บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาอัตราการลดลงของ *E. coli*, *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* รวมถึงโลหะหนักได้แก่ Hg, Cd, Pb, Cu, Fe และ Zn ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) จากแหล่งเพาะเลี้ยงธรรมชาติก่อนการบริโภค โดยใช้ระบบ Depuration ที่ออกแบบโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรีย และระบบกรองที่สามารถดักจับโลหะหนักที่หอยนางรมปากจีบปลดปล่อยออกมากับมวลน้ำ เพื่อไม่ให้หอยนางรมปากจีบมีโอกาสสะสมโลหะหนักกลับคืนได้

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรียที่เติม (Spike) ลงในมวลน้ำที่อัตราการไหลของน้ำ 3 และ 6 ลิตรต่อนาที
2. การทดสอบผลของระบบกรองต่อประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในมวลน้ำ
3. การทดสอบระบบ Depuration ในการลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและโลหะหนักในหอยนางรมปากจีบ
4. การปรับปรุงระบบ โดยทำการจัดการกับตะกอนที่เกิดขึ้นจากการที่หอยคายออกมา

มีรายละเอียดและวิธีการดำเนินการดังนี้

3.1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ระบบ Depuration

3.1.1.1 ถังพลาสติกทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 140 เซนติเมตร สูง 85 เซนติเมตร

3.1.1.2 ถังพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า

3.1.1.3 ถังพลาสติกทรงสามเหลี่ยม

3.1.1.4 หลอดอัลตราไวโอเลตขนาดกำลังไฟ 30 วัตต์ 2 หลอด

3.1.1.5 ปั๊มน้ำ

3.1.1.6 วัสดุดูดซับโลหะหนัก (หินปะการัง ซีโอไลท์ ถ่านกัมมันต์และหินภูเขาไฟ)

3.1.1.7 คลอรีนผง

3.1.1.8 โซเดียมไธโอซัลเฟต ($NaSiO_3$)

3.1.1.9 น้ำยาเคมีสำหรับทดสอบคลอรีนในน้ำทะเล (วิธีการเตรียมดูจากภาคผนวก)

3.1.2 การวิเคราะห์แบคทีเรีย

3.1.2.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้เติมในมวลน้ำ ได้แก่ *E. coli* นำมาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา *V. cholerae* non O1 (DMST No. 2873) และ *V. parahaemolyticus* (DMST No. 21243) นำมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.1.2.2 Tryptic Soy Agar (Difco)

3.1.2.3 Tryptic Soy Broth (Difco)

3.1.2.4 Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (Difco)

3.1.2.5 Coli ID (Bio mérieux)

3.1.2.6 Phosphate Buffer Saline (PBS) 2% NaCl

3.1.2.7 ตู้บ่มเชื้อ Memmert Incubator INB 400

3.1.2.8 เครื่องตีปั่น (Stomacher) (AES Laboratoier)

3.1.2.9 ชุดทดสอบสำเร็จรูป API-20E (Bio mérieux)

3.1.3 การวิเคราะห์โลหะหนัก

3.1.3.1 กรดไนตริกเข้มข้น (Conc. HNO_3)

3.1.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

3.1.3.3 เครื่อง Microwave Digester (CEM รุ่น MAR5X)

3.1.3.4 เครื่อง Atomic Fluorescense Spectrometry (PSAnalytical รุ่น Merlin)

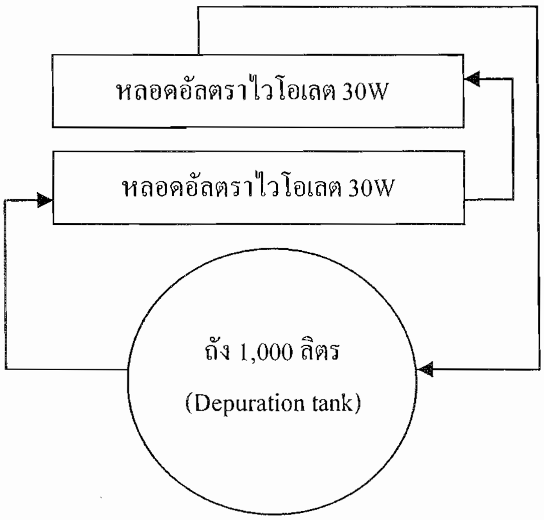
3.1.3.5 เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (UNICAM รุ่น 989 QZ)

3.1.3.6 เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrometry (VARIAN รุ่น SpectrAA 55B)

3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในมวลน้ำที่อัตราการไหลของน้ำ 3 และ 6 ลิตรต่อนาที

3.2.1 การออกแบบระบบ

ระบบประกอบด้วยถังพลาสติกทรงกระบอก บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ปริมาตร 700 ลิตร และหลอดอัลตราไวโอเลตขนาดกำลังไฟ 30 วัตต์ จำนวน 2 หลอด บรรจุอยู่ในท่อแสตนเลส ความยาว 77.5 เซนติเมตร การทดสอบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในขั้นตอนนี้ จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตที่อัตราการไหลของน้ำ 3 และ 6 ลิตรต่อนาที โดยน้ำทะเลจะถูกปั๊มผ่านหลอดอัลตราไวโอเลต ซึ่งใช้ในการฆ่าแบคทีเรียที่เติมลงในมวลน้ำ โดยน้ำจะผ่านจากท่อที่ 1 เข้าสู่ท่อที่ 2 แล้วไหลกลับลงสู่ถังพลาสติกทรงกระบอก (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 แสดงระบบการทดสอบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียที่เติมลงในมวลน้ำ (ขั้นตอนที่ 1)

3.2.2 การเตรียมน้ำทะเล

น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ทำการฆ่าแบคทีเรียในน้ำด้วยคลอรีนความเข้มข้น 10 ppm ก่อนเริ่มการทดลองต้องตรวจสอบปริมาณ *E. coli*, *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.2.5 โดยผลการตรวจต้องไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำทะเล และต้องตรวจสอบคลอรีนในน้ำทะเลด้วยน้ำยาเคมีสำหรับทดสอบคลอรีนในน้ำทะเล (วิธีการเตรียมน้ำยาเคมีและขั้นตอนในการทดสอบดูจากภาคผนวก) ถ้าตรวจพบว่ายังคงมีคลอรีน ให้เติมโซเดียมไธโอซัลเฟตเพื่อเป็นการกำจัดคลอรีนที่ตกค้างอยู่ในน้ำทะเล และตรวจสอบอีกครั้งจนแน่ใจว่าไม่มีคลอรีนตกค้างจึงเริ่มทำการทดลอง

3.2.3 การเตรียม Cell Suspension

3.2.3.1 *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

เพาะเชื้อ *V. cholerae* non O1 (DMST No. 2873) และ *V. parahaemolyticus* (DMST No. 21243) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) +2% NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) +2% NaCl นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำมาวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (Marino et al., 2005; Wang et al., 2010) และปรับให้มีค่าเท่ากับ 0.2 สำหรับเชื้อ *V. cholerae* และ 0.3 สำหรับเชื้อ *V. paraheamolyticus* จะได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำ Cell Suspension ที่ได้มาเติมลงในน้ำทะเล โดยรอให้น้ำทะเลและ Cell Suspension ผสมเข้ากันดีก่อนจึงเริ่มทำการทดลอง

3.2.3.2 *E. coli*

เพาะเชื้อ *E .coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ *E. coli* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Marino et al., 2005) และปรับให้มีค่าเท่ากับ 0.6 จะได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์ *E. coli* ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเซลล์ที่ได้มาเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำ Cell Suspension ที่ได้มาเติมลงในน้ำทะเล โดยรอให้น้ำทะเลและ Cell Suspension ผสมเข้ากันดีก่อนจึงเริ่มทำการทดลอง

3.2.4 การเก็บตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำมาทำการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ด้วยขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณปากท่อที่ไหลกลับเข้าสู่ถังเริ่มต้นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างน้ำครั้งละ 3 ซ้ำ

3.2.5 การวิเคราะห์แบคทีเรียในตัวอย่างน้ำทะเลในห้องปฏิบัติการ

3.2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเล

(ดัดแปลงจาก Charles & Angelo, 2004)

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเป็น 10, 100 และ 1,000 เท่า ด้วยสารละลาย PBS 2% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นถ่ายตัวอย่างที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร นำไปเกลี่ยกระจาย (Spread Plate Technique) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยตู้บ่มเชื้อ Memmert Incubator INB 400 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยโคโลนีสีเหลืองที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS คือเชื้อ *V. cholerae* และโคโลนีสีเขียวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS คือ *V. parahaemolyticus* ดังแสดงในภาพที่ 3-2 (ก)

3.2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* ในน้ำทะเล (ทัศวรรณ ขาวสีจาน และสุวรรณา ภาณุตระกูล, 2551)

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเป็น 10, 100 และ 1,000 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นถ่ายตัวอย่างที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Coli ID จำนวน 2 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยตู้บ่มเชื้อ Memmert Incubator INB 400 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผล โดยโคโลนีสีชมพูเข้มที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Coli ID คือเชื้อ *E. coli* ดังแสดงในภาพที่ 3-2 (ข)

(ก)

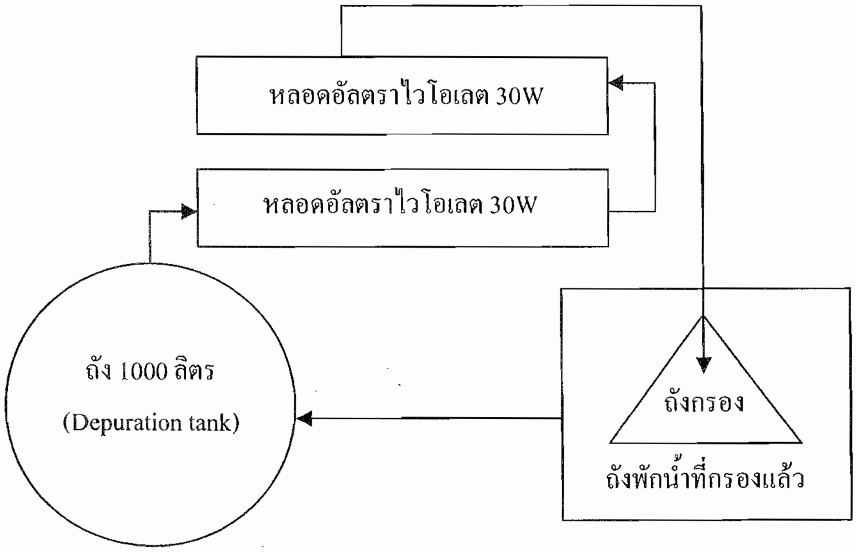
(ข)

ภาพที่ 3-2 ลักษณะโคโลนี *V. cholerae* (โคโลนีสีเหลือง) และ *V. parahaemolyticus* (โคโลนีสีเขียว) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (ก) และโคโลนี *E. coli* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Coli ID (ข)

3.3 การทดสอบผลของระบบกรองต่อประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในมวลน้ำ

3.3.1 การออกแบบระบบ

ระบบประกอบไปด้วยถังพลาสติกทรงกระบอก บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ปริมาตร 700 ลิตร ทำหน้าที่เป็นถังบำบัด หลอดอัลตราไวโอเลตขนาดกำลังไฟ 30 วัตต์ จำนวน 2 หลอด บรรจุอยู่ในท่อแสตนเลส ทำหน้าที่ฆ่าแบคทีเรียในน้ำทะเลและถังพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ทำหน้าที่เป็นถังพักน้ำที่กรองแล้ว ข้างในถังพลาสติกสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีถังกรองทรงสามเหลี่ยมซ้อนอยู่ ภายในถังกรองทรงสามเหลี่ยมประกอบด้วย หินปะการัง ซีโอไลท์ ถ่านกัมมันต์และหินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1:1 (โดยปริมาตร) ก่อนนำมาใช้จะทำความสะอาดวัสดุกรองด้วยคลอรีนแล้วล้างคลอรีนที่เหลืออยู่ออกด้วยสารละลายไธโอซัลเฟต โดยน้ำทะเลในถังบำบัดถูกปั๊มเข้าสู่ท่อแสตนเลสที่มีหลอดอัลตราไวโอเลต แล้วไหลลงสู่ถังกรอง และน้ำจากถังกรองจะไหลออกทางด้านล่างของถังลงสู่ถังพักน้ำที่กรองแล้ว น้ำจากถังพักน้ำถูกปั๊มกลับมายังถังบำบัดที่อัตราการไหลของน้ำ 3 ลิตรต่อนาที โดยระบบดังกล่าวนี้จะใช้ในการทดลองในขั้นตอนที่ 2, 3 และ 4 (ภาพที่3-3)



ภาพที่ 3-3 แสดงระบบ Depuration ที่ใช้ในขั้นตอนที่ 2, 3 และ 4

3.3.2 ขั้นตอนการดำเนินการ

ทำการเตรียมน้ำทะเลที่ใช้ในระบบ Depuration ตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.2.2 เมื่อได้น้ำทะเลที่ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียแล้วจึงทำการเติม Cell Suspension ที่เตรียมไว้ตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 2.2.3 ลงในระบบ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 และ 96 แล้วนำตัวอย่างน้ำที่ได้มาทำการวิเคราะห์แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.2.5

3.4 การทดสอบระบบ Depuration ในการลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและโลหะหนักในหอยนางรมปากจีบ

3.4.1 การออกแบบระบบและการเตรียมน้ำทะเล

ดำเนินการตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.3.1 และ 3.2.2 ตามลำดับ

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

หอยนางรมปากจีบที่นำมาทำการทดลองเป็นหอยนางรมปากจีบที่มาจากแหล่งเลี้ยงหอยในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี นำหอยนางรมปากจีบที่ได้มาทำความสะอาดโดยใช้แปรงขัดเอาโคลนและเพรียงที่ติดตามเปลือกหอยนางรมออก แล้วนำไปล้างในน้ำทะเลสะอาด ทำการสุ่มตัวอย่างหอยนางรมปากจีบที่ใช้ในการทดลองมาชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักทั้งเปลือก) จำนวน 25 ตัว เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบน้ำหนัก โดยในขั้นตอนที่ 3 มีน้ำหนักรวมเปลือกทั้งจำนวน 25 ตัว อยู่ที่ประมาณ 1 กิโลกรัม และในขั้นตอนที่ 4 มีน้ำหนักรวมเปลือกทั้งจำนวน 25 ตัว อยู่ที่ 0.8 กิโลกรัม ในการทดลองครั้งนี้ใช้หอยนางรมปากจีบในบ่อพัก 350 ตัวต่อน้ำ 700 ลิตร ดังนั้นความหนาแน่นของหอยนางรมปากจีบอยู่ที่ 1 ตัวต่อน้ำ 2 ลิตร

3.4.3 การเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ

เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบก่อนเริ่มทำการทดลอง เพื่อทราบระดับการปนเปื้อนของปริมาณแบคทีเรียและโลหะหนักในเนื้อหอยนางรมปากจีบก่อนเริ่มทำการทดลอง และเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบที่ผ่านระบบ Depuration ที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงโดยจะเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบสำหรับวิเคราะห์หาแบคทีเรียจำนวน 10 ตัว ทั้งหมด 3 ซ้ำ และสำหรับวิเคราะห์โลหะหนักจำนวน 1 ตัว ทั้งหมด 5 ซ้ำ รวมเป็น 35 ตัว โดยแบ่ง 5 ตัวในแต่ละซ้ำสำหรับวิเคราะห์หา *V. cholerae* และ *V. paraheamolyticus* และอีก 5 ตัวในแต่ละซ้ำสำหรับวิเคราะห์หา *E. coli* สำหรับ 5 ตัวที่เหลือ นำมาแกะเปลือกและเก็บในถุงพลาสติก แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์โลหะหนักต่อไป

3.4.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ

3.4.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณ *V. cholerae* และ *V. paraheamolyticus* ในหอยนางรมปากจีบ (ดัดแปลงจาก Charles & Angelo, 2004)

ทำการแกะตัวอย่างหอยนางรมปากจีบจำนวน 5 ตัวในแต่ละซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic) แล้วเติมสารละลาย PBS 2% NaCl นำไปทำให้ละเอียด (Homogenate) โดยเครื่องตีปั่น (Stomacher) ของ AES Laboratoier แล้วทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10, 100 และ 1,000 เท่า ด้วยสารละลาย PBS 2% NaCl จากนั้นถ่ายตัวอย่างที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มิลลิลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จำนวน 2 ซ้ำ แล้วนำจานไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยตู้บ่มเชื้อ Memmert Incubator INB 400 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เขี่ยเชื้อที่มีลักษณะและสีของโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *V. cholerae* และ *V. paraheamolyticus* ไปทำการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อแยกชนิดและทำการยืนยันผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API-20E (Bio mérieux) ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* โดยขั้นตอนและวิธีการทดสอบให้ดำเนินการตามขั้นตอนที่คู่มือกำหนด

3.4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* ในหอยนางรมปากจีบ (ทัศวรรณ ขาวสีจาน และสุวรรณา ภาณุตระกูล, 2551)

นำตัวอย่างหอยนางรมปากจีบจำนวน 5 ตัวที่เหลือในแต่ละซ้ำ มาแกะด้วยวิธีปลอดเชื้อแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปทำให้ละเอียดด้วยเครื่องตีปั่น (Stomacher) ของ AES Laboratoier แล้วทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10, 100 และ 1,000 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นถ่ายตัวอย่างที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตร ทำการ pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Coli ID จำนวน 2 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยตู้บ่มเชื้อ Memmert Incubator INB 400 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและบันทึกผล โดยโคโลนีสีชมพูเข้มที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Coli ID คือเชื้อ *E. coli*

3.4.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

3.4.4.3.1 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรมปากจีบสำหรับวิเคราะห์โลหะหนัก

นำตัวอย่างหอยนางรมปากจีบมาบดให้ละเอียดแล้วชั่งน้ำหนักประมาณ 1-1.5 กรัม ใส่ลงใน Vessel เติม HNO_3 : H_2O_2 : DI ในอัตราส่วน 10 : 4 : 6 มิลลิลิตร (HNO_3 ใช้กรดที่ผ่านการกลั่นแล้ว) เมื่อใส่กรดเสร็จแล้วนำไปเข้าเครื่อง Microwave Digester (CEM รุ่น MAR5X) ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำ DI (De-Ionized) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 มิลลิลิตร

3.4.4.3.2 การวิเคราะห์โลหะหนัก

วิเคราะห์ปรอท โดยใช้เทคนิค Cold Vapor Atomic Fluorescense Spectrometry ใช้เครื่อง Atomic Fluorescense Spectrometry ของ PSAnalytical รุ่น Merlin สำหรับโลหะแคดเมียมและตะกั่ว วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry ของ UNICAM รุ่น 989 QZ และวิเคราะห์ทองแดง สังกะสีและเหล็ก โดยใช้เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrometry ของ VARIAN รุ่น SpectrAA 55B

3.5 การปรับปรุงระบบ โดยทำการจัดการกับตะกอนที่เกิดขึ้นจากการที่หอยคายออกมา

3.5.1 ขั้นตอนการดำเนินการ

ทำการเตรียมระบบ Depuration เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 2 (หัวข้อที่ 3.3.1) เตรียมน้ำทะเลที่ใช้ในระบบตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.2.2 แล้วจึงเตรียมหอยนางรมปากจีบที่ใช้ในการทดลองตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.4.2 ทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบในชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างหอยนางรมปากจีบมาทำการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียและโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.4.4

3.5.2 การจัดการกับตะกอนที่หอยคายออกมา

สำหรับการจัดการกับตะกอนที่หอยคายออกมา ใช้วิธีการดูดเอาตะกอนที่อยู่ด้านล่างของถังพักหอย ออกมากรองด้วยใยแก้ว เพื่อทำการแยกตะกอนออกจากมวลน้ำแล้วนำน้ำที่ผ่านการกรองกลับเข้าสู่ถังพักหอยอีกครั้ง โดยจะทำการดูดตะกอนเมื่อเห็นว่ามีตะกอนอยู่ด้านล่างของถัง

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.6.1 แบคทีเรีย

วิธีการคำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น

$$\left\{ \frac{\text{ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในแต่ละชั่วโมง-ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเฉลี่ยในชั่วโมงเริ่มต้น}}{\text{ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเฉลี่ยในชั่วโมงเริ่มต้น}} \right\} \text{X } 100$$

3.6.2 โลหะหนัก

3.6.2.1 วิธีการคำนวณความเข้มข้นของโลหะหนักในเนื้อหอยนางรมปากจีบได้โดยการหาค่าความเข้มข้นของโลหะหนัก (ไมโครกรัมต่อลิตร) ได้จากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณโลหะหนักในสารละลาย 50 มิลลิลิตร} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโลหะหนัก (ไมโครกรัมต่อลิตร)*50 มิลลิลิตร}}{\text{1000 มิลลิลิตร}}$$

แต่สารละลาย 50 มิลลิลิตร ได้จากตัวอย่างที่มีน้ำหนักประมาณ 1.5-2.0 กรัม ดังนั้นในเนื้อหอยนางรมปากจีบ 1.5 กรัม จะมีปริมาณโลหะหนักสะสมอยู่เท่ากับ

$$\frac{\text{ปริมาณโลหะหนักในสารละลาย 50 มิลลิลิตร (ไมโครกรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำหนักที่ใช้ในการย่อยสลายตัวอย่าง (กรัม)}}$$

3.6.2.2 วิธีการคำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาณโลหะหนักโดยเทียบกับปริมาณโลหะหนักเริ่มต้น

$$\left\{ \frac{\text{ปริมาณโลหะหนักในแต่ละชั่วโมง-ปริมาณโลหะหนักเฉลี่ยในชั่วโมงเริ่มต้น}}{\text{ปริมาณโลหะหนักเฉลี่ยในชั่วโมงเริ่มต้น}} \right\} \text{X } 100$$

3.6.2.3 วิธีการคำนวณอัตราการลดลงของความเข้มข้นของโลหะหนักในเนื้อหอยนางรมปากจีบได้ดังนี้ อัตราการลดลงของโลหะหนักเท่ากับ

$$\frac{\text{ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยเริ่มต้นของโลหะหนัก-ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยสุดท้ายของโลหะหนัก}}{\text{เวลาทั้งหมด (ชั่วโมง)}}$$

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่ได้จากการทดลองในแต่ละขั้นตอนมาทำการเปรียบเทียบโดยใช้วิธีการทางสถิติ (two-way ANOVA) การเปรียบเทียบแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

3.7.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในมวลน้ำที่อัตราการไหลของน้ำ 3 กับ 6 ลิตรต่อนาที โดยทำการวิเคราะห์หาความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย คือ ความแตกต่างของอัตราการไหลของน้ำ (3 และ 6 ลิตรต่อนาที) และเวลาที่ทำการศึกษา (ชั่วโมงต่างกัน) และทำการเปรียบเทียบทั้งปริมาณและร้อยละการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในมวลน้ำในแต่ละอัตราการไหลของน้ำโดยใช้สถิติ Student-Newman-Kuels (S-N-K)

3.7.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของหลอดอัลตราไวโอเลตในการลดเชื้อแบคทีเรียในมวลน้ำของระบบที่มีระบบกรองโลหะหนักกับระบบที่ไม่มีระบบกรองโลหะหนัก โดยทำการวิเคราะห์หาความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย คือ ความแตกต่างของระบบ (ระบบที่ไม่มีระบบกรองโลหะหนักกับระบบที่มีระบบกรองโลหะหนัก) และเวลาที่ทำการศึกษา (ชั่วโมงที่ต่างกัน) และทำการเปรียบเทียบทั้งปริมาณและร้อยละการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในมวลน้ำในแต่ละระบบโดยใช้สถิติ Student-Newman-Kuels (S-N-K)

3.7.3 การเปรียบเทียบการลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและโลหะหนักในหอยนางรมปากจีบในระบบ Depuration ที่ไม่มีการปรับปรุงระบบกับระบบ Depuration ที่มีการปรับปรุงระบบโดยการจัดการกับตะกอนที่หอยคายออกมา โดยทำการวิเคราะห์หาความแปรปรวนจาก 2 ปัจจัย คือ ความแตกต่างของระบบ (ระบบที่ไม่มีการจัดการตะกอนกับระบบที่มีการจัดการตะกอน) และเวลาที่ทำการศึกษา (ชั่วโมงที่ต่างกัน) และทำการเปรียบเทียบทั้งปริมาณและร้อยละการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียและโลหะหนักในหอยนางรมปากจีบในแต่ละระบบโดยใช้สถิติ Student-Newman-Kuels (S-N-K)

3.8 การตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิคการวิเคราะห์โลหะหนัก

การวิเคราะห์หาค่า % Recovery เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือและกระบวนการในการวิเคราะห์โลหะหนัก โดยการนำสารมาตรฐาน DORM-3 (Dog Fish Muscle) มาวิเคราะห์หาค่าโลหะหนักด้วยวิธีการเดียวกันกับการวิเคราะห์หาค่าโลหะหนักในตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ จำนวนทั้งหมด 8 ซ้ำ ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 % Recovery ของสารมาตรฐาน DORM-3

Heavy Metal	Certified Values	Mean (µg/g)	%Recovery
Hg	0.382	0.353	92.38
Cd	0.29	0.29	99.10
Pb	0.395	0.293	74.18
Cu	15.5	15.31	98.75
Fe	347	351.73	101.36
Zn	51.3	46.73	91.09