บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์การศึกษา

1. <u>สัตว์ทดลอง</u>
   - Syrian golden hamsters จำนวน 2 ตัว
   - ยุง <u>Cx. quinquefasciatus</u> ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ
2. <u>วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี</u>

การเลี้ยงและเตรียมสัตว์ทดลอง

1. กรงเลี้ยงหนู hamsters ขนาด 20 x 26 x 15 ซม. พร้อมขวดน้ำ จำนวน 1 ชุด
2. กรงเลี้ยงยุงขนาด 30 x 30 x 30 ซม. จำนวน 6 กรง
3. อาหารเลี้ยงสัตว์สำเร็จรูป จำนวน 5 กก.
4. เครื่องชั่งอาหาร
5. 10% glucose และ 5% multivitamin syrup
6. ถาดขนาด 25 x 30 x 6 ซม. 20 ใบ
7. หลอดดูดลูกน้ำ 1 อัน

การเก็บตัวอย่างน้ำและยุง

1. กับดักยุงแสงไฟ (light trap) จำนวน 3 เครื่อง (ดังแสดงในภาพที่ 5)
2. กระบวยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว จำนวน 1 ใบ
3. Thermometer 1 อัน
4. ขวดเก็บน้ำขนาด 2 ลิตร จำนวน 12 ใบ
5. น้ำแข็งแห้ง
6. ถุงมือ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 5. กับดักยุงแสงไฟ (Light trap)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ทดลองในห้องปฏิบัติการ

1. เครื่อง pH meter ของ Hanna instrument 8417 จำนวน 1 เครื่อง
2. เครื่อง Refractometer ใช้วัด salinity จำนวน 1 เครื่อง
3. Burette ขนาด 100 ml พร้อม stand 1 ชุด
4. Pipette ขนาด 10 ml จำนวน 2 อัน
   ขนาด 5 ml จำนวน 5 อัน
   ขนาด 1 ml จำนวน 5 อัน
5. Beaker ขนาด 500 ml จำนวน 2 ใบ
6. ขวดเออร์เลนเมเยอร์ ขนาด 250 ml จำนวน 5 ใบ
7. Volumetric flask ขนาด 100 ml จำนวน 3 ใบ
8. Graduated cylinder ขนาด 100 ml จำนวน 2 ใบ
9. ขวด BOD จำนวน 30 ใบ
10. Incubator 25°C 1 ตู้
11. Air pump 2 ตัว
12. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์
13. สารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟต
14. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นและสารละลายที่ความเข้มข้น 0.01 โมล/ลบ.ดม.
15. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต
16. น้ำกลั่น
17. สารละลายฟีนอล์ฟธาลีนอินดิเคเตอร์
18. สารละลายเมทิลออเรนจ์อินดิเคเตอร์
19. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต
20. ถ้วยวางไข่ขนาด 200 ml จำนวน 30 ใบ
21. ขวดแก้วเลี้ยงลูกน้ำ ขนาด 1000 ml จำนวน 30 ใบ
22. หลอดดูดลูกน้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินการศึกษา

1. การสำรวจยุง

1.1 ดักยุงโดยใช้ light trap ร่วมกับน้ำแข็งแห้งซึ่งจะเป็นตัวล่อยุงให้เข้ากับดัก (ตามวิธีของ Newhouse *et al.* (1966) ที่พบว่าการใช้น้ำแข็งแห้ง 1-2 กิโลกรัม ร่วมกับ light trap สามารถดักยุงได้เพิ่มขึ้น 20-50 เท่า และได้ชนิดของยุงเพิ่มขึ้น 19-25% → ของการดักด้วย light trap เพียงอย่างเดียว) ตั้ง light trap ให้อยู่สูงกว่าพื้นดินประมาณ 60 นิ้ว ในช่วงเวลาตั้งแต่ 18.00 น. ถึง 6.00 น. ตามวิธีของ Addison *et al.* (1979) และ Meyer *et al.*(1986)

บริเวณที่ตั้งดักยุงที่นิคมอุตสาหกรรมบางปูแบ่งออกเป็น 3 จุด (ภาพที่ 6)

- จุดดักยุงที่ 1 บริเวณป้อมยามด้านหน้าของนิคมฯฝั่งถนนสุขุมวิท (ห่างจากทะเลประมาณ 2 กม.)
- จุดดักยุงที่ 2 บริเวณสถานีสูบน้ำเสียตอนกลางนิคมฯ ที่ซอย 5
- จุดดักยุงที่ 3 บริเวณป้อมยามด้านหลังของนิคมฯ ติดคลองหกส่วน

การสำรวจยุงแบ่งเป็น 2 ช่วงต่อปี ซึ่งทำการดักช่วงละ 3 ครั้ง คือ

- ช่วงน้ำน้อยหรือฤดูแล้งจะทำการสำรวจในเดือนกุมภาพันธ์-เมษายน
- ช่วงน้ำมากหรือฤดูฝน จะทำการสำรวจในเดือน สิงหาคม - ตุลาคม

1.2 นำตัวอย่างยุงแยกชนิดและนับจำนวน

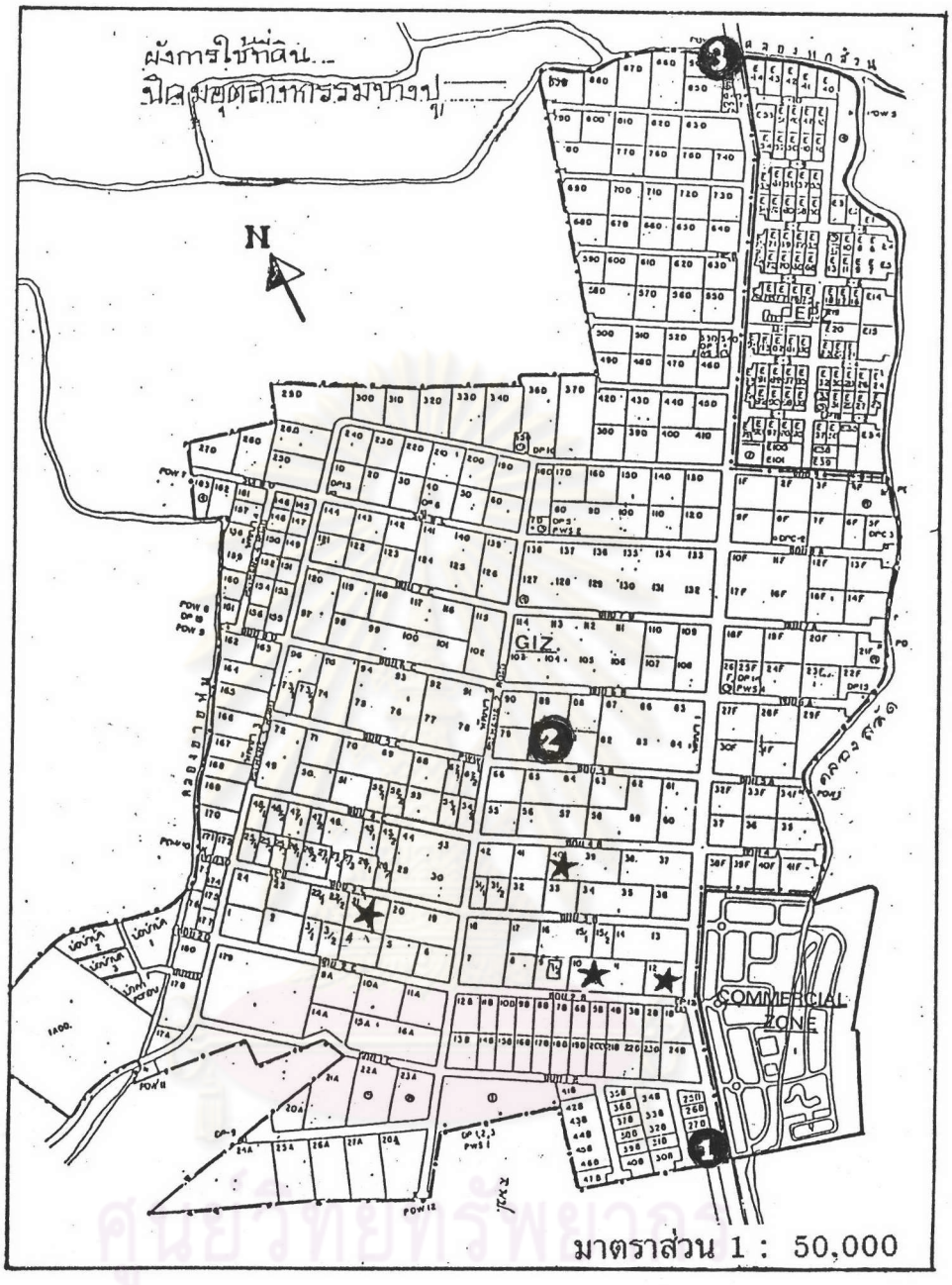
1.3 นำข้อมูลมาวิเคราะห์เชิง Descriptive statistics และ ทดสอบความแตกต่างของข้อมูลที่มีลักษณะความแตกต่างอย่างเด่นชัดด้วย t-test

2. การสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงตามระบบระบายน้ำ

2.1 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจลูกน้ำยุง

- สำรางระบายน้ำฝน ที่อยู่หน้าโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูป 4 โรงงาน ได้แก่

1. บริษัทไทยนิสชิน เซฟุง จำกัด (Thai Nisshin Seifun) ตั้งอยู่แปลงที่ 40 ผลิตซ๊อสกระป๋อง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6. แสดงการใช้พื้นที่ของนิคมอุตสาหกรรมบางปู จุดดักยุง 3 แห่ง และที่ตั้งของโรงงาน 4 แห่ง

● จุดดักยุง 3 แห่ง คือ 1. ป้อมยามด้านถนนสุขุมวิท 2. สถานีสูบน้ำเสียซอย5
3. ป้อมยามติดคลองหกส่วน

★ โรงงาน ไอเอ็นมารีน, ไทยนิสชิน เซฟุง, คาร์เนชั่น และ ล่ำสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. บริษัทล่ำสูง (ประเทศไทย) จำกัด (Lamsoon) ตั้งอยู่แปลงที่ 12,13 ผลิตน้ำมันพืช เนยเทียม ยาขัดเงาโลหะ น้ำยาล้างจาน น้ำยาทำความสะอาดเครื่องสุขภัณฑ์ น้ำยาเช็ดกระจก (ภาพที่ 8)

3. บริษัทคาร์เนชั่นแมนิวแฟคเธอริ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (Carnation Manufactoring) ตั้งอยู่แปลงที่ 11 ประกอบกิจการผลิต ผลิตภัณฑ์ผงครีมเทียม (ภาพที่ 9)

4. บริษัท ไอ เอ็น มารีน จำกัด (I.N. Marine) ตั้งอยู่แปลงที่ 21 A ประกอบกิจการผลิต ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่แข็ง (ภาพที่ 10)

- บ่อพักน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว ของเขตอุตสาหกรรมทั่วไป 1 แหล่ง (ภาพที่ 11)

- คลองธรรมชาติรอบนิคมฯ 3 แหล่ง (ดังแสดงในภาพที่ 12-14) คือ

1. คลองยายหุ่น เป็นคลองที่อยู่ทางด้านทิศตะวันตกของนิคมฯ โดยไหลเรียบขนานติดอยู่กับทางด้านข้างของเขตนิคมฯ ผ่านบ่อบำบัดน้ำเสียรวมของนิคมฯ จึงเป็นแหล่งรองรับน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้วโดยตรง

2. คลองสลัด เป็นคลองที่อยู่ทางด้านทิศตะวันออกของนิคมฯ โดยไหลเรียบขนานติดเขตนิคมฯทางด้านข้างตลอดแนว ผ่านบ่อบำบัดน้ำเสีย และเขตของอุตสาหกรรมส่งออกไปเชื่อมกับคลองหกส่วนทางทิศเหนือ

3. คลองหกส่วน อยู่ทางด้านทิศเหนือของนิคมฯ ขนานกับถนนพุทธ-รักษา โดยผ่านเขตนิคมฯ เป็นบางส่วน

2.2 เก็บลูกน้ำยุงด้วยวิธี Dipping method โดยใช้กระบวยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ทำการสุ่มเก็บลูกน้ำยุงเป็นจำนวน 20 ครั้ง ต่อแหล่งน้ำที่มีขนาดมากกว่า 50 ตารางฟุต (Dixon & Brust, 1972) การสุ่มเก็บลูกน้ำแบ่งเป็น 2 ช่วงต่อปี ช่วงละ 3 ครั้ง เช่นเดียวกับ 1.1

2.3 นำลูกน้ำยุงที่เก็บได้มาแยกประเภทและนับจำนวน

2.4 นำข้อมูลมาวิเคราะห์เชิง Descriptive statistics

ภาพที่ 7. แสดงลำรางระบายน้ำฝนหน้าโรงงานไทยนิสชิน เซฟุง จำกัด

ภาพที่ 8. แสดงลำรางระบายน้ำฝนหน้าโรงงานล่ำสูง (ประเทศไทย) จำกัด

ภาพที่ 9. แสดงลำรางระบายน้ำฝนหน้าโรงงานคาร์เนชั่นแมนนิวแฟ็คเธอริ่ง (ประเทศไทย) จำกัด

ภาพที่ 10. แสดงลำรางระบายน้ำฝนหน้าโรงงานไอเอ็นมารีน จำกัด

ภาพที่ 11. บ่อบำบัดน้ำเสียของนิคมอุตสาหกรรมบางปู

ภาพที่ 12. แสดงลักษณะคลองยายหุ่น

ภาพที่ 13. แสดงลักษณะคลองสลัด

ภาพที่ 14. แสดงลักษณะคลองหกส่วน

3. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

3.1 เก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง ในแหล่งน้ำที่ทำการสำรวจลูกน้ำยุง และน้ำทิ้งจากภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูปโดยตรงทั้ง 4 โรงงาน ในข้อ 2.1 โดยใช้วิธี composite sampling ซึ่งจะได้น้ำทั้งหมด 12 แห่งๆ ละ 2 ลิตร

3.2 นำตัวอย่างน้ำที่ได้มาวิเคราะห์หา total alkalinity, salinity, biochemical oxygen demand (BOD), pH เพื่อใช้เป็นดัชนีพื้นฐานเบื้องต้นในการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหรือแหล่งน้ำอื่นๆ โดยที่

- BOD และ total alkalinity ใช้วิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการตามวิธีของ standard method for the examination of water and wastewater 18th ed. (1992)
- salinity ใช้ refractometer
- pH ใช้ pH meter รุ่น HANNA instruments ในการวิเคราะห์

ทำการศึกษาทั้งในช่วงน้ำน้อยและช่วงน้ำมาก ช่วงละ 3 ครั้ง เช่นเดียวกับข้อ 1.1

3.3 นำข้อมูลมาวิเคราะห์แบบ Descriptive statistics และทดสอบความแตกต่างของ ดัชนีชี้วัดทางน้ำด้วย t-test และ ANOVA เปรียบเทียบตามประเภทของแหล่งน้ำ

4. การเลือกวางไข่ของยุง Cx. quinquefasciatus ตามประเภทของน้ำ

4.1 การเตรียมยุง

- เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus ในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ 25-30 ^{o}C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 80-90 % เลี้ยงลูกน้ำ 250-300 ตัว ในถาดที่มีขนาด 25 x 30 x 6 ซม. ซึ่งบรรจุน้ำประปาที่ขังทิ้งไว้ในถังอย่างน้อย 1 วัน จำนวน 1-1.5 ลิตร ให้อาหารหนูทุกวัน และทำการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้งต่อสัปดาห์
- ลูกน้ำจะเจริญเติบโตจนกลายเป็นลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ประมาณ 5-7 วัน หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงไว้ในกรงที่มีขนาด 30 x 30 x 30 ซม.
- เมื่อกลายเป็นยุงจะเลี้ยงด้วย 10 % glucose และ 5 % multivitamin syrup โดยชุบด้วยสำลีใส่ในกรงและเปลี่ยน 2 ครั้งทุกสัปดาห์
- หลังจาก 7 วัน จะให้ยุงตัวเมียดูดเลือดจากหนู hamster จนส่วนท้องของยุงขยายโตขึ้นเป็นสีแดงสด ขณะที่เลือดถูกย่อย และไข่สีขาวในรังไข่โตขึ้น ส่วนท้องของยุง

จะมีสีขาวทางส่วนหลัง และสีแดงคล้ำทางส่วนหน้า เมื่อเลือดถูกย่อยหมด ส่วนท้องจะขยายโตเป็นสีขาว เป็นช่วงที่ไข่เจริญเต็มที่ พร้อมที่จะวางไข่ ภายใน 2-5 วัน (ดังภาพที่ 19 ในภาคผนวก) เมื่อได้ลูกน้ำยุงก็จะนำไปแยกเลี้ยงเช่นเดิม

- นำลูกน้ำยุงและตัวแก่ของยุงไปใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำเดียวกับที่ทำการสำรวจลูกน้ำ ในข้อ 2.1 ได้แก่

- ลำรางระบายน้ำฝนหน้าโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูป 4 แห่ง
- น้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสีย
- น้ำจากคลองธรรมชาติ (3 แหล่ง)

  โดยการ composite sampling
- น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 วัน

นำน้ำเหล่านี้มาใส่ในถ้วย น้ำตัวอย่างละ 1 ใบ ในปริมาณ 100 ml

4.3 นำถ้วยทั้งหมดมาตั้งในกรงตาข่ายขนาด 30 x 30 x 30 ซม. โดยใส่ยุงตัวเมียที่ท้องแก่ 20 ตัว

4.4 นับจำนวนแพของไข่ที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างน้ำภายในเวลา 12 วัน ตามวิธีของ Carlson (1983) แล้วนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับ

4.5 ทำการทดลองเช่นเดิมเป็นจำนวน 3 ซ้ำ และทำการศึกษาตามช่วงเวลาเช่นเดียวกับข้อ 1.1

4.6 นำข้อมูลมาวิเคราะห์เชิง Descriptive statistics และทดสอบความแตกต่างด้วย t-test และ ANOVA

5. อิทธิพลของคุณภาพน้ำจากแหล่งอุตสาหกรรมและคลองธรรมชาติต่อการดำรงชีวิตของลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus

5.1 เก็บตัวอย่างน้ำเช่นเดียวกับข้อ 4.2 ใส่น้ำลงในขวดเลี้ยงลูกน้ำจำนวน 500 ml ขวดละ 1 ตัวอย่างน้ำ นำมาเลี้ยงลูกน้ำยุง Cx. quinquefasciatus ที่มีอายุ 1 วัน จำนวนขวดละ 50 ตัว เติมอาหารทุกวัน สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงทุกวันจนเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้น้ำประปาที่ไล่คลอรีนออกแล้วเป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการทดลองเช่นเดิมเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

5.2 ทำการศึกษาเช่นนี้ทั้ง 2 ช่วง คือ ช่วงน้ำน้อย และช่วงน้ำมาก ช่วงละ 3 ครั้ง เช่นเดียวกับข้อ 1.1

5.3 นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของลูกน้ำยุงระยะต่าง ๆ ในแต่ละแหล่งน้ำ และทดสอบความแตกต่างด้วย ANOVA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย