บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้จับและรวบรวมพันธุ์ปลาซิวหนวดยาว

(1) สวิงปากกว้าง ตัวสวิงทำด้วยอวนตาถี่ชนิดไม่มีปม ขนาดตาอวนกว้าง 5 มิลลิเมตร ถุงถวนลึก มีด้ามถือเพื่อใช้ช้อนหรือจับปลา

(2) ถังน้ำพลาสติกมีหูหิ้วขนาด 20 ลิตร

(3) เครื่องปั๊มอากาศแบตเตอรี่ขนาดเล็ก พร้อมอุปกรณ์ให้อากาศ

(4) ถังบรรจุออกซิเจนบริสุทธิ์ขนาดเล็ก

(5) สวิงช้อนปลาขนาดเล็ก

(6) ถุงพลาสติกขนาด 19x28 นิ้ว และยางรัด

(7) ขันตักน้ำพลาสติก

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยง เพาะพันธุ์ และอนุบาลลูกปลาซิวหนวดยาว

(1) บ่อคอนกรีตขนาด 0.5x3.5x0.8 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 3 บ่อ เพื่อใช้เป็นบ่อเลี้ยงแยกตามเพศปลา และอีกบ่อใช้สำหรับพักน้ำเพื่อใช้ในการทดลอง

(2) ถังไฟเบอร์สี่เหลี่ยมขนาดความจุ 150 ลิตร สำหรับใช้อนุบาลลูกปลา

(3) ตู้กระจกอะควาเรี่ยมขนาดความจุ 40 ลิตร สำหรับใช้เพาะปลา

(4) เครื่องสูบน้ำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางท่อ 1 นิ้ว

(5) ที่ดักไข่ปลา (Breeding trap) รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า กรอบทำด้วยลวดแข็งขึงด้วยอวนตาถี่ชนิดไม่มีปม ขนาดตาอวน 5 มิลลิเมตร วางอยู่ในตู้กระจกเพาะพันธุ์เหนือพื้นตู้กระจกเล็กน้อย ใช้สำหรับให้ไข่ที่แม่ปลาปล่อยออกมาลอดผ่านตกลงไปยังตู้กระจก ป้องกันพ่อแม่ปลากินไข่ของตัวเองภายหลังวางไข่แล้ว

(6) สาหร่ายเทียมทำด้วยเชือกพาลสติก สำหรับให้ปลาวางไข่ติดกับสาหร่ายเทียม

(7) อาหารสำเร็จรูปซึ่งเป็นอาหารเม็ดลอยน้ำ สำหรับใช้เลี้ยงปลา

(8) เครื่องปั๊มอากาศไฟฟ้า พร้อมอุปกรณ์ให้อากาศครบชุด

(9) เครื่องชั่งน้ำหนัก และที่วัดความยาว

(10) แว่นขยาย และกล้องจุลทรรศน์

(11) เครื่องนับ(Counter)

(12) จานแก้ว และเข็มเขี่ยปลายแหลม

(13) หลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร สำหรับใช้ดูดไข่และลูกปลาวัยอ่อนมาศึกษา

(14) สายยาง สำหรับดูดเศษตะกอนและถ่ายน้ำในบ่อเลี้ยงและถังอนุบาล

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับหาพื้นที่ผิวตัวของปลาทดลอง

(1) เครื่องชั่งละเอียด(Analytical balance)

(2) ไม้โปรแทคเตอร์

(3) สีน้ำและพู่กัน

(4) บีกเกอร์ขนาด 250 ml

(5) กระดาษซับ และแผ่นใส

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมี

(1) โถแก้วทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 นิ้วความจุ 12 ลิตร

(2) เครื่องปั๊มอากาศไฟฟ้า พร้อมอุปกรณ์ให้อากาศครบชุดทุกหน่วยทดลอง

(3) ลูกปลาซิวหนวดยาว อายุตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไป ขนาดความยาว 1.2-3.0 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.02-0.26 กรัม

(4) ลูกปลาตะเพียนขาว อายุตั้งแต่ 4 สัปดาห์ขึ้นไป ขนาดความยาว 1.0-2.8 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.01-0.26 กรัม

(5) ลูกปลาหางนกยูง อายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป ขนาดความยาว 1.2-3.0 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.03-0.34 กรัม

(6) กรัมมอกโซน(Gramoxone) ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ของพาราควอต 199 กรัม/ลิตร

(7) คาร์บาริล(Carbaryl) เกรดวิเคราะห์ 99 เปอร์เซนต์

(8) เพนตาคลอโรฟีนอล(Pentachlorophenol) เกรดวิเคราะห์ 85 เปอร์เซนต์

(9) เครื่องแก้วที่จำเป็นสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต และขวดตวง(Volumetric flask) ขนาดต่างๆ เป็นต้น

3.1.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ทดลอง

(1) เทอร์โมมิเตอร์

(2) เครื่องวัด พีเอช(pH) รุ่น 611 พร้อม Combination electrode 91-02 ของ ORION

(3) เครื่องอุตราไวโอเล็ตสเปคโตรโฟโตมิเตอร์(Ultraviolet spectrophotometer) แบบ Double beam รุ่น 240 ของ SHIMUDZU

(4) ขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดแก้วบีโอดี ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมเครื่องแก้วที่จำเป็นสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ

(5) สารเคมี สารละลายมาตรฐาน อินดิเคเตอร์ สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.1.5 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการคำนวณค่า LC_{50}

(1) ไมโครคอมพิวเตอร์ 8 บิท ที่มีหน่วยความจำอย่างน้อย 48 เคไบท์ และมี 80 คอลัมน์การ์ด(80 column card)

(2) ระบบซีพีเอ็ม(CP/M system) ที่มีโปรแกรม MBASIC.COM.

