

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ชั้นเตรียมการทดลอง

3.1.1 การเตรียมน้ำสำหรับการทดลอง

น้ำสำหรับทดลอง ใช้น้ำประปาที่นำมาพักในถังพลาสติกขนาด 150 ลิตร และเติมอากาศตลอดเวลาอย่างน้อย 7 วัน เพื่อไล่คลอรีนให้หมดไป น้ำที่เตรียมนี้จะใช้ในการทดลองเกี่ยวกับไรแดง ทั้งการทดลองพิษเฉียบพลัน และพิษรองเฉียบพลัน โดยก่อนนำน้ำนี้ไปใช้ทดลองจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางพารามิเตอร์ คือ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลาย ความเป็นด่าง และความกระด้าง โดยวิธีมาตรฐานของ APHA (1992) เพื่อทดสอบคุณภาพน้ำที่ทำการทดลอง เนื่องจากพารามิเตอร์ของน้ำทางเคมีและกายภาพดังกล่าว มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษของโลหะหนัก และการตายของสัตว์ทดลอง

3.1.2 การเตรียมไรแดงสำหรับการทดลอง

ไรแดง (*Moina macrocopa* Straus) เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ วิธีการเพาะเลี้ยงดังแสดงในภาคผนวก ข ไรแดงที่ใช้ทดลอง จะคัดเลือกตัวแม่ในช่วง log growth phase มาแยกเลี้ยงเดี่ยวในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร เมื่อแม่ไรแดงให้ลูกออกมา จะคัดเลือกลูกไรแดงที่มีอายุใกล้เคียงกัน โดยอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง (neonate) นำไปทดสอบกับสารพิษต่อไป ในกรณีที่แม่ตัวใดให้ลูกไรแดงน้อยกว่าร้อยละ 10 จะไม่นำลูกชุดนั้นไปทดลอง (APHA, 1992 ; Calow, 1993)

3.1.3 การเตรียมภาชนะสำหรับการทดลอง

เครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ทดลอง โดยเฉพาะบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร และหลอดทดลอง ต้องนำมาแช่ในสารละลายกรดไนตริกร้อยละ 5 ประมาณ 1 ชั่วโมงขึ้นไป แล้วนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า ทั้งนี้เพราะโลหะหนักสามารถดูดซับที่ผิวแก้วได้ (กรรณิการ์ สิริสิงห์, 2529 อ้างถึงใน โชคชัย ยะชูศรี, 2536)

3.1.4 การเตรียมสารละลายโลหะหนัก

- การเตรียมสารละลายเบื้องต้น

เตรียมสารละลายแคดเมียมไนเตรต คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์ซัลเฟต ชนิด AR grade โดยมีความเข้มข้นของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี เท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) ในน้ำกลั่น แล้วเก็บสารละลายทั้ง 3 ชนิด ในขวด polyethylene

- การเตรียมสารละลายคู่ผสมของโลหะหนักทั้งสามชนิด

การเตรียมสารละลายโลหะหนักที่ใช้ทดสอบนั้น เตรียมจากการเจือจางด้วยน้ำที่เตรียมจากข้อ 3.1.1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ตามสมการ (1)

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \dots\dots\dots(1)$$

- เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักเบื้องต้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร
 C_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ต้องการ
 V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายโลหะหนักเบื้องต้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร
 V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายโลหะหนักที่ต้องการ

การเตรียมสารละลายคู่ผสมของโลหะหนักทั้งสามชนิด มีค่าความเข้มข้นในรูปของหน่วยความเป็นพิษ (TU) โดยให้เป็นไปตามสัดส่วนความเป็นพิษ (toxicity ratio) ที่ใช้ทดลองคือ 1:1, 1:2 และ 2:1 เช่น - สัดส่วนความเป็นพิษของแคดเมียมและทองแดง สามารถคำนวณจากสูตรตามรายงานของ Tsai และ Mckee (1980) ดังนี้คือ

$$\text{สัดส่วนความเป็นพิษ} = \frac{Cd_m}{Cd_1} : \frac{Cu_m}{Cu_1}$$

โดยที่ Cd_m และ Cu_m เป็นความเข้มข้นของแคดเมียมและทองแดงในสารละลายผสมตามลำดับ
 Cd_1 และ Cu_1 เป็นค่า 48h-LC₅₀ ของแคดเมียมและทองแดงในสารละลายเดี่ยวตามลำดับ

ค่า 48-h LC₅₀ ของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีในสภาพสารละลายเดี่ยวที่มีต่อไรแดง ได้มีการศึกษาแล้ว พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.14, 0.019 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไซคชัย ยะชูศรี, 2536) ซึ่งนำมาใช้ในการคิดค่าความเข้มข้นในหน่วย Toxic Unit ดังแสดงในหัวข้อ 2.6

การคำนวณหาปริมาณสารแต่ละชนิดในสารผสมที่สัดส่วนต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันของสาร สามารถทำได้จากสูตรตามสมการ (2) (Sprague และ Ramsay, 1965; Tsai และ Mekee, 1982, 1980 อ้างถึงใน ชูชาติ ชัยรัตน์, 2528)

$$X_m = TU_{mix} * X_{prop} * LC_{50(x)} \quad (2)$$

โดยที่ X_m คือ ความเข้มข้นของโลหะแต่ละชนิดในสารผสม
 TU_{mix} คือ ความเข้มข้นของสารผสมในรูปของ "หน่วยความเป็นพิษ" (TU)
 X_{prop} คือ สัดส่วนของโลหะแต่ละชนิดในสารผสม
 $LC_{50(x)}$ คือ ค่า 48h-LC₅₀ ของโลหะแต่ละชนิด

3.1.5 การเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจสอบคุณภาพน้ำ

การเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ของน้ำที่ใช้ทดสอบกับไรแดงนั้น เตรียมตามวิธีการมาตรฐานของ APHA (1992)

3.2 วิธีการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของสารผสม จะแบ่งเป็นการทดสอบพิษเฉียบพลัน และการทดสอบพิษเรื้อรัง ซึ่งมียาละเอียดในการทดสอบ ดังนี้คือ

(1) การทดสอบพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในสภาพสารละลายคู่ผสมที่ทำให้ไรแดงตายร้อยละ 50 ของประชากรที่ทดลอง ใช้วิธีการทดสอบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (Static bioassay) และบันทึกจำนวนไรแดงที่ตายที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 3 , 6 , 12 , 24 และ 48 ชั่วโมง การทดสอบพิษเฉียบพลันแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

- การทดลองขั้นเริ่มต้น (Small scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารละลายกลุ่มผสมของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีในแต่ละสัดส่วนความเป็นพิษ ที่ทำให้ประชากรไรแดงตายร้อยละ 0 ถึง 100 ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะเตรียมสารละลายกลุ่มผสมของโลหะที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ 5 ระดับ และ 1 ชุดควบคุม ทำการทดลองโดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นใหม่ จนกว่าจะได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นละเอียด

- การทดลองขั้นละเอียด (Full scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารละลายกลุ่มผสมของโลหะหนักทั้งสามชนิดในแต่ละสัดส่วนความเป็นพิษ ที่ทำให้ไรแดงตายร้อยละ 50 ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้นซึ่งได้จากการทดลองขั้นเริ่มต้น มากำหนดให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยเตรียมสารละลายกลุ่มผสมของโลหะหนักในแต่ละสัดส่วนความเป็นพิษ เป็น 5 ระดับความเข้มข้น ให้อยู่ในรูปของ TU และ 1 ชุดควบคุม ที่ระดับความเข้มข้นหนึ่ง ๆ จะทดลอง 5 ซ้ำ

การทดลองทั้ง 2 ขั้นตอนนี้ ได้ทำการทดลองในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร โดยปริมาตรของสารละลายที่ทดสอบ 100 มิลลิลิตรต่อบีกเกอร์ ใส่ลูกไรแดงที่คัดเลือกมาที่มีอายุต่ำกว่า 24 ชั่วโมง บีกเกอร์ละ 10 ตัว สังเกตและบันทึกจำนวนไรแดงที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังกล่าว สภาวะที่ไรแดงตายคือ ไรแดงหยุดเคลื่อนไหว นอนอยู่บนบีกเกอร์ ลำตัวมีสีขาวขุ่น

(2) การทดสอบพิษรองเฉียบพลัน (Sublethal toxicity test) เป็นการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของโลหะหนักกลุ่มผสมของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ในระดับที่ไม่ทำให้ไรแดงตาย 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1 ใน 10 ส่วน 1 ใน 6 ส่วน และ 1 ใน 4 ส่วนของค่า 48 h-LC_{50} ของโลหะหนักกลุ่มผสมแต่ละคู่ที่สัดส่วนความเป็นพิษที่มีความเป็นพิษรุนแรงที่สุด โดยศึกษาผลต่อการสืบพันธุ์ โดยดูจากจำนวนครั้งของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและจำนวนลูกไรแดงทั้งหมด ผลต่อการเติบโตโดยศึกษาจากขนาดความยาวของไรแดง และอายุของไรแดง ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งตายเป็นระยะเวลา 5 รุ่น ผลการศึกษาที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณหาค่า 16% reproductive impairment ตามวิธีของ Biesinger และ Christenson (1972) เพื่อนำมาหาระดับความเข้มข้นของสารละลายกลุ่มผสมของโลหะแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ที่ยอมให้มีได้ในแหล่งน้ำ (MATC) ดังแสดงวิธีคิดในภาคผนวก ข ซึ่งการทดลองแบ่งเป็นขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้คือ

- การเตรียมสารละลายโลหะหนักผสมกับอาหารไรแดง ซึ่งอาหารไรแดงคือ *Chlorella* sp. และจุลินทรีย์ต่าง ๆ (วิธีการเพาะสาหร่ายที่เป็นอาหาร และการเตรียมสารอาหารสาหร่าย แสดงไว้ในภาคผนวก ค) การเตรียมน้ำสำหรับเจือจางนั้น มีส่วนผสมอาหารในอัตราส่วนของสาหร่ายตั้งต้นต่อน้ำ เท่ากับ

50 ต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์สาหร่าย 2.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาเตรียมสารละลายกลุ่มผสมของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด

- วิธีทดลอง การทดสอบพิษของเฉียบพลันโดยเลี้ยงไรแดงในหลอดทดลองที่มีขนาดเท่ากับ 13×100 มิลลิเมตร โดยเติมสารละลายกลุ่มผสมของโลหะหนักที่ความเข้มข้นต่างๆ และชุดควบคุมที่ได้ผสมอาหารแล้ว ใช้ปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วใช้หลอดหยดสารดูไรแดงที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง ที่คัดเลือกไว้ลงไปหลอดละ 1 ตัว โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารหนึ่ง ๆ จะทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ สารละลายที่ใช้เลี้ยงไรแดงจะเปลี่ยนใหม่ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไรแดงตาย เมื่อไรแดงตัวแม่ (F1) ให้ลูกครั้งแรก ก็จะนำลูกรุ่นที่ (F2) ไปทำการทดลองต่อที่ระดับสารละลายที่ความเข้มข้นเดิม ส่วนลูกรุ่นต่อมาของ F1 จะปล่อยให้ตาย เมื่อแม่ในรุ่น F2 ออกลูกมาครั้งแรกจะนำลูกไรแดง (F3) นี้ทดลองต่อไป ทำเช่นนี้ไปจนครบ 5 รุ่น ข้อมูลที่บันทึกที่ระหว่างทดลองคือ จำนวนลูกไรแดงทั้งหมดที่เกิดจากแม่รุ่นนั้น ๆ จำนวนครั้งที่เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ขนาดความยาวของร่างกาย และอายุของไรแดงแต่ละตัวตั้งแต่เกิดจนกระทั่งตายเป็นระยะเวลา 5 รุ่น และบันทึกภาพไรแดงในรุ่นที่ 5 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Olympus model BH-2 สำหรับการวัดขนาดความยาวของไรแดง (L) โดยใช้กล้องรุ่นดังกล่าว ซึ่งวัดได้ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงตำแหน่งที่ใช้วัดความยาวของไรแดง (Lawrence, 1987 อ้างถึงใน โชคชัย ยะชูศรี, 2536)

3.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การทดสอบพิษเฉียบพลัน ต้องทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในช่วงก่อนทำการทดลอง และหลังการทดลอง สำหรับการทดลองพิษของเฉียบพลันจะวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ในช่วงก่อนการทดลองและระหว่างการทดลองทุกครั้ง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งพารามิเตอร์ที่วิเคราะห์ได้แก่

- (1) คุณภาพน้ำทางเคมี วิเคราะห์โดยวิธีตามมาตรฐานของ APHA (1992) ดังนี้คือ
- ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ วิเคราะห์โดยใช้วิธี Azide Modification
 - ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ วิเคราะห์โดยใช้ pH meter วัด
 - ความเป็นด่างของน้ำ วิเคราะห์โดยใช้ Tritation method
 - ความกระด้างของน้ำ วิเคราะห์โดยวิธี EDTA Titrimetric

(2) คุณภาพน้ำทางกายภาพ

- วัดอุณหภูมิของน้ำ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

การหาค่า 48-h LC₅₀ จากการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารละลายคู่ผสมของโลหะหนัก ทั้งสามชนิด ใช้วิธีวิเคราะห์โพรบิต ที่มีโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for MS WINDOWS release 6.1 ซึ่งรายงานค่า LC₅₀ ในช่วงเวลาต่าง ๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งแสดงกราฟความเป็นพิษของโลหะหนักแต่ละคู่ผสมที่สัดส่วนความเป็นพิษต่าง ๆ กัน (แสดงในภาคผนวก ง) ที่มีต่อไร่น้ำแดง สำหรับผลการทดสอบพิษรองเฉียบพลัน ด้านการสืบพันธุ์ของไรแดงจะนำมาหาระดับความเข้มข้นของสารละลายคู่ผสมของโลหะหนักทั้งสามชนิดที่ยอมให้มีได้ (MATC) โดยที่ไรแดงสามารถอยู่ได้โดยไม่เป็นอันตราย

นอกจากนี้แล้วข้อมูลจากการศึกษาพิษรองเฉียบพลัน ซึ่งได้แก่ จำนวนลูกทั้งหมดของไรแดง จำนวนครั้งของการเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ขนาดความยาวลำตัว และอายุของไรแดงในแต่ละรุ่น นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (Analysis of Variance : ANOVA) และทดสอบผลของสารละลายโลหะหนักคู่ผสมแต่ละคู่ว่า ในระดับความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น และชุดควบคุม ว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในระหว่างกลุ่ม (treatment) หรือไม่ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ถ้าต่างกันจะทดสอบว่าข้อมูลในกลุ่มใดที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธีของ Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS for MS WINDOWS release 6.1 ในการวิเคราะห์ (ดังแสดงในภาคผนวก จ)