



อุปกรณ์การทดลอง

1. จุลินทรีย์ (Microbial agent)

แบคทีเรีย Bacillus thuringiensis var. israelensis ผลิตโดยบริษัท SANDOZ ได้รับจากฝ่ายวิจัยประยุกต์ กองมาลาเรีย กระทรวงสาธารณสุข

ชื่อการค้า TeknarTM

สูตร SAN 402 1 SC

ประสิทธิภาพ 600 ITU/มก. (International Toxic Unit/มิลลิกรัม)

ลักษณะทางฟิสิกส์ มีลักษณะเป็นของเหลวแขวนลอย (Flowable colloidal liquid)

สี น้ำตาลแดง

ความถ่วงจำเพาะ 1.1 - 1.2 กรัม/มิลลิลิตร ที่ 18°C

ความเป็นกรดเป็นด่าง pH 6

การละลายน้ำ ดีมาก

การแขวนลอย ดีมาก

ส่วนประกอบ สารออกฤทธิ์ (active ingredients) 0.8 %

สารไม่ออกฤทธิ์ (inert ingredients) 99.2 %

อายุการใช้งาน ขึ้นกับอุณหภูมิที่เก็บรักษา เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 5°C-10°C เก็บได้อย่างน้อย 3 ปี, ที่อุณหภูมิ 21°C-25°C เก็บได้ 1 ปี, ที่อุณหภูมิ 40°C เก็บได้ 6 เดือน



2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 กุ้งก้ามกราม (Macrobrachium rosenbergii de Man) ได้รับความจากภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล วิทยาลัยการประมงมหาวิทาลัย และสถานีประมงทะเลเชิงเตตรา ขนาดที่ใช้ในการทดลองเป็นลูกกุ้งวัยรุ่น (post larva) ซึ่งผ่านพ้นวัยอ่อนมาแล้วประมาณ 2 สัปดาห์ คือจะมีอายุประมาณ 45-60 วัน ความยาวประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตร (วัดจากปลายสุดของกรรถึงปลายหาง)
- 2.2 แมลงดาส่วน (Diplonychus rusticum Fabr.) สืบจากห้องร่องส่วนในมหาวิทาลัยเกษตรศาสตร์ ขนาดที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวเต็มวัยที่ผ่านการลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยใหม่ ๆ อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์
- 2.3 ปลาฉี่ (Tilapia nilotica (Linn.)) ได้รับความจากสถานีประมงน้ำจืดแห่งชาติ ขนาดที่ใช้ในการทดลอง เป็นลูกปลาที่มีความยาวประมาณ 2.0-3.0 เซนติเมตร อายุประมาณ 45-60 วัน
- 2.4 ปลาหางนกยูง (Poecilia reticulata Peters) สืบจากแหล่งน้ำคลองบริเวณชุมชนแออัดย่านสุทธิสาร ขนาดที่ใช้ในการทดลอง เป็นปลาที่มีความยาวประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร อายุประมาณ 2-2 $\frac{1}{2}$ เดือน

3. อาหารสำหรับสัตว์ทดลอง

- 3.1 ลูกน้ำยุงสำหรับเลี้ยงแมลงดาส่วน
- 3.2 ไรน้ำสำหรับเลี้ยงปลาหางนกยูง
- 3.3 อาหารสำเร็จรูปของกรมประมง ได้รับความจากสถานีประมงน้ำจืดแห่งชาติ สำหรับเลี้ยงปลาหางนกยูง, ลูกปลาฉี่ และลูกกุ้งก้ามกราม
- 3.4 อาหารลูกไก่ สำหรับเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกราม และลูกปลาฉี่
- 3.5 ลูกชันปลา สำหรับเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกราม

4. วัสดุและอุปกรณ์

- 4.1 โหลแก้วสูง 10 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว

- 4.2 กระบอกกึ่งยาว 6 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว
- 4.3 ตู้ปลาขนาด 16x10x10 นิ้ว
- 4.4 ถาดพลาสติกขนาด 24x29x11 เซนติเมตร
- 4.5 สำหรับวางกระบอก สำหรับให้แมลงดูล่าวนยึดเกาะ
- 4.6 เครื่องฟั่นฟองอากาศ
- 4.7 กระชอน
- 4.8 ลายยาง
- 4.9 กระบอกตวงขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 4.10 บีกเกอร์ ขนาด 600, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- 4.11 ปีเปต ขนาด 0.1, 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร
- 4.12 Volumetric flask ขนาด 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 4.13 แท่งแก้วคน
- 4.14 เทอร์โมมิเตอร์
- 4.15 autoclave
- 4.16 pH meter
- 4.17 Hach model DR - EL/2 Spectrophotometer
- 4.18 น้ำประปาที่ตกตะกอนคลอรีนแล้ว สภาวะน้ำมีอุณหภูมิ 26-29 °ซ
pH 7.2 - 7.7 DO 7.5 - 8 ppm

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

1.1 ลูกกุ้งก้ามกราม

เมื่อได้รับลูกกุ้งก้ามกรามแล้ว นำมาเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์-
ทางทะเล ให้ออกซิเจนตลอดเวลา เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเป็น



ให้ลูกชิ้นปลาเป็นอาหารเสริมด้วย การให้อาหารวันละ 1 ครั้ง ละครึ่งถ้วย ๆ ดูดเศษอาหารที่เหลือออก
ทุกวัน

1.2 แมลงดาส่วน

จับแมลงดาส่วนมาเพาะเลี้ยงในโหลแก้วและถาดพลาสติก จัดหาสำหรัยทางกระรอก
เพื่อเป็นที่ยึดเกาะและหลบภัย แมลงดาส่วนมีการทำลายกันเองสูง (cannibalism) ดังนั้นเมื่อ
ตัวเมียวางไข่บนหลังตัวผู้แล้ว จะแยกตัวผู้ออกมาเลี้ยงไว้ต่างหาก จนไข่ฟักเป็นตัวจึงแยกตัวเต็มวัย
ออกจากตัวอ่อน เพื่อไม่ให้ตัวอ่อนถูกตัวเต็มวัยทำลาย พยายามเลี้ยง แมลงดาส่วนให้มีอายุไล่เสีย
กันมากที่สุดในแต่ละโหล ให้ลูกน้ำเป็นอาหารวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น ดูดซากลูกน้ำออก
ทุกวัน มิเช่นนั้นน้ำจะเน่าเสียและเกิดเป็นฝ้าบนผิวน้ำ ให้ออกซิเจนตลอดเวลาการเพาะเลี้ยง

1.3 ลูกปลาฉิล

นำลูกปลาฉิลมาเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ให้ออกซิเจนตลอดเวลา ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น

1.4 ปลาหางนกยูง

จับปลาหางนกยูงมาเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
จัดหาพืชน้ำต่าง ๆ เช่น จอก, สำหรัยทางกระรอก เพื่อเป็นที่หลบภัยของลูกปลา ให้ออกซิเจน
ตลอดเวลา ให้อาหารสำเร็จรูปเป็นอาหาร ก่อนการทดลองให้คัดปลาที่มีขนาดเท่า ๆ
กันตามต้องการมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

2. การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเป็นพิษของ B. thuringiensis var. israelensis

ต่อสัตว์ทดลองทั้ง 4 ชนิด

2.1 เตรียมสารละลายสต็อก (stock solution) ด้วยน้ำที่ตกตะกอนคลอรีนแล้ว และ
ทำให้เจือจางเพื่อให้ได้สารละลายแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5-8 ความเข้มข้นเพื่อหาช่วง
ความเข้มข้นที่จะทำให้สัตว์ทดลองทั้ง 4 ชนิดตายระหว่าง 0-100 % ทำการทดลองความเข้มข้นละ
2 ตัว ภาชนะที่ใช้ทดลองสำหรับปลาฉิล, ปลาหางนกยูง และแมลงดาส่วนเป็นโหลแก้วสูง 10 นิ้ว
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว โดยใช้ปริมาตรสารละลายแบคทีเรียเจือจางเท่ากับ 2 ลิตร ไข่
กระชอนตักสัตว์ทดลองปล่อยลงโหลละ 5 ตัว

เนื่องจากกิ้งก่ามกรามีการทำลายกันเองสูง (cannibalism) ในระหว่างทดลอง แม้กระทั่งในกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงต้องใช้กระบอกกึ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 6 นิ้ว ใส่ลูกกิ้งก่ามกราม กระบอกละ 2 ตัว แล้วนำไปวางในโหลซึ่งมีสารละลายแบคทีเรียเชื้อฉางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการโดยมีปริมาตร 5 ลิตร เพื่อให้ระดับน้ำท่วมกระบอกกึ่ง ในแต่ละโหลใช้กระบอกกึ่ง 5 กระบอก

แมลงดาส่วนเป็นแมลงที่ต้องอาศัยสิ่งยึดเกาะ ดังนั้นระหว่างทดลองจำเป็นต้องหาสำหรับวางกระบอกให้แมลงดาส่วนยึดเกาะและหลบภัย โดยแต่ละโหลมีสำหรับวางกระบอกหนัก 0.5 กรัมเท่ากัน

2.2 หากกลุ่มควบคุมโดยใช้น้ำที่ตกตะกอนคลอรีนแล้ว ปริมาตร 2 ลิตร เช่นเดียวกับกลุ่มทดลองสำหรับปลาฉลาม, ปลาหางนกยูง และแมลงดาส่วน ส่วนกิ้งก่ามกรามใส่ในกระบอกกึ่งเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง โดยมีปริมาตรน้ำ 5 ลิตร

2.3 เก็บผลการทดลองโดยบันทึกอัตราการตายที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เก็บสัตว์ทดลองที่ตายแล้วออกจากโหลทุกครั้งที่ตรวจพบ

จากการทดลองเบื้องต้นนี้จะวัดความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายในช่วง 0-100 % นำช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมาขยายให้ได้ 5 ความเข้มข้น เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้สัตว์ทดลองตายในช่วง 5-95 % เพื่อนำไปใช้ทดสอบความเป็นพิษของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อสัตว์น้ำทั้ง 4 ชนิด

3. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อสัตว์ทดลองทั้ง 4 ชนิด

3.1 หาอัตราการตายของสัตว์ทดลองซึ่งดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองเบื้องต้น โดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2. แต่เพิ่มการทดลองเป็น 3 ชั่วโมงแต่ละความเข้มข้น สำหรับปลาฉลาม, ปลาหางนกยูง และแมลงดาส่วน เพิ่มปริมาตรสารละลายแบคทีเรียเป็น 4 ลิตร และใช้สัตว์ทดลองโหลละ 10 ตัว ส่วนลูกกิ้งก่ามกรามดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองเบื้องต้นทุกประการ

3.2 หากกลุ่มควบคุมโดยเพิ่มปริมาตรน้ำที่ตกตะกอนคลอรีนเป็น 4 ลิตร สำหรับปลาฉลาม, ปลาหางนกยูง และแมลงดาส่วน ส่วนกิ้งก่ามกรามใช้ปริมาตรน้ำ 5 ลิตรเช่นเดิม เพิ่มการทดลองเป็น 3 ชั่วโมงแต่ละชั่วโมงใช้สัตว์ทดลอง 10 ตัว

3.3 ตรวจสอบผลการทดลองโดยบันทึกอัตราการตายที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

3.4 จากข้อมูลความเข้มข้นและอัตราการตาย สามารถนำไปคำนวณหาสมการ probit regression line เพื่อประเมินค่า LC_{50} ของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อสัตว์น้ำทั้ง 4 ชนิดที่เวลาต่าง ๆ กัน

4. ประมาณค่าระดับเริ่มเป็นพิษ (threshold of toxicity) ตามเส้นโค้งความเป็นพิษ (toxicity curve) และคำนวณหาค่าระดับปลอดภัย (safe concentration) ของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อสัตว์ทดลองทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ปัจจัยปรับค่า (application factor) ตามสัมมุติฐาน LFPI (Laboratory Fish Production Index) คูณกับค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณจากเส้นโค้งความเป็นพิษ (สัมมุติ, 2522)

5. การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของ B. thuringiensis var. israelensis ต่อปลาหางนกยูง

5.1 เตรียมสารละลายแบคทีเรียเข้มข้น 10 ppm และ 500 ppm ใส่ในตู้ปลาขนาด 16x10x10 นิ้ว โดยมีปริมาตรสารละลายแบคทีเรีย 16 ลิตร ใช้ปลาหางนกยูงเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 10 ตัวต่อตู้ปลา 1 ใบ ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมงให้ออกซิเจนตลอดเวลา การทดลอง 6 เดือน เปลี่ยนสารละลายแบคทีเรียออกครึ่งหนึ่งสัปดาห์ละครั้ง

5.2 ทำกลุ่มควบคุมโดยใช้น้ำที่ตกตะกอนคลอรีนแล้วปริมาตร 16 ลิตร เช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง เปลี่ยนน้ำครึ่งหนึ่งสัปดาห์ละครั้งตลอดเวลา 6 เดือน

5.3 ทำการแยกลูกปลาที่เกิดแต่ละครั้งออกมาเลี้ยงต่างหากในสารละลายแบคทีเรียที่ความเข้มข้นเท่าเดิม

5.4 บันทึกอัตราขยายพันธุ์, อัตราตายที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลอง, การเจริญเติบโตโดยเปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาหางนกยูงทั้งก่อนและหลังการทดลอง นอกจากนี้คอยสังเกตอาการผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำในระหว่างการทดลองส่งสัปดาห์ต่อครั้ง ได้แก่ ส่วนประกอบต่าง ๆ ของไนโตรเจน (NH_3-N , NO_2-N , NO_3-N), ฟอสเฟต (PO_4), ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (D.O.), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ (ดูภาคผนวก)

6.1 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเพื่อหาสมการเส้นตรง probit regression line โดยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิต (probit analysis) (Finney, 1952)

6.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า LC_{50} โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) (จันทสิทธิ์, 2523)

6.3 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่โดยใช้ LSD (least significant difference) (จันทสิทธิ์, 2523)

6.4 วิเคราะห์สมการเส้นโค้งความเป็นพิษ (เล่มมณี, 2522) ซึ่งมีลักษณะเป็น

$$M = a + be^{-KH}$$

เมื่อเปลี่ยนเป็นสมการเส้นตรง

$$\ln(M-a) = \ln b - KH$$

โดยที่ $M = LC_{50}$ = ความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 % ในเวลา H ชั่วโมง

H = เวลาที่สัตว์ทดลองได้รับสารพิษ

a = ระดับเริ่มเป็นพิษ

K = อัตราการเพิ่มความเข้มข้นเป็นพิษ

b = ค่าคงที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย