บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลองเกี่ยวกับปลาตะเพียนขาว

   1.1 อ่างแก้วกลมขนาด 5 ลิตร

   1.2 ถังน้ำพลาสติกขนาด 60 ลิตรและ ขนาด 20 ลิตร

   1.3 เครื่องให้อากาศ (air pump) พร้อมหินฟองอากาศและสายยาง

   1.4 ช้อนพลาสติกสำหรับตักปลา

   1.5 เข็มเขี่ย

   1.6 อาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงปลา

2. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลองเกี่ยวกับไรน้ำแดง

   2.1 บิกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร

   2.2 หลอดทดลองขนาด 13 X 100 มิลลิเมตรพร้อม rack

   2.3 หลอดหยดสำหรับดูดไรน้ำแดง

   2.4 แท่งแก้วสำหรับคน

   2.5 มูลนกกระทา

   2.6 ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 30 ลิตร

   2.7 ที่ช้อนไรน้ำแดง

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

   3.1 Spectrophotometer

3.2 เครื่องชั่งชนิดละเอียด และเครื่องชั่งชนิดหยาบ

3.3 กล้องส่องตา (Olympus model BH-2) สำหรับถ่ายรูปไรน้ำแดง

3.4 เครื่อง pH meter

3.5 เทอร์โมมิเตอร์

3.6 เครื่อง Gilson respirometer

4. <u>เครื่องแก้วที่จำเป็น</u> เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร ปิเปต บิวเรต กระบอกตวง ขวดบีโอดี ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

<u>สารเคมี</u>

1. <u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับปลาตะเพียนขาว และไรน้ำแดง</u>

1.1 $HgCl_2$ ชนิด AR grade ผลิตโดยบริษัท MERCK

1.2 $Pb(NO_3)_2$ ชนิด AR grade ผลิตโดยบริษัท MERCK

2. <u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ</u>

1.1 Na_2SO_3

1.2 น้ำแป้ง

1.3 $MnSO_4$

1.4 H_2SO_4 (conc)

1.5 HCl (conc)

1.6 EDTA

1.7 NH_4Cl

1.8 Eriochrome black T

1.9 $CaCO_3$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เครื่อง minicomputer ของศูนย์คอมพิวเตอร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้วิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับความแปรปรวน การวิเคราะห์เปรียบเทียบภายหลัง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์โพรบิต

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเตรียมน้ำสำหรับทำการทดลอง

นำน้ำประปามาพักในถังพลาสติกขนาด 23 แกลลอน พร้อมให้อากาศตลอดเวลาอย่างน้อย 7 วัน เพื่อไล่คลอรีนออกไป น้ำที่เตรียมนี้จะใช้ทำการทดลองเกี่ยวกับปลาตะเพียนขาวและไรน้ำแดงทุกขั้นตอนการทดลองตลอดจนใช้เลี้ยงลูกปลาตะเพียนขาวในช่วงปรับตัว (Acclimatisation) ด้วย ก่อนนำน้ำนี้ไปใช้ทดลอง จะวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ คือ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลาย และความกระด้างของน้ำทุกครั้ง โดยวิธีการมาตรฐาน (APHA, 1985) เพื่อ ทดสอบความแปรปรวนของคุณภาพน้ำ และระบุคุณภาพน้ำที่นำมาทดลอง เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวมีผลต่อความเป็นพิษของสารละลายโลหะหนัก และอัตราการตายของสัตว์ทดลอง

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกปลาตะเพียนขาว (Puntius gonionotus, Bleeker) มาจากการเพาะเลี้ยง ขนาดปลาที่นำมาใช้ประมาณ 3.0 ถึง 4.0 เซนติเมตร ซึ่งมีอายุประมาณ 2 เดือนก่อนทำการทดลอง จะเลี้ยงปลาให้เคยชินกับสภาพในห้องปฏิบัติการ อย่างน้อย 14 วัน เพื่อสังเกตอาการของปลาว่ามีโรคติดต่อหรือไม่ หากพบว่าลูกปลาที่เลี้ยงมีอัตราการตายสูงกว่า 10 เปอร์เซนต์ จะไม่นำมาใช้ในการทดลอง (APHA, 1985) ในระหว่างการเลี้ยงจะให้อากาศตลอดเวลาให้อาหารทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้งและถ่ายน้ำทุก ๆ 2 วัน ก่อนนำปลามาทดลองจะงดอาหารก่อน 2 วัน เพื่อมิให้เกิดของเสียขึ้นในขณะทำการทดลอง

ไรน้ำแดง (Moina macrocopa, Straus) เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการวิธีการ

เพาะเลี้ยง แสดงในภาคผนวก ค ในการทดลองจะคัดเลือกไรน้ำแดงตัวแม่ในช่วง log growth phase มาแยกเพาะเดี่ยวในหลอดทดลองขนาด 13 X 100 มิลลิเมตรเมื่อไรน้ำแดงให้ลูกออกมาจะคัดเลือกลูกไรน้ำแดงที่มีอายุใกล้เคียงกันคือ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง นำไปทดลองต่อไป

3. การเตรียมภาชนะสำหรับทำการทดลอง

เครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ทดลองเกี่ยวกับโลหะหนัก โดยเฉพาะอ่างแก้วกลม บิกเกอร์ ขนาด 150 มิลลิลิตร และหลอดทดลอง จะแช่ในสารละลายกรด ไฮโดรคลอริค 10 เปอร์เซนต์ ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างทำความสะอาด ทั้งนี้เพราะโลหะหนักสามารถดูดซับที่ผิวแก้วได้ (กรรณิการ์ สิริสิงห์, 2529)

4. การเตรียมสารละลายโลหะหนัก

สารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์และเลดไนเตรทชนิด AR grade โดยให้มีความเข้มข้นของปรอทและตะกั่วเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นแล้วเก็บสารละลายทั้ง 2 ชนิดในขวด polyethylene เพื่อป้องกันการดูดซับโลหะหนัก ที่ผิวแก้ว เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจางด้วยน้ำประปาที่พักไว้ประมาณ 7 วัน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการต่อไป สารละลายโลหะหนักทั้งสองชนิดนี้ จะเตรียมใหม่ ทุกครั้งที่ทำการทดลอง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน

5. การเตรียมสารละลายสำหรับทำการทดลองที่เกี่ยวข้อง

สำหรับการเตรียมสารละลาย เพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ ต่าง ๆ ของน้ำดังกล่าวแล้ว เตรียมตามวิธีการมาตราฐาน (APHA, 1985) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณปรอทและตะกั่ว จะเตรียมตัวอย่างแล้วส่งไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. ปลาตะเพียนขาว มีวิธีการทดลอง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ การทดสอบพิษ

เฉียบพลัน และการทดสอบพิษรองเฉียบพลัน ดังนี้

1.1 การทดสอบพิษเฉียบพลัน (Acute Toxicity Test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของปรอทและตะกั่วที่ทำให้ปลาตะเพียนขาวตายร้อยละ 50 ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง การทดลองขั้นนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1.1.1 การทดลองขั้นเริ่มต้น (small scale test) เป็นการหาช่วงความเข้มข้นของสารละลายปรอทและตะกั่วที่ทำให้ปลาตะเพียนขาวตาย 0 ถึง 100 เปอร์เซนต์ ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง การทดลองในขั้นนี้จะเตรียมสารละลายเลดไนเตรท และสารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.01 0.1 1.0 10 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการทดลอง 1 ซ้ำ (replicate) ใส่ปลาความเข้มข้นละ 5 ตัว และทำการทดลองประมาณ 3 ถึง 5 ครั้ง โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นที่เตรียมใหม่เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป สังเกตและบันทึก การตายของปลา ในระหว่างทำการทดลอง ในระยะเวลา 6 12 24 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ การตายสังเกตจากการปิดเปิดของกระพุ้งแก้มปลาที่ไม่เคลื่อนไหว และปลาไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะที่ตัวปลา

1.1.2 การทดลองขั้นละเอียด (full scale test) เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซนต์ ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมงโดยนำช่วงความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองขั้นเริ่มต้น มากำหนดให้ละเอียดขึ้น โดยเตรียมสารละลายโลหะหนัก 5 ระดับความเข้มข้นและ 1 ชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ใส่ปลาความเข้มข้นละ 10 ตัวทำการทดลองประมาณ 3 ถึง 5 ซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องยิ่งขึ้น สังเกตและบันทึกการตายสะสมของปลาในระยะเวลา 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

วิธีการทดลองทั้งสองขั้นตอนนี้ ใช้วิธีการทดสอบ แบบชีววิทยาในน้ำนิ่ง (static bioassay test) ในอ่างแก้วกลมขนาด 5 ลิตร บรรจุสารละลายโลหะหนัก 4 ลิตร ปลาที่ใช้ในการทดลองคัดขนาดระหว่าง 3.0 ถึง 4.0 เซนติเมตร ใส่ปลาลงไปในสารละลายโดยวิธีการสุ่ม (random) เพื่อให้ปลาได้รับสารละลายโลหะหนักเฉลี่ยเท่ากัน ในขณะทำการทดลองจะไม่ให้อาหารแก่ปลา เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ สังเกตอาการและบันทึกจำนวนปลาที่ตาย ภายใน 96 ชั่วโมง คือ 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อมีปลาตาย จะตักปลา

ออกทันทีเพื่อป้องกันน้ำเน่าเสีย เกณฑ์ที่ใช้ตัดสินว่าปลาตายคือ การสังเกตด้วยตาเปล่า โดยพิจารณาจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาที่ไม่เคลื่อนไหวเลยโดยเฉพาะกระพุ้งแก้ม (operculum) และปลาไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะที่ตัวปลาปลา การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ก่อนและหลังการทดลองทุกครั้ง ทำการวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลาย และ ความกระด้างรวมในรูปของ แคลเซียมคาร์บอเนต

1.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS-X release 3.0 ในการวิเคราะห์โพรบิต (Probit = probability unit) ซึ่งจะรายงานค่าระดับ LC_{50} ในช่วงเวลาต่างๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (95 % confidence limits) รวมทั้งเส้นกราฟความเป็นพิษ (toxicity curve) ของโลหะหนักทั้งสองชนิดต่อปลาตะเพียนขาว

1.2 การศึกษาพิษรองเฉียบพลัน (sublethal effects)ของปรอทและตะกั่วต่อปลาตะเพียนขาว เป็นการทดสอบความเป็นพิษของปรอท และตะกั่วในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ปลาตาย 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1 ใน 4 ส่วน 1 ใน 6 และ 1 ใน 10 ส่วนของค่าระดับ 96-h LC_{50} (ได้จากการคำนวณโดยโปรแกรม SPSS-X) ของโลหะหนักทั้งสองชนิด โดยทำการทดลองในระยะเวลาเวลา 30 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ในแต่ละภาชนะใส่ปลาขนาดใกล้เคียงกันภาชนะละ 10 ตัว ต่อสารละลายที่เตรียม 5 ลิตร บันทึกน้ำหนักปลาแต่ละตัวไว้เพื่อวัดการเติบโตที่เปลี่ยนแปลงไป ในระหว่าง การทดลองจะให้อาหารเม็ดแก่ปลาวันละ 2 ครั้ง อาหารที่ปลากินไม่หมดจะตักออก หลังจากปลาเริ่มกินอาหารประมาณ 15 นาที เพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหาร นอกจากนี้จะสังเกตอาการตอบสนองของปลา เช่นการว่ายน้ำ สีของลำตัวปลา การรวมกลุ่มของปลาในภาชนะ แล้วเปรียบเทียบกับผลการทดลอง ในกลุ่มควบคุม วิธีการที่ใช้ทดลองคือ วิธีชีววิทยาในน้ำนิ่งโดยมีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายใหม่ (static bioassay with renewal test) ในระหว่างทำการทดลองหากมีปลาตาย จะตักออกจากภาชนะทันที วิธีการทดลองมีรายละเอียดดังนี้คือ

1.2.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้น ของสารละลายปรอทและสารละลายตะกั่ว และปริมาณแอมโมเนีย (NH_3) เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป ความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าวอาจมีการเปลี่ยนแปลง ทำให้ความเข้มข้นไม่คงที่ และจำเป็นต้องเปลี่ยนสารละลายใหม่ จึงศึกษาโดยสุ่มตัวอย่างสารละลายโลหะหนักทั้งสองชนิดในขณะทำการ

