมสารละลายโพรพิลแมกนีเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร

2.2.5 เขย่าขวดชมพู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น และเติมสารละลาย 1 นอร์มัลกรดซัลฟุริก 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

2.2.6 ย้ายสารละลายไปใส่กรวยแยก ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์เบนซินในเฮกเซน 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ล้างด้วยเฮกเซน 40 มิลลิลิตร ล้างสารละลายที่อยู่ในขวดชมพู่ด้วยเมธานอล 10 เขย่าให้เข้ากัน และแยกชั้นของ 10 เปอร์เซนต์เบนซินในเฮกเซนไปลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 3-5 มิลลิลิตร

2.2.7 นำสารละลายมา Clean up ด้วยฟลอริซิลโดยการแพ็คคอลัมน์ นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แล้วไปลดปริมาตรให้เหลือ 5 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟีที่ต่อกับเฟลมโฟโตเมตริก ดีเทคเตอร์

3. การวิเคราะห์

3.1 นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟีที่ต่อกับเฟลมโฟโตเมตริก ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร คอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร หนา 0.25 ไมครอน อุณหภูมิ Injector 150 องศาเซลเซียส Detector 270 องศาเซลเซียส และ Oven 100 องศาเซลเซียส 1 นาที 280 องศาเซลเซียส 10 นาที โดยมีอัตราการเพิ่ม 10 องศาเซลเซียส /นาที อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน อากาศและไนโตรเจนที่ 90, 110 และ 5 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ โดยขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (Detection Limit) คือ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.2 สารมาตรฐานที่ใช้คือ ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ (TBT), ไดบิวทิลทินไดคลอไรด์ (DBT) และ บิวทิลทินไตรคลอไรด์ (MBT) โดยการเปรียบเทียบเวลาที่พีคของสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับเวลาที่พีคของสารมาตรฐานถูกชะออกจากคอลัมน์ซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละพีคเป็นสารมาตรฐานชนิดใด ถ้าพีคของสารตัวอย่างใช้เวลาในการชะออกจากคอลัมน์ตรงกับพีคของสารมาตรฐานชนิดใด แสดงว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

4. การหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทินในตัวอย่าง ซึ่งเป็นสารตกค้างจากสภาพแวดล้อม เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่มีค่าต่ำมาก (Trace Analysis) ผลการวิเคราะห์อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นจึงต้องทำการหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หรือร้อยละการกลับคืน (% Recovery) โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในตัวอย่าง นำไปสกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารด้วยวิธีการเดียวกับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทั้งหมด แล้วนำพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) ไปเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน โดยประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทิน มีดังนี้

- สาร TBT จากน้ำทะเล 84.70 % ดินตะกอน 91.73%
- สาร DBT จากน้ำทะเล 84.28 % ดินตะกอน 97.92%
- สาร MBT จากน้ำทะเล 86.49 % ดินตะกอน 85.07%

5. การเจริญของจุลินทรีย์จากดินตะกอน

5.1 เตรียมสารละลายดินตะกอน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยนำดินตะกอนจากชุดการทดลองที่มีการย่อยสลาย 10 กรัม ใส่ในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเติมสาร TBT DBT และ MBT ให้มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

5.2 ถ่ายเชื้อลงในขวดใหม่ โดยดูดสารละลายมา 50 มิลลิลิตร เติมน้ำทะเลลงไปอีก 50 มิลลิลิตร เติมสารประกอบบิวทิลทินชนิดต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

5.3 ถ่ายเชื้อลงในขวดใหม่จนกว่าดินตะกอนจะหมดไป

5.4 นำขวดซีรั่มมา 5 ขวด แบ่งเป็น 2 ชุดคือ ชุดทดลอง 3 ขวดและชุดควบคุม 2 ขวด เติม BT Medium ขวดละ 47.5 มิลลิลิตร เติม Suspension ของจุลินทรีย์ผสม 2 มิลลิลิตร ในชุดควบคุมและนำขวดทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วจึงเติม Suspension ของจุลินทรีย์ผสมในขวดชุดทดลอง

5.5 เติม PS1 และ VS Salts ขวดละ 0.25 มิลลิลิตร

5.6 เติมสาร TBT ให้มีความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร

5.7 ชุดทดลองของสาร DBT และ MBT ทำเช่นเดียวกับชุดทดลองของสาร TBT แต่เปลี่ยนจากสาร TBT เป็นสาร DBT และ MBT แทน

5.8 เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 9 และ 14 นำไปวัดการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร

6. การจำแนกสกุลจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารประกอบบิวทิลทิน

6.1 นำ Suspension ของจุลินทรีย์ผสมมาเกลี่ยบนอาหาร Tryptic Soy Agar ที่มี TBT, DBT และ MBT เป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นแต่ละชนิด 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร

6.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารแข็งมาถ่ายเชื้อต่อไปบนอาหาร Tryptic Soy Agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์

6.3 นำเชื้อบริสุทธิ์มาจำแนกสกุล โดยนำไปทดสอบทางชีวเคมีดังนี้

6.3.1 การย้อมสีแกรม (Koneman, Allen, Dowell & Sommers, 1983)

6.3.2 การสร้างเอนไซม์ Catalase (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

6.3.3 ทดสอบการเคลื่อนที่ (จำนง วิสุทธิแพทย์, 2522)

6.3.4 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Gerhard et al., 1981)

6.3.5 ความสามารถในการผลิต Indole (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

6.3.6 ความสามารถในการผลิต Lysine Decarboxylase (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

7. การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำทะเล

ทำการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำทะเลทุก 7 วัน

7.1 การวัดปริมาณแอมโมเนีย ประยุกต์จากคุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางการประมงของไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ (2528)

7.1.1 เจือจางน้ำตัวอย่าง 10 เท่า โดยใช้น้ำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ปราศจากไอออน 1,800 ไมโครลิตร

7.1.2 เติม Phenol Reagent 80 ไมโครลิตร

7.1.3 เติม Sodium Nitroprusside 80 ไมโครลิตร

7.1.4 เติม Oxidizing Reagent 200 ไมโครลิตร

7.1.5 ปิดปลายหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แต่ไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ได้สารละลายสีน้ำเงิน

7.1.6 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

7.2 การวัดปริมาณไนไทรต์ ประยุกต์จากคู่มือวิเคราะห์น้ำทะเลของ Strickland and Parson (1972)

7.2.1 เจือจางน้ำตัวอย่าง 10 เท่า โดยใช้น้ำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ปราศจากไอออน 1,800 ไมโครลิตร

7.2.2 เติม Sulphanilamide Solution 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที

7.2.3 เติม NNED Solution 40 ไมโครลิตร

7.2.4 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง จะเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ได้สารละลายสีบานเย็น

7.2.5 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

7.3 การวัดปริมาณไนเทรต ประยุกต์จากคู่มือวิเคราะห์น้ำเสียของมั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ (2538)

7.3.1 เจือจางน้ำตัวอย่าง 10 เท่า โดยใช้น้ำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ปราศจากไอออน 1,800 ไมโครลิตร

7.3.2 เติม Sodium Chloride Solution 400 ไมโครลิตร

7.3.3 เติม Sulfuric Acid Solution 2 มิลลิลิตร นำไปตั้งให้เย็นในน้ำแข็ง

7.3.4 เติม Brucine-Sulfanilic Acid 100 ไมโครลิตร

7.3.5 นำไปอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาแช่ให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง

7.3.6 นำสารละลายไปวัด % Transmission ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

สถานที่ดำเนินการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สถานที่วิเคราะห์คุณภาพน้ำและสารประกอบบิวทิลทิน ได้แก่ ห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษา อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

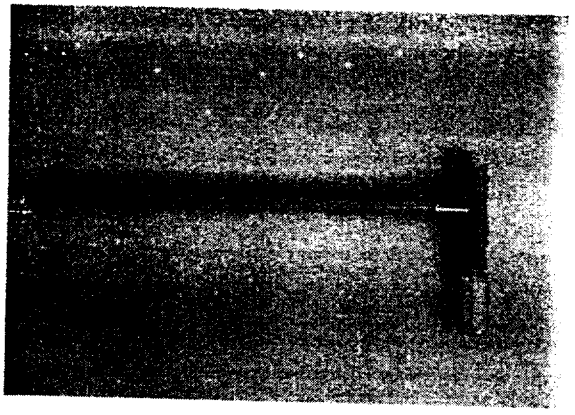
ทำการศึกษาระหว่างเดือน มิถุนายน 2546-มีนาคม 2547

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

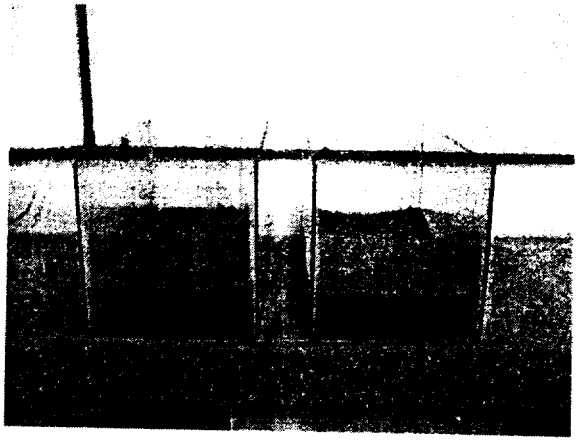
ประมวลผลโดยใช้โปรแกรม SPSS for Window Version 10.5

ใช้สถิติวิเคราะห์ One-Way ANOVA ในการทดสอบความแตกต่างของคุณภาพน้ำทะเล ได้แก่ ค่าออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม แอมโมเนีย ไนไทรต์และไนเทรต

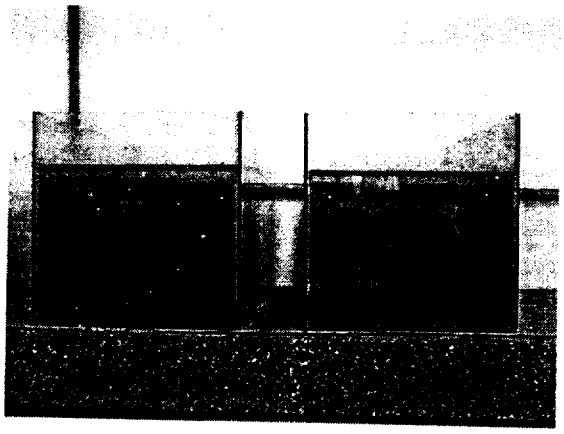
ใช้สถิติวิเคราะห์ Two-Way ANOVA ในการทดสอบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงสภาพของสาร TBT DBT และ MBT ในน้ำทะเลและดินตะกอน ตลอดจนการเปรียบเทียบปริมาณสารตั้งต้น TBT DBT และ MBT ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ในน้ำทะเลและดินตะกอน รวมทั้งการเปรียบเทียบปริมาณสารตั้งต้น TBT DBT และ MBT ในดินตะกอนชั้นบนและชั้นล่าง และ Fate ของสารตั้งต้น TBT DBT และ MBT ในน้ำทะเลและดินตะกอน



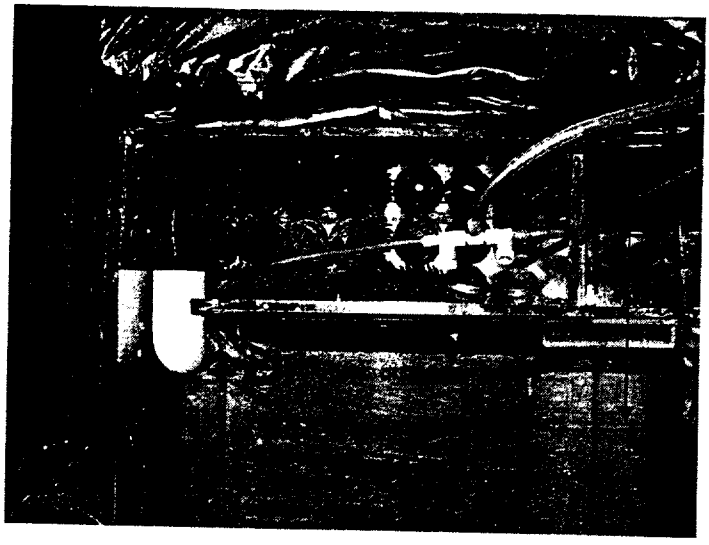
ภาพที่ 8 เครื่องมือเก็บดินตะกอนจากตู้ทดลอง



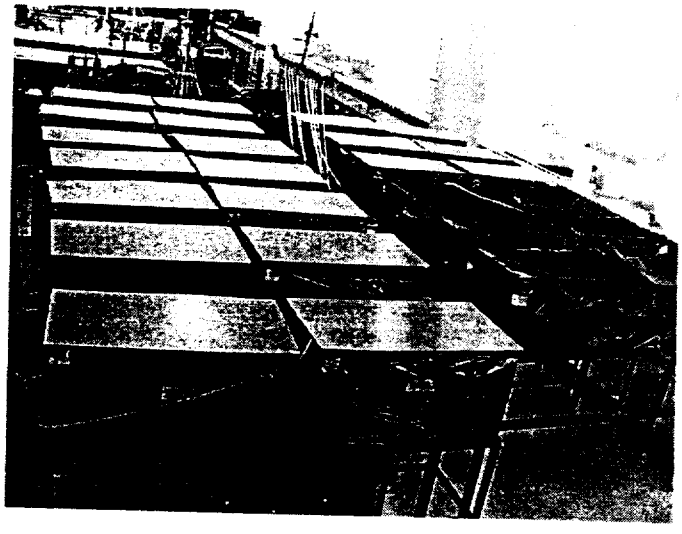
ภาพที่ 9 แสดงการใส่ดินตะกอนในตู้ทดลอง



ภาพที่ 10 แสดงการใส่ดินตะกอนและน้ำทะเลในตู้ทดลอง



ภาพที่ 11 แสดงระบบการหมุนเวียนของน้ำในตู้ทดลองโดยใช้ Bioball



ภาพที่ 12 แสดงตู้ทดลองที่ใส่สารไตรบิวทิลทิน ไดบิวทิลทินและโมโนบิวทิลทิน และชุดควบคุม