บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. หอยเชอรี่

หอยเชอรี่ที่ใช้ทดลองได้จากการเก็บรวบรวมจากบ่อน้ำบริเวณมหาวิทยาลัยราชมงคลตะวันออก (ซึ่งปีนบ่อพักน้ำและไม่มีการเพาะปลูกหรือทำเกษตรกรรม) นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 5 วัน ในน้ำประปาที่มีการเติมอากาศทิ้งไว้ล่วงหน้าอย่างน้อย 1 สัปดาห์ โดยให้จอกและแหนบริเวณบ่อน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาเป็นอาหาร และงดอาหาร 1 วันก่อนทำการทดลอง

ในการทดลองปกติจะใช้หอยโดยวัดส่วนที่กว้างที่สุดของเปลือกหอย กำหนดให้หอยที่มีขนาด 4.5-5 เซนติเมตร น้ำหนักของหอยหลังจากเอาเปลือกออก มีค่า 26-33 กรัม

ภาพที่ 16 การเลือกขนาดหอยเชอรี่ที่ใช้ในการทดลอง

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องปั่นละเอียด (Homogenizer)

2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ(Centrifuge)

2.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS Spectrometer) ยี่ห้อ Perkin รุ่น Lambda 25

2.4 Quatze cuvette แบบ Y shape

2.5 กระบะทรงสี่เหลี่ยมขนาด 14x40x48 cm

2.6 ตะแกรงพลาสติกปิดกระบะ

2.7 ขวดสีชาขนาด 2.5 ลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.8 ปิเปต

2.9 ไมโครปิเปต (Micropipette)

2.10 เทอร์โมมิเตอร์

2.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)

2.12 ไม้บรรทัด

2.13 เครื่องชั่ง

2.14 เครื่องวัดค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ (D.O. Meter)

2.15 อุปกรณ์ผ่าตัดหอย

2.16 กล่องโฟมเก็บความเย็น

2.17 สายปรับอัตราการไหลของน้ำ

2.18 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.19 หลอดแก้ว

2.20 ตู้กระจกขนาด 35x70x35cm

2.21 กระบอกตวงขนาด 1000 ml

3. สารเคมี

3.1 Chlorpyrifos 94%

3.2 Carbaryl 99%

3.3 Dichlorvos 95%

3.4 อะซิโตน (Acetone)

3.5 0.1M Tris HCl Buffer pH=7

3.6 0.1M Tris HCl Buffer pH=8

3.7 Triton X 100

3.8 0.01M DTNB (Dithiobisnitrobenzoate)

3.9 0.01M ACTC (Acetylthiocholine)

3.10 1 N HCl

3.11 BCA™ Protein Assay kit

4. การเตรียมสารเคมี

4.1 สารละลาย 0.1 M TRIS/ HCl pH=8

ชั่ง TRIS Base 12.1 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH เป็น 8 ด้วย 1 N HCl

4.2 สารละลาย 0.1 M TRIS/ HCl pH=7+ 0.1% Tritron X 100

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชั่ง TRIS Base 12.1 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับ pH เป็น 7 ด้วย 1 N HCl เติม Tritron X 100 1 ml

4.3 สารละลาย 0.01 M DTNB

ชั่ง DTNB 396 mg ละลายใน 0.1 M TRIS/ HCl pH=8 100 ml สามารถเก็บได้หลายวัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

4.4 สารละลาย 0.1 M ACTC (Acetylthiocholine Substrate)

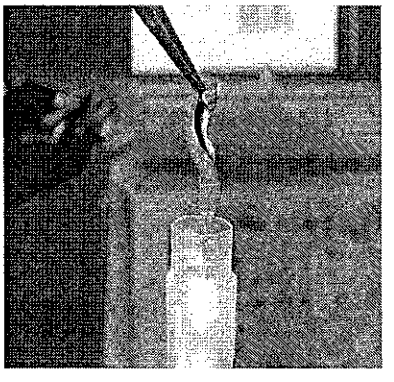
ชั่ง ACTC 289 mg ละลายในน้ำกลั่น 10 ml ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C หลังจากเตรียมแล้วควรใช้ทันที

4.5 เตรียมสารฆ่าแมลงคลอไพรีฟอส ไดคลอวอส และคาร์บาริล ในตัวทำละลายอะซิโตน ซึ่งในการทดลองจะใช้อะซิโตนปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ในน้ำ 1 ลิตร ดังแสดงไว้ในภาคผนวก

วิธีวิเคราะห์หาระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

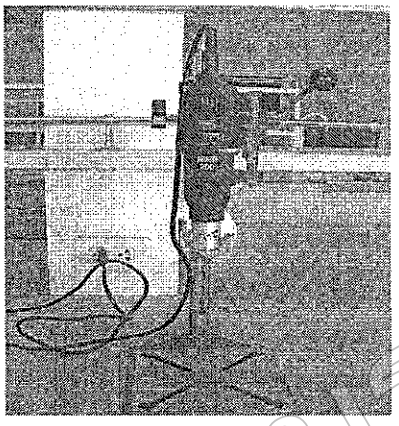
1. เตรียมตัวอย่าง (Supernatant) เพื่อวิเคราะห์

นำเนื้อเยื่อของอวัยวะที่ใช้ทดสอบ 0.2 -1 กรัม ไปปั่นละเอียด (Homogenized) ใน 0.1 M Tris/ HCl Buffer pH 7+ 0.1% Triton X100 (1/ 4 w/ v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนที่ใสด้านบน (Supernatant) เก็บไว้ที่ –80°C ก่อนทำการวิเคราะห์



ภาพที่ 17 การตัดเนื้อเยื่อเพื่อที่จะนำไปปั่นละเอียด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 18 เครื่องปั่นละเอียด

ภาพที่ 19 Supernatant (S9)

2. หาปริมาณอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

ในการวิเคราะห์หาระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ดัดแปลงจากวิธีของ Ellman et al. (1961) ใช้ Acetylthiocholine Iodide(ACTC) เป็น Specific Substrate โดยปรับปริมาตรเพื่อให้เหมาะกับ Cuvette ตามวิธีของ Bocquené and Galgani (1998) โดยใส่

510 µl 0.1M Tris/ HCl Buffer pH7+ 0.1% Triton X100

+ 30 µl 0.01 DTNB

+ 15 µl 0.1M ACTC Set 0

+ 15µl Supernatant

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรทุก 1 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การหาปริมาณโปรตีน

จากคู่มือการหาความเข้มข้นของโปรตีนในชุด BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยใช้ค่ามาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) โดย

3.1 เตรียม Working Reagent โดยใช้ Reagent A 50 ส่วน ผสมกับ Reagent B 1 ส่วน

3.2 นำตัวอย่าง (S9) 0.1 ml ผสมกับ Working Reagent 2.0 ml

3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 562 นาโนเมตร แล้วไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ

4. การคำนวณหาปริมาณ Acetylcholinesterase Activity (Bocquené and Galgani, 1998)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากข้างต้นไปคำนวณเพื่อหาค่า Optical Density (O.D.) ต่อนาที ดังต่อไปนี้

$$\text{O.D. (412 nm)/ min} = \frac{\text{ค่า O.D. นาทีที่ 3 - ค่า O.D. นาทีที่ 1}}{2}$$

$$\text{AChE Activity} = \frac{\text{O.D. (412 nm)/ min}}{\text{Protein (mg)}} \times 75$$

1 $\triangle$ O.D/ min = 75 nmol ของการไฮโดรไลซีส ACTC

หน่วยเป็น nmoles ACTC/ min/ mg protein

5. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{\text{Control} - \text{Treatment}}{\text{Control}} \times 100$$

การทดสอบเบื้องต้น

ในการศึกษาจะแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 หัวข้อใหญ่ ๆ ได้แก่

1. การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอวัยวะและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลอง
2. การทดสอบหาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การศึกษาเพื่อทดสอบผลของระยะเวลาในการสัมผัส (Time Course) และการฟื้นตัว (Recovery) ที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

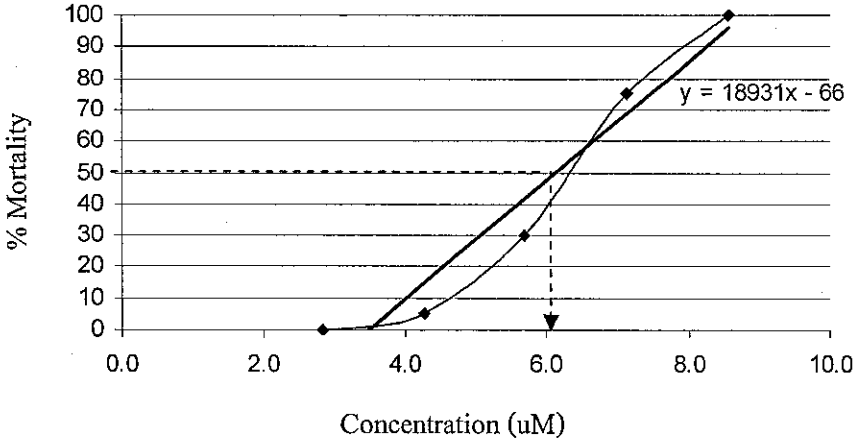
การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอวัยวะและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลอง

1. ทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาชนิดของเนื้อเยื่อ (Target Tissue) เพื่อดูการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

การทดสอบหาชนิดของเนื้อเยื่อเพื่อดูการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส เปรียบเทียบในแต่ละอวัยวะ คือ เหงือก (Gill) กล้ามเนื้อ (Muscle) ลำไส้ (Intestine) ไต(Kidney) และต่อมย่อยอาหาร (Digestive Gland) โดยตัดอวัยวะต่าง ๆ ของหอยเชอรี่ เพื่อนำไปเปรียบเทียบการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส แล้วให้อวัยวะที่ให้ผลตอบสนองดีที่สุดเป็นตัวแทนของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการทดลองในลำดับต่อไป

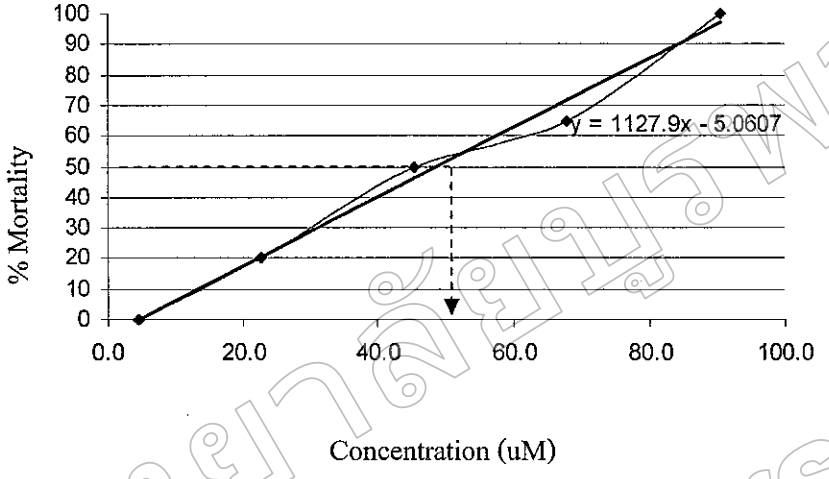
2. ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง (Preliminary Screening) โดยจะทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์ การตาย ที่ 96 ชั่วโมง ในสารต่าง เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งในการทดลองจะใช้ความเข้มข้นระดับที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (Sub-Lethal Concentration) โดยใช้สารคลอไพรีฟอส เข้มข้น 2.9, 4.3, 5.7, 7.1 และ 8.6 µM (1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mg/ l) สารไดคลอวอสที่ความเข้มข้น 4.5, 22.6, 45.0, 67.8 และ 90.5 µM (1, 5, 10, 15 และ 20 mg/ l) และสารคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 µM (10, 20, 30, 40 และ 50 mg/ l) สารทั้ง 3 ชนิดจะละลายในตัวทำละลายอะซิโตน

เมื่อแช่หอยเชอรี่ในสารคลอไพรีฟอส เข้มข้น 2.9, 4.3, 5.7, 7.1 และ 8.6 µM ใน 96 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้หอยเชอรี่ตาย 50% มีค่า 6.1 µM และค่าความเข้มข้นที่ทำให้หอยเชอรี่ไม่ตายใน 96 ชั่วโมง มีค่า 3.7 µM



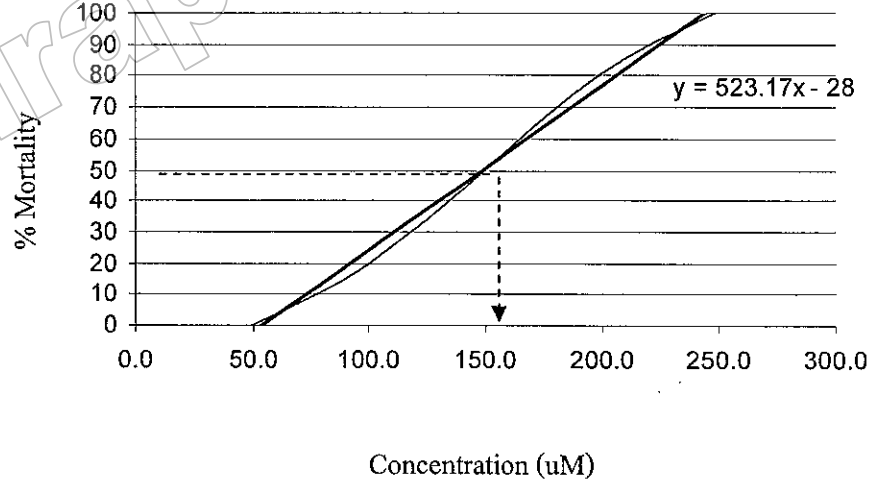
ภาพที่ 20 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่ในคลอไพรีฟอส ที่ 96 ชั่วโมง

เมื่อแช่หอยเชอรี่ในสารไดคลอวอสที่ความเข้มข้น 4.5, 22.6, 45.3, 67.9 และ 90.5 µM ใน 96 ชั่วโมง พบว่าในสารไดคลอวอสที่ทำให้หอยเชอรี่ตาย 50% มีค่า 49 µM และค่าความเข้มข้นที่ทำให้หอยเชอรี่ไม่ตายใน 96 ชั่วโมง มีค่า 4.5 µM



ภาพที่ 21 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่ในไดคลอวอส ที่ 96 ชั่วโมง

เมื่อแช่หอยเชอรี่ในสารสารคาร์บาริลที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 µM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้หอยเชอรี่ตาย 50% มีค่า 150 µM ใน และค่าความเข้มข้นที่ทำให้หอยเชอรี่ไม่ตายใน 96 ชั่วโมง มีค่า 50 µM



ภาพที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหอยเชอรี่ในคาร์บาริล ที่ 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ดังนั้นในการทดลองลำดับต่อไป จะใช้ คลอไพรีฟอสเข้มข้น 3.7 μM (1.3 mg / l), ไดคลอวอส เข้มข้น 4.5 μM(1 mg/ l) และคาร์บาริล เข้มข้น 50.0 μM (10 mg/ l) ละลายในตัวทำละลายอะซิโตนในอัตราส่วนของอะซิโตน 0.2 มิลลิลิตร ในน้ำ 1 ลิตร และเลือกอวัยวะส่วนเหงือก

3. การตอบสนองของหอยเชอรี่ในกลุ่มควบคุมที่มี อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย

โดยสารฆ่าแมลงแต่ละชนิดละลายน้ำได้น้อย จึงจำเป็นต้องใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย สารฆ่าแมลงแต่ละชนิด ปริมาณ 0.2 ml/ l จึงทำการทดสอบเพื่อหาผลกระทบจากการใช้อะซิโตน ปริมาณ 0.2 ml/l เป็นตัวทำละลาย

4. ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองในการยับยั้งการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในสารปราบศัตรูพืชที่ต่างกัน

ในการทดลองเตรียมคลอไพรีฟอส ไดคลอวอสและคาร์บาริล เข้มข้นเท่ากัน คือ 1 mg/ l ในน้ำโดยใช้หอยเชอรี่ขนาด 4.5-5 เซนติเมตรในน้ำอุณหภูมิปกติ แล้วเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นน้ำที่เติมอะซิโตน 0.2 ml/ l สังเกตผลที่ 96 ชั่วโมง

แผนภาพการทดลอง

สาร	กลุ่มควบคุม	คลอไพรีฟอส	ไดคลอวอส	คาร์บาริล
ความเข้มข้น (mg/l)	0	1	1	1
ซ้ำ (ตัว)	5	5	5	5

ทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็นหัวข้อย่อย ได้แก่

การศึกษาความแตกต่างของเพศต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

การศึกษาความแตกต่างของขนาดต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

การศึกษาความแตกต่างของอุณหภูมิต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

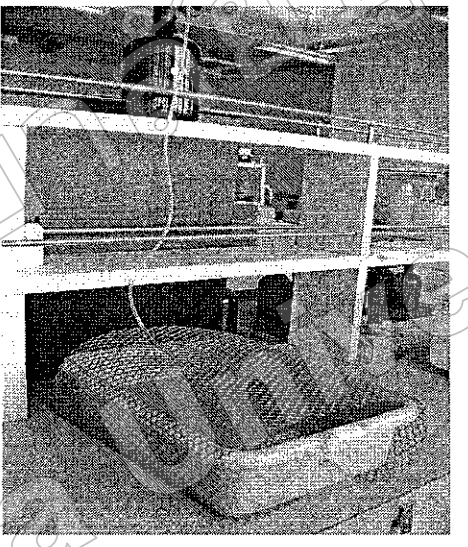
การศึกษาความแตกต่างของความเข้มข้นของสารต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สภาวะของการวิจัย

น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำประปาที่มีการเติมอากาศทิ้งไว้ล่วงหน้าแล้ว 7 วัน ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

ในแต่ละการทดลองจะใช้หอย 5 ตัว โดย ใส่หอยในภาชนะพลาสติกทรงสี่เหลี่ยมขนาด 14x40x48 cm เติมน้ำ 20 ลิตร มีตาข่ายพลาสติกคลุมเพื่อป้องกันหอยปีนออก แล้วมีการถ่ายน้ำที่ผสมสารเคมีในความเข้มข้นต่าง ๆ 20% ทุก 1 วัน โดยใช้ระบบถ่ายน้ำ ด้วยอัตรา 1.5 มิลลิลิตร ใน 1 นาที ด้วยสายปรับอัตราการไหลของน้ำ วัดค่า pH, DO และอุณหภูมิ ทุก ๆ วัน



ภาพที่ 23 ลักษณะการถ่ายน้ำ

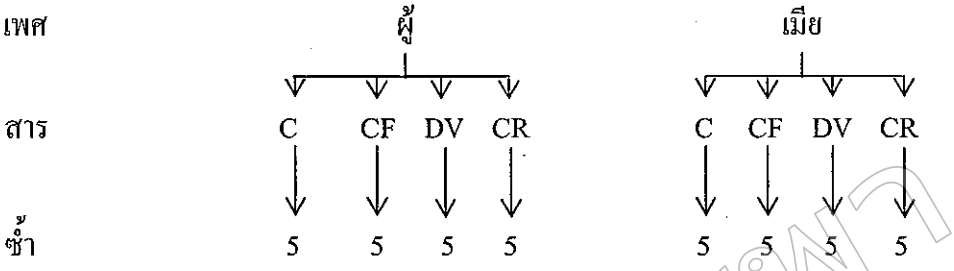
ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาความแตกต่างของเพศต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

เตรียมคลอไพรีฟอสเข้มข้น 3.7 μM, ไดคลอวอส เข้มข้น 4.5 μM และคาร์บาริล เข้มข้น 50 μM ในน้ำอุณหภูมิปกติ โดยใช้หอยเชอรี่ที่มีขนาด 4.5-5 เซนติเมตร แยกเพศของหอยเชอรี่จากวิธีการข้างต้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สังเกตผลที่ 96 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผนภาพการทดลอง

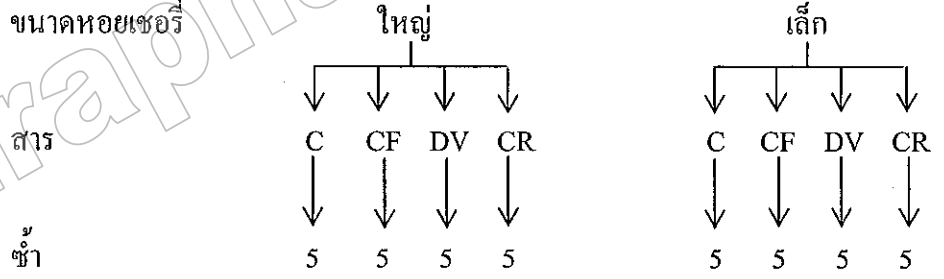


หมายเหตุ C = กลุ่มควบคุม, CF= คลอไพรีฟอส, DV= ไดคลอวอส, CR = คาร์บาริล

2. การศึกษาความแตกต่างของขนาดต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

คัดเลือกหอยตามขนาดที่ต้องการ 2 ขนาด โดยวัดส่วนที่กว้างที่สุดของเปลือกหอย โดยในหอยขนาดเล็กวัดจากฝาโอเพอคิวลัม กว้าง 1.5-2.5 cm และขนาดของหอยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดมีขนาด 3-3.5 เซนติเมตร ส่วนขนาดใหญ่วัดจากฝาโอเพอคิวลัม กว้าง 3-3.5 cm ขนาดของหอยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุด มีขนาด 5.5-7 เซนติเมตร ในการทดลองเตรียมคลอไพรีฟอสเข้มข้น3.7 μM, ไดคลอวอส เข้มข้น 4.5 μM และคาร์บาริล เข้มข้น 50 μM ในน้ำอุณหภูมิปกติ แล้วเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สังเกตผลที่ 96 ชั่วโมง การทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดเวลาเพื่อให้มีความเข้มข้นคงที่

แผนภาพการทดลอง

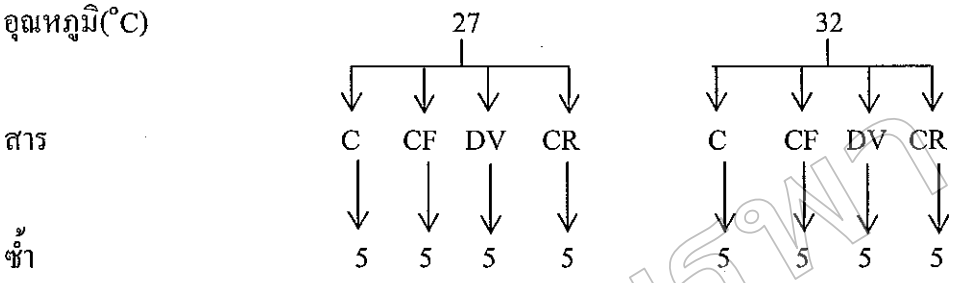


3. การศึกษาความแตกต่างของอุณหภูมิต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

เตรียมคลอไพรีฟอส คลอไพรีฟอสเข้มข้น 3.7 μM, ไดคลอวอส เข้มข้น 4.5 μM และคาร์บาริล เข้มข้น 50 μM ในน้ำ ทำการควบคุมอุณหภูมิโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ กำหนดอุณหภูมิที่ 27, 32 องศาเซลเซียสตามลำดับ ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการทดลองใช้หอยเชอรี่ขนาดเดียวกัน สังเกตผลที่ 96 ชั่วโมง การทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดเวลาซึ่งในอุณหภูมิ 27 และ 32 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิปกติที่สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

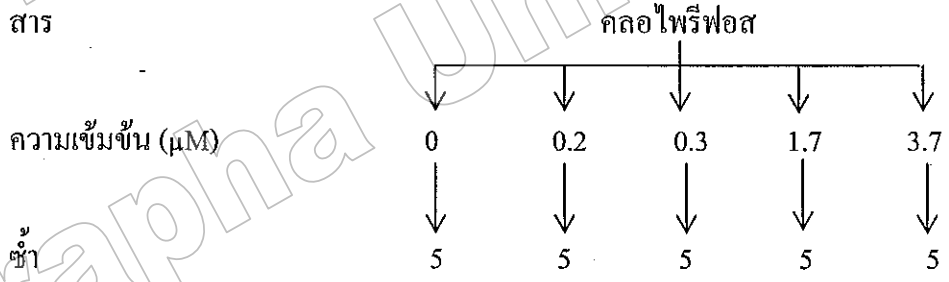
แผนภาพการทดลอง

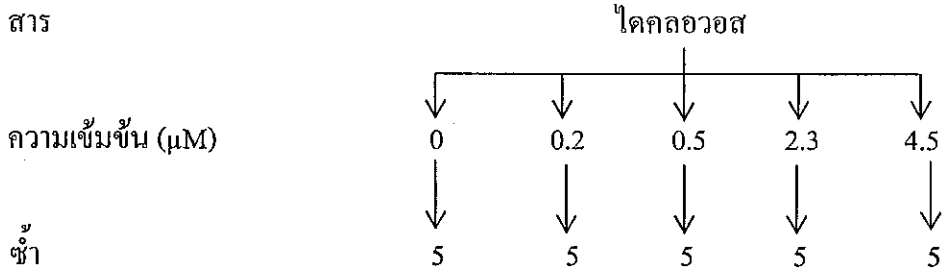


4. การศึกษาความแตกต่างของความเข้มข้นของสารต่อระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่

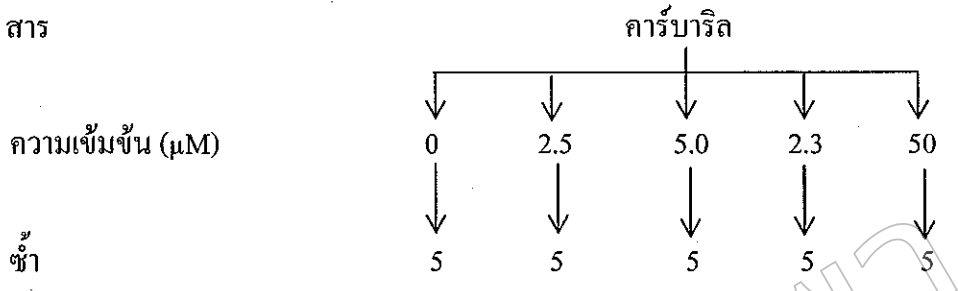
เตรียมคลอไพรีฟอสเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 1.7 และ 3.7μM (0,0.06, 0.1, 0.6 และ 1.3 mg/ l) และไดคลอวอส เข้มข้น 0, 0.2, 0.5, 2.3 และ 4.5 μM (0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/ l) คาร์บาริล เข้มข้น 0, 2.5, 5.0, 24.9, 50 μM (0, 0.5, 1, 5 และ 10 mg/ l) ในน้ำ ใช้หอยเชอรี่ขนาดใกล้เคียงกัน แล้วเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สังเกตผลที่ 96 ชั่วโมง

แผนภาพการทดลอง





มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



5. ศึกษาผลของระยะเวลาในการสัมผัส (time course) และการฟื้นตัว (recovery)ที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

5.1 ศึกษาผลของระยะเวลาในการสัมผัสสารปราบศัตรูพืช

เตรียมคลอไพรีฟอส ไดโควอสและคาร์บาริล เข้มข้น 3.7 µM, 4.5 µM และ 50 µM ตามลำดับ ในน้ำประปา ซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับ Sub-Lethal ทำการวัดการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ในระยะเวลาดังนี้ 0 นาที, นาทีที่ 10 และ 20 ชั่วโมงที่ 1, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ใช้การสุ่มเก็บหอยจำนวน 5 ตัวในแต่ละช่วงเวลา

ตารางที่ 1 แผนการทดลองของระยะเวลาที่มีผลต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

เวลา	ก่อนแช่	10 Min	20 Min	1 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
ซ้ำ	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

5.2 ศึกษาผลของระยะเวลาหลังการฟื้นตัวจากนำมาแช่ในน้ำเปล่า

หลังจาก 96 ชั่วโมงเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นน้ำเปล่า แล้วสังเกตผลที่ 5, 10 และ 30 นาที, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง, วันที่ 7, 15, 20 และ วันที่ 30

ตารางที่ 2 การศึกษาผลของระยะเวลาหลังการฟื้นตัวต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสภายหลังจากแช่ในน้ำเปล่า

5 min	10 min	30 min	1h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	7 day	15 day	20 day	30 day
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สภาวะการวิจัย

ในแต่ละการทดลองทำในตู้กระจกทรงสี่เหลี่ยมขนาด 35x70x35 cm ใส่น้ำปริมาตร 40 ลิตร ปิดด้วยตาข่ายเพื่อป้องกันหอยปีนออกนอกภาชนะ มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเข้า-ออกตลอดเวลา วัดค่า pH,DO และอุณหภูมิทุก ๆ 24 ชั่วโมง ทุก 7 วัน ใช้หอยขนาดใกล้เคียงกัน แล้วสุ่มเก็บหอย 5 ตัว เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบในแต่ละช่วงเวลา

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ค่าที่ได้จากการทดลอง วัดเป็นค่า Mean ± Standard Devation

2. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและเปอร์เซ็นการยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA)

2.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาชนิดของเนื้อเยื่อใช้ One -Way ANOVA

2.2 การทดสอบความเป็นพิษของในกลุ่มควบคุมที่มีอะซิโตนเป็นตัวทำละลายใช้ t-Test

2.3 การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองในการยับยั้งการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารปราบศัตรูพืชต่าง ๆ ใช้ One -Way ANOVA

2.4 การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองในการยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทเรสในปัจจัยด้านเพศ ขนาด และอุณหภูมิ ในสารทั้ง 3 ชนิดใช้ Two-Way Fixed Factor ANOVA

2.5 การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองในการยับยั้งการทำงานของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ในระยะเวลาต่าง ๆ ใช้ One -Way ANOVA

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University