ทดลองขั้นละเอียด มา 3 ความเข้มข้น คือความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียม ความเข้มข้นปานกลางและความเข้มข้นต่ำสุด มาวิเคราะห์ ปริมาณโลหะหนัก เมื่อเวลาผ่านไป 3 ถึง 5 วัน โดยการสุ่มตัวอย่างสารละลายที่ทำการทดลองไปวิเคราะห์ทุกวัน ผลการศึกษาที่ได้ จะนำมากำหนดระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายสารละลายโลหะหนัก โดยจะเปลี่ยนสารละลายเมื่อความเข้มข้นที่เตรียมเปลี่ยนแปลงไป 10 เปอร์เซนต์ (APHA, 1985) ส่วนปริมาณแอมโมเนีย ที่ปลาขับถ่ายออกมาจะวิเคราะห์เพื่อศึกษาว่า ระหว่างการทดลองมีปริมาณแอมโมเนียเกินมาตรฐาน ที่ยอมให้ทำการทดลองได้หรือไม่ (0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพราะแอมโมเนียมีพิษต่อปลา ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้

1.2.2 วิธีการทดลอง เตรียมสารละลายโลหะหนัก ที่มีความเข้มข้นของโลหะหนักดังกล่าวในหัวข้อ 1.2 ใส่ปลาความเข้มข้นละ 10 ตัว ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (replicate) สำหรับสารละลายตะกั่วจะเปลี่ยนใหม่ทุก 2 วัน ส่วนสารละลายปรอทจะเปลี่ยนใหม่ทุก ๆ 3 วัน จนครบระยะเวลาทำการทดลอง คือ 30 วัน ในขณะทำการทดลอง จะเลี้ยงปลาด้วยอาหารเม็ด โดยให้เท่า ๆ กันทุกความเข้มข้น วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ปล่อยให้ปลากินจนอิ่ม (ประมาณ 10-15 นาที) แล้วตักอาหารที่เหลือออกเพื่อป้องกันน้ำเน่าเสีย การบันทึกผลการทดลอง จะบันทึกน้ำหนักปลาทุกตัวในสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม ตอนเริ่มต้นทดลองและทุก ๆ 10 วันต่อมาจนครบ 30 วัน แล้วคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยที่เปลี่ยนแปลงไปของลูกปลา การวัดการใช้ออกซิเจน โดยการสุ่มปลาในแต่ละความเข้มข้น มาความเข้มข้นละ 5 ตัว แล้วนำไปวัดการใช้ออกซิเจน 4 ระยะเวลาคือ เมื่อเริ่มต้นทดลอง (ใส่ปลาลงในสารละลายประมาณ 15 ถึง 20 นาที) เมื่อเลี้ยงปลาในสารละลาย 10 วัน 20 วันและ 30 วัน ตามลำดับ ด้วยเครื่อง Gilson respirometer อุณหภูมิขณะทำการวัดเท่ากับ 28.5 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวัดปล่อยให้ปลาเคยชินกับเครื่องมือประมาณ 15 ถึง 20 นาที บันทึกการใช้ออกซิเจนของปลาทุก ๆ 5 นาที จนครบ 40 นาที แล้วชั่งน้ำหนักปลาแต่ละตัวไว้ก่อนปล่อยกลับลงสู่สารละลายเดิม เพื่อนำมาคำนวณ ปริมาณการใช้ออกซิเจนของปลาต่อน้ำหนักตัว ในหน่วย ml-O_2/gm.hr ส่วนการขับถ่ายแอมโมเนีย จะทำการเตรียมสารละลายใหม่ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับที่ใช้เลี้ยงปลาปริมาตร 1 ลิตร สุ่มปลาตะเพียนขาวที่เลี้ยงไว้ในสารละลายโลหะหนัก ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปความเข้มข้นละ 5 ตัว ทิ้งไว้ในบริเวณที่ไม่มีแสงแดด 2 ชั่วโมงเพื่อป้องกันการสังเคราะห์

แสงของสาหร่าย ซึ่งจะเกิดก๊าซออกซิเจนไปออกซิไดซ์ แอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ และไนเตรทได้ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ที่เกิดขึ้นในสารละลายโลหะหนัก ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยตรงด้วยวิธี phenate ดังแสดงในภาคผนวก ง แล้วบันทึกน้ำหนักปลาทั้ง 5 ตัวไว้เพื่อคำนวณปริมาณแอมโมเนียต่อน้ำหนักตัวของปลาที่ทำการทดลอง ในระหว่างการทดลองจะสังเกตพฤติกรรมต่าง ๆ ของปลาเช่นสีของลำตัว การว่ายน้ำ การปิดเปิดของกระพุ้งแก้ม (operculum movement) เมื่อมีปลาตายจะตักออกจากภาชนะทันที

