บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ก. สถานีเก็บตัวอย่าง เลือกเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทย ซึ่งอยู่ในเขตน้ำขึ้นน้ำลง (intertidal zone) จำนวน 10 สถานี โดยพิจารณาจากความหลากหลายของการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นแหล่งรองรับโดยตรงของน้ำทิ้ง และของเสียต่าง ๆ จากกิจกรรมของประชาชนบนฝั่ง ไม่ว่าจากบ้านเรือนที่อยู่อาศัย โรงงานอุตสาหกรรม ชุมชนเมือง ภัตตาคารร้านค้า แหล่งท่องเที่ยว และแหล่งเกษตรกรรม เป็นต้น (รูปที่ 2.1)

ข. ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเป็นประจำทุก 2 เดือน ตลอดระยะเวลา 1 รอบปี โดยเริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2537 ถึงเดือนมิถุนายน 2538

ค. วิธีการเก็บตัวอย่าง ทำโดยการลงไปเก็บด้วยมือในช่วงน้ำลง ตัวอย่างที่เก็บมีดังนี้

1. ตัวอย่างน้ำ แต่ละสถานีแบ่งเป็น 3 จุดเก็บ ตามแนวขนานชายฝั่งโดยให้ห่างกันจุดละประมาณ 50 เมตร เพื่อวิเคราะห์

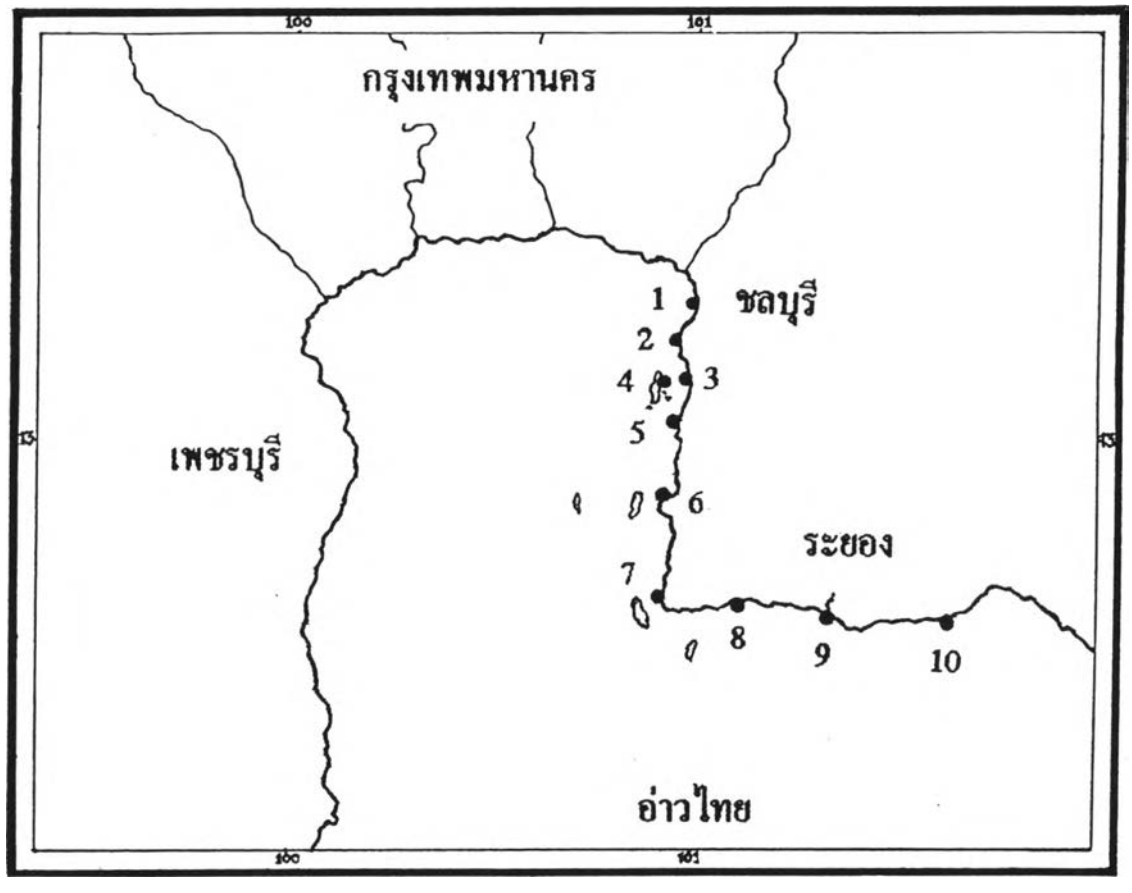
1.1 บีโอดี เก็บตัวอย่างจากกึ่งกลางความลึกของน้ำ โดยใช้ขวดพลาสติก 1 ลิตร แช่เย็นและเก็บในที่มืด

1.2 ซัลไฟด์ เก็บตัวอย่างใกล้พื้นท้องน้ำ ใส่ในขวดบีโอดีขนาดความจุ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายซิงค์อะซิเตต 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แช่เย็นและเก็บในที่มืด

1.3 เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอนจำนวน 4 แกลลอน (20 ลิตร) ต่อสถานี

2. ตัวอย่างดินตะกอน แต่ละจุดเก็บแบ่งเป็น 3 ตัวอย่าง ตามแนวตั้งฉากกับชายฝั่งโดยให้ห่างกันประมาณ 5 เมตร เพื่อวิเคราะห์

2.1 อัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพ เก็บตัวอย่างโดยใช้ท่อพลาสติก (corers) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร แช่เย็นและเก็บในที่มืด



รูปที่ 2.1 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกของอ่าวไทย

1) ชลบุรี (ศาลากลาง)
2) บางแสน (โอเชียนเวิลด์)
3) ศรีราชา (สวนสุขภาพ)
4) เกาะสีชัง (ตลาดท่าล่าง)
5) แหลมฉบัง (ท่าเรือพาณิชย์)
6) พัทยา (ธนาคารศรีนคร)
7) บางเสร่ (ศูนย์ฝึกทหารใหม่)
8) มาบตาพุด (หาดทรายทอง)
9) ระยอง (ปากน้ำ)
10) บ้านเพ (EMDEC)

2.2 สารอินทรีย์และสารอาหารในดินตะกอน เก็บตัวอย่างดินตะกอนผิวหน้า บรรจุถุงพลาสติก แช่เย็น

2.3 ปริมาณแบคทีเรียในดินตะกอน เก็บตัวอย่างดินตะกอนผิวหน้าในขวดสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร ก่อนที่จะแช่เย็น และเก็บในที่มืด

2.4 ขนาดตะกอนดิน เก็บตัวอย่างผิวหน้าดินตะกอน บรรจุถุงพลาสติก และแช่เย็น

2.5 ชั้นดิน เก็บตัวอย่างโดยใช้ท่อพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร แช่เย็นและเก็บในที่มืด

ง. สถานที่ทำการทดลอง

1. สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง ต. ท่าเทววงษ์ อ. เกาะสีชัง จ. ชลบุรี

2. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

2. <u>การวิเคราะห์น้ำและดินตะกอน</u>

ก. การตรวจวัดคุณภาพน้ำในภาคสนาม

1. อุณหภูมิ ตรวจวัดด้วย Thermometer
2. ความเป็นกรด-ด่าง ตรวจวัดด้วย pH meter
3. ความเค็ม ตรวจวัดด้วย Refracto salinometer
4. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ตรวจวัดด้วย DO meter

ข. การวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

1. การวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง

1.1 บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand, BOD)

ค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมีเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลชีพในน้ำ หาได้จากความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนเริ่มต้น และออกซิเจนที่เหลืออยู่หลังจากการบ่ม

ตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

การวิเคราะห์ตาม APHA AWWA WPCF (1985) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

1.2 ปริมาณซัลไฟด์ (Sulfide)

วิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการวิเคราะห์ในรูปของ Lauth's violet ที่เกิดจาก *p*-phenylenediamine โดยการตรวจวิเคราะห์ตามวิธี Colorimetric method (Strickland and Parsons, 1972) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

2. การวิเคราะห์ดินตะกอน

2.1 อัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอน (Oxygen consumption rate of sediment microbe)

การศึกษาถึงอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอน โดยดัดแปลงวิธีการของ Kawai and Maeda (1983) และทำการตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำในแต่ละช่วงเวลาโดยใช้ Micro Winkler Method ตามวิธี Azide modification (APHA AWWA WPCF, 1985)

การเลือกใช้วิธีการ ไมโครวิงเคลอร์ (Micro-Winkler method) เพื่อตรวจวัดปริมาณของออกซิเจนในตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากการทดลอง ในการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอนครั้งนี้ เนื่องมาจาก

- สามารถสุ่มเก็บตัวอย่างจากชุดทดลองได้ง่าย โดยการหย่อนสายยางออกสู่ภายนอก ซึ่งจะไม่ทำให้สภาพของชุดทดลองที่ได้จัดเตรียมไว้เป็นอย่างดีต้องมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก
- สามารถเตรียมชุดทดลองได้มาก โดยไม่มีความจำกัดในเรื่องเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง เนื่องจากใช้เครื่องมือง่ายๆ และตัวอย่างที่สุ่มเก็บได้สามารถเก็บรักษาไว้ได้ระยะหนึ่งก่อนการวิเคราะห์ ฉะนั้นแม้ความสามารถในการตรวจวัดด้วยวิธีนี้จะมีค่าต่ำ แต่เราสามารถเพิ่มจำนวนซ้ำให้มากขึ้นเพื่อความถูกต้องของข้อมูลได้
- เสียค่าใช้จ่ายน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่สลับซับซ้อน

การเตรียมตัวอย่าง

1. ตัวอย่างน้ำในแกลลอน กรองด้วยผ้ากรองขนาด 23 ไมครอน (ถุงกรองแพลงค์ตอนพืช) และทำการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำให้มีค่าสูงระดับหนึ่ง

2. ตัดแบ่งดินตะกอนที่ระดับ 0-0.5 เซนติเมตร จากผิวหน้าดิน ชั่ง 25 กรัม และบรรจุลงขวดทดลอง ขนาดความจุ 1 ลิตร

3. ใส่สารเมอร์คิวริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) 2 มิลลิกรัม (2 ppm) ในขวดทดลองที่ใช้เป็น ชุดควบคุม (blank)

4. ใส่น้ำที่เติมออกซิเจนแล้วโดยวิธีกาลักน้ำลงในขวดทดลอง และนำไปจัดวางลงชั้น ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส

5. หย่อนหลอดยางลงในขวดทดลอง โดยให้ส่วนต้นของหลอดอยู่กึ่งกลางความลึกของขวด และปล่อยส่วนปลายออกสู่ภายนอก เพื่อความสะดวกในการดูดเก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ

6. เคลือบปิดผิวหน้าน้ำด้วยพาราฟินเหลว

7. ทำการตรวจวัดออกซิเจนเริ่มต้นและเมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ในแต่ละขวดทดลอง โดยใช้หลอดฉีดยาที่มีขนาดความจุ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในการดูดเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ (รูปที่ 2.2)

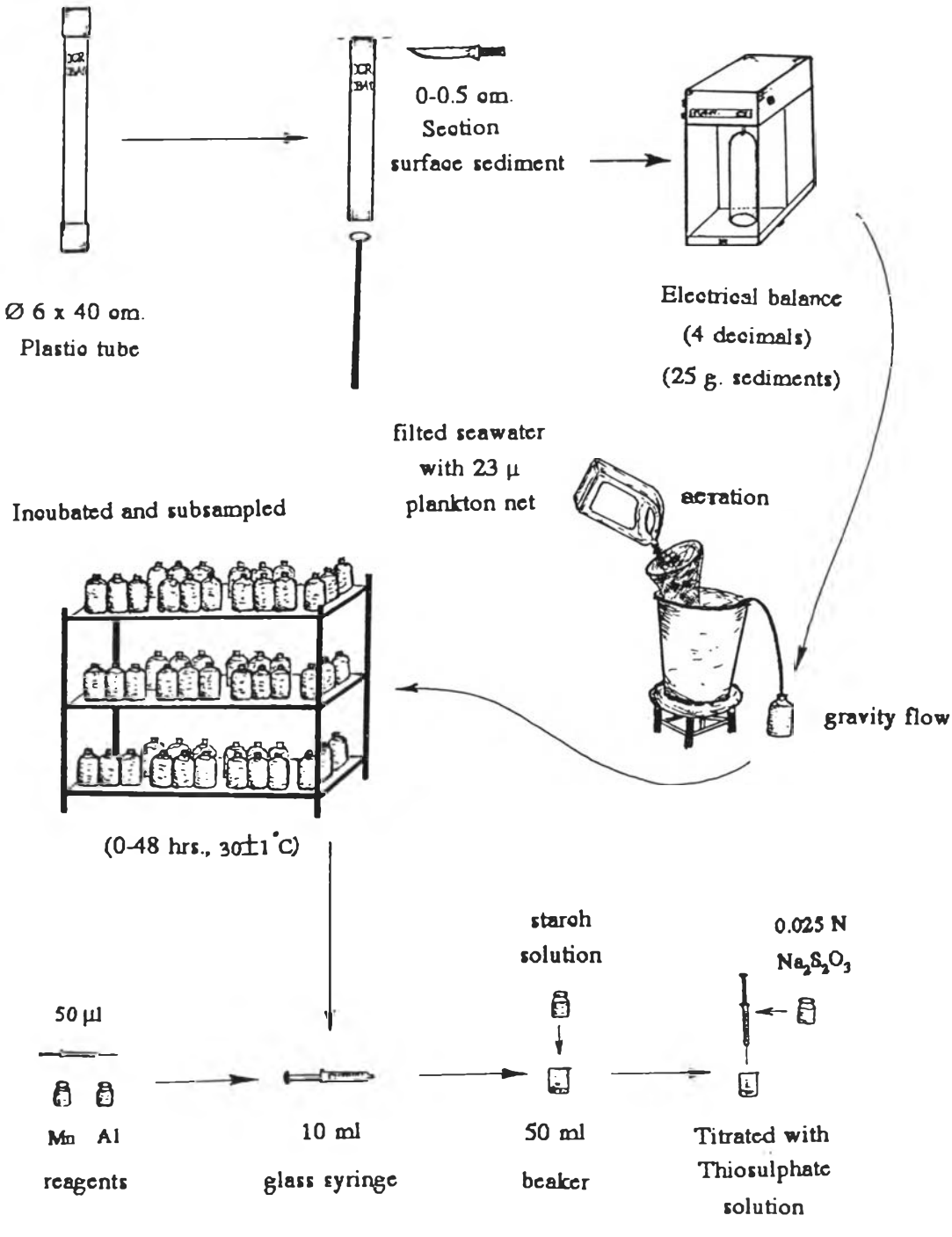
การจัดเตรียมตัวอย่างดินและน้ำจากแต่ละสถานี โดยแบ่งเป็น 12 ขวดทดลอง ดังนี้

1. ชุดทดลอง ประกอบด้วย

จุด A	ได้แก่	A1, A2, A3	-	ดินตะกอน 25 กรัม + น้ำทะเล 1 ลิตร
จุด B	ได้แก่	B1, B2, B3	-	ดินตะกอน 25 กรัม + น้ำทะเล 1 ลิตร
จุด C	ได้แก่	C1, C2, C3	-	ดินตะกอน 25 กรัม + น้ำทะเล 1 ลิตร

2 ชุดควบคุม

Blank A	-	ดินตะกอน 25 กรัม + น้ำทะเล 1 ลิตร + $HgCl_2$ 2 มิลลิกรัม
Blank B	-	ดินตะกอน 25 กรัม + น้ำทะเล 1 ลิตร + $HgCl_2$ 2 มิลลิกรัม
Blank C	-	ดินตะกอน 25 กรัม + น้ำทะเล 1 ลิตร + $HgCl_2$ 2 มิลลิกรัม



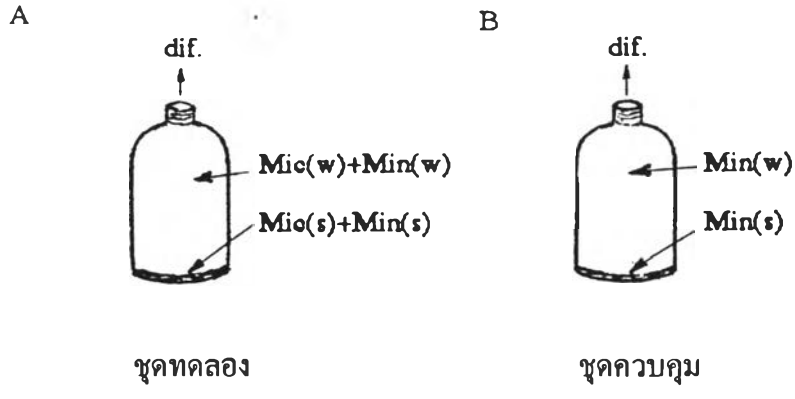
รูปที่ 2.2 แผนภาพอุปกรณ์และวิธีการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอน ดัดแปลงจาก Kawai and Maeda (1984)

การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนในการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์หาค่าออกซิเจนละลายของตัวอย่างน้ำในหลอดฉีดยาขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่สุ่มเก็บจากขวดทดลองในแต่ละช่วงเวลา ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนในการตรวจวัดค่าบีโอดีของตัวอย่างน้ำ ดังได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ก โดยใส่สารเคมีอย่างละ 50 ไมโครลิตร (µl) ผ่านทางปลายหลอดฉีดยา และไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตในบีกเกอร์ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

ลักษณะการใช้ออกซิเจนในการทดลอง

รูปแบบและปริมาณการใช้ออกซิเจนในชุดทดลองทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 2.3



ชุดทดลอง ชุดควบคุม

อธิบายความดังนี้

A = ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในขวดทดลอง
B = ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในขวดควบคุม (blank)
Mic(w) = ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปโดยจุลชีพในน้ำทะเล
Mic(s) = ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปโดยจุลชีพในดินตะกอน
Min(w) = ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปโดยขบวนการทางเคมีในน้ำทะเล
Min(s) = ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปโดยขบวนการทางเคมีในดินตะกอน
dif. = ปริมาณออกซิเจนที่แพร่สู่บรรยากาศ

รูปที่ 2.3 รูปแบบและปริมาณการใช้ออกซิเจนในขวดทดลอง
ดัดแปลงจาก Kawai and Maeda (1983)

<u>การคำนวณปริมาณการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอน</u>

ปริมาณการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอน คิดคำนวณจาก

$$[Mic(w) + Mic(s)] = A - B$$

อัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอน คิดคำนวณจากปริมาณการใช้ออกซิเจนดังกล่าวต่อหนึ่งหน่วยเวลา (ชั่วโมง)

2.2 ปริมาณสารอินทรีย์และสารอาหาร (Organic matter and Nutrient)

การวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในดินตะกอน ทำโดยการตรวจวัดปริมาณไนโตรเจน (N) และ คาร์บอน (C) อันเป็นองค์ประกอบสำคัญ และได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสซึ่งจัดเป็นสารอาหารอย่างหนึ่งเพื่อประกอบในการศึกษา

1) การวิเคราะห์ไนโตรเจนและคาร์บอน (N &C)

โดยการตรวจวัดก๊าซไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเผาดินตะกอนที่ความร้อนสูง ด้วยเครื่องมือ CHN analyser ตามวิธีการของ Snidvongs (1993) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์วิธีนี้จะอยู่ในรูปไนโตรเจนและคาร์บอนทั้งหมดในดินตะกอน โดยค่าของคาร์บอนต้องนำมาหักลบด้วยค่าของแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อหาค่าของสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนในดินตะกอน

2) การวิเคราะห์แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตในตัวอย่างดิน สามารถหาได้จากน้ำหนักที่หายไปหลังการทำปฏิกิริยาด้วยกรด ตามวิธีการที่กล่าวไว้ใน Snidvongs (1993) โดยรายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

3) การวิเคราะห์ฟอสฟอรัส (P)

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในดินตะกอน ทำโดยการเผาดินที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้เกิดการออกซิไดซ์ของสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัสทั้งหมด (Snidvongs, 1993) และสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Colorimetric method (Strickland and Parsons, 1972) ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก

2.3 ปริมาณแบคทีเรียในดินตะกอน

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในดินตะกอน ใช้วิธีการ Total plate count โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นและตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น (Elliott et al., 1978) ดังแสดงรายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก

2.4 ขนาดตะกอนดิน (Grain size)

ความแตกต่างของพื้นที่เก็บและลักษณะของตัวอย่าง ทำให้สามารถแบ่งการศึกษาขนาดตะกอนดินออกเป็นสองส่วน ตามขนาดเม็ดดินที่ค่อนข้างใหญ่และเม็ดดินละเอียด

1) การวิเคราะห์ตัวอย่างดินตะกอนที่มีขนาดเม็ดดินค่อนข้างใหญ่

เม็ดดินตะกอนที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-0.63 มิลลิเมตร (1,000-63 ไมครอน) หรือระดับ Sand-silt สามารถแยกขนาดได้ด้วยตะแกรงร่อนอัตโนมัติ (sediment shaker) ตามวิธีการ Wentworth grade classification อ้างตาม ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธ์ (2524) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก

2) การวิเคราะห์ตัวอย่างดินตะกอนที่มีขนาดเม็ดดินละเอียด

ส่วนของดินตะกอนที่มีระดับ Silt-Clay จะอาศัยหลักการตกตะกอนตามความถ่วงจำเพาะที่แตกต่างกัน ตามวิธี Pipette Method ของ Asian-Australia Economic Co-operation Program (1986) วิธีการดังภาคผนวก ก

2.5 การแบ่งชั้นดินตะกอน

ตัวอย่างดินตะกอนที่เก็บโดยใช้ท่อพลาสติกใส สามารถสังเกตการแบ่งชั้น โดยพิจารณาจากสี ลักษณะเนื้อดิน และองค์ประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในดินด้วยตาเปล่า เพื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ในปัจจัยต่าง ๆ พร้อมถ่ายรูปประกอบการศึกษา

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ก. วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลในแต่ละสถานีและช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างด้วย ANOVA (Analysis of Variance) แบบ One-way และ Two-way

ข. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเฉพาะกลุ่ม โดยใช้วิธีการ Duncan's New Multiple Range Test

ค. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลชีพในดินตะกอนกับปัจจัยที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ Correlation และ Regression equation

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ค