บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ชนิดและองค์ประกอบของน้ำมันดิบที่ใช้ในการทดลอง

น้ำมันดิบที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นน้ำมันดิบอะเรเบียนชนิดเบา โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงกลั่นน้ำมันบางจาก มีส่วนผสมของน้ำมันดิบจากประเทศเบอร์มาน 90 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันดิบจากประเทศโอมาน 10 เปอร์เซ็นต์ เหตุที่ใช้น้ำมันดิบชนิดนี้ เนื่องจากเป็นน้ำมันที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีการขนส่งโดยทางเรือ ย่อมมีโอกาสรั่วไหลลงสู่ทะเล โดยเฉพาะเวลาขนถ่ายน้ำมันขึ้นสู่โรงกลั่น นอกจากนี้ยังเป็นน้ำมันดิบชนิดเบา สามารถละลายน้ำได้ดีกว่าน้ำมันดิบชนิดหนัก หรือชนิดกลาง ดังนั้น ความเป็นพิษของน้ำมันดิบในรูปที่ละลายน้ำจึงมีค่าสูงตามไปด้วย ซึ่งคุณสมบัติของน้ำมันดิบนี้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำมันที่ใช้ในการทดลอง (ข้อมูลจากโรงกลั่นน้ำมันบางจาก)

Characteristics	เปอร์เซ็นต์
API gravity 60 ^{o} F	38.78
RVP (Reid vapour pressure) Psi at 100 ^{o} F	4.45
Sulfer content, % wt	0.812
Vis (Viscosity) at 100 ^{o} F	34.7
Salt content as NaCl, Ptb.	1.985
Wax content, % wt	5.9

สัตว์ทดลอง

ปลากะพงขาว (Lates calcarifer) อยู่ในอันดับ Perciformes และในวงศ์ Centropomidae ซึ่งมีสกุลปลาน้ำกร่อยและน้ำจืดอื่น ๆ ที่พบ เช่น ปลาข้าวเม่า Ambassis ปลากะพงแสม Psammoperca และปลากะพงขาว ปลาชนิดนี้มีชื่อสามัญทั่วไปว่า giant seaperch, sea bass, cock-up, baramnudi ฯลฯ ซึ่งเรียกได้แตกต่างกันไปแต่ละท้องถิ่น

ปลากะพงขาว มีลักษณะลำตัวแบนข้าง มีขอบสันหลังโค้งเล็กน้อย มีปากกว้าง ขากรรไกรยาวถึงใต้ระดับลูกตา และมีฟันเขี้ยวขนาดเล็กแบบ villiform บนลำตัวมีเกล็ดแบบ ctenoid คือ ขอบเกล็ดด้านท้ายเป็นซี่หนามเล็ก ๆ มีแถวเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัวจำนวน 55 - 60 แถว ครีบหลังมี 2 ตอน ตอนแรกเป็นก้านครีบแข็ง ตอนหลังเป็นก้านครีบอ่อน ครีบอก ครีบก้น และครีบหางมีปลายมน

สีในปลาขนาดเล็กที่มีความยาวไม่เกิน 10 เซ็นติเมตร มีแถบสีอ่อนพาดตามยาวของด้านบนลำตัว ด้านข้างสีคล้ำ ท้องสีจาง ส่วนปลาขนาดใหญ่กว่านั้น ด้านบนลำตัวมีสีคล้ำอมน้ำเงินหรือเขียวมะกอก ด้านข้างสีเงินวาว ครีบทุกครีบสีคล้ำ พบขนาดทั่วไป 50 - 60 เซ็นติเมตร และพบโตถึง 1 เมตร

ปลาชนิดนี้จะวางไข่ในทะเลที่ห่างจากฝั่งและปากแม่น้ำ ในช่วงน้ำเริ่มขึ้นไข่จะลอยเข้ามาฟักเป็นตัวอ่อนแล้วเลี้ยงตัวในบริเวณปากแม่น้ำ ลำคลอง ที่ติดต่อทะเล และในป่าชายเลน จนถึงในนาข้าวบางแห่ง (ทรงชัย สหวัชรินทร์ และคนอื่น ๆ, 2523) ปลาเด็กวัยจะอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง ป่าชายเลน และในบ่อเลี้ยงกุ้ง ปลาน้ำกร่อยทั่วไป

การกระจายพันธุ์จะพบทั่วไปในเขตอินโด-แปซิฟิค และออสเตรเลียตอนบน ในประเทศไทยพบปลากะพงขาวในทุกบริเวณที่เป็นปากแม่น้ำ ปากทะเลสาบสงขลา ซึ่งเป็นน้ำกร่อย แต่แหล่งที่พบมากคือ ก้นอ่าวไทย ทะเลสาบสงขลาตอนนอก และฝั่งทะเลอันดามัน ซึ่งได้เป็นแหล่งเพาะเลี้ยงที่สำคัญของปลาชนิดนี้ด้วย

ปลากะพงขาวอยู่ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม จึงสามารถทำการเลี้ยงได้ทั้งในบ่อดอกและกระชัง และยังเป็นปลาที่ค่อนข้างอดทน กินอาหารประเภทเนื้อ หรืออาหารผสมได้ จึงเหมาะสมต่อการนำมาเป็นปลาทดลอง ทั้งในเรื่องอาหาร, ความหนาแน่นในที่เลี้ยง, และโรค

(สุจินต์ มณีวงศ์ และนิเวศน์ เรืองพานิช, 2521, สวัสดิ์ วงศ์สมนึก และประชิต พงศ์สุวรรณ, 2515) จนถึงในเรื่องอื่น ๆ ที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อมได้ดี

การเตรียมน้ำสำหรับทดลอง

การเตรียมน้ำทะเลสังเคราะห์ ที่มีความเค็มสำหรับใช้ในการทดลอง เตรียมโดยเติมสารประกอบต่าง ๆ 6 ชนิด คือ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ โปแตสเซียมคลอไรด์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต ลงในน้ำจืดตามวิธีของ Spotte (1979) น้ำทะเลสังเคราะห์ที่เตรียมได้นี้มีความเค็มประมาณ 33 - 34 ส่วนในพันส่วน นำมาเจือจางให้มีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วกรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 70 ไมครอน ก่อนนำมาใช้

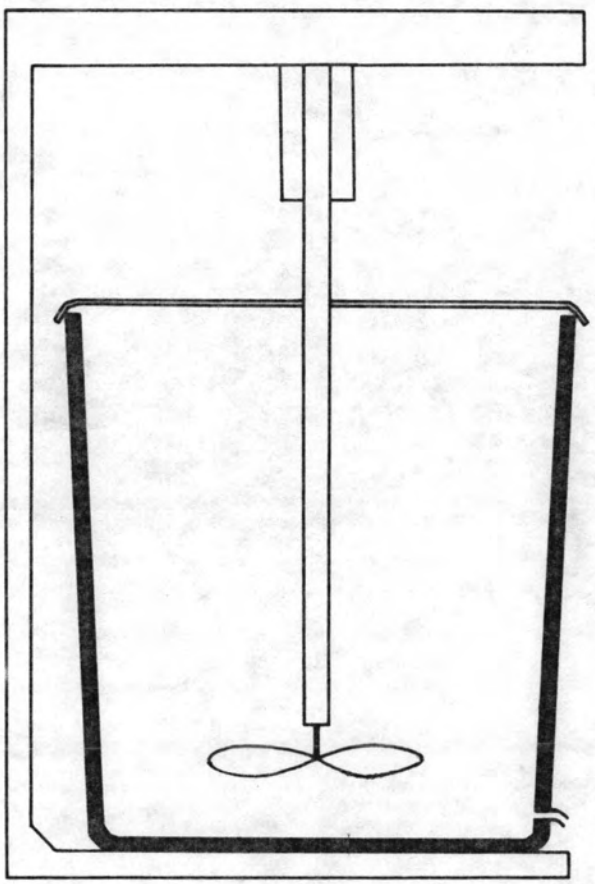
การเตรียมภาชนะที่จะใช้ในการหาปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่ละลายในน้ำ

ทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองด้วยผงซักฟอกและสารละลายกรดโครมิค (Chromic solution) และล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด อบให้แห้ง แล้วชะด้วยนอร์มัลเฮกเซน

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง เป็นน้ำมันดิบในรูปที่ละลายน้ำ (Water suluble fraction WSF.) ตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจากการทดลองของ Anderson (1974) ดังนี้

ใช้น้ำมันดิบ 1 ส่วน ผสมกับน้ำทะเลสังเคราะห์ 9 ส่วน ใส่ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร แล้วกวนอย่างช้า ๆ เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ดังภาพที่ 2 ปิดปากถังเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำมันที่ระเหยง่าย (volatile oil) ความเร็วในการกวนใช้ดูจากการปรับให้วงกรวย (vortex) ของสารละลายลึกไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายทั้งหมด จากนั้นเมื่อครบ 20 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้แยกชั้นประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วจึงดูดส่วนที่ละลายน้ำข้างล่างไปใช้ โดยถือว่าสารละลายที่ได้นี้มีความเข้มข้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของส่วนที่ละลายน้ำ (100 % WSF.) เมื่อต้องการเตรียมสารละลายในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ก็เติมน้ำทะเลสังเคราะห์ลงไปเจือจางตามส่วนสำหรับ 100 % WSF. ของน้ำมันดิบที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด 4.7



ภาพที่ 2 ถังที่ใช้ในการเตรียมน้ำมันดิบในส่วนที่ละลายน้ำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิลลิกรัม/ลิตร (จากการวัดด้วย เทคนิคฟลูออ เรส เซนต์ส เปกโตรโฟโต เมตรี (IOC, 1984)

การ เตรียมสารละลายมาตรฐาน เพื่อใช้ในการวัดปริมาณปิโตร เลียมไฮโดรคาร์บอน (PHC)

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ สารละลายมาตรฐานไครซีน และสารละลายมาตรฐานน้ำมันดิบสำหรับการใช้ไครซีนซึ่ง เป็นสารประกอบอะโรมาติก เป็นสาร ละลายมาตรฐานสำหรับ เปรียบ เทียบหาปริมาณโดยวิ เคราะห์ปริมาณออกมาใน เทอมของสมมูล ไครซีน (Chrysene equivalent) นั้น เนื่องจากน้ำมันดิบมีองค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอน ต่าง ๆ แตกต่างกัน และมีปริมาณไม่คงที่ แต่ไครซีน เป็นตัวแทนของกลุ่มสารประกอบอะโรมาติก ซึ่งถือว่าละลายน้ำได้ดี และ เป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากที่สุด นอกจากนี้ส่วนที่นำมาศึกษาความ เป็นพิษ นั้นไม่ใช่น้ำมัน แต่ เป็นส่วนของน้ำมันที่ละลายน้ำ ดังนั้น จึงมี เพียงพวกสารประกอบอะโรมาติก และไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอนอะตอมต่ำ ๆ ที่สามารถละลายน้ำได้ จึงน่าจะใช้ไครซีน เป็น สารละลายมาตรฐาน เพราะให้รูปแบบของ peak จากการอิมิชชั่น (emission pattern) ที่ เหมือนกับสารตัวอย่าง (IOC, 1982) ส่วนสารละลายมาตรฐานน้ำมันดิบ นั้นใช้ เป็นตัวแทนของไฮโดรคาร์บอนทุกตัวในน้ำมันดิบ ดังนั้น ปริมาณ PHC ที่ใช้สารละลาย มาตรฐานน้ำมันดิบจะมีค่ามากกว่าความ เป็นจริง เนื่องจากสารละลายน้ำมันดิบระ เหยง่ายและมี ค่าไม่คงตัว การทำกราฟ เปรียบ เทียบมาตรฐานในแต่ละครั้งจึงได้ค่าไม่แม่นยำ นอกจากนี้ยัง อาจ เกิด เควนชิ่ง เอฟเฟค (Quenching effect) คือทำให้ความ เข้มฟลูออ เรส เซนต์ (fluorescence intensity) น้อยกว่าที่ เป็นจริง หรือกันไม่ให้ เกิดฟลูออ เรส เซนต์ขึ้นมาอีก ด้วย สำหรับผลที่ได้จากการใช้สารละลายมาตรฐานน้ำมันดิบแสดงในภาคผนวก ก.

การ เตรียมสารตัวอย่าง เพื่อนำไปวิ เคราะห์

เก็บน้ำตัวอย่างที่ต้องการวิ เคราะห์จากตู้ปลาแต่ละตู้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน กรวยแยก เติมสารละลาย เฮก เซน 50 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงประมาณ 5 นาที เพื่อสกัดเอา น้ำมันดิบที่ละลายน้ำออกมาอยู่ใน เฮก เซน เนื่องจาก เฮก เซน เป็นตัวทำละลายสารไฮโดรคาร์บอน ได้ดีและ เหมาะสมกว่าสารละลายอื่น (IOC , 1984) แยกเอาชั้น เฮก เซนใส่ขวดสีชา ขนาด 200 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ทำการสกัดน้ำตัวอย่าง เติมอีก 2 ครั้ง โดย เติม เฮก เซนอีกครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทำการสกัด เหมือนครั้งแรก แล้วแยกชั้น เฮก เซนออกมารวมกับ เฮก เซนที่ทำการสกัดแล้ว ในครั้งที่ 1 ปิดฝาขวดด้วยแผ่นอะลูมินัม และฝาขวดให้แน่น แช่ไว้ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิไว้

ประมาณ 4 องศา เซลเซียส เพื่อป้องกันการระเหย จากนั้นกำจัดน้ำที่ยังหลงเหลืออยู่ในเฮกเซน โดยการผ่านไปยังโซเดียมซัลเฟตแห้ง (anh. Na_2SO_4) แล้วนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องมือระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จนเกือบแห้งละลายส่วนที่เหลืออยู่ด้วยเฮกเซน ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วจุกเกลียว (Vial) ปิดด้วยแผ่นอะลูมินัมและปิดฝาให้แน่น นำไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ PHC ทั้งหมดต่อไป

การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด

ใช้วิธีเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรี (Fluorescence Spectrophotometry) ของ IOC, (1984) และ Gordon et al., (1980) เป็นเทคนิคในการวัดความเข้มฟลูออเรสเซนต์แทนการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง โดยสารประกอบที่มีโครงสร้างแบบอะโรมาติก เมื่อดูดกลืนคลื่นแสงช่วงอัลตราไวโอเลตจะดูดกลืนพลังงานจากแสง พลังงานที่ถูกดูดกลืนจะเป็นพลังงานที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะกับโมเลกุลนั้น ๆ การดูดกลืนดังกล่าวทำให้มีการย้ายอิเลคตรอนจาก ground state ไปยังระดับพลังงานที่สูงกว่า (excited state) เมื่อกลับลงสู่สภาวะเดิมจะมีการคายคลื่นแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความถี่เฉพาะออกมา สารแต่ละชนิดจะมีค่าพลังงานในการกระตุ้นและคลื่นแสงที่คายออกมาเฉพาะแตกต่างกัน เทคนิคนี้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย ๆ ซึ่งวัดได้ถึงหน่วย นาโนกรัม และได้ผลในการวิเคราะห์ดีกว่าเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้จึงใช้เทคนิคในการวัดความเข้มฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากการทดลองครั้งนี้เพียงต้องการหาปริมาณ PHC ทั้งหมดที่ละลายในน้ำเท่านั้น ไม่ได้ต้องการเน้นปริมาณของไฮโดรคาร์บอนเฉพาะตัวซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้และเทคนิคทางด้านเคมีให้ลึกซึ้งกว่านี้ และผลที่ได้ใกล้เคียงกับในธรรมชาติ เนื่องจากน้ำมันดิบเมื่อรั่วไหลลงสู่แม่น้ำ ส่วนที่ละลายน้ำจะประกอบไปด้วยไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด ไม่ได้มีเพียงชนิดเดียว นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสะดวก รวดเร็ว วิธีการไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลที่ถูกต้อง และมีผู้นิยมใช้แพร่หลาย

การเตรียมสารละลายมาตรฐานไครซีน

1. ชั่งไครซีน 1.000 กรัม ละลายด้วยนอร์มัลเฮกเซนในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock standard solution) มีความเข้มข้น 1.000 กรัม/ลิตร (หรือพันส่วนในล้านส่วน หรือ 1000 พีพีเอ็ม)

2. นำสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยกำหนดให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 - 10 พีพีเอ็ม เป็นสารละลายมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

3. ใช้เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ เลือกสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นใด ๆ ก็ได้ไปสแกนหาความยาวคลื่นเอกไซเตชั่น (Excitation Wavelength) และอิมิชชั่น (Emission Wavelength) พร้อมทั้งสารตัวอย่าง

4. กำหนดความยาวคลื่นที่ได้จากข้อ 3 จากนั้นทำการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ (Relative Fluorescence Intensity) ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ นำค่าความเข้มข้นฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์กับค่าความเข้มข้นมาพล็อตเป็นกราฟมาตรฐาน

5. นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ ทำการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ในสภาวะเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ที่วัดได้นำไปคำนวณหาปริมาณ PHC ในตัวอย่างน้ำได้

<u>วิธีการคำนวณหาความเข้มข้น</u>

ตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร นำมาสกัดเอาปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนให้อยู่ในตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร นั่นคือ

สารละลายเฮกเซน 1 มล. มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน x

" 10 " " 10 x

จากตัวอย่างน้ำ 50 มล. มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 10 x

" 1 " " $\frac{10}{50}$ x

x คือความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

<u>เครื่องมือที่ใช้ในการหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน</u>

เครื่องมือที่ใช้คือ Spectrofluorometer : PERKIN ELMER model/3000

Recorder : PERKIN ELMER model/56, Expansion: 1, Range:5,

Scan speed: 60 nm./min., Chart speed : 20 nm./min.

การหาความเป็นพิษเฉียบพลันของน้ำมันดิบอะเรเบียนซนิดเบาในรูปที่ละลายน้ำ ทีมีต่อลูกปลากะพงขาว

การทดลองส่วนใหญ่ดำเนินตามวิธีของ Sprague (1969) และ APHA et al., (1975) เพื่อหาความเป็นพิษเฉียบพลันในรูปมัธยฐานความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (median lethal concentration : LC50) ภายในเวลา 96 ชั่วโมง

สัตว์ทดลอง

ลูกปลากะพงขาวที่นำมาทดลองมีขนาดความยาว 1.5 - 2 เซนติเมตร ได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีประมงน้ำกร่อย จังหวัดระยอง โดยบรรจุใส่ถุงพลาสติกอัดอากาศ ขนย้ายมายังห้องปฏิบัติการสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน นำลูกปลาไปพักไว้ในถังไฟเบอร์กล้าสขนาดความจุ 500 ลิตร เป็นเวลา 1 วัน จึงเริ่มให้อาหารโดยให้อาร์ทีเมีย (Artemia salina) ตัวเต็มวัยวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น พร้อมทั้งดูดตะกอนและถ่ายน้ำทุกวัน น้ำที่ใช้มีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน เลี้ยงลูกปลาเพื่อปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพที่จะทำการทดลองนี้ประมาณ 7 วัน จนกระทั่งก่อนทำการทดลอง 24 ชั่วโมงจึงหยุดให้อาหาร

การทดลองขั้นต้น (Preliminary test)

เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นสูงสุดของ WSF. ของน้ำมันดิบที่ทำให้ปลามีชีวิตอยู่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีการทดลองชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (Static bioassay) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปจัดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองอย่างละเอียด

เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 96 ชั่วโมง โดยแบ่งความเข้มข้นที่หาได้จากการทดลองขั้นต้น ออกเป็น 6 ระดับ โดยใช้สัดส่วนล็อกการิทึมของความเข้มข้น แต่ละระดับใช้ลูกปลาทดลอง 10 ตัว สำหรับความเข้มข้นที่ใช้มีดังนี้ 0.70, 0.79, 0.87, 1.00, 1.09 และ 1.25มิลลิกรัม/ลิตร รวมทั้งจัดให้มีโหลควบคุม (control) เพื่อใช้เปรียบเทียบ

วิธีการทดลอง คือ หลังจากพักลูกปลาไว้อย่างน้อย 7 วันแล้ว นำลูกปลาใส่ไหล

ทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซ็นติเมตร บรรจุน้ำ 10 ลิตร แล้วจึงเติม 100 เปอร์เซ็นต์ของ WSF. ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการพร้อมกับกลุ่มควบคุม ระหว่างการทดลอง ไม่มีการให้อาหารและเครื่องพ่นอากาศ (air pump) มีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ ก่อนการทดลอง 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ คุณภาพน้ำที่ทำการวิเคราะห์ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ วัดโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ปริมาณออกซิเจนละลายโดยวิธีของ Strickland and Parson (1972) วัดความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำโดยใช้พีเอชมิเตอร์ ปริมาณอันไอออนไนซ์แอมโมเนีย ตามวิธีของ Koroleff (1976) และค่า alkalinity ของน้ำตามวิธีของ Strickland and Parson (1972) นอกจากนี้ยังวัดปริมาณไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดในน้ำทั้งก่อนและหลังทดลองด้วย สังเกตอาการของปลาระหว่างการทดลอง และบันทึกจำนวนปลาที่ตายสะสมในเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยปลาที่ตายจะสงบนิ่งอยู่ก้นไหล และแผ่นกระดูกปิดเหงือก (operculum) หยุดการเคลื่อนไหว ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 96 ชั่วโมง และเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษ โดยวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949)

<u>การศึกษาผลของน้ำมันดิบอะเรเบียนชนิดเบาในรูปที่ละลายน้ำในความเข้มข้นต่ำ ๆ ต่อการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาว</u>

นำลูกปลากะพงขาวขนาด 2.0 - 2.2 นิ้ว จากฟาร์มเอกชน จังหวัดฉะเชิงเทรา มาพักและปรับสภาพการเลี้ยง คุณสมบัติของน้ำที่ใช้เช่นเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน แล้วจึงนำมาทดลองเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 45 x 100 x 45 เซ็นติเมตร บรรจุน้ำ 100 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของ WSF. ของน้ำมันดิบเป็น 3 ระดับ คือ 0.11, 0.23 และ 0.46 มิลลิกรัม/ลิตร ระดับละ 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมค่าความเข้มข้นนี้ได้นำข้อมูลจากการทดลองพิษเฉียบพลันมาพิจารณา คือค่าที่ใช้จะต่ำกว่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย ใส่ลูกปลาตู้ละ 25 ตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น โดยใช้อาร์ทีเมียตัวเต็มวัย แช่ในสารละลายด่างทับทิมก่อน 1 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ เปลี่ยนน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำทั้งหมดทุกวันในช่วง 2 วันแรก และเปลี่ยนน้ำ 90 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 พร้อมทั้งเติม WSF. ของน้ำมันดิบลงไปใหม่ ที่จำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำทั้งหมดทุกวันในช่วง 2 วันแรก เนื่องจากธรรมชาติของปลากะพงขาวต้องการน้ำสะอาดในการเลี้ยง จากการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในครั้งแรก ๆ โดยไม่เปลี่ยนน้ำเลยในช่วง 3 วัน พบว่ามีปัญหาเรื่องโรคได้ง่าย

แต่เมื่อมีการเปลี่ยนน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ ทุกวันในความหนาแน่นขนาดนี้ปลากะพงขาว สามารถอยู่ได้ในสภาวะการทดลองดังกล่าวอย่างปลอดภัย มีการให้อากาศตลอดระยะการทดลอง ระหว่างการทดลอง มีการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ เช่น เดียวกับในการศึกษาพิษเฉียบพลัน ในเวลาก่อนการทดลอง 24, 48, และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ทำการชั่งน้ำหนักลูกปลากะพงขาวตามระยะเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาการเจริญเติบโตโดยวิธีทางสถติวิเคราะห์ด้วยโควาเหรียนซ์ (Analysis of covariance) และอัตราการเจริญเติบโต วิเคราะห์ด้วยวาเหรียนซ์ (Analysis of variance)การเปรียบเทียบความแตกต่างการเจริญเติบโต และอัตราการเจริญเติบโตโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

<u>การศึกษาผลของน้ำมันดิบอะเรเบียนชนิดเบาในรูปที่ละลายน้ำในความเข้มข้นต่ำ ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของลูกปลากะพงขาว</u>

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อลูกปลากะพง เนื่องจาก WSF. ของน้ำมันดิบ โดยใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ 3 ระดับ คือ 0.11 , 0.23 และ 0.46 มิลลิกรัม/ลิตร ระดับละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ใส่ลูกปลาตู้ละ 25 ตัว ใช้ลูกปลาขนาด 2.0 - 2.2 นิ้ว น้ำหนัก 4.6 - 4.9 กรัม การใช้ลูกปลาขนาดต่างกับการทดลองพิษเฉียบพลัน เนื่องจาก ลูกปลากะพงขาวมีอวัยวะต่าง ๆ ครบสมบูรณ์ในเวลา 23 วัน (นิตยา วชีรชัยไพศาล, 2527) ถ้าใช้ลูกปลาขนาดเล็กเกินไป คือขนาดเท่ากับที่ทดลองพิษเฉียบพลัน จะทำให้การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่าง ๆ ได้ผิดจากความจริง จากนั้นนำลูกปลาไปทดลองเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 45 x 100 x 45 เซ็นติเมตร บรรจุน้ำ 100 ลิตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น มีการให้อากาศตลอดระยะการทดลอง ทำการเปลี่ยนน้ำ วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ เช่น เดียวกับที่ศึกษาผลของการเจริญเติบโต โดยรายงานผลคุณภาพน้ำเป็นค่าเฉลี่ยจากตัวแทนของทั้ง 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างลูกปลากะพง ครั้งละ 5 ตัว จากตู้ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตามระยะเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ โดยเปิดช่องเหงือกและช่องท้องฟิกซ์ไว้ในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงตัดอวัยวะต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษา คือ เหงือก ออลแฟกคอรีออร์แกน ตา ตับ ไต ม้าม ทางเดินอาหาร และผิวหนัง นำไปผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อ และย้อมสีฮีมาทอกไซลิน และอีโอซิน (H&E) เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวร ตามวิธีของ Humason (1979) ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ฉ เพื่อนำมาศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อไป