หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. Microbial agents

1.1 Bacillus thuringiensis var. israelensis serotype H-14 ได้รับจากบริษัท SANDOZ ผู้ผลิต

ชื่อการค้า	SAN 402 I WDC
สถานะทางฟิสิกส์	colloidal liquid
สี	น้ำตาลแดง
ความถ่วงจำเพาะ	1.1 กรัม/มิลลิลิตร ที่ 18°C
ความหนืด	2300 CP ที่ 18°C, pH 6.6
การละลายน้ำ	ละลายได้ดีมากในน้ำ
เสถียรภาพ	ที่อุณหภูมิ 22-27°C เก็บได้ 1 ปี ในที่เย็นสามารถเก็บไว้ได้นาน เมื่อผสมน้ำ pH 4.0-9.0 อยู่ได้หลายสัปดาห์

1.2 Bacillus sphaericus var. fusiformis สายพันธุ์ 1593 ผลิตจากบริษัท Stauffer โดยได้รับจาก Dr. Samuel Singer Western Illinois University U.S.A.

ชื่อการค้า	MV 716 WP.
สถานะทางฟิสิกส์	ผงละลายน้ำ (Wettable powder)
สี	น้ำตาลเหลือง
การละลายน้ำ	ละลายได้ดีในน้ำ
สารออกฤทธิ์ (active ingredients)	25 % โดยจำนวนสปอร์ = 2.4×10^{10} สปอร์/กรัม

2. สัตว์ทดลอง

2.1 ยุงลาย Aedes aegypti

2.2 ยุงบ้าน Culex quinquefasciatus

ไข่ยุงทั้ง 2 ชนิดได้รับจากสำนักงานโครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ทหาร

2.3 Golden Hamster, Mesocricetus auratus

ได้รับจากห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารสัตว์ทดลอง

3.1 5 % มัลวิติน ไซรัฟ (Mulvitin syrup) สำหรับยุงตัวเต็มวัย

3.2 อาหารหนูของบริษัท F.E. Zuellig สำหรับลูกน้ำยุง

4. วัสดุและอุปกรณ์

4.1 อ่างพลาสติกขนาด 24 x 29 x 11 ซม.

4.2 กรงเลี้ยงยุงขนาด 44 x 44 x 65 ซม.

4.3 ถ้วยอลูมิเนียมขนาด 150 มล.

4.4 ภาชนะรองขาตู้กับข้าวกันมดทำด้วยดินเผา

4.5 กระบอกตวงขนาด 100, 500 มล.

4.6 Beaker ขนาด 250, 600, 1000 มล.

4.7 Pipet ขนาด 0.1, 1, 5 มล.

4.8 Volumetric flask ขนาด 100, 200 มล.

4.9 แท่งแก้ว

4.10 Thermometer

4.11 pH meter

4.12 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนในน้ำ (DO Model OX-2P)

4.13 Autoclave

4.14 สวิงช้อนลูกน้ำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม.

4.15 กระดาษฟาง

4.16 สำลี

4.17 กรงใส่ Hamster สำหรับให้เลือดยุง

4.18 น้ำประปาซึ่งทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ สภาพน้ำอุณหภูมิ 23.5–26.5°C , pH 7.5-8.5 DO 8-9 ppm. น้ำจากสระหน้าตึกชีววิทยา 1. สภาพน้ำอุณหภูมิ 23.0–27.0°C pH 6.5-8.5, DO. 5-6 ppm.

4.19 พู่กันเบอร์ 2

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงยุง

เนื่องจากต้องใช้ลูกน้ำจำนวนมาก และต้องการความสม่ำเสมอในประชากรของลูกน้ำเพื่อลดความคลาดเคลื่อน (error) ที่เกิดจากตัวลูกน้ำเอง (individual error) ในขณะทดลอง การเลี้ยงลูกน้ำจึงมีความสำคัญยิ่ง

1.1 ยุงลาย Aedes aegypti

นำกระดาษฟางที่มีไข่ยุงลายที่หนาแน่นพอสมควรแช่น้ำในอ่างพลาสติก กดกระดาษฟางให้จมอยู่ใต้น้ำ ไข่ยุงจะฟักออกเป็นตัวลูกน้ำยุงระยะที่ 1 เพื่อให้ได้ขนาดเท่ากัน ควรใช้เวลาฟักเพียง 3–4 ชม. นำไข่ที่ยังไม่ฟักทิ้งไป หลังจากนั้นประมาณ 3 ชม. เริ่มให้อาหารครั้งแรก ให้อาหารแต่น้อยและทุก ๆ 24 ชม. เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมอาหารที่เหลือใช้ จะทำให้มีเชื้อราเกิดขึ้น ทำให้น้ำเสีย ลูกน้ำยุงจะตาย

การเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงแบ่งได้เป็น 4 ระยะการลอกคราบ ในการทดลองเลี้ยงลูกน้ำยุงในอ่างที่มีน้ำประมาณ 3.5–4 ลิตร (ใส่น้ำ 2/3 ของอ่างเพาะเลี้ยง) โดยใส่ลูกน้ำ 200–250 ตัว ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 25°–27°C

pH 7.5-8.5 DO 8-9 ppm. ลูกน้ำจะใช้เวลา 24-48 ชม. ในระยะที่ 1, 24-36 ชม. ในระยะที่ 2 และ 24-48 ชม. ในระยะที่ 3 ส่วนระยะที่ 4 จะกินเวลานานที่สุดประมาณ 2-14 วัน จากนั้นจะลอกคราบกลายเป็นตัวโม่ง (pupa) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 48 ชม. จะกลายเป็นตัวเต็มวัย (adult) ในระยะตัวโม่งใช้ dropper ดูดใส่ถ้วยนำไปเลี้ยงในกรงเลี้ยงยุง เมื่อเป็นตัวเต็มวัยแล้ว 12 ชม. ให้ 5 % มัลวิติน ไซรัฟ เป็นอาหาร หลังจากนั้น 2-3 วัน ให้เลือด Hamster เพื่อให้ยุงตัวเมียวางไข่ ไข่ยุงลายเก็บโดยใช้กระดาษฟางวางรอบบีคเกอร์ 600 มล. ที่ใส่น้ำไว้ $\frac{1}{3}$ เพื่อให้กระดาษชื้น และเก็บไข่ทุก 24 ชม. นำไปตากให้แห้งจะเก็บไว้ได้ประมาณ 1 เดือน

ไข่ยุงลายที่นำมาใช้ในการทดลองควรใช้ที่เก็บไว้ประมาณ 24-48 ชม. เพื่อให้ไข่เจริญเต็มที่ (complete development) จะฟักออกเป็นตัวง่ายและแข็งแรงดี

1.2 ยุงบ้าน Culex quinquefasciatus

ไข่ยุงบ้านต่างจากยุงลาย มีลักษณะเป็นแพและจะฟักเป็นตัวใน 24-48 ชม. การเลี้ยงทิ้งไข่ไว้ประมาณ 24 ชม. ที่เหลือข้อนทิ้งไป การเลี้ยงเช่นเดียวกับลูกน้ำยุงลาย แต่ต้องดูแลเป็นพิเศษเนื่องจากน้ำที่เลี้ยงลูกน้ำยุงบ้านจะเป็นเมือกได้ง่าย ใช้กระดาษฟางค่อย ๆ ปาดผิวหน้าออก ช่วยให้ไม่ต้องเปลี่ยนน้ำซึ่งจะเป็นการรบกวนลูกน้ำยุง

หมายเหตุ ลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิดที่นำมาใช้ในการทดลองจะเลือกที่เจริญเติบโตเร็วและแข็งแรงดี กับมีอัตราตายในขณะเลี้ยงไม่เกิน 10 % ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการดูแลให้มีอาหารอย่างเพียงพอ และน้ำสะอาดไม่มีเชื้อราซึ่งเกิดจากอาหารที่ลูกน้ำยุงกินไม่หมด

2. เตรียม bacterial suspension

เตรียม SAN 402 1 WDC และ MV 716 WP ในอัตราส่วน 1 มก. ผสมน้ำ 1 ลิตร มีความเข้มข้น = 1 ppm. ในการทดลองความเข้มข้นของ bacterial suspension ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียและชนิดลูกน้ำยุง ซึ่งหาได้จากการทำ Pre-test ในข้อ 3.

3. ทำ Pre-test ลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิด ทุก ๆ ระยะการลอกคราบ (instar)

3.1 ใส่น้ำ 100 มล. ลงในถ้วยอลูมิเนียมเป็นกลุ่มควบคุม (control) 2 ซ้ำ (replication)

3.2 ใส่ bacterial suspension 100 มล. ลงในถ้วย ให้มีอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น (treament) แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ

3.3 ใส่ลูกน้ำยุงซ้ำละ 20 ตัว โดยใช้สวิงพยายามให้มีน้ำติดน้อยที่สุด และควรใส่ครั้งละ 20 ตัวทุก ๆ ซ้ำ เพื่อลดความคลาดเคลื่อนจากผู้ทำการทดลอง

3.4 ให้อาหารลูกน้ำยุงแต่พอเพียง

3.5 บันทึกอัตราตายหลังจากทำการทดลอง 24, 48 ชม.

จากการทำ pre-test จะได้ความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายในช่วง 0–100 % นำช่วงความเข้มข้นนี้มาขยายอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น เพื่อหาความเข้มข้นที่จะทำให้ลูกน้ำยุงตายในอัตรา 5–90 % การทำ pre-test อาจต้องทำหลายครั้งจึงจะได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม

4. ศึกษาความเป็นพิษของแบคทีเรียต่อลูกน้ำยุง

4.1 หาอัตราตายของลูกน้ำยุง

ทำเช่นเดียวกับ pre-test โดยใช้ความเข้มข้นที่หาได้จากการทำ pre-test และเพิ่มการทดลองเป็น 10 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

ในการทดลองครั้งนี้แยกเป็น 7 ความเข้มข้น และมีกลุ่มควบคุม 10 ซ้ำเช่นกัน

4.2 นำอัตราตายในแต่ละความเข้มข้นหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) นำค่าเฉลี่ยไปหาค่า % mortality เพื่อหาอัตราตายที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียอย่างเดียว โดยคำนวณจากสูตรของแอบบอทท์ (Abbott's Formula) คือ

$$\% \text{ mortality} = \frac{\% \text{ ตายกลุ่มทดลอง} - \% \text{ ตายกลุ่มควบคุม}}{100 - \% \text{ ตายกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ใช้สูตรนี้เมื่อกลุ่มควบคุมมีอัตราตาย 5-20 %
ถ้าต่ำกว่า 5 % ไม่ต้องใช้สูตรนี้ ใช้เปอร์เซนต์ตายจริงได้
ถ้าสูงกว่า 20 % ต้องทำการทดลองใหม่ (WHO/VBC/81.807)

4.3 นำเปอร์เซนต์ตายสูตรแอบบอทท์ไปหาค่า LC_{50} โดยเขียนบนกระดาษกราฟ Probit-log scale

4.4 ทำการทดลองซ้ำข้อ 3 กับลูกน้ำยุงทุกระยะการลอกคราบกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สำหรับตัวโม่งไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากพบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่มีคุณสมบัติถูกตัวตาย (contact poison)

4.5 ทำการทดลองลูกน้ำยุงลาย Aedes aegypti กับ Bacillus thuringiensis var. israelensis serotype H-14 ในภาชนะรองขาตู้กับข้าวกันมด เพื่อเปรียบเทียบกับสภาพธรรมชาติที่ยุงลายมักวางไข่ในภาชนะรองขาตู้กับข้าวกันมด

4.6 ทำการทดลองลูกน้ำยุงบ้าน Culex quinquefasciatus กับ Bacillus sphaericus var. fusiformis strain 1593 ในน้ำสระเพื่อทดสอบเปรียบเทียบเมื่อใช้กับสภาพน้ำธรรมชาติ

5. เปรียบเทียบความเป็นพิษของแบคทีเรีย

5.1 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของลูกน้ำยุงชนิดเดียวกันเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรียต่างกัน

5.2 เปรียบเทียบค่า LC_{50} ของลูกน้ำยุงต่างชนิดเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรียตัวเดียวกัน

5.3 ในลูกน้ำยุงลายเปรียบเทียบสภาพแวดล้อมระหว่างถ้วยอลูมิเนียมและที่รองขาตู้

5.4 ในลูกน้ำยุงบ้าน เปรียบเทียบสภาพน้ำระหว่างน้ำประปาที่ทิ้งไว้ (dechlorinated) กับน้ำจากสระน้ำหน้าตึกชีววิทยา 1

6. ศึกษา residual life ของเชื้อแบคทีเรีย

6.1 เตรียม bacterial suspension โดยใช้ความเข้มข้นจากการทดลองข้อ 4 ที่ทำให้

6.1.1 อัตราตายลูกน้ำยุงเท่ากับ 50–60 %

6.1.2 ความเข้มข้นสูงสุด

6.2 ใส่ลูกน้ำยุงใน bacterial suspension ที่เตรียมทิ้งไว้เป็นเวลา 0, 1, 2, 4, 8, 16 วัน และ 1 เดือน ตามลำดับ แต่ละการทดลองต้องมีกลุ่มควบคุมด้วย

6.3 หาอัตราการตายหลังจากใส่ลูกน้ำยุงไปแล้ว 24, 48 ชม.

6.4 นำเปอร์เซนต์ตายมา plot graph ระหว่างเวลาและอัตราการตาย

7. หาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ให้แบคทีเรียกับอัตราการตายลูกน้ำยุง จากการทดลองตามข้อ 4 จะตรวจนับอัตราตายของลูกน้ำยุงทุก 24 ชม. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำเวลากับอัตราตายมา plot graph

หมายเหตุ การทดลองข้อ 6, 7 เลือกทำกับลูกน้ำยุงในระยะที่ 3 เนื่องจากระยะที่ 1 และ 2 การตรวจนับอัตราการตายมีความผิดพลาดได้มากกว่า และการเลี้ยงลูกน้ำยุงในระยะยาวไม่สามารถรักษาสภาพแวดล้อมเดิมของลูกน้ำไว้ได้ ส่วนระยะที่ 4 จะเป็นตัวโม่งเร็ว จึงไม่เหมาะที่จะนำมาศึกษา residual life ของแบคทีเรีย

8. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

8.1 หาค่าเฉลี่ย (mean)

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

8.2 หาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation ; S.D.)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

8.3 หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r)

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

8.4 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า LC_{50} โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance ; ANOV)

ตารางสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลแบบ randomised block design (Bailey, N.T.J. 1959.)

Treatments	Blocks 1	2	j	b	Treatment totals	Treatment mean
1	x_{11}	x_{12}	x_{1j}	x_{1b}	T_1	$\bar{X}_1$
2	x_{21}	x_{22}	x_{2j}	x_{2b}	T_2	$\bar{X}_2$
i	x_{i1}	x_{i2}	x_{ij}	x_{ib}	T_i	$\bar{X}_i$
t	x_{t1}	x_{t2}	x_{tj}	x_{tb}	T_t	$\bar{X}_t$
Block totals	B_1	B_2	B_j	B_b	G	$\bar{X}=G/bt$

ตารางวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

Source of variation (SV)	Sum of squares (SS)	Degree of freedom (df)	Mean square (MS)
Treatments	$\sum T_i^2/b-C$	t-1	M_T
Blocks	$\sum B_j^2/t-C$	b-1	M_B
Error	By subtraction	(t-1)(b-1)	S^2
Total	$\sum x_{ij}^2-C$	bt-1	-

Correction factor (C) = G^2/bt

8.5 Least significant difference (LSD)

LSD (.05) = t (.05) S $\bar{d}$

S$\bar{d}$ = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างตัวกลางเลขคณิตสองตัว

(standard error of the difference between tow means)

$$S\bar{d} = \sqrt{\frac{2s^2}{r}}$$

s^2 = mean square error

r = จำนวน block