บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำผิวดิน (บ่อน้ำจืด) เพื่อการบริโภค หมู่ที่ 6 ตำบลเกาะสาหร่าย อำเภอเมือง จังหวัดสตูล โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 5 จุด และทำการเก็บทั้งหมด 2 ครั้ง ในเดือนพฤษภาคม และเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551

3.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. สำรวจบ่อน้ำจืด หมู่ที่ 6 ตำบลเกาะสาหร่าย อำเภอเมือง จังหวัดสตูล ที่มีการใช้ประโยชน์เพื่อการอุปโภคและบริโภค
2. กำหนดจุดเก็บตัวอย่างน้ำ (บ่อน้ำจืด) หมู่ที่ 6 ตำบลเกาะสาหร่าย อำเภอเมือง จังหวัดสตูล โดยใช้เครื่อง Global Position System (GPS) เก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ครั้ง
3. เก็บตัวอย่างทั้งหมด 5 จุด มาวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพ-เคมี และชีวภาพ โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบจ้วง

ตารางที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณหมู่ที่ 6 ตำบลเกาะสาหร่าย อำเภอเมือง จังหวัดสตูล

รหัสสถานีเก็บตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง
จุดที่ 1	บ่อทุ่ง
จุดที่ 2	บ่อหลวง
จุดที่ 3	บ่อในสวน
จุดที่ 4	บ่อโต๊ะหลัง
จุดที่ 5	บ่อกลางนา

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ดำเนินการวิเคราะห์คุณภาพจากตัวอย่างน้ำทางกายภาพ-เคมี และชีวภาพ โดยทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ ดังนี้

1. ความลึก วัดโดยใช้ลูกดิ่ง
2. ความขุ่น วัดโดยใช้เครื่อง Turbidity meter
3. ความนำไฟฟ้า วัดโดยใช้เครื่อง Conductivity meter
4. ความเป็นกรด-ด่าง วัดโดยใช้เครื่อง pH meter
5. อุณหภูมิ วัดโดยใช้ Thermometer
6. ความเค็ม วัดโดยใช้เครื่อง Salinity meter

7. ออกซิเจนละลาย วิเคราะห์วิธีเอไซด์โมดิฟิเคชัน Azide Modification

8. บีโอดี วิเคราะห์วิธีบีโอดีวิธีเอไซด์โมดิฟิเคชัน Azide Modification (แบบโดยตรง)

9. ความกระด้างทั้งหมด วิเคราะห์วิธี Complexometric method

10. แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด วิเคราะห์วิธีเอ็มพีเอ็น

11. แบคทีเรียกลุ่มอีโคไล วิเคราะห์วิธีเอ็มพีเอ็น

3.3 เครื่องมือและสารเคมี

3.3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

- เครื่องยูวี- วิสิเบิลสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (UV-Spectrophtometer)
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical balance)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- เครื่องวัดความนำไฟฟ้า (Conductivity meter)
- เครื่องวัดความเค็ม (Salinity Refractometer)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจน (Dissolved Oxygen :DO) และค่าออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์สาร (Biochemical Oxygen Demand: BOD)

- แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulphate : $MnSO_4H_2O$)
- โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide)
- โซเดียมไอโอไดด์ (Sodium ioide : NaI)
- กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid : H_2SO_4)
- น้ำแป้ง (Starch)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : NaOH)
- Alkali-iodide-Azide Reagent (AIA)

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ความกระด้างทั้งหมด (Total hardness)

- conc. NH_4OH (sp.gr.0.900)

- Calcium standard solution 1.00 มิลลิลิตร = 1.00 มิลลิกรัม $CaCO_3$ ชั่ง $CaCO_3$ ซึ่งอบที่ 180 องศาเซลเซียน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 1.000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 600 มิลลิลิตร และค่อย ๆ เติม HCL (dilute) ปริมาณน้อยที่สุดเพื่อละลายแล้ว dilute เป็น 1000 มิลลิลิตร

- Eriochrome Black T indicator solution ละลาย Eriochrome Black T 0.40 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้ว dilute เป็น1 ลิตร ด้วย 95 % ethanol indicator นี้จะ stable อย่างน้อยที่สุด 2 เดือน

- Hydroxylamine hydrochloride solution ละลาย $NH_4OH.HCl$ 30 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น แล้ว dilute เป็น 1 ลิตร

- Potassium ferrocyanide crystals

- Sodium cyanide solution ละลาย NaON 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้ว dilute เป็น100 มิลลิลิตร

- Na_2EDTA standard solution 1.00 มิลลิกรัม $CaCO_3$ ละลาย Na_2EDTA ซึ่งทำให้แห้งโดยเก็บไว้ค้างคืนใน H_2SO_4 desiccator 3.72 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น แล้ว dilute เป็น 1000 มิลลิลิตร reagent นี้ จะเสถียรหลายสัปดาห์ ดังนั้นจะเตรียมได้ที่ละมาก ๆ cheek concentration standard solution 25 มิลลิลิตร

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โคลีฟอร์มแบคทีเรีย

- น้ำกลั่น

- Lactose

- Nutrient Agar (NA)

- Eosin Methlene Blue Agar (EMB)

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์อีโคไล

- น้ำกลั่น

- Lactose

- EC medium

- Nutrient Agar (NA)

- Eosin Methlene Blue Agar (EMB)

3.4 วิธีทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ

3.4.1.1 ใช้ pH meter ที่สามารถวัดอุณหภูมิของน้ำได้

3.4.1.2 การวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH)

- ปิเปตตัวอย่างน้ำที่ไม่ผ่านการกรองมา 70 มิลลิลิตร (ทำ 2 ครั้ง)

- วัดด้วยเครื่อง pH meter

- บันทึกค่า pH ที่ได้จากการวัด

3.4.1.3 ความนำไฟฟ้า (Conductivity)

- ปิเปตตัวอย่างน้ำที่ไม่ได้กรองมา 70 มิลลิลิตร

- วัดด้วยเครื่อง Conductivity meter

- บันทึกค่าความนำไฟฟ้าในหน่วย ไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร

3.4.1.4 ความขุ่น (Turbidity)

-เปิดเครื่องวัดความขุ่นและเตรียมเครื่องตามคู่มือการใช้และวัดความขุ่นของน้ำตัวอย่างตามวิธีของเครื่องนั้น ๆ

- น้ำตัวอย่างต้องเขย่าให้เข้ากันดีก่อนเทใส่หลอดตัวอย่างเพื่อนำไปวัดความขุ่น

- เครื่องวัดความขุ่นบางรุ่นจะมีสารละลาย Stock Standard Turbidity ความขุ่นมาให้แล้ว ต้องมีการตรวจเช็คว่าเสื่อมคุณภาพหรือไม่ โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานความขุ่นที่เตรียมขึ้น

- ถ้าตัวอย่างน้ำมีความขุ่นเกินที่เครื่องจะวัดได้ให้เจือจางตัวอย่างน้ำลงก่อน

3.4.1.5 วิธีวัดความเค็มด้วย Salinity Refractometer

1. เปิดฝาแผ่นพลาสติกใสของ salinity refractometer และหยดน้ำกลั่นลงบนกระจกปริซึม (prism) แล้วเช็ดให้สะอาดด้วยกระดาษทิชชูและหยดตัวอย่างน้ำประมาณ 2-3 หยดลงบนกระจกปริซึมแล้วค่อยๆ ปิดฝาแผ่นพลาสติกใสระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศในตัวอย่างน้ำที่ปิดฝาแผ่นพลาสติกแล้ว

2. หันด้านของกระจกปริซึมของ salinity refractometer เข้าหาด้านที่มีแสง ใช้ตาดูที่บริเวณช่องเลนส์ตา (eyepiece) สังเกตพื้นที่วงกลมใน eyepiece จะปรากฏพื้นที่สี น้ำเงินด้านบนละสีขาวด้านล่าง ให้อ่านค่าบริเวณที่เขตพื้นที่สีน้ำเงินบรรจบกับพื้นที่สีขาว ค่าที่อ่านได้เป็นค่าความเค็มของตัวอย่างน้ำ มีหน่วยเป็น ส่วนในพันส่วน (พีพีที)

3. เทตัวอย่างน้ำทิ้ง ล้างทำความสะอาดกระจกปริซึมและฝาแผ่นพลาสติกใสของ salinity refractometer ด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู

3.4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

3.4.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen: DO)

- ตัวอย่างน้ำ 300 มิลลิลิตร
- เติม $MnSO_4$ 1.5 มิลลิลิตร
- เติมสารละลายอัลคาไลไอโอไดด์เอไซด์ 1 มิลลิลิตร ปิดฝา
- เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
- เติม Conc.H_2SO_4 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้ตะกอนละลาย
- ปิเปตตัวอย่างน้ำ มา 20 มิลลิลิตร นำไทเทรตกับ 0.025 $Na_2S_2O_3$ ที่ผ่านการ Standardization ด้วย $K_2Cr_2O_7$0.025 N แล้วจึงได้สีเหลืองอ่อน
- เติมน้ำแป้ง 1มิลลิลิตร ได้สีน้ำเงินเข้มแล้วไทเทรดจนสีน้ำเงินหายไป
- จดปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้นำไปคำนวณหาค่า DO

3.4.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand: BOD)

- วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ณ จุดเริ่มต้นเรียกว่า DO_0
- วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนในตัวอย่างที่บ่มไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส ในตู้ Incubator นาน 5 วัน เรียกว่า DO_5
- วิเคราะห์เหมือนกับค่า DO โดยใช้น้ำตัวอย่าง 300 ml 2 ขวด ขวดแรกใช้หา DO_0 วิเคราะห์ทันที คำนวณหาค่า DO_0ขวดที่ 2 บ่มในตู้ Incubator นาน 5 วัน วิเคราะห์เหมือน DO_0 แล้วคำนวณหาค่า DO_5

สูตร $BOD(mg/l) = DO_0 - DO_5$

3.4.2.3 การวิเคราะห์ความกระด้างทั้งหมด (Complexometric method)

วิธีการวิเคราะห์

1. Pipet sample ซึ่งมี hardness น้อยกว่า 25 mg หรือ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ใช้อย่างมากที่สุด 50 มิลลิลิตร) ลงใน flask ชนิดจุ 125 มิลลิลิตร ในทางปฏิบัติปิเปตเพียง 25 มิลลิลิตร

2. เติม $NH_2OH.HCl$ solution 0.5 มิลลิลิตร

3. เติม NH_4OH conc. 0.5 มิลลิลิตร (NH_4OH conc) ต้องปิดจุกให้แน่น เพื่อไม่ให้ระเหย ทำให้เปลี่ยนเป็น dil NH_4OH 0.5 มิลลิลิตร ของ NH_4OH dilute จะไม่สามารถ buffer ให้ solution มี pH ตามต้องการได้

4. เติม 1 มิลลิลิตร NaCN solution ในกรณีที่มี Cu , Zn , Pb , Co และ Ni ในตัวอย่าง หรือถ้าตัวอย่าง มีเหล็กน้อยกว่า 0.2 มิลลิกรัม มีแมงกานีสน้อยกว่า 0.025 มิลลิกรัม

5. ถ้ามี Mn ใน sample เติม $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$ 1-2 เกล็ดคนแล้วตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 5 นาที จน $Mn_2Fe(CN)_6$ ตกตะกอน

6. เติม Eriochrome Black T indicator solution 1 มิลลิลิตร

7. titrate กับ Na_2EDTA standard solution จนเป็นสีน้ำเงิน (end point)

การคำนวณ

$$\text{Total hardness as } CaCO_3 = \frac{1{,}000 \times \text{ml titrant}}{\text{ml sample}}$$

3.4.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านชีวภาพ

3.4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโคลีฟอร์มแบคทีเรีย (Total Coliform Bacteria : TCB)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างหนัก 25 g + phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
2. ผสมให้เข้ากันได้สารเจือจาง 10 ใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้ความเจือจาง 10^{-2} ดำเนินการเจือจางต่อไปจนได้ความเจือจาง 10^{-3}
3. ดูดสารเจือจาง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหาร lauryl sulfate broth (LBS) ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส ความเจือจาง ความเจือจางละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง
4. สังเกตหลอดที่ขุ่น และเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สให้อ่านผลเป็นบวก

5. นำไปตรวจยืนยัน โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อ ที่ให้ผลบวกทุกหลอด ใส่ในหลอดอาหารเหลว BGLB ที่บรรจุหลอดดักแก๊สไว้ภายใน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง
6. ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นและเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สให้อ่านผลบวก
7. อ่านค่าโคลิฟอร์มจากตาราง NPN 3 หลอด

3.4.3.2 ปริมาณ E.coil bacteria

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างหนัก 25 g + phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 225 ml
2. ผสมให้เข้ากันได้สารเจือจาง 10^{-1} ใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน PBS ปริมาตร 9ml ได้ความเจือจาง 10^{-2} ดำเนินการเจือจางต่อไปจนได้ความเจือจาง 10^{-3}
3. ดูดสารเจือจาง ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดอาหาร lauryl sulfate broth (LBS) ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส ความเจือจาง ความเจือจางละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 35 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง
4. สังเกตหลอดที่ขุ่น และเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สให้อ่านผลเป็นบวก
5. ใช้ห่วงเขี่ยถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเหลว EC ที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ภายใน บ่มในอ่างน้ำควบคุม อุณหภูมิเป็นเวลา 44.5 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง.
6. ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นและเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สให้อ่านผลเป็นบวก
7. นำไป Streak บนอาหาร EMB บ่มที่อุณหภูมิเป็นเวลา 35 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง.

โคโลนีสีตะกั่ว (Metallic sheen) มีจุดดำตรงกลาง นำไปทดสอบ โดยวิธีชีวเคมีโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อใส่อาหาร

การคำนวณ

การคำนวณหาค่าดัชนี MPN

นำจำนวนของหลอดที่ให้ผล positive ของแต่ละระดับการเจือจางจำนวน 3 ระดับ ในการตรวจสอบขั้นยืนยัน มาหาค่าปริมาณของเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียหรือ ฟีคอลโคลิฟอร์มแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำเทียบกับตารางดัชนี MPN เช่น ถ้าในอนุกรมการเจือจางตัวอย่างน้ำ 10, 1, 0.1 พบว่า 10 ml มีหลอดที่ให้ผลบวก 4 หลอดจาก 5 หลอด (ระดับการเจือจางแรกควรเข้าใกล้ 5) 1 มิลลิลิตร มีหลอดที่ให้ ผลบวก 3 หลอดจาก 5 หลอด 0.1 ml มีหลอดที่ให้ผลบวก 1 หลอดจาก 5 หลอด (ระดับการเจือจางสุดท้ายควรเข้าใกล้ 0 ไม่ควรเกิน 2)

ดังนั้นให้ไปเปิดดูตารางดัชนี MPN จากเลขรวมของหลอดที่ให้ผลบวก คือ 4-3-1 ซึ่งจะให้ค่าดัชนี MPN ของตัวอย่างเป็น 33 MPN/100 ml ของตัวอย่าง แต่ถ้าอนุกรมการเจือจางตัวอย่างน้ำที่อ่านผลได้เป็น 1, 0.1, 0.01 มิลลิลิตร ค่าที่อ่านได้จากดัชนี MPN จะต้องคูณด้วย 10 แต่ถ้าอนุกรมการเจือจางตัวอย่างน้ำที่อ่านผลได้เป็น 0.1, 0.01, 0.001 มิลลิลิตร ค่าที่อ่านได้จากดัชนี MPN จะต้องคูณด้วย 100 บางครั้งผลที่ได้อาจจะอ่านไม่ได้จากตารางดัชนี MPN ให้ทำการคำนวณหาค่าเอ็มพีเอ็นต่อมิลลิลิตร

$$\text{MPN/100 ml} = \frac{\text{No of possitive tube} \times 100}{\sqrt{(\text{ml sample in negative tubes}) \times (\text{ml sample in all sample})}}$$