

อุปกรณ์และวิธีการ



อุปกรณ์

ก. สารเคมี

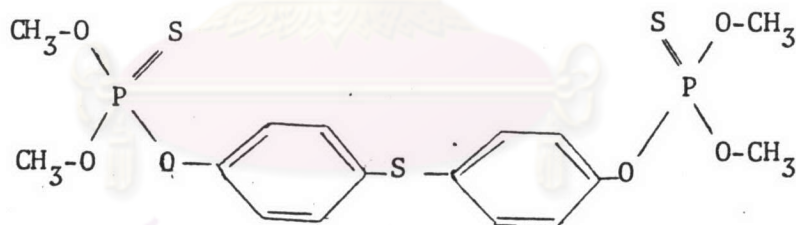
1. เอเบท ได้รับจากบริษัท ที.เจ.ซี.เคมิคอล จำกัด ในรูปของ Technical grade 90 % W/V

ชื่อเคมี 0,0,0,0-tetramethyl 0,0-thiodi-p-phenylene phosphorothioate

ชื่อสามัญ temephos

ชื่ออื่นหรือชื่อทางการค้า Abathion[®], Biothion[®], Difenthos[®], Ecopro[®], Nimitox[®], Abate[®], AC 52160, ENT 27165

สูตรโครงสร้าง



สูตรเอ็มพีเคิล $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$

น้ำหนักโมเลกุล 466.47

สถานะทางฟิสิกส์ เป็นของเหลวเหนียวค่อนข่างหนืด สีน้ำตาล

ดัชนีการหักเหแสง $n_D^{25^\circ\text{C}} - 1.586 - 1.588$

(Reference index)

ความถ่วงจำเพาะ 1.3 ที่ 25°C .

ความหนืด - 5°C . = 3000 CP (centipoises)

25°C . = 300 CP

40°ซ. = 180 CP

80°ซ. = 30 CP

การละลายน้ำ 25 ppb ที่ 25°ซ.

การละลายในตัวทำละลาย ละลายได้ดีใน acetonitrile, carbon tetrachloride, chloroform, ether, ethylene dichloride, ethyl alcohol ละลายได้น้อยใน ketone และ aromatic hydrocarbon ไม่ละลายใน hexane และ methyl cyclohexane

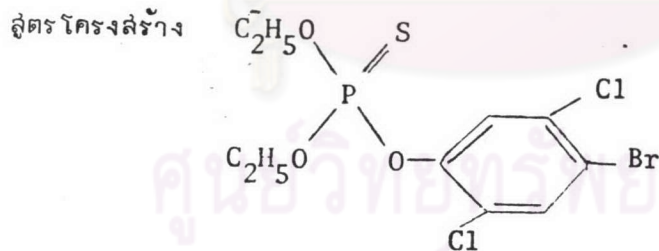
เสถียรภาพ เก็บได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีกำหนดระยะเวลาโดยไม่เปลี่ยนแปลงสภาพ . เกิด hydrolysis เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นด่าง

2. ฟิลาเรียล ได้รับจากบริษัทเวลคัม ประเทศไทย จำกัด ในรูปของ Emulsifiable Concentrate 60 % W/V

ชื่อเคมี 0-(4-Bromo- 2,5-dichlorophenyl) 0,0-diethylphosphorothioate

ชื่อสามัญ bromophos-ethyl

ชื่ออื่นหรือชื่อทางการค้า Cela S-2225, ENT 27258, Nexagan[®], OMS 659, Filariol[®]



สูตรเอ็มพิริเคิล $C_{10}H_{12}O_3Cl_2PSBr$

น้ำหนักโมเลกุล 394.06

สถานะทางฟิสิกซ์ เป็นของเหลว สีดำ

จุดเดือด 122-123°ซ.

การละลายน้ำ ละลายได้ดีมากในน้ำ

การละลายในตัวทำละลาย ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

3. สารเคมีอื่น ๆ

95 % เอทิล แอลกอฮอล์

สารเคมีอื่น ๆ ที่จำเป็นในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (Swingle 1969; APHA 1976)

ข. สัตว์ทดลอง

1. ปลาหางนกยูง Poecilia reticulata Peters ขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 1 ถึง 2 ซม. อายุประมาณ 2 เดือน ซึ่งได้จากการนำพ่อแม่ปลาหางนกยูงมาจากบริเวณน้ำขังใต้ถุนบ้าน วิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี มาเลี้ยงไว้เป็นสัตว์ทดลอง

2. ปลานิล Tilapia nilotica Linn. ขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 2 ถึง 3 ซม. อายุประมาณ $1\frac{1}{2}$ เดือน ได้รับจากฝ่ายวิจัยเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ค. วัสดุและอุปกรณ์

1. บ่อปูนซีเมนต์ขนาด 2.50 x 0.80 x 0.50 ม.
2. ตู้ปลา (aquarium) ขนาด 30 x 18 x 19 นิ้ว
3. โหลแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว สูง 10 นิ้ว
4. เครื่องให้อากาศ (aerator) พร้อมสายพลาสต์ติกและลูกหินอากาศ (air stone)
5. เครื่อง spectrophotometer แบบ spectronic 20
6. เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศ
7. pH meter
8. เครื่องชั่งชนิดละเอียดและชนิดหยาบ
9. ขวด DO
10. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปีกเกอร์, บุเรต, ปีเปต, กระบอกตวง เป็นต้น
11. อาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลอง ได้แก่ ไรน้ำ ลูกน้ำ และอาหารสำเร็จชนิดเม็ดของบริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด

12. ตะแกรงพลาสติก, ฟองน้ำ, ท่อประปา, ท่องอ

วิธีดำเนินการทดลอง

ก. การเลี้ยงปลาทดลองเพื่อให้เคยชินกับสภาพห้องทดลอง (acclimatization)

นำปลาทดลองแต่ละชนิดมาเลี้ยงไว้ในบ่อปูนซีเมนต์แยกตามชนิดของปลา ศักยภาพขนาดที่จะใช้ทำการทดลอง นำมาเลี้ยงไว้ในตู้ปลาเพื่อให้เคยชินกับสภาพห้องทดลอง เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ และงดให้อาหารปลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง

ข. การเตรียมสารละลายสต็อก (stock solution)

การเตรียมสารละลายสต็อก เอเบทไฮ 95 % เอทิล แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย เตรียมสต็อกที่มีความเข้มข้น 100,000 ppm ส่วนฟิลาโรโกลใช้น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้เป็นตัวทำละลาย เตรียมสต็อกที่มีความเข้มข้น 10,000 ppm

ค. การทดสอบหาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity)

เตรียมสารละลายทดลอง (test solution) โดยนำน้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้มาให้อากาศโดยใช้เครื่องให้อากาศเป็นเวลา 4 ถึง 5 ชั่วโมง (Loyacono, 1974) แล้วนำไปใส่ในโหลแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว สูง 10 นิ้ว โหลแก้วละ 2,000 มล. เตรียมสารละลายเอเบทและฟิลาโรโกลจากสารละลายสต็อกให้ได้ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น ไล่ลงในโหลแก้ว การทดลองนี้ทำ 2 ข้ำ และมีกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มควบคุมของเอเบทไฮ 95 % เอทิล แอลกอฮอล์ปริมาตร 16 cc. เท้ากับกลุ่มทดลองด้วย ไข่แห้งแก้วคนสารละลายทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง แล้วใส่ปลาโหลแก้วละ 10 ตัวอย่างสุ่ม (Sprague, 1969) ระหว่างการทดลองไม่มีการให้อากาศ บันทึกจุดหมองห้องและจุดหมองน้ำ บันทึกอัตราการตายของปลาที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลักเกณฑ์การตัดสินว่าปลาตาย ดูจากการเคลื่อนไหวของกระพุ้งแก้ม (operculum) และไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อใช้เข็มเขี่ยลำตัว วิธีการทดลองนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนตามวิธีทดสอบแบบน้ำนิ่ง (static bioassay) (Sprague 1969; Stephan 1975; APHA 1976) ดังนี้

1. การทดสอบเบื้องต้น (range find test หรือ pretest)

การทดสอบเบื้องต้น เป็นการทดสอบเพื่อหาช่วงความเข้มข้นกว้าง ๆ ที่ทำให้ปลาตายระหว่าง 5 % ถึง 95 % ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย

ทดลองแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1.0 และ 0.1 ppm ทำการทดลองกับปลาทั้งสองชนิด นับจำนวนปลาตายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำในช่วงความเข้มข้นที่แคบเข้าเพื่อหาอัตราการตายของปลาตั้งแต่ 5 % ถึง 95 % เมื่อได้ช่วงความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว นำช่วงความเข้มข้นนั้นมาแบ่งย่อยให้ละเอียดยิ่งขึ้น ไม่ต่ำกว่า 5 ระดับความเข้มข้น ทำการทดลองซ้ำอีก

2. การทดสอบสุดท้าย (definitive test)

การทดสอบสุดท้าย เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเป็นพิษต่อปลา เตรียมสารละลายทดลองให้มีความเข้มข้นเท่ากับที่ได้แบ่งย่อยแล้วจากการทดสอบเบื้องต้น ทำการทดลองตามวิธีการเดิมทุกประการ ดูอัตราการตายของปลาที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

ง. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบสุดท้าย นำไปคำนวณหา % อัตราการตายจริง โดยใช้ Abbott's formula (Abbott 1925; WHO/VBC/81.807) เมื่อมีอัตราการตายในกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่าง 5 % ถึง 20 % คือ

$$\% \text{ mortality} = \frac{\% \text{ ตายของกลุ่มทดลอง} - \% \text{ ตายของกลุ่มควบคุม}}{100 - \% \text{ ตายของกลุ่มควบคุม}} \times 100 \%$$

ถ้าอัตราการตายของกลุ่มควบคุมต่ำกว่า 5 % ไม่ต้องใช้สูตรนี้ ใช้เปอร์เซ็นต์ตายจริงได้ แต่ถ้าอัตราการตายของกลุ่มควบคุมสูงกว่า 20 % ต้องทำการทดลองใหม่ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารพิษและ % อัตราการตายจริงใน probit log scale คำนวณหาค่า LC_{50} โดยวิธีของ Finney (1964)

ส่วนการคำนวณระดับเริ่มเป็นพิษ (Threshold of toxicity หรือ incipient LC_{50}) โดยวิธีของปรีชา (2522) โดยใช้ข้อสมมติฐานว่าเส้นโค้งความเป็นพิษ (toxicity curve) มีลักษณะตามสมการ

$$M = a + be^{-KH} \quad \text{-----} \quad (1)$$

ซึ่งอาจเปลี่ยนเป็นสมการเส้นตรง คือ

$$\ln (M-a) = \ln b - KH \quad \text{-----} \quad (2)$$

เมื่อ $M = LC_{50} =$ ระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 % ในเวลา
H ชั่วโมง

H = เวลาที่สัตว์ล้มผลและได้รับสารพิษ

a = มัธยฐานของระดับเริ่มเป็นพิษ

K = อัตราการเพิ่มความเข้มข้น

b = ค่าคงที่

การทำนายระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยของสารพิษ หมายถึงความเข้มข้นสูงสุดของสารพิษที่ยอมรับให้มีอยู่ในแหล่งน้ำ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่กำลังผลิตของสัตว์น้ำ มักใช้ปัจจัยปรับค่า (application factor) คูณกับค่า LC_{50} ที่ประมาณได้ ปัจจัยปรับค่าที่ใช้ถือตาม Laboratory Fish Production Index (LFPI) ซึ่งจะได้ระดับปลอดภัยมีค่าประมาณ 0.05 ของค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ปรีชา, 2522)

จ. การทดสอบหาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง (chronic toxicity)

เตรียมสารละลายเอเบทความเข้มข้น 1 และ 10 ppm และสารละลายฟิลาโรล ความเข้มข้น 1.5 และ 9 ppm ความเข้มข้นละ 3 ข้ว ปริมาตร 5,000 มล. ในโหลแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว สูง 10 นิ้ว ที่มีที่กรองของเสีย (ภาคผนวก รูปที่ 1) และให้อากาศตลอดเวลาที่ทดลอง และมีกลุ่มควบคุม 3 ข้วเช่นกัน เฉพาะกลุ่มควบคุมของเอเบทใส่ 95 % เอทิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับกลุ่มทดลอง ใช้แท่งแก้วคนสารละลายทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ใส่ปลาที่ได้ขังน้ำหนักและวัดขนาดความยาวแล้ว โดยปลาหางนกยูงใส่โหลแก้วละ 20 ตัว อัตราส่วนเพศผู้ : เพศเมีย เท่ากับ 3 : 1 ส่วน ปลาฉลามใส่โหลแก้ว 5 ตัว ให้อาหารทุกวันประมาณ 5 ถึง 10 % ของน้ำหนักปลาในแต่ละโหลแก้ว (Swingle, 1969) วันละ 2 เวลาคือ ตอนเช้าและตอนเย็น เดิมน้ำทุกวัน ให้อยู่ในระดับเมื่อเริ่มต้นทดลอง ทำการเปลี่ยนน้ำทุก 7 วัน โดยดูดออกประมาณ $\frac{1}{3}$ ของทั้งหมด และเติมน้ำที่มีสารละลายความเข้มข้นเท่าเดิมลงไปแทนที่ น้ำส่วนที่ดูดออกไปวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ pH, ปริมาณออกซิเจนละลาย, ความเค็มต่าง, ความกระด้าง และปริมาณแอมโมเนียละลาย บันทึกอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิน้ำ บันทึกจำนวนปลาตาย พร้อมทั้งสังเกตลักษณะพฤติกรรมของปลาที่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุมทุกวัน เป็นเวลา 3 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำปลาที่รอดมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดความยาวเปรียบเทียบกับเมื่อเริ่มทดลอง เพื่อหาอัตราการเติบโตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จ. สถานที่และระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองหาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และความเป็นพิษแบบเรื้อรัง ที่ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่งานวิจัยสารพิษ สถาบันประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ระยะเวลาทดลองระหว่างเดือนเมษายน 2525 ถึงเดือนตุลาคม 2526



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย