

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

สารเคมี

1. Sulfuric Acid, conc. (LAB-SCAN, AR grade : Thailand)
2. Nitric Acid, conc. (LAB-SCAN, AR grade : Thailand)
3. Hydrochloric Acid, conc. (Merck, AR grade : Germany)
4. Stannous Chloride (Fluka, AR grade : Switzerland)
5. Sodium Chloride (Merck, AR grade : Germany)
6. Hydroxylamine Sulfate (Fluka, AR grade : Switzerland)
7. Potassium Permanganate (Fisher Chemicals, AR grade : UK)
8. Potassium Persulfate (APS, AR grade : Australia)
9. Stock Mercury Solution (Merck, AR grade : Germany)
10. CRM Total Mercury in Fish (BCR, CRM422 in Cod muscle : Belgium)
11. Deionized Water

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณปรอท (Mercury Analyzer) ยี่ห้อ Bacharach รุ่น MAS-50D
2. เครื่องบันทึก (recorder) ยี่ห้อ Acer รุ่น Entra 500
3. เครื่องอุ่นน้ำ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W760
4. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) ยี่ห้อ Contherm
5. กระจบอกรเก็บตัวอย่างน้ำ (water sampler)
6. ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1 ลิตร
7. Grab สำหรับเก็บตัวอย่างดิน
8. ถังพลาสติก
9. ถังแช่เย็น
10. มีดพลาสติก
11. เขียงพลาสติก
12. หลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติกขนาด 50 ml
13. กระดาษกรอง Cellulose Acetate ขนาด pore size 0.45 ไมครอน ยี่ห้อ Whatman

14. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น TB-1502

15. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AB 240

16. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาข้อมูลพื้นฐาน

ศึกษาข้อมูลในเอกสารวิชาการต่าง ๆ เกี่ยวกับลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา และทะเลสาบสงขลาตอนล่าง เช่น ที่ตั้งและอาณาเขต ลักษณะภูมิประเทศ ฤดูกาล ลักษณะภูมิอากาศ แหล่งน้ำธรรมชาติ ลำน้ำสำคัญที่ไหลลงสู่ทะเลสาบสงขลาตอนล่าง แหล่งกำเนิดน้ำเสียที่สำคัญในพื้นที่ทะเลสาบสงขลาตอนล่าง และแนวโน้มคุณภาพน้ำในทะเลสาบสงขลาตอนล่าง

ศึกษาข้อมูลในเอกสารวิชาการต่าง ๆ เกี่ยวกับสารปรอท เช่น คุณสมบัติทั่วไป ประเภทรูปแบบทางเคมีและความเป็นพิษ แหล่งที่มาในสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนรูปในสิ่งแวดล้อม การสะสมในสิ่งมีชีวิต การศึกษาระดับปริมาณสารปรอทในสัตว์น้ำในบริเวณทะเลสาบสงขลาและบริเวณอื่น ๆ ในประเทศไทยที่ผ่านมา และการปนเปื้อนของสารปรอทในดินตะกอน

ศึกษาและสำรวจชนิดของสัตว์น้ำหลักที่จับได้จากทะเลสาบสงขลาตอนล่าง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนปฏิบัติงาน การกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง และกำหนดชนิดของสัตว์น้ำ ตลอดจนศึกษาหาวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสม

2. การกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง

2.1 ตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนดินเก็บจากจุดเก็บตัวอย่าง 9 จุด คือ

- ปากคลองอู่ตะเภา
- ปากคลองพะวง
- ชุมชนเกาะขอม
- ชุมชนหัวเขาแดง
- ปากทะเลสาบสงขลา
- ปากคลองขวาง
- ท่าเรือประมงท่าสะอ้าน
- ปากคลองสำโรง
- ทะเลสาบสงขลาตอนล่าง

จุดเก็บตัวอย่างและสภาพทั่วไปบริเวณจุดเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนดิน ดังแสดงในภาพประกอบ 7 และ 8

ภาพประกอบ 7 จุดเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนดินบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนล่าง

(ก) ปากคลองอยู่ตะเภา

(ข) ปากคลองพะวง

(ค) ชุมชนเกาะขอม

ภาพประกอบ 8 สภาพทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนดินบริเวณทะเลสาบ
สงขลาตอนล่าง

(ง) ชุมชนหัวเขาแดง

(จ) ปากทะเลสาบสงขลา

(ฉ) ปากคลองขวาง

ภาพประกอบ 8 (ต่อ)

(ข) ทำเรือประมงทำสะพาน

(ค) ปากคลองสำโรง

(ง) ทะเลสาบสงขลาตอนล่าง

ภาพประกอบ 8 (ต่อ)

2.2 ตัวอย่างปลาเก็บจากทำจันสัตว์น้ำและตลาดสด ในบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนล่าง โดยสอบถามถึงแหล่งที่จับปลาด้วยทุกครั้ง