(3) โปรแกรมวิเคราะห์โปรบิท(Probit analysis) ของ Finney (1964)

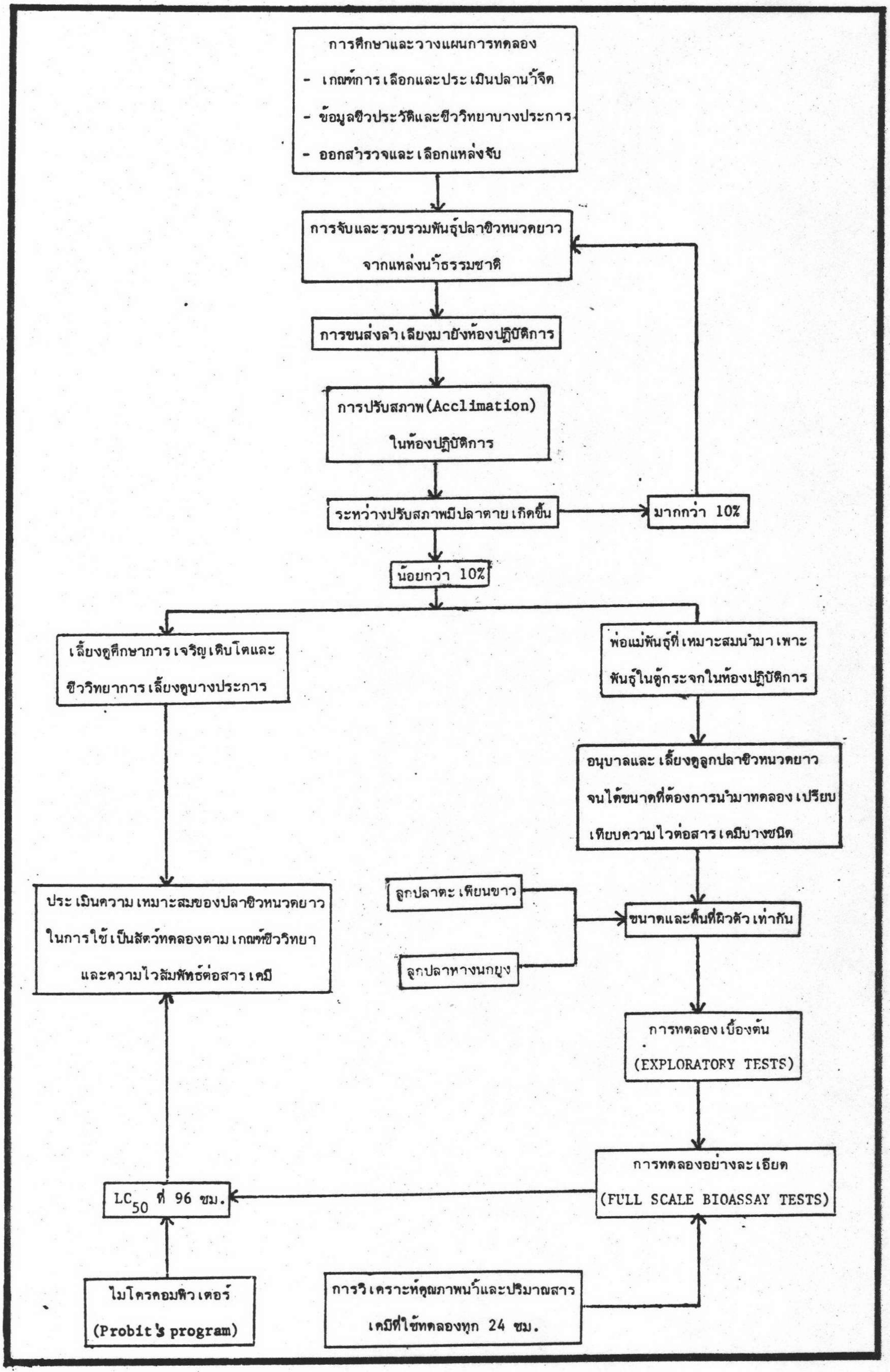
(4) เครื่องขับดิสท์(Disk drive)

(5) เครื่องพิมพ์(Printer) พร้อมกระดาษ

3.2 <u>ขั้นตอนและวิธีการทดลอง</u>

3.2.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นทั่วไปและการวางแผนการทดลอง

ได้แก่การศึกษาและตรวจสอบเอกสาร รายงานวิจัยทั่วๆไป ที่เกี่ยวข้องกับเกณฑ์การเลือกและประเมินปลาน้ำจืด ที่ใช้เป็นสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการวาริชพิษวิทยา ข้อมูลด้านชีวประวัติและชีววิทยาบางประการของปลาซิวหนวดยาว ปลาตะเพียนขาว และปลาหางนกยูง สภาพแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของปลาซิวหนวดยาว รวมทั้งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารพาราควอต คาร์บาริล และเพนตาคลอโรฟีนอลต่อปลา-



ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการวิจัย

น้ำจืด เป็นต้น นอกจากนั้นทำการออกสำรวจพื้นที่ เพื่อเลือกแหล่งจับและรวบรวมพันธุ์ปลาซิว-หนวดยาวจากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยคำนึงถึงสภาพแหล่งที่อยู่อาศัย เครื่องมือที่ใช้จับ วิธีการจับ และการขนส่งลำเลียงมายังห้องปฏิบัติการ

3.2.2 การจับและการรวบรวมพันธุ์ปลาซิวหนวดยาวจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

การพิจารณาเลือกแหล่งจับและรวบรวมพันธุ์ปลาซิวหนวดยาวในครั้งนี้ ได้เลือกบริเวณทางระบายน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงปลาของ บริษัท เอดีเค ฟาร์ม จำกัด ซึ่งตั้งอยู่ติดกับคลองทัพยาว แขวงทัพยาว เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร อยู่ห่างจากกรุงเทพไปทางทิศตะวัน-ออกประมาณ 43 กิโลเมตร บริเวณดังกล่าวและใกล้เคียงไม่มีที่ตั้งของโรงงานอุตสาหกรรม ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเกษตรกรรม แหล่งน้ำธรรมชาติอยู่ในสภาพค่อนข้างดี และมีสภาพทางนิเวศน์วิทยาเหมาะสมที่จะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและแพร่กระจายพันธุ์ของปลาซิวหนวดยาวตามที่เจริญ (2505)รายงานไว้ คลองทัพยาวนี้ไหลออกติดต่อกับแม่น้ำบางปะกง

การจับและรวบรวมพันธุ์ปลาซิวหนวดยาวในครั้งนี้ จะทำการจับและรวบรวมในช่วงเวลาที่ทางฟาร์มระบายน้ำจากบ่อเลี้ยงปลาทิ้ง ซึ่งปลาซิวหนวดยาวจะว่ายและพยายามกระโดดขึ้นไปยังประตูระบายน้ำกันเป็นฝูงๆมากมาย โดยใช้สวิงปากกว้างกวาดไปยังประตูระบายน้ำในขณะที่กำลังระบายน้ำทิ้งอย่างช้าๆ ไม่ให้ปลาซิวหนวดยาวตื่นตกใจ หรืออาจกวาดหรือลากสวิงปากกว้างทวนกระแสน้ำในลำรางระบายน้ำขึ้นไปยังประตูระบายน้ำ วิธีที่จะทำให้ปลาที่จับมีความบอบช้ำน้อยที่สุด โดยพยายามอย่าให้ปลาตื่นตกใจ การจับแต่ละครั้งควรจับแต่น้อยแล้วรีบถ่ายปลาลงถังที่เตรียมไว้ทันที น้ำในถังต้องเป็นน้ำชนิดเดียวกับน้ำบริเวณที่ทำการจับและให้อากาศอย่างพอเพียง ในถังพักควรมีที่ปิดเพื่อป้องกันปลากระโดดออก

ปลาซิวหนวดยาวที่จับได้ ควรพักปลาไว้ในถังพักสักระยะหนึ่ง เพื่อให้ปลาหายจากการตื่นตกใจและบอบช้ำ ระหว่างนั้นหากมีปลาตายต้องรีบนำขึ้นจากถังพักทันที จากนั้นค่อยๆจับปลาถ่ายลงในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ เพื่อขนส่งลำเลียงมายังห้องปฏิบัติการ โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปริมาณปลาในแต่ละถุงไม่เกิน 50-70 ตัว บรรจุน้ำและอัดอากาศในถุงด้วยออกซิเจนให้มีอัตราส่วนระหว่างน้ำกับอากาศเท่ากับ 1:3 โดยปริมาตร (NAS, 1974) แล้วใช้ยางรัดปากถุงให้แน่น

3.2.3 การปรับสภาพและเลี้ยงดูในห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำปลาซิวหนวดยาวที่จับได้มาถึงห้องปฏิบัติการแล้ว ทำการย้ายถุงบรรจุปลาจากรถไปแช่ไว้ในบ่อที่เตรียมไว้ เพื่อทำการปรับอุณหภูมิของน้ำในถุงให้เท่ากับในบ่อก่อนปล่อยลงบ่อ ทั้งนี้เพื่อป้องกันมิให้ปลาช็อคเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกระทันหัน ซึ่งการปรับอุณหภูมิดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที จากนั้นจึงแก้ยางรัดปากถุง เพื่อปล่อยปลาลงบ่อเลี้ยง

