

## บทที่ 2

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

#### ก. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หอยนางรมปากสี ( Crassostrea commercialis Iredale & Roughly) ที่ใช้ทดลองมีขนาดประมาณ 4 x 5 เซนติเมตร เก็บจากตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี นำมาเลี้ยงในถังขนาด 25 x 50 x 25 เซนติเมตร น้ำทะเลที่ใช้มีความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 29 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 วัน เพิ่มหรือลดอุณหภูมิในอัตรา 1 องศาเซลเซียสต่อวันด้วยเครื่องปรับอุณหภูมิ (Thermostat) จนได้อุณหภูมิตามที่ต้องการ คือ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส เลี้ยงหอยนางรมปากสีให้คุ้นกับอุณหภูมิตดลองดังกล่าวอย่างน้อย 7 วัน ในถังเลี้ยงมีเครื่องให้อากาศและมีการให้อาหารแต่จะงดให้อาหารก่อนการทดลอง 1 วัน สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนั้นเป็นอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลโดยอุณหภูมิ 28.0 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิปกติ ส่วนอุณหภูมิ 23.5 และ 32.5 องศาเซลเซียส นั้นนำมาจากเดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ (2522) ที่ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของหอยนางรมวัยอ่อนเพื่อสะดวกในการเปรียบเทียบเทียบผลการทดลอง

ส่วนการทดลองผลของอุณหภูมิและโลหะหนักบางชนิดที่มีต่อพัฒนาการของหอยนางรมปากสีจากไข่ที่ผสมแล้วจนเป็นตัวอ่อนในระยะ D-shaped ได้ทำที่สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดชลบุรี หอยนางรมปากสีที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เก็บจากบริเวณสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง แล้วนำมาเลี้ยงไว้ในอ่างที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

#### ข. การเตรียมสารละลาย

ทองแดงที่ใช้ในการทดลองเตรียมจาก Stock solution ของ  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  เดิมลงในน้ำทะเลเพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ

แคตเมียมที่ใช้ในการทดลองเตรียมจาก Stock solution ของ  $CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2} H_2O$  และตะกั่วเตรียมจาก Stock solution ของ  $Pb(NO_3)_2$  เติมลงในน้ำทะเลเพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ

ค. การทดลองผลของอุณหภูมิจึงโลหะหนักบางชนิด (ทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว) ที่มีต่อพัฒนาการของหอยนางรมปากสี่ปากงอที่ผสมแล้วจน เป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped

### 1. การเตรียมน้ำทะเล

นำน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน กรองด้วยกระดาษกรอง GF/C เพื่อกำจัดสิ่งแขวนลอยในน้ำแล้วจุ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เก็บน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อโรคแล้วนี้เพื่อใช้ทดลองต่อไป

### 2. การเตรียมไขหอยนางรมปากสี่

นำหอยนางรมปากสี่ที่เลี้ยงไว้เพื่อให้คุ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ทดลอง (acclimation) มาตรวจดูความพร้อมของอวัยวะสืบพันธุ์โดยวิธี Sacrificiation method (Galtsoff, 1964) โดยเปิดฝาหอยแล้วตัดกล้ามเนื้อที่ยึดฝาหอย (adductor muscle) ออก ถ้าหอยมีไข่หรือสเปิร์มที่สมบูรณ์ดีจะมีลักษณะของอวัยวะไข่เต่งตึงและมีสีครีมเห็นได้ชัดเจน เมื่อไข่หลุดหยดครีตเบา ๆ จะเห็นของเหลวสีครีมไหลไปตามแขนงของอวัยวะสืบพันธุ์ ไข่หลุดหยดตูดมาแตะบนสไลด์เล็กน้อย แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นไข่หรือสเปิร์มและอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ดีหรือไม่ ถ้าไข่สมบูรณ์จะมีรูปร่างค่อนข้างรีและมีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 40 - 50 ไมครอน เมื่อถูกน้ำทะเลไข่จะมีรูปร่างค่อนข้างกลม ส่วนไข่ที่ไม่สมบูรณ์จะมีขนาดเล็กบ้างใหญ่บ้างหรือติดกันเป็นกลุ่มใหญ่มีเศษเนื้อเยื่อหลุดติดออกมาหรือมีรูปร่างแพบยาว ส่วนสเปิร์มมีขนาดเล็กกว่าไข่มาก สเปิร์มที่แข็งแรงต้องมีการเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลาและว่ายน้ำอย่างรวดเร็ว