3. ชนิดของตัวอย่างปลาที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดของตัวอย่างปลาที่ใช้ในการวิจัย จะพิจารณาปลาที่มีการนำมาบริโภค และมีปริมาณมากพอในธรรมชาติ เป็นปลาที่อยู่ประจำถิ่น และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มของปลาประเภทกินพืชเป็นอาหาร และกลุ่มของปลาประเภทกินสัตว์เป็นอาหาร ตัวอย่างปลาที่ใช้ในการวิจัย มีดังนี้

กลุ่มของปลาประเภทกินพืชเป็นอาหาร ได้แก่	ปลาโคก (<i>Gonialosa modestus</i>)
	ปลากระบอกดำ (<i>Liza subviridis</i>)
	ปลากระบอกขาว (<i>Valamugil cunnesius</i>)
กลุ่มของปลาประเภทกินสัตว์เป็นอาหาร ได้แก่	ปลาเป็นเล็ก (<i>Leiognathus brevirostris</i>)
	ปลาคชี่ลิ่ง (<i>Arius sagor</i>)
	ปลาคคหัวโม่ง (<i>Arius maculatus</i>)
	ปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>)

ชนิดของปลาที่ใช้ในการวิจัยแสดงในภาพประกอบ 9

กลุ่มของปลาประเภทกินพืชเป็นอาหาร

(ก) ปลาโคก (*Gonialosa modestus*)

(ข) ปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*)

(ค) ปลากระบอกขาว (*Valamugil cunnesius*)

ภาพประกอบ 9 ชนิดของปลาที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่มของปลาประเภทกินสัตว์เป็นอาหาร

(ง) ปลาเป็นเล็ก (*Leiognathus brevirostris*)

(จ) ปลากดขี้ลิง (*Arius sagor*)

(ฉ) ปลากดหัวโมง (*Arius maculatus*)

(ช) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

ภาพประกอบ 9 (ต่อ)

4. การเก็บและรักษาตัวอย่าง

4.1 ตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำโดยใช้กระบอกเก็บตัวอย่างน้ำ แล้วใส่ในขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างน้ำ ขนาด 1 ลิตร เก็บรักษาตัวอย่างโดยเติม Nitric Acid จนได้ pH 2 หรือต่ำกว่า แล้วแช่เย็นไว้ (APHA, AWWA and WEF, 1998)

4.2 ตัวอย่างตะกอนดิน

เก็บตัวอย่างตะกอนดินโดยใช้ grab แล้วนำตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติก ม้วนถุงไล่อากาศออกให้หมด แล้วนำไปใส่ในถุงพลาสติกอีกชั้น ม้วนมัดปากถุงให้แน่น แล้วแช่เย็นไว้

ทำการอบตัวอย่างตะกอนดินในตู้อบความร้อนแห้ง (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นานประมาณ 7 วัน แล้วนำตัวอย่างตะกอนดินที่ได้ใส่ในถุงพลาสติก เก็บไว้ในเดซิเคเตอร์

4.3 ตัวอย่างปลา

ก. ทำการเก็บตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) โดยการซื้อปลาที่จับได้จากทะเลสาบสงขลาตอนล่างจากแม่ค้าหรือชาวประมงที่ออกทำการประมงในทะเลสาบสงขลาตอนล่าง

ข. วิธีการเก็บและรักษาตัวอย่างปลา ดำเนินการตามวิธีของคณะกรรมการแก้ไขปัญหาการวิเคราะห์สารเป็นพิษ คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมเรื่องสารเป็นพิษ (2530) โดยการเก็บตัวอย่างปลาแยกตามชนิดและขนาด ปริมาณตัวอย่างปลาแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาต้องให้เป็นตัวแทนทางสถิติ โดยถือหลักดังนี้ ปลาขนาดเล็กกว่า 20 เซนติเมตร เก็บไม่น้อยกว่า 10 ตัว ปลาขนาดระหว่าง 20-60 เซนติเมตร เก็บไม่น้อยกว่า 5 ตัว นำตัวอย่างปลาใส่ในถุงพลาสติก ม้วนถุงไล่อากาศออกให้หมด แล้วนำไปใส่ในถุงพลาสติกอีกชั้น ม้วนมัดปากถุงให้แน่น แล้วแช่เย็นไว้ ทำการวิเคราะห์ทันทีเมื่อถึงห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันที ให้เก็บรักษาตัวอย่างโดยการแช่แข็ง

5. การวัดขนาดความยาวและน้ำหนักของปลา

ตัวอย่างปลาแต่ละตัววัดความยาวด้วยวิธีวัดความยาวทั้งสิ้น (total length) (ธีารัง, 2533) โดยใช้ไม้บรรทัดวัดความยาวตั้งแต่องอปากจนสุดปลายครีบกหาง ดังแสดงในภาพประกอบ 10 และชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง

ภาพประกอบ 10 การวัดความยาวตัวอย่างปลาแบบวิธีวัดหาความยาวทั้งสิ้น (total length)

6. วิธีการย่อยตัวอย่างและการวิเคราะห์ปริมาณสารปรอท

6.1 ตัวอย่างน้ำ (น้ำเค็ม) (APHA, AWWA and WEF, 1998)

1. ตวงตัวอย่างน้ำ 100 มล. หรือตัวอย่างน้ำที่เจือจางเป็น 100 มล. ซึ่งมีสารปรอทไม่มากกว่า 5.0 ไมโครกรัม/ลิตร ลงในขวด BOD ขนาด 300 มล.
2. เติม Sulfuric Acid, conc. 5 มล. เขย่า
3. เติม Nitric Acid, conc. 2.5 มล. เขย่า
4. เติม Potassium Permanganate 25 มล. เขย่า
5. เติม Potassium Persulfate 8 มล.
6. นำไปอุ่นในเครื่องอุ่นไอน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
7. เติม Sodium Chloride Hydroxylamine Sulfate Solution 25 มล. เพื่อ reduce Permanganate ที่เหลือ ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 วินาที
8. เติม Stannous Chloride ลงไปในตัวอย่างที่ย่อยแล้ว 5 มล.
9. ทำการวิเคราะห์ปริมาณปรอทรวม (Total Mercury) โดยใช้เครื่อง Mercury Analyzer ชนิด Cold Vapour Technique

6.2 ตัวอย่างตะกอนดิน (ประยุกต์จาก AOAC, 1990)

1. ชั่งตัวอย่างตะกอนดินที่ทำกรอบแห้งแล้ว ประมาณ 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ใสลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มล.
2. เติม Nitric Acid, conc. 6 มล.

3. นำไปอุ่นในเครื่องอุ่นไอน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำกลั่นชนิด Deionized Water ให้ได้ปริมาตร 100 มล.
6. กรองผ่านกระดาษกรอง Cellulose Acetate ขนาด pore size 0.45 ไมครอน
7. ใส่ตัวอย่างลงในขวด BOD ขนาด 300 มล.
8. เติม Stannous Chloride ลงไปในตัวอย่างที่ย่อยแล้ว 5 มล.
9. ทำการวิเคราะห์ปริมาณปรอทรวม (Total Mercury) โดยใช้เครื่อง Mercury Analyzer ชนิด Cold Vapour Technique

6.3 ตัวอย่างปลา (AOAC, 1990)

1. ชั่งตัวอย่างปลาที่ทำกรแลเนื้อและสับละเอียดแล้วประมาณ 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มล.
2. เติม Nitric Acid, conc. 6 มล.
3. นำไปอุ่นในเครื่องอุ่นไอน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะได้สารละลายสีเหลืองใส
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. ถ่ายตัวอย่างลงในขวด BOD ขนาด 300 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นชนิด Deionized Water ให้ได้ปริมาตร 100 มล.
6. เติม Stannous Chloride ลงไปในตัวอย่างที่ย่อยแล้ว 5 มล.
7. ทำการวิเคราะห์ปริมาณปรอทรวม (Total Mercury) โดยใช้เครื่อง Mercury Analyzer ชนิด Cold Vapour Technique

7. การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างปลาและตัวอย่างตะกอนดิน

1. ชั่งน้ำหนักด้วยอลูมิเนียม (aluminum foil) ด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกค่าน้ำหนักไว้
2. ตักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียม ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกค่าน้ำหนักไว้
3. นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7 วัน
4. ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที
5. ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกค่าน้ำหนักไว้

6. ทำซ้ำข้อ 3-5 จนกว่าน้ำหนักที่ชั่งได้คงที่ (น้ำหนักที่ชั่งได้ครั้งหลังต่างจากน้ำหนักที่ชั่งได้ครั้งก่อนไม่เกิน ± 0.0005 กรัม)

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่าง ดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{(A - B) \times 100}{B}$$

เมื่อ A = น้ำหนักก่อนอบ

B = น้ำหนักหลังอบ

8. การควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำการควบคุมคุณภาพในการวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อยืนยันความถูกต้องและความแม่นยำของผลการวิเคราะห์

8.1 ตัวอย่างน้ำ ทำการควบคุมคุณภาพโดยการหา % recovery ของ spiked sample และทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

8.2 ตัวอย่างตะกอนดิน ทำการควบคุมคุณภาพโดยการหา % recovery ของ spiked sample และทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

8.3 ตัวอย่างปลา ทำการควบคุมคุณภาพโดยการวิเคราะห์ certified reference material (CRM 422 in Cod muscle ของบริษัท BCR) และทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ธวัชชัย, 2540; ศิริชัย, 2539)

นำผลการวิเคราะห์ปริมาณสารปรอทในเนื้อปลา ปริมาณสารปรอทในน้ำ และปริมาณสารปรอทในตะกอนดินที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (mean) นำเสนอโดยใช้ตาราง และกราฟ

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของปลา และปริมาณการสะสมของสารปรอทในเนื้อปลา โดยใช้ Bivariate Correlation (Pearson)

ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณสารปรอทที่สะสมในเนื้อปลา ในปลาประเภทกินพืชเป็นอาหารและปลาประเภทกินสัตว์เป็นอาหาร โดยใช้สถิติ t-test (independence) ของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows

สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่