น้ำที่ใช้เลี้ยงปลาเป็นน้ำประปาที่ทิ้งไว้จนคลอรีนระเหยไปหมด โดยให้อากาศตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 5-7 วัน และเป็นน้ำประปาที่วิเคราะห์จนทราบคุณภาพที่แน่นอนแล้ว

ในระยะแรกของการปรับสภาพให้ปลาเกิดความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่ของห้องปฏิบัติการนั้น จะทำการเลี้ยงรวมกันโดยไม่แยกเพศ วัดความยาวและชั่งน้ำหนักปลาแต่อย่างใด เพื่อไม่ให้ปลาต้องบอบช้ำมาก บันทึกเฉพาะจำนวนของปลาที่จับได้เท่านั้น

การปรับสภาพของปลาซิวหนวดยาวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติ-การ จะใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ระหว่างนั้นฝึกให้ปลากินอาหารสำเร็จรูป(อาหารเม็ดลอยน้ำ) สังเกตพฤติกรรมของปลาอย่างใกล้ชิด หากพบว่าปลาป่วยหรือเป็นโรคและตายให้รีบนำขึ้นจากบ่อเลี้ยงทันทีที่สังเกตพบ และบันทึกจำนวนของปลาที่ป่วยหรือเป็นโรคและตายเป็นประจำทุกวัน ภายใน 2 สัปดาห์หากมีปลาป่วยหรือเป็นโรคและตายมากกว่า 10 เปอร์เซนต์ของจำนวนปลาซิว-หนวดยาวทั้งหมดที่นำมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยไม่รวมปลาที่ตายระหว่างการจับและลำเลียงขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ ต้องทิ้งปลาทั้งกลุ่มที่จับมาและนำมาปรับสภาพเสีย (Alabaster, 1982) ไม่ควรนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองต่อไป โดยออกไปทำการจับและรวบรวมพันธุ์ปลาซิวหนวด-ยาวชุดใหม่ เพื่อนำมาปรับสภาพและใช้ทดลองใหม่อีกครั้ง

เมื่อปลาซิวหนวดยาวคุ้นเคยต่อสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการและมีสภาพแข็งแรงดีแล้ว จึงทำการแยกเพศเพื่อแยกเลี้ยงคนละบ่อ การแยกเพศอาศัยความแตกต่างที่สังเกตได้จากลักษณะภายนอก ตามที่เจริญ(2505)รายงานไว้ จากนั้นทำการสุ่มจับเพื่อชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเพศละ 50 ตัว

ในการเลี้ยงปลาซิวหนวดยาวในห้องปฏิบัติการ โดยให้อาหารเป็นประจำทุกวันๆ ละครั้งประมาณไม่เกิน 5% ของน้ำหนักตัว โดยให้ในช่วงเช้า ทำการสุ่มเพื่อวัดความยาวและชั่งน้ำหนักเพศละ 30 ตัว เป็นประจำเดือนละครั้ง เพื่อพิจารณาการเจริญเติบโตและปรับปริมาณอาหารที่ให้ ทำการดูดตะกอนและเศษอาหารเหลือ รวมทั้งเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเลี้ยงเป็นประจำ

ตารางที่ 3.1 คุณภาพของน้ำประปาที่ใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือนมกราคม-มิถุนายน 2528

คุณภาพ	ปริมาณ
อุณหภูมิน้ำ(Water temperature) [1]	27.0-29.5^{o}C
ความเป็นกรด-ด่าง(pH) [2]	7.8-8.4
ออกซิเจนละลายน้ำ(Dissolved oxygen) [3]	5.0-6.5 มก./ล.
ความกระด้างรวม(Total hardness) [4]	90.0-108.0 มก./ล. แคลเซี่ยมคาร์บอเนต
ความเป็นด่างรวม(Total alkalinity) [5]	84.0-104.0 มก./ล. แคลเซี่ยมคาร์บอเนต
พาราควอต(Paraquat) [6]	-
คาร์บาริล(Carbaryl) [7]	-
แพนตาคลอโรฟีนอล(Pentachlorophenol) [8]	-

[1] วัดด้วยเทอร์โมมิเตอร์

[2] วัดด้วยพี-เอชมิเตอร์

[3]-[5] วิเคราะห์ปริมาณโดยการติเตรชั่น

[6]-[8] วิเคราะห์ปริมาณโดยอุตราไวโอเลต สเปคโตโฟโตมิเตอร์

ตารางที่ 3.2 คุณค่าและส่วนประกอบของอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

คุณค่า	ปริมาณ
โปรตีน	ไม่น้อยกว่า 25 %
ความชื้น	ไม่เกิน 12 %
ไขมัน	ไม่น้อยกว่า 4 %
กาก	ไม่เกิน 8 %

<u>ส่วนประกอบ</u> ปลาป่น, เกล็ดถั่วเหลือง, ถั่วเหลืองนึ่ง, ข้าวโพด, ปลายข้าว, รำละเอียด, กากมะพร้าวอัด, วิตามินและเกลือแร่

ที่มา : ฝ่ายอาหารสัตว์น้ำ บริษัท โภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด กทม.

เดือนละ 2 ครั้ง บันทึกอุณหภูมิน้ำทุกวัน และตรวจสอบคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาสัปดาห์ละครั้ง ในบ่อเลี้ยงมีการให้อากาศจากเครื่องปั๊มอากาศอยู่ตลอดเวลา

3.2.4 การเพาะขยายพันธุ์ปลาซิวหนวดยาวในตู้กระจก

ทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดี ไม่มีบาดแผลหรือพิการ สมบูรณ์เพศ แข็งแรงและว่องไวปราดเปรียว นำมาเพาะในตู้กระจกที่เตรียมขึ้นตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของเจริญ(2505) โดยใช้ตู้กระจกขนาด 40 ลิตร บรรจุน้ำประมาณ 10 ลิตร ซึ่งมีระดับความสูงของน้ำไม่เกิน 15 เซนติเมตร พื้นก้นตู้กระจกรองด้วยที่ดักไข่ปลา(Breeding trap) และสาหร่ายเทียมที่ทำจากเชือกพลาสติก เพื่อให้ปลาไข่ติดและซ่อนไข่ภายในตู้กระจกเพาะพันธุ์มีการให้อากาศอยู่ตลอดเวลา

ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการลงในตู้กระจกเพาะพันธุ์ ในอัตราส่วนปลาเพศเมียต่อปลาเพศผู้ 1 ต่อ 2 โดยปล่อยในตอนเย็น จากนั้นในตอนเช้ามืดของวันรุ่งขึ้นจึงทำการสังเกตพฤติกรรมการวางไข่ เมื่อปลาวางไข่เรียบร้อยแล้ว จึงค่อยช้อนเอาพ่อแม่ปลาออกจากตู้กระจกเพาะพันธุ์ จากนั้นจึงค่อยๆลดระดับน้ำในตู้กระจกลงให้เหลือไม่เกิน 11 เซนติเมตร เพื่อลดอัตราการตายของลูกปลาที่ฟักออกมาใหม่ๆ เนื่องจากระดับน้ำลึกเกินไป(เจริญ,2505)

ทำการนับปริมาณไข่ทั้งหมดที่แม่ปลาวางในแต่ละตู้ จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างไข่มาตู้ละ 200 ฟอง ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร ที่มีระดับน้ำลึกไม่เกิน 11 เซนติเมตรเช่นกัน เพื่อศึกษาอัตราการผสม อัตราการฟัก และอัตราการรอดตายในช่วงอายุ 2 วันแรก หลังจากฟักเป็นตัวโดยสุ่มตัวอย่าง 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.2.5 การอนุบาลลูกปลาซิวหนวดยาววัยอ่อน

หลังจากที่ถุงไข่แดง(Yolk sac) ของลูกปลายุบแล้ว จึงเริ่มให้อาหารแก่ลูกปลาวัยอ่อน โดยให้ไข่แดงต้มสุกบดละเอียด ละลายน้ำร้อนผ่านตะแกรงตาถี่ ให้วันละ 3 ครั้ง คือในตอนเช้า กลางวัน และตอนเย็น โดยให้ครั้งละน้อยๆและค่อยๆให้จนสังเกตว่าลูกปลากินได้ทั่วถึง เปลี่ยนถ่ายน้ำทำความสะอาดและดูดเอาเศษอาหารเหลือออกทุก 2 วัน เมื่อลูกปลาอายุได้ 15 วัน จึงเปลี่ยนเป็นให้ไรแดงแทนไข่แดงต้มสุก จนลูกปลาอายุได้ 25 วันไปแล้ว จึงเปลี่ยนเป็นให้อาหารสำเร็จรูปเช่นเดียวกับที่ใช้เลี้ยงปลาโต แต่นำอาหารมาบดให้เป็นผงละเอียดโปรยให้ลูกปลากินที่ผิวน้ำ ในช่วงที่เริ่มให้ไรแดงเป็นอาหาร จะทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทำความสะอาดและดูดเอาเศษอาหารเหลือออกสัปดาห์ละครั้ง พร้อมทั้งค่อยๆเพิ่มระดับน้ำในตู้กระจกอนุบาลขึ้นเรื่อยๆเป็นระยะโดยไม่ควรเกินกว่า 20-25 เซนติเมตร

ทำการสุ่มวัดความยาวของลูกปลาในแต่ละช่วงอายุครั้งละ 20 ตัว เพื่อประเมินอัตราการเจริญเติบโต รวมทั้งนับจำนวนลูกปลาทั้งหมดในตู้กระจกอนุบาล เพื่อศึกษาอัตราการรอดตายในแต่ละช่วงอายุ เมื่อลูกปลาอายุได้ 1,7,14,20,30 และ 45 วันตามลำดับ

3.2.6 การหาพื้นที่ผิวตัวของปลาซิวหนวดยาว ปลาตะเพียนขาวและปลาหางนกยูง

เนื่องจากปลาที่นำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารพาราควอต คาร์บาริล และเพนตาคลอโรฟีนอลในครั้งนี้ เป็นปลาต่างชนิดกัน ช่วงวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน ดังนั้นเกณฑ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบความไวสัมพัทธ์ระหว่างปลาต่างชนิดกัน จึงเลือกใช้พื้นที่ผิวตัว(body surface area) เป็นเกณฑ์ประเมิน (NAS,1974 และ Brown,1980) โดยเปรียบเทียบผลเมื่อปลาทดลองแต่ละชนิดมีพื้นที่ผิวตัวเท่ากัน

การหาพื้นที่ผิวตัวของปลาทดลองทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว ใช้วิธีการของ Migdalski (1960) โดยทำการสุ่มปลาตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิดๆละ 25 ตัว ให้ขนาดของตัวอย่างกระจายออกไปทุกๆขนาด ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า วัดความยาวสุด(total length) ด้วยไม้โปรแทคเตอร์ และวัดพื้นที่ผิวด้วยแผ่นใสที่มีช่องตารางมิลลิเมตร ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์เชิงถดถอย พร้อมทั้งทดสอบการยอมรับทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

3.2.7 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมีต่อปลาทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารพาราควอต คาร์บาริล และเพนตาคลอโรฟีนอล ต่อปลาซิวหนวดยาว ปลาตะเพียนขาว และปลาหางนกยูงที่มีพื้นที่ผิวตัวเท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบความไวสัมพัทธ์ ใช้วิธีการทดสอบแบบชีววิเคราะห์น้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำ(Renewal static bioassay) เพื่อประเมินค่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาทดลองทั้งสามชนิดตายครึ่งหนึ่งหรือ 50 เปอร์เซนต์ (Median lethal concentration : LC_{50})ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง ตามวิธีการมาตรฐานของสหรัฐอเมริกา (APHA et al.,1980) โดยมีขั้นตอนดำเนินการทดลองดังต่อไปนี้

(1) การเตรียมสัตว์ทดลอง

ปลาทดลองครั้งนี้ ได้แก่ ปลาซิวหนวดยาว และปลาหางนกยูงซึ่งเพาะขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ ส่วนปลาตะเพียนขาวได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน โดยนำมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของห้องปฏิบัติการในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 150 ลิตร ใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ตามวิธีการในข้อ 3.2.3

ก่อนนำปลาทั้ง 3 ชนิดมาทดลอง ทำการงดให้อาหารล่วงหน้าก่อน 2 วัน และไม่ให้อาหารตลอดการทดลอง

(2) การเตรียมน้ำสำหรับทดลอง

น้ำที่ใช้ทดลองเป็นน้ำประปาชนิดเดียวกันกับที่ใช้เลี้ยงปลา โดยปล่อยพักไว้ในถังไฟเบอร์ และให้อากาศในน้ำอยู่ตลอดเวลา อย่างน้อย 5 วัน

(3) การเตรียมสารละลายสำหรับทดลอง

ก. พาราควอต โดยการเจือจางกรัมมอกโซน(Gramoxone) ซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์พาราควอต(Paraquat active ingredient) 199 กรัม/ลิตร ด้วยน้ำที่ใช้ทดลอง โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น(stock solution)ก่อน ให้มีความเข้มข้น 199 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อจะใช้ทดลองจึงนำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำที่ใช้ทดลอง ให้มีความเข้มข้นต่างๆกันตามที่ต้องการซึ่งคำนวณโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้น(stock solution), V_1 = ปริมาตรของสารละลายเข้มข้น, N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเจือจางที่ต้องการใช้ (diluted solution) และ V_2 = ปริมาตรของสารละลายเจือจางที่ต้องการใช้

ตัวอย่างเช่น การเตรียมสารละลายพาราควอตเพื่อใช้ทดลองปริมาตร 10 ลิตร (V_2) ให้มีความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร (N_2) โดยตวงสารละลายพาราควอตเข้มข้น 199 มิลลิกรัม/ลิตร ด้วยกระบอกตวงให้ได้ปริมาตร $\frac{2.0 \times 10000}{199} = 100.50$ มิลลิลิตร (V_1) แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำที่ใช้ทดลองให้มีปริมาตรครบ 10,000 มิลลิลิตร เป็นต้น

ข. คาร์บาริล โดยนำคาร์บาริลเกรดวิเคราะห์ 99% มาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นในน้ำที่ใช้ทดลองให้มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัม/ลิตร(Martin,1971) เมื่อจะใช้ทดลองจึงนำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำที่ใช้ทดลอง ตามความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการตามวิธีคำนวณในข้อ ก.

ค. เพนตาคลอโรฟีนอล โดยนำเพนตาคลอโรฟีนอลเกรดวิเคราะห์ 85% มาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นในน้ำที่ใช้ทดลอง ให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร (Martin,1971) เมื่อจะใช้ทดลองสารละลายเข้มข้นในน้ำที่ใช้ทดลอง ตามความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการ ตามวิธีคำนวณในข้อ ก.

(4) การเตรียมภาชนะทดลอง

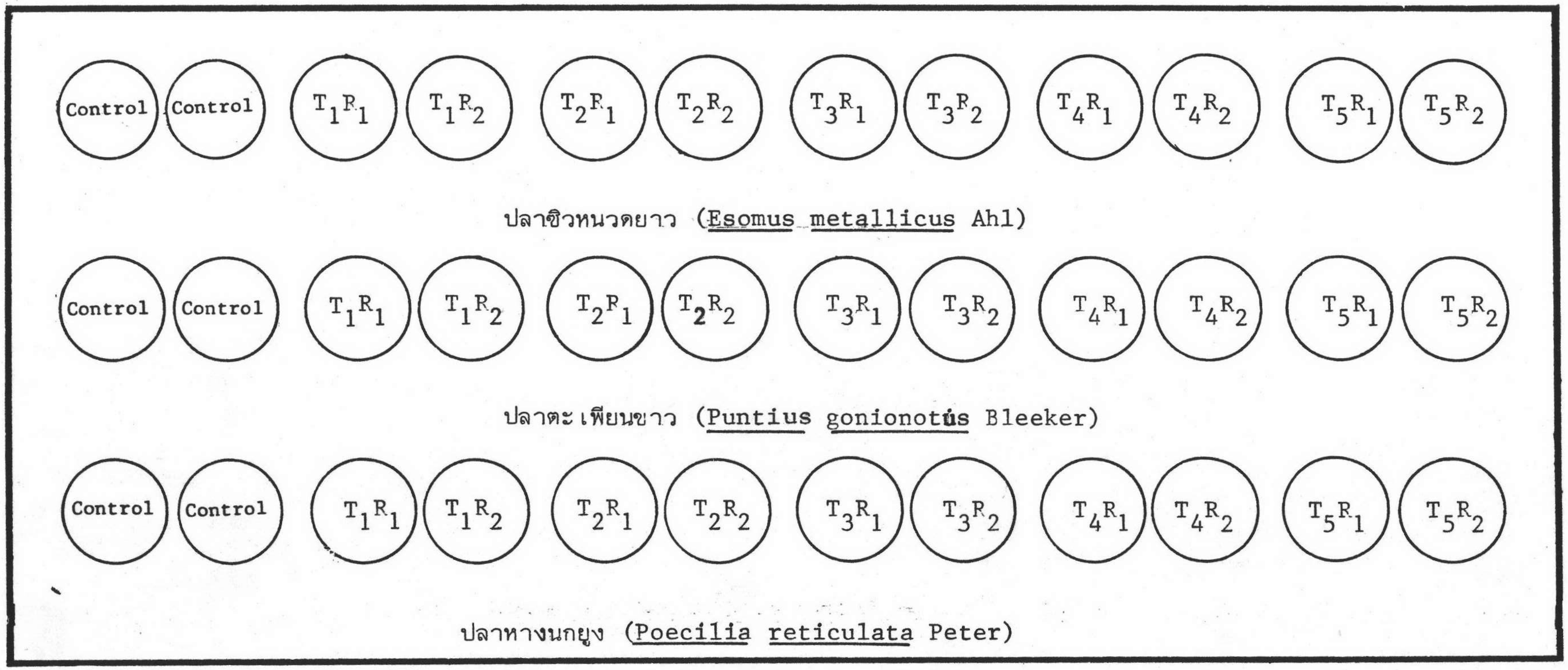
ภาชนะที่ใช้ทดลองเป็นโถแก้วทรงกระบอก ความสูง 35 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 22.5 เซนติเมตร บรรจุน้ำที่ใช้ทดลอง 10 ลิตรเท่ากันทุกภาชนะ พร้อมอุปกรณ์ให้อากาศครบทุกหน่วยทดลอง ภาชนะทดลองทั้งหมดจะถูกนำไปแช่ในบ่อคอนกรีตเลี้ยงปลาโดยมีน้ำเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาการทดลอง

(5) การทดลอง

การทดลองหาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารพาราควอต คาร์บาริล และเพนตาคลอโรฟีนอล ที่อยู่ในสารละลายเพียงชนิดเดียวต่อปลาซิวหนวดยาว ปลาตะเพียนขาว และปลาหางนกยูงที่มีขนาดพื้นที่ผิวตัวเท่ากัน เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาทดลองตาย เปอร์เซนต์ภายในเวลา 96 ชั่วโมงนั้น มีวิธีการดำเนินการทดลองที่เหมือนๆกัน ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้ คือ

ก. การทดลองเบื้องต้น(Exploratory tests) เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นช่วงกว้างๆที่ทำให้ปลาทดลองไม่ตายและตายหมด(range finding tests) เพื่อจะได้นำข้อมูลมาใช้กำหนดความเข้มข้นของสารเคมีทดลองที่เหมาะสมในการทดลองจริง โดยใช้บีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร บรรจุสารละลายที่ใช้ทดลองมีความเข้มข้นต่างๆกัน 4 ระดับ พร้อมกลุ่มควบคุม ใช้ปลาทดลองบีกเกอร์ละ 5 ตัว สังเกตผลการทดลองภายใน 48 ชั่วโมง

ข. การทดลองอย่างละเอียด(Full-scale tests) เป็นการทด-ลองจริง โดยนำผลการทดลองจากการทดลองเบื้องต้นมาใช้พิจารณาจัดระดับความเข้มข้นของสารทดลองที่จะให้ เพื่อหาอัตราการตายของปลาทดลองในแต่ระดับความเข้มข้น โดยใช้สารละลายทดลอง 5 ระดับ ระดับละ 2 ซ้ำ พร้อมทั้งกลุ่มควบคุม(Control) เพื่อใช้เปรียบเทียบด้วย การทดลองทำในโถแก้วทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22,5 เซนติเมตร ระดับของสารละลายในแต่ละหน่วยทดลองประมาณ 28 เซนติเมตร จำนวนปลาในทุกหน่วยทดลอง หน่วยละ 10 ตัว ใช้วิธีการจัดกลุ่มปลาทดลองแบบสุ่มเพื่อให้มีการกระจายปลาทดลองอย่างสม่ำเสมอในแต่ละหน่วยทดลอง ภาชนะทุกหน่วยทดลองจะถูกนำไปแช่ในบ่อคอนกรีตเลี้ยงปลาซึ่งมีน้ำเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิน้ำไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากนัก การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมีแต่ละชนิดจะทำการทดสอบกับปลาทดลองพร้อมกันทั้งสามชนิด โดยจัดหน่วยทดลองตามภาพที่ 3.2 บันทึกจำนวนปลาทดลองที่ตายแต่ละชนิดเมื่อครบ 24,48,72 และ 96 ชั่วโมง เกณฑ์ที่ใช้ตัดสินว่าปลาทดลองตาย คือการเปิดปิดของกระพุ้งแก้ม (Operculum movement) หยุดลง และปลาไม่แสดงอาการ



ภาพที่ 3.2 การจัดหน่วยทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมี

(ประกอบด้วย 5 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 2 ซ้ำ พร้อมกลุ่มควบคุม)

ตอบสนอง เมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะตัวปลาเป็นเวลานานกว่า 2-3 นาที ปลาที่ตายให้รีบนำออกจากภาชนะทดลองทันทีทุกครั้งที่ตรวจพบ และทำการเปลี่ยนสารละลายทดลองในทุกหน่วยทดลองรวมทั้งกลุ่มควบคุมใหม่เมื่อทำการทดลองครบ 48 ชั่วโมง จำนวนการตายของปลาทดลองเมื่อครบ 96 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยเครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ต่อไป

(6) การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ค่า LC_{50} ที่ 24,48,72 และ 96 ชั่วโมง ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% และการวิเคราะห์ทางสถิติอื่นๆ ใช้วิธีการวิเคราะห์ของโปรบิท(Finney,1964) โดยใช้เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมวิเคราะห์โปรบิท(Probit analysis) เขียนบนภาษาไมโครซอฟท์เบสิค(Microsoftbasic หรือ MBASIC) ขั้นตอนการทำงานและโปรแกรมดังกล่าวแสดงไว้ในภาคผนวก ค

(7) การวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ทดลอง

ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ทดลอง ก่อนทำการทดลองและทุก 24 ชั่วโมงขณะการทดลอง และหลังการทดลอง โดยปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ(Dissolved oxygen), ค่าความกระด้างรวม(Total hardness), ค่าความเป็นด่างรวม(Total alkalinity) ใช้วิธีติเตรทชั่น(Titration) ตามวิธีการของ Swingle (1969), อุณหภูมิน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์, ความเป็นกรด-ด่างของน้ำโดยใช้เครื่องวัดพีเอช(pH meter)

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณพาราควอตในตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดลองนั้น ใช้ตัวอย่างน้ำ 10 มิลลิตร เติมด้วยสารละลายโซเดียมไดไธโอไนท์ ($Na_2S_2O_4$) 0.2 %(W/V) ใน 0.5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 มิลลิลิตร จะเกิดสีน้ำเงินขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ภายในเวลาไม่เกิน 5 นาที ด้วยเครื่องอุตราไวโอเล็ตสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 396 นาโนเมตร (Ashworth et al, 1970) ในเซลล์บรรจุสารละลายขนาด 1 เซนติเมตร เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟตรวจเทียบ (calibration curve) ที่เตรียมเหมือนกับตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บาริลนั้น ใช้ตัวอย่างน้ำทดลอง 10 มิลลิลิตร เช่นกัน เติมด้วยเอธานอล (Ethanol) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่วแล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (EPA,1976) ในเซลล์บรรจุสารละลายขนาด 1 เซนติเมตร เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟตรวจเทียบ ที่เตรียมเหมือนกับตัวอย่าง

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณเพนตาคลอโรฟีนอลนั้น ใช้ตัวอย่างน้ำทดลอง 10 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย 0.2 N. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่วแล้วตั้งทิ้งไว้สักครู่ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 248 นาโนเมตร (Monsanto,1965) ในเซลล์บรรจุสารละลายขนาด 1 เซนติเมตร เปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟตรวจเทียบ ที่เตรียมเหมือนกับตัวอย่าง

3.3 <u>สถานที่และระยะเวลาการทดลอง</u>

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองที่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ และโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2527 - เดือนมิถุนายน 2528