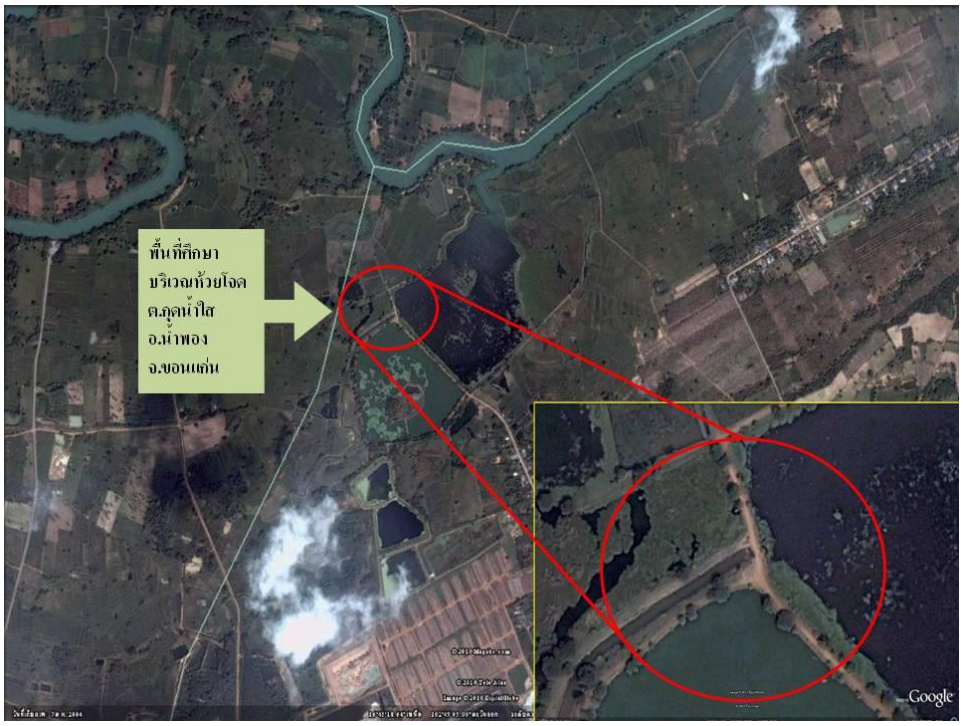
บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษา ผลกระทบทางนิเวศพิษวิทยาและการติดตามทางชีวภาพของตะกอนดินใต้น้ำที่ปนเปื้อนโครเมียม (Cr) และแคดเมียม (Cd) ในระบบนิเวศทางน้ำ

3.1 ลักษณะพื้นที่ศึกษาและเก็บตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในพื้นที่บริเวณแหล่งน้ำที่มี ประวัติการปนเปื้อนเนื่องจากการใช้ประโยชน์ที่ดิน เป็นพื้นที่อุตสาหกรรม คือ บริเวณห้วยโจด ตำ บลกุดน้ำใส อำ เภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ที่จุดพิกัด 16º 42' 60" N, 102º 44' 40" E และทำการเปรียบเทียบกับพื้นที่ที่ไม่ปนเปื้อนสารพิษ คือ บริเวณน้ำหนาว อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่จุดพิกัด 16º 44' 12.19" N, 101º 34' 28.21" E และบริเวณน้ำตกตาดโตน ตำบลนาฝาย อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ ที่จุดพิกัด 15º 58' 41" N, 102º 2' 5" E

ห้วยโจดเป็นบริเวณที่มีการเชื่อมต่อกับแม่น้ำพองของจังหวัดขอนแก่น ซึ่งแม่น้ำพองมีพื้นที่ประมาณ 10,886 ตารางกิโลเมตร ลักษณะภูมิประเทศเป็นที่ราบสูงและภูเขาอยู่ทางทิศตะวันตก และเป็นที่ราบต่ำอยู่ทางทิศตะวันออกซึ่งเหมาะกับการทำการเกษตร แม่น้ำพองไหลจากตะวันตกเฉียงเหนือไปทาง ทิศตะวันออกเฉียงใต้ เป็นระยะทางประมาณ 200 กิโลเมตร จากอำเภออุบลรัตน์ผ่านอำเภอน้ำพอง และอำเภอเมือง ช่วงตอนกลางของแม่น้ำมีเขื่อนอุบลรัตน์ตั้งอยู่ เขื่อนเก็บน้ำ มีความมจุประมาณ 2,263.6 ล้านลูกบาศก์เมตร ถูกใช้ประโยชน์เพื่อ การชลประทาน ผลิตไฟฟ้า และป้อง กันน้ำท่วม และแม่น้ำพองจะไหล ลงแม่น้ำชี ซึ่งเป็นสาขาของแม่น้ำโขงทางด้าน ทิศตะวันออกเฉียงเหนือของตัวเมืองขอนแก่น (ภาพ 3.1)



ภาพที่ 3.1 พื้นที่ศึกษา บริเวณห้วยโจด ต.กุดน้ำใส อ.น้ำพอง จ.ขอนแก่น
ที่มา: ดัดแปลงจาก Google Earth เมื่อ 4 มีนาคม 2011

3.2 วิธีการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้เป็น การศึกษาผลกระทบทางนิเวศพิษวิทยาและการติดตามทางชีวภาพของตะกอนดินใต้น้ำที่ปนเปื้อน โลหะหนัก ได้แก่ Cr และ Cd ที่มีต่อหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด โดยมีหัวข้อที่ใช้ในการศึกษา และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาดังต่อไปนี้

(1) ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำผิวดินและผลกระทบของตะกอนดินใต้น้ำที่มีการปนเปื้อนสารพิษที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศทางน้ำ

(2) ศึกษานิเวศ พิษวิทยาของ โลหะหนักที่มีต่อสัตว์หน้าดินโดยทำการ ศึกษาความป็นพิษเฉียบพลันของ Cr และ Cd ในตะกอนดินใต้น้ำที่มีต่อหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด

(3) ศึกษาติดตามผลกระทบทางชีวภาพของ ตะกอนดินใต้น้ำที่ปนเปื้อน Cr และ Cd ที่มีต่อหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด โดยศึกษาปริมาณเอนไซม์ เมทัลโลไธโอนีน และปริมาณโปรตีน ในหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดหลังจากได้รับ Cr และ Cd ในตะกอนดินใต้น้ำ

3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

(1) สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดลอง

(1.1) หอยน้ำจืด (*Filopaludina (Siamopaludina) martensi martensi*)

(1.2) หนอนริ้นน้ำจืด (*Chironomus* sp.)

(2) ตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ

ตัวอย่างตะกอนดิน ใต้น้ำและตัวอย่างน้ำผิวดินที่ใช้ในการ ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี และตัวอย่างตะกอนดิน ใต้น้ำที่ใช้ในการศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน เก็บจากภาคสนามใน 2 พื้นที่ดังนี้

(2.1) บริเวณห้วยโจด ตำบลกุดน้ำใส อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของพื้นที่ที่มีประวัติการปนเปื้อน

(2.2) บริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ และบริเวณน้ำตกตาดโตน ตำบลนาฝาย อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ ใช้เป็นพื้นที่ที่ไม่ปนเปื้อน

และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน ใต้น้ำ โดยแบ่งเป็น 2 ช่วงฤดูกาล ดังนี้

1) ฤดูกาลที่มีน้ำมากในช่วงเดือน กันยายน 2553 ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนรายเดือนรวม เท่ากับ 266.9 มิลลิเมตร

2) ฤดูกาลที่มีน้ำน้อยในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2554 มีปริมาณน้ำฝนรายเดือนรวม เท่ากับ 7 มิลลิเมตร

(3) อุปกรณ์เก็บและเตรียมตัวอย่างน้ำและตะกอนดินใต้น้ำ

(3.1) Ekman Grab Sampler สำหรับเก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้น้ำ

(3.2) Grab Sampler สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ

(3.3) ตะแกรงร่อน ขนาด 1.0 มิลลิเมตร สำหรับกรองแยกวัสดุปนเปื้อนออกจากตะกอนดินใต้น้ำ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน

(3.4) ตะแกรงร่อน ขนาด 0.5 และ 2.0 มิลลิเมตร สำหรับร่อนตะกอนดินท้องน้ำที่ตากแห้งแล้วเพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตะกอนดินใต้น้ำ

(4) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

(4.1) ถังพลาสติกขนาด ความจุ 100 ลิตร สำหรับพักน้ำประปาเพื่อ ใช้เพาะเลี้ยงหนอนริ้นน้ำจืด และหอยน้ำจืด และใช้เป็นน้ำเจือจางในตะกอนดิน ใต้น้ำเพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง

(4.2) เครื่องปั๊มเติมอากาศ (Oxygen Pump) และสายยางสำหรับต่อสายปั๊มออกซิเจน

(4.3) ถาดพลาสติกขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 21.0 x 35.4 x 8.8 เซนติเมตร สำหรับเพาะเลี้ยงหนอนริ้นน้ำจืด

(4.4) สำลี สำหรับชุบน้ำผึ้ง เพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับริ้นน้ำจืดตัวเต็มวัย

(4.5) ผ้าใยบัว สำหรับปิดถาดพลาสติก เพื่อเพาะเลี้ยงหนอนริ้นน้ำจืด

(4.6) บ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร สำหรับเพาะเลี้ยงและเป็นบ่อพักหอยน้ำจืด เพื่อให้หอยน้ำจืดปรับตัวกับสภาพแวดล้อม

(4.7) หลอดหยด ความกว้างของปากหลอด 0.4 มิลลิเมตร สำหรับดูดหนอนริ้นน้ำจืด

(4.8) กระชอนตาถี่ สำหรับช้อนตัวหนอนริ้นน้ำจืด

(4.9) อาหารปลาบดละเอียด สำหรับเป็นอาหาร ของหนอนริ้นน้ำจืดและหอยน้ำจืด

(4.10) น้ำผึ้ง สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงตัวเต็มวัยริ้นน้ำจืด

(5) อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน

(5.1) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) กล่องพลาสติกกลมขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 11.7 x 6.3 เซนติเมตรสำหรับใช้ทดสอบพิษเฉียบพลันต่อหนอนริ้นน้ำจืด

2) กล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 10 x 30 x 6 เซนติเมตรสำหรับใช้ทดสอบพิษเฉียบพลันต่อหอยน้ำจืด

3) น้ำกลั่นสองขั้นตอน (Deionized Water: DI)

4) น้ำประปาพักที่เติมอากาศอย่างน้อย 7 วัน

5) ขวดปรับปริมาตรขนาด 25, 50, 100, 250, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร

6) ปิเปตขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร

7) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

8) ถาดพลาสติกขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 21 x 35.4 x 8.8 ลูกบาศก์เซนติเมตร

9) ช้อนตักสาร

10) แท่งแก้วคนสาร

11) ผ้าปิดจมูก และถุงมือแพทย์

12) เครื่อง pH meter ยี่ห้อ CONSORT รุ่น C535

13) เครื่อง EC meter ยี่ห้อ CONSORT รุ่น C535

14) เครื่อง DO meter ยี่ห้อ CONSORT รุ่น C535

15) เครื่องวัดอุณหภูมิ ยี่ห้อ CONSORT รุ่น C535

(5.2) สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) สารโครเมียม ที่อยู่ในรูปสารประกอบของโพแทสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$) ผลิตโดยบริษัท Asia Pacific Specialty Chemical Limited

2) สารแคดเมียม ที่อยู่ในรูปสารประกอบของแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2.2.5H_2O$) ชนิด A.C.S grade ผลิตโดยบริษัท Asia Pacific Specialty Chemical Limited

(6) อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทดสอบปริมาณเอนไซม์และโปรตีน

(6.1) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.0 และ 10 มิลลิลิตร

2) เครื่อง Centrifuge

3) ถาด Microplate ขนาด 96 หลุม

4) เครื่อง Microplate Reader Enzyme Assay

(6.2) สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) 0.5 M Sucrose

2) 20 mM Tris – HCl (pH 8.6)

3) 0.006 mM Leupeptin (sigma)

4) 0.5 mM Phenyl methylsulphonyl fluoride (sigma)

5) 0.01 % 2 – mercaptoethanol (sigma)

6) Ethanol

7) Chloroform

8) Calf liver RNA (sigma)

9) 37 % HCl

10) 5, 5–Dithiobis–2–nitrobenzoic acid (DTNB, pH 8.0, sigma)

11) GSH

12) Bovine scrum albumin

(7) เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับทดสอบคุณภาพน้ำ ผิวดิน และคุณสมบัติของตะกอนดินใต้น้ำ

(7.1) คุณสมบัติทางกายภาพ

1) บีกเกอร์ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

2) แท่งแก้วคนสาร

3) ตู้อบ (Oven)

4) ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)

5) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance) 3 ตำแหน่ง

6) เครื่องกรองบุชเนอร์ (Buchner Funnel)

7) เครื่องดูดอากาศ (Suction Pump)

8) กระดาษกรอง Whatman GF/C เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร

9) กระจกนาฬิกา (Watch Glass)

10) ปากคีบ

11) ขวดน้ำกลั่น

12) ถ้วยระเหย (Evaporating Dish)

(7.2) คุณสมบัติทางเคมี

1) ขวดบีโอดีขนาด 300 มิลลิลิตร

2) บีกเกอร์ขนาด 50, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3) ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

4) หลอดย่อยตัวอย่าง (Micro-kjeldahl) ขนาด 800 มิลลิลิตร

5) ขวดปรับปริมาตรขนาด 25, 50, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

6) หลอดซีโอดี

7) แท่งแก้วคนสาร

8) น้ำกลั่น

9) น้ำกลั่นสองขั้นตอน (DI)

10) ปิเปตขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร

11) Volumetric Pipette ขนาด 1, 2, 3, 5, 10, 20 และ 25 มิลลิลิตร

12) กระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 5

13) ขวดพลาสติกขนาด 60 และ 100 มิลลิลิตร

14) กรวยกรอง

15) ลูกยางสำหรับดูดสารละลาย

16) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

17) กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

18) โถดูดความชื้น

19) Water Bath

20) เครื่องย่อย

21) เครื่องกลั่น

22) ตู้ดูดควัน

23) เครื่องซีโอดี

24) เครื่อง pH Meter

25) เครื่อง EC Meter

26) เครื่อง Spectrophotometer

27) เครื่อง Inductively Coupled Plasma – Mass Spectroscopy: ICP-MS (Agilent รุ่น 7500C)

3.2.2 วิธีเตรียมการทดลอง

(1) การเตรียมหนอนริ้นน้ำจืดที่ใช้ในการทดลอง

หนอนริ้นน้ำจืดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยใช้ตัวเต็มวัย บริเวณบ่อน้ำภายใน มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผสมพันธุ์และวางไข่ จนได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ใน ถาดพลาสติก และได้ทำการคัดแยกหนอริ้นน้ำจืดมาเลี้ยง ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Martin et al. (1980) โดยเติมสารละลายดังต่อไปนี้ลงในน้ำกลั่นคือ 1 %

$NaHCO_3$, 5 % NaCl, 1 % $CaCl_2$, 0.2 % KH_2PO_4, 1 % $MgSO_4$ และ 1.8 % $MgCl_2$ ในอัตราส่วนชนิดละ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และเติม 0.1 % $FeSO_4$ ลงไปปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และฉีกกระดาษชำระ ที่ผ่านการแช่ใน absolute ethanol และตากให้แห้งแล้วให้มีขนาดเล็ก ๆ ลงในถาดเลี้ยงหนอนริ้นน้ำจืด จำนวน 2 แผ่น สำหรับเป็นที่ยึดเกาะและเป็นวัสดุในการสร้างปลอกหุ้มตัวของหนอนริ้นน้ำจืด เลี้ยงในถาดพลาสติขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 21 x 35.4 x 8.8 เซนติเมตร ให้อาหารปลาบดละเอียด สัปดาห์ละ 2 ครั้ง และก่อนนำหนอนริ้นน้ำจืดมาทดสอบค่าความเป็นพิษ โดยนำมาพักไว้ในถาดพลาสติก บรรจุน้ำประปาพักประมาณ 2 ลิตร เติมอากาศโดยใช้ปั้มออกซิเจนอย่างน้อยเป็นเวลา 2 วันก่อนทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ และใช้หนอนริ้นน้ำจืดวัยที่สอง ที่มีขนาดความยาว 2-3 มิลลิเมตร ในการทดสอบพิษเฉียบพลัน

(2) การเตรียมหอยน้ำจืดที่ใช้ในการทดลอง

หอยน้ำจืด ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ หอยขม ที่มีขนาด 1-2 เซนติเมตร ที่รวบรวมได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดขอนแก่น และนำมาพักไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ บ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ใส่ดินที่ก้นบ่อเพื่อเป็นที่อยู่ของหอยน้ำจืด ปักไม้เพื่อเป็นที่ยึดเกาะของหอยน้ำจืด อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารปลาบดละเอียด ให้อาหารสัปดาห์ละ 2 ครั้ง และก่อนนำมาทดสอบค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน นำมาพักไว้ในถาดพลาสติก โดยบรรจุน้ำประปาพักประมาณ 2 ลิตร เติมอากาศโดยใช้ปั๊มออกซิเจนอย่างน้อยเป็นเวลา 2 วันก่อนทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ

(3) การเตรียมน้ำสำหรับทดลองพิษเฉียบพลัน

น้ำที่ใช้ในการทดลองได้จากการนำน้ำประปามาพักใส่ถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร พร้อมให้อากาศตลลอดเวลาด้วยเครื่องเติมอากาศ อย่างน้อย 7 วัน เพื่อลดปริมาณคลอรีนในน้ำประปา และก่อนนำน้ำไปใช้ในการทดลองได้ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าการนำไฟฟ้า และอุณหภูมิของน้ำ ตามวิธีการมาตรฐานของ APHA (1998) โดยใช้เครื่องมือวัดยี่ห้อ CONSORT รุ่น C535 เพื่อวัดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำ และระบุคุณภาพน้ำที่นำมาใช้ในการทดลอง เนื่องจากพารามิเตอร์ดังกล่าวมีผลต่อความเป็นพิษของสารละลายโลหะหนักและอัตราการตายของหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดที่ใช้ทดลอง

(4) การเตรียมภาชนะสำหรับทดลอง

กล่องพลาสติกและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต้องล้างทำความสะอาด แล้วแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น ร้อยละ 10 นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปา และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

(5) การเตรียมสารละลายโลหะหนัก

เตรียมสารละลาย Cr ที่อยู่ในรูปของสารประกอบโพแทสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$) ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแคดเมียมที่อยู่ในรูปสารประกอบแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2.2.5H_2O$) ชนิด A.C.S grade ผลิตโดยบริษัท Asia Pacific Specialty Chemical Limited ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นสองขั้นตอน (DI) เก็บสารละลายโลหะหนักทั้ง 2 ชนิด ในขวดพลาสติกชนิด Polyethylene เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทและสารละลายแคดเมียมคลอไรด์จากแสงแดด โดยเก็บในที่มืด แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำประปาพักให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยสารละลายนี้สามารถเก็บไว้ได้นานจึงไม่จำเป็นต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลองเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ แต่ไม่ควรเกิน 3 เดือน

3.3 การวางแผนการทดลอง

การศึกษานิเวศพิษวิทยาและการติดตามทางชีวภาพของตะกอนดินใต้น้ำที่ปนเปื้อน Cr และ Cd ที่มีต่อหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการนิเวศ พิษวิทยา (Ecotoxicology) โดยศึกษาพิษเฉียบพลัน การตอบสนองของหอยน้ำจืดต่อความเข้มข้นของปริมาณสารพิษที่แตกต่างกัน การศึกษาปริมาณเอนไซม์เมทัลโลไธโอนีนและปริมาณโปรตีนในสัตว์ทดลอง และการศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำผิวดินและตะกอนดิน ใต้น้ำที่มีผลต่อระบบนิเวศทางน้ำ

3.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำผิวดินและตะกอนดินใต้น้ำ

(1) การศึกษาคุณภาพน้ำผิวดินในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาคุณภาพน้ำผิวดินครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำผิวดินจากบริเวณห้วยโจด จังหวัดขอนแก่น และบริเวณน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ บริเวณน้ำตกตาดโตน จังหวัดชัยภูมิ เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี สำหรับเปรียบเทียบกับมาตรฐาน คุณภาพน้ำผิวดินของประเทศไทย ที่กำหนดไว้ตามมาตรฐานประเภทที่ 3 (กรมควบคุมมลพิษ, 2537) ซึ่งวิธีการ

วิเคราะห์ได้ทำตามวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย (20th ed. 1998 APHA-AWWA-WEF) ของสหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

ดัชนีคุณภาพน้ำ	วิธีทดสอบ
คุณภาพน้ำทางกายภาพ	
TDS	Gravimetric method
TSS	Gravimetric method
คุณภาพน้ำทางเคมี	
pH	pH meter
EC	Electrical conductivity meter
Alkalinity	Titration
Hardness	ETDA Titrimetric Method
DO	Azide modification
BOD_5	Azide modification ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน
TP	Persulfate digestion และ Ascorbic acid
Available-P	Ascorbic acid
TKN	Semi-micro-kjeldahl และ Titrate
NH_3 - N	Nesslerization Method
NO_3^- - N	Brucine Method
Heavy metal	Spectrometer เครื่อง ICP-MS

ที่มา: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998)

(1.1) คุณภาพน้ำผิวดินทางกายภาพ

1) ของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids: TDS) นำถ้วยระเหยไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำถ้วยระเหยไปวางในตู้ดูดความชื้นและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45 นาที จากนั้น นำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยระเหย สมมุติว่าเป็น A กรัม แล้วนำน้ำที่ผ่านการกรองหาปริมาณสาร แขวนลอยมา 50 มิลลิลิตร เทน้ำดังกล่าวลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน จากนั้นนำไปเข้าตู้อบที่ 103 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำถ้วยระเหยไปวางในตู้ดูดความชื้นและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45 นาที จากนั้นนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยระเหย และนำไปหาค่าของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด

2) ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solid: TSS) นำกระดาษกรอง GF/C เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร วางลงบนกระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบแห้งที่ 103 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำกระดาษกรองไปวางในตู้ดูดความชื้นแ ละปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45 นาที ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอนวางลงบนกรวยกรองบุชเนอร์ ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียก แล้วต่อชุดกรองบุชเนอร์เข้ากับเครื่องดูดอากาศ แล้วเปิดเครื่องดูดสูญญากาศเพื่อให้กระดาษกรอง GF/C ติดกับกรวยบุชเนอร์ จากนั้นนำขวดตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์มาเขย่า แล้วตวงน้ำให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง GF/C แล้วเปิดเครื่องดูดอากาศ จนกระดาษกรองแห้ง นำกระดาษกรอง GF/C ออกจากกรวยกรองบุชเนอร์โดยใช้คีมคีบวาง ลงบนกระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำกระดาษกรองไปวางในตู้ดูดความชื้นและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45 นาที ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของกระดาษกรองเพื่อนำไปหาค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด

(1.2) การศึกษาคุณภาพน้ำผิวดินทางเคมี

1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ใช้น้ำกลั้นฉีดล้างแท่งอิเล็คโทรดให้สะอาด และใช้กระดาษทิชชูชนิดละเอียดซับน้ำให้แห้ง จากนั้นปรับเครื่องมือให้ได้มาตรฐานตามคำแนะนำในคู่มือของเครื่องมือนั้น ๆ โดยจุ่มอิเล็คโทรดลงในสารละลายมาตรฐานที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงกับค่าของน้ำตัวอย่างที่จะวัด แล้วใช้น้ำกลั่นฉีดล้างอิเล็คโทรดอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้ง แล้วจึงวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำผิวดิน

2) ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity: EC) ใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ล้างเซลล์การนำไฟฟ้าอย่างน้อย 2 ครั้ง ใช้กระดาษทิชชูชนิดละเอียดซับน้ำให้แห้ง จากนั้นปรับเครื่องมือให้ได้มาตรฐานตามคำแนะนำในคู่มือของเครื่องมือนั้น ๆ แล้วจึงวัดค่าการนำไฟฟ้าของตัวอย่างน้ำผิวดิน

3) ค่าความเป็นด่างของ น้ำ (Alkalinity) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลาย methyl orange 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นทำการไตเตรตด้วย 0.02 N H_2SO_4 จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม แล้วจึงนำค่าที่ไตเตรตได้มาหาปริมาณความเป็นด่างทั้งหมด

4) ค่าความ กระด้างของน้ำ (Hardness) ปิเปตตัวอย่างน้ำมา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร จะให้ pH 10 ± 0.1 แล้วหยดอินดิเคเตอร์ 3 หยด เขย่าให้สารละลายเข้ากัน สารละลายที่ได้จะเป็นสีม่วงแดง

นำไปไตรเตรทกับสารละลายมาตรฐาน EDTA 0.01 โมลาร์ จุดยุติของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน จดบันทึกปริมาตรของสารละลาย EDTA ที่ใช้ไตเตรท แล้วนำไปหาปริมาณความกระด้างทั้งหมด

5) ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved Oxygen: DO) นำตัวอย่างน้ำผิวดินใส่ขวดบีโอดีขนาด 300 มิลลิลิตร เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร และอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตรลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำ โดยให้ปลายปิเปตจุ่มลงใต้ท้องน้ำ ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เขย่าให้ เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง จากนั้นทิ้งให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส ½ ของขวด แล้วจึงเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปข้าง ๆ คอขวด ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากัน โดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด จากนั้นรินสารละลายในขว ดบีโอดีออก 99 มิลลิลิตร ด้วยกระบ อกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารละลายที่มีปริมาตร 201 มิลลิลิตร ในขวดบีโอดี ไปไตเตร ตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน แล้วจึงหยดสารละลายน้ำแป้ง 2-3 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม แล้วไตเตรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินจางหายไปแล้วอ่านปริมาตรของสารละลาย เพื่อหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ

6) บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand: BOD_5) นำตัวอย่างน้ำผิวดินใส่ขวดบีโอดีขนาด 300 มิลลิลิตร 2 ขวด โดยขวดหนึ่งนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 20 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ส่วนอีกขวดนำมาเติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร และอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตรลงในขวดบีโอดีที่ใส่ตัวอย่างน้ำ โดยให้ปลายปิเปตจุ่มลงใต้ท้องน้ำ ปิดจุกขวดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เขย่าให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง จากนั้นทิ้งให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส ½ ของขวด แล้วจึงเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปข้าง ๆ คอขวด ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากัน โดยคว่ำขวดขึ้นลงจนกระทั่งตะกอนละลายหมด จากนั้นรินสารละลายในขวดบีโอดีออก 99 มิลลิลิตร ด้วยกระบ อกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารละลายที่มีปริมาตร 201 มิลลิลิตร ในขวดบีโอดี ไปไตเตร ตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน แล้วจึงหยดสารละลายน้ำแป้ง 2-3 หยด จะได้สารละลายสีน้ำ เงินเข้ม แล้วไตเตรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินจางหายไปแล้วอ่านปริมาตรของสารละลาย และหลังจาก 5 วัน นำตัวอย่างที่อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 20 ± 1 องศาเซลเซียส มาหาปริมาณออกซิเจนที่เหลืออยู่ เพื่อค่าปริมาณบีโอดี

7) ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus: TP) การทำกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) โดยทำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2

มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะดูดสารละลายมาตรฐาน 20 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริ มาตร 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติม Mixed Molybdate 8 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 30 นาที ได้สารละลายสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร จากนั้นนำค่า Absorbance และระดับ ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปเขียนกราฟมาตรฐาน สำหรับการหาค่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในน้ำตัวอย่าง โดยปิเปตน้ำตัวอย่างมา 20 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดย่อยตัวอย่าง (Micro-kjeldahl) ขนาด 800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยในเ ตาย่อย ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายใส และมีปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งให้เย็นในตู้ดูดควัน แล้วจึงนำมาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงดูดตัวอย่างสารละลายที่ได้มา 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วทำตามขั้นตอนการหาค่ากราฟมาตรฐานในตอนต้นที่กล่าวมาแล้ว

8) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available Phosphorus) การทำกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) โดยทำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะดูดสารละลายมาตรฐาน 20 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติม Mixed Molybdate 8 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 30 นาที ได้สารละลายสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร จากนั้นนำค่า Absorbance และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไปเขียนกราฟมาตรฐาน สำหรับการหาค่าปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในน้ำตัว อย่าง โดยดูดตัวอย่างสารละลายที่ได้มา 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วทำตามขั้นตอนการหาค่ากราฟมาตรฐานในตอนต้นที่กล่าวมาแล้ว

9) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjedahl Nitrogen: TKN) โดยปิเปตน้ำตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม ลงไปในหลอดย่อยตัวอย่าง (Micro-kjeldahl) ขนาด 800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยในเตาย่อย ที่อุณหภูมิ 360 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายมีสีขาวขุ่น และมีปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งให้เย็นในตู้ดูดควัน นำหลอดย่อยที่เย็นแล้วมาเติมน้ำกลั่น 10-15 มิลลิลิตร แกว่งเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วจึงนำมาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมากลั่นโดยดูดมา 10 มิลลิลิตร และเติม 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อยตัวอย่าง นำหลอดย่อยต่อเข้าเครื่องกลั่นและทำการกลั่นทันที โดยใช้ Boric Acid

Indicator ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวรองรับเพื่อจับ NH_4^+ ที่เกิดขึ้น กลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่กลั่นได้มา Titrate กับสารละลายมาตรฐาน 0.005N H_2SO_4 จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู สำหรับการทำ Blank ทำการย่อย Blank โดยใส่สารเร่ง 2 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วทำเหมือนตัวอย่างทุกประการ

10) แอมโมเนียไนโตรเจน (Ammonia Nitrogen : NH_3-N) ตวงตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต 1 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 10.5 ด้วย NaOH 6 N เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อให้ตกตะกอน รินน้ำส่วนใสด้านบน 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำยาอีดีทีเอ 1 – 2 หยด (เพื่อยับยั้งการตกตะกอนของแคลเซียมและแมกนีเซียมที่เหลือ) เติมน้ำยาเนสเลอร์ 2 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำไปตัดกับกราฟมาตรฐาน สำหรับการทำกราฟมาตรฐานโดยนำสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียไนโตรเจนมาทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง จะได้กราฟมาตรฐานเพื่อนำไปหาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

11) ไนเตรตไนโตรเจน (Nitrate Nitrogen : NO_3^--N) ปิเปตตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำขวดรูปชมพู่ไปแช่ในถาดน้ำเพื่อให้หายร้อน เมื่อเย็นแล้วให้นำมาเติมสารละลายบรูซีน -กรดซัลฟานิลิค จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในเครื่องอังไอน้ำ (Water Bath) ซึ่งมีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ควรเปิดเครื่องอังไอน้ำไว้ล่วงหน้าและตั้งอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เมื่อได้อุณหภูมิที่ต้องการแล้วจึงจะทดลองได้) เมื่อครบเวลา 20 นาทีแล้ว ให้นำขวดรูปชมพู่แช่ลงในถาดน้ำเย็น ตั้งทิ้งไว้จนเท่าอุณหภูมิห้อง นำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกค่าที่วัดได้เพื่อนำไปตัดกับกราฟมาตรฐานไนเตรท

12) โลหะหนักโครเมียมและแคดเมียม (Cr and Cd) ตวงตัวอย่างน้ำ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเติมกรดไนตริก 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างเย็นแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS

(2) การศึกษาสมบัติของตะกอนดินใต้น้ำในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตะกอนดิน ใต้น้ำครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำผิวดินจากบริเวณห้วยโจด จ.ขอนแก่น และบริเวณน้ำหนาว จ .เพชรบูรณ์ บริเวณน้ำตก

ตาดโตน จ .ชัยภูมิ เพื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตะกอนดิน ใต้น้ำ และวิธีการวิเคราะห์ได้ทำตามวิธีซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างตะกอนดินใต้น้ำ

คุณสมบัติของตะกอนดิน	วิธีทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
คุณสมบัติทางกายภาพ		
Soil texture	Hydrometer method	มงคลและสัมฤทธิ์ (2539)
คุณสมบัติทางเคมี		
pH (1:2.5 H_2O)	Std. Glass electrode	Black (1965)
EC (1:5 H_2O) (µS/cm)	EC bridge	Jackson (1960)
Total N (mg/kg)	Micro-kjeldahl method	Black (1965)
NH_4^+ - N	Kjeldahl magnesium oxide	Bremner (1965)
NO_3^- - N	Kjeldahl magnesium devarda alloy	Bremner (1965)
Total P (mg/kg)	Ignition method และ Ascorbic acid	Anderson (1976)
Available P (mg/kg)	Bray II	Cottenie (1980)
CEC (cmol/kg)	Peech method	พงศ์ศิริ (2538)
Organic Matter (%)	Walkley and Black	Black (1965)
SOD	Azide modification ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง	นิคมและชัชวาล (ม.ป.ป.)
Heavy metal	Spectrometer เครื่อง ICP-MS	Tessier et al. (1979)

(2.1) สมบัติของตะกอนดินใต้น้ำทางกายภาพ

1) ขนาดอนุภาคตะกอน ดิน นำตัวอย่างตะกอนดิน ใต้น้ำที่ตากแห้งแล้วบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร กำจัดอินทรียวัตถุโดย H_2O_2 ชั่งน้ำหนักดิน 50 กรัม เติมสารละลาย Calgon 5% 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว ทิ้งไว้ค้างคืน ปั่นกวนส่วนผสมโดยใช้เครื่องผสมไฟฟ้าประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เม็ดดินที่จับกันเป็นก้อนแยกออกจากกัน เทลงในกระบอกตกตะกอน ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างเศษดินตะกอนจากเครื่องผสมลงให้หมด เติมน้ำให้ได้ 1 ลิตร ใส่สารละลาย Calgon 5% ลงในกระบอกตวงไว้ข้าง ๆ อีกหนึ่งกระบอก ไว้เพื่ออ่านค่าปรับแก้ผลเนื่องจากอุณหภูมิ และแช่ไฮโดรมิเตอร์ในระหว่างที่ไม่ใช้วัด ใช้จุกยางปิดปากกระบอกตกตะกอน เขย่าส่วนผสมให้เข้าโดยสม่ำเสมอ แล้ววางลงเริ่มจับเวลาทันที หย่อนไฮโดรมิเตอร์ลงไป อ่านค่าที่เวลา 40 วินาทีแรก จดบันทึกค่าที่อ่านได้ และวัดอุณหภูมิด้วย

เทอร์โมมิเตอร์ พร้อมกับบันทึกค่าที่วัดได้ ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง วัดด้วยไฮโดรมิเตอร์ (จับเวลา40 วินาที แล้วอ่านค่า) บันทึกผลและวัด อุณหภูมิอีกครั้ง คำนวณเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทราย (Sand) ทรายแป้ง (Silt) และดินเหนียว (Clay)

(2.2) การศึกษาสมบัติของตะกอนดินใต้น้ำทางเคมี

1) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) นำตัวอย่างตะกอนดินที่ตากแห้ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่น้ำ 25 มิลลิลิตร (1: 2.5) ลงในตัวอย่าง จากนั้นคนให้เข้ากัน เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง pH Meter

2) ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity: EC) นำตัวอย่างตะกอนดินที่ตากแห้ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่น้ำ 50 มิลลิลิตร (1: 5) ลงในตัวอย่าง จากนั้นคนให้เข้ากัน เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง EC Meter

3) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Nitrogen: TN) นำตัวอย่างตะกอนดินที่ตากแห้ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อย เติมสารเร่งปฏิกิริยา 2 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อย โดยช่วงแรกใช้อุ ณหภูมิต่ำ ๆ แล้วจึงค่อยเพิ่มขึ้นจนเต็มที่ ประมาณ 360 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเกิน 400 องศาเซลเซียส ใช้เวลาย่อย 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสารละลายใสสีฟ้า ส่วนดินจะเป็นสีขาว แล้วนำหลอดย่อยที่เย็นแล้วมาเติมน้ำกลั่น 10-15 มิลลิลิตร แกว่งเบาๆ ให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บลงในขวดพลาสติก จากนั้นนำไปกลั่นโดยดูดสารละลาย 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อย แล้วจึงเติม 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงไป 5 มิลลิลิตร (ล้างตามรอบ ๆ หลอดด้านในด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย) และนำหลอดย่อยต่อเข้าเครื่องกลั่นและทำการกลั่นทันที โดยใช้ Boric Acid Indicator ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวรองรับเพื่อจับ NH_4^+ ที่เกิดขึ้น กลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้มาไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N H_2SO_4 จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู สำหรับการทำ Blank โดยย่อย Blank โดยใส่สารเร่ง 2 กรัมและกรดซัลฟูริกเข้มข้น10 มิลลิลิตร แล้วทำเหมือนตัวอย่างทุกประการ

4) ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน (Ammonium Nitrogen: NH_4^+ - N) นำตัวอย่างตะกอนดินที่ตากแห้ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร 10 กรัม เติม 2 M KCl ลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง 1 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 เก็บไว้ในขวดพลาสติก (ถ้าไม่วิเคราะห์ทันทีให้เก็บตัวอย่างไว้ในช่องแช่แข็ง) แล้วนำไปกลั่นโดย ดูดสารละลายมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อย เติม Magnesium Oxide 0.2 กรัม นำหลอดย่อยต่อเข้า

เครื่องกลั่นและทำการกลั่นทันที โดยใช้ Boric Acid Indicator ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการกลั่น จนสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N H_2SO_4 จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู

5) ปริมาณไนเตรตไนโตรเจน (Nitrate Nitrogen: NO_3^--N) นำสารละลายตัวอย่างในหลอดกลั่นแอมโมเนียเสร็จแล้ว (ควรทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทำการกลั่น) มาเติม Devarda Alloy 0.2 กรัม นำหลอดย่อยต่อเข้าเครื่องกลั่นและทำการกลั่นทันที โดยใช้ Boric Acid Indicator ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวจับแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการกลั่น จนสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N H_2SO_4 จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู

6) ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (Total Phosphorus: TP) การทำกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) โดยทำให้มีความเข้มข้นเป็น 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะดูดสารละลายมาตรฐาน 20 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติม Mixed Molybdate 8 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แต่ไม่ควรเกิน 30 นาที ได้สารละลายสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร จากนั้นนำค่า Absorbance และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ไปเขียนกราฟมาตรฐาน สำหรับการหาค่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในตัวอย่างโดยชั่งตะกอนดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 กรัม ลงไปในหลอดย่อยตัวอย่าง (Micro-kjeldahl) ขนาด 800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยในเตาย่อยที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสารละลายใสสีฟ้า ส่วนดินจะเป็นสีขาว จากนั้นทิ้งให้เย็นในตู้ดูดควัน แล้วจึงนำมาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงดูดตัวอย่างสารละลายที่ได้มา 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร แล้วทำตามขั้นตอนการหาค่ากราฟมาตรฐานในตอนต้นที่กล่าวมาแล้ว

7) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available Phosphorus) ชั่งตะกอนดินที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวน 5 กรัม เติมน้ำยากสกัด Bray-II 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 ลงในขวดพลาสติก จากนั้นดูดสารละลาย 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2% Boric Acid 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Murphy' Reagent 2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 2.5% Ascorbic Acid 1 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิ ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง

Spectrophotometer ช่วงคลื่น 820 นาโนเมตร สำหรับการทำเตรียมสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วทำตามขั้นตอนของตัวอย่าง

8) ความจุในการแลกเปลี่ยนแคทไอออน (Cation Exchange Capacity: CEC) ชั่งตะกอนดินที่ร่อนผ่า นตะแกรงขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวน 10 กรัม เติม 1 N แอมโมเนียมอะซิเตท 25 มิลลิลิตรแกว่งให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 ชะดินด้วย 1 N แอมโมเนียมอะซิเตท อีก 75 มิลลิลิตร (อย่าปล่อยให้ดินแห้ง) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 1 N แอมโมเนียมอะซิเตท (เก็บไว้หาแคทไอออนที่เป็น ด่าง) แล้วล้างแอมโมเนียมส่วนเกินที่ไม่ได้ดูดซับกับอนุภาคดินโดยการชะตัวอย่างดินที่อยู่บนกระดาษกรองด้วย 95% เอธิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร (สารละลายที่กรองได้ให้ทิ้งไป) แลกเปลี่ยนแอมโมเนียมที่ดูดซับกับอนุภาคดินโดยการชะดินด้วย 10% โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 10% โซเดียมคลอไรด์ สารละลายที่ได้นำไปกลั่นหาค่า CEC โดยดูดสารละลาย 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดกลั่น เติม 40%โซเดียมไฮดรอกไซด์ ลงไป 5 มิลลิลิตร (ล้างตามรอบ ๆ หลอดด้านในด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย) นำหลอดย่อยต่อเข้าเครื่องกลั่นและทำการกลั่นทันที โดยใช้ Boric Acid Indicator ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เป็นตัวรองรับเพื่อจับ NH_4^+ ที่เกิดขึ้น กลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N H_2SO_4 จนกระทั่งสารละลายเปลี่ ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู การกลั่น Blank ก่อนกลั่นตัวอย่างให้ใช้ 10% โซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร แล้วทำตามขั้นตอนของตัวอย่าง

9) ปริมาณอินทรียวัตถุ (Organic matter: OM) นำตัวอย่างตะกอนดินที่ตากแห้ง และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 0.5 กรัม เติม 1N โพแทสเซียมไดโครเมท 5 มิลลิลิตร แกว่งช้า ๆ ให้สารละลายกับดินผสมกันดี เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แกว่ง flask ไปมาช้า ๆ เพื่อให้ดินทำปฏิกิริยากับน้ำยาได้อย่างทั่วถึง ตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (ล้างดินที่ติดอยู่ข้าง Flask ให้ลงไปในสารละลาย) แล้วเติม O-Phenanthroline Indicator 3-5 หยด จากนั้นไตเตรตด้วย 0.5 N $FeSO_4$ ทันที จนกระทั่งถึง End Point (สารละลายดินจะเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นน้ำตาลปนแดง)

10) ความต้องการออกซิเจนของดินตะกอน (Sediment Oxygen Demand: SOD) แบ่งดินตะกอนออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

10.1) สำหรับหาน้ำหนักที่แท้จริงของดินตะกอน โดยชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างดินตะกอนประมาณ 3 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม นำไปอบในตู้อบ

ความร้อนแห้งที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักแล้วบันทึกน้ำหนักดินตะกอน

10.2) สำหรับหาค่าความต้องการออกซิเจน โดยชั่งดินตะกอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ใน ขวดบีโอ-ดี (ขวดมืด)

นำน้ำ กลั่น มาเติมอากาศโดยใช้หัวทรายเป่าให้อากาศประมาณ 5 นาที จนกระทั่งน้ำอิ่มตัวด้วยออกซิเจน นำขวดมืด (จากข้อ 2) ที่ใส่ดินตะกอนมาเติมน้ำกลั่นที่เติมอากาศให้เต็ม ปิดฝาแล้วเขย่าให้ดินตะกอนละลาย นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5 ชั่วโมง จากนั้น นำขวดมืดที่บ่มแล้วมาเติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-อะไซด์ 1 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ปิดฝาโดยไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ที่คอขวด เขย่าขวดโดยพลิกคว่ำหงายประมาณ 10-15 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนขาวประมาณครึ่งขวด แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ ริน ปิดฝาขวด แล้วเขย่าขวดให้สารผสมกันทั่ว จากนั้นตวงสารละลายมา 100 มิลลิลิตร เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด (สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต จนสารละลายไม่มีสี บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ สำหรับการทำ Blank ใช้ขวดบีโอดี (ขวดใส) จำนวน 3 ขวด และขวดมืดจำนวน 3 ขวด ใส่น้ำกลั่น นำขวดใสไปหาปริมาณออกซิเจน ค่าที่ได้จะเป็นปริมาณออกซิเจนของน้ำเริ่มต้น (ค่า DO เริ่มต้น) ส่วนขวดมืดนำไปบ่มเช่นเดียวกับตัวอย่างดินตะกอน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจน ค่าที่ได้จะเป็นปริมาณออกซิเจนที่เหลือจากออกซิเจนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ (ค่า DO สิ้นสุด) การทำ Blank ควรทำพร้อมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างดินตะกอน หาปริมาณออกซิเจน (ค่า DO) เช่นเดียวกับการหาค่าออกซิเจนละลาย

11) โลหะหนักโครเมียมและแคดเมียม (Cr and Cd) ชั่งตัวอย่างตะกอนดินที่ตากแห้ง จำนวน 0.2 กรัม เติมกรดไนตริกจำนวน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปย่อยด้วยเครื่อง Microwave จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองขั้นตอน (DI) เป็น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS

3.3.2 ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ Cr และ Cd ในตะกอนดินใต้น้ำที่มีต่อหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด

การทดสอบ ความเป็นพิษ เฉียบพลัน ของตะกอนดิน ใต้น้ำต่อสัตว์ทดลอง โดยใช้ตะกอนดินใต้น้ำที่เก็บในพื้นที่ศึกษาที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร โดยใช้น้ำประปาช่วยในการร่อนตะกอนดิน และเก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้น้ำไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทดลอง และมีการเติม สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมท และสารละลายแคดเมียมคลอไรด์ ให้มี

ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ซึ่งได้จากการทดลองขั้นต้น และอ้างจากการศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ และในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองโดยใช้ ตะกอนดินเทียม (Artificial Sediment) ซึ่งได้เตรียมโดยอ้างวิธีการเตรียมจาก OECD (2010) และมีส่วนประกอบในการเตรียมแสดงดังตารางที่ 3.3 และใช้วิธีการทดสอบความเป็นพิษในตะกอนดิน โดยใช้ระยะเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นหาค่าความเป็นพิษอยู่ในรูปของ LC_{50} และเปอร์เซ็นต์การตาย (% Mortality)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของตะกอนดินเทียม (Artificial Sediment)

ส่วนประกอบ	คุณลักษณะ	% ของตะกอนดิน โดยน้ำหนักแห้ง
Peat	มอสที่มีค่า pH 5.5-6.0 (ขนาดอนุภาค < 1 มม.) และตากให้แห้ง	4-5
Quartz sand	ขนาดอนุภาคที่อยู่ในช่วง 50 – 200 µm	75-76
Kaolinite clay	Kaolinite content > 30%	20
Organic carbon	เพิ่มใน Peat และ Sand	2 (± 0.5)
Calcium carbonate	$CaCO_3$	0.05 – 0.1
Water	ที่มีค่าการนำไฟฟ้า < 10 µS/cm	30 - 50

ที่มา: OECD (2010)

(1) การทดสอบพิษเฉียบพลันของหอยน้ำจืด

(1.1) การทดลองขั้นเริ่มต้น

เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารโ พแทสเซียมไดโครเมตและแคดเมียมคลอไรด์ที่ทำให้ประชากรของหอยน้ำจืดตายร้อยละ 0 ถึง 100 ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง โดยเตรียมสารละลายโลหะหนักทั้งสองชนิด จำนวน 5 ระดับความเข้มข้นและ 1 ชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

(1.2) การทดลองขั้นละเอียด

เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารโ พแทสเซียมไดโครเมตและแคดเมียมคลอไรด์ที่ทำให้หอยน้ำจืดตายร้อยละ 50 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้นซึ่งได้จากการทดลองขั้นเริ่มต้น มากำหนดให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยเตรียมสารละลายโลหะหนักทั้ง 2 ชนิด จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 และ 100.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1 ชุดควบคุม โดยใช้ตะกอนดิน ใต้น้ำต่อสารละลายโลหะหนักในอัตราส่วน 1:4 ดัดแปลงตามวิธี OECD (2004) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง และใช้หอย

น้ำจืดในระยะตัวอ่อน (Juvenile) ที่มีขนาดความยาวเฉลี่ย 1-2 เซนติเมตร และใส่หอยน้ำจืด ซ้ำละ 10 ตัว ในแต่ละความเข้มข้น ในขณะทำการทดลองไม่ มีการเติมอาหารให้หอยน้ำจืด สังเกตอาการและบันทึกจำนวนหอยน้ำจืด ที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง

(2) การทดสอบพิษเฉียบพลันของหนอนริ้นน้ำจืด

(2.1) การทดลองขั้นเริ่มต้น

เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารโ พแทสเซียมไดโครเมตและแคดเมียมคลอไรด์ที่ทำให้ประชากรของหนอนริ้นน้ำจืดตายร้อยละ 0 ถึง 100 ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง โดยเตรียมสารละลายโลหะหนักทั้งสองชนิด จำนวน 5 ระดับความเข้มข้นและ 1 ชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

(2.2) การทดลองขั้นละเอียด

เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารโ พแทสเซียมไดโครเมตและแคดเมียมคลอไรด์ที่ทำให้ หนอนริ้นน้ำจืดตายร้อยละ 50 ภายในเวลา 96 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้น ซึ่งได้จากการทดลองขั้นเริ่มต้น มากำหนดให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยเตรียมสารละลายโลหะหนักทั้ง 2 ชนิด จำนวน 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.10, 1.00, 10.00, 20.00 และ 50.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1 ชุดควบคุม โดยใช้ตะกอนดิน ใต้น้ำต่อสารละลายโลหะหนักในอัตราส่วน 1:4 ดัดแปลงตามวิธี OECD (2004) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง และใช้หนอนริ้นน้ำจืดวัยสองที่มีขนาดความยาวเฉลี่ย 2-3 มิลลิเมตร และใส่หนอนริ้นน้ำจืด ซ้ำละ 10 ตัว ในแต่ละความเข้มข้น ในขณะทำการทดลองไม่มีการเติมอาหารให้ หนอนริ้นน้ำจืดสังเกตอาการและบันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง

3.3.3 การศึกษาปริมาณเอนไซม์เมทัลโลไธโอนีนในหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดหลังจากได้รับ Cr และ Cd ในตะกอนดินใต้น้ำ

เป็นการวัดระดับของการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์เมทั ลโลไธโอนีนในหอยน้ำจืดและในหนอนริ้นน้ำจืด หลังจากได้รับสารโครเมียมและแคดเมียม ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดัดแปลงตามวิธีของ Viarengo et al. (1997) อ้างใน Rhee et al. (2007) และ Leung et al. (2003) ซึ่งใช้หอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดที่ได้รับสาร โครเมียม และแคดเมียมจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันซึ่งเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดไว้ในถุงซิป ขนาด 9 x 12 เซนติเมตร และตัวอย่างหนอนริ้นน้ำจืดไว้ใน Microcentrifuge Tube ขนาด 1.0 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตไว้ในตู้

แช่แข็ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ เมทัลโลไธโอนีน โดยนำตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ได้แยกใส่ใน หลอด Centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร โดยใช้หอยน้ำจืด 0.5 กรัม (Leung et al., 2003) และใช้หนอนริ้นน้ำจืด 0.2 กรัม (Fabrik et al., 2008) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำการผสมตัวอย่างสิ่งมีชีวิตให้เข้ากัน ด้วย 0.5 M sucrose และ 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) กับ 0.006 mM leupeptin (Sigma) และ 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (Sigma) เป็น antiproteolytic agent และ 0.01% 2-mercaptoethanol (Sigma) เป็น reducing agent ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่อง Homogenizer นำตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ได้ไปปั่นในเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วเก็บตัวอย่างส่วนใสที่ได้ใน Ethanol/Chloroform (อธิบายใน Kimura et al., 1979) โดยใช้ 1.05 มิลลิลิตร ของ Cold Ethanol และ 80 ไมโครลิตร ของ Chloroform ใน 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่างส่วนใส จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นในเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วทำการดูดตัวอย่างส่วนใส จำนวน 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 8 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, pH 8, Sigma) จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในถาด microplate ขนาด 96 หลุม ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้ GSH เป็น standard หลังจากนั้น 5 นาที นำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader Enzyme Assay

3.3.4 การศึกษาปริมาณโปรตีนในหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดหลังจากได้รับ Cr และ Cd ในตะกอนดินใต้น้ำ

การวิเคราะห์โปรตีนในหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด ดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยนำตัวอย่างหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดที่ปั่นแล้วได้จากข้อ 3.3.3 โดยดูดตัวอย่างส่วนใส จำนวน 100 ไมโครลิตร และสารละลาย Protein Reagent จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ใน ถาด Microplate ขนาด 96 หลุม โดยสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ คือ Bovine Scrum Albumin โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้นที่ระดับ 5 – 200 ไมโครลิตร เป็นตัวใช้ในการเปรียบเทียบมาตรฐาน จากนั้ นดูดสารละลายมาตรฐานจำนวน 100 ไมโครลิตร และสารละลาย Protein Reagent จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ใน Microplate หลังจากนั้น 2 นาที นำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดด้วยเครื่อง Microplate reader enzyme assay แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วง 595 นาโนเมตร

3.4 การวิเคราะห์สถิติ

3.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตะกอนดิน ใต้น้ำและตัวอย่างน้ำผิวดิน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อทำการหาค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างการทดลอง โดยหาค่าเฉลี่ย ± standard deviation (S.D.) โดยโปรแกรม Excel 2007

3.4.2 หาระดับความเข้มข้นของสา รโครเมียมและแคดเมียม ที่ทำให้หอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืดตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ Probit Analysis ด้วยโปรแกรม SPSS 11.5ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ เมทัลโลไธโอนีน และโปรตีน ในหอยน้ำจืดและหนอนริ้นน้ำจืด หลังจากได้รับ Cr และ Cd ที่ระยะ 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลจาก โปรแกรม Excel 2007 และ ANOVA โดยใช้โปรแกรม statistix 8.0

3.5 สถานที่ปฏิบัติการ

3.5.1 ห้องปฏิบัติการนิเวศ พิษวิทยาและสิ่งแวดล้อม สาขาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.2 ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อม สาขาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.3 ห้องปฏิบัติการภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.6 ระยะเวลาทำการศึกษา

ระยะเวลาที่ทำการทดลองตั้งแต่เตรียมการทดลอง เพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการ เก็บตัวอย่างในภาคสนาม วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำและตะกอนดินใต้น้ำทางกายภาพและเคมี วิเคราะห์ความเป็นพิษเฉียบพลันต่อหนอนริ้นน้ำจืดและหอยน้ำจืด และวิเคราะห์ปริมา ณเอนไซม์เมทัลโลไธโอนีนและปริมาณโปรตีนในห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่เดือน มีนาคม 2553 ถึง มิถุนายน 2554