

บทที่ ๓

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน



อุปกรณ์

๑. สารเคมีมีโทปรีน

ชื่อเคมี

Isopropyl (2E, 4E) -11-methoxy-3, 7, 11 trimethyl-2, 4-dodecadienoate

ชื่อการค้า

Altosid[®] SR-10 ของ Zoecon Corporation - 975 California Avenue-Palo Alto, California 94304-(415) 329-1130

สูตรเอ็มพีริเคิล

$C_{19}H_{34}O_3$

น้ำหนักโมเลกุล

310

สถานะทางฟิสิกส์

ของเหลว

ความถ่วงจำเพาะ

0.9261 กรัม/มิลลิลิตรที่ 20° ซ

ความสามารถในการละลาย

ละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ ละลายน้ำได้ 1.39 ppm

แรงดันไอ

1.60×10^{-4} มม. พรอทที่ 40°ซ

2.37×10^{-5} มม. พรอทที่ 25°ซ

๒. สัตว์ที่ใช้ประกอบการทดลอง

๒.๑ ยุงลาย, *Aedes aegypti*

๒.๒ ยุงบ้าน, *Culex pipiens quinquefasciatus*

ได้รับไข่ม้วนทั้งสองชนิดจากห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา จุฬาลงกรณ์มหา-

วิทยาลัย ทำการเพาะเลี้ยงที่ห้องทดลองภาควิชาชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒.๓ *Golden Hamster, Mesocricetus auratus* ได้รับจากห้อง
ปฏิบัติการ *Reproductive Physiology* คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๓. วัสดุที่ใช้เลี้ยงแมลง

- ๓.๑ ถาดเพาะธัญน้ำยุงขนาด $26 \times 42 \times 8$ ซม.
- ๓.๒ กล่องพลาสติกขนาด $7.5 \times 10 \times 5$ ซม.
- ๓.๓ กรงเลี้ยงยุงขนาด $44 \times 44 \times 65$ ซม.
- ๓.๔ *Dropper*
- ๓.๕ สริงช้อนธัญน้ำ
- ๓.๖ กระดาษฟาง
- ๓.๗ เศษอาหารหนูของบริษัท *F.E. Zuellig*
- ๓.๘ มัลวิติน ซีรัพ (*Mulvitin syrup*) ของบริษัทสีลมการแพทย์
จำกัด
- ๓.๙ *Petri dish*
- ๓.๑๐ สำลี

๔. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ทดลอง

- ๔.๑ กล่องพลาสติกขนาด $9 \times 20 \times 5$ ซม.
- ๔.๒ บีกเกอร์ขนาด 25, 100, 250 และ 600 มล.
- ๔.๓ กระบอกตวงขนาด 100 และ 500 มล.
- ๔.๔ *Volumetric flask* ขนาด 100 มล.
- ๔.๕ ไปเปตขนาด 0.1, 1, 5 และ 10 มล.
- ๔.๖ แท่งแก้ว
- ๔.๗ เทอร์โมมิเตอร์

๔.๘ พูกันเบอร์ ๑

๔.๘ เครื่องวิเคราะห์หน้าของ *Horiba Model U-7*วิธีดำเนินการทดลอง๑. การเลี้ยงยุง

นำไข่ยุงมาใส่ถาดสำหรับเพาะเลี้ยงซึ่งใส่น้ำไว้ประมาณ ๑,๐๐๐ มล.

ไข่ยุงลายมีลักษณะเป็นฟองเดี่ยว ๆ ติดอยู่บนกระดาษฟาง เมื่อนำมาฟักในถาดต้องกดให้จมอยู่ใต้ผิวน้ำ บางครั้งไข่ยุงลายจะไม่ยอมฟักง่าย ๆ เนื่องจากอยู่ในสภาพดี (ซึ่งมีสภาพเช่นเดียวกับรายงานของ บุญล้วน, ๒๕๑๕) ต้องนำขึ้นมาตากให้แห้งแล้วแช่ใหม่หลาย ๆ ครั้ง ระยะเวลาที่ไข่ยุงลายจะฟักเป็นตัวลูกน้ำยุงนั้นขึ้นอยู่กับอายุของไข่ในสภาพแห้ง ไข่ที่ถูกเก็บไว้นานจะฟักเป็นตัวเร็ว แต่อัตราการฟักจะต่ำกว่าไข่ที่เพิ่งเก็บใหม่ ถ้าต้องการให้ไข่ฟักเป็นตัวลูกน้ำยุงเร็ว มักจะใส่วิตามินซีลงไปใต้น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วย ส่วนไข่ยุงบ้านมีลักษณะเป็นแพลอยอยู่บนผิวน้ำและฟักเป็นตัวภายใน ๒๔ ชั่วโมงหลังจากที่แม่ยุงวางไข่ เมื่อไข่ฟักเป็นลูกน้ำยุงแล้วต้องให้อาหาร โดยใช้เศษอาหารหมูโรยลงบนผิวน้ำครั้งละน้อย ๆ วันละสองครั้ง ในการเลี้ยงลูกน้ำยุงนี้ ต้องคำนึงถึงความหนาแน่นของลูกน้ำด้วย ไม่ควรให้มีลูกน้ำยุงในถาดมากเกินไป เพราะจะเป็นสาเหตุให้ลูกน้ำยุงตายได้

การเจริญเติบโตของลูกน้ำยุงแบ่งออกเป็น ๔ ระยะการลอกคราบ ระยะหนึ่ง ๆ ใช้เวลาประมาณ ๒๔-๓๒ ชั่วโมง ระยะที่ ๔ จะใช้เวลานานกว่าระยะอื่น เมื่อลูกน้ำยุงลอกคราบครั้งที่ ๔ แล้วจะกลายเป็นตัวโม่ง ลูกน้ำยุงจะเป็นตัวโม่งเร็วหรือช้าขึ้นกับอาหารและอุณหภูมิ สังเกตพบว่าถ้าอุณหภูมิของน้ำสูง ลูกน้ำยุงจะเจริญเติบโตเร็ว ใช้เวลาเพียง ๘-๑๐ วัน ก็กลายเป็นตัวโม่ง ซึ่งจะมีอายุประมาณ ๔๘ ชั่วโมง ตัวโม่งไม่กินอาหาร เมื่อถึงระยะนี้ไม่ต้องให้อาหาร ใช้ *dropper* ตูดจากถาดเลี้ยงไปใส่กล่องพลาสติก นำไปเก็บไว้ในกรงเลี้ยงยุง เมื่อกลายเป็นยุงแล้วต้องให้น้ำหวานเป็นอาหาร ในห้องทดลองใช้เมล็ดดินซีรฟผสมน้ำให้เจือจาง ประมาณ ๕% ขุดสำลีวางไว้ในกรงเลี้ยงยุง ยุงตัวผู้จะกินน้ำหวานอย่างเดียว ส่วนยุงตัวเมียต้องกินเลือดด้วยจึงจะสร้างไข่ได้ หลังจากเป็นยุงแล้ว ๒-๓ วันต้องนำ *Hamster* ใส่กรงขนาดพอดีตัวมาไว้ในกรงเลี้ยงยุง เพื่อให้ยุงตัวเมียกัดดูดเลือด

ยุงลายกัดตอนกลางวัน ส่วนยุงบ้านกัดในเวลากลางคืน เมื่อให้ยุงกัดจุดเลือดแล้วต้องนำปีกเกอร์
บรรจุน้ำประมาณ ๑ ถ้วยมาวางไว้ในกรงเลี้ยงยุงเพื่อให้ยุงวางไข่ ยุงลายชอบวางไข่ตาม
ขอบภาชนะขึ้น ๆ เหนือผิวน้ำเล็กน้อย ถ้าต้องการเก็บไข่ไว้ใช้จะต้องนำกระดาษฟางมาพันรอบ
ด้านในของปีกเกอร์ กระดาษฟางจะจับจุดน้ำไว้ขึ้น ๆ เมื่อยุงลายมาวางไข่ ไข่จะติดอยู่บน
กระดาษฟาง นำมาตากแห้งสามารถเก็บไว้ได้นานหลายเดือน ส่วนไข่ยุงบ้านเก็บไว้ไม่ได้เพราะ
ไข่ฝ่อง่ายต้องปล่อยให้ฟักเป็นตัวเลย ปริมาณของไข่ยุงขึ้นอยู่กับการเลือกที่กินเข้าไป ถ้าแม่ยุงกิน
เลือดเข้าไปมากจะวางไข่มาก แม่ยุงลายตัวหนึ่งจะไข่ประมาณ ๕๐-๑๐๐ ใบ (บุญล้วน, ๒๕๑๕)

