บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างกุ้งทดลอง

ใช้ลูกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) จากฟาร์มกุ้งเอกชนในอำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง ขนาดความยาวประมาณ 6 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 1.55 กรัม ชุดการทดลองที่ 1 ใช้จำนวน 1,500 ตัว ชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ชุดละ 360 ตัว

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ ประกอบด้วย

- สารเคมีขจัดคราบน้ำมันชนิด OD 4000
- น้ำมันดีเซล
- น้ำมันเตา

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมัน ประกอบด้วย

- เฮกเซน (n-hexane)
- ไครซีน (Chrysene)

1.2.3. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บและเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาผลทางเนื้อเยื่อของกุ้ง

(ก) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาดอง Davidson's fixative[7] (Bell and Lightner, 1988) ประกอบด้วย

- 95% Ethyl Alcohol
- Formaldehyde 37-39%
- Glacial Acetic Acid

---

[7] ดูวิธีการเตรียมน้ำยาดองตัวอย่างในภาคผนวก ช

(ข) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสีย้อม Haematoxylin และ Eosin (H&E)[8] (Humason, 1979) ประกอบด้วย

- Hematoxylin Crystals
- Sodiumiodate
- Ammonium Alum
- Citric Acid
- Chloral Hydrate
- Eosin Y, CI 45380
- 70% Ethyl Alcohol
- Glacial Acetic Acid

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้งทดลอง

ตู้กระจกขนาด 30 x 30 x 60 เซนติเมตร ความจุ 54 ลิตร จำนวน 24 ใบ พร้อมเครื่องให้อากาศ ท่ออากาศ หัวทราย สายยาง เครื่องสูบน้ำแบบจุ่ม ถังพักน้ำ ถังพลาสติก และสวิง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการชั่งน้ำหนักปลา

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius ถังน้ำพลาสติก บีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร และสวิง

2.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วย

- เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Evaporator) ยี่ห้อ Rotavapor รุ่น R-114
- ขวดแก้วสีชา ขนาด 3 ลิตร
- เครื่องอังน้ำ (Water Bath) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-480
- แผ่นกรองชนิดแยกสาร (Phase Separators) ชนิด Whatman 1 PS
- เครื่องกวน
- กรวยแยก
- ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Fluorescence Spectrofluorometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น EP-750 PC

---

[8] ดูวิธีการเตรียมสีย้อมและวิธีการย้อมสีได้จากภาคผนวก ช

2.4 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างและเตรียมเนื้อเยื่อ

- ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ กรรไกร มีด และถาด
- ขวดดองตัวอย่าง ความจุ 250 มิลลิลิตร
- หลอดฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร
- เครื่องตัด หรือหั่นชิ้นเนื้อและตัวอย่าง (Microtome)
- เครื่องนำชิ้นเนื้อผ่านสารละลายอัตโนมัติ (Autotechtion)
- แผ่นความร้อน (Hot Plate)
- อ่างปรับอุณหภูมิสำหรับลอยชิ้นเนื้อ (Tissue Floatation Bath)
- แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- ชุดย้อมสีเนื้อเยื่อ
- มีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

2.5 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

- pH Meter ยี่ห้อ Hanna Instrument รุ่น HI 8314
- เครื่องวัดความเค็ม ชนิด Hand Refractometer
- เทอร์โมมิเตอร์
- เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO Meter) ยี่ห้อ YS I รุ่น MODEL 57

3. วิธีดำเนินการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ดำเนินการทดลองตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater พิมพ์ครั้งที่ 20 หมวด Toxicity (APHA, AWWA and WEF, 1998), Manual of Methods for Aquatic Environment Research (FAO, 1987) และ Approaches to Measuring the Toxicity of Pollutants to Marine Organisms (Abel, 1991) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอน ประกอบด้วย

ตอนที่ 1 ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารเคมีขจัดคราบน้ำมันชนิด OD 4000 น้ำมันดีเซล และน้ำมันเตา

ตอนที่ 2 ศึกษาผลกระทบของสารแต่ละชนิดต่อการเจริญเติบโต

ตอนที่ 3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะภายในของกุ้งกุลาดำเมื่อสัมผัสกับสารเคมีขจัดคราบน้ำมันชนิด OD 4000 น้ำมันดีเซล และน้ำมันเตา

3.1 การทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารแต่ละชนิด

3.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ดัดแปลงจากวิธีการของ FAO (1987) โดยนำกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) มาปรับสภาพ (Acclimate) ในอ่างเพาะฟักเพื่อให้มีความเคยชินต่อสภาพน้ำและห้องปฏิบัติการ มีการเติมอากาศให้แก่น้ำในอ่างตลอดเวลา ให้อาหารเม็ดคุณภาพดีวันละ 4 ครั้ง และหยุดให้อาหารก่อนนำมาทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.2 การเตรียมน้ำสำหรับทดลอง

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านการกรอง ให้อากาศตลอดเวลาเป็นอย่างน้อย 7 วัน โดยจะทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลาย และความเค็ม ตามวิธีการของ APHA, AWWA and WEF (1998)

3.1.3 การเตรียมสารเพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษ

-น้ำมัน เตรียมสารละลายที่จะใช้ในการทดลองเป็นน้ำมันในรูปที่ละลายน้ำ (Water Soluble Fraction : WSF) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก FAO (1987) โดยใช้น้ำมัน 1 ส่วนผสมกับน้ำ 9 ส่วน ใส่ถังแล้วกวนช้า ๆ เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปิดปากถังเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำมันที่ระเหยง่าย ความเร็วของการกวนให้ดูจากการปรับให้วงกรวยของสารละลายลึกไม่เกิน 1/4 ของสารละลายทั้งหมด เมื่อกวนครบ 20 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 6 ชั่วโมง เพื่อให้แยกชั้น แล้วจึงดูดเอาส่วนที่ละลายน้ำข้างล่างไปใช้ โดยถือว่าสารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเป็น 100% ของส่วนที่ละลายน้ำ เมื่อต้องการเตรียมสารละลายในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ให้เติมน้ำลงไปเจือจางตามสัดส่วน

การหาความเข้มข้นของ WSF ประกอบด้วยขั้นตอน ดังต่อไปนี้ คือ

ก. การสกัด

ตวง WSF ที่เตรียมไว้ 1 ลิตรใส่กรวยแยก เติมเฮกเซนลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อสกัด ขยับวาล์วไล่ก๊าซที่เกิดขึ้นออก แยกเอาชั้นเฮกเซนออกมาโดยไขชั้นน้ำออกใส่กรวยแยกอีกใบ (และทำการสกัดแบบเดิมอีกครั้ง โดยเติมเฮกเซนลงไป 50 มิลลิลิตร เอาเฮกเซนที่แยกได้รวมกับเฮกเซนที่สกัดได้จากครั้งแรก ส่วนของเฮกเซน (อยู่ด้านบนตอนสกัด) กรองผ่านแผ่นกรอง 1 PS นำเฮกเซนไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องมือระเหยแบบลดความดันที่อุณหภูมิ 59^{o} C จนเกือบแห้ง

ทำปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยเฮกเซนเก็บในหลอดแก้ว (Glass Vial) เพื่อเตรียมสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันต่อไป

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมัน

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันด้วยเทคนิค Fluorescence Spectrofluorometer โดยวิธีการของ IOC/UNESCO (1984)[9] โดยดำเนินการดังนี้ คือ เตรียมสารละลายมาตรฐานไครซีน (Chrysene) โดยการชั่งสารมาตรฐานไครซีน 1.0 มิลลิกรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานไครซีนตั้งต้น 10 mg/L เจือจางสารละลายมาตรฐานไครซีนให้มีความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8 , 0.9 และ 1.0 mg/L แล้วจึงนำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์โดยเครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเลือกสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นใดก็ได้ไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นเอกซิเตชั่น (Excitation Wavelength) และความยาวคลื่นอิมิชชั่น (Emission Wavelength) นำความยาวคลื่นที่ได้มาปรับตั้งตัวเครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์แล้วทำการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ (Relative Fluorescence Intensity) ของสารละลายมาตรฐานไครซีนความเข้มต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ จากนั้นวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายตัวอย่างซึ่งได้ปรับปริมาตรสารละลายตัวอย่างได้ 10 ml ด้วยเฮกเซน ที่สภาวะเดียวกับที่วัดสารละลายมาตรฐานไครซีน คำนวณหาค่าความเข้มข้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) (ภาคผนวก ซ) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันทั้ง 2 ชนิดรูปแบบที่ละลายน้ำ ในช่วงเวลาต่าง ๆ รายละเอียดดังภาคผนวก ฌ

- สารเคมีขจัดคราบน้ำมัน เตรียมความเข้มข้น 1000 ppm โดยการเติมสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน 1 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1000 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

3.1.4 การเตรียมสารพิษที่ใช้ทดลองที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารพิษแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 5 ระดับก่อนการทดลองประมาณ 1 ชั่วโมงโดยเจือจางจากสารละลายตั้งต้น (Stock Solution)

3.1.5 การทดลองเพื่อหาค่าความเป็นพิษของสาร

การทดลองเพื่อหาค่าความเป็นพิษของสาร ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การทดลองขั้นต้น (Preliminary Test) และการทดลองอย่างละเอียด (Full - Scale Test)

---

[9] ดูรายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการของ IOC/UNESCO (1984) ได้จากภาคผนวก ญ

(ก) การทดลองขั้นต้น (Preliminary Test)

เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นช่วงกว้าง ๆ ของสารพิษ เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 100% และความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้กุ้งกุลาดำมีชีวิตรอด 100% เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการจัดระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

(ข) การทดลองอย่างละเอียด (Full - Scale Test)

เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเป็นพิษของน้ำมันเตา น้ำมันดีเซล และสารเคมีขจัดคราบน้ำมันชนิด OD 4000 โดยการนำเอาช่วงระดับความเข้มข้นที่หาได้จากการทดลองขั้นต้นมาแบ่งระดับความเข้มข้นออกเป็น 5 ระดับ ระดับละ 5 ซ้ำ และ 1 ชุดควบคุม โดยทำการทดลองทีละสาร โดยปล่อยกุ้งกุลาดำลงไปในตู้กระจกจำนวนตู้ละ 10 ตัวต่อแต่ละความเข้มข้น สำหรับการคัดเลือกกุ้งกุลาดำนั้นได้เลือกโดยวิธีการสุ่มกุ้งที่มีขนาดเท่า ๆ กัน และอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน แต่ละการทดลองบันทึกผลการตายสะสมของกุ้งกุลาดำหลังการให้สารพิษเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตักกุ้งที่ตายออกทันทีที่พบ กุ้งตัวใดที่สงสัยว่าอาจจะไม่ตายให้ใช้แท่งแก้วแตะเบา ๆ 2-3 ครั้ง ถ้าไม่มีการตอบสนองใด ๆ เกิดขึ้นให้ถือว่าตายแล้ว ทั้งนี้ในระหว่าง ทำการทดลองนั้นไม่มีการให้อาหาร ไม่มีการให้อากาศแก่สัตว์ทดลอง และไม่มีการเปลี่ยนน้ำที่ใช้ทดลองด้วย

3.2 การทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบสารแต่ละชนิดต่อการเจริญเติบโต

3.2.1 การเตรียมสัตว์ และน้ำที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมเช่นเดียวกับตอนที่ 1

3.2.2 การทดลอง

ดำเนินการทดลองแบบชีววิเคราะห์ (Bioassay) ในน้ำนิ่ง (Static) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ น้ำมันและสารเคมีขจัดคราบน้ำมันที่ใช้ทดลองมีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 25, 50 และ 75 ของระดับเริ่มเป็นพิษ ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ และ 1 ชุดควบคุม โดยปล่อยกุ้งกุลาดำลงไปในตู้กระจกจำนวนตู้ละ 10 ตัวต่อแต่ละความเข้มข้น (FAO, 1987 และAbel, 1991) สำหรับการคัดเลือกกุ้งกุลาดำนั้นได้เลือกโดยวิธีการสุ่มกุ้งที่มีขนาดเท่า ๆ กัน และอยู่ในสภาพ แวดล้อมเดียวกัน ระหว่างการทดลองให้อาหารเม็ดคุณภาพดีวันละ 4 ครั้ง เปลี่ยนน้ำประมาณ 1 ใน 3 ของปริมาณน้ำในตู้ทุก 2 วัน พร้อมทั้งเติมสารพิษ (น้ำมัน และสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน)ในระดับความเข้มข้นเท่าเดิมลงไปใหม่ ให้อากาศตลอดการทดลอง ชั่งน้ำหนักกุ้งกุลาดำทุก 2 สัปดาห์ ของการทดลองเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต

3.3 การทดลองเพื่อศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ

3.3.1 การเตรียมสัตว์ และน้ำที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมเช่นเดียวกับตอนที่ 1

3.3.2 การทดลอง

ดำเนินการทดลองแบบชีววิเคราะห์ในน้ำนิ่งเป็นเวลา 6 สัปดาห์ น้ำมันและสารเคมีขจัดคราบน้ำมันที่ใช้ทดลองมีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 25, 50 และ 75 ของระดับเริ่มเป็นพิษ ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ และ 1 ชุดควบคุม โดยปล่อยกุ้งกุลาดำลงไปในตู้กระจกจำนวนตู้ละ 10 ตัวต่อแต่ละความเข้มข้น (FAO, 1987 และAbel, 1991) สำหรับการคัดเลือกกุ้งกุลาดำนั้นได้เลือกโดยวิธีการสุ่มกุ้งที่มีขนาดเท่า ๆ กัน และอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ระหว่างการทดลองให้อาหารเม็ดคุณภาพดีวันละ 4 ครั้ง เปลี่ยนน้ำประมาณ 1 ใน 3 ของปริมาณน้ำในตู้ทุก 2 วัน พร้อมทั้งเติมสารพิษ (น้ำมัน และสารเคมีขจัดคราบน้ำมัน)ในระดับความเข้มข้นเท่าเดิมลงไปใหม่ ให้อากาศตลอดการทดลอง สุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำตู้ละ 2 ตัวทุก 2 สัปดาห์ แล้วดองใน Davidson's Fixative ตามวิธีการของ Bell and Lightner (1988) เพื่อศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะภายใน[10]

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ก. วิเคราะห์หาระดับความเป็นพิษเฉียบพลันของสารแต่ละชนิดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีวิเคราะห์แบบโปรบิท (Probit Analysis) ตามวิธีการของ Finey (1971) และปรีชา สมมณี (2520) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่เขียนโดย โชคชัย เหลืองธุวปราณีต (2531)

ข. ค่าประมาณของระดับความเข้มข้นที่เริ่มเป็นพิษ ประมาณได้จากการศึกษาเส้นโค้งความเป็นพิษตามรายละเอียดที่อธิบายไว้ในเส้นโค้งความเป็นพิษแบบเอ็กซ์โปเนนเชียลที่มีขีดจำกัดล่าง (ปรีชา สมมณี, 2525)

ค. ค่าของระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัย (Safety Level) คำนวณตามวิธีการของ Spraque (1969) โดยใช้สูตร

ค่าของระดับความปลอดภัย = 0.1 x LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง

ง. การเจริญเติบโตและอัตราการเจริญเติบโต การศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ศึกษาได้จากค่าของน้ำหนักกุ้งกุลาดำเฉลี่ยต่อตัว อัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักเฉลี่ย

---

[10] ดูวิธีการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำเพื่อศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อในภาคผนวก ฎ

ที่เพิ่มขึ้น แล้ววิเคราะห์หาค่าความแปรแปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

อัตราการเจริญเติบโต (ร้อยละต่อตัวต่อวัน) ใช้สูตรตามวิธีของ Juancy and Ross (1982)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต} = \frac{LnW_2 - LnW_1}{T_2 - T_1} \times 100$$

โดยกำหนดให้ W_1 = น้ำหนักของกุ้งทดลองจากการชั่งน้ำหนักครั้งที่ T_1

W_2 = น้ำหนักของกุ้งทดลองจากการชั่งน้ำหนักครั้งที่ T_2

T_1 = วันที่ชั่งน้ำหนักกุ้งครั้งที่ 1

T_2 = วันที่ชั่งน้ำหนักกุ้งครั้งที่ 2

น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (ร้อยละ) ใช้สูตร

$$\frac{(\text{น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งครั้งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง}) \times 100}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง}}$$