บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

1. ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

1.1 การเตรียมน้ำสำหรับทำการทดลอง

พักน้ำประปาในถังพลาสติกขนาด 150 ลิตร และให้อากาศต่อเนื่องกันเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน เพื่อกำจัดคลอรีนในน้ำ โดยน้ำที่เตรียมนี้จะใช้ในการทดลองทุกขั้นตอน ตั้งแต่การเลี้ยงไรแดง ตลอดจนการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษรองเฉียบพลัน ทำการวิเคราะห์ตัวชี้วัดคุณภาพน้ำต่างๆ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นด่าง และความกระด้างของน้ำทุกครั้งก่อนนำน้ำนี้ไปใช้ในการทดลอง ตามวิธีมาตรฐานของ APHA (1992)

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เพาะเลี้ยงไรแดง (*Moina macrocopa*) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวชนิด Chlorella sp.(น้ำเขียว) เป็นอาหาร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกัน (รายละเอียดการเพาะเลี้ยงไรแดงแสดงในภาคผนวก ก) เมื่อไรแดงโตเต็มวัยแล้ว คัดเลือกไรแดงมาเพาะแยกเดี่ยวในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร เมื่อไรแดงให้ลูกครั้งแรก ทำการคัดเลือกลูกไรแดงที่มีอายุใกล้เคียงกันคือไม่เกิน 24 ชั่วโมง (neonate) นำไปทดลองต่อไป

1.3 การเตรียมภาชนะสำหรับทำการทดลอง

เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง โดยเฉพาะ บีกเกอร์ 150 มิลลิลิตรและหลอดทดลองขนาด 13×100 มิลลิเมตร ทำความสะอาดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ อะซิโตน เพื่อขจัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ที่ดูดซับผิวภาชนะออกไป (ประสงค์ โรจน์เลิศจรรยา, 2531)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

เตรียมสารละลายคลอร์ไพริฟอส (Lorsban 40% W/V) คาร์บาริล (S-85% WP) และอีโธเฟนพร็อกซ์ (Trebon 5% W/V) ชนิด commercial grade ในรูปของสารละลายเบื้องต้น (stock solution) ในตัวทำละลายอะซิโตน โดยให้มีความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 10°C ในขวดสีชา ไม่ให้ถูกแสง นำสารละลายเบื้องต้นมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจือจางด้วยน้ำที่เตรียมไว้เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ดังสมการการเตรียมสารละลายดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

เมื่อ M_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายเบื้องต้น

M_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายสารทดสอบที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายเบื้องต้น

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายสารทดสอบที่ต้องการ

สารละลายของสารทดสอบทั้ง 3 ชนิด จะทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน และจะทำการเตรียมสารละลายเบื้องต้นใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเนื่องจากการสลายตัวของสารทดสอบ

1.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ทดลอง

วิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดสอบพิษเฉียบพลัน และวิเคราะห์คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบพิษรองเฉียบพลันตามวิธีการมาตรฐาน ของ APHA (1992) ดังนี้

วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ	โดยวิธี Azide Modification
วิเคราะห์ความกระด้างของน้ำ	โดยวิธี EDTA Titrimetric
วิเคราะห์ความด่างของน้ำ	โดยวิธี Tritration method
วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ	โดยใช้ pH meter
วัดอุณหภูมิของน้ำ	โดยใช้ เทอร์โมมิเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้

2.1 การทดสอบพิษเฉียบพลัน (acute toxicity test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลง คลอร์ไพริฟอส คาร์บาริล และอีโธเฟนพร็อกซ์ ในสภาพสารละลายเดี่ยว ที่ทำให้ไรแดงตายร้อยละ 50 ของประชากรที่ทำการทดสอบ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน

2.1.1 การทดลองเบื้องต้น (preliminary test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้ไรแดงตายร้อยละ 0 ถึง 100 ในเวลา 48 ชั่วโมง โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบในระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น 1 ชุดควบคุม (dilution water control) และ 1 ชุดควบคุมที่ผสมตัวทำละลายอะซิโตน (acetone solvent control) ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารเคมีกำจัดแมลงที่ใช้ทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างน้อย 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนช่วงความเข้มข้นจนกว่าจะได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 การทดลองขั้นละเอียด (full scale test) เป็นการหาระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้ไรแดงตายร้อยละ 50 ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำช่วงความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ทดสอบ 6 ระดับความเข้มข้น 1 ชุดควบคุม และ 1 ชุดควบคุมที่มีตัวทำละลายอะซิโตน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

สารเคมีกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้น 0.06, 0.072, 0.084, 0.096, 0.108 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อลิตร ต่อไรแดงอายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง

สารเคมีกำจัดแมลงคาร์บาริล ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้น 14, 17, 20, 23, 26 และ 29 ไมโครกรัมต่อลิตร ต่อไรแดงอายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง

สารเคมีกำจัดแมลงอีโธเฟนพร็อกซ์ ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้น 6.0, 7.2, 8.4, 9.6, 10.8 และ 12.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ต่อไรแดงอายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลองทั้งสองขั้นตอนนี้ ใช้วิธีการทดสอบชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) โดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำระหว่างทำการทดลอง ทำการทดลองโดยเติมสารละลายทดสอบในระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมไรแดงอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง (ไม่มีไข่ใน brood chamber) บีกเกอร์ละ 10 ตัว ขณะทำการทดลอง ไม่มีการให้อาหารแก่ไรแดง บันทึกจำนวนไรแดงที่ตายในระยะเวลาต่างๆ คือ 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เกณฑ์การตัดสินว่าไรแดงตาย คือ นอนอยู่ก้นภาชนะและไม่เคลื่อนที่ เมื่อใช้เข็มเขี่ยที่ตัวไรแดงไม่แสดงอาการตอบสนองใดๆ

2.2 การทดสอบพิษรองเฉียบพลัน (sublethal toxicity test) เป็นการศึกษาผลของสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิด ในระดับความเข้มข้นที่คาดว่าไม่ทำให้ไรแดงตาย 3 ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 48-h LC_{50} คือ 1/4, 1/6 และ 1/10 ของ 48-h LC_{50} ของสารทดสอบแต่ละชนิด โดยศึกษาจำนวนครั้งที่ไรแดงทำการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) จำนวนลูกของไรแดงทั้งหมด ขนาดร่างกาย และอายุของไรแดง ตั้งแต่เริ่มทดลองจนกระทั่งตายเป็นระยะเวลา 5 รุ่น ในการทดสอบพิษรองเฉียบพลันจะมีการให้อาหารแก่ไรแดง คือ สาหร่ายสีเขียว (Chlorella sp.) ผสมกับสารละลายทดสอบ โดยให้สาหร่ายสีเขียวในปริมาณที่เท่ากันในทุกหน่วยทดลอง วิธีการทดลองมีดังนี้

2.2.1 เตรียมสารละลายทดสอบผสมกับอาหารเลี้ยงไรแดงในการทดลอง โดยนำสาหร่ายสีเขียวเข้มข้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีความเข้มข้น 2.5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาผสมน้ำในอัตราส่วน 1 : 20 ใช้สำหรับเป็นอาหารของไรแดงในขณะทำการทดลอง

2.2.2 วิธีการทดลอง ใช้หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร เติมสารละลายทดสอบความเข้มข้นต่างๆ และชุดควบคุมที่ผสมอาหารไว้แล้วลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้หลอดหยดสารดูดไรแดงอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง (F_1) จากการเพาะแยกเลี้ยงเดี่ยว โดยเลือกไรแดงแบบสุ่มลงในหลอดๆละ 1 ตัว ทำการทดลองทั้งหมด 20 ซ้ำ ในการทดสอบพิษรองเฉียบพลันนี้ ใช้วิธีทดสอบแบบชีววิเคราะห์น้ำนิ่งเปลี่ยนน้ำ (static renewal bioassay) โดยทำการเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไรแดงตาย เริ่มสังเกตและบันทึกผลการทดลองเมื่อไรแดงตัวแม่ (F_1) ให้ลูกมาครั้งแรก บันทึกจำนวนลูก แล้วนำลูกรุ่นนี้ (F_2) ไปทำการทดลองต่อในสารละลายความเข้มข้นเดิม ส่วนลูกรุ่นต่อมาของ F_1 บันทึกจำนวนแล้วปล่อยทิ้งไป เมื่อแม่รุ่น F_2 ออกลูกมาครั้งแรก นำลูกไรแดงรุ่นนี้

(F_3) ไปทดลองต่อไปจนครบ 5 รุ่น ทำการบันทึกจำนวนลูกไรแดงในแต่ละครั้งของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวนครั้งที่เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ขนาดความยาวลำตัวของแม่ไรแดงหลังจากเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศครั้งแรก และอายุของไรแดงแต่ละตัวตั้งแต่เกิดจนกระทั่งตาย เป็นระยะเวลา 5 รุ่น บันทึกภาพไรแดงในรุ่นที่ 5 โดยใช้กล้อง Olympus model BH 2

ทั้งนี้การวัดขนาดของไรแดง จะวัดในแนวความยาวของลำตัว แสดงดังรูปที่ 3.1

รูปที่ 3.1 ตำแหน่งที่ใช้วัดความยาวของไรแดง

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

หาค่า LC_{50} ในช่วงเวลาต่างๆที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ จากการวิเคราะห์โพรบิท (probit analysis) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป spss for window รวมทั้งสร้างกราฟแสดงความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์แต่ละชนิดต่อไรแดง ส่วนข้อมูลจากการทดสอบพิษรองเฉียบพลันโดยเฉพาะจำนวนลูกเฉลี่ยของไรแดงในรุ่น F_1 นำมาคำนวนหาค่าระดับความเข้มข้นของสารพิษที่ยอมให้มีได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไรแดงอาศัยอยู่โดยไม่เป็นอันตราย (maximum acceptable toxicant concentration, MATC) ตามวิธีการของ Biesinger และ Christensen (1972) รายละเอียดในภาคผนวก ค และวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (ANOVA) ของจำนวนครั้งของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จำนวนลูกของไรแดง ขนาดร่างกายและอายุของไรแดงในรุ่น F1 ถึง F5 เพื่อหาความแตกต่างของสารทดสอบแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี Duncan's multiple range test ตัวอย่างวิธีวิเคราะห์ ANOVA และ วิธี Duncan's multiple range test ในภาคผนวก ง