๒. การคัดเลือกลูกน้ำยุงเพื่อใช้ในการทดลอง

ในการทดลองจำเป็นต้องใช้ลูกน้ำยุงอายุเท่า ๆ กัน จึงอาศัยความแตกต่าง
ระหว่างลูกน้ำยุงทั้ง ๔ ระยะเพื่อคัดเลือกลูกน้ำยุงระยะการลอกคราบต่าง ๆ มาใช้ในการ
ทดลอง

ลูกน้ำยุงระยะที่ ๑

ขนาดเล็กยาวประมาณ ๐.๒ ซม. เส้นขนต่าง ๆ ยังไม่เจริญอย่างเต็มที่ จะมีไม่
แหลมคมอยู่ตอนปลายของหัว สำหรับต้นให้เปลือกไข่แตกออก ซึ่งลูกน้ำยุงระยะอื่นไม่มี ตาของ
ลูกน้ำยุงระยะนี้เป็นตาที่มองดูได้หนึ่งคู่เรียกว่า *larval eyes* ส่วนคอของลูกน้ำยุงจะกว้าง
กว่าส่วนยาวของลำตัว ลูกน้ำยุงระยะนี้มีอายุประมาณ ๑-๒ วัน

ลูกน้ำยุงระยะที่ ๒

ขนาดใหญ่กว่าระยะที่ ๑ ยาวประมาณ ๐.๔-๐.๕ ซม. แต่เส้นขนต่าง ๆ ยังไม่
เจริญอย่างเต็มที่ ส่วนหัวของลูกน้ำยุงระยะนี้จะไม่มีปุ่มแหลมต่างจากลูกน้ำยุงระยะที่ ๑ ใช้
เวลาเติบโต ๓-๔ วัน จึงลอกคราบเข้าสู่ระยะที่ ๓

ลูกน้ำยุงระยะที่ ๓

ยาวประมาณ ๐.๘ ซม. เริ่มเห็น *adult eyes* เพิ่มขึ้นมา ๑ คู่ ขนาดเล็ก
กว่า *larval eyes* ส่วนกว้างของคอเมื่อเทียบกับความยาวของลำตัวแล้วเกือบจะเท่า ๆ
กัน ใช้เวลา ๓-๔ วันจึงจะลอกคราบเข้าสู่ระยะที่ ๔

ลูกน้ำยุงระยะที่ ๔

ลูกน้ำยุงระยะนี้เจริญเต็มที่แล้วยาวประมาณ ๑.๐ ซม. *adult eyes* ขยายขนาดใหญ่มากกว่า *larval eyes* เส้นขนตามตำแหน่งต่าง ๆ ขึ้นครบสมบูรณ์ ใช้เวลา ๓-๔ วัน จึงลอกคราบเป็นตัวโม่ง

๓. การเตรียมสารละลายมีโทพรีน

มีโทพรีนประกอบด้วย *Active Ingradient* คือ *Isopropyl (2E, 4E)-11-methoxy-3, 7, 11-trimethyl-2, 4-dodecadienoate* 10% และ *Inert Ingradients* อีก 90% การเตรียมสารละลายมีโทพรีนกระทำโดยไปเปิดสารมา ๑ มล. แล้วเติมน้ำให้ครบ ๑๐๐ มล. จะได้สารละลายความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นก็ทำให้สารละลายเจือจางลงเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ

๔. การศึกษาความเป็นพิษของมีโทพรีนในยุงลายและยุงบ้าน

๔.๑ เตรียมสารละลายมีโทพรีนความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ppm โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

๔.๒ ใส่สารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในกล่องพลาสติกความเข้มข้นละ ๒๐ ข้ำ ข้ำละ ๑๐๐ มล.

๔.๓ นับลูกน้ำยุงหรือตัวโม่งใส่ลงไปในข้ำละ ๑๐ ตัว

๔.๔ ทุกข้ำต้องมีกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ผสมสารลงไป

๔.๕ หลังจากนับสัตว์ทดลองใส่ลงไปแล้วประมาณ ๓ ชั่วโมงจึงให้อาหารแก่ลูกน้ำยุงแล้วปิดฝากล่อง ซึ่งทำด้วยมุ้งลวด นำไปวางไว้ในที่ซึ่งแสงแดดส่องเข้ามาได้

๔.๖ บันทึกจำนวนลูกน้ำยุงหรือตัวโม่งหรือยุงที่ตายทุก ๆ วันแล้วเขียนทิ้งไปและให้อาหารแก่ลูกน้ำยุงที่ยังเหลืออยู่วันละครั้ง จนกว่าจะกลายเป็นยุงหรือตายหมด

๔.๗ คิคเปอร์เซนต์ตายของยุงที่เกิดจากสารเคมีอย่างเดี่ยว โดยคำนวณจากสูตรของแอบบอทท์ (*Abbott's Formula*) ดังนี้

$$\% \text{ ตาย} = \frac{\% \text{ ตายของกุ่มทดลอง} - \% \text{ ตายของกุ่มควบคุม}}{100 - \% \text{ ตายของกุ่มควบคุม}} \times 100$$

จะใช้สูตรของแอบบอทที่ต่อเมื่อ% ตายของกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่าง ๔-๒๐% ถ้าต่ำกว่า ๔% ให้ใช้% ตายธรรมดา ถ้าสูงกว่า ๒๐% ต้องทำการทดลองใหม่ (Anonymous, 1970)

๔.๘ นำ% ตายแอบบอทไปเขียนกราฟใน *probit-log scales*

๔.๙ อ่านค่า LC_{50} จาก *dosage-mortality curve*

๔.๑๐ ทดสอบหาความเข้มข้นของมีโทรินซึ่งทำให้ลูกน้ำยุงทุกระยะการลอกคราบ

ตายหมด

๔.๑๑ ใช้ความเข้มข้นสูงที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายหมดมาทดลองกับลูกน้ำยุงทุกระยะการลอกคราบ เพื่อเปรียบเทียบการตายระหว่างระยะการเจริญเติบโต จำแนกเป็นการตายขณะเป็นลูกน้ำยุง การตายขณะเป็นตัวโม่ง และการตายขณะเป็นตัวเต็มวัย

๔.๑๒ สำหรับยุงบ้านชอบอาศัยอยู่ในน้ำสกปรก จึงต้องนำน้ำสกปรกมาทำการทดลองด้วยและเปรียบเทียบผลกับการทดลองในน้ำประปา สำหรับน้ำสกปรกที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ สภาพของน้ำเป็นดังนี้คือ อุณหภูมิ = 27.4° ซ, $pH = 7.4$, $DO : 3.5$ ppm และ $Turbidity = 199$ ppm ส่วนน้ำประปาที่ซิงหิ้งไว้ ๑ สัปดาห์ สภาพของน้ำเป็นดังนี้คือ อุณหภูมิ 29.5° ซ, $pH = 8.2$, $DO = 6.6$ ppm และ $Turbidity = 24$ ppm

๔.๑๓ เปรียบเทียบค่า LC_{50} ในยุงสองชนิด

๔.๑๔ เปรียบเทียบค่า LC_{50} ในยุงแต่ละระยะเพื่อหา *sensitive stage*

๔.๑๕ สำหรับยุงบ้านเปรียบเทียบค่า LC_{50} ในน้ำทั้งสองชนิด

๔. สูตรการคำนวณที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

๔.๑ สูตรหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean หรือ \bar{X})

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

๔.๒ สูตรหาค่า Standard Deviation (S.D.)

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

๔.๓ สูตรหาค่า Chi-square (X^2) จากตารางสำเร็จแบบ 2X2

	A	B	รวม
x	a	b	a+b
y	c	d	c+d
	a+c	b+d	N

$$X^2 = \frac{(ad - bc) - \frac{1}{2} N)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \dots (\text{ล้าน, ๒๕๑๔})$$

ความหมายของอักษรย่อในสูตร

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยเลขคณิต

S.D. = Standard Deviation

Xi = ข้อมูลของยาแต่ละตัว

n = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

X^2 = Chi-Square

x = ชนิดของลูกน้ำยุงที่ ๑

y = ชนิดของลูกน้ำยุงที่ ๒

A = ลูกน้ำยุงที่ตาย

B = ลูกน้ำยุงที่ไม่ตาย

006712

a, c = จำนวนเปอร์เซ็นต์ตาย

b, d = จำนวนเปอร์เซ็นต์ที่รอดเป็นฝูง

N = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด