

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. คิวปิกคลอไรด์ ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
2. แคดเมียมคลอไรด์ ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)
3. กรดไนตริกเข้มข้น (Supra HNO_3)
4. สารละลายบูแอง (Bouin's Fluid)
5. เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol)
6. ไดออกเซน (Dioxane)
7. พาราพลาสต์ (Paraplast)
8. เจลาติน (Gelatine)
9. สีอีมาทอกไซลีน (Hematoxylin)
10. สีอีโอซิน (Eosin)
11. ไชลีน (Xylene)
12. เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (n-Buthyl Alcohol)
13. เปอร์เมาท์ (Permout)
14. กลีเซอริน (Glycerin)
15. แกลเซียล อะซีติก แอซิด (Glacial Acetic Acid)
16. คลอรีน (Cl_2)

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1. ถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร จำนวน 4 ใบ
2. ถังพลาสติก ขนาด 24 ลิตร จำนวน 36 ใบ
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
4. เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO Meter)
5. เครื่องวัดค่าความเค็ม (Hand Refractometer)
6. เครื่องใช้อื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการทดลอง เช่น เครื่องให้อากาศ ที่ซ็อนปลา หินฟอง

อากาศ สายยางส่งอากาศ เป็นต้น

7. ถุงผ้าพลาสติกขนาด 1 ไมโครเมตร
8. ชุดกรองพลาสติก (Nalgene)
9. เยื่อกรองโพลีคาร์บอเนต (Polycarbonate Membrane) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร
10. ขวดพลาสติกโพลีโพรพิลีน (FLPE) ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 104 ใบ
11. เครื่องมือผ่าตัดเนื้อเยื่อ เช่น มีดผ่าตัด กรรไกร คีม เป็นต้น
12. เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome)
13. สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slide and Cover Glass)
14. เครื่องอะตอมมิก แอบซอร์ปชัน สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การเตรียมน้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำทะเลความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน เจือจางด้วยน้ำประปา กรองด้วยถุงผ้าพลาสติกขนาด 1 ไมโครเมตร นำเชื้อโรคด้วยคลอรีน โดยเติมคลอรีน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร คนให้ละลาย ใส่ถังพักไว้ 1 วัน หลังจากนั้นให้อากาศตลอดเวลา ทั้งไว้อย่างน้อย 7 วัน หรือจนกว่าตรวจสอบไม่พบคลอรีนตกค้าง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

ลูกปลากะพงขาวอายุ 30 ถึง 40 วัน น้ำหนัก 1 ถึง 2 กรัม ความยาวประมาณ 1 นิ้ว จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ตำบลสองคลอง จังหวัดสมุทรปราการ นำมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้เคยชินกับสภาพแวดล้อมที่จะใช้ทดลอง เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน ในถังไฟเบอร์ ขนาด 500 ลิตร เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียตัวเต็มวัย

การเตรียมสารละลายทองแดงและแคดเมียม

สารละลายทองแดงที่ใช้ในการทดลอง เตรียมจาก $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง 2.118 กรัม $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลายแคดเมียมที่ใช้ในการทดลอง เตรียมจาก $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง 1.632 กรัม $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองโดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (ดัดแปลงจากวิธีของ CIDA, 1993) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 การทดลองขั้นต้น (Range-Finder Test)

ทดลองเพื่อหาช่วงความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายและความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายทั้งหมด ภายใน 96 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้มากำหนดความเข้มข้นในการทดลองขั้นละเอียดต่อไป

ขั้นที่ 2 การทดลองขั้นละเอียด (Full-Scale Test)

นำผลที่ได้จากการทดลองขั้นต้นมาทำการทดลอง ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาพิษเฉียบพลันของทองแดงที่มีต่อปลากระพงขาว

ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของทองแดงที่มีต่อลูกปลากระพงขาวด้วยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเตรียมสารละลายทองแดงให้ได้ 5 ความเข้มข้น เพื่อใช้ทดสอบพิษเฉียบพลันกับลูกปลากระพงขาว ทำการทดลอง 3 ซ้ำจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้นใส่ 10 ตัวต่อปริมาตรน้ำที่ใช้ทดลอง 20 ลิตร โดยใช้วิธีจัดกลุ่มสัตว์ทดลองแบบสุ่ม เพื่อให้มีการกระจายของสัตว์ทดลองอย่างสม่ำเสมอ และใช้แคดเมียม เป็นสารอ้างอิงที่ทำควบคู่กัน (Reference Toxicant) โดยใช้ความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น และทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 27 ถึง 30 องศาเซลเซียส ระหว่างการทดลองสังเกตอาการของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อทองแดงและแคดเมียม ตรวจสอบคุณภาพน้ำเป็นประจำ คือ ออกซิเจนละลายในน้ำ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และความเค็ม เป็นต้น บันทึกการตายที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ปลาที่ตายนำออกจากการทดลองทันที โดยถือหลักการตายของปลาจากการไม่มีการเคลื่อนไหวของเหงือกและไม่ตอบสนองต่อการแตะที่ตัว ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองสำหรับการวิเคราะห์ทองแดงและแคดเมียมที่มีอยู่จริงในน้ำ

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพในอวัยวะต่าง ๆ ของลูกปลากระพงขาว เนื่องจากพิษของทองแดง (ดัดแปลงจากวิธีของ Humason, 1972)

ลูกปลากระพงขาวที่ไม่ตายจากการทดลองพิษเฉียบพลันของทองแดงจากข้อ 1 นำมาตัดเอาตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก ตับและไต

2.1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 1)

นำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ในสารละลายบูแอง (ภาคผนวก ก) เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนมาแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งไม่มีสีเหลืองของสารละลายบูแอง จากนั้นนำมาผ่านขบวนการคั่งน้ำออกในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง โดยแช่ในแอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที แอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที และแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 45 นาที

แช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และแช่ในพาราพลาสต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นทำการฝังเนื้อเยื่อด้วยพาราพลาสต์และตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ ให้มีความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ได้ติดบนสไลด์โดยใช้เจลาติน วางบนแผ่นความร้อน 24 ชั่วโมง นำสไลด์ไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและสีอีโอซิน

2.2 ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลิน-อีโอซิน (ภาพที่ 2)

นำสไลด์ที่ติดแผ่นเนื้อเยื่อแล้ว แช่ในไซลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 100, 95, 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขั้นละ 5 นาที นำมาแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลิน (ภาคผนวก ก) 40 วินาที ล้างในน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา 5 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ขั้นละ 5 นาที ย้อมด้วยสีอีโอซิน (ภาคผนวก ก) 1 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที เปลี่ยนมาแช่ในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 และ 5 นาที ตามลำดับ แช่ในไซลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้สารเปอร์มาท์ แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3. การวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงและแคดเมียม

3.1 การเตรียมตัวอย่างและการเก็บรักษาตัวอย่าง

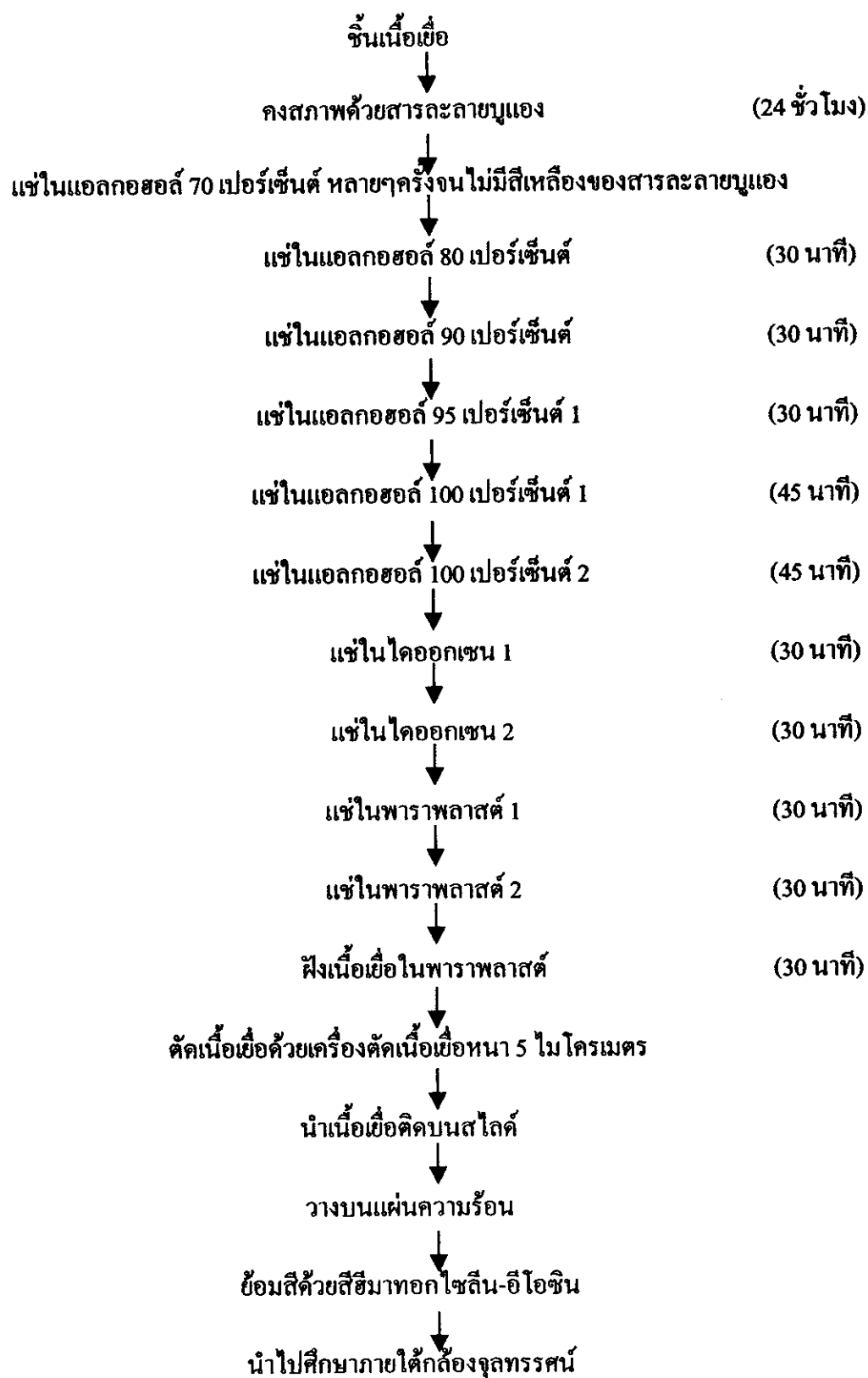
เก็บตัวอย่างน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยชุดกรองพลาสติก ผ่านเยื่อกรองโพลิคาร์บอนเนต ขนาดรู (Pore Size) 0.4 ไมโครเมตร ที่ผ่านการแช่ด้วยกรดไนตริก 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วล้างกรอออกด้วยน้ำกลั่น (Double Distilled Water) ตามด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ (Deionized Water) ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำที่ได้หลังการกรองไว้ในขวดพลาสติกโพลิโพรพิลีน โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ต่ำกว่า 2 ด้วยการเติมกรดไนตริกเข้มข้น ก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.2 การวิเคราะห์โลหะหนัก

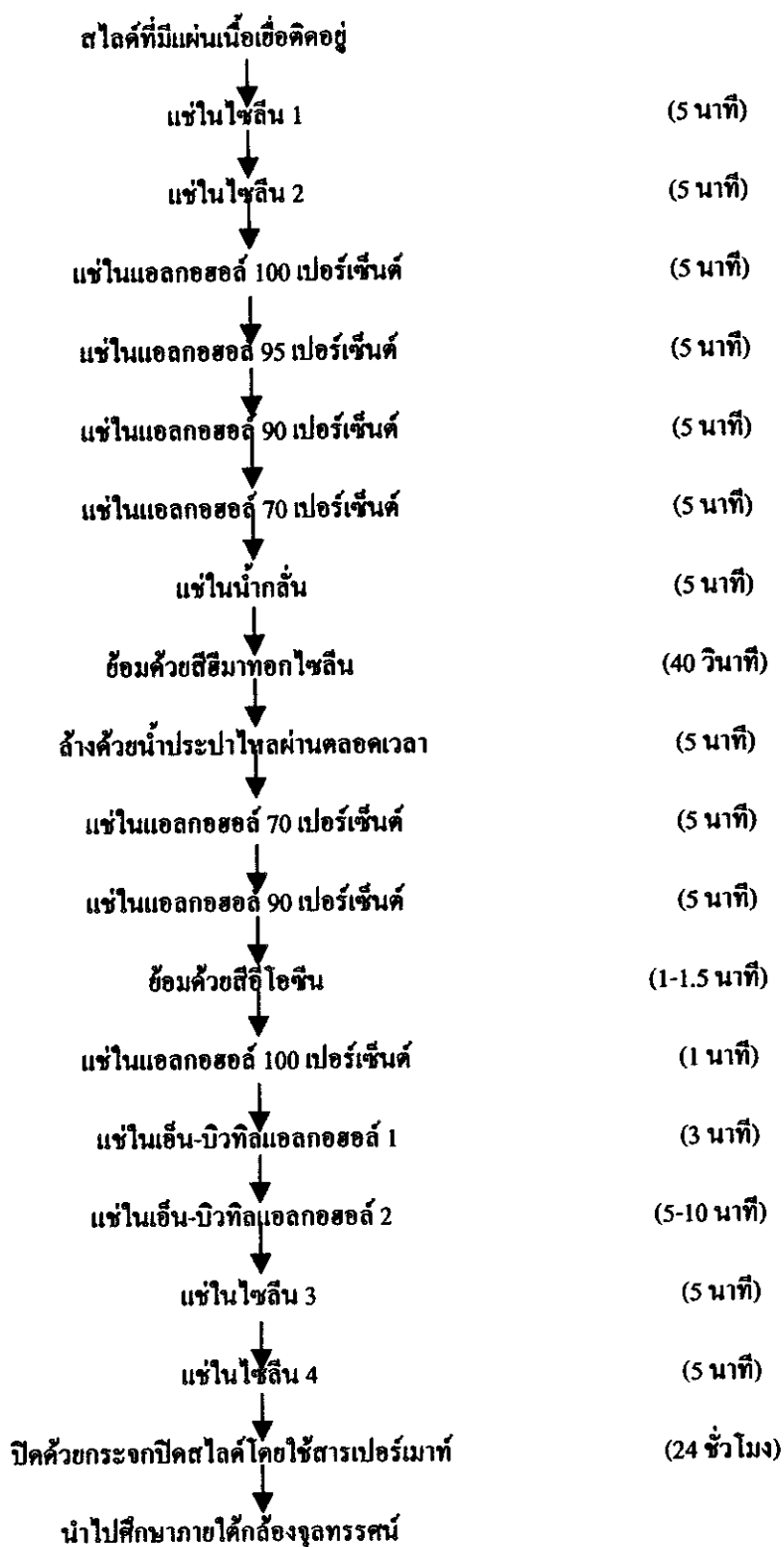
ทำการวิเคราะห์หาปริมาณทองแดงและแคดเมียมในน้ำที่ทดลองโดยใช้วิธีวัดโดยตรง ด้วยเครื่องอะตอมมิก แอ็บซอร์พชัน สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Flame Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS (PERKIN ELMER, AAnalyst 100))

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความเข้มข้นของทองแดง ที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (96-h LC₅₀) และช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป EFFL (CIDA, 1993)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเชื่อมสีอีมาทอกไซลีน-อีโอซิน