

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

วิธีการเลี้ยงยุง

ระยะตัวเต็มวัย (Adult) ยุงที่ใช้เลี้ยงในการทดลองได้มาจากคณะอายุรศาสตร์เซตรอน นำมาเลี้ยงในกรงมุ้งลวดขนาด $30 \times 30 \times 30$ ซม. กรงละ 50 ตัว โดยให้มีจำนวนตัวผู้และตัวเมียใกล้เคียงกัน ให้ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหาร โดยใช้สำลีชุบน้ำหวานพอหมาด ๆ วางบน petri dish แล้วใส่ไว้ในกรงยุง เปลี่ยนสำลีชุบน้ำหวานทุกวัน ยุงตัวผู้จะเจริญเต็มที่และผสมพันธุ์กับยุงตัวเมียหลังจากออกจากคักแกไค์ 1 วัน สำหรับยุงตัวเมียจะเจริญเต็มที่และคัก host หลังจากออกจากคักแกไค์ 2 วัน เมื่อต้องการให้ยุงตัวเมียวางไข่ ให้กินเลือดหนูขาว (mice) โดยจับหนูใส่ในของลวดตาข่ายที่มีคาห่างพอสมควร จับลวดตาข่ายให้กระชับพอที่จะไม่ให้หนูคืบหลุดออกมาได้และไม่ให้แน่นเกินไปจนหนูตาย คอกจากนั้นใส่ไว้ในกรงยุงเวลาใกล้พลบค่ำ ติ่งไว้ตลอดคืนรุ่งเช้าจึงเอาหนูออก แล้วใส่หลอดพลาสติกบรรจุน้ำประปาไว้ในกรงยุง เพื่อให้เป็นที่สำหรับยุงวางไข่

ระยะไข่ (Egg) ภายหลังจากยุงตัวเมียกินเลือดหนูแล้วประมาณ 2 - 3 วัน จะเริ่มวางไข่ ไข่ของยุงชนิดนี้มีลักษณะเป็นแผ่นสีน้ำตาลลอยอยู่บนผิวน้ำ แต่ละแพแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนไข่ที่ติดซ้อนกันแน่นภายในแพ ไข่ที่กินร้อนแพไข่ออกมาวางใน petri dish (ขนาด 10×1.5 ซม.) ซึ่งมีน้ำอยู่ประมาณ $\frac{2}{3}$ ส่วน petri dish ละ 1 แพ ปิดฝาแล้วบันทึกวันที่เพื่อทราบอายุของไข่

ระยะลูกน้ำ (Larva) ไข่จะฟักเป็นตัวภายใน 1 วัน ใช้ dropper ดูดลูกน้ำออกจาก petri dish ถ้วยใส่ในถาดอลูมิเนียม (ขนาด $19 \times 29 \times 5$ ซม.) ซึ่งมีบรรจุน้ำประปาอยู่ $\frac{2}{3}$ ส่วน ถาดละ 100 ตัว ใช้อาหารสุนัขสำเร็จรูป (ผลิตภัณฑ์ของสงเคราะห์สัตว์ กสิกร จำกัด) เลี้ยงลูกน้ำ โดยมีให้เป็นชั้นเล็ก ๆ

ผสมกับน้ำเล็กน้อยใส่ในตากลูกน้ำทุกวัน สำหรับระยะลูกน้ำนี้ต้องใช้กระดาษ tissue ซ้ำๆ ที่คลุมอยู่เหนือผิวน้ำทุกวัน เพื่อให้ลูกน้ำมีอากาศหายใจเพียงพอ และเปลี่ยนน้ำในตาทุก 3 วัน

ระยะดักแด้ (Pupa) เมื่อลูกน้ำมีอายุครบ 6 วัน จะเริ่มเป็นตัวโม่ง ใช้ dropper ดูดแยกออกมาจากตาใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 25 CC. ที่มีน้ำอยู่เล็กน้อยหลอดละ 1 ตัว ทิ้งไว้ประมาณ 1 - 2 วัน ตัวเต็มวัยจะเจริญออกมา ในกรณีที่ไม่ต้องการแยกเพศ ให้นำตัวโม่งรวมกันใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 100 CC. ประมาณหลอดละ 10 ตัว แล้วใส่หลอดพลาสติกนี้ไว้ในกรงยุง

การเตรียม specimens เพื่ออาบรังสี

ระยะไข่ ก่อนที่จะทำการสุ่มตัวอย่างไข่ที่ถูกวางในวันแรก คัดสำลีเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ใช้ forcep คีบวางในหลอดทดลอง (test tube) ขนาด 25 CC. ที่มีกระดาษ tissue อัดแน่นอยู่สูงประมาณ 3 ซม. จากนั้นหยดน้ำใช้ dropper ให้นำหยดลงบนสำลีและกระดาษ tissue ให้เปียกชุ่ม ค่อยจากนั้นจึงใช้พู่กันขนแพะไขว่วางลงบนสำลีในหลอดทดลองที่เตรียมไว้หลอดละ 1 แพ้ โดยระวังไม่ให้แพะไขว่แตกจากกัน เมื่อทำการอาบรังสีเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้นำแพะไขว่ออกใส่ใน petri dish ขนาด 10 x 1.5 ซม. ที่มีน้ำอยู่ $\frac{2}{3}$ ส่วน ปิดฝาทิ้งไว้ รุ่งขึ้นใช้ dropper ดูดลูกน้ำที่ฟักออกมาถ่ายใส่ในตาอคูมิเนียมขนาด 19 x 29 x 5 ซม. ทำการเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจนกระทั่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย

ระยะลูกน้ำ ทำการสุ่มตัวอย่างไข่จากกรงยุงมาวางบนผิวหน้าในตาอคูมิเนียมขนาด 19 x 29 x 5 ซม. เลี้ยงไว้จนได้ระยะลูกน้ำตามอายุที่ต้องการ จึงใช้ dropper ดูดลูกน้ำใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 CC. หลอดละ 25 ตัว ให้ระดับน้ำในหลอดทดลองสูงประมาณ 4 ซม. จากนั้นหลอด เมื่ออาบรังสีแล้วดูดลูกน้ำออกมาเลี้ยงใน petri dish ขนาด 10 x 1.5 ซม. จนกระทั่งเจริญเป็นตัวเต็มวัย

ระยะกักแค้ ใช้ dropper สุ่มตัวอย่างกุกตัวโม่งที่มีอายุ 1 วัน ใส ในหลอดทดลองควยวิธีเดียวกับระยะลูกน้ำ ภายหลังจากอาบรังสีแล้วแยกตัวโม่งออก ใสหลอดพลาสติกขนาด 25CC. ที่มีน้ำอยู่เล็กน้อยหลอดละ 1 ตัว ปิดฝาหลวม ๆ ทิ้งไว้ จนเจริญเป็นตัวเต็มวัย

ระยะตัวเต็มวัย ใช้หลอดกุกแมลงกุกยุงตัวผู้และยุงตัวเมียอายุ 1 วัน แยกเพศใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 CC. หลอดละ 10 ตัว ใสสำลีอุดปากหลอดไว้ หลวม ๆ หลังจากอาบรังสีแล้วนำมาเลี้ยงในกรงมุ้งลวดขนาด 15 x 15 x 25 ซม. กรงละ 10 ตัว

แผนการทดลอง

นำ specimens ไปอาบรังสีแกมมาที่ได้จาก Cesium-137 source ที่ศิริกวงสิมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แล้วนำมาศึกษาในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 - 30 องศา เซ็นติเกรด การอาบรังสีแกมมากระทำกับทุกระยะของยุง ทำการทดลอง treatment ละ 4 ชั่วโมง แต่ละชั่วโมงแมลง 25 ตัว ยกเว้นระยะไข่ซึ่งใช้ไข่จำนวน 92 - 250 ฟอง และระยะตัวเต็มวัยซึ่งใช้ยุง 100 ตัว ในการทดลอง ปริมาณรังสีที่ใช้เพิ่มขึ้นตามลำดับตามอายุของยุงตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัย อัตรารังสี (dose rate) ที่ใช้คือ 256 และ 220 แรด/นาที่ เนื่องจากอัตรา รังสีเปลี่ยนแปลงทุก 3 เดือน

1. ปริมาณรังสีแกมมา (แรด) ที่ใช้ในการทดลอง

ไข่อายุ 1 วัน	125	250	500	1,000				
ลูกน้ำอายุ 1 วัน		250	500	1,000	2,000			
ลูกน้ำอายุ 3 วัน			500	1,000	2,000	4,000		
ลูกน้ำอายุ 6 วัน				1,000	2,000	4,000	8,000	
คักแก้อายุ 1 วัน					2,000	4,000	8,000	16,000
ตัวเต็มวัย						4,000	8,000	16,000 32,000



2. นำตัวเค็มวัยที่รอดจากการอาบรังสีผู้กระยะมาทำการศึกษาคูการ เป็น
หมันโดยแบ่งออกเป็น 2 พวก

2.1 ตัวผู้ที่รอดจากการอาบรังสีผสมพันธุ์กับตัวเมียที่ไม่อาบรังสี

2.2 ตัวเมียที่รอดจากการอาบรังสีผสมพันธุ์กับตัวผู้ที่ไม่อาบรังสี

ทำการทดลองพวกละ 10 คู่ โดยแบ่งออกใส่กรงมุ้งลวดขนาด 15 x
15 x 25 ซม. กระจก 5 คู่ ให้ผู้ตัวเมียกินเลือกหนูขาวเพื่อใหวางไข่

การทดลองนี้กระทำกับยูงระยะต่าง ๆ ตามอายุที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
ยกเว้นในกรณีของระยะตัวเค็มวัย ซึ่งทำการอาบรังสีแก่ตัวเค็มวัยแยกเพศกันโดยคง

บันทึกผล

แบ่งเป็น 5 ขั้นตอนต่อไปนี้

1. นับจำนวนตายทั้งหมดจากระยะแรกเริ่มที่ทำการอาบรังสี จนถึงขั้น
เจริญเป็นตัวเค็มวัยในทุกการทดลอง เปรียบเทียบกับ Check ที่ไม่โก้อาบรังสี
บันทึกผลผลการทดลองทุกวัน

สูตรที่ใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ตาย (Abbot's Formula)

$$\% \text{ Killed} = \frac{\% \text{ Survival in Check} - \% \text{ Survival in Treatment}}{\% \text{ Survival in Check}} \times 100$$

หมายเหตุ ไร้อุสรณ์ในทุกการทดลองยกเว้นในการทดลองที่ไม่มีการตายเกิดขึ้นใน
check

2. หาว่า LD₅₀ จากเปอร์เซ็นต์การตายที่คำนวณได้จากสูตร
Abbot's Formula โดยเขียนค่าปริมาณรังสี versus เปอร์เซ็นต์การตายใน
log-probit scale

3. บันทึกระยะเวลาที่แมลงใช้ในการเจริญเติบโตจนเป็นบุงในทุกระยะทดลอง โดยการนับจำนวนวันต่อจากวันที่อาบรังสี

4. นับจำนวนไข่และจำนวนฟักของไข่จากบุงที่รอดจากการอาบรังสี ผสมกันกับบุงที่ไม่ถูกอาบรังสี นำมาเปรียบเทียบกับ check บันทึกผลการทดลองทุกวัน

5. คำนวณหาค่าเฉลี่ย และ standard deviation ของจำนวนไข่และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่

