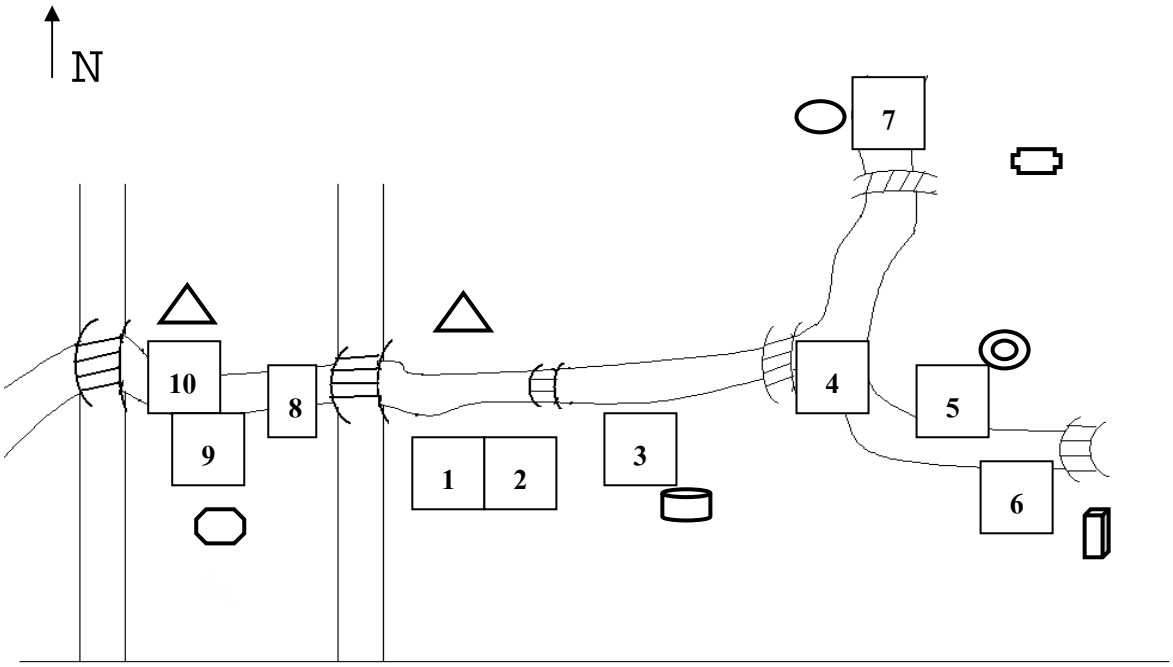
บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน

คลองชวดหมัน เป็นคลองธรรมชาติตั้งอยู่ในเขตชุมชนหมู่ 7 อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ โดยมีจุดเริ่มต้นของคลองเชื่อมต่อมาจากคลองโอ่งแตก และคลองลำชวดตาชุ่ม จากจุดที่เชื่อมต่อจากคลองลำชวดตาชุ่มประมาณ 1 กิโลเมตร คลองชวดหมันมีการเชื่อมต่อกับคลองลำรางตาพลอยซึ่งมีทิศทางการไหลของน้ำลงสู่คลองชวดหมัน เส้นทางการไหลของน้ำคลองชวดหมันจะไหลลงมาทางทิศใต้ผ่านชุมชน รวมถึงไหลผ่านทางด้านหลังของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คลองชวดหมันมีความยาวตลอดลำคลองประมาณ 3.5 กิโลเมตร กว้างประมาณ 3.5 เมตร ลึก ประมาณ 1-2 เมตร โดยโครงการวิจัยนี้จะสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน แบ่งการพิจารณาเป็น 2 ประเด็น คือ

(1) วิธีการเก็บตัวอย่างตามแนวยาวของลำคลอง จะเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากจุดต่างๆตลอดลำคลองชวดหมันและคลองเชื่อมต่อ โดยจะสุ่มเก็บตัวอย่างแบบกะ ซึ่งการกำหนดจุดเก็บตัวอย่างจะมาจากการสำรวจเบื้องต้น และการรวบรวมจากข้อมูลทุติยภูมิ โดยพิจารณาจากบริเวณแหล่งกำเนิดมลพิษแต่ละแหล่ง

(2) วิธีการเก็บตัวอย่างตามแนวลึกของลำคลอง จะเก็บตัวอย่างน้ำในคลองที่ระดับความลึกเฉพาะกึ่งกลางคลอง และเก็บตัวอย่างตะกอนดินที่ระดับผิวหน้าตะกอน ซึ่งจะใช้เป็นตัวแทนความลึกทั้งหมด ภาพจุดเก็บตัวอย่างน้ำอย่างง่ายทั้ง 10 จุดแสดงในรูปที่ 3.1-1 และภาคผนวก ก



รูปที่ 3.1-1 จุดเก็บตัวอย่างน้ำ

สัญลักษณ์

- มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
- ชุมชน/หอพัก
- โรงงานปลากระป๋อง
- โรงงานขนมปัง
- โรงงานเหล็ก
- สนามกอล์ฟ
- บ่อเลี้ยงปลา
- สะพาน

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำและตะกอนดิน

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำและตะกอนดินด้วยพารามิเตอร์ทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ รวมทั้งปริมาณโลหะทั้งหมด 10 ชนิด โดยเป็นการเลือกตัวแทนบางพารามิเตอร์เพื่อสะท้อนปัญหามลพิษทางน้ำและตะกอนดินในด้านต่างๆ ซึ่งแสดงวิธีการตรวจวัดอ้างอิงตาม APHA, AWWA and WEF (1998) และมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง สำหรับการวัดความเข้มข้นของไนเตรดและแอมโมเนีย รวมทั้งวิธี Multiple tube fermentation technique แสดงในภาคผนวก ข.

ตาราง 3.2-1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำและตะกอนดิน

พารามิเตอร์	วิธีการตรวจวัด
- พีเอช (pH)**	pH Meter (Multi 340i)
- สภาพนำไฟฟ้า (Conductivity)*	Conductivity Meter (Multi 340i)
- [A] Chemical Oxygen Demand (COD)*	Close Reflux Method
- ไนเตรต (Nitrate)**	Ion Selective Electrode Mettertoledo รุ่น 7 Multi (probe : 261)
- แอมโมเนีย (Ammonia)**	Ion Selective Electrode Mettertoledo รุ่น 7 Multi (Probe : DX 218)
- Coliform bacteria *	Multiple Tube Fermentation Technique
- Fecal Coliform bateria *	Multiple Tube Fermentation Technique
- E. Coli *	Multiple Tube Fermentation Technique
- [A] โลหะ**	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES)
Cadmium (Cd)	
Copper (Cu)	
Iron (Fe)	
Zinc (Zn)	
Mercury (Hg)	
Nickel (Ni)	
Chromium (Cr)	
Arsenic (As)	
Lead (Pb)	
Manganese (Mn)	

หมายเหตุ * ตรวจวัดเฉพาะตัวอย่างน้ำ

** ตรวจทั้งตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน

A = APHA, AWWA and WEF (1998)

3.3 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน

ความเป็นพิษของน้ำและตะกอนดินในระดับพิษเฉียบพลัน โดยใช้เมล็ดข้าวเป็นตัวแทนเมล็ดพืชชนิดอื่นในการทดสอบด้วยวิธี Seed germination/ Root elongation ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่ประยุกต์มาจาก Ecological effect test guideline OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test (EPA. 1996: 1-8) โดยวิธีการดังกล่าวสามารถประยุกต์และสรุปได้ดังนี้

3.3.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในน้ำ

(1) ทำการเจือจางน้ำตัวอย่างทั้ง 10 จุด โดยแบ่งระดับการเจือจางเป็น 0% ,10%, 20%, 40%, 80% และ 100% ตามลำดับ

(2) เตรียมเพาะเมล็ดข้าวจำนวน 20 เมล็ด ใน Plate โดยแบ่งเป็น 10 ชุด ตามจุดเก็บน้ำ แต่ละชุดแยกเป็น 6 ระดับการเจืองจางตามขั้นตอนแรกโดยใช้น้ำประปา (ระดับการเจือจาง 0%) เป็นชุดควบคุม (Control Plate)

(3) ใส่น้ำตัวอย่างของแต่ละแหล่งที่ระดับการเจือจางต่างๆในปริมาณ 10 มิลิลิตร ลงในทุก Plate ทิ้งไว้ในที่มืดภายใต้อุณหภูมิห้อง

(4) สังเกต Control Plate เมื่อมีการงอกของเมล็ดข้าวครบ 100% ของทั้งหมด (คิดเป็น 20 เมล็ด) และมีความยาวรากถึง 20 mm. จึงทำการนับจำนวนเมล็ดข้าวที่งอกและวัดความยาวรากของเมล็ดข้าวในแต่ละ Plate ตัวอย่าง

3.3.2 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในตะกอนดิน

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในตะกอนดินมีวิธีการที่คล้ายคลึงกับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในน้ำ แต่ในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างที่ทดสอบมีความแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากตะกอนดินตัวอย่างอยู่ในสภาวะกึ่งของเหลว จึงมีการผสมน้ำตัวอย่างจากจุดเก็บในบริเวณเดียวกัน เพื่อให้มีความเหมาะสมในการทดสอบกับเมล็ดข้าว จากการทดสอบหาร้อยละของความชื้นในตะกอนตัวอย่างพบว่า มีปริมาณน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 50 ในทุกจุดเก็บตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่างตะกอนดินที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษจึงใช้อัตราส่วนตะกอนดิน : ปริมาตรน้ำตัวอย่างเป็น 1: 2 โดยปริมาตร หลังจากนั้นจึงนำตะกอนตัวอย่างมาทดสอบความเป็นพิษต่อเมล็ดข้าวด้วยวิธีการเดียวกับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในน้ำ

3.3.3 การประเมินระดับความเป็นพิษเฉียบพลัน

1) การประเมินการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวใช้ตัวชี้วัดดังนี้ คือ การงอกของเมล็ดข้าว (Seed germination) และความยาวของราก (Root elongation) โดยทำการเปรียบเทียบกับชุดทดลองของแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง

2) การเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของน้ำ ใช้ Inhibit Concentration at 50 % (IC_{50}) เป็นดัชนีวัดระดับความเป็นพิษซึ่งคำนวณได้จากสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของน้ำและตะกอนตัวอย่างกับ เปอร์เซ็นต์การตาย (หรือการยับยั้งการงอก)งอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก (รายละเอียดแสดงในบทที่ 2 ข้อ 2.8)

3.4 การทดสอบการกลายพันธุ์ ด้วยวิธี Ames test

การทดสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test จะใช้แบคทีเรีย *S. typhimurium* จำนวน 2 สายพันธุ์ (strains) ซึ่งมีวิธีการทดสอบสรุปได้ดังนี้ (Mortelmans and Zeiger. 2000: 29-60)

3.4.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเอมส์

- นำเชื้อ *Salmonella* Typhimurium สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร Oxoid nutrient broth No. 2 ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

- เคลือบผิวหน้าอาหาร minimal glucose agar plate ด้วยแอมพิซิลินเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร และไบโอตินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้แห้ง

- ใช้ loop แตะเชื้อ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง Oxoid nutrient broth No. 2 จากนั้น streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ 1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

- เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ให้ใช้ loop แตะบนโคโลนีที่เด่นชัดที่สุดแล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร Oxoid nutrient broth No. 2 ปริมาณ 12 มิลลิลิตรที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จะได้ fresh overnight culture

- แบ่งเก็บส่วนเล็กๆ (aliquot) ลงในหลอดพลาสติกทนความเย็น โดยเติมกลีเซอรอลปริมาตร 600 ไมโครลิตร และแบคทีเรีย 300 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น stock

3.4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติแบคทีเรีย

(1) ความต้องการกรดอะมิโนฮีสทิดีน (Histidine requirement)

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate
- เคลือบผิวหน้าอาหารด้วยฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์และไบโอติน ดังนี้

จานที่ 1 ไม่ใส่ฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์และไบโอติน

จานที่ 2 ใส่ไบโอตินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร

จานที่ 3 ใส่ฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร

จานที่ 4 ใส่ฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตรและใส่ ไบโอตินเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร

- นำ single colony ที่เลี้ยงไว้ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- แบคทีเรียที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4 เท่านั้น จึงสามารถนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

(2) การตรวจ *rfa* mutation

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate
- ผสมฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร กับเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.3 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม top agar ที่ใส่สารผสมฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์และไบโอตินเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อ top agar ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเทส่วนผสมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate ที่เตรียมไว้
- จุ่มกระดาษกรองที่ตัดที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-9 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงใน 0.1% คริสตอลไวโอเล็ต และค่อยๆวางลงบนจานผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.2 บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ตรวจผลการทดสอบโดยสังเกตบริเวณรอบๆกระดาษกรองที่ชุบ 0.1% คริสตอลไวโอเล็ต ถ้าเชื้อมี *rfa* mutation จะเห็น clear zone คือ ไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ สามารถนำแบคทีเรียนี้มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

(3) การตรวจสอบ R-factor

- เตรียมแอมพิซิลินเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร

- จุ่มกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในสารละลายแอมพิซิลินที่เตรียมไว้

- ค่อยๆวางแผ่นแอมพิซิลินลงผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate ที่เตรียมไว้ดังในข้อ 2.2

- นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบโดยสังเกตการณ์เจริญของแบคทีเรียบริเวณรอบๆแผ่นแอมพิซิลลิน เพราะมี R-factor ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียดื้อต่อยาแอมพิซิลิน สามารถนำแบคทีเรียนี้มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

(4) การตรวจสอบ *uvr B* mutation

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate

- เคลือบผิวหน้าอาหาร minimal glucose agar plate ด้วยฮีสทิดีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และไบโอตินเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร แล้วทิ้งให้แห้ง

- ใช้ loop แตะเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Oxoid nutrient broth No. 2 ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง แล้วขีดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal glucose agar plate ที่เตรียมไว้ดังข้อ 4.2 เป็นเส้นตรง 2 เส้นที่ขนานกัน

- นำจานเพาะเชื้อวางใต้หลอดอัตราไวโอเล็ตโดยวางห่างจากหลอดกำเนิดแสง 30 เซนติเมตร แล้วเปิดฝาจานเพาะเชื้อครึ่งหนึ่งเพื่อทำให้แบคทีเรียถูกแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 8 วินาที

- นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

- แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น *uvr B* mutation จะไม่สามารถเจริญเมื่อถูกแสงอัตราไวโอเล็ตแต่ด้านที่ไม่ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเจริญเป็นโคโลนีให้เห็น สามารถนำแบคทีเรียนี้มาทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ได้

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

(1) ตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน

- เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินตัวอย่างละ 10 จุด

- นำตัวอย่างน้ำ 10 ตัวอย่างๆละ 20 มิลลิลิตร กรองด้วยหัวกรอง whatman 0.45 ไมครอน ใส่ ในหลอดพลาสติกปราศจากเชื้อ

- ชั่งตัวอย่างตะกอนดิน 10 ตัวอย่างๆละ 5 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติก เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm. นาน 10 นาที และกรองส่วนใสด้วยหัวกรอง whatman 0.45 ไมครอน ใส่ในหลอดพลาสติกปราศจากเชื้อ

(2) แบคทีเรียทดสอบ

- เชื้อที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของตัวอย่างน้ำและตะกอนดิน ได้แก่ *S.* Typhimurium สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอตรงส่วนของยีน histidine (*his*) แบบ frameshift mutation และ basepair substitution ตามลำดับ

(3) อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ Oxoid nutrient broth No.2 , minimal glucose agar plate, Vogel Bonner medium E (VB salt) และ Top agar

(4) สารเคมีและสารก่อกลายพันธุ์

- สารเคมีได้แก่ sodium phosphate buffer (pH 7.4) , histidine และ biotin

- สารก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ 1-aminopyrene และ sodium azide

(5) การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างตะกอนดิน

- ใช้วิธี preincubation ของการทดสอบด้วยวิธีเอมส์ชนิดไม่มี metabolic activation ตามวิธีของ Yahagi และคณะ (1975)

- นำเชื้อ *S.* Typhimurium TA98 และ TA100 จาก stock. ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ใส่ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Oxoid nutrient broth No.2 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที นาน 12 ชั่วโมง

- นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^6-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- นำตัวอย่างทั้งหมดใส่ในหลอดแก้วปราศจากเชื้อ ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม sodium phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

- เติมเชื้อที่ใช้ทดสอบ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มใน shaking incubator ที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

- จากนั้นเติม Molten top agar ที่มีส่วนผสมของสารละลาย 0.5 มิลลิโมลาร์ histidine/biotin ในอัตราส่วน histidine/biotin : top agar เท่ากับ 1:10) หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าเบาๆแล้วเทลงบนผิวหน้าอาหาร Minimal glucose agar plate ให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- นับจำนวนโคโลนีที่กลายพันธุ์ (revertant colony)ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี histidine ถ้าจำนวน revertant colony มีมากกว่า 4 เท่าของ spontaneous colonies เทียบกับ negative control แสดงว่าตัวอย่างน้ำและตะกอนดินนั้นน่าจะมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

- สำหรับ positive control จะมีเฉพาะสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานได้แก่ 1-aminopyrene และ sodium azide ชนิดละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม sodium phosphate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเชื้อ 100 ไมโครลิตร

- สำหรับ negative control เตรียมเช่นเดียวกันโดยมีน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร แต่ไม่มีสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานทั้งสองชนิด