บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์

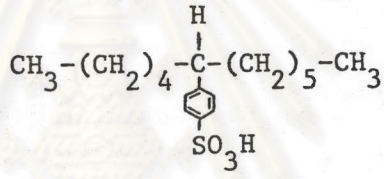
ก. สารเคมี

1. สารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิก ได้รับจาก ห้างหุ้นส่วนจำกัด แกรนด์ เคมีเคิล

ชื่อสามัญ Linear dodecyl benzene sulfonic acid (LAS)

ชื่อทางการค้า NANSA 1853

สูตรโครงสร้าง



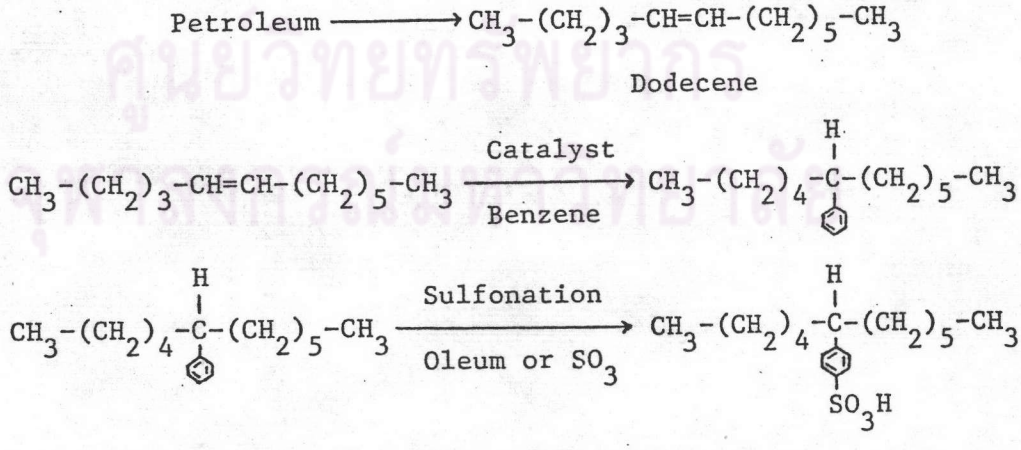
สูตรเอ็มไพริกัล $C_{18}H_{30}O_3S$

น้ำหนักโมเลกุล 326

สถานะทางฟิสิกส์ เป็นของเหลว ค่อนข้างเหนียว มีสีน้ำตาล

Active content 96±1%

การเตรียม



Linear dodecyl benzene sulfonic acid (LAS)

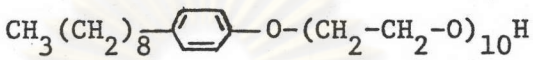
การนำมาใช้ประโยชน์ ใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการผลิตผงซักฟอกและ liquid detergent นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารซักล้างก่อนและหลังพิมพ์ ย้อมและฟอกในอุตสาหกรรมเส้นใยและสิ่งทอ

2. สารลดแรงตึงผิวประเภทนอนไอออนิก ได้รับจาก ห้างหุ้นส่วนจำกัด แกรนด์ เคมีเคิล

ชื่อสามัญ Nonyl phenol ethoxylate หรือ Polyoxyethylene nonylphenol (APE)

ชื่อทางการค้า Berol 09

สูตรโครงสร้าง



สูตรเอ็มไพริกัล $C_{35}H_{64}O_{11}$

น้ำหนักโมเลกุล 660

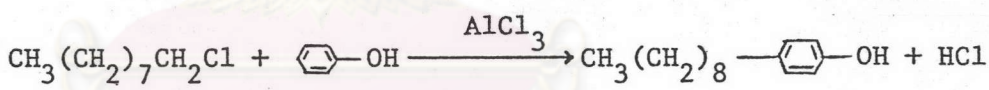
สถานะทางฟิสิกส์ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี

Active content 100%

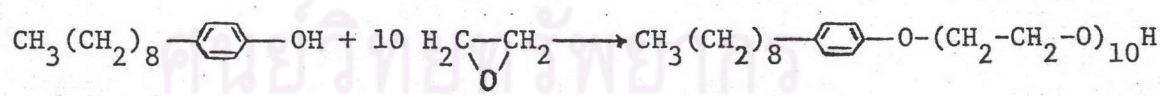
การละลาย สามารถได้ดีในน้ำ,ethanol,xylene และ trichloroethylene

การเตรียม

Nonane Chlorine Nonyl chloride



Phenol Nonyl phenol



Ethylene oxide Nonyl phenol ethoxylate (APE)

การนำมาใช้ประโยชน์ ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิต liquid detergent และนิยมใช้เป็นสารซักล้างในอุตสาหกรรมกระดาษและเส้นใย

3. สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ โดยใช้ชุดวิเคราะห์น้ำของบริษัท Hach

3.1 Man Ver II hardness reagent

3.2 Titra Ver hardness tritrant

3.3 Buffer solution hardness

3.4 Phenolpthalein indicator powder

3.5 Brom Cresol Methyl Red indicator powder

3.6 Sulfuric acid standard solution

3.7 Dissolved oxygen I reagent

3.8 Dissolved oxygen II reagent

3.9 Dissolved oxygen III reagent

3.10 P.A.O. tritrant

ข. สัตว์ทดลอง

ไรแดง (Moina macrocopa.Straus)

ค. วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องให้อากาศ (aerator) พร้อมสายพลาสติกและ air stone
2. บีกเกอร์ขนาด 50 ml., 250 ml., 500 ml. และ 1,000 ml.
3. กระบอกตวงขนาด 10 ml. และ 100 ml.
4. ปิเปตขนาด 1 ml.,5 ml. และ 10 ml.
5. volumetric flask ขนาด 500 ml. และ 1,000 ml.
6. อาหารปลาสำเร็จชนิดเม็ด
7. ยีสต์
8. ถังไฟเบอร์
9. หลอดหยด
10. เทอร์โมมิเตอร์
11. เครื่องชั่งชนิดหยาบ
12. ถาดอลูมิเนียม
13. แผ่นสไลด์
14. กล้องจุลทรรศน์
15. เข็มเขี่ย
16. แท่งแก้ว
17. ช้อนตักสาร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. กระชอน

19. ขวดน้ำกลั่น

20. กระดาษสติกเกอร์

21. ผ้าขาวบาง

22. เครื่องปั่นไฟฟ้า

23. ชุดวิเคราะห์น้ำของ บริษัท Hach

24. pH meter

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมการทดลอง มีดังนี้

3.2.1 การเลี้ยงไรแดงเพื่อให้เคยชินกับสภาพห้องปฏิบัติการ (acclimatization)

นำไรแดงมาคัดเลือกในห้องปฏิบัติการ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเลือกไรแดงเพศเมียที่สมบูรณ์และกำลังมีไข่จำนวน 50 ตัว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml. ที่เตรียมอาหารและน้ำ สำหรับเลี้ยงไรแดงไว้เรียบร้อยแล้ว ตั้งไว้ในที่ ๆ มีแสงสว่าง ใช้ผ้าขาวบางคลุมบีกเกอร์ด้านบน เพื่อป้องกันฝุ่นละอองปลิวลงไป ทำให้น้ำสกปรกและป้องกันแมลงหรือสัตว์อื่นๆ มารบกวน

3.2.2 การเตรียมน้ำและอาหารไว้เพื่อเลี้ยงไรแดงและการทดลอง

การเตรียมน้ำสำหรับทดลอง ใช้น้ำประปามาพักในถังไฟเบอร์และเติมอากาศโดย aerator ทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วัน เพื่อให้ปริมาณคลอรีนที่ปนอยู่ในน้ำลดลง การเตรียมอาหารสำหรับไรแดง ทำได้โดยชั่งอาหารปลาสำเร็จชนิดเม็ด 12 กรัม และ ยีสต์ 3 กรัมใส่ลงในเครื่องปั่นไฟฟ้า เติมน้ำ 400 ml. แล้วเปิดเครื่องปั่นด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนผสมที่ได้ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 ml. เติมน้ำลงไปอีก 600 ml. คนส่วนผสมด้วยแท่งแก้วให้เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เทส่วนใสลงในบีกเกอร์ใหม่ นำมาเป็นอาหารสำหรับไรแดง โดยเจือจางในอัตราส่วน อาหารต่อน้ำ 1 : 20 เมื่อนำมาเลี้ยงไรแดง ต้องเปลี่ยนอาหารและทำความสะอาดภาชนะที่ใช้เลี้ยงทุก ๆ สัปดาห์ (ASTM,1985)

3.2.3 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวสำหรับการทดลอง

ใช้สารลดแรงตึงผิวมาเตรียมเป็น stock solution ที่มีความเข้มข้น

1,000 ppm. โดยปิเปตสารลดแรงตึงผิว แต่ละประเภทมาอย่างละ 1 ml. ใส่ใน volumetric flask แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml. เขย่าให้ละลายทั่ว ๆ กัน เวลาทดลองใช้สารละลาย stock solution ที่ทราบความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว แล้วนำไปทำให้เจือจางตามเข้มข้นที่ต้องการ สารละลาย stock solution จะต้องเตรียมใหม่ทุกวันก่อนการทดลอง เพื่อป้องกันการผิดพลาด อันอาจเกิดจากการสลายตัวทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิว

3.3 <u>การทดลองหาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity)</u>

3.3.1 การเตรียมเครื่องมือเพื่อใช้ในการทดลอง

นำบีกเกอร์ขนาด 250 ml. ที่สะอาดมาจัดเรียงในถาดซึ่งเตรียมไว้ โดยจัดเรียงเป็นแถว ๆ ละ 3 ใบ ใช้ความเข้มข้นละ 1 แถว ทำการทดลองครั้งละ 5 ความเข้มข้น รวมกับชุด control อีก 1 ชุด และทำทั้งหมด 3 ซ้ำ (replication) โดยทำการทดลองสารลดแรงตึงผิวแต่ละประเภทีละครั้ง และน้ำที่ใช้เป็นตัวกลางในการทดลองแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ใช้น้ำซึ่งเตรียมไว้โดยตรง ส่วนชุดที่ 2 ใช้น้ำซึ่งเตรียมไว้เช่นกัน แต่เติมอาหารลงไปในอัตราส่วน อาหารต่อน้ำ 1 : 20 นำน้ำมาใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ml. รวมกับส่วนผสมของสารละลายสารลดแรงตึงผิวจาก stock solution ตามอัตราส่วนที่ต้องการจนได้ปริมาตรครบ 100 ml. ปิดป้ายแสดง วันที่ เวลา และความเข้มข้นของสารที่เตรียมไว้ในแต่ละบีกเกอร์ นำไรแดง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาล้างสิ่งสกปรกออกให้หมด แล้วนำไปใส่ในบีกเกอร์ 250 ml. ที่มีน้ำซึ่งได้เตรียมไว้แล้ว 100 ml. เพื่อล้างทำความสะอาดอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือกไรแดงมาใส่ในบีกเกอร์ทดลอง โดยเลือกไรแดงวัยอ่อน อายุต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ซึ่งยังไม่มีไข่ใน brood chamber เลือกตัวที่แข็งแรงและสมบูรณ์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ขยายรูปร่างและอวัยวะภายในประกอบ ใส่ไรแดงลงในบีกเกอร์ละ 10 ตัว จนครบ 18 ใบ เติมน้ำในถาดจนน้ำในถาดเท่ากับระดับของน้ำในบีกเกอร์ที่ทดลอง เพื่อเป็นการควบคุมอุณหภูมิของบีกเกอร์ทดลองให้คงที่ในระหว่างการทดลอง และนำเอาผ้าขาวบางมาคลุมทับไว้ เพื่อป้องกันสิ่งสกปรกและแมลงที่อาจตกลงไปในบีกเกอร์ทดลอง เสร็จแล้วนำไปตั้งไว้ในที่ ๆ มีแสงสว่าง

3.3.2 การทดลอง

การทดลองใช้วิธีชีววิเคราะห์ในน้ำนิ่ง (static bioassay) เพื่อหาค่า LC_{50} ในเวลา 24 ชั่วโมง ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

ก. การทดลองขั้นต้น (preliminary test) เป็นการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นช่วงกว้าง ๆ ของสารลดแรงตึงผิว เพื่อต้องการทราบช่วงความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ไรแดงมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ไรแดงตายทั้งหมดหรือ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จะประมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่จะใช้ในการทดลองจริง โดยคัดเลือกความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทละ 5 ระดับความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ แต่ละความเข้มข้นใช้ไรแดง 10 ตัว สังเกตและบันทึกอัตราการตายภายใน 24 ชั่วโมง

ข. การทดลองขั้นสุดท้าย(full-scales หรือ definitive test) เป็นการทดลองจริง โดยนำข้อมูลจากการทดลองขั้นต้น มาใช้พิจารณาระดับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว เพื่อหาอัตราการตายของไรแดงในแต่ละระดับความเข้มข้น ทำการทดลองตามการทดลองขั้นต้นทุกประการ สังเกตอาการและบันทึกอัตราการตายของไรแดง ภายใน 24 ชั่วโมง คือ 1.5,3,6,9,12,18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ในการทดลองขั้นนี้ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เชื่อถือได้ เกณฑ์ที่ใช้ตัดสินว่าไรแดงตาย คือ การสังเกตด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์ โดยขั้นแรกพิจารณาจากการที่ไรแดงหยุดการเคลื่อนไหวนอนอยู่ที่ก้นบีกเกอร์ ลำตัวมีสีขุ่นและซีด เมื่อใช้เข็มเขี่ยจะไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองและการเคลื่อนไหวใด ๆ จากนั้นขั้นสุดท้ายนำไรแดงไปตรวจอย่างละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกครั้งหนึ่ง(ธนาภรณ์ จิตตปาลพงศ์,2526) ลักษณะที่บ่งว่าไรแดงตาย ได้แก่

1. ไม่มีอวัยวะส่วนใดเคลื่อนไหวเลย ทั้งภายนอกและภายใน
2. กรณีที่ตัวไรแดงยังใสมองเห็นอวัยวะภายใน ดูว่าหัวใจยังเต้นหรือสลายไปแล้ว
3. เริ่มมีแบคทีเรียและโปรโตซัวเข้ามาย่อยสลายร่างกายของไรแดง
4. ตารวม (compound eye) เริ่มสลายตัว

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองขั้นสุดท้าย นำไปคำนวนหา % อัตราการตายจริง โดยใช้ Abbott's formula (ศรีวิไล ผ่องอุดม,2527) เมื่อมีอัตราการตายของไรแดงในกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่าง 5% ถึง 20% คือ

$$\% \text{ mortality} = \frac{\%\text{ตายของกลุ่มทดลอง} - \%\text{ตายของกลุ่มควบคุม}}{100 - \%\text{ตายของกลุ่มควบคุม}} \times 100\%$$

ถ้าอัตราการตายของกลุ่มควบคุมต่ำกว่า 5% ไม่ต้องใช้สูตรนี้ ใช้เปอร์เซ็นต์การตายจริงได้ แต่ถ้าอัตราการตายของกลุ่มควบคุมสูงกว่า 20% ต้องทำการทดลองใหม่ หลังจากได้

% อัตราการตายจริงแล้ว นำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวและ % อัตราการตายจริงของไรแดงใน probit log scale คำนวนหาค่ามัธยฐานของความเป็นพิษหรือ LC_{50} ภายใน 24 ชั่วโมง ของสารลดแรงดึงผิวทั้งสองประเภท โดยวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) รวมทั้ง ช่วงระดับความเชื่อมั่น (confidence intervals) ตลอดจนพิจารณาเกี่ยวกับฟังก์ชั่นความเอียง (slope function) ของเส้นกราฟและเส้นกราฟความเป็นพิษ (toxicity curve) ของสารลดแรงดึงผิว แต่ละประเภทต่อไรแดง

3.4 <u>การทดลองหาความเป็นพิษสะสม (chronic toxicity)</u>

3.4.1 การเตรียมเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมและจัดวางเครื่องมือ ทำเช่นเดียวกับการทดลองหาความเป็นพิษเฉียบพลัน แต่น้ำที่ใช้เป็นตัวกลางในการทดลอง ใช้เฉพาะน้ำที่เตรียมไว้เติมอาหารลงไปในอัตราส่วน อาหารต่อน้ำ 1 : 20 เท่านั้น นำน้ำที่เตรียมได้มาใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml. รวมกับส่วนผสมของสารละลายสารลดแรงดึงผิวจาก stock solution ตามอัตราส่วนที่ต้องการจนได้ปริมาตรครบ 50 ml. ปิดป้ายแสดง วันที่ เวลาและความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิว ที่เตรียมไว้ในแต่ละบีกเกอร์ แล้วนำไรแดง ซึ่งทำการคัดเลือกไว้แล้ว ใส่ลงในบีกเกอร์ละ 1 ตัว จนครบทั้งหมด 18 ใบ เติมน้ำในถาดและนำผ้าขาวบางคลุมไว้ เสร็จแล้วนำไปตั้งไว้ในที่ ๆ มีแสงสว่าง

3.4.2 การทดลอง

การทดลองใช้วิธี renewal static bioassay มีขั้นตอน ดังนี้

คัดเลือกความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิว ในระดับที่ต่ำกว่าพิษเฉียบพลัน ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 5 ระดับความเข้มข้น ทดลองโดยใช้ไรแดง 1 ตัว ในแต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ เมื่อทดลองครบทุก ๆ 24 ชั่วโมง บันทึกและนับจำนวนลูกไรแดงที่เกิดขึ้น แล้วทำการย้ายไรแดงตัวแม่ลงสู่บีกเกอร์ใหม่ ซึ่งมีสารที่เตรียมไว้ระดับความเข้มข้นเท่ากันจนกว่าไรแดงตัวแม่จะตายลง ในการทดลองนี้ จะทำซ้ำ 20 ครั้ง และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลจากการทดลอง ผลของสารลดแรงดึงผิวที่มีต่อการสืบพันธุ์ของไรแดง คำนวนหาค่า MATC คือ ระดับความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิว ที่จะยอมให้มีได้ในแหล่งน้ำโดยไม่เป็นอันตรายต่อไรแดง โดยวิธีของ Biesinger and Christensen (1972) และ

Dunnett's multiple comparison test (Winer,1962)

3.5 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน นำน้ำที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำในระยะก่อนและหลังการทดลอง ส่วนในการศึกษาความเป็นพิษสะสม จะวิเคราะห์คุณภาพน้ำในระยะก่อนการทดลองและทุกครั้ง เมื่อมีการย้ายไรแดงลงสู่บีกเกอร์ใหม่ ทั้งนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำ ที่อาจจะเกิดขึ้นก่อนและหลังจากการใส่สารลดแรงตึงผิว ซึ่งการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ประกอบด้วย

3.5.1 การวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ชุดวิเคราะห์น้ำของ บริษัท Hach

- วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen)
- วิเคราะห์หาความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH)
- วิเคราะห์หาความกระด้างของน้ำ (total hardness)
- วิเคราะห์หาความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity)

3.5.2 การวิเคราะห์ทางฟิสิกส์

- วัดอุณหภูมิของน้ำ (temperature)

สถานที่และระยะเวลาทดลอง

ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2528 ถึง เดือน มิถุนายน 2529

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย