

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและการเตรียมวัสดุต่าง ๆ ในการย้อมสี

สารเคมีและการเตรียมสีต่างๆในการย้อมสี (Humason, 1979)

1. Haematoxylin & Eosin

Harris Haematoxylin ประกอบด้วย

Haematoxylin	4	กรัม
Absolute alcohol	40	มิลลิลิตร

(ละลายสารทั้งสองเข้าด้วยกันเป็น สารละลาย A)

Ammonium aluminium sulphate

หรือ Potassium aluminium sulphate	40	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

(ละลายสารทั้งสองเป็น สารละลาย B)

ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วจึงนำสารละลาย A+B มารวมกัน ทิ้งไว้นาน 6 สัปดาห์ หรือถ้าต้องการใช้ทันทีให้เติม Mercuric oxide 2 กรัม

2. 0.5% Eosin ประกอบด้วย

Eosin	0.5	กรัม
95% ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

3. 10% Neutral buffer formalin ประกอบด้วย

37 - 40 % formalin	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
Sodium phosphate monobasic	4	กรัม
Sodium phosphate dibasic	6.5	กรัม

วิธีเตรียม

เติม Sodium phosphate monobasic 4 กรัม ในน้ำกลั่นจนจนละลาย และเติม Sodium phosphate dibasic 6.5 กรัม จนจนละลายเช่นกัน จากนั้นเติมสารละลายฟอรัมาลิน 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดปิดฝา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. Periodic acid Schiff (PAS)

0.5% Periodic acid solution ประกอบด้วย

Periodic acid	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

เติม Periodic acid 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น คนจนละลาย และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดที่อุณหภูมิห้อง

5. Schiff solution ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร
Basic fuchsin	1	กรัม
1 NHCl	20	มิลลิลิตร
Sodium bisulfate	1	กรัม

วิธีเตรียม

1. ต้มน้ำกลั่นให้เดือด ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเติม Basic fuchsin 1 กรัม คนจนละลายและทิ้งไว้ให้เย็น จนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
2. กรองและเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 20 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงและทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
3. เติม Sodium bisulphate 1 กรัม เขย่าอย่างแรง และเก็บในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอย่างฟาง ถ่ายใส่ขวดสีชาและเก็บในตู้เย็น

ภาคผนวก ข
คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำบางประการ

ตารางภาคผนวกที่ 1 คุณสมบัติของน้ำบางประการในน้ำที่ใช้ในการทดลองผลของ
โซเดียมอาร์ซีไนท์ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 นาน 48 ชั่วโมง

เวลา (ชม.)	กลุ่ม	คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำ											
		ออกซิเจนละลายน้ำ(มก/ล)				ความเป็นกรด-ด่าง				อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
0	ควบคุม	6.31	6.28	6.30	6.32	7.0	7.1	7.2	6.9	28.4	28.3	29.0	28.7
	ทดลอง	6.27	6.28	6.27	6.26	7.3	7.2	7.2	7.2	28.6	28.5	28.5	28.2
24	ควบคุม	5.20	5.00	5.11	5.10	7.1	7.2	7.0	7.0	28.7	28.4	28.4	28.3
	ทดลอง	3.41	3.44	3.37	3.41	7.2	7.2	7.3	7.2	28.1	28.2	28.2	28.3
48	ควบคุม	4.00	4.23	4.03	4.08	7.2	7.0	7.0	7.1	28.8	28.8	28.4	29.0
	ทดลอง	2.21	2.20	2.22	2.22	7.0	7.4	7.2	7.2	28.8	28.9	28.4	28.3

ตารางภาคผนวกที่ 2 คุณสมบัติของน้ำบางประการในน้ำที่ใช้ในการทดลองผลของ
เมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 นาน 48 ชั่วโมง