เมื่อทราบว่าเป็นหอยตัวผู้หรือตัวเมียแล้วไข่หลุดหยดครีตและดูไข่หรือสเปิร์มใส่ในปิกลเกอร์คนละใบที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิตามที่ใช้ในการทดลอง จากนั้นนำไข่กับสเปิร์มมาผสมกันโดยอัตราส่วนของหอยตัวผู้ต่อตัวเมียที่ใช้ในการผสมพันธุ์ประมาณ 1 ต่อ 3 การผสมจะได้ผลดีถ้าปริมาณของสเปิร์มไม่มากเกินไป หากสเปิร์มมากเกินไป

เปอร์เซ็นต์ของไข่ที่พัฒนาผิดปกติจะสูง ปลอ่ยให้ล้เป็รรมปฏิสนธิกับไข่ประมาณ 10 นาที กรองไข่ที่ผสมแล้วด้วยผ้ากรองขนาด 77 ไมครอน เพื่อกรองเศษเนื้อเยื่อที่ติดมากับไข่หรือล้เป็รรมออก แล้วกรองอีกรั้งด้วยผ้ากรองขนาด 37 ไมครอน เพื่อขจัดล้เป็รรมที่เหลือออก ล้างไข่ที่กรองได้ด้วยน้ำทะเลอีกรั้งหนึ่ง เพื่อป้องกันล้เป็รรมที่อาจติดค้างอยู่ให้หมดไป ไข่ที่ถูกผสมแล้วนี้จะไข่ทดลองต่อไป

### 3. การศึกษาพัฒนาการของหอยนางรมปากสืบจากไข่ที่ผสมแล้วจนเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped ที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

นำไข่ที่ถูกผสมแล้วเลี้ยงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ซึ่งอยู่ในอ่างที่มีการปรับอุณหภูมิตามต้องการ โดยให้มีความหนาแน่นของไข่ 20 - 30 ตัวต่อมิลลิลิตร เก็บตัวอย่างไข่ทุก ๆ 5 นาที ใน 1 ชั่วโมงแรก จากนั้นเก็บทุก ๆ 15 นาที ใน 5 ชั่วโมงต่อมา และทุก ๆ 6 ชั่วโมง รวมระยะเวลาทดลอง 2 วัน ตัวอย่างที่ลุ่มมาจะถูกดองด้วยน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 5%

### 4. การทดลองผลของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ที่มีต่อพัฒนาการของหอยนางรมปากสืบจากไข่ที่ผสมแล้วจนเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped ที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

#### 4.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาความเข้มข้นของทองแดง แคดเมียม และตะกั่วที่เหมาะสมต่อพัฒนาการจากไข่ที่ผสมแล้วจนเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped ที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

ในแต่ละอุณหภูมิเตรียมน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ให้มีความเข้มข้นของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ตามที่ต้องการลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จากนั้นใส่ไข่ที่ผสมแล้วลงไปให้มีจำนวนของไข่ 20 - 30 ตัวต่อมิลลิลิตร รวมทั้งอ่างเปรียบเทียบ (control) ซึ่งใส่น้ำทะเลปกติที่มีได้เต็มโหลหะหนัก เมื่อครบ 48 ชั่วโมงทำการกรองตัวอ่อนหอยนางรมปากสืบและดองด้วยน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 5% ลุ่มตัวอย่างนับ 100 ตัวเพื่อดูจำนวนเอมบริโอที่มีพัฒนาการปกติและจำนวนเอมบริโอที่มีพัฒนาการผิดปกติ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่มีพัฒนาการเป็น

ปกติใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่มีพัฒนาการเป็นปกติในอ่างเปรียบเทียบ และหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เอมบริโอไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped ที่สมบูรณ์เทียบกับเอมบริโอในอ่างเปรียบเทียบมาจัดลำดับใหม่เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับเอมบริโอที่มีพัฒนาการเป็นปกติคือเอมบริโอที่เจริญเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped โดยมีรูปร่างภายนอกสมบูรณ์ครบถ้วน ส่วนพัฒนาการที่ผิดปกติคือ ตัวอ่อนที่มีอายุ 48 ชั่วโมงแล้วไม่สามารถพัฒนาเป็นรูปตัว D ที่สมบูรณ์

4.2 การทดลองผลของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ที่มีต่อพัฒนาการของหอยนางรมปากสืบจากไข่ที่ผสมแล้วจนเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped ที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

เมื่อทราบช่วงความเป็นพิษของทองแดง แคดเมียม และตะกั่วแล้ว จึงกำหนดความเข้มข้นที่จะทดลองใหม่ 6 ระดับ (รวมอ่างเปรียบเทียบ) โดยทองแดงที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01 ส่วนในล้านส่วน แคดเมียมที่ใช้ทดลองมีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ส่วนในล้านส่วน และตะกั่วที่ใช้ทดลองมีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.005, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ จากนั้นใส่ไข่ที่ผสมแล้วลงไปให้มีจำนวนของไข่ 20 - 30 ตัวต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับข้อ 4.1 ในแต่ละอุณหภูมิทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการกรองตัวอ่อนหอยนางรมและดองด้วยน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 5% บันทึกจำนวนเอมบริโอที่มีพัฒนาการปกติและจำนวนเอมบริโอที่มีพัฒนาการผิดปกติ

ง. การทดลองผลของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ที่มีต่อหอยนางรมปากสืบที่โตเต็มวัยที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

1. การทดลองโดยใช้หอยนางรมปากสืบที่มีชีวิตทั้งตัว (Whole organism)

1.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาความเข้มข้นสำหรับการทดลอง

ทำการทดลองย่อยเพื่อหาความเข้มข้นของทองแดง แคดเมียม และตะกั่วที่เหมาะสมสำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองเลี้ยงหอยนางรมปากสืบที่โตเต็มวัยในโลหะหนักแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

กันหลายระดับ ๆ ละ 10 ตัว เมื่อเริ่มการทดลองนำหอยนางรมแต่ละตัวมาเปิดฝาเล็กน้อยแล้วเอาไม้เล็ก ๆ สอดค้ำเปลือกทั้งสองไว้เพื่อให้เกิดเป็นช่องให้น้ำเข้าภายใน ทั้งนี้เพื่อง่ายแก่การตรวจสอบว่าหอยยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ หรืออาจดูได้จากกล้ำมเนื้อที่ปิดฝาหอยไม่มีการตอบสนองทำการทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง บันทึกผลการตายของหอยแล้วใช้ความเข้มข้นที่ฆ่าหอยได้ 30 - 80% ในเวลา 96 ชั่วโมง มาพิจารณาในการจัดลำดับความเข้มข้นใหม่เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 1.2 การทดลองผลของทองแดงที่มีต่อหอยนางรมปากสีที่โตเต็มวัยที่

อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

เมื่อทราบช่วงความเป็นพิษของทองแดงแล้วจึงกำหนดความเข้มข้นที่จะทดลองใหม่ 6 ระดับ (รวมอ้างอิงเปรียบเทียบกับ) กล่าวคือที่อุณหภูมิ 23.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของทองแดงที่ใช้เท่ากับ 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 ส่วนในล้านส่วน ที่อุณหภูมิ 28.0 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของทองแดงที่ใช้คือ 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 ส่วนในล้านส่วน และที่อุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ ในแต่ละอ่างทดลองให้อากาศลมมาเสมอ ใส่หอยนางรมที่มีไม้เล็ก ๆ สอดค้ำเปลือกทั้งสองไว้ลงในอ่าง ๆ ละ 20 ตัว ทำการทดลองเป็นเวลา 120 ชั่วโมง บันทึกผลการตายของหอยนางรม อุณหภูมิ และ pH ของน้ำที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ในแต่ละอุณหภูมิที่ใช้ทดลองทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง เนื่องจากการทดลองทำในอ่างแก้วซึ่งเป็นระบบปิด (closed system) ทำให้มีการสะสมของเสียที่หอยขับออกมาหรือของเสียจากการเน่าของหอยที่ตายแล้ว จึงมีการเปลี่ยนน้ำในอ่างแก้วทุกวันจนสิ้นสุดการทดลอง

### 1.3 การทดลองผลของแคดเมียมที่มีต่อหอยนางรมปากสีที่โตเต็มวัยที่

อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

การทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่ใช้ในการทดลองที่อุณหภูมิ 23.5 องศาเซลเซียส คือ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ส่วนในล้านส่วน อุณหภูมิ 28.0 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นที่ใช้คือ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 ส่วนในล้านส่วน และอุณหภูมิ 32.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ

1.4 การทดลองผลของตะกั่วที่มีต่อหอยนางรมปากสีที่โตเต็มวัยที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

การทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ความเข้มข้นของตะกั่วที่ใช้ในการทดลองที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส คือ 1, 2, 4, 6, 8, 10, 50 และ 100 ส่วนในล้านส่วน

2. การทดลองโดยใช้เนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอยนางรมปากสี

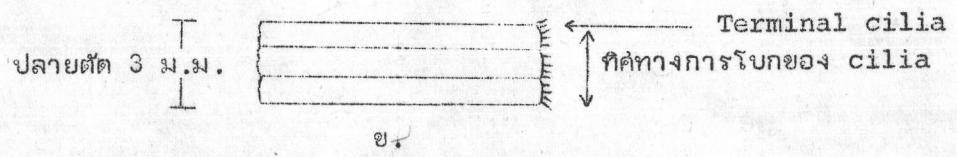
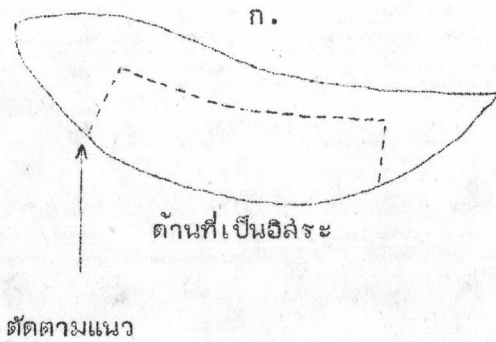
ในการทดลองผลของโลหะหนัก (ทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว) ที่มีต่อหอยนางรมปากสีที่โตเต็มวัย ได้ทำการทดลองโดยใช้หอยนางรมปากสีที่มีชีวิตทั้งตัว (whole organism) และใช้เฉพาะเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอย (excised gill tissue) ทั้งนี้เนื่องจากหอยนางรมปากสีมีฝาปิดมิดชิด มักจะทำให้เกิดปัญหาในขณะทดลองว่าหอยที่ใช้ทดลองนี้ล้มหรือตาย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงใช้เนื้อเยื่อส่วนเหงือกมาทดลองแทนโดยถือว่าความทนทานของเนื้อเยื่อส่วนที่ตัดออกมานี้อาจเชื่อมโยง หรือแสดงถึงความทนทานของหอยนางรมปากสีนี้ได้

2.1 การตัดเนื้อเยื่อส่วนเหงือก

ในการตัดเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอยนางรมปากสีทำโดยใช้มีดค่อย ๆ ตัด adductor muscle ออกเพื่อเปิดฝาหอย ตึงเนื้อเยื่อส่วน mantle ไปด้านหลังหรือขลิบออกเพื่อให้เห็นส่วนเหงือกได้ชัดเจนขึ้น ตัดส่วนของ gill lamellae ทั้ง 4 ชั้นออกใส่ใน petri dish จาก gill lamellae ชั้นใหญ่ตัดส่วนที่อยู่ตรงปลายทั้งสองออกเหลือเพียงสองในสามส่วนของ gill lamellae เท่านั้น ดังรูปที่ 3 ก. แล้วตัดส่วนนี้ออกอีกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ที่มีแถบกว้างประมาณ 3 มม. (รูปที่ 3 ข.) แล้วใช้กึ่งกันค่อย ๆ ข้อนเนื้อเยื่อส่วนเหงือกวางบนสไลด์เพื่อตรวจดูการเคลื่อนไหวของ terminal cilia ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 การทดลองความทนทานของเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอยนางรมปากสีต่อทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ที่อุณหภูมิ 23.5, 28.0 และ 32.5 องศาเซลเซียส

ในแต่ละอุณหภูมิเตรียมน้ำทะเลความเข้มข้น 30 ppt. ให้มีความเข้มข้นของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว เช่นเดียวกับข้อ 4.1 ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล.



รูปที่ 3

ภาพแสดงการตัดเนื้อเยื่อส่วนเหงือกของหอยนางรมปากสีบ

ก. แสดงการตัดเนื้อเยื่อออกจากแผ่นเหงือก 1 แผ่น (gill lamella)

ข. ภาพขยายของเนื้อเยื่อส่วนเหงือกชั้นเล็กขนาดแถบกว้าง

3 มิลลิเมตร ซึ่งตัดจากเนื้อเยื่อแผ่นใหญ่อีกครั้งหนึ่ง

ใช้ความเข้มข้นละ 2 ปีกเกอร์ จากนั้นนำเนื้อเยื่อส่วนเหงือกที่เตรียมไว้ใส่ในปิกเกอร์ ๆ ละ 5 อัน ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง บันทึกอัตราการเคลื่อนไหวของ cilia ดังต่อไปนี้

- 3 - การเคลื่อนไหวปกติ
- 2 - การเคลื่อนไหวลดลงบ้าง cilia บางตำแหน่งอาจหยุดการเคลื่อนไหว
- 1 - การเคลื่อนไหวลดลงมาก cilia ส่วนใหญ่หยุดการทำงาน
- 0 - ไม่มีการเคลื่อนไหว

การทดลองสิ้นสุดเมื่อเนื้อเยื่อส่วนเหงือกหยุดการทำงาน บันทึกการเคลื่อนไหวของ cilia ทุก ๆ 2 ชั่วโมง

จ. การหาปริมาณของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ที่อยู่ในน้ำทดลอง

1. การหาปริมาณของทองแดงที่มีอยู่จริงในน้ำ

สำหรับผลของทองแดงที่มีต่อหอยนางรมปากสีจากไข่ที่ผสมแล้วจนเป็นตัวอ่อนระยะ D-shaped ทำโดยเก็บตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นในตอนเริ่มแรกและสิ้นสุดการทดลอง (48 ชั่วโมง) ส่วนผลของทองแดงที่มีต่อหอยนางรมปากสีที่โตเต็มวัยนั้นเก็บตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร ในตอนเริ่มแรกของการทดลองและเมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วเติมกรดไนตริก 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้ APDC - MIBK extraction แล้ววัดด้วย Unicam SP 90 B Series 2 Atomic Absorption Spectrophotometer (สิทธิพันธ์ ศิริรัตนชัย, 2523)

2. การหาปริมาณของแคดเมียมและตะกั่วที่มีอยู่จริงในน้ำทดลอง

ทำเช่นเดียวกับข้อ 1

ฉ. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์หาค่า  $EC_{50}$  (Median effective concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของโลหะที่ทำให้สัตว์ทดลองมีพัฒนาการที่ผิดปกติ 50 เปอร์เซ็นต์ และค่า  $LC_{50}$  (Median lethal concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของโลหะที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาต่าง ๆ โดยวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) และ Finney (1971)



ส่วนการประมาณค่าระดับเริ่มเป็นพิษ โดยวิธีของปรีชา ส้มณี (2522) ได้ใช้ข้อ  
สมมติว่าเส้นโค้งความเป็นพิษ (toxicity curve) มีลักษณะตามสมการ

$$M = a + be^{-kH} \dots\dots\dots(1)$$

ซึ่งอาจเปลี่ยนให้เป็นสมการเส้นตรงคือ

$$\ln(M - a) = \ln b - kH \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ

$M = LC_{50}$  = มัธยฐานของความเข้มข้นที่ทำให้ตายในเวลา  $H$  ชั่วโมง

$H$  = เวลาที่สัตว์สัมผัสและได้รับสารพิษ

$a$  = มัธยฐานของระดับเริ่มเป็นพิษ

$k$  = อัตราการเพิ่มความเข้มข้น

$b$  = ค่าคงที่

การทำนายระดับปลอดภัย (safe level) ของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว  
มักใช้ปัจจัยปรับค่า (application factor) คูณกับค่า  $EC_{50}$  หรือ  $LC_{50}$  ที่ประมาณได้  
ปัจจัยปรับค่าที่ใช้ถือตาม Laboratory Fish Production Index (LFPI) ซึ่งจะได้ระดับ  
ปลอดภัยมีค่าประมาณ 0.05 ของ 96-h.  $LC_{50}$  หรือ 0.025 ของ 48-h.  $LC_{50}$  (ปรีชา  
ส้มณี, 2522)