บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. จุลินทรีย์กำจัดแมลง

แบคทีเรีย	Bacillus thuringiensis var. israelensis, serotype H-14
สูตร	IPS-78 (International Pasteur Standard 1978)
ประสิทธิภาพ	1000 ITU Aedes aegypti ต่อ มก.
ส่วนประกอบ	ส่วนผสมเชิงซ้อนสปอร์และผลึก (spore crystal complex)
สถานะ	ของแข็ง (ผง)
สี	น้ำตาลเหลือง

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 หนูตะเภา สำหรับให้อาหารเลือดแก่ยุงตัวเต็มวัย

2.2 ยุงก้นปล่อง Anopheles (Cellia) dirus Peyton & Harrison

2.3 ยุงก้นปล่อง An. (Cel.) minimus Theobald

จากฝ่ายวิจัยประยุกต์ กองมาลาเรีย กระทรวงสาธารณสุข

3. อาหารสัตว์ทดลอง

3.1 หญ้ายนอ่อน สำหรับเลี้ยงหนูตะเภา

3.2 อาหารสุนัขปน สำหรับลูกน้ำยุงก้นปล่อง

3.3 สารละลายวิตามินเข้มข้น 5 % สำหรับยุงตัวเต็มวัย

4. วัสดุและอุปกรณ์

4.1 ถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว สำหรับยุงวางไข่

4.2 กระดาษกรอง สำหรับบุถ้วยวางไข่และซับน้ำ

4.3 ถาดพลาสติกขนาด 10 x 15 นิ้ว สำหรับเลี้ยงลูกน้ำ

4.4 eye dropper สำหรับดูดลูกน้ำยุง

4.5 ล่วิงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว สำหรับย้อนลูกน้ำ

4.6 กรงมุ้งลวดขนาด 6 x 6 x 6, 10 x 10 x 10 และ 10 x 10 x 20 นิ้ว สำหรับเลี้ยงยุงตัวเต็มวัย

4.7 aspirator สำหรับดูดยุงตัวเต็มวัย

4.8 แก้วกระดาษ

4.9 สำลี

4.10 หลอด vial ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. สูง 8 ซม. สำหรับแยกยุงตัวเต็มวัยเพื่อผสมพันธุ์

4.11 เข็มปักยุง

4.12 air pump

4.13 anesthetic ether สำหรับล่อบยุงตัวเต็มวัย

4.14 บีกเกอร์ ขนาด 250 และ 1000 มล.

4.15 กระบอกตวงขนาด 100 มล.

4.16 pipette ขนาด 1, 5 และ 10 มล.

4.17 volumetric flask ขนาด 250 มล.

4.18 เครื่องชั่งไฟฟ้า

4.19 เทอร์โมมิเตอร์

4.20 autoclave

4.21 foil paper

4.22 กรดซัลฟูริกเข้มข้น สำหรับปรับ pH ของน้ำ

4.23 สารละลาย NaOH เข้มข้น สำหรับปรับ pH ของน้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอน 1. การเพาะเลี้ยงยุงก้นปล่อง An. (Cel.) dirus และ An. (Cel.) minimus

นำไข่ยุงก้นปล่องมาใส่ลงในถ้วยพลาสติกบุกระดาษกรองบรรจุน้ำไว้ 2 ใน 3 ส่วน ทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน ไข่จะฟักเป็นระยะที่ 1 ถ่ายลูกน้ำลงสู่ถาดพลาสติกใหญ่ที่มีน้ำอยู่สูง 4 ซม. โดยการใช้ไม้กวาดกระดาษกรองบริเวณก้นถ้วยพลาสติกให้ขาดแล้วค่อย ๆ ยกกระดาษกรองขึ้น เปลือกไข่และไข่ที่ไม่ฟักจะติดอยู่บนกระดาษกรอง ตัวลูกน้ำจะไหลลงสู่ถ้วยพลาสติกไปกับน้ำ หลังจากถ่ายลูกน้ำแล้ว ควรให้มีลูกน้ำอยู่ประมาณ 100-200 ตัวต่อ 1 ถาด ถ้าจำนวนหนา

แน่นเกินไปจะมีผลต่อการเจริญเติบโตทำให้มีอัตราการตายสูงและลูกน้ำตัวเล็กกว่าปกติ โรยอาหารลูกน้ำโดยใช้อาหารสุนัขป่นเป็นผงละเอียดวันละ 2-3 ครั้ง ระวังอย่าให้อาหารมากเกินไปเพราะทำให้น้ำเป็นฝ้า ต้องคอยใช้กระดาษกรองซับฝ้าทิ้ง มิฉะนั้นลูกน้ำหายใจไม่ออกจะตายหมด

ประมาณ 10-15 วันลูกน้ำจะเข้าดักแด้ ใช้ eye dropper ดูดเก็บดักแด้จากถาดแยกใส่ถ้วยพลาสติกนำไปใส่ไว้ในกรงมุ้งลวดภายใน 2-3 วันจะได้ตัวเต็มวัยออกมา ระยะแรก ๆ ยุงตัวเต็มวัยทั้งตัวผู้และตัวเมียกินอาหารน้ำหวานก่อนโดยใช้สารละลายวิตามินในน้ำเชื่อมเจือจาง 5 % จากนั้นสามวันยุงตัวเมียสามารถรับอาหารเลือดได้ จึงนำหนูตะเภาใส่เข้าไปในกรงทิ้งไว้สัก 1-2 ชั่วโมงค่อยเอาหนูออกมา ทำการผสมพันธุ์ยุงตัวเมียที่กินเลือดโดยวิธีผสมเทียม (artificial mating) เก็บยุงตัวเมียที่ผสมพันธุ์แล้วแยกใส่กรงไว้ต่างหาก โดยให้อาหารทั้งน้ำหวานและเลือด ภายในกรงใส่ถ้วยพลาสติกบุกระดาษกรองบรรจุน้ำไว้ 2 ใน 3 ส่วนเข้าไปเพื่อให้ยุงวางไข่ เก็บไข่ยุงทุกวันและนำมาเลี้ยงต่อไป ห้องเลี้ยงแมลงควรปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 25-27°c ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70-80 % (WHO, 1963, WHO, 1975)

หมายเหตุ สำหรับยุง An. (Cel.) minimus ให้อาหารเลือดจากคนแทนหนูตะเภา

ขั้นตอน 2. การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาช่วงประสิทธิภาพของ Bacillus thuringiensis var. israelensis

การทดลองนี้ใช้ผงแบคทีเรียมาตรฐาน IPS-78 มีประสิทธิภาพ 1000 ITU Aedes aegypti ต่อ มก. จากนั้นเตรียมแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 1 % โดยใช้ผงแบคทีเรียมาตรฐานหนัก 1 ก.ต่อน้ำ 100 มล. นำส่วนผสมแบคทีเรียเข้มข้น 1 % นี้ไปเตรียมแบคทีเรียเจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 0.5×10^{-6}, 10^{-7}, 0.5×10^{-7}, 10^{-8}, 0.5×10^{-8} ต่อ ๆ ไปดังนี้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.	10 มล.	ของแบคทีเรียเข้มข้น	1 %	+ น้ำ	90 มล.	เท่ากับแบคทีเรียเจือจาง	10^{-3}
2.	10 มล.	"	10^{-3}	+ "	90 มล.	"	10^{-4}
3.	10 มล.	"	10^{-4}	+ "	90 มล.	"	10^{-5}
4.	10 มล.	"	10^{-5}	+ "	90 มล.	"	10^{-6}
5.	5 มล.	"	10^{-5}	+ "	95 มล.	"	$0.5x10^{-6}$
6.	10 มล.	"	10^{-6}	+ "	90 มล.	"	10^{-7}
7.	5 มล.	"	10^{-6}	+ "	95 มล.	"	$0.5x10^{-7}$
8.	10 มล.	"	10^{-7}	+ "	90 มล.	"	10^{-8}
9.	5 มล.	"	10^{-7}	+ "	95 มล.	"	$0.5x10^{-8}$

โดยแบคทีเรียเจือจางเข้มข้น 10^{-3} เท่ากับแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 1000 ppm

เมื่อได้แบคทีเรียเจือจางความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว ทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่พอเหมาะที่จะทำลายยุงระยะต่าง ๆ ได้แก่ ลูกน้ำยุงระยะที่ 1, 2, 3, 4 และดักแด้ รวมทั้งระยะไข่ด้วย

หมายเหตุ ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมอาจเปลี่ยนแปลงไปจากนี้ได้ และช่วงความเข้มข้นที่ได้สำหรับยุงทั้งสองชนิดไม่จำเป็นต้องเป็นช่วงเดียวกัน

ขั้นตอน 3. การทดสอบระดับความไวของยุงระยะต่าง ๆ ต่อ Bacillus thuringiensis var. israelensis

การทดลองนี้ใช้ผงแบคทีเรียมาตรฐาน 1000 ITU Aedes aegypti ต่อ มก. โดยใช้ช่วงความเข้มข้นของแบคทีเรียเจือจางที่ได้จากการทดลองขั้นตอนที่ 2 นำมาทดสอบกับยุงทั้งสองชนิดในลูกน้ำระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 รวมทั้งดักแด้และไข่ด้วย

เริ่มทำการทดลองโดยใช้ปีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมแบคทีเรียความเข้มข้นที่ต้องการลงไปปีกเกอร์ละ 100 มล. จากนั้นจึงใส่ยุงระยะที่จะทดสอบลงไปปีกเกอร์ละ 25 ตัว ทำการทดลองควบคุม (untreated control) ด้วยทุกครั้ง ถ้าทำการทดลองยุงในระยะตัวอ่อนต้องให้อาหารในแต่ละปีกเกอร์ด้วย ตรวจผลการทดลองหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ในการทดลองกับยุงระยะไข่ก็นับอัตราการไม่ฟัก (%) ของไข่ ถ้าการทดลองใช้ยุงระยะตัวอ่อนก็สังเกตลูกน้ำที่ยังว่ายได้ปกติ หรือลูกน้ำที่ว่ายผิดปกติไม่สามารถขึ้นมาหายใจที่ผิวน้ำได้ หรือลูกน้ำที่ตายลักษณะสองประการหลังนับเป็นอัตราการตายของลูกน้ำยุง ส่วนการใช้ยุงระยะดักแด้ให้นับอัตรา

การไม่ลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยพร้อมทั้งสังเกตความสมบูรณ์ของยุงตัวเต็มวัยที่เกิดขึ้นด้วย เพื่อตรวจสอบอย่างแน่นอนว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีพิษต่อลูกน้ำยุงจากผลของการกินแบคทีเรียเข้าไปเท่านั้น เนื่องจากระยะดักแด้ยุงไม่กินอาหาร การทดลองนี้แต่ละอย่างทำอย่างละ 6 ซ้ำ

หมายเหตุ

1. ถ้ามีการตายเกิดขึ้นในกลุ่มควบคุมโดยอัตราการตายของกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่าง 5-20 % ต้องคำนวณอัตราการตายของกลุ่มทดลองที่ถูกต้องจาก Abbott's formular คือ

$$\frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มทดลอง} - \text{อัตราการตายของกลุ่มควบคุม}}{100 - \text{อัตราการตายของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ถ้าอัตราการตายของกลุ่มควบคุม 5 % ให้ใช้อัตราการตายของกลุ่มทดลองจริงได้

ถ้าอัตราการตายของกลุ่มควบคุม 20 % ให้ทำการทดลองใหม่

2. ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำไปเขียนกราฟ dosage-mortality regression line บน logarithemic-probability paper เพื่อประเมินผลหาค่าความเข้มข้นที่ LC 50 และ LC 95 ของสารพิษแบคทีเรียต่อยุงก้นปล่องทั้งสองชนิดระยะต่าง ๆ (Rishikesh และ Quelennec, 1983, WHO, 1981 a)

ขั้นตอน 4. การศึกษาฤทธิ์ตกค้างของ Bacillus thuringiensis var. israelensis

การทดลองนี้ใช้ผงแบคทีเรียมาตรฐาน 1000 ITU Aedes aegypti ต่อ มก. ทดสอบกับลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ที่แบคทีเรียความเข้มข้น LC 95 ของยุงแต่ละชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากการทดลองขั้นตอนที่ 3

เริ่มทำการทดลองโดยใช้บีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมแบคทีเรียความเข้มข้นที่ LC 95 ลงไปบีกเกอร์ละ 100 มล. จากนั้นนับลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ลงไปบีกเกอร์ละ 25 ตัว (ทำการทดลองควบคุมด้วย) ตรวจบันทึกผลประสิทธิภาพการทำลายลูกน้ำยุงเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 วัน และ 1, 2, 3, 4 อาทิตย์ ทำการทดลองทั้งหมด 6 ซ้ำ

ขั้นตอน 5. การศึกษาประสิทธิภาพของ Bacillus thuringiensis var. israelensis ในน้ำลักษณะต่าง ๆ

การทดลองนี้ใช้ผงแบคทีเรียมาตรฐาน 1000 ITU Aedes aegypti ต่อ มก. กับ

ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ในน้ำลักษณะต่าง ๆ คือ น้ำ pH ต่าง (pH 6, 7, 8) น้ำคลอง น้ำฝน และน้ำแหล่งเพาะพันธุ์ธรรมชาติ

เริ่มทำการทดลองโดยใช้ปีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองขั้นตอนที่ 2 ลงไปปีกเกอร์ละ 100 มล. นับลูกน้ำระยะที่ 4 ลงไปปีกเกอร์ละ 25 ตัว (ทำการทดลองควบคุมด้วย) บันทึกผลหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง การทดลองนี้ทำอย่างละ 6 ซ้ำ

หมายเหตุ การบันทึกและประเมินผลการทดลองทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3

ขั้นตอนที่ 6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเพื่อเขียนกราฟเส้นตรง dosage-mortality linear regression line โดยวิธี probit analysis (Finney และ Tattersfield, 1952)

2. วิเคราะห์ผลการทดลองเปรียบเทียบโดยวิธี analysis of variance (สันทลักษณา, 2523)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย