บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการอนุบาลสัตว์ทดลอง

   1) ตู้กระจกอะควาเรียมขนาด 200 ลิตร 12 ตู้

   2) สวิงช้อนปลาขนาดต่าง ๆ

   3) ถังน้ำและขันน้ำ

   4) เครื่องสูบน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางท่อ 1 นิ้ว

   5) สายยางขนาดเล็ก สำหรับดูดเศษอาหารและตะกอน

   6) ท่อแก้วขนาดต่าง ๆ เพื่อให้ลูกกุ้งใช้เป็นที่หลบพักไม่ให้กินกันเอง

   7) อาหารสำเร็จรูป

      ก) อาหารเม็ดลอยน้ำเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

      ข) อาหารผงแบบผสมน้ำ สำหรับปลาดุกอุย

      ค) อาหารเม็ดสำหรับปลากินพืช สำหรับปลาตะเพียนขาว

   8) น้ำยาฟอร์มาลิน (formalin)

2. วัสดุอุปกรณ์ในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันของคลอรีนในระบบน้ำไหล

   1) เครื่องเตรียมสารละลาย (propartional dilutor) ดัดแปลงมาจาก Mount and Brungs (1967) ตามแบบของ Harrison *et al.* (1975)

   2) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) พร้อมถังทดลอง

   3) สวิทช์อัตโนมัติควบคุมการทำงานของเครื่องปั๊มสองตัว

   4) เครื่องปั๊มดูดสารละลายอัตโนมัติ (media dispensing pump) แบบ Harvard

   5) เครื่องปั๊มน้ำขนาดเล็ก

   6) ถังไฟเบอร์ ขนาด 1,000 ลิตร

7) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermostat)

8) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

9) สายยางซิลิโคน (silicon rubber tube)

10) ขวดสารละลายเข้มข้น (stock solution)

11) กระติกน้ำแข็งสำหรับแช่ขวดสารละลายเข้มข้น

12) น้ำแข็ง

13) หม้อแปลงไฟฟ้าสำหรับไฟ 110 วัตต์

14) ถุงพลาสติก

15) เครื่องปั๊มอากาศไฟฟ้า พร้อมอุปกรณ์

3. สารเคมีในการเตรียมสารละลายคลอรีนเข้มข้น

1) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) "CODEX" กรดวิเคราะห์มี คลอรีนอิสระ (free chlorine) 8±2% Cl Active

2) โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI)

3) กรดน้ำส้มเข้มข้น (conc. CH_3COOH)

4) โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)

5) น้ำแป้ง (starch)

6) น้ำยาออโธโทลิดีน (O-tulidine dihydrochloride + conc. HCl)

7) โซเดียมอาร์ซีไนต์ ($NaAsO_2$)

8) น้ำกลั่นที่ปราศจากประจุ (deionized distilled water)

4. อุปกรณ์ในการทดลอง

1) เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดตวง (volumetric flask) ขนาดต่าง ๆ ปิเปต กระบอกตวง บีคเกอร์ และอื่น ๆ

2) เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 ของ Bausch & Lomb. พร้อมเซลล์ (cell) แก้วขนาด 1 เซนติเมตร

3) ขวดเก็บน้ำตัวอย่างขนาด 50 มิลลิลิตร

4) กระดาษกราฟ

5. วัสดุอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์น้ำที่ใช้ทดลอง

1) เครื่องวัด pH (pH meter) แบบ Titrigraph Module PHA 943B ของ Hack Simpson Limited

2) เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (oxygen meter แบบ YSI model 57)

3) เครื่องแก้ว (glassware) ต่าง ๆ

4) สารเคมี สารละลายมาตรฐานอินดิเคเตอร์ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตามวิธีของ Swingle (1969) และ APHA (1980)

6. สัตว์ทดลอง

1) ลูกกุ้งก้ามกรามความยาวลำตัว 0.8 - 1.8 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.01 - 0.23 กรัม

2) ลูกปลาตะเพียนขาว 2 - 3.8 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.02 - 0.31 กรัม

3) ลูกปลาดุกอุยขนาดความยาว 2 - 4 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.04 - 0.39 กรัม

7. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการคำนวณค่า LC_{50}

1) ไมโครคอมพิวเตอร์ 8 บิท 48 เคไบท์ 80 คอลัมน์การ์ด

2) ระบบซีพีเอ็ม (CP/M system) ที่มีโปรแกรม MBASIC

3) โปรแกรมวิเคราะห์โปรบิท (probit analysis) ของ Finney (1964) เขียนโดย โชคชัย เหลืองธุวปราณีต

4) เครื่องขับดิสท์ (disk drive)

5) เครื่องพิมพ์ (printer) พร้อมกระดาษ

3.2 <u>ขั้นตอนและวิธีการทดลอง</u>

1. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นทั่วไป และการวางแผนการทดลอง

ทำการศึกษาและตรวจสอบเอกสาร รายงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของคลอรีนต่อสัตว์น้ำ ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) และแบบระยะยาว (long-term toxicity) ตลอดจนผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเป็นพิษของคลอรีนในสัตว์น้ำ ซึ่งจะ

ทำการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับผลของน้ำหล่อเย็น (cooling water) ต่อสภาพแวดล้อมเข้าไปด้วย เพื่อใช้ประเมินผลของค่าความเป็นพิษของคลอรีนต่อสัตว์น้ำ เมื่อได้ข้อมูลพอเพียงที่จะตั้งแนวทางในการวิจัยและตั้งสมมุติฐานแล้ว จึงเลือกวิธีการทดลองที่เหมาะสมที่เห็นว่าจะเกิดประโยชน์มากที่สุด แล้วจึงศึกษาหลักเกณฑ์ต่าง ๆ ในการทดลองทางวาริชพิษวิทยา (aquatic toxicology) เพื่อเลือกสัตว์ทดสอบให้ตรงตามแนวทางในการวิจัย (APHA, 1980; DRAFT, 1980) โดยศึกษาถึงชีววิทยาและชีวประวัติของสัตว์ทดลอง แล้วเลือกสัตว์ทดลองที่เป็นตัวแทนที่ดีที่สุด คือ กุ้งก้ามกราม ปลาดุกอุย และปลาตะเพียนขาว แล้วกำหนดวิธีประเมินผลทางสถิติ เพื่อใช้หาค่า LC_{50} ซึ่งเลือกใช้วิธีของ Finney (1964) ซึ่งเขียนเป็นแผนงานดังภาพที่ 3.1

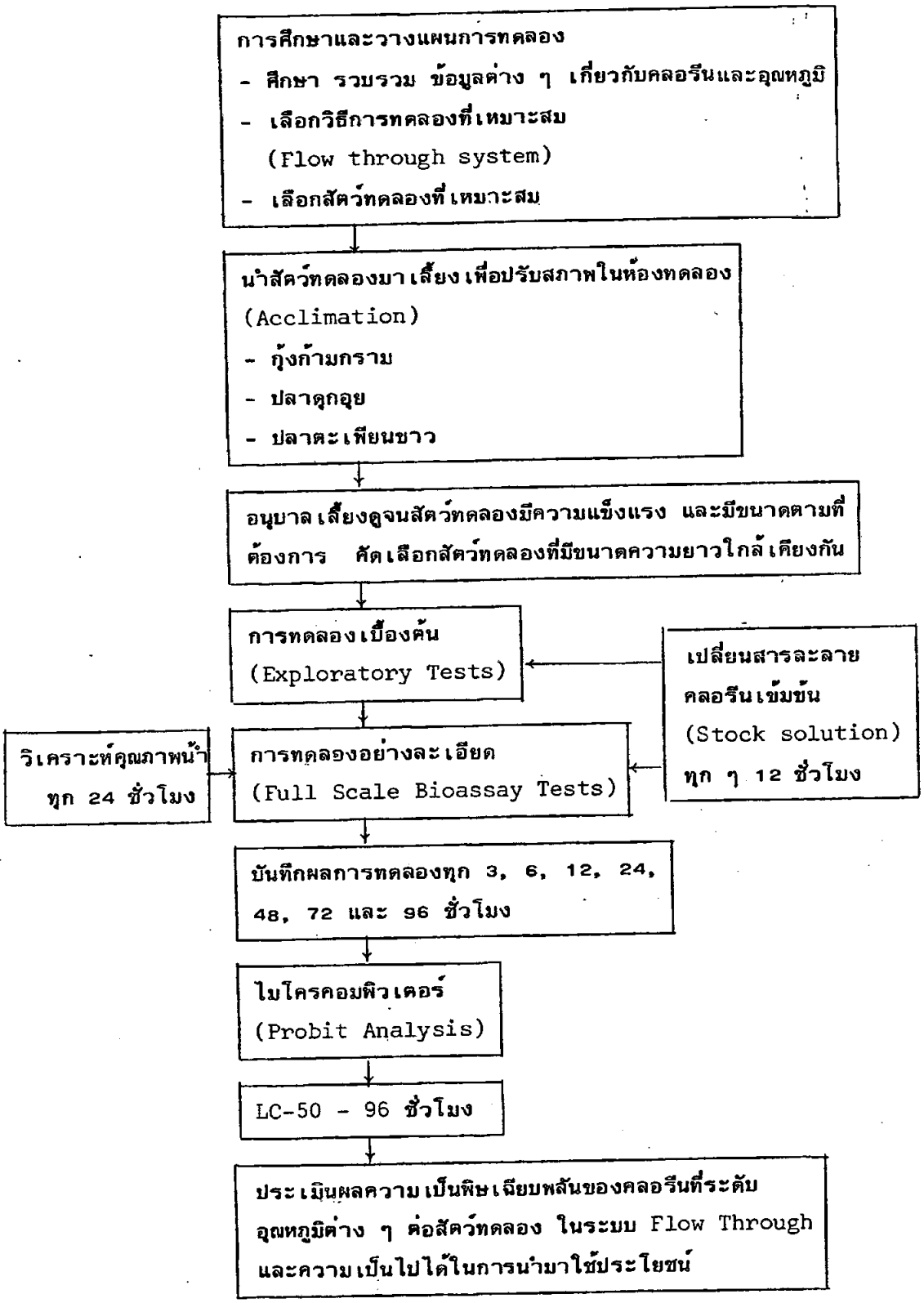
จากผลการศึกษาเอกสารและงานวิจัย ได้ทำการเลือกระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง คือ 27, 32 และ 37°C โดยพิจารณาจากระดับอุณหภูมิเฉลี่ยของแม่น้ำบางปะกง ซึ่งอยู่ระหว่าง 25 - 35°C (สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, 2526) และจากแบบจำลองของแม่น้ำบางปะกงของสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT, 1981) เมื่อโรงไฟฟ้าบางปะกงผลิตกระแสไฟฟ้าแล้ว อุณหภูมิของน้ำที่ทิ้งลงสู่แม่น้ำจะมีอุณหภูมิประมาณ 39.9°C จึงได้กำหนดช่วงอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทดลองและมีระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งจะสามารถเห็นความแตกต่างกันเกี่ยวกับผลกระทบจากระดับอุณหภูมิที่กำหนดไว้ได้ชัดเจน

2. การเลือกวิธีทดลอง

การทดลองต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสมกับสารพิษที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งวิธีการทาง Bioassay แบ่งเป็น 2 ระบบ ตามลักษณะของน้ำที่ใช้ทดลอง (APHA, 1980; DRAFT, 1980)

1) ระบบน้ำนิ่ง (static system) เป็นการทดลองในภาชนะที่บรรจุน้ำทดลองโดยอาจมีการเปลี่ยนน้ำหรือไม่เปลี่ยนน้ำก็ได้ วิธีนี้นิยมใช้ทดลองกับสารที่มีความอยู่ตัวสูง สลายตัวได้ยากในน้ำ คงฤทธิ์เป็นเวลานาน (ไมตรี, 2525) เช่น ยาฆ่าแมลง (DDT) น้ำมัน หรือโลหะหนัก นอกจากนี้ วิธีนี้สามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว เพราะประหยัด

2) ระบบน้ำไหล (flow-through system) เป็นการทดลองในสถานที่ การทดลองจะมีน้ำไหลหมุนเวียนตลอดเวลา ซึ่งใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติของแหล่งน้ำ ที่จะต้องมีการไหลเวียนตลอดเวลา ระบบ flow through นี้ แบ่งเป็น 2 อย่างด้วยกัน คือ



ภาพที่ 3.1 แสดงแผนผังการวางแผนงานวิจัย

i 18143829

- น้ำหมุนเวียนตลอดเวลา (continuous flow through)

- น้ำหมุนเวียนเป็นครั้งคราว (intermittent flow through)

ระบบน้ำหมุนเวียนนี้เหมาะกับสารพิษที่สลายตัวโดยการระเหยได้ง่าย เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นและการทดลองที่ต้องการปริมาณออกซิเจนในน้ำสูง

ในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกเอาระบบน้ำหมุนเวียน เพราะมีความเหมาะสมกว่าระบบน้ำนิ่ง คือ

คลอรีนที่ใช้ในการทดลองเป็นสารที่ระเหยกลายเป็นก๊าซ (Cl_2) ได้ง่าย และคลอรีนยังทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำได้ดี เช่น สารอินทรีย์ (Organic matter), แอมโมเนีย (NH_4) และพวกสารลดออกซิเจนในน้ำ (H_2S, Fe^{+2}, Mn^{+2}, NO_2^-) ซึ่งจะทำให้ความต้องการคลอรีนของน้ำ (Chlorine demand) สูง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของคลอรีนจะเปลี่ยนไปไม่คงที่ ทำให้ควบคุมความเข้มข้นของคลอรีนไม่ได้สม่ำเสมอ แต่ในระบบน้ำหมุนเวียนคลอรีนจะถูกปล่อยออกมาผสมกับน้ำ (Diluant) เป็นระยะตลอดเวลา ทำให้ความเข้มข้นของคลอรีนคงที่ตลอดเวลา

3.3 ระบบน้ำไหล

ระบบน้ำหมุนเวียนที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ คือ ระบบน้ำหมุนเวียนเป็นครั้งคราว (intermittent) เพราะประหยัดปริมาณสารละลายคลอรีนเข้มข้น (Stock solution) และน้ำ (diluent) ที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายลง ระบบน้ำไหลมีส่วนประกอบ 2 ส่วนใหญ่ ดังนี้

1. ระบบการไหลของสารละลาย ใช้เครื่องมือเตรียมสารละลาย (Proportional dilutor) โดยใช้ระบบที่ดัดแปลงมาจาก Mount and Brung (1967) ตามแบบของ Harison *et al.* (1975) (ดังภาพที่ 3.1) คลอรีนในสภาพสารละลายเข้มข้น (Stock solution) จะผสมกับน้ำที่ช่องผสม (Mixing cell) โดยเครื่องฉีดสารละลายอัตโนมัติ (Media dispensing pump) เพื่อให้ได้ปริมาตรและความเข้มข้นระดับที่ต้องการใช้ หลังจากนี้สารละลายจะถูกทำให้เจือจางลงไปตามลำดับ โดยการผสมกับน้ำทดลองตามสัดส่วนที่จัดไว้ เพื่อที่จะได้ให้สารละลายที่เข้มข้นลดหลั่นกันเป็น 5 ระดับ ในการทดลองนี้จัดระยะห่างของความเข้มข้น (dilution factor) ของสารละลายไว้ที่ 25% โดยจะผสม

สารละลายที่มีความเข้มข้นเป็น 75% ของระดับความเข้มข้นที่สูงถัดขึ้นไปตามลำดับ การไหลของสารละลายคลอรีนที่ผสมแล้วลงไปในถังทดลองแต่ละครั้งใช้เวลา 5 นาทีต่อรอบ โดยมีปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งจะถูกแยกไปยังถังทดลองแต่ละระดับความเข้มข้น ซึ่งมีระดับละ 2 ถัง ๆ ละ 200 มิลลิลิตร สารละลายคลอรีนในถังทดลองแต่ละถังจะถูกแทนที่ไปทั้งหมดด้วยสารละลายใหม่ในเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ซึ่ง Sprague (1969) แนะนำว่า 95% ของสารละลายทดลองควรจะถูกแทนที่ด้วยสารละลายที่เตรียมขึ้นใหม่ภายในเวลาไม่เกิน 17 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 3.2)

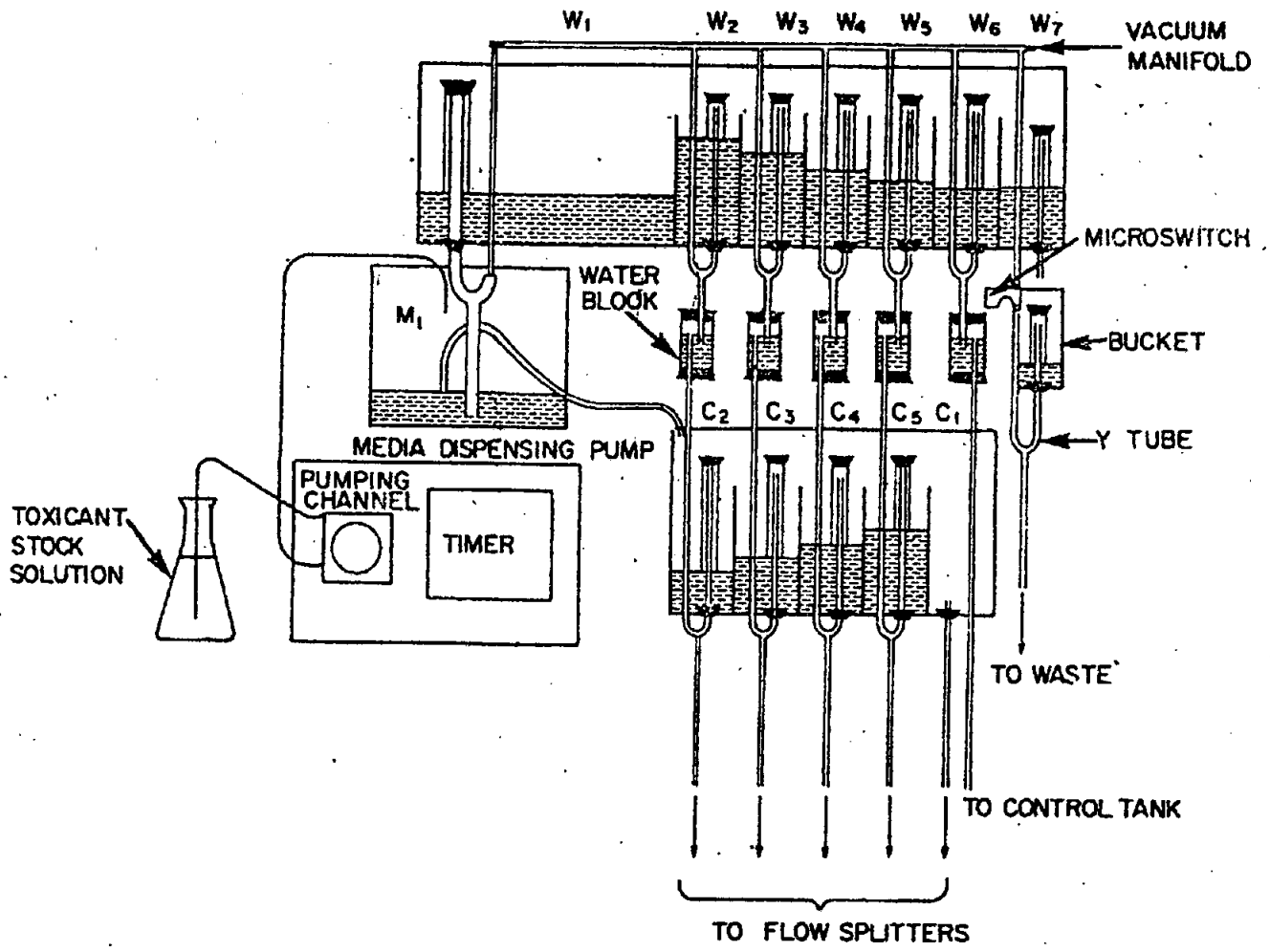
2. ถังทดลอง ใช้ถังไพลีเอทธิลีน (polyethylene) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ความจุ 20 ลิตร จำนวน 12 ถัง โดยแช่อยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ขนาด 1.80 x 0.60 x 0.30 เมตร^3 ที่ถังทดลองแต่ละถังมีช่องทางระบายน้ำโดยใช้หลอดแก้วรูปตัว Y คว่ำ โดยจะระบายน้ำส่วนที่อยู่ก้นถังออก (ดังภาพที่ 3.3) เมื่อมีน้ำใหม่เข้ามาแทนที่ ทำให้ปริมาตรของน้ำในถังทดลองคงที่ตลอดเวลา โดยปรับให้มีปริมาตร 15 ลิตร การเติมน้ำใหม่เข้าแทนที่จะเติมทางส่วนผิวบนเป็นระยะ ๆ ตลอดเวลา ในการทดลองแต่ละครั้งใช้ถุงพลาสติกคลุมปากถังทดลอง เพื่อป้องกันสัตว์ทดลองกระโดดหนี ซึ่งแผนผังการจัดหน่วยทดลองแสดงอยู่ในภาพที่ 3.5

3.4 การเลือกสัตว์ทดลอง

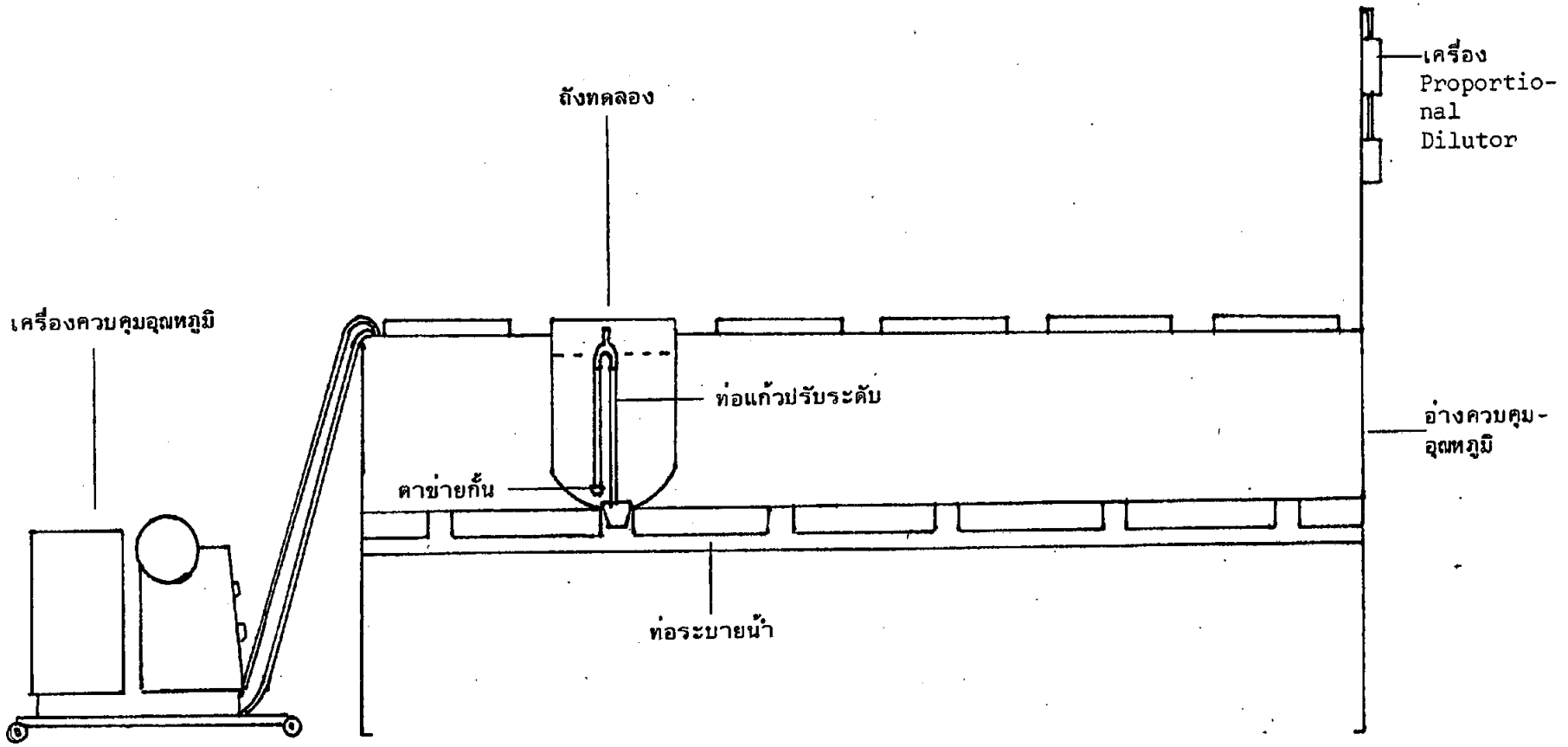
การเลือกสัตว์ทดลองได้ใช้หลักเกณฑ์หลายอย่างประกอบกัน ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ก. คัดเลือกกลุ่มสัตว์ทดลองจากจุดมุ่งหมายในการทดลอง

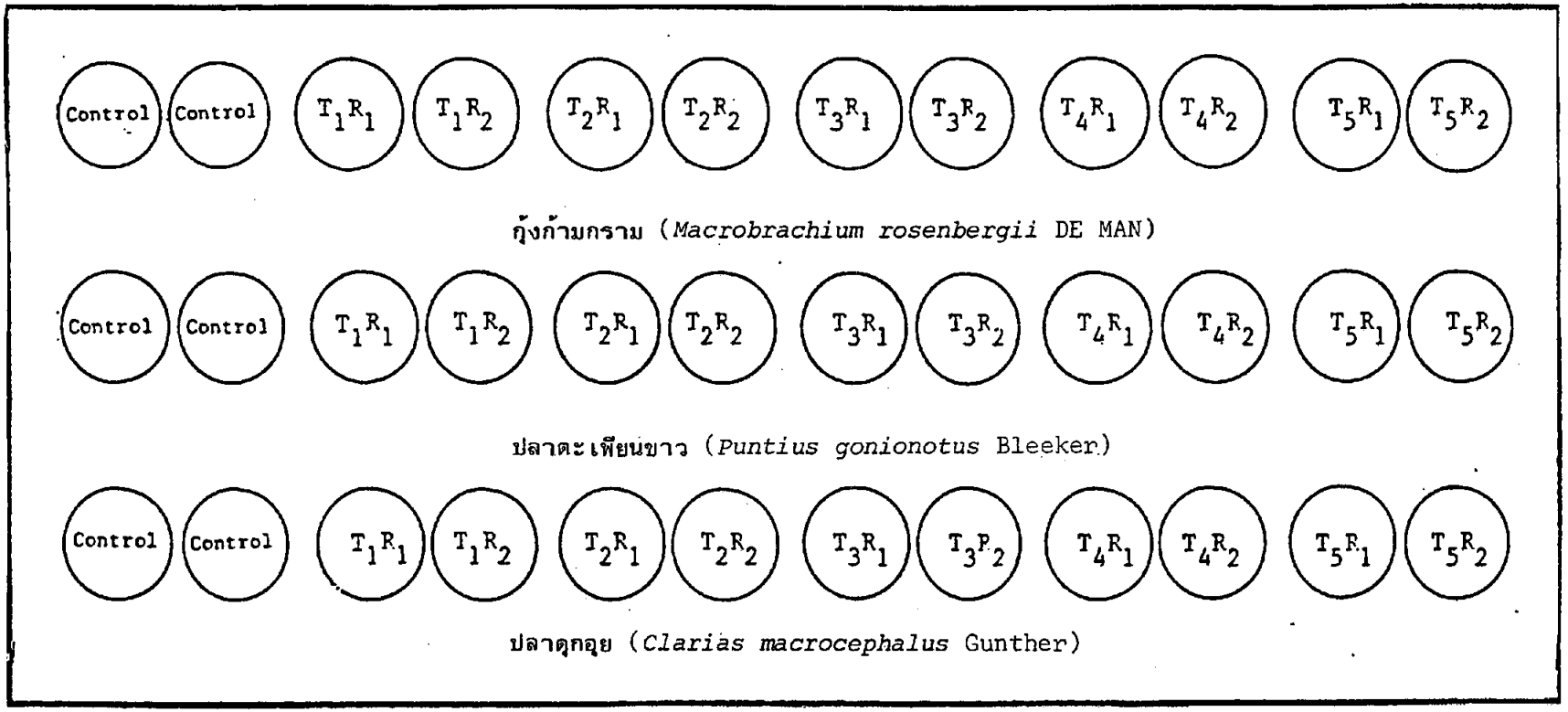
การวิจัยนี้เกิดขึ้นเนื่องจากความสนใจในเรื่องผลของน้ำหล่อเย็นจากโรงไฟฟ้าต่อสภาวะแวดล้อม ซึ่งผลกระทบที่ร้ายแรงที่สุด คือ ผลกระทบที่เกิดจากอุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มขึ้นร่วมกับสารเคมีที่ใช้สกัดสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในท่อของระบบหล่อเย็นที่นิยมใช้กันมาก คือ คลอรีน จึงมุ่งความสนใจไปยังแหล่งน้ำที่คาดว่าจะได้รับผลกระทบจากน้ำหล่อเย็น คือ แม่น้ำบางปะกงบริเวณที่มีโรงไฟฟ้าพลังงานความร้อนร่วมบางปะกงตั้งอยู่ จากผลการสำรวจชนิดและจำนวนของสัตว์น้ำในบริเวณนั้นพบว่า สัตว์น้ำที่พบทั้งหมดมีประมาณ 78 ชนิด (สันทนา และคณะ, 2526) จึงได้ทำการคัดเลือกสัตว์ทดลอง 3 ชนิดซึ่งมีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์และเศรษฐกิจ



ภาพที่ 3.2 ส่วนประกอบของเครื่องผสมสารละลาย (Proportional Dilutor) ตามแบบของ Harison *et al.* (1975)



ภาพที่ 3.3 ถังทดลองและอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)



ภาพที่ 3.4 แผนผังการจัดหน่วยทดลอง 5 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 2 ซ้ำ พร้อมกลุ่มควบคุม

โดยให้ชนิดแรกเป็นตัวแทนของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ชนิดที่สองเป็นตัวแทนของปลาที่มีเกล็ด ชนิดที่สามเป็นตัวแทนของปลาไม่มีเกล็ด แล้วจึงนำสัตว์ทดลองที่เลือกได้มาพิจารณาในขั้นต่อไป

ข. คัดเลือกสัตว์ทดลองที่เหมาะสมตามหลักของวาริชพิษวิทยา

ตามหลักของวาริชพิษวิทยา การเลือกสัตว์ทดลองจะต้องพิจารณาคุณสมบัติด้านชีววิทยาของสัตว์ทดลอง ซึ่งมีการเสนอไว้ดังนี้ (APHA, 1980; FAO, 1975)

1) แหล่งที่พบ ควรเป็นสัตว์ทดลองที่มีการกระจายพันธุ์ในแหล่งน้ำที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษ ถ้าเป็นสัตว์ที่มีแหล่งที่พบกระจายอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ก็จะเป็นประโยชน์มากขึ้น หรือเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและระบบนิเวศน์ท้องถิ่น เพื่อจะได้นำผลการทดลองมาประยุกต์ใช้แก้ปัญหาได้โดยตรง และยังใช้สัตว์ทดลองดังกล่าวในธรรมชาติเป็นเครื่องชี้เตือนถึงอันตรายที่จะมีต่อสัตว์น้ำและสภาวะแวดล้อมได้ตลอดเวลา

2) ขนาด ต้องเป็นสัตว์น้ำที่มีขนาดเหมาะต่อการทดลองตามวัตถุประสงค์ ไม่ควรมีขนาดใหญ่โต เพราะต้องนำมาเลี้ยงในห้องทดลอง ควรมีขนาดพอเหมาะกับภาชนะในห้องทดลอง และไม่มีขนาดเล็กเกินไปซึ่งจะเป็นการลำบากในการตรวจนับหรือตรวจวิเคราะห์หาสารพิษตกค้างในเนื้อเยื่อ โดยทั่วไปนิยมขนาด 2 เซนติเมตร แต่ไม่เกิน 5 - 8 เซนติเมตร

3) วงจรชีวิต (life cycle) ควรเป็นสัตว์ทดลองที่ไม่มีวงชีวิตยาวนานเกินไป ควรเป็นสัตว์ทดลองที่เติบโตเร็ว วงจรชีวิตไม่ควรนานเกิน 1 ปี หากมีวงจรชีวิตสั้นจะทำให้สะดวกในการทดลองระยะยาว (long term) ทำให้สามารถเห็นผลกระทบจากสารเคมีในสัตว์ทดลองหลายรุ่น (generation)

4) สามารถหาได้ง่ายทุกฤดูกาล

สัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย สามารถหาได้ทุกขนาดตลอดปี และปริมาณมาก ทำให้สะดวกในการทดลองและลดปัจจัยเรื่องสภาวะแวดล้อมในแต่ละฤดูกาล

5) ไม่ยุ่งยากในการเลี้ยงในห้องทดลอง

สัตว์ทดลองควรมีคุณลักษณะที่สามารถนำมาเลี้ยงดูในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

ก) มีอุปนิสัยสามารถรวมกลุ่มกันได้ดี ไม่ก้าวร้าว กัดกินกันเอง

ข) สามารถอยู่ได้ในสภาพห้องทดลอง เช่น อาศัยอยู่ในตู้กระจก กินอาหารสำเร็จรูปได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค) มีข้อมูลฐานทางด้านชีววิทยาของสัตว์ทดลองเพียงพอ เช่น ที่อยู่อาศัย การกระจาย และการเจริญเติบโต เป็นต้น

6) มีความไวในการตอบสนองต่อสารเคมีสูง

การที่สัตว์ทดลองมีความไวในการตอบสนองต่อสารเคมีสูง จะทำให้สัตว์น้ำอื่นก็น่าจะได้รับความคุ้มครองต่ออันตรายจากสารเคมีนั้นในระดับที่ปลอดภัยต่อสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ สัตว์ทดลองควรจะมีระดับความผันแปรของการตอบสนองต่อสารเคมีชนิดหนึ่งน้อย เมื่อทดลองโดยวิธีมาตรฐานเดียวกัน

7) สัตว์ทดลองที่เหมาะสม

เมื่อพิจารณาตามขั้นตอนแรกปรากฏว่า สัตว์ทดลองที่เหมาะสม ได้แก่

ก) กุ้งก้ามกราม เป็นสัตว์ทดลองแทนกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ข) ปลาตะเพียนขาว เป็นตัวแทนกลุ่มของปลามีเกล็ด

ค) ปลาดุกอุย เป็นตัวแทนกลุ่มปลาไม่มีเกล็ด

3.5 <u>การทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันของคลอรีนที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ</u>

ทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของคลอรีนที่ระดับอุณหภูมิ 27, 32 และ 37°C ต่อ กุ้งก้ามกราม ปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุย ที่มีขนาดและความยาวเท่า ๆ กัน ใช้วิธีการทดสอบแบบชีววิเคราะห์แบบน้ำหมุนเวียนเป็นครั้งคราว (intermittent flow through bioassay) โดยประเมินค่าความเข้มข้นของคลอรีนที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งหรือ 50 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละระดับอุณหภูมิ (Median lethal concentration: LC_{50}) ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง ตามวิธีของ APHA (1980) โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ในการทดลองดังนี้

ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง ซึ่งได้แก่ กุ้งก้ามกรามซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีประมงบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากงานเพาะเลี้ยง สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ นำสัตว์ทดลองทั้งหมดมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของห้องทดลอง ในตู้กระจกอะควาเรียมขนาด 200 ลิตร โดยปล่อยในปริมาณ กุ้งก้ามกราม 200 ตัว/ตู้ ปลาตะเพียนขาว 400 ตัว/ตู้ ปลาดุกอุย 200 ตัว/ตู้ ใช้เวลา

ปรับสภาพอย่างน้อย 2 สัปดาห์ และระดับอุณหภูมิที่ปรับสภาพสัตว์ทดลองอยู่ระหว่าง 27 - 29 °C ก่อนนำสัตว์ทดลองมาทดลองให้ทำการงดอาหารล่วงหน้าก่อน 48 ชั่วโมง และไม่ให้อาหารตลอดระยะการทดลอง

ข. การเตรียมน้ำทดลอง

ใช้น้ำบาดาลของสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน ซึ่งใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองระหว่างปรับสภาพด้วย โดยนำมาพักในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 1,000 ลิตร และให้อากาศตลอดเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ในระหว่างทดลองก็ปรับอัตราการไหลของน้ำที่ถูกสูบขึ้นไปยังเครื่องเตรียมสารละลาย กับอัตราการไหลเข้าน้ำในถังไฟเบอร์เท่ากัน และให้อากาศตลอดเวลา

ค. การเตรียมสารละลายสำหรับทดลอง

การเจือจาง NaClO (Analytical grade) 10±2% ของคลอรีนอิสระนำมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ให้มีความเข้มข้น 1,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากประจุ โดยสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายเข้มข้น

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเจือจาง

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเจือจางที่ต้องการใช้

เมื่อเตรียมเรียบร้อยแล้ว นำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนอีกครั้ง โดยการ Re-standardization ทุกครั้งก่อนใช้ เนื่องจากคลอรีนสลายตัวได้เร็ว

จากนั้นทำการคำนวณความเข้มข้นที่ต้องการในการทดลอง ปรับเครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติตามปริมาตรที่คำนวณได้ ตรวจความเข้มข้นของสารละลายที่ออกมาจากเครื่องเตรียมสารละลาย (Proportional Dilutor) แล้วปรับเครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติจนความเข้มข้นของสารละลายที่ออกมาจากเครื่องเตรียมสารละลายมีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ขวดสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อลดอัตราการระเหย และเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก ๆ 12 ชั่วโมง

ง. การเตรียมเครื่องมือในการทดลอง

หลังจากเตรียมสัตว์ทดลอง น้ำที่ใช้ในการทดลองและสารละลายคลอรีนเรียบร้อยแล้ว ก็เริ่มเดินเครื่อง Intermittent flow through system ทิ้งไว้ก่อนการทดลอง 24 ชั่วโมง เพื่อให้เครื่องอยู่ตัวและปฏิกริยาของคลอรีนในน้ำสมบูรณ์เต็มที่ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน ก่อนเริ่มการทดลองต้องตรวจดูความเข้มข้นในถังทดลองก่อนอีกครั้ง ถ้าความเข้มข้นไม่อยู่ในความเข้มข้นที่ต้องการ ให้ปรับเครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติอีกครั้งจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

จ. การทดลอง

การทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันของคลอรีนต่อ กุ้งก้ามกราม ปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุย ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ ในระบบน้ำหมุนเวียนเป็นครั้งคราว เพื่อหาค่า LC_{50}-96 h มีการทดลอง 2 ขั้นตอน คือ

1) การทดลองเบื้องต้น (Exploratory tests) เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นช่วงกว้าง ๆ ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายหมด และไม่ตายเลย หรือตาย 100% และ 0% (Range finding tests) เพื่อจะได้นำข้อมูลมากำหนดความเข้มข้นของสารเคมีทดลองที่เหมาะสมในการทดลองจริง โดยกำหนดช่วงความเข้มข้นเป็นระยะกว้างตามการศึกษาจากเอกสารงานวิจัยต่าง ๆ 5 ระดับความเข้มข้น และกลุ่มควบคุม (Control group) ใช้สัตว์ทดลองถังละ 10 ตัว สังเกตผลการทดลองภายใน 96 ชั่วโมง

2) การทดลองอย่างละเอียด

เป็นการทดลองจริง โดยนำข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้นมาใช้พิจารณาระดับความเข้มข้นของคลอรีน เพื่อหาอัตราการตายของปลาทดลองในแต่ละระดับความเข้มข้นโดยใช้สารละลายทดลอง 5 ระดับ ๆ ละ 2 ซ้ำ พร้อมทั้งกลุ่มควบคุม โดยใส่สัตว์ทดลองถังละ 10 ตัว ด้วยการจัดกลุ่มสัตว์ทดลองแบบสุ่ม เพื่อให้แต่ละถังทดลองมีการกระจายของสัตว์ทดลองอย่างสม่ำเสมอ แล้วทำการปรับระดับอุณหภูมิโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิทีละน้อยจนอุณหภูมิสูงถึงระดับที่ต้องการ โดยกะใช้เวลาปรับอุณหภูมิประมาณ 3 - 6 ชั่วโมง แล้วแต่ระดับของอุณหภูมิ บันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย เมื่อเวลาครบ 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เกณฑ์ที่ใช้ตัดสินว่าสัตว์ทดลองตาย คือ การเปิดปิดของกระพุ้งแก้ม (operculum) ตัวแข็งนิ่งเฉย ไม่แสดงอาการตอบสนองต่อวัตถุที่มา

แตะที่ตัว สีของผิวหนังที่เปลี่ยนไป สัตว์ทดลองที่ตายต้องรีบนำออกจากถังทดลองทันทีทุกครั้งที่ตรวจพบ เมื่อครบ 96 ชั่วโมง นำจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายนำไปวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยเครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ต่อไป

ฉ. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ค่า LC_{50} ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ใช้วิธีการวิเคราะห์โปรบิท (Finney, 1964) โดยใช้เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์โปรบิท (Probit analysis) เขียนบนภาษาไมโครซอฟท์เบสิค (Microsoftbasic หรือ MBASIC) ซึ่งเขียนโดย นายโชคชัย เหลืองธุวปราณีต ซึ่งขั้นตอนการทำงานและโปรแกรมดังกล่าวแสดงในภาคผนวก

ช. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ทดลอง ก่อนการทดลอง และทุก 24 ชั่วโมงขณะทดลองและหลังการทดลอง โดยทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำดังต่อไปนี้

1) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของน้ำ

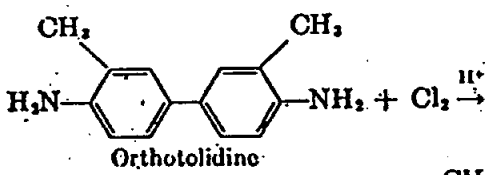
2) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen)

3) ความกระด้างรวมของน้ำ (Total hardness)

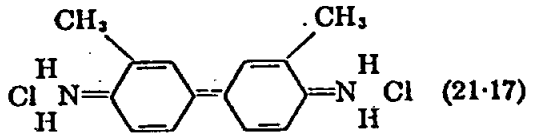
4) ความเป็นด่างรวมของน้ำ (Total alkalinity)

5) ปริมาณแอมโมเนียในน้ำ (Ammonia Nitrogen)

วิธีวิเคราะห์คุณภาพน้ำดังกล่าวนี้ใช้วิธีของ Swingle (1969) และ APHA (1980) ส่วนวิธีวิเคราะห์หาคลอรีนนั้น ใช้วิธีออโธโทลิดีน (Orthotolidine Method) โดยใช้ Orthotolidine ทำปฏิกริยากับคลอรีนในน้ำในสารละลายที่เป็นกรด Orthotolidine จะถูกออกซิไดส์โดยคลอรีน และคลอรามีน (chloramine) ให้สารสีเหลืองในน้ำ ชื่อ Holoquinone



Orthotolidine



(21·17)

A holoquinone (yellow)

วัดความเข้มของสีเหลืองที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 มิลลิไมครอน (mμ) นำค่าที่วัดได้ไปหาค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของคลอรีน

สถานที่และระยะเวลาทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองที่ ห้องปฏิบัติการควบคุมน้ำเสีย ฝ่ายวิจัยสิ่งแวดล้อมสัตว์น้ำ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ เกษตรกลางบางเขน ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2528 - ตุลาคม 2528