บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 ริ้นน้ำจืด (*Chironomus* sp.) ริ้นน้ำจืดที่ใช้ในการทดลองได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จากนั้นมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้อง โดยเลี้ยงในตู้ปลาขนาด 15x30x20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดด้วยผ้าขาวบางและติดตั้งเครื่องให้อากาศ (Oxygen pump) เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำ และวัดคุณภาพน้ำด้วยชุดเครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ เพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำให้ได้ระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตัวหนอนริ้นน้ำจืด จากนั้นรอจนกระทั่งตัวหนอนริ้นน้ำจืดเจริญเป็นตัวเต็มวัย ผสมพันธุ์แล้ววางไข่ จนได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์

3.1.1.2 ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ขนาดความยาวลำตัว 3-5 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.4-0.5 กรัม จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น กรมประมง ก่อนทำการทดลองนำลูกปลานิลมาพักเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 ซม. สูง 50 เซนติเมตร และให้อากาศเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ปลานิลปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทุกวัน ๆละ 1 ครั้ง งดให้อาหารปลานิลก่อนการทดลอง 24 ชั่วโมง เป็นอย่างน้อย

3.1.2 น้ำที่ใช้ในการทดลอง

น้ำที่ใช้ในการทดลองได้มาจากการนำน้ำประปามาพักในถังพลาสติกขนาด 150 ลิตร พร้อมให้อากาศตลอดเวลาด้วยเครื่องให้อากาศทิ้งไว้อย่างน้อย 7 วัน เพื่อลดปริมาณคลอรีนจากน้ำ โดยก่อนนำน้ำไปใช้ในการทดลองได้วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) การละลายของออกซิเจน (DO) อุณหภูมิของน้ำ ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำยี่ห้อ CONSORT รุ่น C535 (APHA, 1995) และทำการวัดปริมาณสารหนูและปรอทโดยใช้เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชั่น สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Absorbtion Spectrophotometer, AAS)

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 โซเดียมอาร์ซีไนท์ 99.0% ($NaAsO_2$) ผลิตโดยบริษัท Fluka Chemie GmbH, Switzerland.

3.1.3.2 เมอร์คิวริกคลอไรด์ 99.5% ($HgCl_2$) ผลิตโดยบริษัท VWR International Ltd., Switzerland.

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การทดสอบพิษเฉียบพลัน

3.2.1.1 การทดสอบความเป็นพิษของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ตัวหนอนริ้นน้ำจืดวัย1 ถึง วัย 4 ตายร้อยละ 50

หาความเป็นพิษของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ตัวหนอนริ้นน้ำจืดวัย1 ถึง วัย 4 ตายร้อยละ 50 ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (LC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง) โดยวิธีวิเคราะห์ในน้ำนิ่ง (static bioasay) ที่อุณหภูมิห้อง ตามวิธีของ Jeyasingham & Ling (2000) ทดลองในถ้วยพลาสติกขนาด 10 ลิตร แบ่งตัวหนอนริ้นน้ำจืดเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แล้วดำเนินการทดลองดังนี้

การทดลองขั้นต้น เป็นการหาระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ตัวหนอนริ้นน้ำจืดตายร้อยละ 0 ถึง 100 ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง โดยเตรียมสารละลายทั้งสองชนิด จำนวน 5 ระดับความเข้มข้นและ 1 ชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นใหม่ จนได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองขั้นละเอียด เป็นการหาระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ตัวหนอนริ้นน้ำจืดตายร้อยละ 50 ในช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยนำความเข้มข้น ซึ่งได้จากการนำผลการทดลองขั้นต้นมาวิเคราะห์ด้วย probit analysis ในโปรแกรม spss ซึ่งได้ความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักทั้งสองชนิดต่อตัวหนอนแต่ละวัยดังต่อไปนี้ โดยระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์ต่อตัวหนอนวัยที่1 อยู่ในช่วง 5 ถึง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวหนอนวัยที่ 2 อยู่ในช่วง 10 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวหนอนวัยที่ 3และวัยที่ 4 อยู่ในช่วง 20 ถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับความเข้มข้นของเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อตัวหนอนวัยที่1,2 และ3 อยู่ในช่วง 2 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวหนอนวัยที่ 4 อยู่ในช่วง 5 ถึง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้น้ำประปาพักเป็นตัวควบคุม จากนั้นนำตัวหนอนริ้นน้ำจืดใส่ในถ้วยพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ จำนวนถ้วยละ 5 มิลลิลิตร โดยใส่ตัวหนอนริ้นน้ำจืด ถ้วยละ 1 ตัว จำนวนความเข้มข้นละ 10 ถ้วย 4 ซ้ำ บันทึกผลหลังจากได้รับสาร 24 และ 48 ชั่วโมง

3.2.1.2 การทดสอบความเป็นพิษของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ปลานิลตายร้อยละ 50

หาความเป็นพิษเฉียบพลันของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ลูกปลานิลตายร้อยละ 50 ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ในน้ำนิ่ง (static bioassy) ตามวิธีของ U.S.EPA (1991) ทดลองในขวดพลาสติกความจุ 2 ลิตร แบ่งลูกปลานิลออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แล้วดำเนินการทดลองดังนี้

การทดลองขั้นต้น เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ในช่วงกว้าง คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายทั้งหมด และความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย เตรียมสารละลายโลหะหนักความเข้มข้นข้นต่างๆในน้ำปริมาตร 1.5 ลิตร โดยกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์เป็น 5 ระดับ คือ 1, 100, 500, 1000 และ 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1, 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมเลี้ยงปลานิลในน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น และใช้ลูกปลานิลจำนวนซ้ำละ 10 ตัวและนับจำนวนปลาที่ตายภายในเวลา 24 และ48 ชั่วโมง

การทดลองขั้นละเอียด นำผลความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ได้จากการทดลองขั้นต้น ซึ่งความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์อยู่ในช่วง 0 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเมอร์คิวริกคลอไรด์อยู่ในช่วง 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำการทดสอบเพื่อใช้กำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ให้ละเอียดยิ่งขึ้น คือ 0, 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น และใช้ปลาซ้ำละ 10 ตัว นับจำนวนลูกปลาตายที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

วัดค่าคุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), การละลายของออกซิเจน (DO) และอุณหภูมิของน้ำด้วยชุดเครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ และสังเกตพฤติกรรมการว่ายน้ำของปลานิล

3.2.1.3 การศึกษาผลของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ปลานิลตายร้อยละ 50 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกและตับปลานิล

นำค่าความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ปลานิลตายร้อยละ 50 ที่เวลา 48 ชั่วโมง มาทดสอบกับปลานิล โดยเปรียบเทียบกับปลานิลกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในน้ำประปา การทดลองแต่ละกลุ่ม ทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว สุ่มจับตัวอย่างปลานิลจากการทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ๆละ 8 ตัว ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยทำให้ปลานิลสลบด้วยการนำไปแช่ในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นเปิดช่องเหงือกและช่องท้องของลูกปลานิลให้กว้าง เพื่อให้น้ำยา fixative ซึมเข้าสู่ร่างกายปลานิล ได้เร็ว และรักษาสภาพ

ตัวอย่างปลาทันทีในน้ำยา 10% buffer neutral formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง มาตัดเหงือกและตับ ขนาด 0.5 เซนติเมตร มาทำสไลด์ถาวรด้วยกรรมวิธีพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อหนา 7 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง rotary microtome ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Haematoxulin และ erosin (H&E) (Humason, 1979) เพื่อดูการย้อมติดสี แล้วส่องดูเนื้อเยื่อปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา บันทึกลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเหงือกและตับ

3.2.2 การทดสอบพิษรองเฉียบพลัน

3.2.2.1 การทดสอบพิษรองเฉียบพลันของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อริ้นน้ำจืด

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาผลของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ตัวหนอนริ้นน้ำจืดตาย ซึ่งเป็นการทดสอบต่อเนื่องมาจากการทดสอบในข้อ 2.1.1 โดยนำค่าความเป็นพิษเฉียบพลันในรูป LC_{10} ของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อตัวหนอนริ้นน้ำจืดวัยที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 48 ชั่วโมง มากำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของตัวหนอนริ้นน้ำจืด ซึ่งระดับความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์ที่ใช้ในการทดสอบพิษรองเฉียบพลัน คือ 0, 3, 6 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับความเข้มข้นของเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ใช้ในการทดสอบพิษรองเฉียบพลัน คือ 0, 0.3, 0.6 และ 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดสอบโดยนำไข่ริ้นน้ำจืดที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ มาแยกเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ปิดด้วยผ้าขาวบาง โดยเลี้ยงในอุณหภูมิห้อง ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของริ้นน้ำจืดตั้งแต่ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย โดยวัดขนาดความกว้างและความยาวของไข่ และนับจำนวนเซลล์ไข่ในแต่ละกลุ่มไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่มี ocular micrometer ที่กำลังขยาย 10 เท่า โดย 1 ช่องของ ocular micrometer เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร จากนั้นรอจนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัวหนอนวัยที่ 1 เติมโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ ให้ได้ 400 มิลลิลิตรในทุกสัปดาห์ และวัดค่าคุณภาพน้ำ ได้แก่ pH, การละลายของออกซิเจน และอุณหภูมิของน้ำด้วยชุดเครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำเป็นประจำทุกวัน ให้อาหารปลา 0.5 กรัม ต่อสัปดาห์ และใส่ทรายละเอียดเพื่อให้ตัวหนอนใช้สำหรับสร้างปลอกหุ้มลำตัว วัดการเจริญเติบโตของหนอนทุกวัย โดยวัดขนาดความยาวลำตัวของตัวหนอนทุกวัน วันละ 10 ตัวต่อตำรับการทดลอง ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่มี ocular micrometer ที่กำลังขยาย 30 เท่า โดย 1 ช่องของ ocular micrometer เท่ากับ 0.033 มิลลิเมตร ซึ่งตัวหนอนที่วัดแล้วถูกปล่อยกลับคืนสู่ที่เดิม เพื่อให้ตัวหนอนเจริญเติบโตเป็นวัยที่ 2 3 และ 4 หลังจากเปลี่ยนวัยแล้ว เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ได้จำนวนตัวหนอนที่มากตามต้องการ ตัวหนอนในแต่ละวัยที่เก็บไว้จำนวน 30 ตัว เพื่อนำไปใช้หาน้ำหนักแห้งของตัวหนอน โดยนำไปอบใน hot air oven ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การทดสอบพิษรองเฉียบพลันของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อปลานิล

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาผลของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ปลานิลตาย โดยนำค่าความเป็นพิษในรูป LC_{10} ของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อตัวหนอนริ้นน้ำจืดวัยที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 48 ชั่วโมง มากำหนดความเข้มข้นในการทดสอบพิษรองเฉียบพลันในครั้งนี้ ก่อนเริ่มต้นการทดลองวัดความยาวลำตัวและชั่งน้ำหนักตัวของปลานิล นำปลานิลที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ มาแยกเลี้ยงในตู้ปลาขนาด 15x30x20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่น้ำปริมาตร 6 ลิตร ทดสอบทางชีววิทยาในน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำ (Static with renewal bioassay) โดยเปลี่ยนถ่ายใหม่ทุก 3 วัน (Sprague, 1969) เลี้ยงในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว ให้อาหารปลาต่างกันในแต่ละตำรับการทดลอง วันละ 1 มื้อ เวลา 16.00 น. โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

การทดสอบพิษรองเฉียบพลันของโซเดียมอาร์ซีไนท์ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ปลานิลตาย ซึ่งนำค่าความเข้มข้นที่ได้จากค่าความเป็นพิษในรูป LC_{10} ของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อตัวหนอนริ้นน้ำจืดวัยที่ 1 มาผสมกับอาหารปลาและริ้นน้ำจืด ซึ่งมีตำรับการทดลอง คือ

T_1 = อาหารปลา

T_2 = อาหารปลาคลุกกับโซเดียมอาร์ซีไนท์ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

T_3 = ริ้นน้ำจืด

T_4 = ริ้นน้ำจืดคลุกกับโซเดียมอาร์ซีไนท์ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดสอบพิษรองเฉียบพลันของเมอร์คิวริกคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ปลานิลตาย มีตำรับการทดลอง คือ

T_5 = อาหารปลา

T_6 = อาหารปลาคลุกกับเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

T_7 = ริ้นน้ำจืด

T_8 = ริ้นน้ำจืดคลุกกับเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

วัดค่าคุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), การละลายของออกซิเจน (DO) และอุณหภูมิของน้ำด้วยชุดเครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพน้ำเป็นประจำทุกวัน บันทึกการเจริญเติบโตของปลานิล โดยทำการวัดความยาวลำตัวและน้ำหนักสดของปลานิล สังเกตพฤติกรรมการว่ายน้ำของปลานิลในทุก ๆวัน หลังจากสิ้นสุดการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลในทุกตำรับการทดลอง ซ้ำละ 3 ตัว เพื่อนำปลานิลมารักษาสภาพใน 10% buffer neutral formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วนำเนื้อเยื่อเหงือกและตับมาทำสไลด์ถาวรด้วยกรรมวิธีพาราฟิน ดังข้อ 3.2.1.3

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 หาความเข้มข้นของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ที่ทำให้ตัวหนอนริ้นน้ำจืดและปลานิลตาย ร้อยละ 50 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ Probit analysis ด้วยโปรแกรม SPSS-X 11.5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ (Finney, 1971)

3.3.2 การทดสอบพิษรองเฉียบพลันของโซเดียมอาร์ซีไนท์และเมอร์คิวริกคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของริ้นน้ำจืดและปลานิล โดยเปรียบเทียบขนาดความยาวลำตัว ระยะเวลาในการเจริญเติบโต น้ำหนังแห้งของตัวหนอน จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ น้ำหนักสดของปลานิล ค่าคุณภาพน้ำ เป็นต้น วิเคราะห์ผลจาก ANOVA โดยใช้โปรแกรม SAS

3.4 สถานที่ปฏิบัติการ

3.4.1 ห้องปฏิบัติการพิษนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อม หมวดดินและปุ๋ย ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.4.2 ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.4.3 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.4.4 สถาบัน National Research Centre for Environmental Toxicology, The University of Queensland ประเทศออสเตรเลีย

3.5 ระยะเวลาในการปฏิบัติการ

เริ่มการศึกษาตั้งแต่เดือนมกราคม 2548 และสิ้นสุดในเดือนพฤษภาคม 2549