2. ไรน้ำแดง มีวิธีการทดลอง 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

2.1 การทดสอบพิษเฉียบพลัน (acute toxicity test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของปรอทและตะกั่วที่ทำให้ ไรน้ำแดงตาย 50 เปอร์เซนต์ ของประชากรของไรน้ำแดงในภาชนะที่ทำการทดลองในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อย ๆ คือ

2.1.1 การทดลองขั้นเริ่มต้น (small scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารละลายปรอท และตะกั่วที่ทำให้ประชากรของไรน้ำแดงตาย 0 ถึง 100 เปอร์เซนต์ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะเตรียมสารละลายโลหะหนัก 5 ระดับความเข้มข้น และ 1 ชุดควบคุม ระดับความเข้มข้นของสารละลายเมอร์คิวริคคลอไรด์และเลดไนเตรทที่เตรียมคือ 0.001 0.01 0.1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (replicate) ประมาณ 3 ถึง 5 ครั้งหรือมากกว่า โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นใหม่ จนได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 การทดลองขั้นละเอียด (full scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของโลหะหนักที่ทำให้ไรน้ำแดงตาย 50 เปอร์เซนต์ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้น ซึ่งได้จากการทดลองขั้นเริ่มต้น มากำหนดให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยเตรียมสารละลายโลหะหนัก 5 ระดับความเข้มข้นและชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ทำการทดลองประมาณ 5 ซ้ำขึ้นไปเพื่อผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

วิธีการทดลองทั้งสองขั้นตอนนี้ ใช้วิธีการทดสอบแบบ ชีววิทยาในน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำ (static with renewal test) โดยเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง

ทำการทดลองในบิกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายโลหะหนัก 100 มิลลิลิตร ใส่ลูกไรน้ำแดงอายุต่ำกว่า 24 ชั่วโมง (ยังไม่มีไข่ใน brood chamber) บิกเกอร์ละ 10 ตัว บันทึกจำนวนไรน้ำแดงที่ตาย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ในขณะทำการทดลองไม่เติมอาหารให้ไรน้ำแดง สังเกตอาการ และบันทึกจำนวนไรน้ำแดงที่ตายในระยะเวลาดังกล่าว เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินว่าไรน้ำแดงตายคือ ลำตัวมีสีซีดขุ่น นอนอยู่ก้นภาชนะและไม่เคลื่อนไหวเลย และเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะที่ตัวไรน้ำแดง ไรน้ำแดงไม่แสดงอาการตอบสนองใด ๆ

2.2 การทดสอบพิษรองเฉียบพลัน (sublethal effect toxicity test) ของปรอทและตะกั่วต่อไรน้ำแดง เป็นการทดลองเพื่อศึกษาผลของปรอท และตะกั่ว ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ไรน้ำแดงตาย 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1 ใน 4 ส่วน 1 ใน 6 ส่วนและ 1 ใน 10 ส่วน ของค่าระดับ 48-h LC_{50} ของโลหะหนักแต่ละชนิด โดยศึกษาจำนวนครั้งของการเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) จำนวนลูกไรน้ำแดงทั้งหมด และอายุของไรน้ำแดง ตั้งแต่เริ่มต้นทดลองจนกระทั่งตาย เป็นจำนวน 5 รุ่น (generations) ผลการศึกษาที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณค่า 16 % reproductive impairment (MATC) ตามวิธีการของ Biesinger and Christensen (1972) การทดลองนี้จะเลี้ยงไรน้ำแดง ในสารละลายโลหะหนักที่ผสมอาหารไรน้ำแดง (Chlorella sp.) วิธีการเตรียมคือใช้มูลนกกระทา ผสมน้ำในอัตราส่วน 10 กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ให้ได้รับแสงแดด ประมาณ 2 วัน ก็จะเกิดน้ำเขียว (Chlorella sp.) ใช้เป็นอาหารเลี้ยงไรน้ำแดงในขณะที่ทำการทดลองได้ วิธีการดังแสดงในภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงไรน้ำแดงนี้ไม่ทำการวิเคราะห์แต่จะให้ในปริมาณเท่า ๆ กันทุกหน่วยทดลอง วิธีการทดลองดังต่อไปนี้

2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงไรน้ำแดงในการทดลอง นำอาหารเลี้ยงไรน้ำแดงที่เตรียมไว้มาผสมน้ำในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ใช้สำหรับเป็นอาหารของไรน้ำแดงในขณะทำการทดลอง

2.2.2 วิธีการทดลอง ใช้หลอดทดลองขนาด 13 X 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายโลหะหนักความเข้มข้นต่าง ๆ และชุดควบคุม ที่เตรียมไว้ลงไปจนเกือบเต็ม (ต่ำกว่าปากหลอดประมาณ 3 เซนติเมตร) เติมอาหารของไรน้ำแดงลงไปให้เต็มหลอดทดลอง เขย่าหลอดแล้วใช้หลอดหยดดูดไรน้ำแดงอายุประมาณ 24 ชั่วโมงที่เพาะพันธุ์และคัดเลือกไว้แล้วลงไปหลอดละ

1 ตัว ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำเพื่อผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น สารละลายที่เตรียม จะเปลี่ยนใหม่ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไรน้ำแดงตาย เมื่อไรน้ำแดงตัวแม่ (F_1) ให้ลูกมาครั้งแรก ก็จะนำลูกรุ่นนี้ (F_2) ไปทำการทดลองต่อ โดยเลี้ยงต่อไปในสารละลายความเข้มข้นเดิม ส่วนลูกรุ่นต่อมาของ F_1 จะปล่อยไป เมื่อรุ่นแม่ (F_2) ออกลูกมาครั้งแรกจะนำลูกไรน้ำแดงนี้ (F_3) ทดลองต่อไป จนครบ 5 รุ่น ในการทดลองจะบันทึกจำนวนลูกไรน้ำแดงในแต่ละครั้งที่เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) จำนวนครั้งที่เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และอายุของไรน้ำแดงแต่ละตัว ตั้งแต่เกิดจนกระทั่งตายเป็นระยะเวลา 5 รุ่น และบันทึกภาพไรน้ำแดงในรุ่นที่ 5 โดยใช้กล้อง Olympus modle BH-2

3. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS-X ในการวิเคราะห์โพรบิต (Probit) ซึ่งจะรายงานค่า LC_{50} ในช่วงเวลาต่าง ๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ รวมทั้งเส้นกราฟความเป็นพิษของโลหะหนักแต่ละชนิด (แสดงในภาคผนวก ก) ต่อไรน้ำแดง นอกจากนี้ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ผลของโลหะหนักแต่ละชนิดที่มีต่อการสืบพันธุ์ของไรน้ำแดง คำนวณหาค่า MATC หรือระดับความเข้มข้นของโลหะหนักที่ยอมให้มีได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไรน้ำแดงอาศัยอยู่โดยไม่เป็นอันตราย โดยวิธีของ Biesinger and Christensen (1972) นอกจากนี้ ในการศึกษาพิษรองเฉียบพลันจะวิเคราะห์ ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (ANOVA) ของจำนวนครั้งของการเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวนลูกทั้งหมดของไรน้ำแดง และช่วงอายุของไรน้ำแดง ในแต่ละรุ่นเพื่อทดสอบผลของสารละลายโลหะหนักแต่ละชนิด ในระดับความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น และชุดควบคุม ว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละกลุ่ม (treatment) หรือไม่ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ถ้าต่างกันจะทดสอบว่าข้อมูลในกลุ่มใด (ความเข้มข้น 3 ระดับ และชุดควบคุม) ที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธีของ Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS-X ในการวิเคราะห์ (แสดงในภาคผนวก ก)

4. <u>การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ</u>

ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน นำน้ำที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์คุณภาพในช่วงก่อนทำการทดลอง และหลังการทดลองทุกครั้ง ส่วนการทดสอบพิษรองเฉียบพลัน จะ

วิเคราะห์คุณภาพน้ำ ก่อนและระหว่างการทดลองทุกครั้ง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่ใช้ การวิเคราะห์คุณภาพน้ำประกอบด้วย

4.1 การวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธีการมาตรฐาน ของ APHA (1985)

วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ โดยวิธี Azide Modification

วิเคราะห์ความเป็นกรดด่างของน้ำ ใช้ pH meter วัด

วิเคราะห์ความกระด้างของน้ำ โดยวิธี EDTA Titrimetric

วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน โดยวิธี phenate (ภาคนวก ง)

4.2 การวิเคราะห์ทางฟิสิกส์

วัดอุณหภูมิของน้ำ (เทอร์โมมิเตอร์)

<u>สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง</u>

ทำการทดลองบริเวณห้องปฏิบัติการ ชั้น 4 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2533 ถึงเดือน มีนาคม 2534

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย