

วิธีการศึกษาวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลองเกี่ยวกับโรนินาแดง

- 1.1 บีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร และขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 1.2 หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร พร้อม rack
- 1.3 หลอดหยดสาร สำหรับชุดโรนินาแดง
- 1.4 แท่งแก้วสำหรับคน
- 1.5 มุลนกระดาษ
- 1.6 ถังพลาสติกขนาด 20 ลิตร และ 150 ลิตร
- 1.7 อ่างคินเฝ้าเคลื่อนขนาด 50 ลิตร
- 1.8 เครื่องให้อากาศ (air pump) พร้อมหินฟองอากาศและสายยาง
- 1.9 กระชอนตาถี่ สำหรับชั้นโรนินาแดง

2. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการทดลอง

- 2.1 Spectrophotometer
- 2.2 Smith-Hieftje 4000 Atomic Absorption Spectrophotometer
- 2.3 กล้องส่องตา (Olympus model BH2) พร้อมอุปกรณ์ควบคุมการถ่ายภาพ
- 2.4 เครื่องชั่งชนิดละเอียดและเครื่องชั่งชนิดหยาบ
- 2.5 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- 2.6 เทอร์โมมิเตอร์

3. เครื่องแก้วที่จำเป็นสำหรับการทดลอง เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวดปริมาตร  
ปิเปต บิวเรต กระบอกตวง ขวดบ๊อด้ ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

### สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลองกับโรน้าแดง
  - 1.1 Cd course powder ชนิด AR grade ผลิตโดยบริษัท MERCK
  - 1.2  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ชนิด AR grade ผลิตโดยบริษัท MERCK
  - 1.3  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ชนิด AR grade ผลิตโดยบริษัท MERCK
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพน้ำ
  - 2.1  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
  - 2.2 น้ำปิ้ง
  - 2.3  $\text{MnSO}_4$
  - 2.4  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc.)
  - 2.5 Hcl (conc.)
  - 2.6  $\text{HNO}_3$  (conc.)
  - 2.7 EDTA
  - 2.8  $\text{NH}_4\text{Cl}$
  - 2.9 Eritrochrome black T
  - 2.10  $\text{CaCO}_3$

### เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เครื่อง minicomputer ของศูนย์คอมพิวเตอร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้วิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับการทดลองหิซเจียบพลันด้วยวิธี โนรบิต และวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของแควคเมียมทองแดง และสังกะสี ต่อขนาด จำนวนลูก และจำนวนครั้งของการให้ลูกของโรน้าแดง ด้วยวิธี ANOVA (Analysis of Variance)

## ขั้นตอนการทดลอง

### 1. การเตรียมน้ำสำหรับทำการทดลอง

นำน้ำประปามาพักในถังพลาสติกขนาด 150 ลิตร พร้อมให้อากาศตลอดเวลาอย่างน้อย 7 วัน เพื่อให้คลอรีนออกไป น้ำที่เตรียมนี้ จะใช้ทำการทดลองเกี่ยวกับไรน้ำแดงตลอดทุกขั้นตอนการทดลอง ทั้งช่วงนิชเจียบพลันและนิชรองเจียบพลัน โดยก่อนนำน้ำไปใช้ทดลอง จะวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ คือ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายและความกระด้างของน้ำทุกครั้ง โดยวิธีการมาตรฐานของ APHA (1985) เพื่อทดสอบความแปรปรวนของคุณภาพน้ำและระบุคุณภาพน้ำที่นำมาทดลอง เนื่องจากพารามิเตอร์ต่างๆ ดังกล่าวมีผลต่อความเป็นพิษของสารละลายโลหะหนัก และอัตราการตายของสัตว์ทดลอง

### 2. การเตรียมน้ำแดง

ไรน้ำแดง (*Hoina macrocopa* Straus) เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ วิธีการเพาะเลี้ยงแสดงในภาคผนวก ค ในการทดลองจะคัดเลือกไรน้ำแดงตัวแม่ในช่วง log growth phase มาแยกเพาะเดี่ยวในหลอดทดลองขนาด 13 X 100 มิลลิเมตร เมื่อไรน้ำแดงให้ลูกออกมา จะคัดเลือกลูกไรน้ำแดงที่มีอายุใกล้เคียงกัน คือ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง นำไปทดลองต่อไป แต่ถ้าหลอดทดลองใดมีลูกไรน้ำแดงตายมากกว่าร้อยละ 10 จะไม่นำไปใช้ในการทดลอง (APHA, 1985)

### 3. การเตรียมภาชนะสำหรับทำการทดลอง

เครื่องแก้วทุกชิ้นที่ใช้ทดลองเกี่ยวกับโลหะหนัก โดยเฉพาะอ่างแก้วกลม บีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร และหลอดทดลองจะแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 10 ประมาณ 1 ชั่วโมงขึ้นไป แล้วจึงล้างทำความสะอาด ทั้งนี้เพราะโลหะหนักสามารถดูดซับที่ผิวแก้วได้ (กรรณิการ์ สิริสิงห์, 2529)

### 4. การเตรียมน้ำแดง

เตรียมน้ำแดงแคดเมียมในเตรด คอปเปอร์ซัลเฟตและซิงค์ซัลเฟตชนิด AR grade โดยให้ความเข้มข้นของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่น แล้วเก็บสารละลายทั้ง 2 ชนิดในขวด polyethylene เพื่อป้องกันการดูดซับโลหะหนักที่ผิวแก้ว โดยจะเตรียมน้ำแดงโลหะหนักใหม่ทุก 14 วัน เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจางด้วย

น้ำประปาที่พักไว้แล้วประมาณ 7 วัน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการต่อไปตามสมการ

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

เมื่อ  $M_1$  คือความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อ  $M_2$  คือความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักที่ต้องการ

เมื่อ  $V_1$  คือปริมาตรของสารละลายโลหะหนักมาตรฐาน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อ  $V_2$  คือปริมาตรของสารละลายโลหะหนักที่ต้องการ

โดยสารละลายโลหะหนักทั้งสามชนิดนี้ จะเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน

#### 5. การเตรียมสารละลายสำหรับทำการทดลองที่เกี่ยวข้อง

สำหรับการเตรียมสารละลาย เพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของน้ำที่ใช้ทดลองดังกล่าวมาแล้ว เตรียมตามวิธีการมาตรฐานของ APHA (1985)

#### วิธีการทดลอง

##### 1. โรน้ำแดง มีวิธีการทดลอง 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

1.1 การทดสอบพิษเฉียบพลัน (acute toxicity test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีที่ทำให้โรน้ำแดงตายร้อยละ 50 ของประชากรของโรน้ำแดง ในภาชนะที่ทำการทดลองในช่วงเวลาต่างๆ กัน การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

1.1.1 การทดลองขั้นเริ่มต้น (small scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีที่ทำให้ประชากรของโรน้ำแดงตายร้อยละ 0 ถึง 100 ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ในการทดลองนี้จะเตรียมสารละลายโลหะหนักในระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น และ 1 ชุดควบคุม และ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (replicate) ประมาณ 3 ถึง 5 ครั้งหรือมากกว่า โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นใหม่ จนกว่าจะได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการทดลองขั้นต่อไป



1.1.2 การทดลองขั้นละเอียด (full scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของโลหะหนักที่ทำให้โรน้ำแดงตายร้อยละ 50 ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้นซึ่งได้จากการทดลองขั้นเริ่มต้น มากำหนดให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยเตรียมสารละลายโลหะหนักทั้งสามชนิด 5 ระดับความเข้มข้นและชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.1 - 4.3 ทำการทดลองประมาณ 5 ซ้ำขึ้นไป เพื่อผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

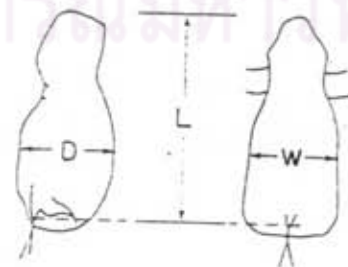
วิธีการทดลองทั้งสองขั้นตอนนี้ ใช้วิธีการทดสอบแบบชีววิทยาในน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำ โดยเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโลหะหนักในระดับความเข้มข้นต่างๆ 100 มิลลิลิตรในแต่ละบีกเกอร์ ใส่ลูกโรน้ำแดงอายุต่ำกว่า 24 ชั่วโมง (ซึ่งไม่มีไข่ใน brood chamber) บีกเกอร์ละ 10 ตัว บันทึกจำนวนโรน้ำแดงที่ตายที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ทำการทดลองไม่เติมอาหารให้โรน้ำแดง สังเกตอาการและบันทึกจำนวนโรน้ำแดงที่ตายในระยะเวลาดังกล่าว เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินว่าโรน้ำแดงตาย คือ ลำตัวมีสีซีดขุ่น นอนอยู่กับภาชนะและไม่เคลื่อนไหวเลย เมื่อใช้เข็ม เขี่ยและที่ตัวโรน้ำแดง ก็ไม่แสดงอาการตอบสนองใดๆ

1.2 การทดสอบพิษของเจือปน (sublethal effect toxicity test) ของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสีต่อโรน้ำแดง เป็นการทดลองเพื่อศึกษาผลโลหะหนักทั้งสามชนิด ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าจะไม่ทำให้โรน้ำแดงตาย 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1 ใน 4 ส่วน, 1 ใน 6 ส่วนและ 1 ใน 10 ส่วน ของค่าระดับ 48-h  $LC_{50}$  ของโลหะหนักแต่ละชนิด โดยศึกษาจำนวนครั้งของการเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวนลูกของโรน้ำแดงทั้งหมด ขนาดร่างกายและอายุของโรน้ำแดง ตั้งแต่เริ่มต้นทดลองจนกระทั่งตาย เป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการศึกษาที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณค่า 16% reproductive impairment (MATC) ตามวิธีการของ Biesinger และ Christensen (1972) การทดลองนี้จะเลี้ยงโรน้ำแดง ในสารละลายโลหะหนักที่ผสมอาหารโรน้ำแดง (*Chlorella* sp. และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ) วิธีการเตรียม คือ ใช้มูลกกระทาผสมน้ำในอัตราส่วน 10 กรัม ค่อน้ำ 1 ลิตร ทิ้งไว้ให้ได้รับแสงแดด ประมาณ 2 วัน ก็จะเกิดน้ำเขียว (*Chlorella* sp.) ใช้เป็นอาหารเลี้ยงโรน้ำแดงในขณะที่ทำการทดลองได้ วิธีการดังแสดงในภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงโรน้ำแดงนี้ไม่ทำการวิเคราะห์ เพราะให้ในปริมาณเท่าๆ กันทุกหน่วยทดลอง วิธีการทดลองดังต่อไปนี้

1.2.1 การเตรียมสารละลายโลหะหนักผสมกับอาหารเลี้ยงโรน้ำแดงในการทดลอง โดยนำอาหารเลี้ยงโรน้ำแดงที่เตรียมไว้มาผสมน้ำในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ใช้สำหรับเป็นอาหารของโรน้ำแดงในระหว่างการทดลอง

1.2.2 วิธีการทดลอง ใช้หลอดทดลองขนาด 13 X 100 มิลลิเมตร เติมสารละลายโลหะหนักความเข้มข้นต่างๆ และชุดควบคุมที่ผสมอาหารไว้แล้วลงไปประมาณ 10 มิลลิเมตร (ต่ำกว่าปากหลอดประมาณ 3 เซนติเมตร) แล้วใช้หลอดหยดสารละลายโรน้ำแดงอายุประมาณ 24 ชั่วโมงที่เพาะพันธุ์และคัดเลือกไว้แล้วลงไปหลอดละ 1 ตัว ทำการทดลองทั้งหมด 15 ข้าง เพื่อให้ผลการทดลองที่ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น สารละลายที่เตรียมจะเปลี่ยนใหม่ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งโรน้ำแดงตาย เมื่อโรน้ำแดงตัวแม่ ( $F_1$ ) ให้ลูกมาครั้งแรก ก็จะนำลูกรุ่นนี้ ( $F_2$ ) ไปทำการทดลองคือ โดยเลี้ยงต่อไปในสารละลายความเข้มข้นเดิม ส่วนลูกรุ่นต่อมาของ  $F_1$  จะปล่อยไปเมื่อรุ่นแม่ ( $F_2$ ) ออกลูกมาครั้งแรกจะนำลูกโรน้ำแดงนี้ ( $F_3$ ) ทดลองต่อไป จนครบ 5 รุ่น ในการทดลอง จะบันทึกจำนวนลูกโรน้ำแดงในแต่ละครั้งที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวนครั้งที่เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ขนาดร่างกาย และอายุของโรน้ำแดงแต่ละตัว ตั้งแต่เกิดจนกระทั่งตายเป็นระยะเวลา 5 รุ่น และบันทึกภาพโรน้ำแดงในรุ่นที่ 5 โดยใช้กล้อง Olympus model BH-2

อนึ่ง การวัดขนาดร่างกายของโรน้ำแดง โดยวัดความยาว (L) แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงตำแหน่งที่ใช้วัดความยาวของโรน้ำแดง (Lawrence, 1987)

2. การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS-X ในการวิเคราะห์โทรมิต ซึ่งจะรายงานค่า  $LC_{50}$  ในช่วงเวลาต่างๆ และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของโลหะหนักแต่ละชนิด (แสดงในภาคผนวก ง) คอโรนาแดงและจะนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองผลของโลหะหนักแต่ละชนิดที่มีต่อการสืบพันธุ์ของโรน้าแดง มาคำนวณหา

50

ค่า MATC หรือระดับความเข้มข้นของโลหะหนักที่ขอมให้มิได้ในสภาวะแวดล้อมที่โรน้าแดงอาศัยอยู่ โดยไม่เป็นอันตราย โดยวิธีของ Biesinger and Christensen (1972) นอกจากนี้ในการศึกษาพิษของเจือปนจะวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (ANOVA) ของจำนวนครั้งของการเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวนลูกทั้งหมดของโรน้าแดง ขนาดร่างกายและช่วงอายุของโรน้าแดงในแต่ละวัน เพื่อทดสอบผลของสารละลายโลหะหนักแต่ละชนิดว่า ในระดับความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น และชุดควบคุม ว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในระหว่างกลุ่ม (treatment) หรือไม่ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ถ้าต่างกันจะทดสอบว่าข้อมูลในกลุ่มใด (ความเข้มข้น 3 ระดับและชุดควบคุม) ที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่น ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธีของ Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS-X ในการวิเคราะห์ (แสดงในภาคผนวก ง)

### 3. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในการศึกษาความเป็นพิษเจือปน ต้องนำน้ำที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์คุณภาพทั้งในช่วงก่อนทำการทดลอง และหลังการทดลองทุกครั้ง สำหรับการทดสอบพิษของเจือปน จะวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ในช่วงก่อนการทดลอง และระหว่างการทดลองทุกครั้ง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งการวิเคราะห์คุณภาพน้ำประกอบด้วย

#### 3.1 การวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธีการมาตรฐาน ของ APHA (1985)

วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ โดยวิธี Azide Modification

วิเคราะห์ความเป็นกรดด่างของน้ำ ใช้ pH meter วัด

วิเคราะห์ความกระด้างของน้ำ โดยวิธี EDTA Titrimetric

วิเคราะห์ความเป็นด่างของน้ำ โดยวิธี Tritation method



### 3.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วัดอุณหภูมิของน้ำ (เทอร์โมมิเตอร์)

#### สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

ทำการทดลองบริเวณห้องปฏิบัติการ ชั้น 4 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2535 ถึงเดือน มกราคม 2536



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย