บทที่ 2

วิธีการวิจัย

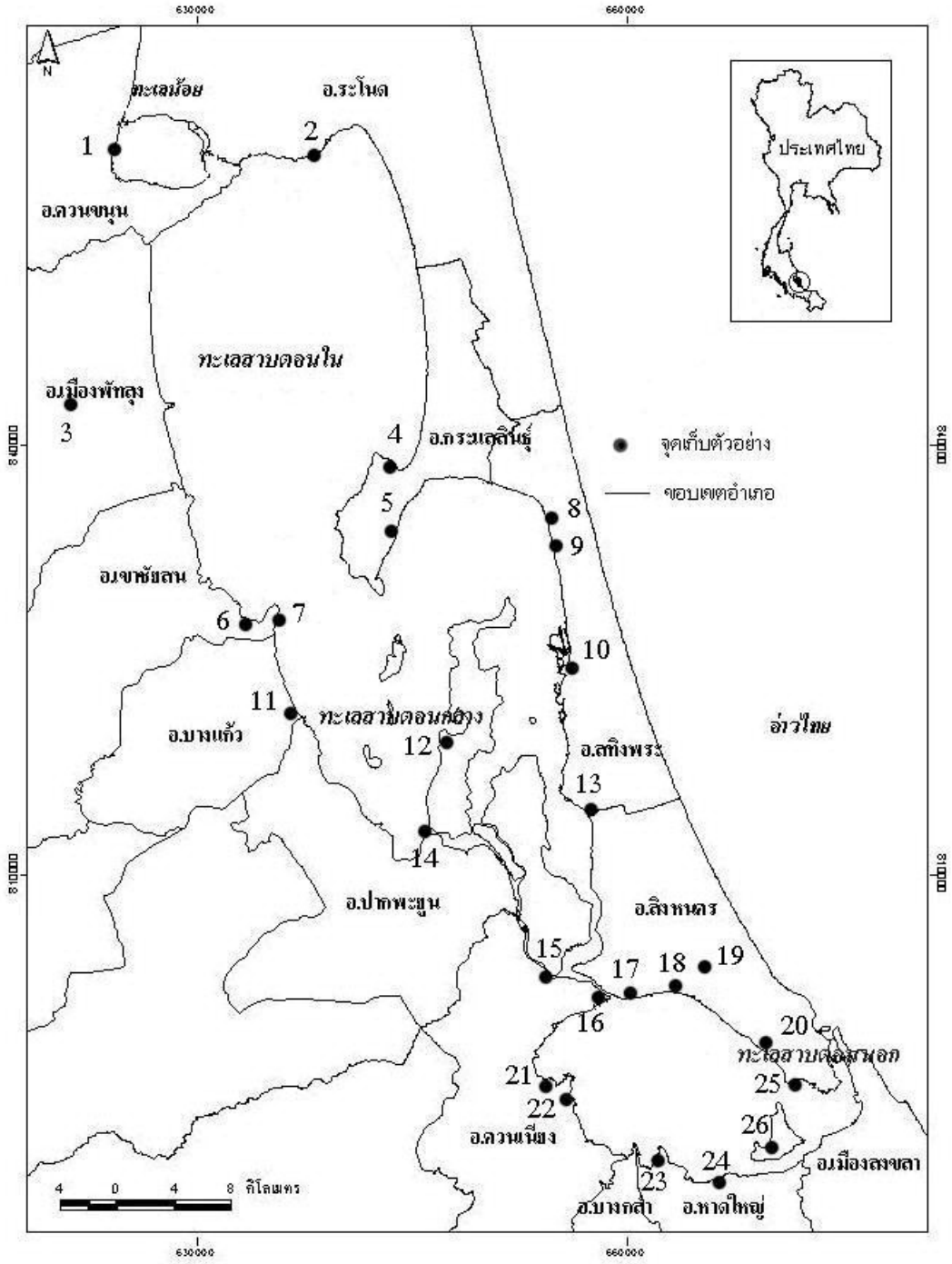
2.1 การศึกษาข้อมูลพื้นฐาน

เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลในเอกสารวิชาการต่างๆ เกี่ยวกับสารปรอท เช่น แหล่งกำเนิดของปรอทในสิ่งแวดล้อม การสะสมปรอทในสัตว์น้ำและห่วงโซ่อาหาร และการสะสมของปรอทในสิ่งมีชีวิตในน้ำในทะเลสาบสงขลาและบริเวณอื่นๆ

เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลในเอกสารวิชาการต่างๆ เกี่ยวกับลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลาและชนิดของสัตว์น้ำหลักที่จับได้จากทะเลสาบสงขลา ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่พบเห็นทั่วไป และมีข้อมูลเกี่ยวกับประวัติ และชีววิทยาที่เกี่ยวข้อง เช่น การกินอาหาร ถิ่นที่อยู่ เป็นต้น

2.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างและวิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ เก็บตัวอย่างครอบคลุมพื้นที่ทะเลสาบสงขลาทั้ง 4 ส่วน คือ ทะเลน้อย ทะเลสาบตอนใน ทะเลสาบตอนกลาง และทะเลสาบตอนนอก โดยเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำรวม 6 ครั้ง ครอบคลุมระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2547 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2548 โดยความอนุเคราะห์ของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาชายฝั่ง สงขลา ให้ติดตามไปเก็บตัวอย่างพร้อมกับเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยระบบและการจัดการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ซึ่งดำเนินการสำรวจสัตว์น้ำภายใต้ “โครงการฟาร์มทะเลในทะเลสาบสงขลา การฟื้นฟูทรัพยากรประมงโดยชุมชน” โดยมีสถานีเก็บตัวอย่างรอบทะเลสาบสงขลารวมทั้งสิ้น 26 จุด ดังรูปที่ 2-1 รายละเอียดของแต่ละสถานีเก็บตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 2-1 เก็บตัวอย่างสัตว์น้ำจากท่าขึ้นสัตว์น้ำ ผู้รับซื้อสัตว์น้ำ ตลาดสด และบ้านชาวประมงที่ทำประมงในทะเลสาบ โดยทำการสอบถามถึงแหล่งที่จับสัตว์น้ำนั้นๆ ก่อนเก็บตัวอย่างทุกครั้ง



รูปที่ 2-1 ตำแหน่งสถานีเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำ (ท่าขึ้นสัตว์น้ำ ผู้รับซื้อสัตว์น้ำ ตลาดสด และบ้านชาวประมง)

ตารางที่ 2-1 สถานีเก็บตัวอย่างและเดือนที่เก็บตัวอย่างในแต่ละสถานี

สถานี	สถานที่	พ.ศ. 2547			พ.ศ. 2548		
		สิงหาคม	กันยายน	พฤศจิกายน	มีนาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม
1	ผู้รับซื้อใน ต.ทะเลน้อย จ.พัทลุง		✓	✓	✓	✓	✓
2	ผู้รับซื้อใน ต.บ้านขาว จ.พัทลุง	✓					
3	ตลาดพัทลุง จ.พัทลุง	✓				✓	✓
4	ผู้รับซื้อใน ต.เกาะใหญ่ จ.สงขลา		✓			✓	
5	ผู้รับซื้อใน ต.เกาะใหญ่ จ.สงขลา		✓			✓	
6	ผู้รับซื้อใน ต.จองถนน จ.พัทลุง		✓	✓	✓	✓	✓
7	ผู้รับซื้อใน ต.จองถนน จ.พัทลุง		✓	✓	✓	✓	✓
8	ผู้รับซื้อใน ต.คลองรี จ.สงขลา	✓			✓		
9	บ้านผู้รับซื้อใน ต.คลองรี จ.สงขลา	✓			✓		
10	บ้านผู้รับซื้อใน ต.คูขุด จ.สงขลา	✓	✓	✓	✓	✓	
11	ผู้รับซื้อใน ต.นาปะขอ จ.พัทลุง			✓		✓	✓
12	ผู้รับซื้อใน ต.ปากพะยูน จ.พัทลุง	✓	✓	✓	✓	✓	
13	ผู้รับซื้อใน ต.ท่าหิน จ.สงขลา				✓		
14	ตลาดปากพะยูน จ.พัทลุง	✓	✓	✓		✓	✓
15	ผู้รับซื้อใน ต.ควนโส จ.สงขลา		✓	✓			✓
16	ผู้รับซื้อใน ต.ควนโส จ.สงขลา		✓	✓			✓
17	ผู้รับซื้อใน ต.ควนโส จ.สงขลา		✓	✓			✓
18	ผู้รับซื้อใน ต.ปากรอ จ.สงขลา		✓				
19	ผู้รับซื้อใน ต.ป่าขาด จ.สงขลา		✓	✓		✓	
20	ผู้รับซื้อใน ต.สทิงหม้อ จ.สงขลา				✓		
21	ผู้รับซื้อใน ต.รัตภูมิ จ.สงขลา	✓					
22	ผู้รับซื้อใน ต.รัตภูมิ จ.สงขลา	✓					
23	ผู้รับซื้อใน ต.คูเต่า จ.สงขลา	✓	✓	✓	✓	✓	
24	ตลาดคูเต่า จ.สงขลา	✓					✓
25	ผู้รับซื้อใน บ้านท่าเสา จ.สงขลา	✓		✓	✓	✓	
26	ผู้รับซื้อใน บ้านท่าเสา จ.สงขลา	✓		✓	✓	✓	

วิธีการเก็บและเก็บรักษาตัวอย่างสัตว์น้ำ ดัดแปลงจากวิธีของคณะอนุกรรมการแก้ไขปัญหาการวิเคราะห์สารเป็นพิษ (2530) โดยการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำ บรรจุสัตว์น้ำลงถุงพลาสติกสะอาด แยกตามชนิดและขนาด (รูปที่ 2-2ก) ปิดผนึกสนิท บันทึกวันที่ สถานี และชื่อสามัญตามภาษาท้องถิ่นของสัตว์น้ำชนิดนั้น เก็บรักษาตัวอย่างในลังโฟมบรรจุน้ำแข็งแห้ง นำกลับมายังห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 2-2ข) เมื่อกลับมาถึงห้องปฏิบัติการแล้วเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20°C ในตู้แช่แข็ง (รูปที่ 2-2ค) จนกว่าจะนำมาชำแหละและวิเคราะห์ทางเคมี

(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 2-2 การเก็บรักษาตัวอย่าง

(ก) การเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกปิดสนิท บันทึกเวลาและสถานีเก็บตัวอย่าง

(ข) การเก็บรักษาในลังโฟมบรรจุน้ำแข็งแห้ง

(ค) การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20°C ในตู้แช่แข็ง

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือหาตำแหน่งบนพื้นโลกด้วยดาวเทียม ยี่ห้อ Garmin รุ่น GPS 12
2. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณปรอทแบบโฟลอินเจคชัน (Flow Injection Mercury Analyzer) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น FIMS 400
3. เครื่องเขย่าผสมสารละลาย ยี่ห้อ Vortex-Genie2 รุ่น G-560E
4. เตาให้ความร้อนแบบ block heater ยี่ห้อ Selecta®
5. ปากคีบพลาสติก
6. แผ่นพลาสติกสะอาด
7. ปากกากันน้ำ
8. ถุงพลาสติกและถุงซิปสำหรับเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำ
9. มีดแสตนเลส
10. เขียงพลาสติก
11. ถังน้ำแข็ง
12. ตู้ Freezer ยี่ห้อ SHARP
13. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบมีเครื่องทำความเย็น (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ TOMY SEIKO รุ่น Rf-20IV
14. ตู้ปลอดฝุ่น (laminar flow cabinet) Class 100
15. หลอดแก้วทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
16. หลอดเซนตริฟิวก์ (centrifuge tube) พลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร
17. บีกเกอร์ขนาดต่างๆ สำหรับการวิเคราะห์
18. เครื่องชั่งแบบ analytical balance ความละเอียด 2 ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น PB3002-S และ 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AB104-S
19. ปิเปต (pipet) และไมโครปิเปต (micropipet)

2.4 สารเคมี

1. Sulfuric acid (H_2SO_4)
2. Nitric acid (HNO_3)
3. Potassium permanganate ($KMnO_4$)
4. Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)

5. Hydroxylamine hydrochloride ($NH_2OH{\cdot}HCl$)
6. Sodium borohydride ($NaBH_4$)
7. Hydrochloric acid (HCl)
8. Mercuric chloride ($HgCl_2$)
9. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) (>18MΩ)

2.5 การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

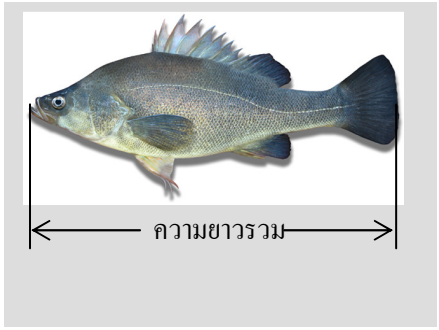
อุปกรณ์และเครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ล้างให้สะอาดด้วยดีเทอเจนต์ (detergent) และแช่ใน 10% HNO_3 ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (>18MΩ) จนหมดฤทธิ์กรด ผึ่งให้แห้งในตู้ปราศจากฝุ่น และเก็บไว้ในถุงพลาสติกจนกว่าจะใช้งาน

2.6 การชำแหละตัวอย่าง

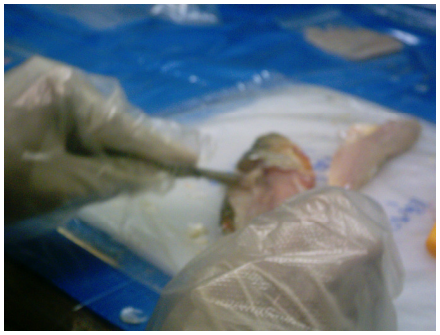
1. นำตัวอย่างที่แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนต่างๆ หลังจากนี้ทำภายใต้บรรยากาศที่ปราศจากฝุ่น ในตู้ปลอดฝุ่น Class 100 (รูปที่ 2-3ก)
2. ปูแผ่นพลาสติกสะอาดกั้นระหว่างผิวสัมผัสกับตัวอย่างก่อนวางตัวอย่างลงทุกครั้ง (รูปที่ 2-3ข) ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง และวัดความยาวรวมของตัวอย่าง (รูปที่ 2-3ค)
3. จำแนกชนิดสัตว์น้ำและศึกษาเรื่องอนุกรมวิธาน โดยอ้างอิงและค้นคว้าจาก
   - มูลนิธิสารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพานิชย์ (2542)
   - กรมประมง (2535)
   - สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวช (2543)
   - ประวิทย์ สุรนีรนารถ (2548)
   - Bruin *et al*. (2005)
   - Fish Base (2005)
4. ทำความสะอาดตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน (>18MΩ) และซับตัวอย่างให้แห้ง แล่เอาแต่เฉพาะเนื้อเยื่อของตัวอย่างด้วยมีดสแตนเลสสตีล (รูปที่ 2-3ง) ขณะทำการแล่ตัวอย่างสวมถุงมือพลาสติก
5. เก็บตัวอย่างที่แล่แล้วใส่ถุงซิปสะอาด (รูปที่ 2-3จ) เก็บรักษาด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะวิเคราะห์ทางเคมี

(ก)

(ข)



(ค)



(ง)

(จ)

รูปที่ 2-3 การเตรียมตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

(ก) ตู้ปลอดฝุ่น (laminar flow cabinet)

(ข) ปูแผ่นพลาสติกสะอาดกั้นระหว่างผิวสัมผัสกับตัวอย่าง

(ค) วัดหาความยาวรวม (total length)

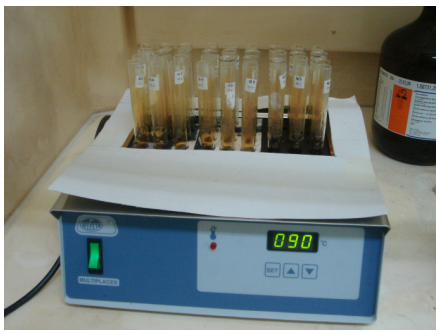
(ง) แล่ตัวอย่างด้วยมีดสแตนเลสสตีล (stainless steel)

(จ) เก็บตัวอย่างที่แล่แล้วใส่ถุงซิปสะอาด ก่อนเก็บรักษาโดยแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C

2.7 การวิเคราะห์ปรอทในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ

ดัดแปลงจากวิธีการ AOAC (1990)

1. นำตัวอย่างออกจากตู้แช่แข็งเพื่อละลายน้ำแข็ง
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดประมาณ 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน บรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
3. เติม conc. H_2SO_4 1 มิลลิลิตร และ conc. HNO_3 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
4. นำหลอดทดลองบรรจุลงในเตาหลุมแบบ block heater (รูปที่ 2-4ก) ตั้งอุณหภูมิในการย่อยที่ 90-95°C นาน 30 นาที ตั้งทิ้งให้ตัวอย่างเย็นลง
5. เติมน้ำปราศจากไอออน (>18MΩ) 2.5 มิลลิลิตร, 5% (w/w) $KMnO_4$ 2.5 มิลลิลิตร และ 5% (w/w) $K_2S_2O_8$ 1.7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสารละลาย (รูปที่ 2-4ข) ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เกิดขึ้นสมบูรณ์ ในขั้นตอนนี้ตัวอย่างจะมีตะกอนสีม่วงเข้มออกดำ
6. หลังทิ้งค้างคืน ตะกอนสีม่วงจะตกตะกอนที่ก้นหลอด จะยังไม่เติมสารละลายใดๆ ลงไปอีก จนกว่าจะเปิดเครื่อง และจัดเตรียมอุปกรณ์ในการวิเคราะห์เสร็จ
7. ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่างเติม 1 มิลลิลิตร 10% (w/w) $NH_2OH{\cdot}HCl$ เพื่อรีดิวซ์ (reduce) $KMnO_4$ ส่วนเกินซึ่งเหลือจากปฏิกิริยา ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้ตะกอนสีม่วงเข้มจะละลายหายไป และได้สารละลายใสแต่อาจมีตะกอนแขวนลอยอยู่
8. กำจัดตะกอนโดยนำหลอดตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยง (รูปที่ 2-4ค) ตั้งความเร็วในการหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้สารละลายใส
9. ชักตัวอย่างที่สกัดแล้วด้วยไมโครปิเปตมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 3% (v/v) HCl 6 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ปรอททันที
10. วิเคราะห์ปรอทโดยเติมสารละลาย 0.4% (v/v) $NaBH_4$ ใน 0.5% (v/v) NaOH 150 มิลลิลิตร เพื่อรีดิวซ์ปรอทในรูปต่างๆ ที่ละลายอยู่ในสารละลายให้เป็นไอปรอท (Hg^0) และนำไปวิเคราะห์ปริมาณปรอทด้วยเทคนิคอะตอมมิกแอบซอบชันแบบไอเย็น (coldvapour atomic absorption) ทันที
11. ใช้ก๊าซอาร์กอน (argon; Ar) ไล่ไอปรอทที่เกิดขึ้นให้เข้าเครื่องวิเคราะห์ปริมาณปรอท Perkin Elmer FIMS 400 (รูปที่ 2-4ง)



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

รูปที่ 2-4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารปรอทในห้องปฏิบัติการ

(ก) Block heater ยี่ห้อ Selecta®

(ข) เครื่องเขย่าผสมสารละลาย ยี่ห้อ Vortex-Genie2 รุ่น G-560E

(ค) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ TOMY SEIKO รุ่น Rf-20IV

(ง) เครื่อง Atomic absorption spectrometry ชนิดไอเย็น ซึ่งออกแบบเฉพาะสำหรับการวัดปรอท หรือเรียกว่า mercury analyzer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น FIMS 400

2.8 การควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ทำโดยวิเคราะห์สารอ้างอิงมาตรฐาน (certified reference material: CRM) TORT-2 (lobster hepatopancreas) ของ National Research Council of Canada ค่าที่วิเคราะห์ได้จะต้องอยู่ในช่วง 0.27±0.06 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในตารางที่ 2-2

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยจำแนกกลุ่มสัตว์น้ำ ตามพฤติกรรมการกินอาหาร และสร้างสายใยอาหารในทะเลสาบสงขลาจากข้อมูลสัตว์น้ำที่ได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้สถิติเชิงพรรนา (descriptive statistics) วิเคราะห์หาค่าต่ำสุด (minimum), ค่าสูงสุด (maximum), ค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของปรอทในแต่ละประเภทของสัตว์น้ำและในแต่ละถิ่นที่อาศัยของสัตว์น้ำและแสดงผลด้วย “Box Plot” ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้รายละเอียดเกี่ยวกับการแจกแจงของข้อมูล โดยเส้นหนาตรงกลางกล่องแสดงค่ามัธยฐาน เส้นล่างของกล่องแสดงเปอร์เซ็นไทล์ที่ 25 เส้นบนของกล่องแสดงเปอร์เซ็นไทล์ที่ 75 และสำหรับเครื่องหมายวงกลมเปิด (o) แสดงข้อมูลที่มีค่าระหว่าง 1.5 ถึง 3 เท่าของความกว้างของกล่อง และเครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงข้อมูลที่มีค่ามากกว่า 3 เท่าของความกว้างของกล่อง