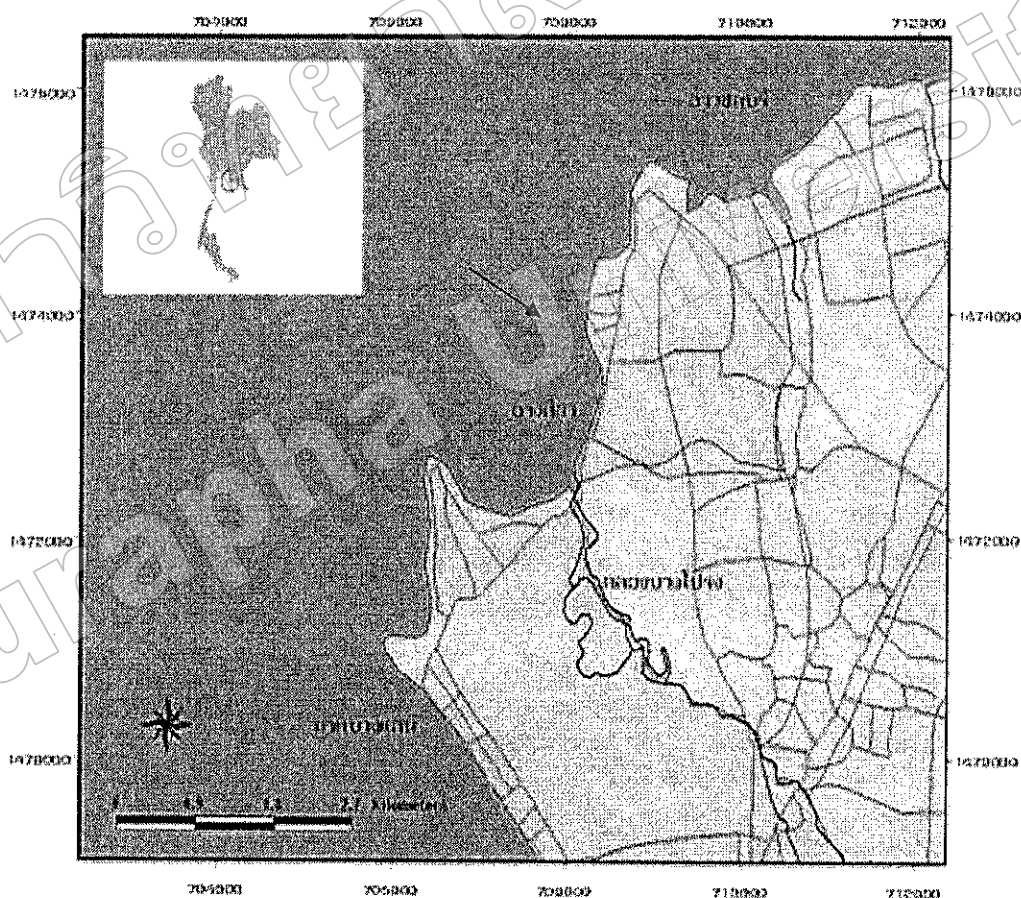


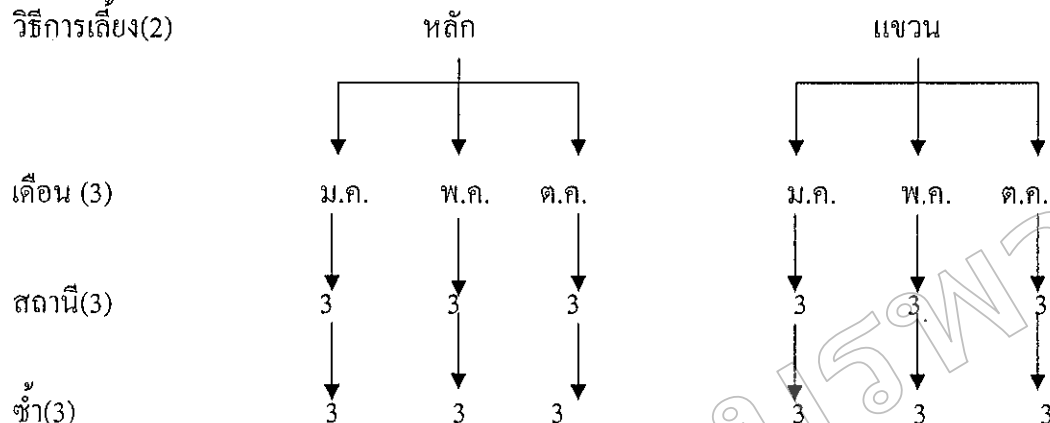
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาผลของฤดูกาลและวิธีการเลี้ยงต่อการปนเปื้อนของโลหะหนักและแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในน้ำทะเล ดินตะกอน และหอยนางรม บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ดินตะกอน และหอยนางรม บริเวณที่มีการเลี้ยงหอยนางรมแบบแขวน จำนวน 3 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำ และแบบหลัก จำนวน 3 สถานี สถานีละ 3 ซ้ำในเดือน มกราคม พฤษภาคม และตุลาคม 2547 มีผลการศึกษาดังนี้



วิธีการเลี้ยง(2)



ภาพที่ 4 แผนการเก็บตัวอย่างการปนเปื้อนของโลหะหนักและแบคทีเรียกลุ่มวับริโอ ในน้ำทะเล ดินตะกอน และหอยนางรม

การปฏิบัติงานภาคสนาม

ในการปฏิบัติงานภาคสนามจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ดินตะกอนและหอยนางรม จากแหล่งเลี้ยงหอยนางรมแบบหลักและแบบแขวน พร้อมทั้งทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ โดยใช้เครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหลายหัวอ่าน YSI Multiprobe Model 600XL ที่ได้ทำการปรับความเที่ยงตรงของเครื่องมือ (Calibration) ตามมาตรฐานของเครื่องมือ ก่อนทำการตรวจวัดทุกครั้ง

1. การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล เพื่อตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มวับริโอ ซึ่งจะทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลโดยใช้ขวดพลาสติกที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (121 องศาเซลเซียส 15 นาที) และนำมาวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มวับริโอภายใน 24 ชั่วโมง

2. การเก็บตัวอย่างดินตะกอน ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ชุดเก็บตัวอย่างดิน (Grab) หลังจากนั้นตักดินใส่ในภาชนะพลาสติก เพื่อนำมาวิเคราะห์โลหะหนัก แخذตัวอย่างดินในภาชนะและรักษาอุณหภูมิด้วยน้ำแข็ง ส่วนดินที่จะนำมาวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มวับริโอ จะใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิปกติ

3. การเก็บตัวอย่างหอยนางรม ทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากแหล่งเลี้ยงแบบแขวน โดยใช้มีดตัดพวงหอยนางรมจากแพเลี้ยงหอย ส่วนหอยนางรมที่เลี้ยงแบบหลัก เก็บโดยเคาะเอาหอยนางรมจากหลักที่หอยเกาะ แล้วทำการแบ่งตัวอย่างหอยนางรมออกเป็นสองส่วน เพื่อวิเคราะห์หาโลหะหนักและแบคทีเรียกลุ่มวับริโอ โดยตัวอย่างหอยนางรมที่จะทำการวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มวับริโอ จะเก็บในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ และนำกลับมาวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

1. ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม vibrio วิเคราะห์ตามวิธีการของ American Public Health Association (APHA) และ Food and Drug Administration (FDA)

1.1 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในน้ำทะเล

เจือจางตัวอย่างน้ำด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2% NaCl ให้เจือจางลงเป็น 10 และ 100 เท่า แล้วเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Salt) โดยวิธีเกลี่ยกระจาย (Spread Plate Technique) และนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเขียนเชื้อที่สงสัยไปทำการทดสอบทางชีวเคมี (ภาคผนวก ข) เพื่อแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio

1.2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในดินตะกอน

ชั่งตัวอย่างดินตะกอนประมาณ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2% NaCl นำไปเข้าเครื่องตีปั่นให้ละเอียด (Homogenate) แล้วทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10 และ 100 เท่า จากนั้นทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS โดยวิธีกระจายเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เขียนเชื้อที่สงสัยไปทำการทดสอบทางชีวเคมีเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในน้ำทะเล

1.3 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ในหอยนางรม

แกะตัวอย่างหอยนางรมโดยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic) นำเนื้อหอยมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งเนื้อหอยประมาณ 25 กรัม เติมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2% NaCl นำไปเข้าเครื่องตีปั่นให้ละเอียด (Homogenate) แล้วทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10 และ 100 เท่า จากนั้นทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS โดยวิธีกระจายเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เขียนเชื้อที่สงสัยไปทำการทดสอบทางชีวเคมีเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในน้ำทะเลและดินตะกอน

2. โลหะหนัก

2.1 การเตรียมตัวอย่างดินตะกอน

ชั่งตัวอย่างดินประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงใน Vessel เติม HNO_3 : HCl : DI ในอัตราส่วน 6: 2: 10 มิลลิลิตร (HCl : HNO_3 ใช้กรดที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง) เมื่อใส่กรดเสร็จแล้วนำไปเข้าเครื่อง Microwave Digester ยี่ห้อ CEM รุ่น MAR5X ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำ DI

(De-Ionized) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปรอท 20 มิลลิลิตร และสำหรับวิเคราะห์โลหะหนักอื่น ๆ 30 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรม

ซึ่งตัวอย่างหอยนางรมที่บดละเอียดประมาณ 0.25 กรัม ใส่ลงใน Vessel เติม HNO_3 ; H_2O_2 ; DI ในอัตราส่วน 10: 4: 6 มิลลิลิตร (HNO_3 ใช้กรดที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง) เมื่อใส่กรดเสร็จแล้วนำไปเข้าเครื่อง Microwave Digester ยี่ห้อ CEM รุ่น MAR5X ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำ DI (De-Ionized) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 มิลลิลิตร แบ่งตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปรอท 20 มิลลิลิตร และสำหรับวิเคราะห์โลหะหนักอื่น ๆ 30 มิลลิลิตร

2.3 การวิเคราะห์โลหะหนัก

วิเคราะห์ปรอทโดยใช้เทคนิค Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry โดยใช้เครื่อง Atomic Fluorescence Spectrometry ของ PSA analytical รุ่น Merlin วิเคราะห์โลหะหนักชนิดอื่น ๆ ได้แก่ แคดเมียม ตะกั่ว นิกเกิล โดยใช้เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry ของ UNICAM รุ่น 989 QZ และวิเคราะห์ทองแดง สังกะสี เหล็ก โดยใช้เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrometry ของ VARIAN รุ่น SpectrAA 55B

ผลการวิเคราะห์ % Recovery โดยใช้สารมาตรฐาน MESS-2

การวิเคราะห์ % Recovery เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือและกระบวนการในการวิเคราะห์ปริมาณปรอทและโลหะหนัก โดยใช้สารมาตรฐาน MESS-2 จำนวน 8 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 % Recovery ของสารมาตรฐาน MESS-3

Heavy Metal	No. of test	Mean $\pm$ SD. (ug/g)	Certified Values	% Recovery
Hg	8	0.084 $\pm$ 0.002	0.091	92.5
Cd	8	0.23 $\pm$ 0.02	0.24	97.0
Cu	8	33.08 $\pm$ 2.95	33	93.7
Fe	8	48.6 $\pm$ 2.95	43	113.1
Ni	8	50.5 $\pm$ 0.72	46	109.7
Pb	8	21.1 $\pm$ 1.30	21	100.5
Zn	8	148.71 $\pm$ 4.45	155	95.9

ผลการวิเคราะห์ % Recovery โดยใช้สารมาตรฐาน DORM-2

การวิเคราะห์ % Recovery เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือและกระบวนการในการวิเคราะห์ปริมาณปรอทและโลหะหนัก โดยใช้สารมาตรฐาน DORM-2 (Dog Fish Muscle) จำนวน 8 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 % Recovery ของสารมาตรฐาน DORM-2

Heavy Metal	No. of Test	Mean $\pm$ SD. (ug/g)	Certified Values	% Recovery
Hg	8	4.83 $\pm$ 0.045	4.64	94.4
Cd	8	0.39 $\pm$ 0.011	0.43	90.7
Cu	8	2.65 $\pm$ 0.060	2.34	113.5
Fe	8	135.26 $\pm$ 10.40	142	95.3
Ni	8	19.99 $\pm$ 2.47	19.4	103.0
Pb	8	0.07 $\pm$ 0.006	0.065	107.7
Zn	8	24.37 $\pm$ 0.095	25.6	95.2

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Version 11.0)

1. การศึกษาปริมาณรวมแบคทีเรียกลุ่ม vibrio

ทำการแปลงข้อมูลของปริมาณแบคทีเรียด้วย $\text{Log}(x)$ เมื่อ x คือ ปริมาณแบคทีเรีย เพื่อให้ข้อมูลของปริมาณแบคทีเรียมีการกระจายแบบปกติ และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย คือ เดือนที่เก็บตัวอย่างและรูปแบบการเลี้ยง โดยใช้สถิติ Student-Newman-Kuels (S-N-K)

2. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio

ทำการแปลงข้อมูลของปริมาณแบคทีเรียด้วย $\text{Log}(x)$ เมื่อ x คือ ปริมาณแบคทีเรีย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนจาก 3 ปัจจัย คือ เดือนที่เก็บตัวอย่าง รูปแบบการเลี้ยง และชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม vibrio โดยใช้สถิติ Student-Newman-Kuels (S-N-K)

3. การศึกษาปริมาณการสะสมโลหะหนัก

วิเคราะห์ความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย คือ เดือนที่เก็บตัวอย่างและรูปแบบการเลี้ยง โดยใช้สถิติ Student-Newman-Kuels (S-N-K)