

บทที่ 2



อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่และระยะเวลา ทำการทดลองพืชเลี้ยงปล้นของสารน้ำมันปิโตรเลียมคอกุ้ง
แชบวยขาววัยรุ่น (อายุ 45-60 วัน) ที่ห้องทดลอง ของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทาง
ทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่วันที่ 31 สิงหาคม 2521 ถึงวันที่ 14
มกราคม 2522

การทดลองกับกุ้งวัยอ่อน (อายุ 5-7 วัน) ทำที่ ห้องทดลอง ของงาน
ประมงน้ำกรวย สถานีประมงทะเลบ้านเพ กองประมงทะเล ตั้งแต่วันที่ 29
มกราคม 2522 ถึงวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2522

ภาชนะที่ใช้ทดลอง การทดลองกับกุ้งวัยรุ่น ใช้ตู้แก้ว ขนาด 25+25+50 ซม.
ส่วนกุ้งวัยอ่อนใช้ บีกเกอร์ขนาดความจุ 1 ลิตร

การเตรียมน้ำทะเล การทดลองที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ใช้น้ำทะเลที่นำ
มาจากบริเวณชายฝั่ง อำเภอสรีราชา มาเก็บไว้ในบ่อพัก กรองด้วย การผ่านทราย
ละเอียดและผ้ากรองขนาด 100 ไมครอน จากนั้นจะถ่ายลงในถังขนาดความจุ 600
ลิตร ให้ความร้อนถึง 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 นาที ปล่อยให้
ไว้ให้เย็น พร้อมกับให้อากาศโดยใช้เครื่องให้อากาศ เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 7 วัน

การปรับความเค็มของน้ำ ทำโดยการเติมน้ำประปา (ที่เก็บกักไว้ในถัง
พักพร้อมกับให้อากาศ จากการตรวจสอบไม่พบปริมาณคลอรีน) ลงในน้ำทะเล ตรวจ
วัดความเค็มโดยเครื่องวัดความเค็มของน้ำ จนได้ความเค็มที่ต้องการ

การทดลองที่สถานีประมงทะเลบ้านเพ ใช้น้ำทะเลจากบ่อกรองและเก็บ
กักน้ำของสถานี นำมากรองด้วยผ้ากรองขนาด 100 ไมครอน ให้ความร้อนถึง 45
องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 นาที ปล่อยให้ไว้ให้เย็น พร้อมกับให้อากาศ

ผ่านเครื่องให้อากาศ เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 7 วัน

สัตว์ทดลอง กุ้งที่ใช้ในการทดลองทั้งสองขนาด นำมาจากบ่อเพาะพัก ของงาน
ประมงน้ำกรวย สถานีประมงทะเลบ้านเพ

กุ้งวัยรุ่น มีอายุ 45-60 วัน หลังจากเป็น Post larva
ความยาวระหว่าง 3.80 - 5.10 ซม. น้ำหนักไม่เกิน 0.55 กรัม ทำการขนส่ง
จากสถานีประมงมายังห้องทดลองที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ โดย ใส่ถุงพลาสติกขนาด
40x60 ซม. จำนวนประมาณ 100 ตัว ต่อหนึ่งถุง แล้วอัดออกซิเจน นำบรรจุลงในถัง
ทำการลดอุณหภูมิลง 1-3°C โดยการใช้น้ำแข็งทุบผสมขี้เลื่อยใส่ลงระหว่างถุงพลาสติก
กับถังบรรจุ การเดินทางใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

กุ้งวัยอ่อน มีอายุ 5-7 วัน หลังจากเป็น Post larva

การปรับสภาพเข้าสู่สภาวะการทดลอง (Acclimation)

เมื่อถึงห้องทดลอง กุ้งจะถูกถ่ายลงเลี้ยงในถังขนาด 600 ลิตร เพื่อพัก
ให้แข็งแรง 2 วัน แล้วจะทำการเพิ่มหรือลดอุณหภูมิลง 1°C ต่อหนึ่งวัน จนถึงอุณหภูมิ
ตามที่ต้องการ คือ 23°C, 28°C และ 33°C ซึ่งจะเลี้ยงกุ้งอยู่ในอุณหภูมิที่จะใช้
ในการทดลองนี้ เพื่อให้คุ้นกับอุณหภูมิ อย่างน้อย 7 วัน

ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยง จะให้อาหาร วันละ 2 ครั้ง คือ เช้าก่อน 8.00 น.
และเวลาเย็น 15 - 17.00 น. ในถังเลี้ยงมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา น้ำถูกเปลี่ยน
ทุกวัน ๆ ละประมาณ 1/3 ของปริมาณน้ำในถัง เศษอาหารและตะกอนก้นถังถูกดูดออก
โดยใช้ท่อยาง

ก่อนการทดลอง 1 วัน กุ้งจำนวนที่จะใช้ทดลองจะถูกแยกออกจากถังใหญ่
แยกเลี้ยงในตู้ ึ่งให้อาหาร

สารทดลอง

ใช้น้ำมันดิบ (Arabian light crude oil) น้ำมันดีเซล
(Industrial diesel oil) ซึ่งได้มาจาก บริษัท เอสโซ่ ประเทศไทย จำกัด

ซึ่งมีคุณสมบัติ ดังนี้

คุณสมบัติของน้ำมัน	น้ำมันดิบ	น้ำมันดีเซล
API gravity	33.8	33.2
Viscosity	9.5(70°F)	6.3(100°F)
Sulfer content	1.68	1.1
Flash point	Below room temp.	180(PM, °F)
Pour point	-	60(°F)
Cetane index	-	56.5

เบนซีน (Benzene) ใช้ เบนซีน reagent grade (C_6H_6)

การหาความเข้มข้นของสาร เพื่อใช้ในการทดลอง ทำการทดลองย่อยเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมสำหรับการทดลองโดยทำการเลี้ยงกุงในสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลายระดับ แล้วใช้ความเข้มข้นที่มากุ่ใดหมคในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นที่มากุ่ใดไม่เกิน 30 % ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง เป็นความเข้มข้นสูงสุด และต่ำสุด นำค่าความเข้มข้นทั้งสองมาจัดลำดับ ความเข้มข้นสำหรับการทดลองตามลำดับลอกการวิ้มของความเข้มข้น ดังเช่น 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18, 32, 56 หน่วย

วิธีการทดลอง ใส่ น้ำทะเลที่เตรียมไว้ลงในตุ้เลี้ยง จำนวน 20 ลิตร เติมสารน้ำมันชนิดที่ทดลองลงในตุ้เลี้ยงให้ไคความเข้มข้นของสารในน้ำตามจำนวนที่ตองการ กวนน้ำมันด้วยเครื่องกวนอย่างช้า ๆ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วจึงใส่กุงที่เตรียมไว้ลงในตุ้ จำนวน 5 กั้ว ตอหนึ่งกุง นำแผ่นพลาสติกใส กั้นระหว่างกุงแต่ละกั้ว ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

การทดลองกับกุ้งวัยอ่อน แบ่งสำรอน้ำมันที่ผสมเรียบร้อยแล้วลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร ใส่กุ้งจำนวน 5 ตัว เช่นกัน เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สภาวะการทดลอง

1. การทดลองกับน้ำมันชนิดหนึ่ง แบ่งเป็น 4 ชุด
 2. ทำการทดลองที่ 3 อุณหภูมิ คือ $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ สำหรับกุ้งวัยรุ่น ส่วนกุ้งวัยอ่อนทดลองเฉพาะที่อุณหภูมิ $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ทั้งนี้เพื่อใช้ผลเปรียบเทียบกับผลที่มีต่อกุ้งวัยรุ่นที่ระดับอุณหภูมิเดียวกัน การทดลองที่ $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ทำในห้องทดลอง ที่มีเครื่องทำความเย็นและเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ส่วนการทดลองที่ $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ กระทำโดยนำตู้ทดลองทั้ง 3 ชุด ตั้งลงในบ็อกซีเมนต์ ปรับระดับน้ำในบ็อกซีเมนต์ให้เท่ากับระดับน้ำในตู้แก้ว แล้วจึงปรับอุณหภูมิน้ำให้ได้ตามต้องการ โดยใช้เครื่องให้ความร้อนและเครื่องควบคุมอุณหภูมิ
- ส่วนการทดลองกับกุ้งวัยอ่อน นำบีกเกอร์ใส่ลงในตู้แก้ว ขนาด $40 \times 60 \times 30$ ซม. ปรับระดับน้ำให้ได้เท่ากับระดับในบีกเกอร์ แล้วใช้เครื่องให้ความร้อน และเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ให้ได้ตามต้องการ

3. ปริมาณออกซิเจนในน้ำ

ที่อุณหภูมิ	$23 \pm 1^{\circ}\text{C}$	=	6.18 ml/l
ที่อุณหภูมิ	$28 \pm 1^{\circ}\text{C}$	=	5.14 ml/l
ที่อุณหภูมิ	$33 \pm 1^{\circ}\text{C}$	=	4.13 ml/l
4. P_H ของน้ำ อยู่ระหว่าง 6.8 - 8.0

การตรวจผล ทำการตรวจผลการทดลองทั้ง 4 ครั้ง ในรอบ 24 ชั่วโมง เมื่อพบกุ้งตายก็บันทึกจำนวนและนำออกทันที แล้วนับรวมเป็นจำนวนที่ตาย ในระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

การหาค่า LC_{50} ค่า Slope function และค่า 95% Confidence limit (95% C.I.) รวมทั้งการตรวจสอบความเชื่อมั่นในการทดลอง ใช้วิธีการของ Litchfield และ Wilcoxon (1949) ซึ่งมีวิธีการและการทดสอบโดยสังเขปดังต่อไปนี้

1. นำค่าที่ได้จากการทดลองตามระยะเวลาที่กำหนด เช่น 24, 48 และ 96 ชั่วโมง มากำหนดจุดลงในกระดาษกราฟโดยกำหนดจุดค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมบนแกนตั้ง (Y) ซึ่งมีลักษณะเป็น "Probitscale" และกำหนดจุดค่าความเข้มข้นลงบนแกนนอน (X) ซึ่งมีลักษณะเป็น "Logarithmic scale"

2. ลากเส้นตรงผ่านจุดต่าง ๆ ด้วยสายทำให้ใกล้เคียงมากที่สุด โดยเนหาะจุดที่อยู่ระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่ 16 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจุดที่ 0 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ใช้ค่าที่อ่านได้จากเส้นที่ลากผ่านความเข้มข้นนั้นไปกำหนดจุดจากตารางมาตรฐาน

3. ตรวจสอบความเชื่อมั่นของเส้นตรงที่ลากด้วย $(Chi)^2$ ตามสูตร

$$(Chi)^2 = \frac{(\text{Observed} - \text{Expected percent effect})^2}{(\text{Expected effect})(100 - \text{Expected effect})}$$

Observed percents = จุดที่ได้จากการทดลอง

Expected percent = จุดที่กำหนดได้จากเส้นตรงลากผ่าน

4. ค่า LC_{50} อ่านได้จากเส้นตรงที่ลาก

5. ค่า Slope function คำนวณได้จากสูตร

$$\text{Slope function (S)} = \frac{LC_{84}/LC_{50} + LC_{50}/LC_{16}}{2}$$

6. ค่า 95% Confidence limit ของ LC_{50} คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ค่าสูงสุด} = LC_{50} \cdot f LC_{50}$$

$$\text{ค่าต่ำสุด} = LC_{50} / f LC_{50}$$

โดยที่ค่า $f LC_{50}$ (function of LC_{50}) คำนวณได้จาก

$$f LC_{50} = S \exp. 2.77 \sqrt{n}$$

n = จำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมดที่อยู่ในระหว่างค่า

$$LC_{84} \text{ และ } LC_{16}$$

7. ค่า 95% Confidence limit ของ S คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ค่าสูงสุด} = S / fs$$

$$\text{ค่าต่ำสุด} = S / fs$$

$$fs = \text{function of } S$$

$$= A \cdot \exp. 10(K-1)/k \sqrt{n}$$

$$A = \frac{1.1 (\log S)^2}{\log R}$$

$$R = \frac{\text{ความเข้มข้นสูงสุด}}{\text{ความเข้มข้นต่ำสุด}}$$

8. การหาค่าความแตกต่างของการทดลองแต่ละชุด (หรือการทดลองของสารต่างกัน) กระทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า S (Slope function) และเปรียบเทียบค่า LC_{50}

ในลักษณะของการเปรียบเทียบอัตราส่วน (Ratio) และ Function of Ratio เช่น การเปรียบเทียบค่า LC_{50} ของการทดลอง 2 ครั้ง

$$\text{Ratio} = LC_{50(1)} / LC_{50(2)}$$

$$\text{Function of Ratio} = \text{Anti log} \sqrt{(\log f LC_{50(1)})^2 + (\log f LC_{50(2)})^2}$$

ถ้า Function of Ratio มีค่ามากกว่า Ratio แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างเป็นนัยสำคัญทาง สถิติ