บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

สถานที่ ห้องปฏิบัติการทดลอง ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1. <u>อุปกรณ์ที่ใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ</u>

- ขวดมาตรฐาน (Volumetric flask) ขนาด 100 มล. และ 250 มล.
- ขวดปากแคบขนาด 100 มล. พร้อมจุก
- micro-syringe ขนาด 10^3 µl
- แผ่นกรองมิลลิพอร์ (Millipore filter) ขนาดรู 0.45 ไมครอน
- ผ้ากรองตาละเอียด (70 ไมครอน)
- Sedgwick Rafter cell ขนาดความจุ 1 มล.
- เครื่องปั่น (Tomy Seiko Co., Ltd Moder TD-65)
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)

2. <u>อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ดีดีทีและบีเอชซี</u>

- เครื่องวัดกัมมันตภาพรังสี Liquid Scintillation counter (Packard Tri-carb Liquid Scintillation Spectometer Automatic Control Model 578)
- Scintillation vial ขนาด 20 มล.

3. สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ดีดีทีและบีเอชซี

- โซลูอีน (Soluene) 0.5N Quaternary Ammonium hydroxide in toluene
- อินสตา-เจล (Insta-gel)

วิธีดำเนินงาน

ตอนที่ 1 การศึกษาในคลอเรลลา

ก. การศึกษาเกี่ยวกับการสะสมของดีดีทีและบีเอชซีในคลอเรลลา

1. การเตรียมสารละลายสารประกอบออร์แกนโนคลอรีน

สารประกอบออร์แกนโนคลอรีนที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด คือ ดีดีที (dichlorodiphenyl trichloroethane) 100 เปอร์เซนต์ และบีเอชซี (Benzene hexachloride) 30 เปอร์เซนต์ มีลักษณะเป็นผงทั้งสองชนิด ซึ่งได้จากโรงงานเจี่ยไต๋เกษตรกรรม

1.1 การเตรียมสารละลาย ^{14}C-labelled DDT

ใช้คาร์บอน-14-ดีดีทีเป็นตัวติดตาม (tracer) มีกัมมันตภาพจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 29.7 m Ci/m mol. (83.4 u Ci/mg)

เตรียมสารละลายดีดีทีให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการชั่งดีดีที 25 มิลลิกรัม ละลายด้วยเบนซีน (Benzene) ให้ได้ 250 มล. จากนั้นเจือจางสารละลายนี้ให้ได้ความเข้มข้น 4 ระดับ ในขวดมาตรฐานขนาด 100 มล. แล้วจึงหยดคาร์บอน-14-ดีดีที เล็กน้อยเท่า ๆ กันลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ^{14}C-labelled DDT เท่ากับ 1, 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมล. เขย่าขวดแล้วเก็บรักษาในที่อุณหภูมิต่ำ

1.2 การเตรียมสารละลาย ^{14}C-labelled BHC

ใช้คาร์บอน-14-บีเอชซีเป็นตัวติดตาม (tracer) มีกัมมันตภาพจำเพาะ (Specific activity) เท่ากับ 50 m Ci/m mol (171 u Ci/mg)

เตรียมสารละลายบีเอชซีให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยการชั่งบีเอชซี 83.3 มิลลิกรัม ละลายด้วยโทลูอีน (Toluene) ให้ได้ 250 มล. จากนั้นเจือจางสารละลายนี้ให้ได้ความเข้มข้น 4 ระดับ ในขวดบาตรฐานขนาด 100 มล. แล้วจึงหยดคาร์บอน-14 -บีเอชซี เล็กน้อยเท่า ๆ กันลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ^{14}C-labelled BHC เท่ากับ 1, 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมล. เขย่าขวดแล้วเก็บรักษาในที่อุณหภูมิต่ำ

2. <u>การหาปริมาณของ ^{14}C-labelled organochlorine compounds ที่ติดค้างบนกระดาษกรอง</u>

003993

ในการทดลองใช้แผ่นกรองมิลลิพอร์ (Millipore filter) 0.45 ไมครอน กรองตัวอย่างทดลอง แม้ว่าดีดีทีและบีเอชซีเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่ารูกระดาษกรองมาก แต่อาจติดค้างบนแผ่นกรองได้เพื่อลดข้อผิดพลาดนี้ จึงทำการทดสอบการกรองซึ่งสามารถทดสอบได้ โดยกรองสารละลาย ^{14}C-labelled DDT และ ^{14}C-labelled BHC ทุกความเข้มข้นที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยการเตรียมน้ำเลี้ยงสาหร่ายขวดละ 100 มล. หยดสารละลาย ^{14}C-labelled DDT ลงไป 0.1 มล. ในแต่ละขวด ดังนั้นจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ^{14}C-labelled DDT แต่ละขวดเป็น 1, 5, 10 และ 50 ไมโครกรัม/ลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40-50°ซ ประมาณ 3-5 นาที วางทิ้งให้เย็นนำน้ำที่เตรียมนี้ 10 มล. กรองด้วยแผ่นกรองมิลลิพอร์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 50-100 มล. แล้วนำกระดาษกรองนี้ไปละลายด้วยโซลูอีน 1 มล. ผสมกับสารละลาย Scintillator ในที่นี้ใช้อินสตา-เจล 10 มล. ใน Scintillation vial เก็บในตู้เย็น 1 คืน นำไปวัดกัมมันตภาพรังสีด้วย Liquid Scintillation counter จะได้ปริมาณของกัมมันตภาพรังสีจำนวนหนึ่งที่ติดบนแผ่นกรองมีหน่วยเป็น Cpm (Count per minute) นำค่าที่ได้นี้ไปหักออกจากค่าที่ได้จากการทดลองกับคลอเรลลา เพื่อให้ได้ค่ากัมมันตภาพรังสีที่ติดคลอเรลลาจริง ๆ ทำการทดสอบแบบเดียวกันนี้ด้วย ^{14}C-labelled BHC

3. <u>การเพาะเลี้ยงคลอเรลลา</u>

เพาะเลี้ยงคลอเรลลาน้ำเค็มและน้ำจืดแบบ Batch culture ในห้องปฏิบัติการใช้สูตรน้ำเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียวของ Allen and Nelson (1910) เป็นสูตรน้ำเลี้ยง

สาหร่ายแบบใช้น้ำทะเลหรือน้ำจืดแล้วแต่กรณีผสมธาตุอาหารที่เตรียมขึ้นตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรน้ำเลี้ยงสาหร่ายของ Allen and Nelson (1910)

	ส่วนผสม		
สารละลาย A	KNO_3	20.2	กรัม
	H_2O	100	มล.
สารละลาย B	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	4	กรัม
	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	4	กรัม
	HCl (conc.)	2	มล.
	$FeCl_3$ (melted)	2	มล.
	H_2O	80	มล.

น้ำทะเล : สารละลาย A : สารละลาย B = 1000 : 2 : 1 (มล.)
น้ำจืด : สารละลาย A : สารละลาย B = 1000 : 2 : 1 (มล.)

โดยเตรียมสารละลาย A และ B ตามส่วนผสมในตารางตอนบนแยกกันไว้ก่อน เมื่อจะใช้จึงเติมสารละลาย A และ B ลงในน้ำทะเลหรือน้ำจืดตามส่วนผสมในตารางตอนล่างสุด

น้ำทะเลและน้ำจืดที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายจะต้องกรองด้วยแผ่นกรองมิลลิพอร์และฆ่าเสียก่อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจึงหยดสารละลาย A และ B ตามสูตร แล้วจึงใส่คลอเรลลาลงไปเลี้ยงในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25–27 °ซ ให้แสงด้วยหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 3 หลอด มีระยะห่าง 25 ซ.ม. (2688 ลักส์) และให้อากาศตลอดเวลา ปากขวดปิดด้วยสำลี อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายทุกอย่าง อบที่อุณหภูมิ 80 °ซ ก่อนใช้ทุกครั้ง

สำหรับคลอเรลลาน้ำเค็มเลี้ยงที่ความเค็ม 20%. การผสมน้ำทะเลและน้ำจืดเพื่อให้ได้ความเค็มตามต้องการนี้ กระทำได้โดยการคำนวณหาจากสูตรคำนวณสารละลาย

ตามสมการ $N_1V_1 = N_2V_2$

เมื่อ N_1 คือค่าความเค็มของน้ำทะเล

N_2 คือค่าความเค็มของน้ำที่ต้องการ

V_1 คือปริมาตรของน้ำทะเล

V_2 คือปริมาตรของน้ำผสมแล้ว

4. การเตรียมตัวอย่างทดลอง

4.1 การทดลองการสะสมของ ดีดีที และ บีเอชซี ในคลอเรลลาน้ำเค็ม

4.1.1 เตรียมน้ำเลี้ยงสาหร่ายตามวิธีในข้อ 3 ให้มีความเค็มประมาณ 20 %. ในการทดลอง ทดลองในขวดปากแคบขนาด 100 มล. ดังนี้

บรรจุน้ำเลี้ยงสาหร่าย 20 มล. ด้วยกระบอกตวงลงในขวดปากแคบ หยดสารละลาย ^{14}C-labelled DDT ที่เตรียมไว้แล้วในตอนแรก 0.1 มล. ด้วย ไมโครซิรินจ์ นำไปอุ่นให้เบนซีนระเหยที่อุณหภูมิ 40–50 °ซ. ประมาณ 3–5 นาที ปิดจุกทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมคลอเรลลาซึ่งเพาะเลี้ยงเตรียมไว้แล้ว 80 มล. ลงไป เขย่าขวดจะได้คลอเรลลาขวดละ 100 มล. และได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย ^{14}C-labelled DDT ในแต่ละขวดเท่ากับ 1, 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร นำขวดที่เตรียมได้นี้ไปทดลองในห้องที่มีอุณหภูมิ 25–27 °ซ ให้แสงจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 3 หลอด และอยู่ห่างจากขวดทดลอง 50 ซม. (672 ลักส์) เป็นเวลา 18 วัน เขย่าขวดบ่อย ๆ ตลอดการทดลอง

4.1.2 นับจำนวนเซลล์คลอเรลลาแรกเริ่มการทดลองทุกครั้งโดยใช้ฮีมาไซโทมิเตอร์

การทดลองในแต่ละความเข้มข้นจะทดลองกับคลอเรลลาที่ตายแล้วด้วย โดยการเตรียมการทดลองเหมือนครั้งแรก ต่างกันที่บรรจุน้ำเลี้ยงสาหร่ายครั้งแรกเพียง 18 มล. เพื่อจะได้เติมฟอร์มาลิน 40 % อีก 2 มล. หลังจากเติมคลอเรลลาลงไปแล้ว

เตรียมตัวอย่างทดลองอีกชุดหนึ่งโดยใช้ ^{14}C - labelled BHC เตรียมเหมือนครั้งแรก

4.2 การทดลองการสะสมดีดีทีและบีเอชซีในคลอเรลลาน้ำจืด

วิธีการทดลองเหมือนข้อ 4.1 ทุกประการ ยกเว้นน้ำเลี้ยงสาหร่ายเป็นน้ำจืดเท่านั้น และใช้คลอเรลลาน้ำจืดแทน

4.3 การทดลองนี้ทำซ้ำ 2 ชุด

5. <u>การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์</u>

ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเก็บทุก 3 วัน หลังจากทำการทดลองคือ 3, 6, 9, 12, 15 และ 18 วัน รวมทั้งหมดความเข้มข้นละ 6 ครั้ง แต่ละครั้งในการเก็บตัวอย่างนับจำนวนเซลล์ด้วย

6. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

ทำการวัดกัมมันตภาพรังสีคาร์บอน–14–ดีดีที และคาร์บอน–14–บีเอชซีด้วย Liquid Scintillation Counter โดยการกรองตัวอย่าง 10 มล. จากขวดทดลองด้วยแผ่นกรองมิลลิพอร์ (0.45 ไมครอน) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 50–100 เมื่อดูดกรองจนแห้งสนิทแล้ว นำส่วนที่กรองได้นี้ใส่ใน Scintillation vial ซึ่งเป็นขวดเฉพาะที่ใช้กับเครื่องวัดกัมมันตภาพรังสีนี้เติมโซลูอีน 1 มล. ผสมกับอินสตา–เจล 10 มล. เก็บในตู้เย็น 1 คืน เพื่อให้โซลูอีนละลายคลอเรลลาและกระดาษกรองให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกับอินสตา–เจล จึงนำไปเข้าเครื่องวัดกัมมันตภาพรังสี ค่าที่วัดไว้มีหน่วยเป็น cpm (ในการวัดตัวอย่างละ 5 นาที แล้วหารค่าที่วัดได้ด้วย 5 ได้ค่าเป็น cpm หลังจากหักออกด้วยปริมาณออร์แกนโนรีนที่มีหน่วยเป็น cpm ที่ติดแผ่นกรอง แล้วนำค่าที่เหลือนี้ไปคำนวณหาปริมาณออร์แกนโนคลอรีนที่สะสมในคลอเรลลาตามสมการดังนี้

$$\frac{\text{Radioactivity added}}{\text{Organochlorine added}} = \frac{\text{Radioactivity measured}}{\text{Organochlorine accumulated}}$$

Radioactivity added = ปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่ใส่ในตอนแรก (cpm)

Organochlorine added = ปริมาณออร์แกนโนคลอรีนที่ใส่ในตอนแรก (ไมโครกรัม)

Radioactivity measured = ปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้หลังจากทดลอง (cpm)

Organochlorine accumulated = ปริมาณสารประกอบออร์แกนโนคลอรีนที่สะสมในสาหร่าย (คลอเรลลา) (ไมโครกรัม)

ปริมาณกัมมันตภาพรังสีและปริมาณสารประกอบออร์แกนโนคลอรีนที่ใส่ในตอนแรก ทราบค่าก่อนแล้วโดยวัดกัมมันตภาพรังสีด้วย Liquid Scintillation Counter และได้จากการเตรียมตามลำดับ

ตัวอย่าง การหาปริมาณสารประกอบออร์แกนโนคลอรีนที่สะสมในสาหร่าย

สมมุติ สารละลายออร์แกนโนคลอรีนที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ มล. และในการทดลองกับสาหร่ายใช้เพียง 0.1 มล. หยดสารละลายออร์แกนโนคลอรีน 0.1 มล. นี้ใส่ในขวดที่ใช้กับเครื่องวัดกัมมันตภาพรังสี ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยสักครู่ จึงใส่กระดาษกรองที่สะอาด 1 แผ่น เติมโซลูอีน 1 มล. ผสมกับอินสตา–เจล 10 มล. เก็บในตู้เย็น 1 คืน จึงนำไปวัดกัมมันตภาพรังสีเป็น cpm ถ้าวัดได้เท่ากับ a cpm ต่อ 0.1 มล. แสดงว่าวัดกัมมันตภาพรังสีได้ a cpm ประกอบด้วยเนื้อสารออร์แกนโนคลอรีนเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม

ถ้าในการทดลองกับคลอเรลลาจำนวน y ล้านเซลล์ วัดกัมมันตภาพรังสี b cpm

จะมีเนื้อสารออร์แกนโนคลอรีนประกอบอยู่ = $\frac{0.1 \times b}{a}$ ไมโครกรัม

จากนั้นนำค่านี้คำนวณหาปริมาณสารประกอบออร์แกนโนคลอรีนที่สะสมในคลอเรลลาต่อ 1 ล้านเซลล์ได้

7. วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสะสมสารประกอบออร์แกนโนคลอรีนกับเวลาที่ทำการทดลองโดยการหาค่าสหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient = r) จากสูตรต่อไปนี้ (Spiegel, 1961)

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{1}{n}\Sigma x \Sigma y}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - \frac{1}{n}(\Sigma x)^2\right]\left[\Sigma y^2 - \frac{1}{n}(\Sigma y)^2\right]}}$$

ทดสอบสมมุติฐานโดยใช้ T-test two tail จากสูตร

$$t_{0.05} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad , d.f = n - 2.$$

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ข. การศึกษาอิทธิพลของ แสง ความเค็ม และอุณหภูมิที่มีต่อการสะสม ดีดีที ในคลอเรลลาน้ำเค็ม

1. การเตรียมสารละลาย ^{14}C-labelled DDT และเพาะเลี้ยงคลอเรลลาน้ำเค็ม

1.1 ใช้สารละลาย ^{14}C-labelled DDT ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1 หัวข้อ ก. ในตอนที่ 1

1.2 เพาะเลี้ยงคลอเรลลาน้ำเค็มเหมือนข้อ 2 หัวข้อ ก. ในตอนที่ 1

2. การเตรียมตัวอย่างทดลอง

เตรียมอุปกรณ์ทดลองทำนองเดียวกับข้อ 4.1.1 หัวข้อ ก. ในตอนที่ 1 อีก 3 ชุด โดยทดลองกับ ^{14}C-labelled DDT ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ มล. เพียงความเข้มข้นเดียวเพื่อไม่ให้มีปัญหาที่จะเกิดจากอิทธิพลของความเข้มข้นสูงที่มีต่อการแบ่งเซลล์

จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย ^{14}C-labelled DDT ทุกขวดเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดที่ 1 <u>ศึกษาอิทธิพลของแสง</u>

ทดลองกับความเข้มแสงต่างกัน 3 ระดับ โดยใช้หลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 3 หลอด โดยวางตัวอย่างทดลองให้ห่างจากหลอดไฟ 3 ระยะคือ 25,50 และ 75 ซม. ซึ่งจะได้ความเข้มแสงเท่ากับ 2688,672 และ 298 ลักส์ ตามลำดับ ทดลองในห้องที่มีอุณหภูมิ 25-27 °ซ. และความเค็มของน้ำเลี้ยงสาหร่ายประมาณ 20 %.

ชุดที่ 2 <u>ศึกษาอิทธิพลของความเค็ม</u>

ทดลองในน้ำเลี้ยงสาหร่ายที่มีความเค็ม 3 ระดับ คือ 15,25 และ 35 %. ให้แสงจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 3 หลอด โดยอยู่ห่างจากหลอดไฟ 50 ซม. (672 ลักส์) อุณหภูมิห้องทดลอง 25–27 °ซ.

ชุดที่ 3 <u>ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ</u>

ทดลองให้อุณหภูมิต่างกัน 2 ระดับ ที่อุณหภูมิ 20 °ซ. โดยทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิและ 27 °ซ. ทดลองในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิปกติในประเทศไทย ให้แสงจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 1 หลอด โดยห่างจากหลอดไฟประมาณ 25 ซม. (896 ลักส์)

3. <u>การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์</u>

ชุดที่ 1 เก็บตัวอย่างหลังจากทดลอง 9 วัน
ชุดที่ 2 เก็บตัวอย่างหลังจากทดลอง 9 วัน
ชุดที่ 3 เก็บตัวอย่างหลังจากทดลอง ดังนี้

$\frac{1}{6}$, 24, 48, 72 และ 216 ชั่วโมง

4. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

ทำการวัดกัมมันตรังสีด้วย Liquid Scintillation counter และวิธีดำเนินการวัดเช่นเดียวกับข้อ 6 หัวข้อ ก ในตอนที่ 1 ทุกประการ

5. <u>วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

5.1 วิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance)แผนแบบสุ่มตลอด (Completely Random design, CRD) ของการสะสมคีคีที่ในคลอเรลลาน้ำเค็ม เนื่องจากได้รับทรีทเมนต์ที่ต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ได้จากสูตรต่อไปนี้ (จรัญ, 251ง)

$$SStotal = \sum_{ij} x_{ij}^2 - \frac{T_{..}^2}{nk} \quad , \quad T_{..} = \sum\sum x_{ij}$$

$$SStreatment = \frac{T_{i.}^2}{n} - \frac{T_{..}^2}{nk} \quad , \quad T_{i.} = \sum_{j=1}^{n} x_{ij}$$

SSerror = SStotal - SStreatment

n = จำนวนตัวอย่างทั้งหมดต่อหนึ่ง treatment

k = จำนวน treatment

ANOVA

Source of variation	SS	df	MS	F
total	$x_{ij}^2 - \frac{T_{..}^2}{nk}$	nk - 1		
treatment	$\frac{T_{i.}^2}{n} - \frac{T_{..}^2}{nk}$	k - 1	$\frac{SStreatment}{k-1}$	$\frac{MStreatment}{MSerror}$
error	SStotal-SStreatment	k(n-1)	$\frac{SSerror}{k(n-1)}$	

5.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณการสะสม ดีดีที เนื่องจากได้รับทรีทเม้นต์ที่ต่างกันโดยใช้วิธี Least Significant difference (LSD) จากสูตรต่อไปนี้ (จรัญ, 2519)

$$LSD = t \cdot \sqrt{\frac{2S^2}{n}} \quad , \quad t \text{ มี } df = df \text{ of MSE } (S^2)$$

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตอนที่ 2 การศึกษาในโรติเฟอร์น้ำเค็ม (Brachionus plicatilis)

ก. การศึกษาการสะสมของ ดีดีที ในโรติเฟอร์โดยตรง

1. การเตรียมสารละลาย ^{14}C-labelled DDT

ใช้สารละลาย ^{14}C-labelled DDT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ มล. ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1 หัวข้อ ก. ในตอนที่ 1

2. การเพาะเลี้ยงโรติเฟอร์น้ำเค็ม

เพาะเลี้ยงโรติเฟอร์แบบ batch culture ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร เลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25–27 °ซ.

น้ำที่ใช้เลี้ยงโรติเฟอร์ใช้น้ำทะเลผสมและกรองให้สะอาดมีความเค็มประมาณ 20 %. วางไว้ให้เย็น ใส่โรติเฟอร์ซึ่งแยกไว้บริสุทธิ์แล้วลงไป ให้แสงจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 1 หลอด วางห่างจากภาชนะที่เลี้ยงโรติเฟอร์ประมาณ 50 ซม. (224 ลักส์) เลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวคือ คลอเรลลาน้ำเค็ม

3. การเตรียมตัวอย่างทดลอง

3.1 บรรจุน้ำเลี้ยงโรติเฟอร์ 20 มล. ลงในขวดปากแคบ ขนาด 10 มล. หยดสารละลาย ^{14}C-labelled DDT 0.1 มล. ด้วยไมโครซิรินจ์ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40–50 °ซ ประมาณ 3–5 นาที ปิดจุกแล้ววางไว้ให้เย็น

3.2 กรองโรติเฟอร์ออกจากสต๊อกที่เลี้ยงไว้ด้วยผ้ากรองละเอียดขนาดตาประมาณ 70 ไมครอน โรติเฟอร์ซึ่งมีขนาดรูปร่างใหญ่กว่าคลอเรลลาจะติดอยู่บนผ้ากรองคลอเรลลา ที่ให้เป็นอาหารจะผ่านรูผ้ากรองออกไป ล้างโรติเฟอร์บนผ้ากรองด้วยน้ำเลี้ยงโรติเฟอร์ที่สะอาด 3–4 ครั้ง จากนั้นนำโรติเฟอร์นี้ใส่ลงในอีกภาชนะหนึ่งซึ่งเตรียมน้ำเลี้ยงโรติเฟอร์ไว้แล้ว ก็จะได้สต๊อกของโรติเฟอร์ที่ไม่มีคลอเรลลาเจือปน จากนั้นนำโรติเฟอร์ที่ได้นี้ 80 มล. เติมลงในขวดทดลองในข้อ 3.1 ด้วยกระบอกตวง จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ^{14}C-labelled DDT ในขวด เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.3 นับจำนวนโรติเฟอร์เริ่มแรกในแต่ละขวดได้เท่ากับ 100 ตัวต่อ มล. ด้วย Sedgwick Rafter cell ที่มีขนาดความจุ 1 มล. ทดลองในห้องที่มีอุณหภูมิ 25–27 °ซ. ให้แสงจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ 1 หลอด โดยวางห่างจากหลอดไฟ 50 ซม. (224 ลักส์) ระหว่างการทดลองเขย่าขวดบ่อย ๆ และไม่มีการให้อาหารระหว่างการทดลอง

3.4 การทดลองศึกษาการสะสมของ ดีดีที ในโรติเฟอร์ที่ตายแล้ว โดยเตรียมการทดลองเหมือนข้างต้น ต่างกันที่บรรจุน้ำเลี้ยง โรติเฟอร์ในขวดปากแคบครั้งแรกเพียง 18 มล. เพื่อจะเติมฟอร์มาลีน 40 % อีก 2 มล. หลังจากเติมโรติเฟอร์ลงไปแล้ว

4. <u>การเก็บรวบรวมตัวอย่าง</u>

ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังจากทดลอง ดังนี้

3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 9 ชั่วโมง
24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง

แต่ละครั้งในการเก็บตัวอย่างนับจำนวนโรติเฟอร์ด้วย

5. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

ทำการวัดกัมมันตภาพรังสีคาร์บอน–14–ดีดีที ด้วย Liquid Scintillation counter โดยการกรองตัวอย่างจากขวดทดลองขวดละ 10 มล. แต่ละ 10 มล. กรอง 2 ครั้ง ดังนี้ ครั้งแรกกรองด้วยผ้ากรองอย่างละเอียดขนาดตา 70 ไมครอน ล้างโรติเฟอร์ที่ติดบนผ้ากรอง

ด้วยน้ำกลั่น 2–3 ครั้ง เพื่อทิ้ง ^{14}C-labelled DDT ส่วนที่เหลือจากการถูกดูดซึมโดยโรติเฟอร์เสียก่อน นำโรติเฟอร์ที่กรองได้นี้ใส่ในบีเกอร์ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุน้ำเกือบเต็ม อีกครั้งแล้วจึงนำมาดูดน้ำออกให้แห้งด้วยแผ่นกรองมิลลิพอร์จนแห้ง แล้วนำส่วนที่กรองได้นี้ใส่ใน Scintillation vial เติมโซลูอีน 1 มล. ผสมกับอินสตา–เจล 10 มล. เก็บในตู้เย็น 1 คืน เพื่อให้โซลูอีนละลายโรติเฟอร์และกระดาษกรองจนผสมเป็นเนื้อเดียวกับอินสตา–เจล จึงนำไปวัดกัมมันตรังสีด้วยเครื่องวัดดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 5 นาที แล้วคำนวณให้เหลือ 1 นาที จะได้เป็น cpm นำค่าที่ได้นี้ไปคำนวณหาปริมาณดีดีทีที่สะสมได้ตามสมการเหมือนในคอลเรลลา

ข. <u>การศึกษาการสะสมของดีดีทีในโรติเฟอร์น้ำเค็มโดยผ่านทางคลอเรลลาน้ำเค็ม</u>

1. <u>การเตรียมสารละลาย ^{14}C-labelled DDT</u>

ใช้สารละลาย ^{14}C-labelled DDT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมล. ที่เตรียมไว้แล้วในตอนต้น

2. <u>เตรียมคลอเรลลาและโรติเฟอร์น้ำเค็ม</u>

ใช้คลอเรลลาน้ำเค็มและโรติเฟอร์น้ำเค็ม ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้แล้ว

3. <u>การเตรียมตัวอย่างทดลอง</u>

3.1 เตรียมโรติเฟอร์ไว้ในบีเกอร์ (ขนาด 250 มล.) 100 มล. มีจำนวนโรติเฟอร์เท่ากับ 100 ตัวต่อมล. เป็นโรติเฟอร์ที่กรองคลอเรลลาที่ใช้เป็นอาหารออกหมดแล้ว

3.2 เตรียมคลอเรลลาซึ่งให้มีการสะสมของดีดีทีเป็นเวลา 10 นาที ในขวดปากแคบขนาด 100 มล. ใช้ความเข้มข้นของดีดีที 1 ไมโครกรัมต่อมล. โดยเตรียมการทดลองเหมือนข้อ 4.1.1 หลังจากให้ดีดีทีคลอเรลลาแล้วนำตัวอย่างทั้งขวดไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วดูดส่วนที่เป็นน้ำออกให้มากที่สุด เพื่อให้เหลือ ^{14}C-labelled DDT ที่ติดอยู่กับคลอเรลลาเท่านั้น ฉะนั้นรวมเวลาทั้งหมดที่คลอเรลลาสัมผัสกับดีดีที 30 นาที นำคลอเรลลาที่ได้นี้ให้เป็นอาหารของโรติเฟอร์ ให้มีปริมาณมากเกินพอ การทดลองครั้งนี้แยกเป็น 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ทดลองในห้องที่มี อุณหภูมิ 20 °ซ
ชุดที่ 2 ทดลองในห้องที่มี อุณหภูมิ 27 °ซ

4. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างหลังจากให้อาหารโรติเฟอร์แล้ว 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง

5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำวิธีเดียวกับ ข้อ 5 หัวข้อ ก. ในตอนที่ 2