เวลา (ชม.)	กลุ่ม	คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำ											
		ออกซิเจนละลายน้ำ(มก/ล)				ความเป็นกรด-ด่าง				อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
0	ควบคุม	6.23	6.34	6.33	6.31	7.1	6.8	7.0	7.0	28.5	28.5	28.5	28.5
	ทดลอง	6.47	6.45	6.37	6.44	7.1	7.2	7.0	7.0	28.8	28.8	28.7	29.0
24	ควบคุม	5.12	4.97	4.75	4.92	7.2	6.7	7.0	7.0	28.5	28.5	28.5	28.5
	ทดลอง	4.45	4.25	4.11	4.26	7.0	7.0	7.1	7.0	28.7	28.5	28.6	28.5
48	ควบคุม	4	4.15	4.18	4.12	7.3	7.1	6.7	7.0	28.8	28.8	28.7	28.7
	ทดลอง	3.12	3.14	3.15	3.15	7.2	7.1	7.1	7.1	28.5	28.5	28.5	28.5

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่เลี้ยงปลานิลในชุดการทดลองของโซเดียมอาร์ซีไนท์ที่มีการให้อาหารต่างชนิดกัน เป็นเวลา 30 วัน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายน้ำ(มิลลิกรัม/ลิตร)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T ₁	6.3	6.1	6.1	6.3	6.1	6.0	6.4	6.3	6.1	6.3	6.1	6.2	6.2	6.2	6.3	6.3	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.4	6.3	6.4	6.5	6.0
T ₂	6.3	6.1	6.1	6.2	6.1	6.1	6.5	6.3	6.0	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.1	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.3	6.7	6.5	6.6	6.5	6.0
T ₃	6.2	6.1	6.0	6.3	6.2	6.1	6.4	6.3	6.0	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.1	6.4	6.7	6.7	6.7	6.4
T ₄	6.2	6.1	6.1	6.3	6.2	6.1	6.3	6.3	6.0	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.5	6.4	6.1	6.7	6.4	6.1

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่เลี้ยงปลานิลในชุดการทดลองของเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่มีการให้อาหารต่างชนิดกันเป็นเวลา 30 วัน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายน้ำ(มิลลิกรัม/ลิตร)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T ₅	6.0	6.2	6.0	6.4	6.0	6.0	6.2	6.2	6.0	6.2	6.1	6.1	6.0	6.1	6.3	6.1	6.1	6.1	6.2	6.0	6.3	6.5	6.2	6.3	6.3	6.4	6.7	6.3	6.5	6.3
T ₆	6.0	6.3	6.0	6.4	6.0	6.0	6.2	6.2	6.0	6.2	6.0	6.2	6.0	6.2	6.3	6.0	6.2	6.1	6.3	6.2	6.3	6.5	6.4	6.3	6.3	6.4	6.7	6.5	6.5	6.3
T ₇	6.1	6.2	6.0	6.3	6.1	6.0	6.2	6.2	6.0	6.2	6.2	6.3	6.0	6.1	6.2	6.0	6.3	6.1	6.2	6.2	6.4	6.2	6.5	6.3	6.3	6.4	6.7	6.5	6.5	6.4
T ₈	6.1	6.2	6.0	6.3	6.2	6.0	6.2	6.2	6.0	6.2	6.0	6.1	6.0	6.1	6.1	6.0	6.1	6.1	6.2	6.0	6.0	6.3	6.4	6.2	6.3	6.4	6.8	6.5	6.5	6.4

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่เลี้ยงปลานิลในชุดการทดลองของโซเดียมอาร์ซีไนท์ที่มีการให้อาหารต่างชนิดกันเป็นเวลา 30 วัน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของน้ำ(มิลลิกรัม/ลิตร)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T ₁	7.1	7.0	7.1	7.0	7.0	7.1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.4	7.2	7.3	7.4	7.3	7.4	7.3	7.0	7.1	7.1	7.1	7.0	7.0	7.2	7.0	7.1	7.0	7.1	7.0	7.1
T ₂	7.2	7.0	7.2	7.0	7.0	7.2	7.0	7.3	7.2	7.0	7.4	7.2	7.3	7.4	7.2	7.4	7.2	7.0	7.0	7.2	7.2	7.0	7.0	7.2	7.0	7.1	7.0	7.1	7.0	7.2
T ₃	7.1	7.0	7.2	7.0	7.0	7.2	7.0	7.2	7.3	7.0	7.3	7.2	7.3	7.4	7.2	7.3	7.4	7.3	7.2	7.0	7.2	7.2	7.0	7.1	7.0	7.1	7.0	7.1	7.0	7.2
T ₄	7.1	7.1	7.2	7.0	7.0	7.2	7.0	7.2	7.3	7.0	7.3	7.0	7.3	7.4	7.1	7.3	7.4	7.2	7.1	7.0	7.1	7.0	7.0	7.1	7.0	7.1	7.0	7.1	7.0	7.2

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่เลี้ยงปลานิลในชุดการทดลองของเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่มีการให้อาหารต่างชนิดกันเป็นเวลา 30 วัน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของน้ำ(มิลลิกรัม/ลิตร)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T ₅	7.2	7.0	7.1	7.1	7.0	7.2	7.3	7.1	7.1	7.2	7.4	7.0	7.1	7.3	7.2	7.1	7.2	7.1	7.0	7.2	7.0	7.0	7.3	7.2	7.1	7.2	7.2	7.1	7.2	7.2
T ₆	7.2	7.0	7.1	7.1	7.0	7.3	7.2	7.1	7.3	7.2	7.4	7.0	7.2	7.6	7.1	7.2	7.1	7.1	7.0	7.3	7.0	7.0	7.2	7.2	7.2	7.2	7.3	7.2	7.3	7.3
T ₇	7.2	7.0	7.0	7.2	7.0	7.3	7.1	7.1	7.4	7.2	7.4	7.0	7.3	7.5	7.1	7.2	7.3	7.2	7.0	7.1	7.0	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.3	7.2	7.2	7.3
T ₈	7.2	7.2	7.0	7.1	7.0	7.3	7.2	7.1	7.4	7.3	7.4	7.0	7.3	7.6	7.0	7.2	7.2	7.2	7.0	7.1	7.0	7.0	7.1	7.2	7.1	7.2	7.1	7.1	7.1	7.1

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส) ที่เลี้ยงปลานิลในชุดการทดลองของโซเดียมอาร์ซีไนท์ที่มีการให้อาหารต่างชนิดกันเป็นเวลา 30 วัน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิของน้ำ (องศาเซลเซียส)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T ₁	27.1	27.0	27.5	27.4	27.5	27.1	27.0	27.2	27.4	27.5	27.4	28.0	28.0	28.1	28.0	27.5	27.8	27.8	28.1	28.0	28.0	28.1	28.2	28.2	28.1	28.2	28.1	28.2	28.0	28.2
T ₂	27.0	27.2	27.5	27.4	27.5	27.4	27.0	27.2	27.4	27.5	27.4	27.7	28.0	28.0	28.0	27.5	27.7	28.0	28.0	28.0	28.0	28.1	28.2	28.2	28.1	28.2	28.1	28.2	28.0	28.2
T ₃	27.0	27.5	27.5	27.4	27.5	27.4	27.0	27.2	27.4	27.6	27.6	27.5	28.0	27.9	28.0	27.8	27.6	27.8	28.0	28.0	28.0	28.1	28.2	28.2	28.1	28.2	28.1	28.2	28.0	28.2
T ₄	27.0	27.5	27.5	27.4	27.5	27.4	27.0	27.2	27.4	27.6	27.5	27.5	28.0	28.1	28.0	27.9	27.5	28.2	28.0	28.0	28.2	28.1	28.1	28.2	28.1	28.2	28.1	28.2	28.0	28.2

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส) ที่เลี้ยงปลานิลในชุดการทดลองของเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่มีการให้อาหารต่างชนิดกันเป็นเวลา 30 วัน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิของน้ำ (องศาเซลเซียส)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T ₁	27.0	27.0	27.0	27.2	27.5	27.0	27.1	27.4	27.3	27.4	28.1	28.0	28.0	28.1	28.0	27.4	27.9	28.0	28.1	28.0	28.3	28.0	28.3	28.1	28.0	28.1	28.0	28.0	28.2	28.4
T ₂	27.0	27.0	27.0	27.2	27.5	27.1	27.4	27.4	27.2	27.4	28.0	28.0	28.0	28.3	28.0	27.7	27.9	28.0	28.1	28.0	28.2	28.1	28.2	28.1	28.0	28.1	28.1	28.2	28.4	28.4
T ₃	27.0	27.3	27.0	27.3	27.5	27.2	27.5	27.5	27.2	27.4	27.8	28.0	28.0	28.2	28.0	27.7	27.8	28.0	28.1	28.0	28.2	28.1	28.3	28.1	28.0	28.2	28.2	28.1	28.3	28.2
T ₄	27.0	27.3	27.4	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.1	27.5	28.0	28.0	28.0	28.1	28.0	27.7	27.7	28.1	28.2	28.0	28.2	28.1	28.4	28.2	28.2	28.3	28.3	28.0	28.1	28.2

ภาคผนวก ค
เทคนิคการทดลองสารพิษด้วยวิธีชีววิเคราะห์

เทคนิคการทดลองสารพิษด้วยวิธีชีววิเคราะห์ (APHA, 1981 อ้างถึงใน ทรงกฤษณ์ ประภักดิ์, 2538)

1. ใช้ช่วงระยะเวลาในการทดลองเป็นเกณฑ์

1.1 ชีววิเคราะห์ในช่วงเวลาสั้น

ชีววิเคราะห์ในช่วงเวลาสั้น (Short-term bioassay) เป็นการทดสอบชีววิเคราะห์โดยมีช่วงระยะเวลาในการทดลองสั้น ๆ โดยปกติใช้เวลาประมาณ 24-96 ชั่วโมง แต่บางครั้งอาจยาวเกินถึง 14 วันก็ได้ ซึ่งขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดลองว่าจะต้องการศึกษาอะไร แต่โดยทั่วไปจากการทดลองชีววิเคราะห์ในช่วงเวลาสั้น ๆ นี้ จะใช้ศึกษาหาระดับความเป็นพิษอย่างคร่าว ๆ ในช่วงที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 0-100 และใช้สัตว์ทดลองจำนวน 5 ตัวหรือมากกว่า ซึ่งขึ้นกับขนาดภาชนะที่จะใช้สำหรับใส่สัตว์ทดลอง เพราะถ้าสัตว์ทดลองมีขนาดใหญ่ ก็จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่มีขนาดใหญ่ด้วยเหมือนกัน เพื่อป้องกันความเครียดที่อาจเกิดขึ้นได้ หรือถ้าสัตว์ทดลองมีขนาดเล็กก็จะสามารถใส่สัตว์ทดลองได้มากขึ้น นอกจากนี้ การทดลองชีววิเคราะห์ในช่วงเวลาสั้น ๆ อาจเลือกวิธีการทดลองว่าจะเป็นแบบ ชีววิทยาในน้ำนิ่ง (Static bioassay) หรือชีววิทยาน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำ (Static with renewal bioassay) หรือชีววิทยาในน้ำไหล (Flow-through bioassay) ก็ได้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความอยู่คงตัวของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ขนาดของสัตว์ทดลอง ตลอดจนปัจจัยต่าง ๆ เช่น ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ถ้าสัตว์ทดลองมีความต้องการออกซิเจนสูง ก็จะต้องมีการเปลี่ยนสารละลาย เพื่อเพิ่มออกซิเจนให้สัตว์ทดลอง หรือถ้าสัตว์ทดลองมีขนาดเล็ก การป้องกันการหลุดลอกออกไปของสัตว์ทดลองก็ทำได้ยาก ดังนั้นอาจไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนสารละลายทุก 24 ชั่วโมงก็ได้ แต่ก็ควรเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก 96 ชั่วโมง

1.2 ชีววิเคราะห์ในช่วงระยะเวลาปานกลาง

วิธีชีววิเคราะห์ในช่วงระยะเวลาปานกลาง (Intermediated-term bioassay) เป็นการทดลองทางพิษวิทยาที่ใช้ช่วงระยะเวลาอยู่ในช่วง 15-90 วัน ซึ่งการทดลองชีววิเคราะห์แบบนี้ มักจะใช้กับสัตว์ทดลองที่มีช่วงชีวิตยาวนาน หรือในระหว่างการเติบโต มีการเปลี่ยนแปลงร่างกายไปตามสภาพวงจรชีวิต และส่วนใหญ่จะใช้ศึกษาผลของการตอบสนองของสัตว์ทดลองต่อสารพิษในช่วงเกือบจะไม่มีอาการตอบสนอง (asymptotic) ตามระยะเวลาทดลองที่เพิ่มขึ้น

1.3 ชีววิเคราะห์ในช่วงเวลายาวนาน

ชีววิเคราะห์ในช่วงเวลายาวนาน (Long-term or complete life cycle bioassay) เป็นการทดลองเพื่อศึกษาสารพิษต่อสัตว์ทดลองตลอดช่วงชีวิต เช่น จากไข่จนเป็นตัวเต็มวัย และออกไข่มาในรุ่นต่อมา หรือในสัตว์ที่มีวงชีวิตสั้น เช่น ไรน้ำแดง ก็จะศึกษาตลอดจนช่วงชีวิตในหลาย ๆ รุ่น เพื่อหาระดับความเข้มข้นสูงสุดที่จะไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้นในสัตว์ทดลอง โดยจะศึกษาในเรื่องการสืบพันธุ์ การเจริญเติบโต การออกไข่ การฟักไข่ การมีชีวิตรอดของตัวอ่อน รวมทั้งพฤติกรรมและการสะสมสารมลพิษในร่างกาย ซึ่งในการศึกษาในช่วงระยะเวลายาวนานนั้นจะต้อง

นำเอาปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมาพิจารณาด้วย เพื่อควบคุมการทดลองให้มีสภาพใกล้เคียงธรรมชาติให้มากที่สุด เพราะปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิในแต่ละฤดูกาล จะมีผลอย่างมากในการผสมพันธุ์ วางไข่และการฟักเป็นตัวของสัตว์ทดลองหลายชนิด และต้องควบคุมความเข้มข้นของสารพิษที่ใช้ทดลอง ให้มีการเปลี่ยนแปลงได้ไม่เกินร้อยละ 10-15 ไม่ว่าจะเกิดจากการตกตะกอน หรือเหตุอื่นใดก็ตาม

2. ใช้ความแตกต่างของการเกิดพิษเป็นเกณฑ์

2.1 การทดสอบสารพิษแบบเฉียบพลัน

การทดสอบสารพิษแบบเฉียบพลัน (Acute toxicity test) เป็นการทดสอบเพื่อตรวจวัดผลหรืออาการที่สัตว์ทดลองตอบสนองสารพิษ ภายหลังจากได้รับสารพิษปริมาณมากเพียงครั้งเดียวหรือหลายครั้งในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 24-96 ชั่วโมง โดยทั่วไปมักจะแสดงความเข้มข้นด้วยสัญลักษณ์ “ LC_{50} ” (Median lethal concentration) ซึ่งหมายถึง ปริมาณหรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารพิษที่ทำให้ประชากรสัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 ซึ่งสารเคมีต่าง ๆ ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ต้องทำการทดสอบเพื่อหาค่าดังกล่าวก่อนที่จะนำไปผลิตหรือจำหน่าย

2.2 การทดสอบสารพิษก่อนเกิดอาการเรื้อรัง

การทดสอบสารพิษแบบเรื้อรัง (Chronic toxicity test) เป็นการทดสอบสารพิษเพื่อตรวจวัดการตอบสนองในสัตว์ทดลอง หลังจากได้รับสารพิษในขนาดความเข้มข้นต่ำ ๆ เป็นเวลานาน ๆ โดยปกติจะใช้ศึกษาความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นกับระบบต่างๆของสัตว์ทดลอง เช่น การทำให้เกิดความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ ทำให้สัตว์ทดลองให้ลูกที่มีรูปร่างผิดปกติ หรือกระตุ้นให้เกิดมะเร็งขึ้นในสัตว์ทดลอง ดังนั้น การตอบสนองสารพิษแบบเรื้อรัง จึงเป็นการศึกษาทดลองที่มุ่งเน้นถึงความเป็นพิษของสารพิษ ว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutagenicity) หรือว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดความวิรูป (Teratogenicity)

3. แบ่งตามวิธีการควบคุมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.1 ชีววิเคราะห์แบบไม่เปลี่ยนน้ำ

ชีววิเคราะห์แบบไม่เปลี่ยนน้ำ (static bioassay) เป็นวิธีทางชีววิเคราะห์ที่ใช้หาปริมาณสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองแสดงอาการตอบสนองได้ง่ายที่สุด มักใช้หาค่า LC_{50} และ FC_{50} (Median effect concentration) ในสัตว์ทดลองที่มีขนาดเล็กและวงชีวิตไม่ยาวนาน โดยตลอดช่วงเวลาที่ใช้ทดลองไม่มีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายที่ใช้ทดลองเลย ซึ่งวิธีการนี้มีข้อดีข้อเสียดังนี้

ข้อดี

1. สามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป
2. ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก
3. ปริมาณสารละลายหรือสารพิษที่นำมาใช้ทดลองไม่มากนัก

4. วิธีการและอุปกรณ์ที่ใช้ไม่มีความซับซ้อนยุ่งยาก

ข้อเสีย

1. ระดับความเข้มข้นของสารพิษ ในการทดลองอาจเปลี่ยนแปลงได้ เช่น สารเคมีอาจถูกย่อยสลายโดยปัจจัยอื่นหรือสารเคมีอาจถูกดูดซับโดยผิวของภาชนะที่ทำการทดลอง

2. มีการสะสมของสารพิษต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์ทดลองและแบคทีเรียต่างๆ

3. ปริมาณออกซิเจนในสารละลายที่ใช้ทดลองอาจลดน้อยลง เนื่องจากสัตว์ทดลองใช้ไปและถูกใช้ไปในกระบวนการทางชีวเคมีของแบคทีเรียต่างๆ

3.2 ชีวิตวิเคราะห์แบบน้ำไหล

ชีวิตวิเคราะห์แบบนี้ เป็นการทดลองที่มีการหมุนเวียนสารละลายที่ใช้ทดลองตลอดเวลา หรือเป็นช่วงเวลาที่คงที่ โดยไม่ต้องเคลื่อนย้ายสัตว์ทดลอง ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียดังนี้

ข้อดี

1. เป็นวิธีการที่ดีและเป็นระบบที่ถูกประยุกต์ให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงที่สุด
2. สามารถควบคุมระดับความเข้มข้นของสารพิษในสารละลายที่ใช้ทดลอง ได้

ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง

3. ไม่มีการสะสมของเสียต่างๆ จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์ทดลอง

4. ควบคุมปริมาณออกซิเจน ที่สัตว์ทดลองต้องการใช้ได้คงที่

5. สามารถทำการทดลองได้เป็นระยะเวลานาน ตลอดวงจรชีวิตของสัตว์ทดลองใช้

เช่น ปลา กุ้ง เป็นต้น

ข้อเสีย

1. ต้องการอุปกรณ์และเครื่องมือที่ซับซ้อน ยุ่งยาก และใช้เทคนิคสูง

2. มีราคาแพง

3. ต้องใช้สารละลายที่ใช้ทดลองในปริมาณมาก

3.3 ชีวิตวิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเปลี่ยนน้ำ

ชีวิตวิเคราะห์แบบน้ำนิ่งเปลี่ยนน้ำ (Static with renewal bioassay) เป็นการทดลองที่มีการเปลี่ยนถ่ายสัตว์ทดลองไปสู่ภาชนะที่มีสารละลายใหม่ หรือมีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายใหม่โดยไซฟอน (siphon) สารละลายเก่าออก แล้วเปลี่ยนสารละลายใหม่แทนโดยไม่มีการเคลื่อนย้ายสัตว์ทดลองไปภาชนะใหม่ ซึ่งมีข้อดีและข้อเสีย ดังนี้

ข้อดี

1. ทำได้ง่ายและสะดวก ไม่ต้องใช้เทคนิคมากนัก

2. มีค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก

3. ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการทดลองไม่มากนัก และควบคุมความเข้มข้นของสารละลายได้คงที่

4. เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน จึงไม่ต้องการเครื่องมือและอุปกรณ์ไม่มากนัก

ข้อเสีย

1. ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายใหม่ตามช่วงเวลา

2. ขณะทำการเปลี่ยนสารละลาย อาจทำให้สัตว์ทดลองเครียดได้

อธิบายศัพท์

ชีววิเคราะห์ (Bioassay) หมายถึง เทคนิคอย่างหนึ่งในการศึกษาทดลองโดยใช้สิ่งมีชีวิตเป็นตัวทดสอบกับระดับความเข้มข้นของสาร แล้วสังเกตผลกระทบที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตนั้น จากนั้นนำมาแปลความหมายเทียบกับตัวมาตรฐานหรือตัวควบคุม โดยใช้สถิติช่วยในการวางแผนการทดลอง การวิเคราะห์ข้อมูล และการตัดสินใจที่ได้จากการทดลอง

พิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) หมายถึง ผลกระทบของสารพิษ ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย หลังจากได้รับสารพิษครั้งเดียวหรือหลายครั้งในระยะเวลาอันสั้น โดยปกติภายใน 96 ชั่วโมง

พิษรองเฉียบพลัน (Sublethal toxicity) ซึ่งหมายถึง ผลกระทบของสารพิษซึ่งระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายในระหว่างการทดลองหาค่าพิษเฉียบพลันหรือตายทันทีในระยะเวลาอันสั้น แต่อาจก่อให้เกิดผลกระทบอันสั้น แต่อาจก่อให้เกิดผลกระทบในด้านต่าง ๆ เช่น รูปร่างลักษณะ การสืบพันธุ์ การเจริญเติบโต และจำนวนประชากรในระยะเวลา

Median lethal concentration (LC_{50}) คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้ประชากรสัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 มักใช้กับสัตว์น้ำ เพราะไม่ได้รับสารพิษโดยตรง แต่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารพิษอยู่ในความเข้มข้นที่สามารถทำให้ประชากรสัตว์ทดลองนั้นตาย

Effective concentration (EC) คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้ประชากรสัตว์ทดลองแสดงผลกระทบออกมาในลักษณะที่เป็นการตอบสนองที่เฉพาะเจาะจง เช่น เสียการทรงตัว เป็นอัมพาต เป็นต้น ซึ่งเมื่อมีการใช้ EC ต้องยังลงไปว่าต้องการศึกษาอะไร

Median tolerance limit (Tlm) คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้ประชากรสัตว์ทดลองมีชีวิตอยู่ได้ร้อยละ 50 สำหรับการทดสอบเกี่ยวกับ lethality TL_{50} ก็จะมี ความหมายเช่นเดียวกับ LC_{50} แต่ TLm_{50} จะเท่ากับ LC_{50}

Safe concentration (SC) คือ ระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารพิษที่ไม่แสดงผลกระทบให้ปรากฏหลังจากสัตว์ทดลองได้รับสารพิษมานานกว่า 1 รุ่น โดย SC จะกำหนดให้เป็นตัวตัดสินขั้นพื้นฐานสำหรับเพื่อหามาตรฐานคุณภาพน้ำสำหรับสารพิษในแหล่งน้ำนั้น

Maximum allowable toxicity concentration (MATC) หมายถึง ระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารพิษที่ยอมรับได้ ซึ่งปรากฏอยู่ในน้ำ โดยไม่ปรากฏว่ามีอันตรายที่มีนัยสำคัญต่อการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ของน้ำ

Application factor (AF) คืออัตราส่วนระหว่าง MATC และ incipient LC_{50} ใช้สำหรับทำนายความปลอดภัยจากค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน และใช้ในการควบคุมปริมาณสารพิษชนิดต่างๆ ในแหล่งน้ำธรรมชาติ

No observable adverse effect level (NOAEL) คือ ระดับความเข้มข้นของสารพิษซึ่งสัตว์ทดลองสามารถมีชีวิตอยู่ได้ตลอด โดยไม่สามารถสังเกตผลกระทบที่เกิดขึ้น

Acute chronic ratio (ACR) คืออัตราส่วนระหว่าง 96-hr LC_{50} กับ NOAEL ใช้สำหรับทำนายระดับความเข้มข้น ซึ่งสัตว์ทดลองสามารถทนอยู่ได้โดยไม่สามารถสังเกตผลกระทบที่เกิดขึ้นในการทดลองพิษเรื้อรัง