ความเป็นพิษของ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* ต่อลูกน้ำยุงลาย (*AEDES AEGYPTI*) ในภาชนะเก็บน้ำต่างชนิดภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน

นางสุทารัตน์ พรจรรยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-533-206-2

TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* TO *AEDES AEGYPTI* LARVAE IN VARIOUS WATER CONTAINERS UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Mrs. Sutarat Pornchanya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Environmental Biology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2002

ISBN 974-533-206-2

ความเป็นพิษของ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* ต่อลูกน้ำยุงลาย (*AEDES AEGYPTI*) ในภาชนะเก็บน้ำต่างชนิด ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……...
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาณี วรรณนิธิกุล)
ประธานกรรมการ

……...
(อาจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ ธานี)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

……...
(อาจารย์ ภก. ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ)
กรรมการ

……...
(รองศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ สุขประเสริฐ)
กรรมการ

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

……...
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาท สืบค้า)
คณบดีสำนักวิชาวิทยาศาสตร์

สุทารัตน์ พรจรรยา: ความเป็นพิษของ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* ต่อลูกน้ำยุงลาย (*AEDES AEGYPTI*) ในภาชนะเก็บน้ำต่างชนิดภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน (TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* TO *AEDES AEGYPTI* LARVAE IN VARIOUS WATER CONTAINERS UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS) อ.ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ ธานี, 93 หน้า. ISBN 974-533-206-2

จากการนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่ค่า LC_{50} ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่2 ในเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงในภาชนะเก็บน้ำที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองในอาคารอยู่ระหว่าง $1.68x10^{8}$ ถึง $2.25x10^{8}$ และ $9.29x10^{7}$ ถึง $1.45x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกอาคารอยู่ระหว่าง $7.53x10^{8}$ ถึง $1.19x10^{9}$ และ $5.28x10^{8}$ ถึง $8.99x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในห้องปฏิบัติการอยู่ระหว่าง $1.67x10^{8}$ ถึง $2.28x10^{8}$ และ $1.01x10^{8}$ ถึง $1.71x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่า LC_{50} จากการนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียต่อลูกน้ำระยะที่4 ในเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงในภาชนะเก็บน้ำที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองในอาคารอยู่ระหว่าง $1.57x10^{8}$ ถึง $3.84x10^{8}$ และ $9.01x10^{7}$ ถึง $2.32x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกอาคารอยู่ระหว่าง $9.59x10^{8}$ ถึง $1.24x10^{9}$ และ $7.88x10^{8}$ ถึง $9.62x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในห้องปฏิบัติการอยู่ระหว่าง $1.93x10^{8}$ ถึง $2.68x10^{8}$ และ $1.68x10^{8}$ ถึง $1.99x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการทดลองในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผาและอลูมิเนียม ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันในเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง ของลูกน้ำยุงลายทั้ง 2 ระยะ ผลลัพธ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ส่วนอัตราการตายของลูกน้ำที่สิ่งแวดล้อมในอาคารและในห้องปฏิบัติการมากกว่านอกอาคารที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 การทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Bti หรือค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นทำให้อัตราการตายของลูกน้ำทั้ง 2 ระยะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นอัตราการตายของลูกน้ำทั้ง 2 ระยะจะลดลง เมื่อค่าออกซิเจนละลายลดลงทำให้อัตราการตายของลูกน้ำเพิ่มขึ้นที่ระดับ นัยสำคัญ 0.05

สาขาวิชาชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SUTARAT PORNCHANYA : TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* TO *AEDES AEGYPTI* LARVAE IN VARIOUS WATER CONTAINERS UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS

THESIS ADVISOR : DR. NATHAWUT THANEE, Ph.D. 93 pp. ISBN 974-533-206-2

LC_{50}/*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) / *Aedes aegypi* / Dissolved Oxygen (DO) / pH

The bacterial cell counts at LC_{50} with 2^{nd} instar larvae and tested in indoors after 72 and 96 hours using different containers were between $1.68x10^8$ to $2.25x10^8$ and $9.29x10^7$ to $1.45x10^8$ cells/ml respectively. When tested in outdoors the cell count ranged from $7.53x10^8$ to $1.19x10^9$ and $5.28x10^8$ to $8.99x10^8$ cells/ml after 72 and 96 hours respectively. Under laboratory conditions cell counts were between $1.67x10^8$ to $2.28x10^8$ and $1.01x10^8$ to $1.71x10^8$ cells/ml at 72 and 96 hours respectively.

By comparison the bacterial cell count at LC_{50} with 4^{th} instar larvae and tested in indoors after 72 and 96 hours using different containers were between $1.57x10^8$ to $3.84x10^8$ and $9.01x10^7$ to $2.32x10^8$ cells/ml respectively. When tested outdoors the cell counts ranged from $9.59x10^8$ to $1.24x10^9$ and $7.88x10^8$ to $9.62x10^8$ cells/ml after 72 and 96 hours respectively. Under laboratory conditions cell counts were between $1.93x10^8$ to $2.68x10^8$ and $1.68x10^8$ to $1.99x10^8$ cells/ml at 72 and 96 hours respectively.

The results getting from both type of mosquito larvae (2^{nd} and 4^{th} instar) under 72 and 96 hours in glass, cement, earthenware and aluminium under the same conditions were similar (α=0.05). The testing larvae showed significantly higher mortality under indoor and laboratory than under outdoor conditions (α=0.05). An increase of Bti concentration or pH results in higher mortality in both instar larvae. When there is an increase of water temperature, then lower mortality in both instar larvae results. The decrease of DO results in higher mortality in both instar larvae (α=0.05).

สาขาวิชาชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ ธานี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ผู้ให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด และกราบขอบพระคุณบุคคล และกลุ่มบุคคลต่างๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการ และ ด้านดำเนินงานวิจัย อาทิเช่น

- รศ. เสาวลักษณ์ สุขประเสริฐ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ผศ. ดร. พาณี วรรณนิธิกุล, อาจารย์ ภก. ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ, รศ. ดร. กรกช อินทราพิเชฐ, รศ. ดร. สมพงษ์ ธรรมถาวร, รศ.ดร.อรรณพ วราอัศวปติ และอาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน
- ขอขอบพระคุณ คุณ วีระพล โพธิจิตติ เจ้าหน้าที่ประจำสำนักงานควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงเขต 1 สระบุรี ที่ให้การสนับสนุนไข่ยุงลายที่ใช้ในการวิจัย
- ขอขอบคุณ คุณสิริลักษณ์ ดีสูงเนิน และเจ้าหน้าที่สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่กรุณาอำนวยความสะดวก
- ขอขอบคุณ คุณชาตรี พรจรรยา ที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณสุภาพ ธรรมวิชัย คุณสุจิตรา ละสูงเนิน และบิดามารดาที่ให้การเลี้ยงดูอบรมและสนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดีจนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

สุทารัตน์ พรจรรยา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……...ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)……...ข

กิตติกรรมประกาศ……ค

สารบัญ……..……..……..ง

สารบัญตาราง……..……..ช

สารบัญภาพ……..……..ฌ

บทที่

1 บทนำ……. 1

1.1 ความสำคัญของปัญหา…….. 1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย ……. ……..… 7

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย……..7

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น ……. ……7

1.5 ขอบเขตของการวิจัย ……8

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ……8

1.7 คำอธิบายศัพท์ ……. ……8

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..10

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยุง…… ……..……..10

2.1.1 ลักษณะเฉพาะที่สำคัญของ Subfamily Culicinae……..……11

2.1.2 นิเวศวิทยาของยุง……..……..……11

2.1.3 Genus *Aedes*……..……...12

2.1.4 ลักษณะและชีววิทยาของยุงลาย..……..…… 15

2.1.5 การแพร่กระจายของยุงลายเข้าสู่ประเทศไทย…….…….. 24

2.1.6 การสำรวจลูกน้ำยุงลาย ..……..…..... 24

2.1.7 ความสำคัญทางการแพทย์ของยุงลาย.....26

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*…… 28

2.2.1 อนุกรมวิธาน…… ……..……...….. 28

2.2.2 ประวัติและการศึกษา *Bacillus thuringiensis*…… ……..……. 28

2.2.3 สารพิษที่สร้างโดย Bt ……..……..……... ...30

2.2.4 คุณสมบัติของ Bt.…….…… 31

2.2.5 โครงสร้างของผลึกโปรตีน…….…… 33

2.2.6 สารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน…….……33

2.2.7 กลไกการออกฤทธิ์ของ Bti…….……..……36

2.2.8 ความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง…….……...……..…36

2.2.9 การเพาะเลี้ยง Bti …….……...……..41

2.2.10 ความปลอดภัยของ Bti ต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมาย…….……..……42

3 วิธีดำเนินการวิจัย ……..……..…… 44

3.1 วิธีวิจัย……..……..... 44

3.2 สถานที่ทำการวิจัย…….…….…… 45

3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง…….…….. 45

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง……..……... 46

3.4.1 การเตรียม Bti ……49

3.4.2 การเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย……... 50

3.4.3 การเตรียมภาชนะชนิดต่าง ๆ ..…….…….. 51

3.4.4 การทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย…. ……..…….. 51

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล…….…… 53

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล……54

4.1 การศึกษาความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย…….....54

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า LC_{50} กับสิ่งแวดล้อม……..……..……..…….. 67

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2.1 การศึกษาอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายต่างภาชนะ……..……....67
4.2.2 การศึกษาอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายต่างสิ่งแวดล้อม……..... ...68
4.2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย
กับปัจจัยทางกายภาพ……71
4.2.4 อุณหภูมิอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเข้มแสงในขณะทดลอง…..... 73
4.3 อภิปรายผลการศึกษา……..……... 74
5 บทสรุป……..……77
5.1 สรุปผลการวิจัย.....…….....77
5.2 การประยุกต์ผลการวิจัย…..…..……..……..…….. 79
5.3 ข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป……...……79
รายการอ้างอิง……...81
ประวัติผู้เขียน…….. 93

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 แสดงสถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2539 - 2544..... 4

2.1 แสดงร้อยละที่พบลูกน้ำยุงลายในภาชนะชนิดต่างๆ 23

2.2 แสดงคุณสมบัติและชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนใน Bt สายพันธุ์ต่างๆ.....35

4.1 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะแก้ว…….....55

4.2 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะพลาสติก…….....56

4.3 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะซีเมนต์……..57

4.4 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะดินเผา…….....58

4.5 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะอลูมิเนียม…….....59

4.6 แสดงสมการเส้นตรงของความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย ระยะที่ 2 ในภาชนะ 5 ชนิด ในสิ่งแวดล้อม 3 อย่าง…….....62

4.7 แสดงสมการเส้นตรงของความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย ระยะที่ 4 ในภาชนะ 5 ชนิด ในสิ่งแวดล้อม 3 อย่าง…….....62

4.8 แสดงค่า LC_{50} ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2……..... ... .63

4.9 แสดงค่า LC_{50} ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4……..... 63

4.10 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย……..67

4.11 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในภาชนะ 5 ชนิด วิธี One way ANOVA..... 67

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่

หน้า

4.12 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในสิ่งแวดล้อม 3 อย่างด้วยวิธี One way ANOVA 69

4.13 แสดงผลวิเคราะห์สถิติการเปรียบเทียบแต่ละคู่ตัวแปรในสิ่งแวดล้อม 3 อย่างโดยวิธีของ LSD 70

4.14 แสดงผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างอัตราตายของลูกน้ำยุงลายกับความเข้มข้นของ Bti และปัจจัยทางกายภาพโดยใช้วิธี Pearson correlation 71

4.15 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิของอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงเฉลี่ยจากการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 73

4.16 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิของอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงเฉลี่ยจากการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4..... 73

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 กราฟแสดงอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกรายปีของจังหวัดนครราชสีมา ในช่วงปี พ.ศ.2532-2544……..2

1.2 กราฟแสดงเปรียบเทียบอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดนครราชสีมา รายปีระหว่างปี พ.ศ.2541-2544……..3

1.3 กราฟแสดงอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกรายเดือนของจังหวัดนครราชสีมา ระหว่างปี พ.ศ.2532-2544……3

2.1 แสดงภาพวงจรชีวิตของยุงลายบ้าน.....13

2.2 แสดงภาพลักษณะของยุงลายบ้าน.....14

2.3 แสดงภาพลักษณะเฉพาะของลูกน้ำยุงลายบ้าน.....15

2.4 แสดงภาพไข่ของยุงลายบ้าน.....16

2.5 แสดงภาพลูกน้ำยุงลายบ้าน.....18

2.6 แสดงภาพระดับ pH ในลูกน้ำยุงลายบ้าน.....19

2.7 แสดงภาพตัวโม่งของยุงลายบ้าน.....20

2.8 แสดงภาพตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน.....21

2.9 แสดงภาพ parasporal body ของ Bti.....32

3.1 แผนผังแสดงการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti*.....44

4.1 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตรา การตายของลูกน้ำยุงลายทดลองในอาคาร.....64

4.2 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตรา การตายของลูกน้ำยุงลายทดลองนอกอาคาร.....65

4.3 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตรา การตายของลูกน้ำยุงลายทดลองในห้องปฏิบัติการ……..…. 66

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

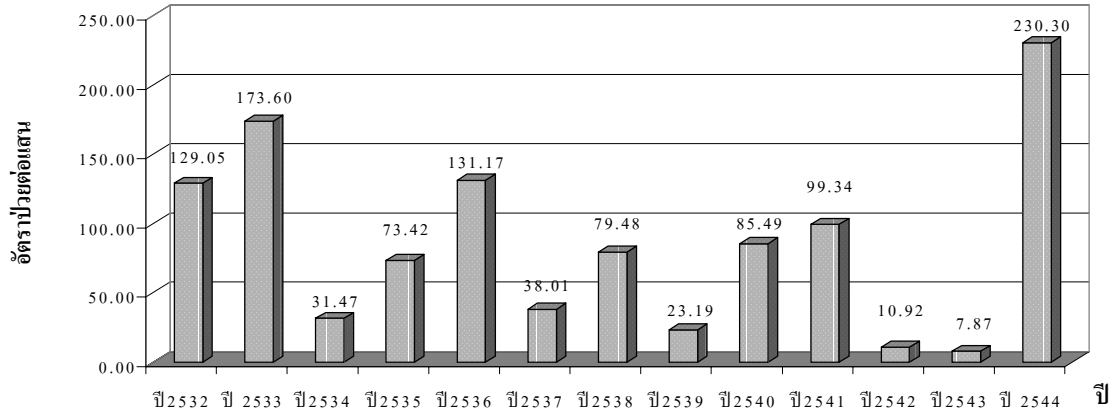
ยุง (mosquito) เป็นสัตว์ขาปล้องซึ่งมีมากมายหลายชนิด โทษของยุงนอกจากดูดกินเลือดแล้วยังทำความรบกวนแก่ คน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ และนก ยุงในเมืองชอบดูดกินเลือดของสัตว์เลือดอุ่นแต่มีรายงานเกี่ยวกับยุงดูดกินเลือดปลา สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำด้วย (สัมฤทธิ์ สิงห์อาสา, 2532) ยุงส่วนมากหากินในเวลากลางคืนแต่ก็มีบางชนิดที่หากินในเวลากลางวัน ยุงแพร่พันธุ์ในน้ำแทบทุกชนิดทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย น้ำสกปรกและน้ำสะอาด น้ำขังในกระป๋อง ยางรถยนต์ รอยเท้าสัตว์ รูต้นไม้ ใบไม้ ขอบลำธาร แม่น้ำ ทะเลสาบ และบึง ยุงบางชนิดอาศัยภายนอกบ้าน บางชนิดอาศัยและแพร่พันธุ์ภายในบ้าน การรบกวนของยุงทำให้ผลผลิตทางอุตสาหกรรมลดลง นอกจากนี้ยังเป็นตัวนำโรคต่างๆ มาสู่คนและสัตว์โดยโรคที่นำโดยยุงบางโรคอาจจะทำให้คนและสัตว์ตายได้

การกระจายพันธุ์ของยุงพบได้ทั่วโลก ยกเว้นในบริเวณที่มีอากาศเย็นจัดจนเป็นน้ำแข็งหรือหิมะปกคลุมเท่านั้นที่จะไม่พบยุง และที่สำคัญแหล่งใหญ่ของยุงอยู่ในเขตร้อนทำให้ในประเทศไทยมียุงที่สำคัญทั้ง 4 สกุล (Genus) ที่มีความสำคัญในทางการแพทย์ โดยเป็นพาหะนำโรคมาสู่คน เช่น ยุงลาย *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* นำโรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever) โรคไข้ปวดข้อออกผื่นที่มีสาเหตุจาก chikungunya virus ยุงท้องนาหรือยุงรำคาญ *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* นำโรคไข้สมองอักเสบ (Japanese-encephalitis) ยุงเสือ *Mansonia uniformis* เป็นพาหะสำคัญนำโรคเท้าช้าง (filariasis) ที่เกิดจากเชื้อ *Brugia malayi* ยุงก้นปล่องหลายชนิด เช่น *Anopheles minimus*, *Anopheles maculatus* และ *Anopheles dirus* นำโรคมาลาเรีย (Malaria) (วลัยรัตน์ ตัณฑประศาสตร์, 2539; Potter and Knapp, www, 1994) โรคที่กล่าวมามีความสำคัญเป็น 1 ใน 10 อันดับแรกของโลกที่ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขและโดยเฉพาะโรคไข้เลือดออกที่มียุงลายเป็นพาหะหลัก

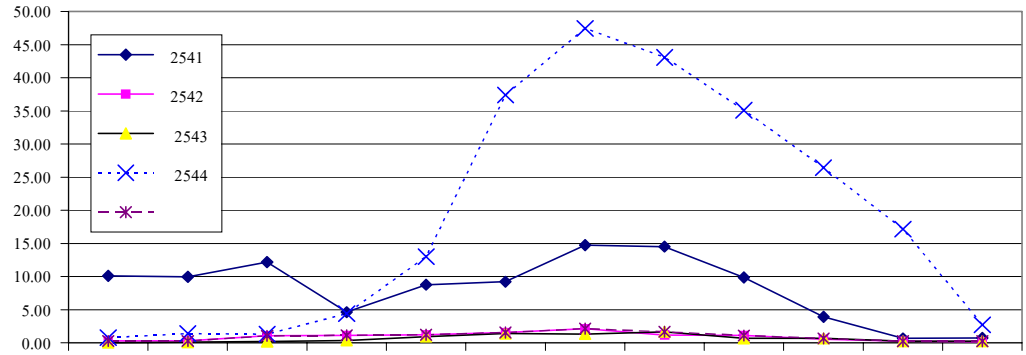
ในประเทศไทยมียุงเป็นพาหะนำโรคอยู่มากเนื่องจากสภาพแวดล้อมเหมาะกับการเจริญเติบโตของยุงทำให้มีผู้ป่วยและเสียชีวิตมาก กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุขจึงได้จัดทำโครงการควบคุมยุงในประเทศไทยมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2493 จนถึงปัจจุบัน ซึ่งสถิติในปี พ.ศ.2536

พบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกทั้งสิ้น 67,010 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 114.88 ต่อแสนประชากร เพิ่มจากปี พ.ศ.2535 ที่มีอัตราป่วยไม่เกิน 85 ต่อแสนประชากร ส่วนอุบัติการณ์ของโรคในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาในปี พ.ศ.2539 พ.ศ.2540 พ.ศ.2541 และ พ.ศ.2542 มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรเป็น 43.71, 56.00, 102.62 และ 97.50 ตามลำดับ ส่วนอัตราตายจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 0.54, 0.44, 0.74 และ 1.25 ตามลำดับ ซึ่งในช่วงเวลาระหว่าง 1 มกราคม 2542 ถึง 15 พฤศจิกายน 2542 พบจำนวนผู้ป่วย 239 คน เสียชีวิต 3 คน (สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา, 2542) และในช่วงเวลาระหว่าง 1 มกราคม 2544 ถึง 25 ธันวาคม 2544 พบจำนวนผู้ป่วย 5,841 คน เสียชีวิต 15 คน คิดเป็นอัตราตายจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดร้อยละ 0.26 และ มีอัตราป่วย 229.97 ต่อแสนประชากร เมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันในปี พ.ศ.2543 พบจำนวนผู้ป่วย 199 รายไม่มีเสียชีวิต จะเห็นได้ว่าในปี พ.ศ.2544 พบผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นถึง 26 เท่า แสดงรายละเอียดดังภาพที่ 1.1, 1.2 และ 1.3 (สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา, 2545)

ภาพที่ 1.1 กราฟแสดงอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกรายปีของจังหวัดนครราชสีมาในช่วงปี พ.ศ.2532-2544

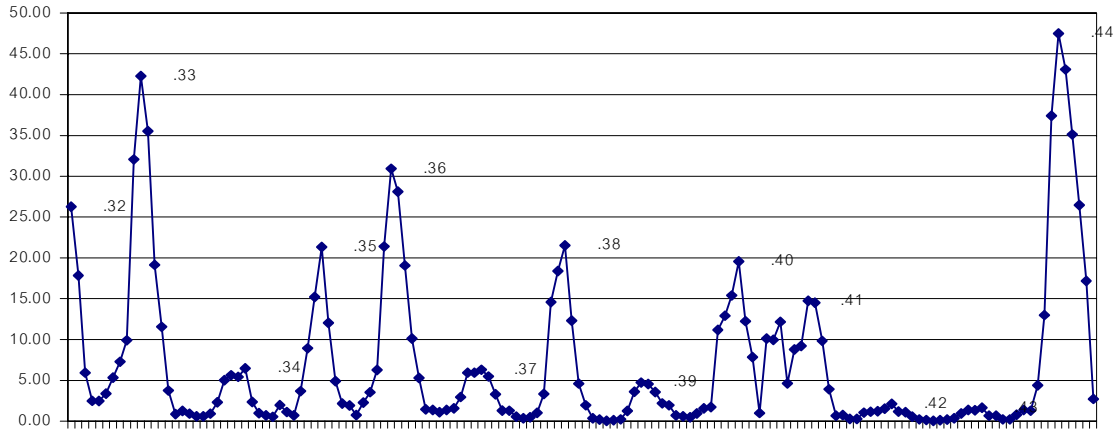


หมายเหตุ จากรายงานระบาดวิทยาโรคไข้เลือดออกประจำปี 2544 (หน้า 18), สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา, 2544, ฝ่ายระบาดวิทยาสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา



ภาพที่ 1.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกของจังหวัดนครราชสีมารายปี ระหว่างปี พ.ศ.2541-2544

หมายเหตุ จากรายงานระบาดวิทยาโรคไข้เลือดออกประจำปี 2544 (หน้า 19), สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา, 2545, ฝ่ายระบาดวิทยาสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา



ภาพที่ 1.3 กราฟแสดงอัตราป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกรายเดือนของจังหวัดนครราชสีมา ระหว่างปี พ.ศ.2532-2544

หมายเหตุ จากรายงานระบาดวิทยาโรคไข้เลือดออกประจำปี 2544 (หน้า 20), สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา, 2545, ฝ่ายระบาดวิทยาสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา

ตารางที่ 1.1 แสดงสถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทยปี พ.ศ.2539-2544

รายละเอียด	พ.ศ.2539	พ.ศ.2540	พ.ศ.2541	พ.ศ.2542	พ.ศ.2543	พ.ศ.2544
1. จำนวนผู้ป่วย (ราย)	37,929	101,689	129,954	24,826	18,617	84,730
2.จำนวนผู้ป่วยตาย (ราย)	116	253	424	56	32	154
3.อัตราป่วยต่อแสนประชากร	63.09	167.21	211.42	40.39	30.19	136.93
4.อัตราตายต่อแสนประชากร	0.19	0.42	0.69	0.09	0.05	0.25
5. อัตราป่วยตายร้อยละ	0.31	0.25	0.33	0.23	0.17	0.18

หมายเหตุ จากรายงานระบาดวิทยาโรคไข้เลือดออกประจำปี 2544 (หน้า 21), สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา, 2545, ฝ่ายระบาดวิทยาสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา

กระทรวงสาธารณสุขมีแผนการควบคุมโรคโดยกำจัดยุงด้วยวิธีต่างๆ แต่ก็ยังไม่สามารถกำจัดให้ลดลงไปได้ ส่วนการใช้วัคซีนป้องกันโรคยังอยู่ในระหว่างการศึกษาวิจัย ดังนั้นหนทางแก้ไขที่ทำได้ในปัจจุบันคือตัดวงจรการแพร่ระบาดของโรคโดยการกำจัดลูกน้ำและแหล่งเพาะพันธุ์เพื่อไม่ให้มีการขยายพันธุ์ของยุง ซึ่งยุงลายนี้ชอบอยู่ในน้ำนิ่งใสและสะอาด อยู่ตามภาชนะต่าง ๆ ที่มีน้ำขัง เช่น ตุ่ม โอ่ง ไห ยางรถยนต์ ถังซีเมนต์ ถังเก็บน้ำพลาสติก ฯลฯ (จิตติ จันทร์แสง, อุรุญากร จันทร์แสง, อุษาวดี ถาวระ และ ประคอง พันธ์อุไร, 2536; เยาวภา ดุลไพรีและ ไพฑูรย์ วงศ์สกุล, 2533; องอาจ เจริญสุข และคณะ, 2533) การควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์โดยประชาชนที่เหมาะสมที่สุด คือ วิธีทางกายภาพ เช่น คว่ำกะลามะพร้าว ปิดฝาตุ่ม ไห แต่ก็มีภาชนะบางชนิดที่ลักษณะการใช้งานทำให้ไม่สามารถปิดฝาได้ทุกครั้งหลังการใช้ เช่น ถังซีเมนต์ในห้องน้ำ ดังนั้นหากมีวิธีการใดๆที่สามารถนำมาใช้ได้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ก็นับว่าเป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสม การใช้สารเคมีฆ่าตัวเต็มวัยก็ไม่สามารถลดจำนวนยุงลงได้มากนัก และยุงบางชนิดก็ยังได้พัฒนาต่อต้านยาฆ่าแมลง (พงศ์ศรี ใบอดุลย์, ม.ป.ป.) และยังเป็นอันตรายกับสุขภาพผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้เทเมฟอส (temephos) หรือทรายอะเบท (abate) ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus compound) ควบคุมลูกน้ำยุงลายเพราะมีพิษต่ำต่อสัตว์เลือดอุ่นแต่ไม่เป็นที่นิยมเพราะมีกลิ่นเหม็นทำให้ประชาชนไม่มั่นใจในความปลอดภัย (บุญล้วน พันธุมจินดา, 2517) ดังนั้นการควบคุมยุงโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจโดยเฉพาะการควบคุมลูกน้ำยุงลายโดยใช้แบคทีเรีย(Potter and Knapp, www, 1994)

โดยปกติวงจรชีวิตของยุง มี 4 ระยะ คือ ไข่ (egg) ลูกน้ำ (larva) ตัวโม่ง (pupa) และ ตัวเต็มวัย (adult) ลูกน้ำมี 4 ระยะ โดยจะลอกคราบ (moult, cast, pelt) ทุกครั้งเพื่อขยายขนาดตัวให้ใหญ่ขึ้น แต่ละครั้งเรียกว่า instar โดยใช้เวลาประมาณ 7–14 วันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำและอาหาร ซึ่งลูกน้ำจะกินสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ในน้ำ (Floore, www, 1994) ระยะหนึ่งๆ ประมาณ 1-2 วัน ในระยะที่ 4 จะนานกว่าระยะอื่นๆ โดยในช่วงที่เป็นลูกน้ำยุงจะอ่อนแอจึงถูกควบคุมได้ง่าย (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2526)

การนำแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus thuringiensis* หรือ Bt มาใช้ควบคุมแมลงมีมากว่า 40 ปีแล้ว (Chanan Angsuthanasombat, 1996) โดยสามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นจึงเป็นที่นิยมเนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่าย ผลิตได้มากในเวลาอันสั้นและไม่พบการสร้างความต้านทานในยุงต่อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จะสร้างผลึกโปรตีนที่มีฤทธิ์ทำลายลูกน้ำยุงอย่างจำเพาะเจาะจง ไม่เป็นพิษกับสัตว์นอกกลุ่มเป้าหมาย (non target) รวมทั้งมนุษย์ สารพิษที่ผลิตขึ้นไม่คงทนในธรรมชาติจึงไม่มีสารพิษตกค้าง ไม่เกิดผลเสียกับสิ่งแวดล้อม (กัญจนา ธีระกุล และจริยา จันทร์ไพแสง, 2542) แบคทีเรียนี้ใช้ควบคุมลูกน้ำยุงเท่านั้นไม่เป็นพิษกับไข่หรือตัวโม่ง (Alameda County Mosquito Abatement District, www, 1998)

ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย พบว่า *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* หรือ Bti หรือ *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 และผลิตภัณฑ์ Bti ที่มีชื่อทางการค้าต่างๆ เช่น Teknar®, Bactimos® Vectobac® มีความเหมาะสมในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีที่สุด รองลงมาคือยุงรำคาญและยุงก้นปล่องตามลำดับ (Frankenhuyzen and Nystrom, www, 1998; Wongsiri Siriwat, 1976) Bti จะสร้างผลึกโปรตีน เรียก parasporal crystal ซึ่งผลึกนี้คือสารเดลต้าเอนโดทอกซิน (delta endotoxin) ยุงกินเข้าไปจะไปอยู่ในรูปของ protoxin ซึ่งยังไม่เป็นพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในกระเพาะของยุงลาย (caeca) ซึ่งมีน้ำย่อยที่เป็นด่าง (อาคม สังข์วรานนท์, 2538; Clements, 1963) ทำให้เกิดขบวนการย่อยโปรทอกซิน (protoxin) ออกมาเป็นสารพิษที่แท้จริง (active toxin) สารพิษจะเข้าไปอยู่ที่ผนังเซลล์ของกระเพาะทำให้ปากและกระเพาะอาหารเป็นอัมพาตและทำลายเยื่อบุกระเพาะอาหารจนเป็นแผล น้ำย่อยที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะเข้าไปตามรอยแผลเข้าไปในลำตัวจะทำให้ลูกน้ำตายภายใน 2-3 ชั่วโมง ผลึกโปรตีนนี้จะมีฤทธิ์ประมาณ 3 สัปดาห์ (WHO, 1979a) ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของผลึกโปรตีนและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสงแดด ความหนาแน่นของลูกน้ำ (กรมวิชาการเกษตร, 2539; Foo and Yap, 1982; Becker, Zgomba, Ludwig, Petric and Rettich, 1992)

วลัยรัตน์ ตัณฑประศาสน์ (2539) ศึกษาประสิทธิภาพ ประสิทธิผลและความคงทนของสารสกัดจากใบและเมล็ดมันแกวในการควบคุมลูกน้ำยุงลายโดยใช้น้ำกลั่นและเอธานอล 95% เป็นตัวทำละลายและใช้ช่วงระยะเวลาในการหมักนาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และศึกษาความคงทนของ

สารสกัดที่ยังคงมีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงได้ในสภาวะการทดลองเลียนแบบการใช้น้ำของประชาชน พบว่าสารสกัดจากใบมันแกวซึ่งใช้เอธานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีกว่าใช้น้ำกลั่น โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1353.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่สารสกัดจากเมล็ดมันแกวที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้ผลดีกว่าเอธานอล โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีค่า LC_{50} เท่ากับ 169.31 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 411.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง นั่นคือในระยะเวลาการหมักเมล็ดมันแกว 24 ชั่วโมงโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายจะให้ผลดีกว่าใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย เหมาะแก่การนำไปใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลายในธรรมชาติ แต่ทั้งนี้ควรศึกษาถึงความปลอดภัยก่อนการนำไปใช้ในตุ่มน้ำบริโภค

รุ่งทิวา ประสานทอง (2532) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของผงซักฟอกในการป้องกันยุงลายวางไข่และกำจัดลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* ที่ความเข้มข้นของผงซักฟอก 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 และ 0.08% พบว่า ความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารละลายผงซักฟอกที่มีชื่อการค้าว่า Fab® ที่ป้องกันยุงลายวางไข่ได้ คือ 0.07% และที่ความเข้มข้น 0.07% นี้สารละลายผงซักฟอก Fab® ป้องกันยุงลายวางไข่ได้นาน 22 วัน สารละลายผงซักฟอก Breeze® และ Pao® ความเข้มข้น 0.07% ป้องกันยุงลายวางไข่ได้ แต่สารละลาย 0.07% ของผงซักฟอก Paic® ป้องกันยุงลายวางไข่ไม่ได้ การหาค่าความเป็นพิษของผงซักฟอก Fab®, Breeze®, Pao® และ Paic® ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 3 พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงมีค่า LC_{50} ของผงซักฟอก Fab®, Breeze®, Pao® และ Paic® เท่ากับ 0.0127%, 0.0169%, 0.0178% และ 0.0193% ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบทางสถิติ ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง ของ Fab® แตกต่างจากของ Paic® อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจาก Breeze® และ Pao® และค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง ของ Breeze®, Pao® และ Paic® ไม่แตกต่างกัน สรุปว่า ผงซักฟอก Fab®, Breeze®, Pao® และ Paic® ที่ความเข้มข้น 0.08% สามารถป้องกันและกำจัดลูกน้ำยุงลายได้

องอาจ เจริญสุข (2538) ทำการสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายในประเทศไทย พบว่าร้อยละ 64.52 เป็นภาชนะเก็บน้ำที่อยู่ภายในบ้าน และร้อยละ 35.48 เป็นภาชนะเก็บน้ำที่อยู่นอกบ้าน แหล่งเพาะพันธุ์มีหลายประเภทที่พบส่วนใหญ่คือ โอ่งน้ำดื่มน้ำใช้ อ่างล้างเท้า จานรองกระถางต้นไม้ ภาชนะใส่น้ำเลี้ยงสัตว์ จานรองขาตู้ที่ทำจากแก้ว พลาสติก และดินเผา ซึ่งยุงลายชอบวางไข่ในภาชนะแต่ละชนิดต่างกัน ภาชนะจะมีความแตกต่างกันในด้านการดูดซึมน้ำ ความละเอียดของผิว และทำจากวัสดุที่แตกต่างกัน จึงคาดว่าคุณสมบัติที่แตกต่างกันของผิวเนื้อวัสดุและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันอาจจะมีผลต่อปริมาณและความเข้มข้นของผลึกโปรตีนที่แสดงความเป็นพิษของ Bti ที่อยู่ในภาชนะต่างๆในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย จะเห็นว่าแหล่งเพาะพันธุ์ยุงมีความใกล้ชิดกับมนุษย์จึงมีโอกาสเสี่ยงมากที่จะได้รับการแพร่เชื้อโดยยุงที่เป็นพาหะนำโรค ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับ “ความเป็นพิษของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*)

ในภาชนะเก็บน้ำต่างชนิดภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน" เพื่อเป็นแนวทางในการนำกระบวนการควบคุมลูกน้ำยุงลายโดยนำ Bti ไปใช้ในภาคสนามคือในแหล่งชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประหยัดค่าใช้จ่าย ควบคุมจำนวนลูกน้ำยุงลายที่เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกให้ลดลงจนทำให้อุบัติการณ์ของโรคลดลงและจะได้ลดปัญหาสาธารณสุขได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมด (LC_{50}) ภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการ ในอาคาร และนอกอาคาร(กลางแจ้ง) ในสภาพจำลองปล่อยให้น้ำระเหยไปตามธรรมชาติ

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า LC_{50} ที่ได้ในภาชนะต่างชนิดกันกับปัจจัยทางกายภาพ คือ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) และความเป็นกรด-เบส (pH)

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

1. ภาชนะแต่ละชนิดได้แก่ แก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม มีผลต่อความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมด (LC_{50}) ภายใน 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง ต่างกัน

2. ความเข้มข้นที่ต่างกันของ Bti มีผลในการทำลายลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมด (LC_{50}) ภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง ต่างกัน

3. สิ่งแวดล้อมบางประการ เช่น อุณหภูมิ DO และ pH ที่ต่างกันมีผลต่อความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเองในห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. ลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองเป็นลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 และ 4 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีอัตราตายในขณะเลี้ยงไม่เกิน 10% อายุรุ่นเดียวกัน สายพันธุ์เดียวกันและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน

3. ภาชนะชนิดต่าง ๆ มีความจุใกล้เคียงกันทุกใบ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาครั้งนี้ทำการเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ให้ได้ไข่จำนวนมากเพียงพอ และนำไข่ยุงลายมาฟักให้เจริญเป็นลูกน้ำยุง ระยะที่ 2 และ 4 ในห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. การศึกษาครั้งนี้ทำการเลี้ยง Bti ในห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมดภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง (LC_{50})

4. การศึกษานี้จะศึกษาความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ในสิ่งแวดล้อม 3 อย่างคือ ในอาคาร ในห้องปฏิบัติการ และกลางแจ้งนอกอาคารในสภาพจำลองปล่อยให้น้ำระเหยไปตามธรรมชาติ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Bti ที่ใช้กำจัดลูกน้ำยุงลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม

2. ทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมของการใส่ Bti ที่ใช้กำจัดลูกน้ำยุงลายในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม

3. ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างค่า LC_{50} ที่ได้ในภาชนะต่างชนิดกันกับความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพที่ศึกษา

4. เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมป้องกันและกำจัดลูกน้ำยุงลายซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ในด้านเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกให้มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการให้ความรู้กับประชาชนในวิธีกำจัดลูกน้ำยุงแบบชีววิธีที่ไม่มีพิษกับมนุษย์ สัตว์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย และสิ่งแวดล้อม

1.7 คำอธิบายศัพท์

1. ความเป็นพิษของ Bti หมายถึง ค่าความเข้มข้นของ Bti ในน้ำที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายในช่วงระหว่างร้อยละ 1-99 ภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง (Wright, 1971)

2. Lethal concentration 50% end point (LC_{50}) หมายถึง ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมดภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง

3. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* หมายถึงแบคทีเรียกลุ่ม aerobic grampositive bacilli รูปแท่งยาว (rod) ที่สร้างสปอร์ (endospore–forming)ได้ (นิภา ชินะพงศ์ไพศาล, 2524) และสร้างผลึกโปรตีน (protein crystal) ที่มีคุณสมบัติฆ่าลูกน้ำยุงลาย เมื่อลูกน้ำยุงกินผลึกโปรตีนเข้าไปอยู่ในกระเพาะซึ่งมีน้ำย่อยที่เป็นด่าง (อาคม สังข์วรานนท์, 2538; Clements, 1963) ทำให้เกิดสารพิษที่แท้จริง (active toxin) สารพิษจะทำลายเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารทำให้เซลล์บวมแตกจนเป็นแผล คุณสมบัติการซึมผ่านของผนังของกระเพาะอาหารต่อประจุโซเดียมเพิ่มขึ้น ระดับความเข้มข้นของประจุโพแทสเซียมในเลือดสูงขึ้น เมื่อกระเพาะอาหารทะลุระบบโลหิตและระบบทางเดินอาหารจะเชื่อมต่อถึงกันทำให้เกิดภาวะโลหิตเป็นด่างมีผลให้ลูกน้ำเป็นอัมพาตและตายในที่สุด เชื้อนี้ไม่สามารถคงอยู่ในธรรมชาติได้นานเพราะไม่สามารถขยายพันธุ์หมุนเวียนได้ในธรรมชาติ

4. ลูกน้ำยุงลาย หมายถึง ลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* ที่ได้จากการนำไข่ยุงลายจากสำนักงานควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงเขต 1 สระบุรี มาฟักเลี้ยงในน้ำให้เจริญเป็นลูกน้ำยุงระยะที่ 2 และ 4 ตอนต้น

5. ลูกน้ำยุงลายที่ตายจากการทดลอง หมายถึง ลูกน้ำยุงลายที่ว่ายผิดปกติ ไม่สามารถขึ้นมาหายใจที่ผิวน้ำได้ หรือลูกน้ำที่ตายไม่เคลื่อนไหว

6. ภาชนะพลาสติก หมายถึง ภาชนะบรรจุน้ำที่ทำขึ้นจากพลาสติกชนิดโพลีเอธิลีน (polyethylene) ความจุปริมาตร 250 มิลลิลิตร (พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์, 2536; สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, ม.ป.ป.)

7. ภาชนะดินเผา หมายถึง ภาชนะดินเผาไม่เคลือบ ทำขึ้นจากดินเหนียวดำผสมกับดินเชื้อมาปั้นขึ้นรูป แล้วนำมาเผา ความจุปริมาตร 250 มิลลิลิตร (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537)

8. ภาชนะแก้ว หมายถึง ภาชนะแก้วใส เนื้อเรียบ ขนาดบรรจุปริมาตร 250 มิลลิลิตร

9. ภาชนะซีเมนต์ หมายถึง ภาชนะบรรจุน้ำที่ทำจากปูนซีเมนต์ผสมน้ำและทราย ในอัตราส่วน 1:2:1 นำมาหล่อให้ได้ความจุปริมาตร 250 มิลลิลิตร (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรม, 2535)

10. ภาชนะอลูมิเนียม หมายถึง ภาชนะบรรจุน้ำที่ทำจากอลูมิเนียมหนา 0.2 มิลลิเมตร ความจุปริมาตร 250 มิลลิลิตร

11. การหยุดทดลอง หมายถึง หยุดทำการทดลองเมื่อพบว่าอัตราตายของลูกน้ำยุงในภาชนะต่ำกว่าร้อยละ 20

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยุง

ยุงเป็นแมลงจำพวกหนึ่งจัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Insecta (Hexapoda)
Order	Diptera
Suborder	Nematocera
Family	Culicidae

ใน Family Culicidae ยังจำแนกออกเป็น Subfamilies ต่างๆ ได้ดังนี้

1. Subfamily Toxorhynchitinae
2. Subfamily Culicinae
3. Subfamily Anophelinae

ลักษณะสำคัญทั่วไปคือ

1. ร่างกายอ่อนนุ่ม เปราะบาง แบ่งเป็น 3 ส่วน แยกออกจากกันเห็นได้ชัดเจน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง

2. ขา 3 คู่ ปีก 2 คู่ อยู่บริเวณส่วนอก ปีกคู่แรกบางใส ปีกคู่หลังหดเล็กลง เป็นตุ่มเล็กเรียกว่า halter ทำหน้าที่เกี่ยวกับการทรงตัว (organ of balancer)

3. การเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์(complete metamorphosis) มีระยะไข่ ระยะตัวอ่อน (ลูกน้ำ) ระยะดักแด้ (ตัวโม่ง) และระยะตัวเต็มวัย

4. ลักษณะของปาก เป็นแบบแทงดูด (picering and sucking)

5. ตัวผู้มีหนวดแบบ plumose ตัวเมียมีหนวดแบบเส้นด้าย (pilose) หนวดของยุงมีความสำคัญในการแยกเพศ (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2526)

Subfamily Culicinae

ยุงใน Subfamily Culicinae เรียกรวมๆ ว่า culicines เป็นตัวนำโรคสู่คนที่สำคัญและเป็นพาหะที่สำคัญของ arboviruses เช่น ยุงลาย (*A. aegypti*) นำโรคไข้เหลืองและโรคไข้เลือดออก ยุงบางชนิดเป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (filariasis) เช่น *Culex quinquefasciatus* นำเชื้อ *Wuchereria bancrofti* และ *Mansonia uniformis* นำเชื้อ *Brugia malayi* (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2526)

2.1.1 ลักษณะเฉพาะที่สำคัญของ Subfamily Culicinae

ตัวเต็มวัยของแมลงในวงศ์ Culicinae นี้มี Sentellum เป็นรูป 3 ท่อน (trilobe) ซึ่งแต่ละ lobe จะมีขนแข็ง (bristle) ออกมาแต่จะมีบริเวณที่ไม่มีขนในระหว่าง lobe ด้วย ส่วนท้องจะถูกปกคลุมด้วยเกล็ดซึ่งมีลักษณะกว้างอย่างสมบูรณ์ เรียงตัวในแนวราบ ตัวอ่อนมีท่ออากาศ หรือ siphon ตรงหางชัดเจน ตามปกติด้านข้างของโคนท่อหายใจจะมี หนามแข็ง (pecten) ที่เจริญดี และตรงท่อหายใจจะมีแผงของขน (hair truft) 1 อัน หรือมากกว่า ในหลายกรณีพบว่า ไข่จะถูกวางในลักษณะเป็นแผงหรือแพ (raft like mass) บนผิวของน้ำหรือวางเดี่ยวเหนือระดับน้ำ ไข่พวกนี้จะไม่มีทุ่นลอย (float) (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2526)

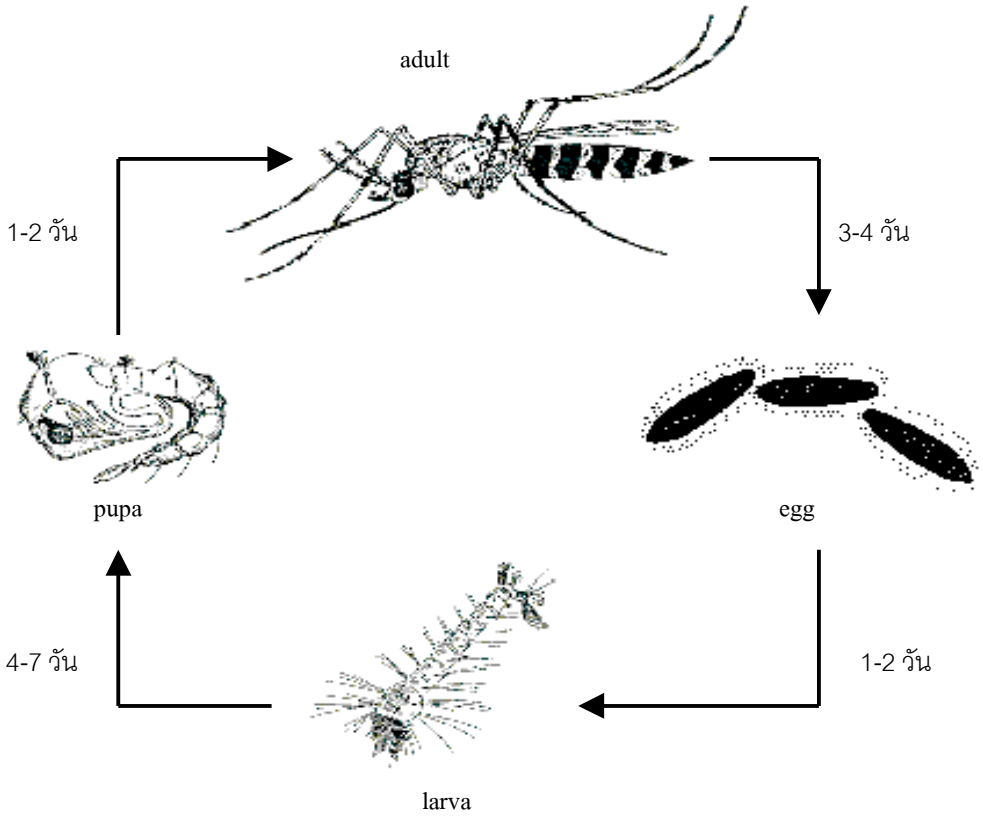
วงศ์ย่อยนี้ประกอบด้วยยุงประมาณ 1,700 ชนิด และมากกว่า 20 สกุล พบว่าประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของยุงที่แยกชนิดแล้วเป็นพวกยุงรำคาญ (*Culex*) และยุงลาย (*Aedes*)

ยุงใน Subfamily นี้ จัดเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. *Culex* group
2. *Aedes* group
3. *Mansonia* group
4. *Subethine* group
5. *Urotaenia* group

2.1.2 นิเวศวิทยาของยุง

วงจรชีวิตของยุงจะมีการเจริญเติบโตผ่านช่วงต่างๆ 4 ระยะ โดยลอกคราบแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) คือ 1. ไข่ (eggs) 2. ระยะตัวอ่อนหรือลูกน้ำ (larvae, wriggles) 3. ระยะดักแด้หรือตัวโม่ง (pupae, tumblers) 4. ระยะตัวเต็มวัย (adults, imago) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงภาพวงจรชีวิตของยุงลายบ้าน *A. aegypti*

หมายเหตุ จาก Mosquito information, Floore, 1994, http://www.mosquito.org/ mosquito.html

2.1.3 Genus *Aedes*

ยุง genus นี้มี postspiracular bristle pulvilli หายไปหรือมีลักษณะคล้ายขนส่วนท้องของตัวเมีย ปลายแหลมและ cercus ยาวกว่าในพวกอื่นๆ ตัวอ่อนมี siphon ซึ่งมี perteroventral hair tuft 1 คู่ และมี pecten เห็นได้ชัด ยุง genus นี้จะวางไข่ใบเดี่ยวๆ บนผิวน้ำ บนดินชื้นๆ เหนือระดับน้ำข้างๆ ภาชนะที่เก็บน้ำเหนือระดับน้ำ สามารถอยู่ในที่แห้งๆ ได้ ตัวเต็มวัยเพศเมียกินเลือดคน ส่วนมากออกหากินเลือดในช่วงกลางวันจนกระทั่งค่ำ ยุง genus นี้มีหลาย subgenus เท่าที่พบมากในประเทศไทยอยู่ใน subgenus *Stegomyia* ลักษณะเป็นยุงขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง ตัวสีดำ มีลวดลายสีขาวหรือสีตะกั่วอยู่บนหลัง และมีแถบขาวสลับดำอยู่ที่ขา

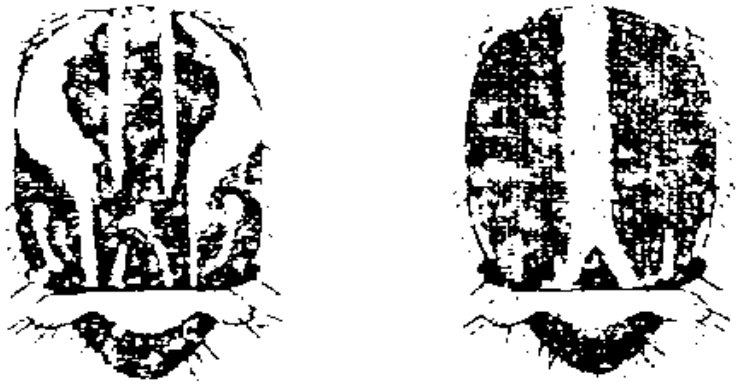
ยุงใน subgenus นี้ ประเทศไทยมีหลายชนิด ที่เคยสำรวจและรายงานไว้มี 13 species แต่ที่สำคัญต่อวงการแพทย์เพราะเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย มี 2 ชนิด คือ

1. *A. aegypti* (ยุงลายบ้านซึ่งเป็นพาหะหลัก)
2. *A. albopictus* (ยุงลายสวนซึ่งเป็นพาหะรอง) สามารถนำโรคได้แต่มีความสำคัญน้อย

กว่าชนิดแรกและมีจำนวนไม่มากนักจะพบได้ในพื้นที่ที่มีต้นไม้มาก เช่น ในสวนผลไม้ สวนยางพาราและป่าไม้ เป็นต้น ในประเทศไทยมียุง *A. albopictus* เป็นพาหะนำโรค Japanese encephalitis (JE) ด้วย ยุงทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนี้ (สัมฤทธิ์ สิงห์อาสา, 2533)

A. aegypti ส่วนหัวของตัวเต็มวัยตรงปากจะปกคลุมด้วยเกล็ดสีขาว ส่วนอกบริเวณกึ่งกลางของหลังจะมีขนแข็งด้านหลังมีเกล็ดสีขาวคล้ายพิณ หรือเคียวเกี่ยวข้าว (lyre shape) สำหรับตัวอ่อนบริเวณปล้องที่ 8 จะมี comb scale อยู่หนึ่งแถวจะมีประมาณ 8-12 อัน ส่วนปลายของ comb scale บริเวณขอบจะแยกเป็นแฉก บริเวณอกจะมีหนามแหลมอยู่ใต้ pleural hair

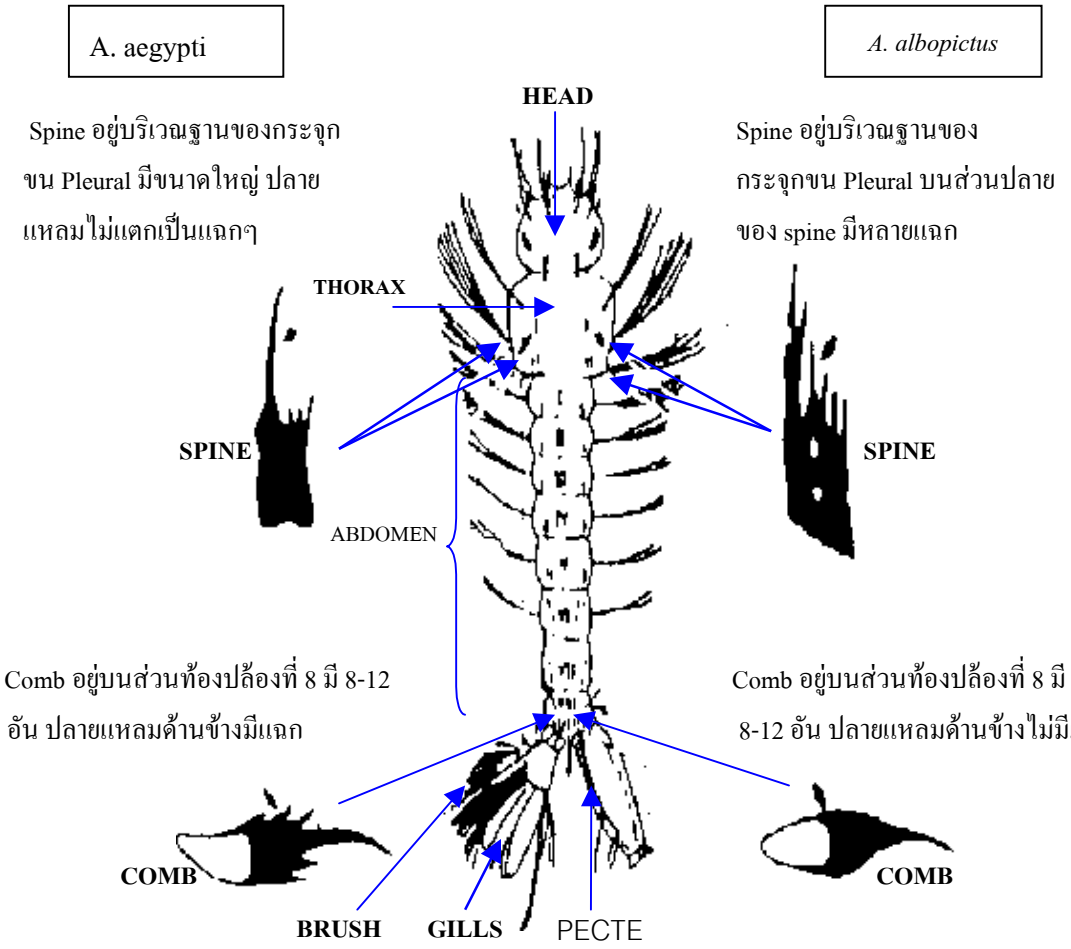
A. albopictus ส่วนหัวของตัวเต็มวัยจะมีเกล็ดสีดำตรงกลางหลังมีแถบสีขาวพาดอยู่ครึ่งหลัง บริเวณ mesepimeral จะมีเกล็ดสีขาวเรียงต่อกันเป็นรูปตัววี (V) สำหรับตัวอ่อนบริเวณปล้องที่ 8 จะมี comb scale อยู่หนึ่งแถวจะมีประมาณ 8-12 อัน ส่วนปลายของ comb scale บริเวณขอบไม่แยกเป็นแฉก บริเวณอกบริเวณใต้ pleural hair จะไม่มีหนามแหลม แสดงลักษณะของยุงลายบ้านและยุงลายสวนดังภาพที่ 2.2 และ 2.3 (สัมฤทธิ์ สิงห์อาสา, 2533)



a) b)

ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของยุงลายบ้าน *A. aegypti*
ด้านบนของทรวงอกของตัวแก่ยุงลาย แสดงลวดลายของเกล็ดสีดำและขาว
บน scutum และ scutellum : a) *A. aegypti* b) *A. albopictus*

หมายเหตุ จาก การศึกษาประสิทธิภาพ ประสิทธิผลและความคงทนของสารสกัดจากใบและเมล็ดมันแกวในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย (หน้า 12), วลัยรัตน์ ตัณฑประศาสน์, 2539, มหาวิทยาลัยมหิดล



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะเฉพาะของลูกน้ำยุงลายบ้าน *A. aegypti* และลูกน้ำยุงลายสวน *A. albopictus*

หมายเหตุ จาก การศึกษาประสิทธิภาพ ประสิทธิผลและความคงทนของสารสกัดจากใบและเมล็ดมันแกวในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย (หน้า 13), วลัยรัตน์ ตัณฑประศาสน์, 2539, มหาวิทยาลัยมหิดล

2.1.4 ลักษณะและชีววิทยาของยุงลาย

วงจรชีวิตของยุงลาย

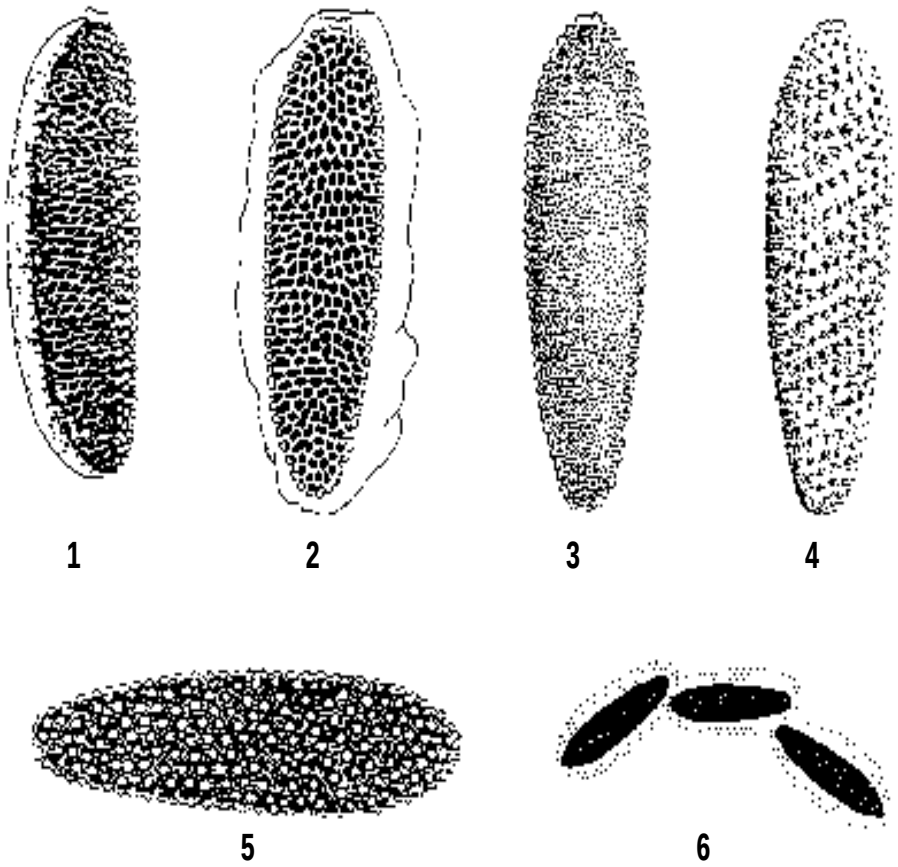
เมื่อตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์กันแล้วตัวเมียจะเก็บเชื้อไว้ในถุงเรียกว่า spermatheca เป็นถุงสีน้ำตาลมีอยู่ 3 ถุง ในปล้องที่ 7-8 ยุงลายเมื่อผสมพันธุ์ครั้งหนึ่งก็มีเชื้อเพียงพอที่จะผสมกับไข่ได้ตลอดชีวิต แล้วจะออกหาเลือดเป็นอาหารเพื่อไปสร้างไข่ให้เติบโต เมื่อครบกำหนดจะวางไข่ ไข่ฟักเป็นลูกน้ำ ลูกน้ำเจริญเติบโตโดยลอกคราบ 4 ครั้ง กลายเป็นตัวโม่ง ตัวโม่งลอกคราบเป็นยุงแล้วขึ้นจากน้ำ ระยะเวลาจากไข่จนเป็นตัวยุงกินเวลาประมาณ 7-14 วัน (ชวลิต ทัศนสว่าง, 2532)

ไข่ยุงลาย (ภาพที่ 2.4)

รูปร่าง ไข่ของยุงลายรูปร่างยาวรี หัวท้ายเรียวคล้ายบุหรี่ซิการ์

ขนาด มีขนาดกว้างประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ยาว 0.7 มิลลิเมตร

ตำแหน่งการวางไข่ ยุงลายไข่ทีละฟองวางติดกันเป็นกลุ่มตามผิวภาชนะหรือวัสดุที่ชื้นๆ เหนือระดับน้ำ 1-2 เซนติเมตร (ชวลิต ทัศนสว่าง, 2532) ไข่ยุงที่พบมักติดกับภาชนะ เข้าใจว่าคงมีสารยึดติดไว้ การเอาไข่ยุงออกจึงทำได้โดยใช้แปรงขัดภาชนะใส่น้ำด้านในที่ยุงไปไข่ไว้จึงจะกำจัดไข่ยุงออกได้ (สัมฤทธิ์ สิงห์อาสา, 2533)



ภาพที่ 2.4 แสดงไข่ของยุงลายบ้าน (*A. aegypti*)

1. ภาพด้านข้างของไข่ แสดงลักษณะผิวด้านบนและด้านล่าง
2. แสดงสภาวะที่ความชื้นพอเพียง chorionic pad จะพองออกจนโปร่งใสล้อมรอบไข่
3. ผิวด้านล่างของไข่ในสภาวะที่แห้ง
4. ผิวด้านบนของไข่ในสภาวะที่แห้ง
5. ผิวด้านบนของไข่ในสภาวะที่ไม่แห้งมากนัก
6. ลักษณะของไข่ที่ลอยบนผิวน้ำ จุดประคือ chorionic pad

หมายเหตุ จาก Mosquito information, Floore, 1994, http://www.mosquito.org/ mosquito.html

การเจริญไปเป็นลูกน้ำ เมื่อไข่ออกมาใหม่ๆ จะมีสีขาวนวล สักครู่ไข่จะดูดน้ำไว้ในตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย ต่อมาผิวนอกเปลี่ยนเป็นสีดำในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง และดำสนิทใน 4 ชั่วโมง ไข่ที่ออกมาใหม่นั้นการเจริญจาก ovum ไปเป็นคัพภะหรือตัวอ่อน (embryo) ต้องใช้เวลา 30-40 ชั่วโมงในที่ที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จึงเจริญเต็มที่ (สมศักดิ์ บุตราช และคณะ, 2530; อุษาวดี ถาวระ, 2534) หากไข่แห้งในขณะที่ตัวอ่อนกำลังเจริญเติบโต ตัวอ่อนในไข่จะตาย เมื่อตัวอ่อนภายในไข่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วหากอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมกับการฟักจะมีการพักตัว (quiescence) รอให้น้ำท่วมไข่ต่อไป และสามารถทนสภาพแห้งได้ประมาณ 6 เดือนหรือเป็นปี หากใน 24 ชั่วโมงแรกไข่ถูกทำให้แห้ง จะยุบตัวลง เปลือกไข่จะแตก ปรากฏการณ์ที่ไข่ทนต่อความแห้งแล้งได้หลังจากที่ได้รับน้ำเพียงพอในช่วงแรกเรียก conditioning ไข่ที่ผ่านปรากฏการณ์นี้เรียกว่า conditioning egg ไข่จะถูกฟักเป็นลูกน้ำเมื่อถูกแช่น้ำแต่ฟักไม่พร้อมกัน ยุงตัวเมียแต่ละตัวสามารถวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 50-100 ฟอง ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของยุงและปริมาณเลือดที่กิน ในช่วงชีวิตจะวางไข่ได้ 3-5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7-8 วัน บางครั้งก็ไข่ไม่หมด ต้องกินเลือดอีกเพื่อจะทำให้ไข่สุกและไข่ออกหมดในแต่ละครั้ง (สัมฤทธิ์ สิงห์อาสา, 2533)

การฟักตัวเป็นลูกน้ำ ในห้องทดลอง เมื่อเอาไข่แช่น้ำประมาณ 51 นาที ลูกน้ำจะฟักออกมา ถ้าใช้น้ำที่มีออกซิเจนน้อยจะฟักออกเป็นตัวเร็วขึ้น (บุญล้วน พันธุมจินดา, 2515) ขั้นตอนและปัจจัยที่มีผลต่อการฟักตัวเป็นลูกน้ำมีดังนี้

1. ผ่านปรากฏการณ์ conditioning
2. หลังจากนั้นไข่ต้องจมน้ำอย่างสมบูรณ์ บางฟองใช้เวลา 2-3 นาที บางฟองใช้เวลา 24 ชั่วโมง หรือมากกว่า บางฟองอาจอยู่ในสภาพดื้อ (depressed hatching) ต้องแช่น้ำแล้วผึ่งให้แห้งแล้วแช่ใหม่จึงจะฟักออกเป็นตัว ปัจจัยที่มีผลคือระยะเวลาที่ conditioning egg อยู่ในสภาพแห้ง ถ้าภายใน 1 เดือนอัตราการฟักตัวจะเร็วและสูง หากนานขึ้นก็ฟักตัวได้ช้าและน้อยลง และไข่ที่ใช้ระยะเวลา conditioning 24-48 ชั่วโมง จะฟักตัวน้อยกว่าพวกที่ใช้เวลา 48-72 ชั่วโมง
3. สารอินทรีย์บางชนิด เช่น น้ำตาลจะทำให้ไข่ฟักตัวเร็วขึ้น
4. ถ้าลดระดับออกซิเจนในน้ำแช่ไข่ลง ไข่จะฟักตัวเร็วขึ้น
5. เมื่ออุณหภูมิของน้ำเย็นลง ไข่จะฟักตัวง่ายขึ้น
6. สารเคมี เช่น สารฟอกสีจะกระตุ้นการวางไข่แต่ลูกน้ำจะตาย

ลูกน้ำยุงลาย

รูปร่าง แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก ส่วนท้อง บริเวณหัวมีหนวด 1 คู่เป็นแท่งตรงอกส่วนกลางและอกส่วนหลัง 2 ข้างจะมีหนามแหลมข้างละ 1 คู่ ปล้องที่ 8 จะมีขน 1 แถว ประมาณ 7-8 อัน เรียก comb scale บริเวณท่อหายใจ (siphon) มีกระจุกขน 1 คู่ และมี pecten tooth รูปร่างคล้ายมีดโค้ง มีหนามแหลมบริเวณสันท่อหายใจ (ภาพที่ 2.5)

อาหาร อาหารลูกน้ำคือตะไคร่น้ำ สัตว์เซลล์เดียวในน้ำ และจุลินทรีย์ต่างๆ ตลอดจนสารอินทรีย์ในตุ่มน้ำ ส่วนในห้องทดลองใช้อาหารปลา อาหารสุนัขบด หรือยีสต์ เป็นอาหาร ในท่อหายใจของลูกน้ำมีลิ้นปิดเปิดพิเศษจะเปิดเพื่อนำอากาศเข้าขณะโผล่ที่ผิวน้ำและปิดเมื่อดำลงใต้น้ำ

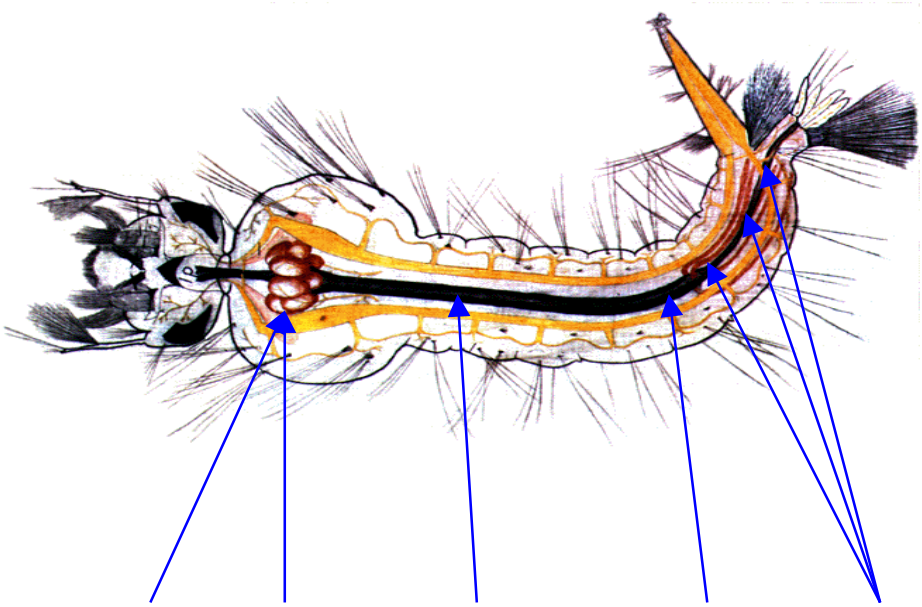
การเคลื่อนไหว จะเคลื่อนไหวรวดเร็วเมื่อมีเงาหรือการเคลื่อนไหวของแสงโดยว่ายลักษณะคล้ายงูเลื้อยหรือตัว S ตัวลูกน้ำตั้งเกือบตรงกับผิวน้ำโดยลอยตัวเอาหัวปักใต้ผิวน้ำ

ลูกน้ำมี 4 ระยะ คือระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีความยาวเต็มที่ 1.97, 3.24, 5.17 และ 7.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ ทั้ง 4 ระยะใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับ ความหนาแน่น อาหาร และอุณหภูมิโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของลูกน้ำอยู่ระหว่าง 16-34 องศาเซลเซียส ระยะหนึ่งๆ ประมาณ 1-2 วัน ในระยะที่ 4 จะนานกว่าระยะอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงมีการลอกคราบ (moult, cast, pelt) ทุกครั้ง ลูกน้ำยุงลายดังแสดงในภาพที่ 2.5

ภาพที่ 2.5 แสดงภาพลูกน้ำยุงลายบ้าน (*A. aegypti*)

หมายเหตุ จาก Mosquito information, Floore, 1994, http://www.mosquito.org/ mosquito.html

คุณสมบัติทางด้านสรีรวิทยา (physiology) การศึกษาคุณสมบัติทางด้านสรีรวิทยาเกี่ยวกับระดับ pH ของส่วนต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารของลูกน้ำยุงลาย พบว่าในกระเพาะอาหาร (caeca) เป็นด่างเล็กน้อย เมื่อถึงช่วงลำไส้ส่วนกลาง (midgut) จะเป็นด่างมาก ส่วนในลำไส้ส่วนปลาย (Hindgut) จะเป็นด่างอ่อนๆ หรือเกือบเป็นกลาง (Clements, 1992) pH ของส่วนต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารของลูกน้ำยุงลาย ดังแสดงในภาพที่ 2.6



Species	Anterior midgut	Gastric midgut	Central midgut	Posterior midgut	Hindgut
	pH	pH	pH	pH	pH
A. aegypti	-	7.6 ⟶8.0	-	-	7.6 ⟶<7.2 (1)
A. aegypti	? ⟶9.7	7.6 ⟶8.0	> 9.9 ⟶9.3	8.1 ⟶6.2	(2)
A. aegypti	7.5 ⟶10	8.0 ⟶8.5	>10.1 ⟶9.5	9.0 ⟶7.0	6.5 ⟶7.5 (3)

(1)Ramsay, (2) Charles and de Barjac, (3) Dadd

ภาพที่ 2.6 ภาพแสดงระดับ pH ในลูกน้ำยุงลายบ้าน (*A. aegypti*)

หมายเหตุ จาก ประสิทธิภาพและความคงอยู่ของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ที่มีผลต่อลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* (Linnaeus) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา (หน้า 11), โดยนิตยาจาร กิตติเดชา, 2540, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ตัวโม่ง

ตัวโม่งออกมาใหม่ๆ มีสีน้ำตาลอ่อน ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำ รูปร่างคล้ายเครื่องหมายจุลภาค (,) ดังแสดงในภาพที่ 2.7 ประกอบด้วยส่วนหัวและอกเชื่อมกัน (cephalothorax) ส่วนท้อง (abdomen) เรียวมีท่อหายใจอยู่ด้านบนบริเวณอกปล้องแรก (prothorax) ไม่มีปากจึงไม่กินอาหาร แต่มีการเปลี่ยนแปลงภายในตัวโม่ง ใช้เวลา 30-40 ชั่วโมง จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย ตามปกติยุงตัวผู้จะออกก่อนตัวเมีย 1 วัน ยุงตัวเมียจะเข้าเป็นตัวโม่งนานกว่ายุงตัวผู้ 8-10 ชั่วโมง

ภาพที่ 2.7 แสดงภาพตัวโม่งของยุงลายบ้าน (*A. aegypti*)

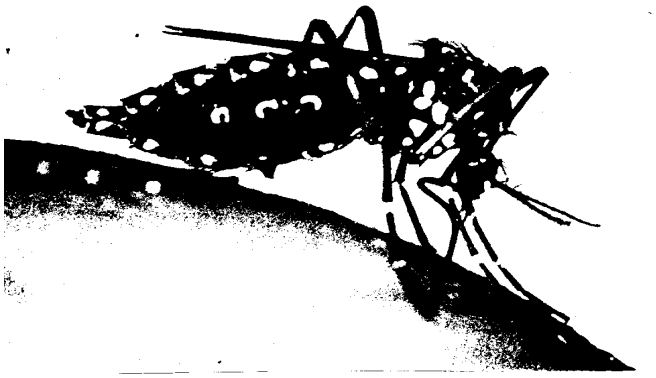
หมายเหตุ จาก Mosquito information, Floore, 1994, http://www.mosquito.org/ mosquito.html

ยุงลายเต็มวัย

ลักษณะ ตัวดำ มีแถบหรือคาดวงสีขาวเหมือนเงินหรือขาวเหลือง อกด้านบนมีเส้นขาวนอก 2 เส้นโค้ง ลายคล้ายพิณ (lyre-shape) เส้นขาวในขนานกัน 2 เส้น ขามีแถบดำขาว ขาหลังปลายปล้องสุดขาวหมด หัวมีเกล็ดกว้างแบนราบ มีแถบสีขาวพาดอยู่ตรงกลางของหัวไปจนถึงตาทั้ง 2 ข้าง เส้นตั้งตรง มีปลายแฉกอยู่บริเวณโคนหัว ดังแสดงในภาพที่ 2.8

การลอกคราบออกเป็นตัวเต็มวัย (emergence) ตัวโม่งจะเอาส่วนหัวออกจากรอยแตกด้านหลังของ cephalothorax ซึ่งใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงเมื่อออกจากคราบแล้วพักตัวชั่วครู่ให้ปีกแห้งและเลือดฉีดเข้าเส้นปีกแล้วจึงบินหลังลอกคราบ 24 ชั่วโมงก็เริ่มจับคู่ผสมพันธุ์ตัวผู้มีอายุได้ 7-10 วันหรืออาจถึง 30 วันถ้าอาหารคาร์โบไฮเดรตเพียงพอและความชื้นสูง ตัวเมียมีอายุได้ 30-90 วันใน

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมยุงลายอาจมี 15-20 รุ่น/ปี ระยะเวลาตั้งแต่ลอกคราบถึงวางไข่ใช้เวลา 2-3 สัปดาห์ (ชวลิต ทัศนสว่าง, 2532)



ภาพที่ 2.8 ภาพแสดงตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*A. aegypti*)

หมายเหตุ จาก Mosquito information, Floore, 1994, http://www.mosquito.org/ mosquito.html

นิสัยของยุงลาย

การออกหากินตามธรรมชาติ ยุงลายไม่ชอบแสงและลมแรง ดังนั้นการหากินจึงไม่ไกลจากแหล่งกำเนิด บินได้ไกลประมาณ 100 หลา จากการสำรวจ พบว่ายุงลายชอบอยู่ใกล้ชิดคน มีนิสัยกัดคนในบ้าน (endophagic) เข้าใจว่า ยุงชอบกลิ่นของคาร์บอนไดออกไซด์และแลคติกแอซิดที่ระเหยจากผิวหนัง (บุญล้วน พันธุมจินดา, 2515) นอกจากนี้จะพบว่ามียุงลายชุกชุมมากในฤดูฝน เพราะมีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะกับการแพร่พันธุ์ ส่วนในฤดูอื่นจะพบว่าความชุกชุมของยุงลายลดลงเล็กน้อย

อาหารของยุงลาย อาหารใช้สร้างพลังงานของยุงทั้ง 2 เพศ ได้จากน้ำหวานของเกสรดอกไม้และน้ำผึ้ง น้ำตาลจะถูกย่อยใน diverticulum อาหารยุงในห้องทดลองใช้น้ำตาลเข้มข้น 5-10% ยุงตัวเมียหลังลอกคราบจะกินเลือดใน 24 ชั่วโมง ก่อนการวางไข่ เนื่องจากโปรตีนในเลือดมีความสำคัญในการสร้างไข่ โดยกระตุ้น oocytes ในรังไข่ เพื่อสร้าง yolk ตัวเมียจะออกหากินเวลากลางวัน 2 ระยะคือ 09.00-11.00 น. และ 13.00-15.00 น. ถ้ากลางคืนแสงสว่างพอก็กินเลือดด้วย ชอบกัดแขนขามากกว่าใบหน้า ชอบกินเลือดคนมากกว่าเลือดสัตว์ จัดเป็นพวก anthropophilic โดยกินเลือดมากกว่าน้ำหนักตัวหนึ่งเท่าครึ่งถึงสองเท่าหรือ 4.2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ปริมาณนี้ยุงต้อง

กำจัดออกโดยจะขับน้ำใสๆ ออกทางก้นภายใน 5-15 นาที ในปริมาณ 1.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (2-3 หยด) แรกๆ เป็นกรดยูริค (uric acid) ต่อมาเป็นปฏิกิริยาบวก นินไฮดริน (ninhydrin positive) นอกนั้นเป็นเม็ดเลือดแดง ปริมาณเลือดที่กินแท้จริงคำนวณโดยใช้รังสีไอโซโทปซีเรียม (cerium isotope) ใส่ปนในอาหารยุงลาย อาหารคาร์โบไฮเดรตถูกย่อยใน diverticulum ส่วนโปรตีนถูกย่อยใน midgut (สุภัทร สุจริต, 2531)

ความสามารถในการบินและแหล่งเกาะพัก ยุงลายบินได้ไม่เกิน 1 กิโลเมตร โดยทั่วไปประมาณ 100 หลาจากแหล่งเพาะพันธุ์ และบินในอัตราเร็ว 0.5-1 เมตร/วินาที

การผสมพันธุ์ จะผสมพันธุ์กันได้ในที่แคบๆ เรียก Stenogamy ตัวผู้จะบินไปหาตัวเมียตามเสียงการบิน

การวางไข่ ระยะเวลาสำหรับการเจริญของรังไข่และพร้อมที่จะวางไข่แตกต่างกันไปตามอุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิ 29-30 องศาเซลเซียส จะวางไข่ภายใน 3-4 วันที่อุณหภูมิ 25–27 องศาเซลเซียส จะวางไข่ภายใน 4-5 วันที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส จะวางไข่ภายใน 4 วันขึ้นไป และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส จะวางไข่ภายใน 26-27 วัน ยุงลายจะวางไข่ทีละฟองแล้วเดินเป็นจังหวะสม่ำเสมอ ครั้งหนึ่งจะวางไข่ประมาณ 50-140 ฟอง (Gillett, 1972) จำนวนไข่ขึ้นกับปริมาณเลือดที่กิน ตามปกติยุงตัวหนึ่งจะออกไข่ได้ 3 ครั้ง ระยะเวลาในการวางไข่แต่ละครั้งขึ้นกับอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ถ้าอุณหภูมิต่ำลงจะใช้เวลาวางไข่นานขึ้น (บุญล้วน พันธุมจินดา, 2515)

ปัจจัยที่มีผลต่อการวางไข่ ปัจจัยหลักที่มีผลคือแหล่งเพาะพันธุ์ โดยยุงลายชอบวางไข่ในผิวภาชนะที่ดูดซึมน้ำได้ดี ขรุขระและชอบน้ำที่มีสารเคมีหรืออินทรีย์วัตถุปนอยู่ เช่น ฟอสเฟต คาร์บอเนต และคลอไรด์ไอออน และทำให้ค่า pH น้ำเท่ากับ 6-12 ชอบน้ำใส สะอาด และอยู่ภายในอาคารบ้านเรือน รวมทั้งชอบสีน้ำที่สะท้อนภาชนะเป็นสีเข้ม แต่ก็มีรายงานว่าพบลูกน้ำยุงลายในท่อระบายน้ำโสโครกเช่นกัน (เลาจนา เชาวนาดิศัย และ เพ็ญสุข เต่าทอง, 2524; เลาจนา ธีรภัทรสกุล, บุญล้วน พันธุมจินดา และ เพ็ญสุข เต่าทอง, 2523; องอาจ เจริญสุข, 2520) ซึ่งมีการศึกษาพบว่าเป็นเพราะน้ำนั้นนิ่ง มีภาชนะเป็นซีเมนต์ น้ำมีสีสะท้อนเข้มออกเหลือง และมีอินทรียวัตถุหรือสารเคมีละลายอยู่มากกว่าน้ำประปา (Gillett, 1972)

แหล่งเพาะพันธุ์ ยุงลายจะวางไข่ตามภาชนะที่มีน้ำขัง เป็นน้ำนิ่ง ใส สะอาด โดยเฉพาะน้ำฝนเป็นน้ำที่ยุงลายชอบวางไข่มากที่สุด ดังนั้น แหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายจึงมักอยู่ตามโอ่งน้ำกิน น้ำใช้ และภาชนะอื่นๆ จากอัตราการพบลูกน้ำแต่ละชนิดลำดับความสำคัญได้ดังนี้ ตุ่มหรือโอ่งน้ำดื่ม น้ำใช้ จานรองขาตู้กับข้าวกันมด และภาชนะอื่นๆ นอกจากนี้ยุงลายยังสามารถวางไข่ได้ตามกาบใบของพืชพวกมะพร้าว กล้วย พลับพลึง ฯลฯ แหล่งเพาะพันธุ์ของยุง *A. aegypti* ส่วนใหญ่พบอยู่ใน

บ้านมากกว่านอกบ้าน จากการสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงชนิดนี้ พบว่าร้อยละ 64.52 เป็นภาชนะเก็บขังน้ำที่อยู่ภายในบ้าน และร้อยละ 35.53 เป็นภาชนะเก็บขังน้ำที่อยู่นอกบ้าน แหล่งเพาะพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่คือ โอ่งน้ำดื่มน้ำใช้ อ่างล้างเท้า จานรองกระถางต้นไม้ ภาชนะใส่น้ำเลี้ยงสัตว์ ส่วนแหล่งเพาะพันธุ์ของยุง *A. albopictus* ส่วนใหญ่พบอยู่นอกบ้านมากกว่าในบ้าน เช่น กะลา กระบอกไม้ไผ่ที่มีน้ำขัง โพรงไม้ กาบใบของพืชที่มีใบเป็นร่อง

จากการศึกษาโดยการสำรวจความชุกชุมของ องอาจ เจริญสุข และคณะ (2533) ปรากฏผลดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงร้อยละที่พบลูกน้ำยุงลายในภาชนะชนิดต่างๆ

ชนิดของภาชนะ	ร้อยละที่พบลูกน้ำ
จานรองขาตู้กับข้าว	62.9
โอ่งน้ำใช้	36.8
โอ่งน้ำดื่ม	36.4
ถังซีเมนต์ห้องน้ำ	35.1
ภาชนะอื่นๆ ภายนอกและภายในบ้าน	35.1
โอ่งซีเมนต์ขนาดใหญ่	6.2
ถังคอนกรีตเก็บน้ำฝน	0.3

หมายเหตุ จาก “ความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายในโอ่งซีเมนต์ขนาดใหญ่และถังคอนกรีตเก็บน้ำฝน,” โดยองอาจ เจริญสุข และคณะ, 2533, วารสารโรคติดต่อ. ปีที่11, เล่มที่ 3, หน้า 261.

จะเห็นว่าแหล่งเพาะพันธุ์มีความใกล้ชิดกับมนุษย์จึงมีโอกาสเสี่ยงมากที่จะได้รับการแพร่เชื้อโดยยุงที่เป็นพาหะนำโรค

วิธีเลี้ยงยุงลาย

การเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ในห้องปฏิบัติการ ส่วนมากจะใช้ขนมปังสุนัข (dog biscuit) หรือ Fleishman′s dry yeast หรือ อาหารปลา อาหารสุกร อาหารสุนัขเป็นอาหารของลูกน้ำ ในการเลี้ยงลูกน้ำใช้ถาดขนาด 19x30x5 เซนติเมตร ใส่น้ำประมาณ 1.5 ลิตร ใช้เลี้ยงลูกน้ำประมาณ 200-250 ตัวต่อ 1 ถาด โดยนำไข่ยุงมาแช่น้ำจนฟักเป็นลูกน้ำแล้วนำหลอดดูดย้ายมาเลี้ยงในถาดใส่น้ำ ให้อาหารเพาะเลี้ยงไปก่อนให้ได้จำนวนมากเพื่อจะได้ลูกน้ำที่สมบูรณ์แข็งแรงและอายุรุ่นเดียวกันมาทดลอง เมื่อลูกน้ำเป็นตัวโม่งย้ายใส่ภาชนะไปไว้ในกรงเลี้ยงยุง 2-3 วันจะเป็นตัวเต็มวัยจึงให้

น้ำเชื่อมเป็นอาหาร และใส่ลูกไก่หรือหนูตะเภาไว้ในกรงเพื่อให้ยุงตัวเมียเต็มวัยกินเลือดจนอายุ 2-3 วันจะผสมพันธุ์และวางไข่ การเก็บไข่โดยนำบีกเกอร์ใส่น้ำมีกระดาษฟางหรือกระดาษกรองติดด้านในบีกเกอร์ เพื่อให้ยุงวางไข่ ยุงลายจะวางไข่ข้างผนังด้านในของภาชนะเหนือระดับน้ำ ไข่ที่วางใหม่ๆ จะมีสีขาวและค่อยๆ เข้มขึ้นจนกลายเป็นสีดำ เมื่อตัวอ่อนภายในไข่เจริญเต็มที่พร้อมที่จะฟัก การฟักโดยนำกระดาษที่มีไข่แช่น้ำให้ท่วมประมาณ 2-3 วันจะได้ลูกน้ำระยะที่ 2 และอีกประมาณ 4-5 วันจะได้ลูกน้ำระยะที่ 4 ไข่ที่เหลือเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส ลูกน้ำที่เหลือจากการทดลอง เพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นตัวโม่งและตัวเต็มวัยเพื่อการผลิตไข่รุ่นต่อไป (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2526; Nathawut Thanee, 1980)

2.1.5 การแพร่กระจายของยุงลายเข้าสู่ประเทศไทย

ยุงลาย *A. aegypti* ถูกค้นพบโดย Linnaeus ในปี ค.ศ.1762 ที่ประเทศอียิปต์ มีแพร่กระจายอยู่ทั่วๆ ไป การแพร่กระจายเข้าสู่ประเทศไทยยังไม่มีรายงานว่ายุงลายเข้าสู่ประเทศไทยตั้งแต่เมื่อใด (อุษาวดี ถาวระ, 2533) อาจจะมากับภาชนะดินเผาจากประเทศจีนหรืออาหรับในหลายศตวรรษก่อน (Scalon, 1965) มีรายงานเกี่ยวกับการพบยุงลายครั้งแรกในประเทศไทย ปี พ.ศ.2450 แต่ไม่ได้บอกพื้นที่ที่พบยุงลาย ในอดีตจะพบยุง *A. aegypti* เฉพาะในเขตเมืองใหญ่ๆ แต่ในปัจจุบันพบยุงชนิดนี้ทั้งในเขตเมืองและชนบท (กองระบาดวิทยา, 2535) มีการสำรวจและแยกชนิดของยุงลายใน genus *Aedes* ที่พบในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ.2512 โดย Ratanaithikul และ Harrison ได้จำแนกยุงลายไว้ 12 ชนิด สาเหตุการแพร่พันธ์ยุงลายอีกประการหนึ่งคือสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป ในช่วงเวลากว่า 100 ปี ที่ผ่านมาโลกมีการเปลี่ยนแปลงทุกรูปแบบของอากาศอย่างชัดเจนอุณหภูมิเฉลี่ยของโลกสูงขึ้นอย่างมาก ในปี พ.ศ.2523-2533 เป็นช่วงที่โลกมีสภาพอากาศร้อนที่สุด ปรากฏการณ์ El Nino ได้รับการบันทึกมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2110 จนถึงปัจจุบัน ปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดภาวะแห้งแล้งและอุณหภูมิสูงขึ้นในหลายๆ ประเทศรวมทั้งประเทศไทย ภาวะแห้งแล้งทำให้ประชาชนกักเก็บน้ำไว้ในภาชนะต่างๆ มากขึ้น ขณะเดียวกันจากภาวะโลกที่อบอุ่นมากขึ้นของปรากฏการณ์เรือนกระจกยังช่วยให้ยุงและแมลงที่จำศีลในช่วงฤดูหนาวสามารถแพร่พันธุ์ได้ในสภาพอากาศของฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นได้ดีอีกด้วย (ศิริรัตน์ สาโพธิ์สิงห์, 2544)

2.1.6 การสำรวจลูกน้ำยุงลาย

ในปี พ.ศ.2514 ประคอง พันธุ์อุไร ทำการสำรวจลูกน้ำ *A. aegypti* ในภาชนะธรรมชาติ เช่น กะลามะพร้าว โพรงไม้ ในเขตนครหลวง กรุงเทพมหานคร ไม่พบลูกน้ำชนิดนี้

ในรายงานของ องอาจ เจริญสุข (2520); เลาจนา ธีรภัทรสกุล บุญล้วน พันธุมจินดา และเพ็ญสุข เต่าทอง (2523); เลาจนา เชาวนาดิศัย และ เพ็ญสุข เต่าทอง (2524) พบว่าที่หมู่บ้านรถไฟ บางเขน พระนคร มีลูกน้ำยุงลายในท่อระบายน้ำโสโครกซึ่งเป็นท่อคอนกรีต มีเศษขยะและดินอุดตันในท่อ ทำให้เกิดน้ำขังนิ่ง บางตอนไม่มีแผ่นซีเมนต์ปิด สาเหตุที่ยุงเปลี่ยนนิสัยอาจมาจากการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดยุงมาเป็นเวลานาน ดังนั้นควรคำนึงถึงการควบคุมยุงลายด้วย ในบางบ้านใช้ไม้กระดานตอกห่างๆ เป็นฝาปิดภาชนะใส่น้ำ บางบ้านเป็นฝาไม้หักชำรุดเหลือปิดเป็นบางส่วน การปิดฝาภาชนะเก็บน้ำไม่มิดทำให้เป็นเงามืดซึ่งยุงลายชอบลงไปวางไข่มากกว่าภาชนะที่เปิดตุ่มหมด บางบ้านขังน้ำฝนไว้จะใช้พลาสติกคลุมรัดไว้แน่น หรือมีฝาอะลูมิเนียมกลมปิดปากตุ่ม พวกนี้พบลูกน้ำน้อยกว่าพวกที่ไม่ปิดตุ่มหรือปิดไม่สนิท

จากการศึกษาในเขตโครงการจัดหาน้ำสะอาดในชนบท อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ.2528 มีการพบลูกน้ำยุงลาย ในโอ่งซีเมนต์ขนาดใหญ่ทั้งที่มีฝาปิดและไม่มีฝาปิด 32.3% ในถังคอนกรีตเก็บน้ำฝน 4% ในโอ่งน้ำใช้ขนาดเล็กภายนอกบ้าน 63.7% ในโอ่งน้ำใช้ขนาดเล็กภายในบ้าน 95.3% โอ่งน้ำดื่ม 66.3% และขาตู้กันมด 63.4% ค่าเฉลี่ยภาชนะบรรจุน้ำที่มีลูกน้ำเท่ากับ 6.5 ภาชนะต่อบ้าน และพบยุงลายทุกบ้าน การพบลูกน้ำยุงลายในภาชนะที่ปิดฝาด้วยเนื่องจาก ในขณะรองน้ำฝนต้องเปิดฝาโอ่งทำให้ยุงสามารถวางไข่ได้ เมื่อนำน้ำในภาชนะนั้นมาตรวจ พบว่า pH 6.81-10.68 แสดงว่า pH ระดับนี้ไม่ได้เป็นอันตรายแก่ลูกน้ำในการดำรงชีพ (บุญล้วน พันธุมจินดา, 2517)

จากการสำรวจดัชนีความชุกชุมของยุงลายในช่วง พ.ศ.2532-2534 ของประเทศ พบว่าค่าเฉลี่ย BI (Breteau Index) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้มีค่า 225.14, 189.75 และ 106.44 ตามลำดับ แหล่งเพาะพันธุ์ลูกน้ำยุงลายที่พบมากที่สุดคือตุ่มขังน้ำ (เยาวภา ดุลยไพรี และ ไพฑูรย์ วงษ์สกุล, 2533) ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจ 5 จังหวัดใน พ.ศ.2530 ของสมศักดิ์ บุตราช และคณะ อย่างไรก็ตามแม้จะพบถังซีเมนต์ที่อยู่ในห้องน้ำในสัดส่วนที่น้อย คือ 5.62% แต่ก็พบว่ามีอัตราการพบลูกน้ำยุงลายสูง เนื่องจากเป็นภาชนะที่ไม่มีฝาปิดอยู่ในที่มืดการขัดล้างและเปลี่ยนถ่ายน้ำทำได้ไม่สะดวกมีปริมาณน้ำมากและมักจะสร้างไว้แทนตุ่มเก็บน้ำ ในปัจจุบันมีการสร้างไว้ใช้ในชนบทเป็นจำนวนมาก เพราะมีความทนทานและเก็บน้ำได้ปริมาณมาก ส่วนจานรองขาตู้กับข้าวมีสัดส่วนที่พบน้อย คือ 4.29% เมื่อเทียบกับภาชนะอื่นๆ อัตราการพบลูกน้ำยุงลายเท่ากับ 42.36-58.58% ซึ่งต่ำกว่าการสำรวจของประคอง พันธุ์อุไร ที่กรุงเทพฯ ในปี พ.ศ.2514 ที่พบว่าจานรองขาตู้พบลูกน้ำยุงลายสูงถึง 63.5% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้ความรู้ด้านสุขศึกษากันอย่างต่อเนื่อง ตลอดจนมีการศึกษาวิจัยการใช้สารต่างๆ เช่น เกลือ ปูนแดง และน้ำส้มสายชู ก็เป็นได้

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการสำรวจที่ผ่านมา เมื่อ ค.ศ.1973 โดย Pant, Jatanasen and Yasuno พ.ศ.2523 โดย Boonlaun Panthumchinda, Somsak Phan U-rai, Wongsiri Samuthrapong,

Ongoarg Charoensook and Poonyos Rielrangboonya และ พ.ศ.2530 โดย สมศักดิ์ บุตราช และคณะ ซึ่งได้สำรวจในบางจังหวัด พบว่า ค่าดัชนีความชุกชุมของยุงลายในแต่ละพื้นที่จะสำรวจในช่วงเวลาที่ต่างกัน โดยส่วนรวมมีแนวโน้มสูงขึ้น จากการเปรียบเทียบภาพรวมของจังหวัดที่สำรวจและจากข้อมูลผู้ป่วยไข้เลือดออก พบว่ามีความสอดคล้องกันกับค่าดัชนีความชุกชุมของยุงลาย อย่างไรก็ดียังมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไข้เลือดออก คือ อัตราการกัด อายุขัย และอัตราการติดเชื้อไวรัสเดงกี่ของยุงลาย ตลอดจนสภาพภูมิคุ้มกันของประชากร และสภาพภูมิอากาศ เป็นต้น

ความสำคัญทางการแพทย์ของยุงลาย

ยุงลาย *A.aegypti* เป็นพาหะสำคัญของโรคไข้เลือดออกและทำให้เชื้อไวรัสแพร่กระจายและระบาดได้ โดยยุงลายกัดกินเลือดผู้ป่วยที่มีเชื้อ Flavivirus เชื้อจะเข้าไปฟักอยู่ในตัวยุง 8-10 วัน ยุงจะมีเชื้ออยู่ในตัวตลอดอายุขัยและสามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่ผู้ที่ถูกกัดได้ (อารีรัตน์ ศรีจักรวาล, วงษ์, สำลี โพธิปัญญา, สุนทรี โรจน์สุพจน์ และ ไพรจิตร วราชิต, 2536)

มีรายงานว่าเชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดไปสู่ยุงได้โดยผ่านทางไข่ (Transovarian) ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคไข้เลือดออกในพระนคร-ธนบุรี ตั้งแต่ปี พ.ศ.2492 การระบาดรุนแรงเมื่อปี พ.ศ.2501 หลังจากนั้นเริ่มระบาดไปยังเมืองใหญ่ๆ ที่มีการติดต่อกับกรุงเทพฯ เช่น เชียงใหม่ นครสวรรค์ สระบุรี ลพบุรี นครราชสีมา โดยพบผู้ป่วยเฉพาะในเขตเมืองเท่านั้น ปัจจุบันพบการระบาดของโรคไข้เลือดออกในทุกจังหวัด และมีรายงานพบทั้งในเขตเมืองและนอกเมือง เนื่องจากประชาชนนิยมเก็บน้ำไว้ในตุ่มเพื่อใช้บริโภค ซึ่งโอ่งและที่ใส่น้ำล้างเท้าเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงที่สำคัญ ในรายงานของฝ่ายระบาดวิทยา กองควบคุมโรค สำนักอนามัย ปี พ.ศ.2536 มีจำนวนผู้ป่วยในการระบาดแต่ละครั้งเพิ่มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ จากจำนวนพันเป็นจำนวนหมื่น ในปี พ.ศ.2537 กองระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออกทั้งสิ้น 51,688 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 87.47% ต่อประชากรแสนคน จากข้อมูลในอดีตที่ผ่านมาพบว่ารูปแบบของโรคไข้เลือดออกมีระบาดในช่วง 10 ปีแรก เป็นการระบาดแบบปีเว้นปี ในช่วง 10 ปีที่สองเปลี่ยนไปเป็นระบาดรุนแรงทุก 3 ปี และในช่วง 10 ปีที่ 3 เป็นแบบติดต่อกัน 2 ปีเว้น 1 ปี เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราป่วยในแต่ละปีมีแนวโน้มสูงขึ้น แสดงว่าการดำเนินการป้องกันและการควบคุมยังไม่ประสพผลสำเร็จ ถึงแม้ว่าอัตราการตายของผู้ป่วยจะลดลงอย่างมาก แสดงว่าการรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น

โดยทั่วไปโรคไข้เลือดออกจะพบชุกชุมในฤดูฝน ในกรุงเทพฯ และเมืองใหญ่ๆ อาจพบได้ตลอดทั้งปี การระบาดมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับฤดูฝนและความชุกชุมของยุงลาย ทุกครั้งที่เข้าฤดู

ฝนโรคระบาดนี้จะปรากฏ โดยในปี พ.ศ.2537 พบผู้ป่วยมากขึ้นในช่วงเดือนพฤษภาคม สูงสุดในเดือนมิถุนายน หลังจากนั้นจำนวนผู้ป่วยจะลดลง ระยะเวลาที่ปริมาณยุงลายสูงมากจะนำมาก่อนระยะเวลาที่โรคระบาดสูงสุดประมาณ 1-2 เดือน เนื่องจากยุงที่เกิดใหม่ที่ยังไม่มีเชื้อไวรัสหากดูดเลือดคนที่มีเชื้อเข้าไปแล้วจะต้องใช้เวลาสักระระหนึ่งจึงจะแพร่เชื้อโรคต่อไปได้ เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน การระบาดของโรคจะบรรเทาลง ดังนั้นการกำจัดยุงลายควรกระทำในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน จึงจะได้ผลดีเพราะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความชื้นจะมีผลต่ออัตราการตายของยุงและวัฏจักรของเชื้อไวรัสในตัวยุง (ชวลิต ทัศนสว่าง, 2532)

การระบาดในครั้งแรกๆ จะพบไข้เลือดออกมากที่สุดในเด็กอายุ 3-5 ปี แต่ในระยะหลังอายุของเด็กที่เป็นไข้เลือดออกสูงขึ้นคือมีอายุ 5-9 ปี ในเด็กต่ำกว่า 1 ปี อาจพบได้แต่มีจำนวนน้อย ซึ่งในช่วง อายุ 6-9 เดือน มีอัตราการตายสูงกว่าอายุอื่นๆ ในเด็กที่อายุมากกว่า 14 ปี จะมีอุบัติการณ์ของโรคนี้ลดลงเรื่อยๆ แต่ในระยะหลังพบในกลุ่มวัยหนุ่มสาวเพิ่มมากขึ้น (รุ่งโรจน์ พิมพ์ใจพงศ์, สุคต พานิชการ และ เกษตร ยะสาธะโร, 2533)

2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

2.2.1 อนุกรมวิธาน

โดยทั่วไป Bti เป็นแบคทีเรียพวกหนึ่งจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom): Monera

ไฟลัม (Phylum): Schizophyta

อันดับ (Order): Eubacteriales

วงศ์ (Family): Bacillaceae

จีนัส (Genus): Bacillus

สปีชีส์ (Species): *Bacillus thuringiensis*

Bti ที่ศึกษาคือ *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 หรือ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

2.2.2 ประวัติและการศึกษา *Bacillus thuringiensis*

ในปี ค.ศ.1902 นักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Ishiwata พบว่าหนอนไหมเป็นโรคท้องร่วงตายและสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากหนอนไหม และตั้งชื่อว่า *B. sotto* ในปี ค.ศ.1915 Aoki และ Chigasaki ได้ศึกษาโรคท้องร่วงที่เกิดจากหนอนไหมและทดลองให้เห็นว่า โรคท้องร่วงในหนอนไหมเป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียสร้างขึ้น และในปีเดียวกันนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ชื่อ E. Berliner ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจาก Mediterranean flour month (*Anagasta kuehniella*) ซึ่งพบที่เมือง Thuringen และตั้งชื่อตามชื่อเมืองที่พบว่า *Bacillus thuringiensis* (Bt) (อัจฉรา ตันติโชดก, ม.ป.ป) ทั้งนี้ Berliner ไม่ทราบว่ามีการพบแบคทีเรียชนิดเดียวกันนี้ที่ประเทศญี่ปุ่น ต่อมาในปี ค.ศ. 1916 Mitani และ Watarai ชาวญี่ปุ่นได้แยกสารจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและให้สารนั้นกับหนอนไหมและทำให้หนอนไหมตาย ต่อมาภายหลังศึกษาพบว่าเป็นผลึกโปรตีนที่แบคทีเรียนี้สร้างขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ.1920 เป็นต้นมามีผู้พยายามที่จะทดลองใช้ Bt ในการป้องกันกำจัดแมลงหลายชนิด จนกระทั่งในปี ค.ศ.1938 มีผู้ผลิต Bt ในรูปการค้าเป็นครั้งแรกชื่อ Sporeine®

ในปี คศ.1953 Hanney พบโครงสร้างในเซลล์แบคทีเรียขณะที่แบคทีเรียกำลังสร้างสปอร์ ที่เรียกว่า parasporal bodies และให้ข้อสังเกตว่าโครงสร้างนี้ต้องเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค หนึ่งปีต่อมา Angus ได้ทดลองให้เห็นว่าข้อสังเกตของ Hanney เป็นความจริงและจัดแบคทีเรียนี้เป็นพวก Crystalliferous bacteria หลังจากนั้นงานทดลองเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียตัวนี้จึงมีมากขึ้นเรื่อยๆ ภายหลัง De Barjac และ Bonifoi ได้ค้นพบวิธีวิเคราะห์แยกสายพันธุ์ Bt ในปี ค.ศ.1962 โดยดูจาก

ปฏิกริยาของ antibody ที่มีผลต่อ flagella protein หรือที่เรียกว่า H-antigen และเรียกสายพันธุ์ต่าง ๆ นี้ว่า H-serotype (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535)

ต่อมาในปี คศ.1975-1976 Thahori และ Magarlit ได้สำรวจในอิสราเอล พบมีแอ่งน้ำแห่งหนึ่งในแม่น้ำที่แห้งตอนบนของส่วนกลางของทะเลทราย Negev ใกล้กับ Kibbutz Zeelim แอ่งน้ำกว้าง 15x60 เมตร ลึก 30 เซนติเมตร มีน้ำกร่อยและอินทรียสารสูงมีลูกน้ำ *Culex pipiens* (*C. pipiens*) ที่ตายแล้วและกำลังจะตายลอยอยู่บนผิวน้ำ มีตัวโม่งและตัวเต็มวัยจมอยู่พยายามที่จะออกจากคราบ เขาจึงเก็บตัวอย่างน้ำ ลูกน้ำ และดินโคลนริมแอ่งน้ำนั้นไปตรวจวิเคราะห์และทำการแยกแบคทีเรียร่วมกับ Goldberg และนำมาแยกให้บริสุทธิ์เป็น colony เดี่ยวตั้งชื่อว่า ONR 60A หรือ Bti ในปัจจุบัน ซึ่งในปี ค.ศ.1976 ได้เพาะเลี้ยง Bti ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อลูกน้ำยุง 5 ชนิด คือ *A. aegypti, Culex univittatus* (*C. univittatus*), *C. pipiens, Aedes sergentii* และ *Uranotaenia unguiculata* เป็นครั้งแรก (Goldberg and Margalit,1977)

Dr. De Barjac เป็นผู้ศึกษาและตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype H–14 เมื่อนำไปทดสอบกับลูกน้ำยุงลายที่ความเข้มข้น $2.4x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าทำให้ลูกน้ำยุงลายตายภายใน 20-30 นาที (De Barjac, 1979) โดยมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงในวงศ์ Diptera มาก

ในปี ค.ศ.1981 Ignoffo และคณะ ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ Bti กับ *Bacillus kurstaki* พบว่า Bti มีพิษต่อลูกน้ำยุงลายมากแต่มีพิษน้อยต่อหนอนคืบกระหล่ำ (*Trichoplusiani*) (Ignoffo, Garcia, Kroha, Fukuda, and Couth, 1981)

การแพร่กระจายของ Bti สามารถพบในน้ำ ชิ้นส่วนของพืช แมลงและในดินหลายแห่งของโลก สำหรับแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีผู้รายงานการแยก Bt จากดินในประเทศฟิลิปปินส์ ประเทศเวียตนาม ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศไต้หวัน และประเทศไทย (จริยา จันทร์ไพแสง, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สมศักดิ์ ศิวิชัย, 2541) ในปัจจุบันพบ Bt ทั่วโลกประมาณ 58 สายพันธุ์ ในประเทศไทยพบแล้ว 14 สายพันธุ์ ซึ่ง 13 สายพันธุ์ที่เคยมีผู้รายงานได้แก่สายพันธุ์ *kurstaki* (H13abc), *alesti* (H3ac) , *kenyea* (H4ac), *galleriae* (H5ab), *canadensis* (5ac), *entomocidus* (H6ab) *aizawai* (H7), *tolworthi* (H9), *kumamotoensis* (H18), *tochogiensis* (H19), *neoleonensis* (H24) *mexicanensis* (H27) และ *leesis* (H33) ส่วนสายพันธุ์ *chanpaisis* (H46) เป็นสายพันธุ์ใหม่ (Jariya Chanpaisang, 1995) และคาดว่าจะพบสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งสายพันธุ์ใหม่อีกมาก สามารถนำ Bt มาใช้ประโยชน์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง นำมาเพิ่มปริมาณหรือผลิตเป็นการค้าและใช้เป็นสารกำจัดแมลงแทนสารเคมี หลังจากใช้แล้วจุลินทรีย์บางส่วนก็ตายไปบางส่วนก็ยังสามารถคงอยู่ในธรรมชาติและขยายพันธุ์ต่อไป

2.2.3 สารพิษที่สร้างโดย Bt

Bt สร้างสารพิษหลายชนิด เชื้อต่างสายพันธุ์สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกันไปและมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน สารพิษที่เชื้อนี้สร้างขึ้นมีอยู่ 5 ชนิดคือ

1. สารเดลต้าเอนโดทอกซิน (delta endotoxin) เป็น protein crystal คือคริสตัลที่ประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมีทั้งสารพิษและเอนไซม์ประกอบกันเป็นรูป dum-bell พบครั้งแรกโดย Hannay เมื่อปี ค.ศ.1953 ในหนอนไหมเรียก crystal protein หรือ parasporal body นอกจากนี้ยังพบใน *Bacillus subtilis , Bacillus laterosporus , Bacillus popilliae* และ *Clostidium cochiearium* แต่มีสารพิษต่อแมลงมากน้อยแตกต่างกันไป จนถึงปัจจุบันพบว่ามีผลเฉพาะกับหนอนผีเสื้อบางชนิด ยุง ริ้น และ blackflies เท่านั้น

2. สารเบต้าเอกโซทอกซิน (beta exotoxin)หรือ thuringiensin หรือ thermostable exotoxin คือสารพิษที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ขณะเซลล์กำลังเจริญเติบโต เป็นสารพิษซึ่งทนความร้อนได้ 120 องศาเซลเซียส นานถึง 15 นาที สารพิษนี้สร้างก่อนการสร้างสปอร์ น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นสารที่ละลายในน้ำได้ เป็นอันตรายต่อแมลงโดยไปมีผลต่อระบบฮอร์โมนกระบวนการเมทาบอลิซึม และการสร้างเอนไซม์ต่างๆ exotoxin ชนิดนี้มีพิษต่อแมลงหลายชนิดกว่า endotoxin

3. สารแอลฟาเอกโซทอกซิน (alpha exotoxin) หรือ lecithinase C หรือ phospholipase C เป็นสารซึ่งสร้างในเซลล์และปล่อยออกมานอกเซลล์ เรียกว่า Toumanoff′s factor สารพิษของ Bt ถูกกำกับโดยพลาสมิด ดังนั้น Bt แต่ละสายพันธุ์จะมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อีก เช่น mouse factor thermosensitive exotoxin เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ละลายในน้ำได้ มีคุณสมบัติพิเศษเป็น hemolysin คือทำลายเซลล์เม็ดเลือดและมีผลต่อการขัดขวางการทำงานในระบบสรีรวิทยาหลายอย่างในตัวแมลง พบว่าเป็นพิษต่อตัวอ่อน sawfly (Hymenoptera)

4. สารแกมมาเอกโซทอกซิน (gamma exotoxin) เป็นสารพิษที่พบใน *B. thuringiensis* var. *entomocidus* และเป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน ก๊าซออกซิเจนและแสงอาทิตย์ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสจะถูกทำลายภายใน 10-15 นาที กลไกในการเข้าทำลายแมลงนี้ยังไม่รู้แน่ชัด

5. Louse factor พบโดย Gingrich มีเหาถึง 4 ชนิด แสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) เชื้อที่ไม่สร้าง exotoxin และพบว่าอาการผิดปกติไม่ได้เกิดจาก endotoxin จึงรายงานว่าเป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่เชื้อสร้างขึ้นและให้ชื่อสารนี้ว่า louse factor และยังมีเอนไซม์พวก chitinase เป็นตัวช่วยส่งเสริมให้การเข้าทำลายดีขึ้น (อัจฉรา ตันติโชดก, ม.ป.ป; Cornell University, Ithaca, New York, www, 1998)

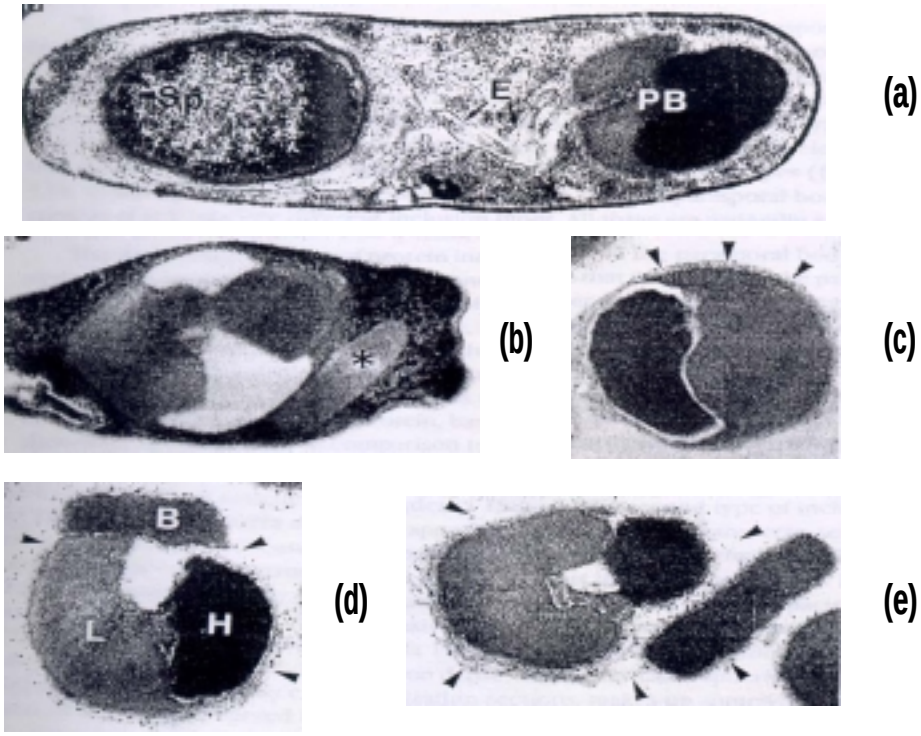
2.2.4 คุณสมบัติของ Bti

Bti เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน แกรมบวกย้อมติดสีน้ำเงิน (gram positive) ต้องการออกซิเจน (aerobic) รูปร่างเป็นเซลล์ท่อน (rod shape) ขนาดกว้าง 1-1.2 ไมโครเมตร ยาว 3-5 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา สร้างสปอร์ได้ภายในเซลล์เรียกว่าเอนโดสปอร์ (endospore) (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535) ในขณะสร้างสปอร์จะสร้างผลึกโปรตีนคือสารเดลต้าเอนโดทอกซิน (delta endotoxin) ในเวลาใกล้เคียงกันเรียก parasporal crystal แสดงดังภาพที่ 2.9 (Foo and Yap, 1982) ซึ่งผลึกนี้มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน สลายตัวง่าย ละลายในสารละลายที่เป็นด่าง โดยผลึกโปรตีนที่ยุงกินเข้าไปจะไปอยู่ในรูปของ protoxin ซึ่งยังไม่เป็นพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในกระเพาะของยุงลาย (caeca) ซึ่งมีน้ำย่อยที่เป็นด่าง (pH 7.6-8.4) และเมื่อถึงช่วงลำไส้ส่วนกลาง (midgut) จะเป็นด่างมากขึ้น (pH 8.4) ส่วนในลำไส้ส่วนปลาย (hindgut) จะเป็นด่างอ่อนๆ หรือเกือบเป็นกลาง pH 7.2-7.8 (อาคม สังข์วรานนท์, 2538; Clements, 1963) ทำให้เกิดขบวนการย่อยโปรทอกซิน (protoxin) โดยน้ำย่อยโปรทีโอไลติค (proteolytic enzyme) ออกมาเป็นสารพิษที่แท้จริง (active toxin) สารพิษจะเข้าไปอยู่ที่ผนังเซลล์ของกระเพาะอาหารทำลายเยื่อบุกระเพาะอาหารจนเป็นแผล น้ำย่อยที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะเข้าไปตามรอยแผลเข้าไปในลำตัวทำให้ปากและกระเพาะอาหารเป็นอัมพาตและจะทำให้ลูกน้ำตายภายใน 2-3 ชั่วโมง และมีฤทธิ์ประมาณ 3 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของผลึกโปรตีนและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสงแดด ความหนาแน่นของลูกน้ำ (กรมวิชาการเกษตร, 2539)

มีการศึกษาการย่อยของสปอร์ Bti โดยลูกน้ำยุง *A. aegypti* พบว่าสปอร์ของ Bti จะถูกย่อยในลำไส้ (gut) ของลูกน้ำยุงโดยยืนยันได้จากมีการรวมตัวกันระหว่าง สปอร์กับ methionine เข้าไปสู่เนื้อเยื่อ (Khawaled, Cohen, and Zaritsky, www, 1992) จากการทดลองพบว่า Bti สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีที่สุด รองลงมาคือยุงรำคาญและยุงก้นปล่องตามลำดับ (Frankenhuyzen and Nystrom, www, 1998; Wongsiri, 1976)

จากการศึกษาทางชีวเคมีเปรียบเทียบผลึกข้างสปอร์ของ Bt สายพันธุ์ *kurstaki*, *tolworthi*, *alesti, berliner* และ *israelensis* พบว่าสายพันธุ์ *israelensis* มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงแต่ไม่มีพิษต่อหนอนกินใบยาสูบซึ่งต่างจากสายพันธุ์อื่น ผลึกจากสายพันธุ์ทั้ง 5 ประกอบด้วยสารพิษตั้งต้น (protoxin subunit) 1 หน่วยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.34×10^5 ดาลตัน แต่จากผลของโพลีอไคลาไมด์เจล อิเลคโทรโฟรีซีส (polyacrylamide gel electrophoresis) พบส่วนประกอบน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.6×10^4 ดาลตันในสายพันธุ์ *israelensis* และยังพบความแตกต่างขององค์ประกอบของกรดอะมิโนและทริปติค เพปไทด์ ฟิงเกอร์พริน (tryptic peptide fingerprint) จึงอาจเป็นได้ว่าความ

จำเพาะของการทำลายแมลงขึ้นกับความแตกต่างของการเรียงลำดับกรดอะมิโนและองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรต (Tyrell, Bulla, Andrews, Kramer, Devidson, and Nordin, 1981)



ภาพที่ 2.9 แสดงภาพ parasporal body ของ Bti

(a) ระยะที่ 5 ของการ sporulation spore (Sp) และ parasporal body (PB)

(b) รูปแบบที่สมบูรณ์ของ parasporal body ก่อนจะมีการแตกตัวของ sporangium

(c) parasporal body ที่เพิ่งจะหลุดออกจาก sporangium ยังมีเยื่อหุ้มหลายชั้นคลุมอยู่รอบๆ อย่างหนาแน่น

(d) แสดง parasporal body ที่มีลักษณะ inclusion แตกต่างกัน 3 ชนิด (L) inclusion ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 27–kDa (B) bar-shaped body inclusion ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 65–kDa (H) inclusion ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 128 และ 135–kDa

(e) parasporal body ที่แยกออกมาจะเห็นรูปร่างลักษณะ inclusion ได้ชัดเจน

หมายเหตุ จาก Bacterial Control of Mosquitoes & Black Files (p. 18) De Barjac, H. and Sutherland, D.J. 1990, USA: Rutgens University Press.

2.2.5 โครงสร้างของผลึกโปรตีน

โดยทั่วไปผลึกโปรตีนเดลต้าเอนโดทอกซิน ของ Bt มีรูปร่างเหมือนพีระมิดสองอันฐานชนกัน (bipyramid shape) ผลึกโปรตีนนี้ประกอบด้วยกลุ่มของโมเลกุลโปรตีนเกาะกันเป็นรูปไข่หรือรูปดัมเบล (dumb-bell) ยาว 15 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 230 กิโลดาลตัน มีการเรียงตัวของคาร์บอนเป็นแบบ tetramolecular face–centered cubic ในแต่ละสายพันธุ์ผลึกโปรตีนมีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน ทำให้สารพิษที่อยู่ในผลึกโปรตีนมีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไป ผลึกโปรตีน Bti นี้มีโครงสร้างเป็นหน่วยเดียวของสารประกอบไกลโคโปรตีน (glycloprotein) ประกอบด้วยโปรตีน 95% คาร์โบไฮเดรต 5.6% (กลูโคส 3.8% แมนโนส 1.8%) กรดอะมิโนที่พบมากคือ กรดกลูตามิค (glutamic acid) และกรดแอสปาติก (aspartic acid) (Bulla, Kramer, and Devidson, 1977) เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น อาหารชนิด nutrient broth ใช้เวลาในการสร้างผลึกโปรตีน 24 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเลี้ยงเชื้อ และใช้เวลา 24-48 ชั่วโมงในการปลดปล่อยผลึกโปรตีนออกจากเซลล์ (Burges and Hussey, 1971)

ในเซลล์อาจมีผลึกโปรตีน 1-3 ผลึก ส่วนผลึกโปรตีนของ Bti เป็นรูปกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร หรือในช่วง 0.7-1.2 ไมโครเมตร ซึ่งผลึกโปรตีนรูปกลมของ Bti มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน 27, 65 และ 128 ถึง 130 กิโลดาลตัน ในแต่ละผลึกโปรตีนประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ปกคลุมด้วยส่วนที่เหมือนตาข่ายบางๆ แต่ละส่วนที่อยู่ด้วยกันจะแยกอิสระโดยมีชั้นหุ้มอยู่ 1 ชั้น หรือมากกว่า (ดวงทิพย์ จารุพัฒน์, 2538; Bulla, Kramer and Devidson, 1977; Nathawut Thanee, 1980) ผลึกโปรตีนนี้ไม่ทนต่อความร้อน ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์และสามารถละลายได้ในภาวะที่เป็นด่าง มีความคงทนในน้ำ ถ้าทำให้แห้งก็ยังมีประสิทธิภาพดี หากเก็บในรูปสารแขวนลอย (suspension) ควรเก็บที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส หากเก็บในที่มืดจะอยู่ได้นานถึง 10 ปี (Burges and Hussey, 1971)

2.2.6 สารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน

ปัจจุบันจำแนกโปรตีนที่มีอยู่ในผลึกโปรตีนของ Bt โดยอาศัยความเป็นพิษต่อแมลงและลำดับยีนที่คล้ายกันเป็น 6 กลุ่มใหญ่ คือ

กลุ่ม 1 โปรตีน CryI ประกอบด้วย 8 subclass (A-H) เป็นผลึกรูปร่างปิรามิดคู่ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 130-140 กิโลดาลตัน เป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับ Lepidoptera

กลุ่ม 2 โปรตีน CryII (A, B และ C) เป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตัน เป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera

กลุ่ม 3โปรตีน CryIII ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 72-75 กิโลดาลตัน เป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับ Coleoptera เท่านั้น

กลุ่มที่ 4 โปรตีน CryIV ที่พบใน Bt ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้มี 4 subclass ได้แก่ CryIVA, CryIVB, CryIVC และ CryIVD มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 128, 65 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

กลุ่ม 5 โปรตีน CryV มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Coleoptera

กลุ่ม 6 โปรตีน CytA ที่พบใน Bt มีความเป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera

ยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนทั้ง 6 กลุ่มพบใน Bt สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (ดวงทิพย์ จารุพัฒน์, 2538)

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติและชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนใน Bt สายพันธุ์ต่างๆ

ชนิดของยีน	สายพันธุ์ของ Bt	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	Host range	แมลงที่ได้รับอันตราย
CryIA	*kurstaki* HD-1, *aizawai sotto, entomocidus*	132.2	L	*Manduca sexta, Bornbyx mori, Pieris brassicae, Plutella, Ostrinia nubilalis*
CryIA	*berliner* 1715, *kurstaki* NRD-12, *aizawai* IC-1, *aizawai* IPL-7, *kurstaki* HD-1	131.0	L	*Pieris brassocae, Manduca sexta, Heliothis virescens*
CryIA	***kurstaki* HD-73**	130.0	L/D	*Pieris brassocae, Aedes aegypti*
		133.3	L	*Heliothis virescens, Manduca sexta, Trichoplusia ni, Ostrinia nubilalis, Pieris brassicae*
CryIB	*thuringiensis* HD-2, *entomocidus* HD-110	138.0	L	**Pieris brassicae**
CryIC	*entomocidus* 601, *aizawai* HD-173, *entomocidus* HD-110	134.8	L	*Spodotera littoralis, Spodoptera exigua, Mamesyra brassicae, Pieris brassicae*
CryID	*aizawai* HD-68	132.5	L	**Manduca sexta, Spodoptera exigua**
CryIE	*kenyae*	130.0	L	*Manduca sexta, Spodoptera littoralis, Spodoptera exigua*
CryIF	*aizawai* EG6346	133.6	L	*Ostrinia nubilalis, Heliothis virescens, Spodoptera exigua*
CryIIA	*kurstaki* HD-263, *kurstaki* HD-1	70.9	L/D	*Heliothis virescens, Lymantria dispar, Manduca sexta, A. aegypti*
CryIIB	*kurstaki* HD-1	70.8	L	*Manduca sexta, Lymantria dispar, Heliothis virescens, Trichoplusia ni*
CryIIIA	*san diego*, *tenebrionis* EG2158	73.1	C	*Manduca sexta, Lymantria dispar, Trichoplusia ni*
CryIIIB	*pakistani*, *tolworthi*	74.2	C	*Leptinotarsa dece ineata, Phaedon cochleariae*
CryIVA	*israelensis*	134.4	D	*A. aegypti, Anopheles stephensi, Culex pipiens*
CryIVB	*israelensis*	127.8	D	**A. aegypti, Anopheles stephensi**
CryIVC	*israelensis*	77.8	D	*A. aegypti*
CryIVD	*israelensis*	72.4	D	*A. aegypti, Culex pipiens*
CytA	*israelensis, morrisoni* PG-14	27.4	Non-specific	

L : lepidopteran, D : dipteran, C : coleopteran

หมายเหตุ จาก การโคลนและการศึกษาคุณสมบัติของยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน cry I จาก *Bacillus thuringiensis* H-serotype ใหม่ที่แยกได้ในประเทศไทย (หน้า 17), โดย ดวงทิพย์ จารุพัฒน์, 2538, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

2.2.7 กลไกการออกฤทธิ์ของ Bti

กลไกการทำให้เกิดโรคของ Bt มี 2 ประการหลักคือ ทำให้เกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร (gut paralysis) และเกิดอัมพาตทั่วตัว (general paralysis) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของแมลงที่กินเข้าไป

Angus(1956) และ Heimpel(1959) ได้ศึกษากลไกการเกิดอัมพาตของหนอนไหม รายงานว่า หลังจากเกิดภาวะเป็นพิษแล้ว pH ในเลือดของหนอนไหมจะเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดอัมพาตและเป็นไปทั่วตัวอย่างรวดเร็วและรุนแรง ต่อมามีผลการศึกษาหลายชิ้นพบว่า สารพิษของ Bti คือผลึกโปรตีน หรือ crystalline body ซึ่งเป็น protoxin เมื่อยุงกินเข้าไป สภาพที่เหมาะสมคือความเป็นด่าง (alkaline condition) ภายในกระเพาะอาหารและลำไส้ของลูกน้ำยุงจาก proteolytic enzyme จะทำให้เกิดการแตกตัวของผลึกโปรตีนกลายเป็น toxin หลังจากผลึกแตกตัวปล่อยสารพิษเดลต้าเอนโดทอกซิน (delta endotoxin) จะทำให้ยุงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด โดยสารพิษเดลต้าเอนโดทอกซินจะไปยับยั้งปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ในเซลล์ทางเดินอาหารของยุงและแมลงทำให้ออกซิเจนมีปริมาณเพิ่มขึ้นแล้วมีผลให้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มปริมาณขึ้นด้วยขบวนการ catabolytic และมีผลต่อเนื่องให้เกิดขบวนการ metabolic respiratory โดยไม่เพิ่ม ATP เมื่อ ATP ไม่เพิ่มตามก็จะทำให้ไม่มีการถ่ายทอดประจุ ทำให้ควบคุมการออสโมซิสไม่ได้ สุดท้ายทำให้ microvilli ของ goblet cell ในเยื่อบุทางเดินอาหารพองและแตก ทำให้เกิดการเชื่อมต่อถึงกันระหว่างระบบทางเดินอาหารและหลอดเลือด สมดุลที่มีอยู่ในธรรมชาติจะถูกเปลี่ยนไป สภาพ pH ในกระเพาะอาหารปกติ 10.2-10.5 จะต่ำลง ส่วนในเลือดซึ่งปกติจะมี pH ประมาณ 6.8 ก็จะเพิ่มมากขึ้นมีผลให้เกิดอัมพาตทั่วตัวอย่างรวดเร็วและรุนแรง นั่นก็คือการเกิดอัมพาตจะควบคู่ไปกับภาวะเป็นด่างในกระแสเลือดรวมทั้งทำให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่ระบบหลอดเลือดได้ด้วย แต่ส่วนใหญ่ลูกน้ำยุงจะตายจากการเป็นอัมพาต กินอาหารไม่ได้ ซึ่งสารพิษเดลต้าเอนโดทอกซินจะมีผลโดยตรงกับ cell membrane ของ gut epithelium ทำให้เกิดการแยกตัวของเซลล์ออกจาก basement membrane เกิดการผิดปกติของ ion transportation มีผลทำให้คุณสมบัติการซึมผ่านของเยื่อบางๆ (permeability) ของผนังกระเพาะอาหารต่อประจุโซเดียม (Na^+) เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความเข้มข้นของโพแทสเซียม (K^+) ในเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร และอัมพาตไปทั่วตัว (Burges and Hussey, 1971)

2.2.8 ความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง

การศึกษาในห้องปฏิบัติการครั้งแรกพบว่า Bti มีประสิทธิภาพสูงต่อลูกน้ำยุง *A. sergentii*, U*ranotaeni. unguiculata*, *A. aegypti*, C. *univittatus* และ *C. pipiens* เมื่อทดสอบกับลูกน้ำ *C. pipiens* ให้ประสิทธิภาพสูงกว่า *B. sphaericus* (SSII-1) 30-100 เท่า มีค่า ED_{95} (95% effective

dose) ต่อลูกน้ำยุง *C. pipiens* เท่ากับ $8x10^4$ เซลล์/ มิลลิลิตร(cells/ml) และต่อ *A. sergentii* เท่ากับ $6x10^5$ เซลล์/ มิลลิลิตร (Goldberg and Margarit, 1977)

จากการทดสอบยุง 3 ชนิด คือ *A. aegypti*, *C. pipiens* var. *quinquefasciatus* และ *Anopheles albimanus (An. albimanus)* พบว่าจำนวนลูกน้ำที่ตายสัมพันธ์กับน้ำหนักผลึกแห้งแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^{-2} ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่า LD_{50} (50% lethal dose) ใน 48 ชั่วโมง เท่ากับ $1.9x10^{-4}$, $3.7x10^{-4}$ และ $8.0x10^{-3}$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าผลึกโปรตีนมีพิษต่อลูกน้ำยุงก้นปล่องน้อยกว่ายุงรำคาญและยุงลาย 20-40 เท่า อาจเป็นเพราะพฤติกรรมการกินอาหารที่แตกต่างกัน (Tyrell, Devidson Bulla and Ramoska, 1977)

ความน่าจะเป็นของความต้านทานต่อ Bti (cross-resistance) สูตร ISP-78 ในลูกน้ำยุงระยะที่ 3-4 ของยุง *C. quinquefasciatus* และ *An. albimanus* ที่ต้านเคมีฆ่าแมลง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านสารเคมีของยุงทั้งสองชนิด แสดงว่ากลไกการต้านยาฆ่าแมลงพวกคาร์บาเมต (carbamate oxidase detoxification) ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate esterase detoxification) และ ไพรีโทรอยด์ (pyrethroid nerve insensitivity) ของลูกน้ำยุงยังไม่มี ดังนั้นการใช้ Bti หรือการใช้แบคทีเรียนี้อาจใช้ได้แม้ในสภาวะที่แมลงเกิดความต้านทานต่อสารเคมี (Sun, Goghiou and Weiss, 1980)

นิภา เบญจพงษ์ สมศักดิ์ พันธุวัฒนา และ เพ็ญสุข เต่าทอง (2528) ทำการศึกษาพิษและความคงทนของพิษของ Bti ในห้องปฏิบัติการ ที่มีต่อลูกน้ำยุง พบว่า Bti มีสารพิษที่ทำให้ลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ตาย 50% ที่ความเข้มข้น $7.13x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร(spores/ml) และตาย 90% ที่ความเข้มข้น $2.19x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง และทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatis*) ตาย 50% ที่ความเข้มข้น $7.57x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร และตาย 90% ที่ความเข้มข้น $3.44x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง และความคงทนของพิษในน้ำกลั่นดีกว่าในน้ำเสียและน้ำประปา สารพิษจะหมดฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญในน้ำเสียในสัปดาห์ที่ 14 หลังการทดลอง ส่วนในน้ำประปาและน้ำกลั่น ยังมีพิษสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ 61.11% และ 75% และฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญได้ 17.03% และ 68.34% ตามลำดับ

มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุง ระยะที่ 2 ของยุง *A. aegypti* และ *Anophelus stephensi (An. stephensi)* พบว่า ค่า LD_{50} ใน 24 ชั่วโมง เท่ากับ $2.4x10^4$ และ $9.8x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ *A. aegypti* มีระดับความไวสูงมากให้ค่า LT_{100} (100% lethal time) เท่ากับ 30-40 นาที ส่วน *An. stephensi* ให้ค่า LT_{100} เท่ากับ 100-110 นาที (Service, 1983) และประสิทธิภาพของ Bti ต่อลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุง *A. aegypti*, *A. albopictus* และ *Aedes*

polynesiensis เปรียบเทียบกับ *An. stephensi* และ *Anopheles gambiae (An. gambiae)* พบว่ายุงก้นปล่องทั้ง 2 ชนิดมีความไวต่อ Bti ต่ำกว่ายุงอื่นมาก (De Barjac and Coz, 1979)

นอกจากนี้ Ignoffo, Garcia, Kroha, Fukuda, and Couth (1981) ยังได้ศึกษาประสิทธิภาพของ Bti ต่อลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุง A. aegypti *ในน้ำกลั่นและน้ำบ่อ พบว่าค่า* LC_{50} *(50% lethal concentration) เท่ากับ 0.7 และ 59.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่างกัน 85 เท่า ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของตะกอนในน้ำ (2%) จะทำให้ประสิทธิภาพลดลง 1.5 เท่า ซึ่งสารแขวนลอย Bti เมื่อตกตะกอนในน้ำหลังทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงจะมีผลให้น้ำส่วนบนและส่วนล่างมีประสิทธิภาพ Bti ต่อลูกน้ำต่างกัน และถ้าถูกแสงอัลตร้าไวโอเล็ต 24 ชั่วโมงประสิทธิภาพจะลดลงหมด ส่วนที่อุณหภูมิ 31 ±1 องศาเซลเซียส นาน 100 วัน ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของ Bti และเมื่อทดสอบที่ความเค็ม 0.5% pH 4 , 6.6 และ 10 พบว่าไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของ Bti*

Van and Hembree (1982) ศึกษาส่วนประกอบที่แขวนลอยและละลายของดินในน้ำต่อประสิทธิภาพของ Bti พบว่าทำให้การตกตะกอนของ Bti เร็วขึ้นเนื่องจากการดูดซับของอนุภาคของดิน การกวนน้ำก็มีผล ถ้าน้ำไม่มีดินเป็นส่วนประกอบจะทำให้เพิ่มระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพ ตรงกันข้ามถ้าน้ำมีดินการกวนน้ำจะทำให้ลดระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพลง ในทำนองเดียวกัน Ramoska, Watts, and Rodriguez (1982) ทดลองโดยใช้น้ำที่มีดิน (soil) หรือดินเหนียว (clay) ≥ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าเม็ดทรายไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของ Bti ยกเว้นจะมีขนาดน้อยกว่า 147 ไมครอน ดังนั้นก่อนใช้ผลิตภัณฑ์ Bti ควรทำความสะอาดภาชนะก่อนเพื่อลดผลกระทบที่จะมีต่อ Bti

ประสิทธิภาพของ Bti ถูกพบว่ามีส่วนสัมพันธ์กับรูปแบบผลิตภัณฑ์และนิสัยการอยู่อาศัยของยุงแต่ละชนิด โดยการทดสอบทางชีวภาพ (bioassay) ของผลิตภัณฑ์ 3 สูตร คือ IPS-78® (สูตรมาตรฐาน) San 402-I® (ของเหลว) และ Bactimos ® (ก้อนทุ่นลอยน้ำ) ที่มีต่อลูกน้ำระยะที่ 3-4 ของยุง 4 ชนิด พบว่า *A. aegypti* ไวมากที่สุด รองลงมาคือ *C. quinquefasciatus*, *An. balabacensis* และ *Mansonia indiana* ตามลำดับ ยกเว้น *Anopheles balabacensis* จะไวต่อ Bactimos® มากที่สุด (Foo and Yap, 1982)

มีการดัดแปลงวิธีการใช้ Bti (Vectobac® 12AS) โดยผสมน้ำในอัตรา 1:3 ใช้เฮลิคอปเตอร์พ่นเป็นฝอยเล็กๆ (178 ไมโครกรัม) จะมีประสิทธิภาพต่อลูกน้ำยุง *A. aegypti* มากกว่าขนาดใหญ่ (553 ไมโครกรัม) และยังพบว่าค่าใช้จ่ายน้อยกว่าแต่มีประสิทธิภาพดีกว่าแบบผง (Knepper, Wagner, and Walker, 1991)

Karch, Manzambi, and Salaun (1991) ทำการทดลองภาคสนามในประเทศซาอีร์ (Zaire) ถึงประสิทธิภาพของสารแขวนลอย Bti (Vectobac® 12AS) ต่อลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* ในท่อน้ำทิ้ง และ *An. gambiae* ในบ่อชลประทาน พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำในทุกความเข้มข้น แต่ B.S.

(Vectolex-G®) ใช้ควบคุมลูกน้ำยุง *C. quinquefasciatus* ได้ดี ถ้าเพิ่มความเข้มข้นขึ้นจะใช้ควบคุมลูกน้ำยุง *An. gambiae* ได้เช่นกันทั้งๆ ที่ Vectobac® 12AS แตกตัวได้ดีกว่า Vectolex-G®

ในปี พ.ศ.2530 มีการสำรวจแยกเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทยเพื่อหาสายพันธุ์ที่ฆ่าลูกน้ำได้ดีในท้องถิ่น เพราะเชื่อว่าเชื้อจะปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมในประเทศไทยได้ดีกว่าเชื้อที่สั่งมาจากต่างประเทศ และสามารถผลิตจำหน่ายในราคาถูกได้ โดยเก็บตัวอย่างลูกน้ำที่ใกล้ตาย (มีสีเขียวหรือดำ) จาก 20 จังหวัด แล้วนำมาทดสอบกับลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญในห้องปฏิบัติการ พบว่า *B. sphaericus* สายพันธุ์ H-5 และหมายเลข K 6-3 จากจังหวัดกาญจนบุรี เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดกับยุงรำคาญ (นิภา เบญจพงษ์, เลาจนา เชาวนาดิสัย, สมเกียรติ บุญญะบัญชา และ บุญล้วน พันธุมจินดา, 2530) ในปี พ.ศ.2538 ได้สำรวจหาสายพันธุ์ใน 6 จังหวัดภาคกลางพบ *B. sphaericus* สายพันธุ์ H-5 หมายเลข 7 จากอยุธยา เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดกับยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus)* โดยมีมีประสิทธิภาพฆ่ายุงรำคาญได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *B. sphaericus* 2632 และไม่มีผลทำให้ลูกน้ำยุงยักษ์ตาย ส่วนประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) เมื่อเทียบกับ Bti แล้วจะต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 70 เท่า จึงจะทำให้ลูกน้ำยุงลายตาย ร้อยละ 50 (เลาจนา เชาวนาดิสัย, สุวิทย์ ธนศรีภักดีกุล, ศิริพรรณ วงศ์วานิช และ สุนันทา รามศิริ, 2538)

มีการทดลองใช้ Bti รูปเม็ดเข้มข้น 5% ในชุมชนรถไฟ กม.11 บางเขน 137 ครอบครัว เพื่อควบคุมลูกน้ำยุง *A. aegypti* 3 ครั้ง คือ ในระยะโรคสงบ ก่อนระยะโรคระบาด และระหว่างมีโรคระบาด ครั้งแรกขนาด 20 มิลลิกรัม/ตุ่ม ครั้งหลัง 60 มิลลิกรัม/ตุ่ม การใส่ Bti เข้มข้น 5% ในขนาด 20 มิลลิกรัม/ตุ่ม สามารถควบคุมลูกน้ำยุง *A. aegypti* โดยลดปริมาณลูกน้ำลงได้ 2 สัปดาห์ ส่วนการใส่ Bti เข้มข้น 5% ในขนาด 60 มิลลิกรัม/ตุ่ม จะลดความชุกชุมของลูกน้ำได้สูงกว่า นาน 10 สัปดาห์ (เลาจนา เชาวนาดิสัย, สุวิทย์ ธนศรีภักดีกุล และ บุญล้วน พันธุมจินดา, 2530)

ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ Bti ต่อลูกน้ำยุง *A. vaxans*, *A. aegypti* และ *C. pipiens* พบว่าความหนาแน่นของลูกน้ำและแสงแดดทำให้ประสิทธิภาพของ Bti ลดลง ส่วนที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ค่า LC_{50} และ LC_{90} จะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสถึง 10 เท่า เนื่องจากอุณหภูมิต่ำอัตราการกินของลูกน้ำจะลดลง เมื่อมี daphnia อยู่ร่วมกับลูกน้ำ ประสิทธิภาพของ Bti ทั้งสองรูปแบบคือสารแขวนลอยกับแบบผง ทำให้ลูกน้ำตายน้อยลง อาจเนื่องจากการแย่งกินอาหารของ daphnia ทำให้เอนโดท็อกซินในน้ำลดลง (Becker, Zgomba, Ludwig, Petric, and Rettich, 1992)

มีการศึกษาความคงอยู่ของ *Bacillus thuringiensis* var. *serovars* และ var. *jegathesan* ต่อลูกน้ำยุง *A. aegypti* และ *C. pipiens* ในภาคสนามที่ประเทศฝรั่งเศสโดยใช้ผลิตภัณฑ์ในรูปผงแป้ง 3 ชนิด คือ Lyophilized ผลิตภัณฑ์ Bti และ IPS 82 พบว่า แสงแดด ดิน และคุณภาพน้ำ ไม่มีผลแตก

ต่างต่อความคงอยู่ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 อย่างในการทำลายลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิดยกเว้นในน้ำเสียหรือน้ำที่มีอินทรีย์สารปนเปื้อนอยู่มากที่ *Bacillus thuringiensis serovars* จะมีความคงอยู่ต่ำที่สุดทั้งในห้องทดลองและภาคสนาม แต่ *Bacillus thuringiensis jegathesan* ยังมีพิษคงค้างอยู่ใกล้เคียงกับ Bti (Thiery, Fouque, Gaven and Lagneau, www, 1999) ได้มีการทดลองสำรวจความคงอยู่ตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ผงแป้ง Bti และ *B. sphaericus* ในการใช้ควบคุมลูกน้ำยุง พบว่าผลิตภัณฑ์ SPH 88 ที่ผลิตในปี ค.ศ.1988 ที่เก็บไว้ในรูปสารแขวนลอยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 3 ปี เมื่อใช้ทดสอบกับยุง *C. pipiens* แล้วคุณภาพไม่ลดลงแต่หลัง 9 ปีคุณภาพลดลง 2 เท่า โดยมาตรฐานโลกกำหนดให้คุณภาพลดลงได้ไม่เกิน 20% (Thiery and Hamon, www, 1998) ผลของแสงแดดต่อประสิทธิภาพการฆ่าลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* ของ Bti ที่แยกได้จากดินในประเทศไนจีเรียในรูปของผลิตภัณฑ์ Bti 3 ประเภทที่ทดลอง คือ OBG8, OBG1 และ GSC3 พบว่าผลของแสงแดดทำให้ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ประเภทลดลง (Obeta, www, 1996)

มีการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ Bti ชื่อ Larvetab® ต่อลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* ระยะที่ 4 ตอนต้น ในภาชนะ พลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ Bti รูปผงอัดเม็ดละลายน้ำเป็นสารแขวนลอยก่อนนำไปทดสอบทางชีวภาพตามมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกกำหนด และวิเคราะห์ด้วย probit analysis สำหรับการทดสอบความคงอยู่ของ Bti (5 มิลลิกรัม/ลิตร) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ควบคุมปริมาณน้ำให้คงที่ โดยการเติมน้ำให้เท่าระดับเดิม (200 มิลลิลิตร) ทุกครั้งก่อนการทดสอบ ในกลุ่มที่ 2 ปล่อยให้น้ำระเหยไปตามธรรมชาติ และกลุ่มที่ 3 เป็นภาชนะความจุ 200 ลิตร เลียนแบบการใช้น้ำในชีวิตประจำวัน โดยการตักน้ำออก 50 ลิตร (1/4 ของน้ำในภาชนะ) แล้วเติมน้ำเข้าให้เท่าระดับเดิมทุกวัน ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ Bti ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ภายใน 24 ชั่วโมง (LC_{50}) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา เท่ากับ 0.8581, 0.9244 และ 0.8565 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายร้อยละ 95 ภายใน 24 ชั่วโมง (LC_{95}) เท่ากับ 1.5997, 1.5958 และ 1.5355 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลที่ได้ในภาชนะทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกัน ส่วนความคงอยู่ของ Bti ที่ทำให้อัตราการตายของลูกน้ำมากกว่าร้อยละ 90 ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา ของกลุ่มที่ 1 เท่ากับ 21, 18 และ 11 วัน ตามลำดับ ของกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 27, 11 และ 17 วัน ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 9, 4 และ 6 วัน ตามลำดับ ผลดังกล่าวแสดงว่าความคงอยู่ของ Bti (5 มิลลิกรัม/ลิตร) ในภาชนะทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกัน คือ ในภาชนะพลาสติกมีความคงอยู่ของ Bti นานที่สุด จากการทดสอบที่ควบคุมปริมาตรน้ำให้คงที่พบว่า ความคงอยู่ของ Bti ในภาชนะดินเผาสั้นกว่าในภาชนะซีเมนต์ ภาชนะกักเก็บน้ำที่ไม่มีการใช้น้ำ ใส่ Bti ขนาด 1 เม็ด (1 กรัม/น้ำ 200 ลิตร) จะให้ผลฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ใน 24 ชั่วโมง ความคงอยู่ของ Bti ขึ้น

อยู่กับชนิดของภาชนะ ถ้าเป็นภาชนะพลาสติกจะอยู่นานประมาณ 3-4 สัปดาห์ ถ้าเป็นภาชนะดินเผาและภาชนะซีเมนต์ ความคงอยู่ของ Bti จะสั้นกว่า จึงควรใส่ Bti เร็วขึ้น 1 สัปดาห์ แต่ถ้ามีการใช้น้ำประมาณ 1/4 ทุกวัน การใส่ Bti ในครั้งต่อไปจะเร็วขึ้นโดยใส่ประมาณสัปดาห์ละ 1 ครั้งจะทำให้มีการควบคุมจำนวนลูกน้ำยุงอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (นิตยาจาร กิตติเดชา, 2542)

2.2.9 การเพาะเลี้ยง Bti

Bti สามารถเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากๆ โดยนำ Bti ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ใส่ถังหมักโดยอาศัยกระบวนการหมัก (fermentation process) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) ในภาชนะบรรจุอาหารเหลวขนาดใหญ่ที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเติบโตของเชื้อ โดยมีการควบคุมอุณหภูมิ pH และการถ่ายเทอากาศในถังหมักอย่างเหมาะสม Bti จะเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นก็ผ่านกระบวนการแยกเชื้อออกจากอาหารเหลวโดยผลิตภัณฑ์จะออกมาเป็นน้ำเข้มข้นหรือผงละลายน้ำ แล้วจึงแยกส่วนที่ต้องการออกจากน้ำด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ทำให้แห้ง นำตะกอนที่ได้จากการเหวี่ยงมาละลายด้วยอะซิโตนนำมากรองจะได้ Bti ที่แห้งเก็บไว้ได้นาน ค่าความรุนแรงของพิษไม่คงที่ในแต่ละชุดการผลิตจึงต้องวัดความแรง (potency) โดยทำการทดลองทางชีวภาพ (bioassay) โดยใช้ลูกน้ำยุงที่เหมาะสมแล้วคำนวณเป็นค่า ITU (International Toxic Unit)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง Bti มีหลายชนิด เช่น ในประเทศจีนใช้รำข้าวสาลี เศษเมล็ดข้าวโพด บด ถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้ายที่คั้นน้ำออกแล้ว โดยมีเศษถั่วเหลืองบดเป็นองค์ประกอบหลัก (Entwistle, Cory, Bailey and Higgs, 1993) การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จส่วนใหญ่ใช้อาหาร GYS (Glucose-Yeast Extract–Salt) ประกอบด้วย glucose 5 กรัม/ลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 4 กรัม/ลิตร K_2HPO_4 1 กรัม/ลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.82 กรัม/ลิตร, $CaCl_2.2H_2O$ 1.8 กรัม/ลิตร, $MnSO_4.H_2O$ 0.7 กรัม/ลิตร และ H_2O ปรับปริมาตรน้ำให้ได้ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7 ด้วย 4 N KOH และทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Kang, Lee and Chang, 1993) Nickerson and Bulla (1994) เพาะเลี้ยง Bt 12 serotypes โดยใช้อาหาร GYS ประกอบด้วย yeast extract 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, K_2HPO_4 0.05% ปรับ pH เท่ากับ 7.3 เติม glucose 0.1%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02%, $CaCl_2.2H_2O$ 0.005% และ $MnSO_4.H_2O$ 0.005% ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงไปทีหลังในฟลาสก์ และทำการเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่า โดยใช้อัตราเขย่า 200 rpm

Obeta และ Okafor (1984) ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับอาหารเลี้ยง Bti พบว่าใช้สูตรอาหาร cow blood 10 กรัม/ลิตร, $MnCl_24H_2O$ 0.02 กรัม/ลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 กรัม/ลิตร, $CaCO_3$ 1 กรัม/ลิตร

และถั่วชนิดต่างๆ ในฟลาสก์ 500 มิลลิลิตร ใช้อัตราเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่า สูตรอาหารถั่ว Soya beans (glycine soja) 7.5 กรัม/ลิตร ให้จำนวนสปอร์และการเติบโตสูงสุด

สำหรับประเทศกำลังพัฒนาอาจใช้ กากมะพร้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ถั่วเหลือง ได้โดยต้องมีไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ปริมาณของกลูโคสในอาหารจะสัมพันธ์กับปริมาณของผลึกเดลต้าเอนโดทอกซิน และรวมถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น pH อุณหภูมิ อากาศ เป็นต้น ระยะเวลาในการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทำให้มีการสร้างสปอร์เร็วหรือช้า อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วย autuclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15-30 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณและชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ

2.2.10 ความปลอดภัยของ Bti ต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมาย

Bti เป็นแบคทีเรียที่ใช้ควบคุมแมลงวงศ์ Culicidae และ Simuliidae ยกเว้นวงศ์ Dixidae, Chironomidae และ Ceratopogonidae เนื่องจากเชื้อมี specificity ต่อเหยื่อสูง มีความปลอดภัยต่อสัตว์เลือดอุ่น สัตว์น้ำจำพวกปลา สัตว์นอกกลุ่มเป้าหมาย รวมทั้งการทดลองในคนที่เป็นอาสาสมัคร (De Barjac, 1979) สารพิษที่เกิดขึ้นจาก Bti นี้ไม่ส่งผลกระทบกับสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสลายตัวได้ (biodegradable toxin) ซึ่งแตกต่างจากสารเคมีกำจัดแมลงที่สลายตัวช้าหรือบางชนิดก็ไม่สลายตัว

Shadduck (1980) ได้ทำการทดลองความปลอดภัยของ Bti กับหนูโดยให้หนูสัมผัส Bti $1.6x10^9$ เซลล์/หนู 1 ตัว พบว่าไม่มีอาการบวม ผื่นแดง ทดลองโดยการหายใจจำนวน 80 ล้านเซลล์/หนู 1 ตัว พบว่าไม่มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในปอด ที่ความเข้มข้นของเซลล์ $2x10^6$–$7x10^6$ เซลล์/หนู 1 ตัว โดยฉีดเข้าช่องท้องใน 1 สัปดาห์ ไม่พบว่ามีอาการป่วยปรากฏ เมื่อฉีดเข้าสมองจะทำให้หนูตายภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งตาย 1 ใน 6 ตัวหลังฉีด 7 วัน แต่สมองไม่มีรอยช้ำ แต่ตัวที่ไม่ตายจะฟื้นโดยไม่มีอาการป่วย Bti จะพบในม้ามมาก เป็นไปได้ว่าม้ามเป็นอวัยวะกรองแบคทีเรียชนิดนี้ แต่ไม่พบการทำลายเซลล์ม้ามและสมอง จากการศึกษาของ Miura, Takahashi และ Mulligan ในปี ค.ศ.1980 ซึ่งทดสอบผลของ Bti กับสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับใช้ในยุงพบว่า ไม่มีอันตรายต่อด้วงน้ำ ไรน้ำ ตัวอ่อนแมลงปอ กุ้ง หอยนางรม ปลากินลูกน้ำ ยกเว้นหนอนแดง ซึ่งมีผลเพียงเล็กน้อย และ Bti ที่ปริมาณสูงๆ ไม่มีผลต่อลูกน้ำยุงยักษ์ ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติของยุงลาย (เลาจนา เชาวนาดิศัย และ สราญจิต ไกรฤกษ์, 2539)

มีการศึกษาพิษเฉียบพลันของ Bti ในมนุษย์ โดยทดลองในกลุ่มอายุมากกว่า 18 ปีให้ รับประทาน Bti ในรูปผงแป้งผสมกับอาหารขนาด 1,000 มิลลิกรัม วันเว้นวันนาน 5 วัน และอีกกลุ่มรับประทานในขนาด 1000 มิลลิกรัมต่อวันติดต่อกัน 5 วันก็ไม่เกิดพิษหรือติดเชื้อแต่อย่างใด (U.S. Environmental Protection Agency, www, 1986) มีการทดลองในสัตว์โดยให้สัมผัสหลายๆทางใน

ขนาดสูงสุด $6.7x10^{11}$ สปอร์ต่อสัตว์ 1 ตัว พบว่ามีผลน้อยจนถึงไม่มีผลเลย ไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษเฉียบพลันใน นก สุนัข หมู หนู มนุษย์ หรือสัตว์อื่น เมื่อให้หนูและนกกระทาญี่ปุ่นกิน ผลึกโปรตีนของ Bti ไม่พบว่าเป็นพิษ หากฉีดเข้าไปในช่องท้องของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอาจทำให้สัตว์ตายได้แต่ถ้าสัมผัสโดยทางอื่นจะไม่เกิดพิษ (Roe and Motoyama, www, 1991)

ยังมีการศึกษาผลของ Bti ต่อคนโดยอาสาสมัครรับประทาน Bti ในรูปแคปซูล 1 กรัม (10^{10} เซลล์) และโดยการหายใจในรูปของผง 100 มิลลิกรัม ทุกวันจนครบ 5 วัน พบว่าไม่มีผลต่อ สุขภาพร่างกายโดยการตรวจสอบทางร่างกาย ทางห้องปฏิบัติการและทางเอกซเรย์ (Fisher and Rosner, 1959) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ชาวนารายหนึ่งอายุ 18 ปีได้รับอุบัติเหตุจาก *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* กระเด็นเข้าตามีอาการเป็นแผลที่เยื่อบุตา เมื่อแพทย์รักษาด้วยยาปฏิชีวนะประมาณ 10 วัน ก็หายเป็นปกติ (Sample and Bruettner, 1983)

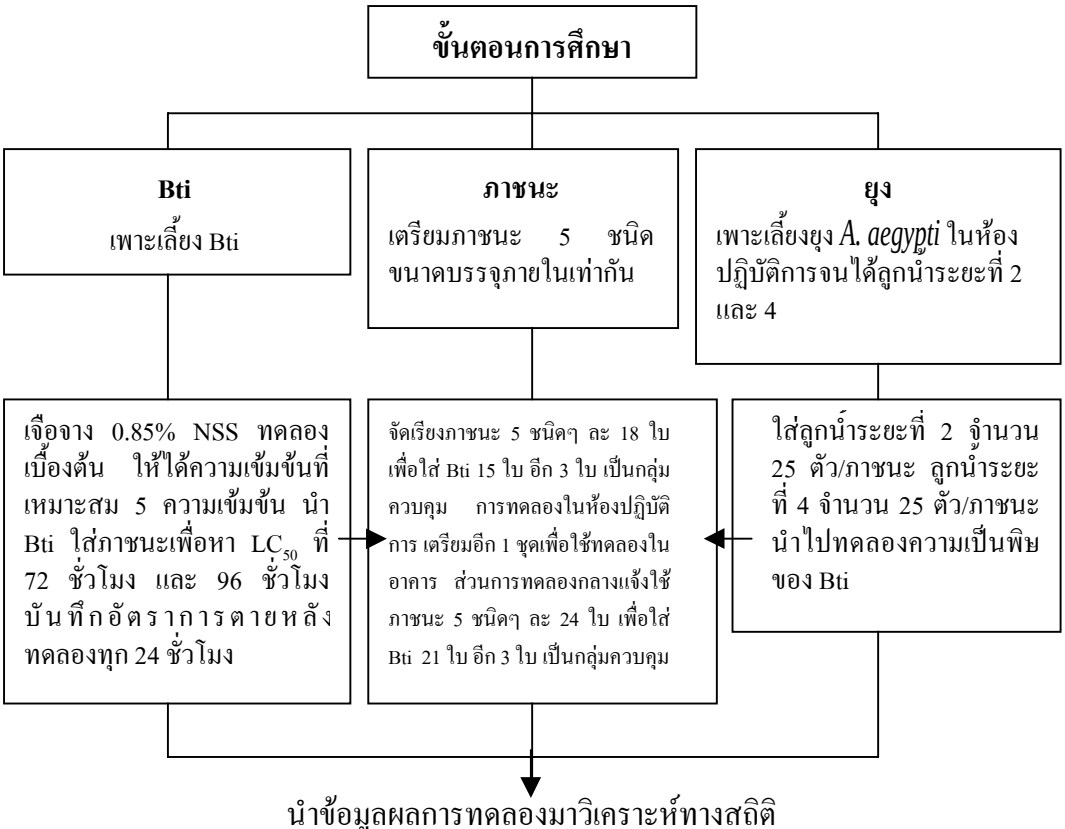
การทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 0.25-2.5 ppm. ในสระ และ 0.5 ppm. ในบ่อ พบว่าลดจำนวนของหนอนแดง (chironomids) และริ้น (midges) ได้ 78-88% และ 27-65% ตามลำดับ ในความเข้มข้นสูงๆ จะไม่เป็นอันตรายต่อโรติเฟอร์ (rotifer) ไรน้ำ (ostracod) มวนกรรเชียง (corixids) มวนวน (notonectids) ด้วงปีกแข็ง (beetle) รวมทั้งสัตว์น้ำอื่นๆ ด้วย (Ali, 1981)

การทดลองในช่วงเวลา 2-15 วัน ของ Bti ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่ามีผลต่อหนอนแดง (chironomids) มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับลูกน้ำยุง แต่ไม่พบว่ามีผลต่อด้วงน้ำกินซาก (water scavenger: *Berosus*) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 5 วัน แมลงปอ (*Cordulia*) 8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 5 วันไรน้ำเค็ม (*Artemiasalina*) 1.6 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 5 วัน ตัวอ่อนริ้น (phantom midge: *Chaborids*) ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 2 วัน ปลากินลูกน้ำยุง (*Gambusia affinis*) ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 15 วัน และหอยนางรม (*Ostrea edulis*) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน นอกจากนั้น Bti ที่ปะปนอยู่ในน้ำปริมาณสูงๆ ยังไม่มีผลกระทบต่อลูกน้ำยุงยักษ์ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติของลูกน้ำยุงอีกด้วย (Sinegre, Gaven, and Jullien, 1979)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental laboratory research) (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2540) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของ Bti ในรูปความเข้มข้นของเซลล์ของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลาย *A.aegypti* ตายร้อยละ 50 ซึ่งความเข้มข้นต่างๆ กันของ Bti ที่ใช้ในการทดลองได้จากการทดลองเบื้องต้น (pretest) โดยประยุกต์จากวิธีทางสถิติเพื่อหาค่า LC_{50} ของ Finney (1964) และ Natrella (1963) แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้นั้นมาทดลองกับลูกน้ำยุงลายที่สมบูรณ์ มีอายุรุ่นเดียวกัน (ได้จากการเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลายที่มีอัตราการตายไม่เกิน 10%) ในภาชนะชนิดต่างๆ โดยใช้น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลการทดลองทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 4 วัน



ภาพที่ 3.1 แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti*

3.2 สถานที่ทำการวิจัย

ภาคสนาม

สถานที่ทำการวิจัยภาคสนามทำในอาคารและนอกอาคาร โดยสถานที่ทำการวิจัยนอกอาคารใช้บริเวณกลางแจ้งที่มีแสงแดดส่องทั่วถึง ไม่ให้ถูกฝน สถานที่ทำการวิจัยในอาคารใช้บริเวณที่ร่มมีหลังคา ไม่มีแสงแดดส่องถึง ไม่ถูกฝน อยู่ในเขตอำเภอสูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา

ห้องปฏิบัติการ

สถานที่ทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการ ใช้ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างแบคทีเรียใช้ Bti ซึ่งได้เชื้อ Bti ในรูปผงแห้งจากสภาวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ลูกน้ำยุงลาย

กลุ่มตัวอย่างลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลอง ใช้เฉพาะลูกน้ำยุงลาย *A.aegypti* ระยะที่ 2 และ 4 ที่ได้จากการนำไข่ยุงจากสำนักงานควบคุมโรคติดต่อนำโดยแมลงเขต 1 สระบุรี นำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นยุงตัวเต็มวัย และเลี้ยงยุงตัวเต็มวัยจนวางไข่และฟักออกมาเป็นลูกน้ำยุงลายที่ใช้ในการทดลองได้

อาหารสัตว์ทดลอง

ใช้อาหารสุนัขบดละเอียดสำหรับลูกน้ำยุง น้ำเชื่อมเข้มข้น 10% สำหรับเป็นอาหารยุงตัวผู้ และหนูสำหรับให้ยุงตัวเมียดูดกินเลือด

ใช้หนู mouse จากอาคารสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นสัตว์ให้เลือดแก่ยุงตัวเมียเต็มวัยเพื่อใช้ในการสร้างไข่

ภาชนะที่ใช้ทดลอง

ภาชนะที่ใช้ ได้แก่ แก้ว พลาสติก ดินเผา ซีเมนต์ และ อลูมิเนียม ที่มีขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เท่ากันทุกใบ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ดังนี้

1. อุปกรณ์ที่ใช้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงยุงได้แก่ ถาดพลาสติก, ถ้วยพลาสติก ดรอปเปอร์ดูดลูกน้ำ, สวิงช้อนลูกน้ำ, กรงเลี้ยงยุง, กระดาษฟาง, สำลี
2. อุปกรณ์ที่ใช้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงและเตรียมเชื้อ Bti ได้แก่ ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร, บีกเกอร์ ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร, กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร, ออโตปิเปต (autopipette) ขนาด 100 - 2,000 ไมโครลิตร, แท่งแก้ว, ตู้อบ (incubator), ตู้เย็น,จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish), hot plate สำหรับต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ, หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave), เครื่องเขย่า (gyrotary shaker), เครื่องปั่นเหวี่ยง bench top centrifuge, เครื่องปั่นเหวี่ยง micro centrifuge, เครื่อง magnetic stirrer, กล้องจุลทรรศน์ phase contrast microscope, กล้องจุลทรรศน์ compound microscope, กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope
3. อุปกรณ์ที่ใช้วัดปัจจัยทางกายภาพได้แก่ เครื่องวัดความเข้มแสง (lux meter), เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (DO meter), เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH meter), เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (hygrometer)
4. ภาชนะที่ใช้ทดลองได้แก่ ภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม ความจุ 250 มิลลิลิตร

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4.1 การเตรียม Bti

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร Nutrient broth (NB)

1. ใช้สูตรอาหาร NB ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. เตรียมอาหาร NB โดยชั่งส่วนประกอบต่างๆ ที่คำนวณได้ตามสูตร
3. ละลายส่วนประกอบต่างๆในน้ำกลั่นคนด้วยแท่งแก้วให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย โดยใช้ความร้อนช่วยปรับปริมาณให้ครบตามสูตร
4. วัดความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัด pH เมื่ออาหารเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl จนได้ค่า pH ประมาณ 7.0
5. บรรจุลง flask ในปริมาณ flask ละ 100 มิลลิลิตร

6. บรรจุลงหม้อนึ่งความดันไอ เพื่อฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA)

1. เตรียมอาหาร NA โดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับสูตรอาหาร NB
2. ปรับค่า pH ให้ได้ 7.0 ทำการเติมวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต้มจนวุ้นละลายหมด
3. บรรจุในหลอดทดลอง หลอดละ 7 มิลลิลิตร
4. บรรจุลงหม้อนึ่งความดันไอ เพื่อฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวางเป็นอาหารผิวเอียง (slant agar) ก่อนวุ้นแข็งตัว

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง Bti

1. ทำการเพาะเลี้ยง Bti บนอาหาร NA โดยใช้ loop แตะเชื้อ Bti แล้วขีดลากบนผิวหน้าอาหารเอียงเป็นรูปซิกแซ็ก โดยเริ่มจากส่วนล่างของอาหาร
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำเชื้อ Bti ในหลอดทดลองที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง เขี่ยใส่ใน flask อาหาร NB ที่ปลอดเชื้อ โดยใส่ Bti 1 หลอดทดลองต่อ 1 flask (สุรีลักษณ์ รอดทอง, หนึ่ง เตียอำรุง, ทัศนีย์ สุโกศล, สิทธิโชค แสงโสดา และ เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์, 2542; นิภา เบญจพงศ์, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา และ เพ็ญสุข เต่าทอง, 2528)
4. นำ Bti ใน flask อาหาร NB เขย่าโดยใช้เครื่อง gyrotary shaker ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-36 ชั่วโมง จนได้เชื้อที่เจริญเติบโตเต็มที่ (final whole culture) นำเชื้อ Bti ในอาหาร NB ที่เจริญเต็มที่ไปปั่นเพื่อแยกเอาเซลล์ Bti ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง bench top centrifuge โดยใช้ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้งเพื่อปั่นล้างเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกจาก Bti จากนั้นนำ Bti ที่ตกตะกอนมาละลายใน 0.85% NSS และทำให้เซลล์ Bti กระจายตัวใน 0.85% NSS สม่ำเสมอด้วยเครื่อง magnetic stirrer นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็ว 12,000 rpm นาน 4 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. แยกเซลล์ Bti ที่ตกตะกอนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทของเหลวด้านบนทิ้ง นำ Bti ที่ตกตะกอนมาเจือจางด้วย 0.85% NSS ทำการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งใช้วิธีการเดียวกับการนับเซลล์เม็ดเลือด จนได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการโดยใช้ หลอดหยด Bti ที่ละลาย

ใน 0.85% NSS ลงบน slide hematocytometer ทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x10 เท่า นับในตาราง 25 ช่องของ slide hematocytometer หาค่าเฉลี่ยใน 1 ช่อง ซึ่งใน 1 ช่องใหญ่จะมี 16 ช่องเล็ก พื้นที่ตาราง 1 ช่องเล็กมีขนาด 0.0025x0.0025 ตารางมิลลิเมตร ความลึก 0.01 มิลลิเมตร นำค่าเฉลี่ยจำนวนที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่มาแทนค่า จำนวนที่นับได้ในสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น (cells/ml)} = \left[\frac{\text{จำนวนที่นับได้}}{16}\right] \times \left[\frac{1}{\frac{1}{20} \times \frac{1}{20} \times 0.1}\right] \times \text{dilution} \times 10^3$$

โดย จำนวนที่นับได้ = ค่าเฉลี่ยจำนวนที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่

dilution = เจือจางกี่เท่า

การเตรียม Bti ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. นำเซลล์ Bti ที่ได้มานับจำนวนเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต้องการจำนวน 5 ความเข้มข้นเพื่อทำการทดลองเบื้องต้น (pretest) โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ $1x10^8$ cells/ml ซึ่งใช้วิธีการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า เช่นเตรียมน้ำที่จะใช้ทดลองใส่ภาชนะไว้ 90 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย Bti จากที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงสุดที่จะใช้ทดลอง ($1x10^8$ cells/ml) มา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในน้ำที่เตรียมไว้จะได้สารละลาย Bti ที่ความเข้มข้น $1x10^7$ cells/ml และในความเข้มข้นต่อไปที่ลดลง 10 เท่า ($1x10^7$ cells/ml) ก็ใช้วิธีการเดียวกันเจือจางไปเรื่อย ๆ จนได้ 5 ความเข้มข้นที่ต้องการคือ $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ และ $1x10^8$ cells/ml

2. ทำการทดลองเบื้องต้น ในบีกเกอร์ปริมาตร 250 ลูกบาศก์เซนติเมตรจำนวน 6 ใบ ใส่น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ปริมาณ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ Bti ภาชนะละ 1 ความเข้มข้น โดยไม่ต้องใส่ Bti 1 บีกเกอร์เพื่อเป็นภาชนะควบคุม ใส่ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 จำนวน 25 ตัวต่อ 1 บีกเกอร์ สำหรับลูกน้ำระยะที่ 4 ก็ทำเช่นเดียวกันกับลูกน้ำระยะที่ 2 ทั้ง 2 ระยะทำ 3 ซ้ำภายในห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และนอกห้องปฏิบัติการ

3. ทำการบันทึกจำนวนลูกน้ำที่ตาย ตักลูกน้ำที่ตายออกทุก 24 ชั่วโมง และวัดปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ ค่า DO ค่า pH และค่าความชื้นสัมพัทธ์ จนกระทั่งครบ 96 ชั่วโมง

4. จากการทดลองเบื้องต้นที่ในห้องปฏิบัติการได้ค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำระยะที่ 2 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ในเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ $9.01x10^7$ cells/ml และ LC_{50} ในเวลา

72 ชั่วโมงของลูกน้ำระยะที่ 4 เท่ากับ $1.6x10^8$ cells/ml และ จากการทดลองเบื้องต้นที่นอกอาคาร ได้ค่า LC_{50} ในเวลา 72 ชั่วโมงของลูกน้ำระยะที่ 2 เท่ากับ $1.93x10^8$ cells/ml และได้ค่า LC_{50} ในเวลา 72 ชั่วโมงของลูกน้ำระยะที่ 4 เท่ากับ $2.42x10^8$ cells/ml โดยประยุกต์จากวิธีของ Finney (1964) และ Natrella (1963)

5. นำค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่ได้มาหาปริมาณสารละลาย Bti ใน 0.85% NSS ของแต่ละค่าความเข้มข้นที่ต้องการใช้ทดลองเพื่อจะได้ทราบปริมาณสารละลาย Bti ที่ต้องการใช้ทั้งหมด โดยใช้วิธีคำนวณตามสูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

โดย C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้น

V_1 คือ ปริมาณเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นที่ต้องการ

V_2 คือ ปริมาณที่ต้องการ

6. นำเซลล์ Bti ที่ได้มานับจำนวนเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต้องการจำนวน 7 ความเข้มข้นเพื่อทำการทดลอง โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ $2x10^9$ cells/ml ซึ่งใช้วิธีการเจือจางลงครั้งละ 5 เท่า เช่นเตรียมน้ำที่จะใช้ทดลองใส่ภาชนะไว้ 95 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย Bti จากที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงสุดที่จะใช้ทดลอง ($2x10^9$ cells/ml) มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในน้ำที่เตรียมไว้จะได้สารละลาย Bti จะได้สารละลาย Bti ที่ความเข้มข้น $7x10^8$ cells/ml และในความเข้มข้นต่อไปที่ลดลง 5 เท่า ($2x10^8$ cells/ml) ก็ใช้วิธีการเดียวกันเจือจางไปเรื่อย ๆ จนได้ 7 ความเข้มข้นที่ต้องการคือ $2x10^6$, $7x10^6$, $2x10^7$, $7x10^7$, $2 x10^8$, $7x10^8$ และ $2x0^9$ cells/ml ซึ่งการทดลองในอาคารและในห้องปฏิบัติการทำการทดลองโดยใช้สารละลาย Bti ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ $2x10^6$, $7x10^6$, $2x10^7$, $7x10^7$ และ $2x10^8$ cells/ml และการทดลองนอกอาคารทำการทดลองใช้ สารละลาย Bti ความเข้มข้น 7 ระดับ คือ $2x10^6$, $7x10^6$, $2x10^7$, $7x10^7$, $2x10^8$, $7x10^8$ และ $2x10^9$ cells/ml โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่นำมาทดลองได้จากการทำการทดลองเบื้องต้น

3.4.2 การเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย

ทำการเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ในห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยประยุกต์จากวิธีของ Nathawut Thanee (1980) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำไข่ยุงลายซึ่งมีลักษณะเป็นปล้องเดียวเรียงชิดติดกันอยู่ในถ้วยดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร มีอายุ 3 วัน หรือมากกว่า ใส่ลงในถาดพลาสติกสี่เหลี่ยมที่ใช้

สำหรับเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง ใส่น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ในภาชนะปากกว้างและต้องให้น้ำท่วมถ้วยดินเผาที่มีไข่ยุงลาย หากแช่น้ำแล้วไข่ยังไม่ฟักไข่อาจอยู่ในสภาพ depressed hatching ต้องนำถ้วยดินเผาที่มีไข่ยุงลายขึ้นมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม 2-3 วัน แล้วจึงนำไปแช่น้ำอีกครั้ง หากใช้น้ำต้มสุกที่มีออกซิเจนน้อยหรือเติม ascorbics acid ในน้ำที่แช่ไข่ยุงลายปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร จะทำให้ไข่ฟักตัวเร็วขึ้น ระยะเวลาในการฟักตัวจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่อยู่ในสภาพแห้งด้วย หากอยู่ในสภาพแห้งนาน (อายุไข่มาก) ไข่จะฟักตัวเร็วกว่าไข่ที่อยู่ในสภาพแห้งน้อย (อายุไข่น้อย) แต่จะมีอัตราการฟักตัวน้อยกว่า

2. นำไข่ยุงลายมาแช่น้ำจนฟักเป็นลูกน้ำแล้วนำหลอดดูดย้ายมาเลี้ยงในถาดขนาด 25x40x6 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 3,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เลี้ยงลูกน้ำประมาณถาดละ 200-300 ตัว เพื่อควบคุมความหนาแน่นภายในถาดเลี้ยง หากมีความหนาแน่นมากเกินไปอาจทำให้ลูกน้ำตายได้ ให้อาหารสุนัขบดละเอียดปริมาณ 0.5 กรัมต่อถาด (1/3 ช้อนชา) เป็นอาหารเพาะเลี้ยง ในระหว่างนี้จะไม่เปลี่ยนน้ำเพราะการเปลี่ยนน้ำจะเป็นการรบกวนลูกน้ำทำให้ลูกน้ำตายได้

3. เมื่อลูกน้ำผ่านการเปลี่ยนแปลง 4 ระยะจนกระทั่งเป็นตัวโม่ง ใช้เวลา 4-7 วัน เพื่อรอให้ได้ลูกน้ำจำนวนมาก ทำการคัดเลือกลูกน้ำที่สมบูรณ์แข็งแรงและอายุรุ่นเดียวกันขนาดใกล้เคียงกันมาทดลอง ทำการย้ายตัวโม่งใส่ภาชนะไปไว้ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30x30x70 ลูกบาศก์นิ้ว ใช้เวลา 2-3 วันลูกน้ำจะโตเป็นตัวเต็มวัย

4. ใช้สำลีชุบน้ำเชื่อมเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ถ้วยเล็กๆ ตั้งทิ้งไว้ในกรงเพื่อเป็นอาหารของยุงตัวผู้ และใช้หนู mouse เป็นตัวให้เลือดแก่ยุงตัวเมียโดยนำหนูมาตัดขน (shape) และจับหนูใส่ไว้ในกรงตาข่ายลวดขนาดพอดีตัวเพื่อไม่ให้หนูเคลื่อนที่ นำไปวางใส่ไว้ในกรงเลี้ยงยุงในเวลากลางวันประมาณ 1-2 ชั่วโมงเพื่อให้ยุงตัวเมียเต็มวัยกินเลือด จนอายุ 3-4 วันยุงตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์และวางไข่

5. การเก็บไข่ทำได้โดยนำกระป๋องพลาสติกทึบขนาดปริมาตรประมาณ 0.5 ลิตร ใส่น้ำประมาณ 0.25 ลิตร ใช้กระดาษฟางติดด้านในภาชนะให้กระดาษแช่น้ำและมีส่วนที่โผล่พ้นน้ำประมาณ 2-3 เซนติเมตร เพื่อเป็นที่ให้ยุงวางไข่ ยุงลายจะวางไข่ข้างผนังด้านในของภาชนะเหนือระดับน้ำประมาณ 1-2 เซนติเมตร เมื่อได้ไข่ตามปริมาณที่ต้องการนำกระดาษฟางไปผึ่งให้แห้งในที่ร่มที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 3 วัน จะได้ไข่ที่พร้อมจะฟักเป็นลูกน้ำต่อไป ยุงลายตัวเมีย 1 ตัวจะให้ไข่ครั้งละ 50-100 ฟอง สามารถให้ไข่ได้ 3-5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7-8 วัน หากยุงกินเลือดไม่เพียงพอจะทำให้ไข่ไม่สุกและออกไข่ได้ไม่หมดจึงต้องนำหนูเข้ากรงเพื่อให้เลือดอีกครั้ง

6. ไข่ที่วางใหม่จะมีสีขาวและจะค่อยๆ เข้มขึ้นจนกลายเป็นสีดำ เมื่อตัวอ่อนภายในไข่เจริญเต็มที่พร้อมที่จะฟักทำการฟักโดยนำกระดาษที่มีไข่ไปแช่น้ำให้ท่วมประมาณ 2-3 วันจะได้ลูกน้ำระยะที่ 2 ตัวยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร และประมาณ 4-5 วันจะได้ลูกน้ำระยะที่ 4 ตัวยาวประมาณ 4-4.5 เซนติเมตร ทำการคัดเลือกลูกน้ำที่มีอายุรุ่นเดียวกันไปทำการทดลอง ส่วนลูกน้ำที่เหลือจากการทดลอง ทำการเลี้ยงให้เจริญเป็นตัวโม่งและตัวเต็มวัยเพื่อผลิตไข่รุ่นต่อไป ไข่ที่เหลือสามารถเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2526; Nathawut Thanee, 1980)

3.4.3 การเตรียมภาชนะชนิดต่างๆ

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิด ชนิดละ 60 ใบ ทุกใบมีปริมาตร 250 มิลลิลิตรหรือใกล้เคียงกัน รูปทรงกระบอกหรือใกล้เคียงทรงกระบอก รายละเอียดของภาชนะแต่ละชนิดมีดังนี้

1. ภาชนะแก้วใช้แก้วใสเนื้อเรียบ ปริมาตร 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. ภาชะพลาสติก ใช้แก้วพลาสติกสีขาวขุ่นชนิดพีอี (โพลีเอธิลีน) รูปทรงใกล้เคียงทรงกระบอก ปริมาตร 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซื้อจากตลาดในจังหวัดนครราชสีมา
3. ภาชนะอลูมิเนียมใช้แก้วอลูมิเนียมทรงกระบอกปริมาตร 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซื้อจากตลาดในจังหวัดนครราชสีมา
4. ภาชนะดินเผา ใช้ภาชนะดินเผาขึ้นรูป ไม่เคลือบซื้อจากบ้านด่านเกวียนจังหวัดนครราชสีมา นำมาแช่น้ำ 1 สัปดาห์ เพื่อไม่ให้น้ำที่ใช้ทดลองซึมออก
5. ภาชนะซีเมนต์ ได้จากการนำปูนซีเมนต์ผสมมาผสมน้ำ ทราย และน้ำยากันซึม ขนาด 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 กิโลกรัม นำมาเทใส่แม่พิมพ์จนแห้ง แกะออกมาขัดถูให้เรียบเพื่อไม่ให้ปูนแตกร้าว

3.4.3 การทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย

1. ทำความสะอาดภาชนะด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำประปา ใส่น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง โดยให้ปริมาตรของน้ำรวมกับปริมาตรของผลึกโปรตีนของ Bti ใน normal saline solution รวมกันได้ 200 มิลลิลิตร ยกเว้นภาชนะควบคุมไม่ใส่ Bti ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate)

2. จัดวางภาชนะทั้งหมดเป็นแบบสุ่ม (random) ตามหลักทางสถิติ (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2540) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามระยะของลูกน้ำที่ใช้ทดลองคือ ลูกน้ำระยะที่ 2 และลูกน้ำ

ระยะที่ 4 โดยทำ 3 ซ้ำในสิ่งแวดล้อม 3 ลักษณะ คือ ในอาคาร นอกอาคารและในห้องปฏิบัติการ โดยมีการจัดเตรียมภาชนะ เป็น 6 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 คือชุดควบคุมในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม สำหรับลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ภาชนะละ 3 ใบ และ ภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียมสำหรับลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ภาชนะละ 3 ใบ

ชุดที่ 2 คือชุดทดลองในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และ อลูมิเนียม สำหรับลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ภาชนะละ 15 ใบใช้สำหรับความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น และภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม สำหรับลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ภาชนะละ 15 ใบใช้สำหรับความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น

ชุดที่ 3 คือ ชุดควบคุมภาคสนามนอกอาคาร (กลางแจ้ง) จัดเตรียมเช่นเดียวกับชุดควบคุมในห้องปฏิบัติการ

ชุดที่ 4 ชุดทดลองภาคสนามนอกอาคาร (กลางแจ้ง) ตามลำดับ ประกอบด้วยภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม สำหรับลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ภาชนะละ 21 ใบใช้สำหรับความเข้มข้นต่างๆ กัน 7 ความเข้มข้น และภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม สำหรับลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ภาชนะละ 21 ใบใช้สำหรับความเข้มข้นต่างๆ กัน 7 ความเข้มข้น

ชุดที่ 5 และ 6 คือ ชุดควบคุมและชุดทดลองภาคสนามในอาคาร ตามลำดับซึ่งชุดที่ 3, 4, 5 และ 6 จัดเตรียมเช่นเดียวกับชุดควบคุมและชุดทดลองในห้องปฏิบัติการ

3. คัดเลือกลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่สมบูรณ์แข็งแรง มีขนาดใกล้เคียงกัน มีอายุรุ่นใกล้เคียงกันและมีอัตราตายระหว่างเลี้ยงไม่เกิน 10% นำมาล้างน้ำโดยเทใส่ภาชนะพลาสติกแช่ล้างในน้ำสะอาดแล้วใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ภาชนะละ 25 ตัว ใส่ Bti ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันที่เตรียมไว้ สำหรับลูกน้ำระยะที่ 4 ทำเช่นเดียวกัน

4. ทำการวัดปัจจัยทางกายภาพในภาชนะที่ใช้ทดลองทั้ง 5 ชนิด ทุกภาชนะ ได้แก่ ค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) อุณหภูมิของน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH) และวัดปัจจัยทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมงเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายของลูกน้ำกับสิ่งแวดล้อม

5. ทำการนับจำนวนการตายของลูกน้ำในแต่ละภาชนะหลังการทดลอง สังเกตและบันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง โดยนับลูกน้ำตัวเป็นที่เหลือและตักลูกน้ำที่ตายออกเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเน่าเสีย จนครบ 96 ชั่วโมง

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

หาค่าเฉลี่ย

หาค่าเฉลี่ย (mean) ของจำนวนลูกน้ำที่ตายโดย Bti ถ้ากรณีที่ลูกน้ำในชุดควบคุมตาย จะต้องแก้ไขให้เป็นการตายที่ถูกต้องโดยใช้ Abbott′s Formula ตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง} = \frac{\text{จำนวนที่ตายจากการทดลอง - จำนวนที่ตายจากชุดควบคุม}}{\text{จำนวนที่ตายจากการทดลอง}} \times 100$$

หาค่า LC_{50} ภายใน 72 ชั่วโมง และ ค่า LC_{50} ภายใน 96 ชั่วโมง

ใช้โปรแกรม SPSS for windows version 10.0.7 (“STAT 2002 SPSS 10.0.7 for windows”, Computer program 2002) หาค่า LC_{50} โดยใช้วิธี probit analysis หาค่า สมการและกราฟเส้นตรงถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression line) สำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตราตายของลูกน้ำยุงลาย

หาค่าความแปรปรวน

ใช้โปรแกรม SPSS for windows version 10.0.7 (“STAT 2002 SPSS 10.0.7 for windows”, Computer program 2002) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยสถิติวิธี Oneway ANOVA เพื่อหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงในภาชนะที่ต่างกัน 5 ชนิดและหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงกับปัจจัยทางกายภาพในสิ่งแวดล้อมต่างชนิด 3 แห่ง คือ ในอาคาร นอกอาคาร และในห้องปฏิบัติการ

หาค่าความสัมพันธ์

ใช้สถิติวิธี Pearson correlation (“STAT 2002 SPSS 10.0.7 for windows”, Computer program 2002) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ค่า DO ค่า pH อุณหภูมิน้ำ กับอัตราการตายของลูกน้ำ

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย

ศึกษาความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และ อลูมิเนียม ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมด (LC_{50}) ภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมงในอาคาร นอกอาคาร (กลางแจ้ง) และในห้องปฏิบัติการ ในสภาพจำลองปล่อยให้น้ำระเหยไปตามธรรมชาติ

ได้ทำการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ในห้องปฏิบัติการ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของจำนวนลูกน้ำที่ตายจากการทดลอง นำผลรวมของจำนวนลูกน้ำที่ตายมาคำนวณหาอัตราการตายของลูกน้ำคิดเป็นร้อยละในแต่ละช่วงเวลา และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี probit analysis โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows versions 10.0.7 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย โดยใช้เส้นตรงถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression line) จะได้สมการเส้นตรงและกราฟเส้นตรงซึ่งจะนำไปคำนวณหาค่า LC_{50} ได้ต่อไป

ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ ระยะที่ 4 ในภาชนะ 5 ชนิด ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน 3 อย่าง แสดงผลดังตารางที่ 4.1- 4.5

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะแก้ว

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	จำนวนลูกน้ำที่ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายจากการทดลอง											
		ในอาคาร				นอกอาคาร				ในห้องปฏิบัติการ			
		ลูกน้ำ ระยะที่ 2		ลูกน้ำ ระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4	
		72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
กลุ่มควบคุม	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$7x10^6$	25	0	0	1.33	1.32	0	0	0	0	0	0	0	0
$2x10^7$	25	18.67	21.33	8.00	13.32	4.00	4.00	2.67	2.67	17.33	28.00	0	0
$7x10^7$	25	42.67	54.67	33.33	44.00	9.33	12.00	2.67	2.67	30.66	41.33	18.66	22.66
$2x10^8$	25	54.67	69.33	57.33	80.00	20.00	21.32	17.33	17.33	54.68	68.00	46.66	57.33
$7x10^8$	25	69.33	81.33	81.33	88.00	22.67	25.32	22.68	22.67	77.33	89.33	72.00	86.66
$2x10^9$	25	*	*	*	*	57.33	66.68	58.68	69.33	*	*	*	*
$7x10^9$	25	*	*	*	*	92.00	96.00	82.67	100	*	*	*	*

หมายเหตุ ทดลองในสิ่งแวดล้อมนอกอาคารเพิ่มความเข้มข้นของ Bti อีก 2 ระดับ คือ $2x10^9$ cells/ml และ $7x10^9$ cells/ml

* คือ ไม่ทำการทดลอง

ตารางที่ 4.2 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะพลาสติก

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	จำนวนลูกน้ำที่ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายจากการทดลอง											
		ในอาคาร				นอกอาคาร				ในห้องปฏิบัติการ			
		ลูกน้ำ ระยะที่ 2		ลูกน้ำ ระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4	
		72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
กลุ่มควบคุม	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$7x10^6$	25	2.66	2.66	0	0	0	0	0	0	1.33	1.33	1.33	1.33
$2x10^7$	25	2.66	6.66	4.00	4.00	1.33	1.33	1.33	1.33	4.00	6.66	1.33	2.66
$7x10^7$	25	25.33	29.33	9.33	10.66	2.66	2.66	1.33	1.33	24.00	28.00	14.66	17.33
$2x10^8$	25	54.66	65.33	37.33	54.66	17.33	18.66	14.66	16.00	50.66	61.33	42.66	50.66
$7x10^8$	25	70.66	82.66	64.00	86.66	34.66	36.00	22.66	22.66	76.00	89.33	76.00	85.33
$2x10^9$	25	*	*	*	*	66.68	76.00	78.66	89.33	*	*	*	*
$7x10^9$	25	*	*	*	*	84.00	97.33	96.00	100.00	*	*	*	*

หมายเหตุ ทดลองในสิ่งแวดล้อมนอกอาคารเพิ่มความเข้มข้นของ Bti อีก 2 ระดับ คือ $2x10^9$ cells/ml และ $7x10^9$ cells/ml

* คือ ไม่ทำการทดลอง

ตารางที่ 4.3 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะซีเมนต์

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	จำนวนลูกน้ำที่ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายจากการทดลอง											
		ในอาคาร				นอกอาคาร				ในห้องปฏิบัติการ			
		ลูกน้ำ ระยะที่ 2		ลูกน้ำ ระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4	
		72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
กลุ่มควบคุม	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$7x10^6$	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.33	0	0
$2x10^7$	25	16.00	20.00	0	0	1.33	1.33	1.33	1.33	6.66	9.33	0	0
$7x10^7$	25	21.33	32.00	17.33	21.33	10.668	12.00	4.00	4.00	20.00	25.33	25.33	26.66
$2x10^8$	25	50.66	61.32	41.33	52.00	28.00	30.66	17.33	18.66	50.66	52.00	58.66	62.66
$7x10^8$	25	85.33	89.33	84.00	85.33	45.33	45.33	32.00	32.00	84.00	88.00	78.66	84.00
$2x10^9$	25	*	*	*	*	57.33	66.66	65.33	74.66	*	*	*	*
$7x10^9$	25	*	*	*	*	88.00	100.00	97.33	98.66	*	*	*	*

หมายเหตุ ทดลองในสิ่งแวดล้อมนอกอาคารเพิ่มความเข้มข้นของ Bti อีก 2 ระดับ คือ $2x10^9$ cells/ml และ $7x10^9$ cells/ml

* คือ ไม่ทำการทดลอง

ตารางที่ 4.4 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะดินเผา

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	จำนวนลูกน้ำที่ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายจากการทดลอง											
		ในอาคาร				นอกอาคาร				ในห้องปฏิบัติการ			
		ลูกน้ำ ระยะที่ 2		ลูกน้ำ ระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4	
		72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
กลุ่มควบคุม	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$7x10^6$	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$2x10^7$	25	9.33	10.66	0	0	1.33	1.33	2.66	2.66	4.00	5.33	1.33	1.33
$7x10^7$	25	21.33	22.66	17.33	18.66	13.33	14.66	5.33	5.33	16.00	21.33	16.00	16.00
$2x10^8$	25	48.00	50.66	37.33	41.33	30.66	33.33	16.00	17.33	48.00	58.66	49.33	61.33
$7x10^8$	25	85.33	88.00	78.66	84.00	50.68	53.33	30.66	30.66	80.00	85.33	80.00	84.00
$2x10^9$	25	*	*	*	*	58.66	68.00	66.66	76.00	*	*	*	*
$7x10^9$	25	*	*	*	*	90.66	100	89.33	98.66	*	*	*	*

หมายเหตุ ทดลองในสิ่งแวดล้อมนอกอาคารเพิ่มความเข้มข้นของ Bti อีก 2 ระดับ คือ $2x10^9$ cells/ml และ $7x10^9$ cells/ml

* คือ ไม่ทำการทดลอง

ตารางที่ 4.5 ผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะอลูมิเนียม

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	จำนวนลูกน้ำที่ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ลูกน้ำที่ตายจากการทดลอง											
		ในอาคาร				นอกอาคาร				ในห้องปฏิบัติการ			
		ลูกน้ำ ระยะที่ 2		ลูกน้ำ ระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4		ลูกน้ำระยะที่ 2		ลูกน้ำระยะที่ 4	
		72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
กลุ่มควบคุม	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$7x10^6$	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$2x10^7$	25	2.66	5.33	1.33	2.66	0	0	0	0	5.33	9.33	4.00	4.00
$7x10^7$	25	16.00	22.66	9.33	12.00	5.33	8.00	5.33	5.33	20.00	28.00	16.00	21.33
$2x10^8$	25	64.00	78.66	45.33	56.00	18.66	18.66	16	17.33	72.00	85.33	50.66	60.00
$7x10^8$	25	81.33	92.00	82.66	82.66	29.33	30.66	21.33	24.00	76.00	92.00	74.66	85.33
$2x10^9$	25	*	*	*	*	62.66	73.33	62.66	72.00	*	*	*	*
$7x10^9$	25	*	*	*	*	96.00	100.00	92.00	100.00	*	*	*	*

<u>หมายเหตุ</u> ทดลองในสิ่งแวดล้อมนอกอาคารเพิ่มความเข้มข้นของ Bti อีก 2 ระดับ คือ $2x10^9$ cells/ml และ $7x10^9$ cells/ml

* คือ ไม่ทำการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้น Bti สูงขึ้นอัตราการตายของลูกน้ำจะเพิ่มขึ้น และเนื่องจากผลการทดลองในภาชนะทุกชนิดก็ให้ผลเช่นเดียวกัน และพบว่าทุกชนิดภาชนะมีอัตราการตายของลูกน้ำใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้นเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ผลการทดลองจากตารางที่ 4.1 ซึ่งเป็นการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 ในภาชนะแก้วที่สิ่งแวดล้อมในอาคาร ดังนี้

- ที่ความเข้มข้น $7x10^6$ cells/ml ลูกน้ำไม่ตาย
- ที่ความเข้มข้น $2x10^7$ cells/ml ลูกน้ำตาย 18.67% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 21.33% ในเวลา 96 ชั่วโมง
- ที่ความเข้มข้น $7x10^7$ cells/ml ลูกน้ำตาย 42.67% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 54.67% ในเวลา 96 ชั่วโมง
- ที่ความเข้มข้น $2x10^8$ cells/ml ลูกน้ำตาย 54.67% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 69.33% ในเวลา 96 ชั่วโมง
- ที่ความเข้มข้น $7x10^8$ cells/ml ลูกน้ำตาย 69.33% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 81.33% ในเวลา 96 ชั่วโมง

ตัวอย่างผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 4 ในภาชนะแก้วที่สิ่งแวดล้อมในอาคาร พบว่า

- ที่ความเข้มข้น $7x10^6$ cells/ml ลูกน้ำไม่ตาย
- ที่ความเข้มข้น $2x10^7$ cells/ml ลูกน้ำตาย 8% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 13.32% ในเวลา 96 ชั่วโมง
- ที่ความเข้มข้น $7x10^7$ cells/ml ลูกน้ำตาย 33.33% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 44% ในเวลา 96 ชั่วโมง
- ที่ความเข้มข้น $2x10^8$ cells/ml ลูกน้ำตาย 57.33% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 80% ในเวลา 96 ชั่วโมง
- ที่ความเข้มข้น $7x10^8$ cells/ml ลูกน้ำตาย 81.33% ในเวลา 72 ชั่วโมง และตาย 88% ในเวลา 96 ชั่วโมง

จะเห็นว่าอัตราการตายของลูกน้ำระยะที่ 4 จะตายน้อยกว่าลูกน้ำระยะที่ 2 ในความเข้มข้นและระยะเวลาที่เท่ากัน ผลการทดลองในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียมก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ผลการทดลองที่สิ่งแวดล้อมนอกอาคารกลางแจ้งในความเข้มข้นของ Bti เท่ากันกับในอาคารและในห้องปฏิบัติการอัตราตายลูกน้ำจะน้อยกว่า และพบว่าถ้าที่อุณหภูมิน้ำสูงขึ้นอัตราตายลูกน้ำจะลดลง ส่วนในห้องปฏิบัติการให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับในอาคาร

จากนั้นนำค่าที่ได้ในตารางที่ 4.1–4.5 ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี probit analysis โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows versions 10.0.7 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายโดยใช้เส้นตรงถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression line) จะได้สมการเส้นตรงถดถอยเชิงเส้นอย่างง่ายของความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายลูกน้ำยุงลายซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.6–4.7 และแสดงผลเป็นกราฟเส้นตรงในภาพที่ 4.1-4.3

ตารางที่ 4.6 แสดงสมการเส้นตรงของความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในภาชนะ 5 ชนิด ในสิ่งแวดล้อม 3 อย่าง

ภาชนะ	สมการเส้นตรง					
	ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง			ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 96 ชั่วโมง		
	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ
แก้ว	Y = -12.20 +1.39 X	Y = -12.29 +1.50 X	Y = -10.66 + 1.29 X	Y = -10.68 + 1.34 X	Y = -13.32 + 1.67 X	Y = -9.52 + 1.29 X
พลาสติก	Y = -11.96 + 1.39 X	Y = -13.09 + 1.52 X	Y = -12.70 +1.52 X	Y = -12.77 + 1.56 X	Y = -17.29 + 2.08 X	Y= -14.62 +1.77 X
ซีเมนต์	Y = -12.25 + 1.48 X	Y = -17.65 +2.10 X	Y = -14.34 + 1.73 X	Y = -12.27 + 1.51 X	Y = -17.30 +2.08 X	Y = -13.35 + 1.62 X
ดินเผา	Y = -13.63 + 1.64 X	Y = -17.35 +2.07 X	Y = -14.91 +1.78 X	Y = -13.76 + 1.67 X	Y = -16.37 +1.94 X	Y = -15.16 + 1.84 X
อลูมิเนียม	Y = -16.05+1.94 X	Y = -18.23 +2.17X	Y = -13.89 +1.68 X	Y = -17.87 + 2.21X	Y = -16.81+ 2.02X	Y = -16.71 + 2.08X

ตารางที่ 4.7 แสดงสมการเส้นตรงของความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในภาชนะ 5 ชนิด ในสิ่งแวดล้อม 3 อย่าง

ภาชนะ	สมการเส้นตรง					
	ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง			ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 96 ชั่วโมง		
	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ
แก้ว	Y = -10.68 +1.34 X	Y = -11.43 +1.27 X	Y = -9.52 + 1.16 X	Y = -13.32 + 1.67 X	Y = -14.87 + 1.65 X	Y = -17.57 + 2.12 X
พลาสติก	Y = -12.77 + 1.56 X	Y = -15.25+1.71 X	Y = -14.46 + 1.77 X	Y = -17.29 + 2.08 X	Y = -18.69 + 2.10 X	Y = -15.37 +1.85 X
ซีเมนต์	Y = -12.27 + 1.51 X	Y = -12.30 +1.39 X	Y = -13.35 + 1.62 X	Y = -17.30 + 2.08 X	Y = -15.11 + 1.69 X	Y = -16.41 + 1.99 X
ดินเผา	Y = -13.76 + 1.67 X	Y = -12.04 +1.38 X	Y = -14.91 +1.78 X	Y = -17.35 + 2.07 X	Y = -14.35 +1.61 X	Y = -17.29 + 2.09 X
อลูมิเนียม	Y = -15.67 +1.84 X	Y = -17.87 +2.21X	Y = -14.98 +1.68 X	Y = -13.32 + 1.67 X	Y = -14.87 + 1.65 X	Y = -17.57 + 2.12 X

จากสมการเส้นตรงในตารางที่ 4.6 และ 4.7 สามารถนำไปหาค่า LC_{50} (cells/ml) แสดงดังตารางที่ 4.8 และ 4.9

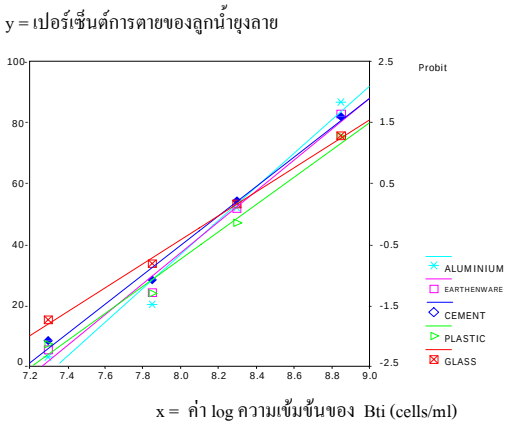
ตารางที่ 4.8 แสดง ค่า LC_{50} (cells/ml) ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2

ภาชนะ	สมการเส้นตรง					
	ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง			ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 96 ชั่วโมง		
	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ
แก้ว	$1.6x10^8$	$1.19x10^9$	$1.67x10^8$	$9.29x10^7$	$8.99x10^8$	$1.56x10^8$
พลาสติก	$2.25x10^8$	$1.16x10^9$	$2.17x10^8$	$1.45x10^8$	$8.07x10^8$	$1.41x10^8$
ซีเมนต์	$1.70x10^8$	$9.06x10^8$	$1.93x10^8$	$1.18x10^8$	$6.21x10^8$	$1.61x10^8$
ดินเผา	$1.87x10^8$	$7.53x10^8$	$2.28x10^8$	$1.08x10^8$	$5.28x10^8$	$1.71x10^8$
อลูมิเนียม	$1.87x10^8$	$1.03x10^9$	$1.72x10^8$	$1.22x10^8$	$8.05x10^8$	$1.01x10^8$

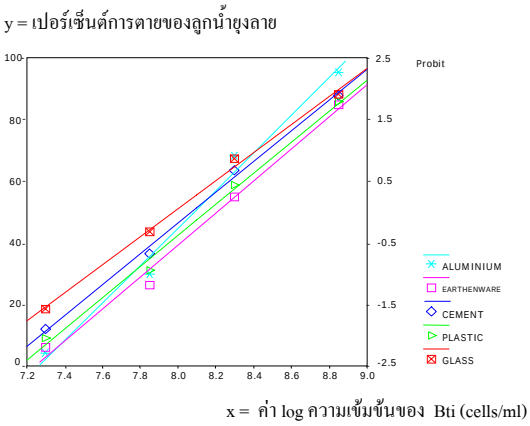
ตารางที่ 4.9 แสดง ค่า LC_{50} (cells/ml) ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4

ภาชนะ	สมการเส้นตรง					
	ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ที่เวลา 72 ชั่วโมง			ลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ที่เวลา 96 ชั่วโมง		
	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ
แก้ว	$1.57x10^8$	$1.22x10^9$	$2.68x10^8$	$9.01x10^7$	$9.62x10^8$	$1.79x10^8$
พลาสติก	$3.84x10^8$	$9.77x10^8$	$2.70x10^8$	$2.00x10^8$	$7.88x10^8$	$1.99x10^8$
ซีเมนต์	$2.36x10^8$	$9.59x10^8$	$1.93x10^8$	$1.96x10^8$	$8.23x10^8$	$1.68x10^8$
ดินเผา	$2.70x10^8$	$1.08x10^9$	$2.30x10^8$	$2.32x10^8$	$8.06x10^8$	$1.88x10^8$
อลูมิเนียม	$2.47x10^8$	$1.24x10^9$	$2.42x10^8$	$2.10x10^8$	$9.19x10^8$	$1.71x10^8$

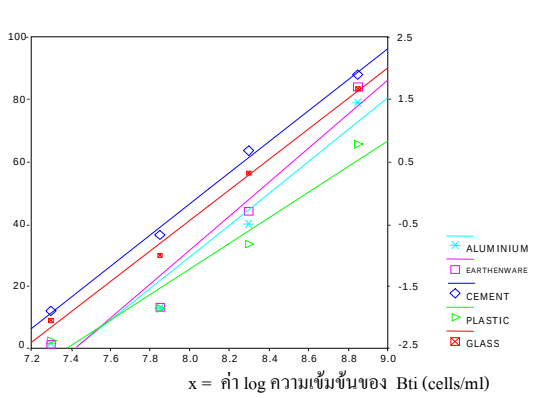
จากสมการเส้นตรงในตารางที่ 4.6–4.7 สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 และระยะที่ 4 ในสิ่งแวดล้อม 3 อย่างและในภาชนะ 5 ชนิด แสดงดังในภาพที่ 4.1-4.3



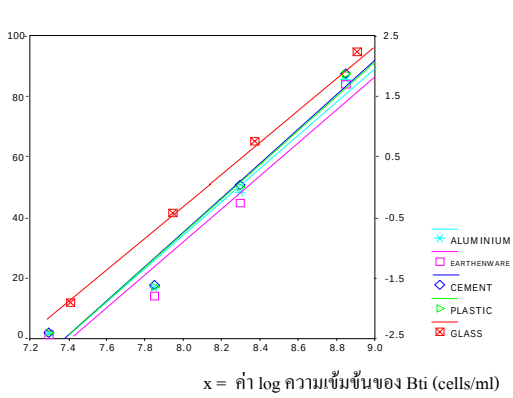
(1) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในเวลา 72 ชั่วโมง



(2) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในเวลา 96 ชั่วโมง



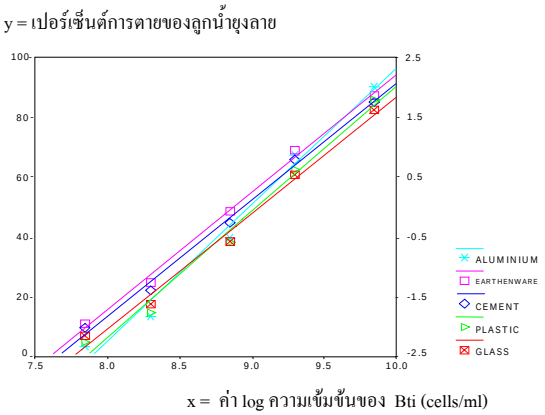
(3) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ***ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมง***



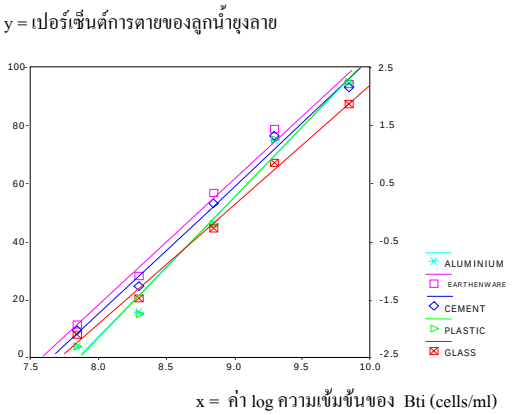
(4) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ***ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในเวลา 96 ชั่วโมง***

หมายเหตุ Glass = ทดลองในภาชนะแก้ว Aluminium = ทดลองในภาชนะอลูมิเนียม
Cement = ทดลองในภาชนะซีเมนต์ Earthenware = ทดลองในภาชนะดินเผา
Plastic = ทดลองในภาชนะพลาสติก

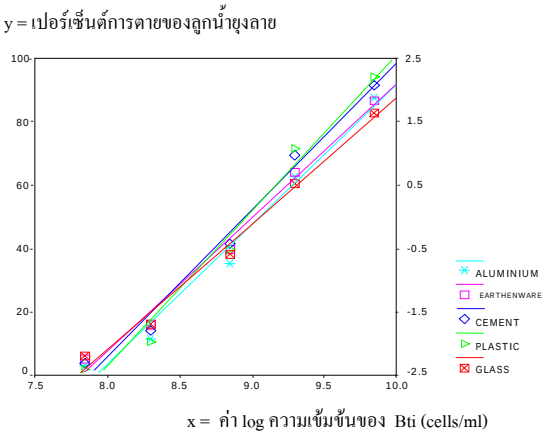
ภาพที่ 4.1 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายทดลองในอาคาร



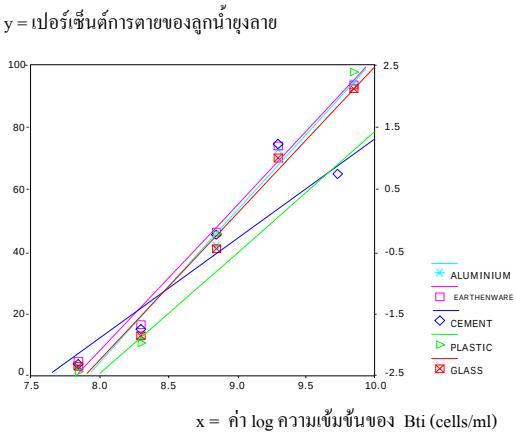
(1) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในเวลา 72 ชั่วโมง



(2) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในเวลา 96 ชั่วโมง



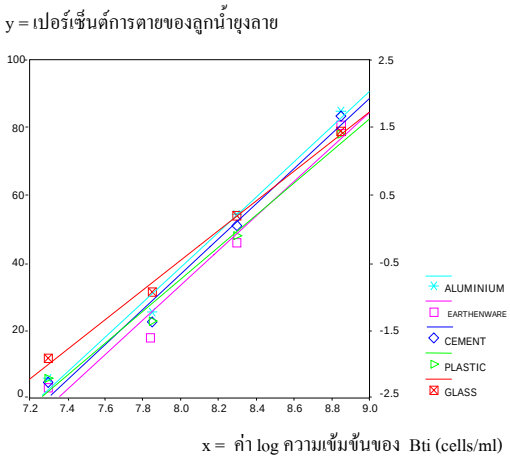
(3) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ***ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมง***



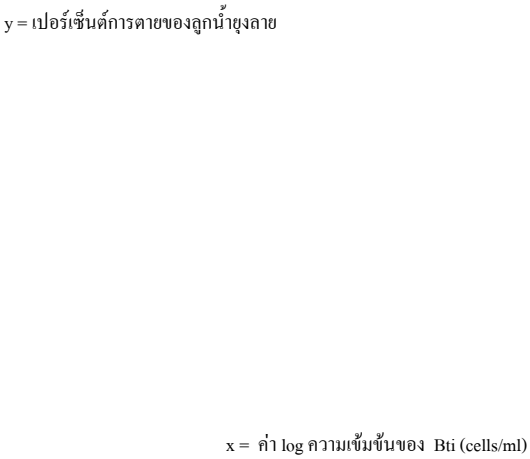
(4) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ***ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในเวลา 96 ชั่วโมง***

<u>หมายเหตุ</u> Glass = ทดลองในภาชนะแก้ว Aluminium = ทดลองในภาชนะอลูมิเนียม
Cement = ทดลองในภาชนะซีเมนต์ Earthenware = ทดลองในภาชนะดินเผา
Plastic = ทดลองในภาชนะพลาสติก

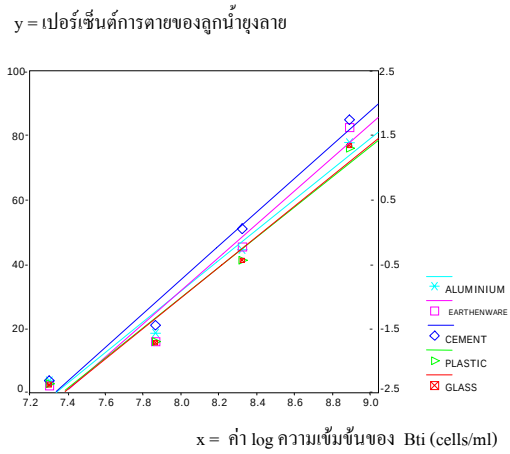
ภาพที่ 4.2 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายทดลองนอกอาคาร



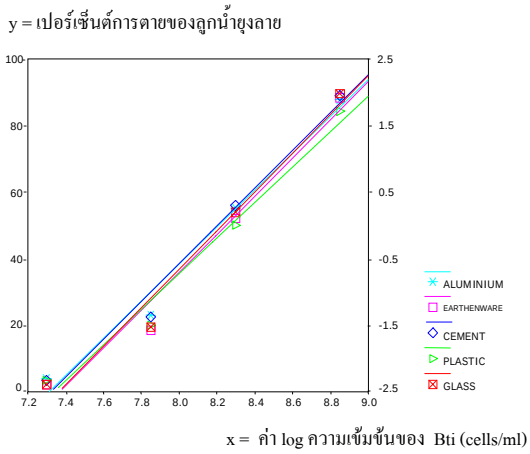
(1) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในเวลา 72 ชั่วโมง



(2) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ในเวลา 96 ชั่วโมง



(3) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ***ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมง***



(4) กราฟความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ***ของลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4 ในเวลา 96 ชั่วโมง***

<u>หมายเหตุ</u> Glass = ทดลองในภาชนะแก้ว Aluminium = ทดลองในภาชนะอลูมิเนียม
Cement = ทดลองในภาชนะซีเมนต์ Earthenware = ทดลองในภาชนะดินเผา
Plastic = ทดลองในภาชนะพลาสติก

ภาพที่ 4.3 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bti กับอัตราการตาย ของลูกน้ำยุงลายทดลองในห้องปฏิบัติการ

4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า LC_{50} กับปัจจัยทางกายภาพ

4.2.1 การศึกษาอัตราการตายของลูกน้ำต่างภาชนะ

จากการวิเคราะห์หาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงในภาชนะที่ใช้ทดลอง 5 ชนิด จากผลการทดลองความเป็นพิษของ Bti ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อลูกน้ำยุงลายดังแสดงในตารางที่ 4.1–4.5 โดยใช้วิธี One way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำในภาชนะทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ทดลองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows versions 10.0.7 แสดงผลดังตารางที่ 4.10 และ 4.11

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าเฉลี่ย ± SD ของอัตราการตายของลูกน้ำยุง

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	ค่าเฉลี่ย ± SD			
	ลูกน้ำยุงระยะ2 เวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ2 เวลา 96 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ4 เวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ4 เวลา 96 ชั่วโมง
$7x10^6$	.08 ± .19	.08 ± .19	.04 ± .11	.04 ± .11
$2x10^7$	2.17 ± 2.06	2.17 ± 2.06	.46 ± .54	.59 ± .83
$7x10^7$	5.90 ± 3.31	5.90 ± 3.31	3.26 ± 2.24	3.81 ± 2.84
$2x10^8$	12.88 ± 5.48	12.88 ± 5.48	9.12 ± 3.98	11.04 ± 5.30
$7x10^8$	17.77 ± 6.26	17.77 ± 6.26	15.01 ± 6.40	16.39 ± 7.20

ตารางที่ 4.11 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงในภาชนะ 5 ชนิด วิธี One way ANOVA

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	ค่านัยสำคัญ			
	ลูกน้ำยุงระยะ2 เวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ2 เวลา 96 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ4 เวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ4 เวลา 96 ชั่วโมง
$7x10^6$	.15	.15	.58	.58
$2x10^7$	.25	.25	.56	.50
$7x10^7$	.55	.55	.73	.71
$2x10^8$	.95	.95	.95	.97
$7x10^8$	.99	.99	.99	1

จากตารางที่ 4.11 ใช้วิธีวิเคราะห์ One way ANOVAในการทดลองความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายแต่ละภาชนะ

สมมุติฐานทางสถิติ

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_1 : $\mu_i \neq \mu_j$ $(i \neq j)$

หรือ

H_0 : อัตราการตายของลูกน้ำแต่ละภาชนะไม่แตกต่างกัน

H_1 : อัตราการตายของลูกน้ำแต่ละภาชนะแตกต่างกัน

กำหนด $\alpha = 0.05$

พบว่าระดับนัยสำคัญ (significant) จากผลลัพธ์ ความเข้มข้นของ Bti ทั้ง 5 ระดับมีค่ามากกว่า α ที่กำหนดคือ 0.05

ดังนั้นสรุปได้ว่า ยอมรับสมมุติฐาน H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

ปฏิเสธสมมุติฐาน H_1 : $\mu_i \neq \mu_j$ $(i \neq j)$

ซึ่งหมายความว่า ไม่มีความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำแต่ละภาชนะที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงไม่ต้องใช้สถิติการเปรียบเทียบแต่ละกลุ่ม

4.2.2 การศึกษาอัตราการตายของลูกน้ำต่างสิ่งแวดล้อม

แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในสิ่งแวดล้อม 3 อย่าง ได้แก่ ในอาคาร นอกอาคาร และในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี One way ANOVA แสดงดังตารางที่ 4.12 และ ผลวิเคราะห์สถิติการเปรียบเทียบความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ ระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมง และ96 ชั่วโมงในภาชนะ 5 ชนิดในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน 3 อย่าง แสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.12 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำยุงใน 3 สิ่งแวดล้อมด้วยวิธี One way ANOVA

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	ค่านัยสำคัญ			
	ลูกน้ำยุงระยะ2 เวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ2 เวลา 96 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ4 เวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะ4 เวลา 96 ชั่วโมง
$7x10^6$	.50	.50	.61	.61
$2x10^7$	.04*	.04*	.62	.45
$7x10^7$	.00*	.00*	.00*	.00*
$2x10^8$	.00*	.00*	.00*	.00*
$7x10^8$	.00*	.00*	.00*	.00*

หมายเหตุ เครื่องหมาย* หมายถึงมีความแตกต่างกันที่สิ่งแวดล้อมคู่ใดคู่หนึ่งที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($*p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.12 ใช้ วิธีวิเคราะห์ One Way ANOVAในการทดลองความแตกต่างทางสถิติของอัตราการตายของลูกน้ำแต่ละสิ่งแวดล้อม

สมมุติฐานทางสถิติ

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_1 : $\mu_i \neq \mu_j$ $(i \neq j)$ หรือ

H_0 : อัตราการตายของลูกน้ำแต่ละสิ่งแวดล้อมไม่แตกต่างกัน

H_1 : อัตราการตายของลูกน้ำแต่ละสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน

กำหนด $\alpha = 0.05$ พบว่าระดับนัยสำคัญ (Sig.) จากผลลัพธ์ มีค่าน้อยกว่า α ที่กำหนดคือ 0.05 ดังนั้นสรุปได้ว่า ปฏิเสธสมมุติฐาน H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

ยอมรับสมมุติฐาน H_1 : $\mu_i \neq \mu_j$ $(i \neq j)$

ซึ่งหมายความว่า มีความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำแต่ละสิ่งแวดล้อม อย่างน้อย 2 แห่งที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงใช้สถิติการเปรียบเทียบแต่ละกลุ่ม (Post Hoc Tests)โดยวิธีของ LSD เพื่อหาความแตกต่างของคู่ตัวแปรใน สิ่งแวดล้อม 3 อย่าง กำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.13 แสดงผลวิเคราะห์สถิติการเปรียบเทียบแต่ละคู่ตัวแปรในสิ่งแวดล้อม 3 อย่างโดยวิธีของ LSD

ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)	สิ่งแวดล้อม	ค่านัยสำคัญของ Mean Difference			
		ลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ในเวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ในเวลา 96 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมง	ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ในเวลา 96 ชั่วโมง
$7x10^6$	ในอาคาร กับ นอกอาคาร	.34	.42	.36	.38
	ในอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.60	.60	.37	.25
	นอกอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.24	.24	.56	.59
$2x10^7$	ในอาคาร กับ นอกอาคาร	.02*	.02*	.46	.28
	ในอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.80	.80	.37	.28
	นอกอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.04*	.04*	.86	.99
$7x10^7$	ในอาคาร กับ นอกอาคาร	.00*	.00*	.00*	.00*
	ในอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.56	.56	.84	.91
	นอกอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.00*	.00*	.00*	.00*
$2x10^8$	ในอาคาร กับ นอกอาคาร	.00*	.00*	.00*	.00*
	ในอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.99	.99	.14	.77
	นอกอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.00*	.00*	.00*	.00*
$7x10^8$	ในอาคาร กับ นอกอาคาร	.00*	.00*	.00*	.00*
	ในอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.68	.64	.62	.89
	นอกอาคาร กับ ในห้องปฏิบัติการ	.00*	.00*	.00*	.00*

หมายเหตุ * หมายถึงมีความแตกต่างของคู่สิ่งแวดล้อมที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (*$p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.13 ผลลัพธ์จากการเปรียบเทียบค่าสถิติโดยจะมีเครื่องหมาย * ในผลลัพธ์ช่องค่านัยสำคัญของ Mean Difference กลุ่มใดที่มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันบ้าง จากการวิเคราะห์ผลสิ่งแวดล้อมที่มีอัตราการตายของลูกน้ำแตกต่างกันสรุปได้ว่า สิ่งแวดล้อมที่มีอัตราการตายของลูกน้ำแตกต่างกันคือที่ระดับความเข้มข้น $7x10^7$ cells/ml ความเข้มข้น $2x10^8$ cells/ml และความเข้มข้น $7x10^8$ cells/ml ส่วนที่ระดับความเข้มข้น $7x10^6$ cells/ml ลูกน้ำทั้งระยะที่ 2 และ

ระยะที่ 4 ไม่แตกต่าง และ ความเข้มข้น $2x10^7$ cells/ml ของลูกน้ำระยะที่ 4 ไม่แตกต่าง โดยสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างคือ

- สิ่งแวดล้อมในอาคารกับนอกอาคาร
- สิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการกับนอกอาคาร

โดยการทดลองกลางแจ้ง (นอกอาคาร) จะได้ค่า LC_{50} ภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง สูงกว่าการทดลองในอาคารและในห้องปฏิบัติการ

4.2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายกับสิ่งแวดล้อม

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า LC_{50} ที่ได้ในภาชนะต่างชนิดกันกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการคือ ค่าของปริมาณออกซิเจนละลาย(DO) อุณหภูมิของน้ำ และค่า pH ของน้ำ โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติ (Pearson correlation) แสดงผลดังในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4. 14 แสดงผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างอัตราตายของลูกน้ำกับความเข้มข้นของ Bti และปัจจัยทางกายภาพโดยใช้วิธี Pearson correlation

อัตราตายลูกน้ำต่างระยะต่างเวลา	ความเข้มข้นของ Bti (cells/ml)		อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)		DO (mg/l)		pH	
	ความสัมพันธ์	เฉลี่ย ± SD	ความสัมพันธ์	เฉลี่ย ± SD	ความสัมพันธ์	เฉลี่ย ± SD	ความสัมพันธ์	เฉลี่ย ± SD
ระยะที่ 2 เวลา 72 ชั่วโมง	.80*	$2x10^8 \pm 2.6x10^8$	-.25*	27.33 ± 1.31	-.23*	4.02 ± 0.27	.20*	7.05 ± 0.13
ระยะที่ 2 เวลา 96 ชั่วโมง	.77*	$2x10^8 \pm 2.6x10^8$	-.28*	27.78 ± 1.49	-.82*	4.04 ± 0.25	.23*	7.16 ± 1.00
ระยะที่ 4 เวลา 72 ชั่วโมง	.81*	$2x10^8 \pm 2.6x10^8$	-.21*	27.33 ± 1.31	-.85*	27.33 ± 0.27	.23*	7.05 ± 1.03
ระยะที่ 4 เวลา 96 ชั่วโมง	.77*	$2x10^8 \pm 2.6x10^8$	-.19*	30.55 ± 2.44	-.79*	4.10 ± 0.29	.22*	7.15 ± 1.00

หมายเหตุ เครื่องหมาย* หมายถึงมีความสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (*$p < 0.05$)

การทดลองค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสัมพันธ์ของอัตราการตายของลูกน้ำกับปัจจัยทางกายภาพ ใช้ วิธีวิเคราะห์ Pearson correlation หาค่าความสัมพันธ์ของอัตราการตายของลูกน้ำกับปัจจัยทางกายภาพ

สมมุติฐานทางสถิติ

H_0 : ตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นต่อกัน

H_1 : ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงเส้นต่อกัน หรือ

H_0 : $\rho = 0$

H_1 : $\rho \neq 0$

กำหนดค่า α ที่ 0.05

จากผลการวิเคราะห์ สรุปได้ว่า ปฏิเสธสมมุติฐาน H_0 ที่ระดับ $\alpha = 0.05$ นั่นคือ $\rho \neq 0$ (มีความสัมพันธ์) ดังแสดงในตารางที่ 4.15

ผลการวิเคราะห์ อัตราการตายของลูกน้ำระยะที่ 2 และระยะที่ 4 ที่เวลา 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมงกับปัจจัยทางกายภาพ หมายความว่า ตัวแปร 3 ตัว คือ อุณหภูมิ pH และค่า DO มี ความสัมพันธ์กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นั่นคือ

- ระดับความเข้มข้นของ Bti มีความสัมพันธ์ในแนวทางเดียวกันกับอัตราการตายของลูกน้ำ หรือแปรผันตามกัน
- อุณหภูมิมีความสัมพันธ์กันในทางตรงข้ามกับอัตราการตายของลูกน้ำ หรือแปรผกผันกัน
- DO มีความสัมพันธ์กันในทางตรงข้ามกับอัตราการตายของลูกน้ำ หรือแปรผกผันกัน
- pH มีความสัมพันธ์ในแนวทางเดียวกันกับอัตราการตายของลูกน้ำ หรือแปรผันตามกัน

4.2.4 อุณหภูมิของอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสง ในขณะทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 และ 4 ในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน

ผลการวัดอุณหภูมิของอากาศความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงเฉลี่ยในขณะทดลองกับลูกน้ำระยะที่ 2 และ4 ในเวลา 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.15 และ 4.16

ตารางที่ 4.15 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิของอากาศความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงเฉลี่ยจากการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			ความชื้นสัมพัทธ์ (%RH)			ความเข้มแสง (Lux)		
	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ
72	27.20	38.90	30.80	59.10	58.00	62.20	400	1300	500
96	27.10	40.80	30.80	58.40	59.00	63.00	400	1300	500

ตารางที่ 4.16 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิของอากาศความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงเฉลี่ยจากการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 4

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			ความชื้นสัมพัทธ์ (%RH)			ความเข้มแสง (Lux)		
	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ	ในอาคาร	นอกอาคาร	ในห้องปฏิบัติการ
72	28.10	43.70	29.90	59.00	59.40	62.00	400	1300	500
96	29.20	39.90	30.90	58.50	63.00	61.00	400	1300	500

4.3 อภิปรายผลการศึกษา

จากการทดลองความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A.aegypti*) ในภาชนะเก็บน้ำต่างชนิดภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน พบว่า ความเข้มข้นที่สูงขึ้นของสารละลาย Bti มีผลทำให้สัดส่วนการตายของลูกน้ำสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ Bti ทำให้ความเป็นพิษสูงขึ้น โอกาสที่ลูกน้ำจะกินสารพิษในปริมาณมากก็สูงขึ้นเช่นกันและการออกฤทธิ์ของสารพิษในการทำลายเซลล์กระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงก็สูงขึ้น จึงส่งผลให้มีการตายของลูกน้ำสูงขึ้นตามไปด้วย

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ในภาชนะทุกชนิด ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ในเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกันคือ ที่สิ่งแวดล้อมในอาคารภาชนะแก้วเท่ากับ $1.68x10^8$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $2.25x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $1.70x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $1.87x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.87x10^8$ cells/ml นอกอาคาร ภาชนะแก้วเท่ากับ $1.19x10^9$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $1.16x10^9$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $9.06x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $7.53x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.03x10^9$ cells/ml และในห้องปฏิบัติการทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับในอาคาร และ LC_{50} ในเวลา 96 ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่า LC_{50} ในเวลา 72 ชั่วโมง ผลสรุป ค่า LC_{50} (cells/ml) ที่คำนวณได้จากการทดลอง แสดงไว้ในตารางที่ 4.8

ค่าความเข้มข้นของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ในภาชนะทุกชนิดตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ในเวลา 72 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกันคือ ที่สิ่งแวดล้อมในอาคารในภาชนะแก้วเท่ากับ $1.57x10^8$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $3.84x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $2.36x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $2.70x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $2.47x10^8$ cells/ml นอกอาคาร ภาชนะแก้วเท่ากับ $1.22x10^9$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $9.77x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $9.59x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $1.08x10^9$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.24x10^9$ cells/ml และในห้องปฏิบัติการทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับในอาคาร ผลสรุปค่า LC_{50} (cells/ml) ที่คำนวณได้จากการทดลอง แสดงดังตาราง 4.9

ค่า LC_{50} ที่ได้จากการทดลองนี้สูงมากเมื่อเทียบกับค่า LC_{50} หรือ LD_{50} ที่ผู้วิจัยท่านอื่นศึกษาไว้ เช่น Service (1983) ได้ค่า LD_{50} ในเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ $9.8x10^4$ spores/ml นิภา เบญจพงศ์, สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา และ เพ็ญสุข เต่าทอง (2528) ทดลองความเป็นพิษของ Bti กับลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ได้ค่า LC_{50} และ ค่า LC_{90} ในเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ $7.13x10^3$ spores/ml และ $2.19x10^4$ spores/ml ตามลำดับ และค่าความไวที่ผู้วิจัยท่านนี้ศึกษาไว้ พบว่าลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* ให้ค่า LT_{100} (100 % Lethal time) เท่ากับ 30-40 นาที แต่จากการทดลองนี้พบว่าลูกน้ำยุงลายจะเริ่มตายมากเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง และการศึกษาของ นิภา เบญจพงศ์, สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา และ เพ็ญสุข เต่าทอง (2528) ก็พบว่า ลูกน้ำตายมากที่เวลา 48 ชั่วโมง แต่ใช้ความเข้มข้น Bti ต่ำกว่า ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลเนื่องมาจากปัจจัยหลักๆ คือเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันของสายพันธุ์ในการผลิตมาจากประเทศที่ต่างกัน ความแตกต่างแต่ละชุดการผลิต เทคนิค วิธีการเลี้ยงเชื้อ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต มีผลต่อปริมาณผลึกโปรตีน Bti และความรุนแรงของพิษ (Couch and Ross, 1980) ขนาดผลึก และรูปแบบผลิตภัณฑ์ Bti มีผลต่อพฤติกรรมการกินอาหารของลูกน้ำแต่ละชนิด (Foo and Yap, 1982) ปัจจัยต่อมาคือ ชนิดของลูกน้ำ ซึ่งมีความแตกต่างกันของสายพันธุ์และระยะของ

ลูกน้ำ ปัจจัยสุดท้ายคือสิ่งแวดล้อมในขณะทดลอง เช่น อุณหภูมิ ความแตกต่างกันของน้ำที่ใช้ทดลอง แสงแดด (Becker, Zgomba, Ludwig, Petric, and Rettich, 1992)

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 จะมากกว่า ลูกน้ำระยะที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Guillet and Escaffre (1979) ที่พบว่าความเป็นพิษของ Bti มีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับอายุของลูกน้ำ ซึ่งมักจะคิดเป็นระยะของลูกน้ำ (instar) นั่นคือ Bti จะมีความเป็นพิษมากกับลูกน้ำระยะต้นๆ มากกว่าระยะท้ายๆ และจากการศึกษาต่อมาของ Olejnicek (1986) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองหาความสัมพันธ์ของปัจจัยทางกายภาพบางประการคือ อุณหภูมิน้ำ ค่า DO ค่า pH ต่ออัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย เนื่องจากอุณหภูมิในแหล่งเพาะพันธุ์ที่ต่างกันมากกว่า 10-15 องศาเซลเซียสจะมีผลต่อประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Bti จึงได้ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำ ค่า DO ค่า pH ในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม พบว่า ค่าความแตกต่างของอุณหภูมิน้ำในภาชนะทั้ง 5 ชนิดที่สิ่งแวดล้อมเดียวกันเท่ากับ 2 องศาเซลเซียส การทดสอบทางสถิติพบว่าความเป็นพิษของBtiในการทำลายลูกน้ำยุงในแต่ละภาชนะไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Becker, Zgomba, Ludwig, Petric, and Rettich (1992) และมีการศึกษาโดยนิตยาจาร กิตติเดชา (2540) พบว่า ประสิทธิภาพในการทำลายลูกน้ำยุงของผลิตภัณฑ์ Bti ยี่ห้อ Larvetab® ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ไม่แตกต่างกัน แต่จากการทดลองความคงอยู่ของผลิตภัณฑ์ Bti ยี่ห้อ Larvetab® พบว่าความคงอยู่ของ Bti ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา อยู่ที่เวลา 21, 18 และ 11 วัน ตามลำดับ ซึ่งภาชนะพลาสติกคงอยู่นานที่สุด

การเปรียบเทียบอัตราการตายของลูกน้ำในสิ่งแวดล้อมในอาคาร นอกอาคาร และในห้องปฏิบัติการ พบว่า อัตราการตายของลูกน้ำในอาคารและในห้องปฏิบัติการแตกต่างกับนอกอาคาร ซึ่งก็เนื่องจากอุณหภูมิน้ำในอาคารอยู่ระหว่าง 26.3-27.2 องศาเซลเซียส และในห้องปฏิบัติการใกล้เคียงกับในอาคารแต่แตกต่างกับนอกอาคาร พบว่าอุณหภูมิน้ำในภาชนะนอกอาคารอยู่ระหว่าง 27.1-30.6 องศาเซลเซียส ซึ่งการศึกษาของ Igonoffo, Garcia, Kroha, Fukuda, and Couch (1981) พบว่าประสิทธิภาพของ Bti ในน้ำกลั่นและน้ำบ่อจะหมดลงถ้าถูกแสงอัลตราไวโอเลต 24 ชั่วโมง และ ที่อุณหภูมิ 31±1 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพ Bti นาน 100 วัน และที่ pH ของน้ำเท่ากับ 4, 6.6, 10 พบว่าไม่มีผลต่อประสิทธิภาพ Bti ซึ่งอุณหภูมิน้ำนอกอาคารที่สูงเกือบถึง 31 องศาเซลเซียส ประกอบกับปัจจัยอื่นๆ เช่นเชื้อแบคทีเรียผลิตมาจากประเทศที่ต่างกัน ความแตกต่างแต่ละชุดการผลิต เทคนิค วิธีการ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตมีผลต่อปริมาณผลึกโปรตีน Bt และความรุนแรงของพิษ (Couch and Ross, 1980) ขนาดผลึก และรูปแบบผลิต

ภัณฑ์ Bti มีผลต่อพฤติกรรมการกินอาหารของลูกน้ำแต่ละชนิด (Foo and Yap, 1982) ความแตกต่างกันของสายพันธุ์และระยะของลูกน้ำและสิ่งแวดล้อมในขณะทดลอง จากการทดลองได้วัดค่า pH ในแต่ละภาชนะและแต่ละสิ่งแวดล้อมอยู่ระหว่าง 6.1- 8.7 พบว่า pH มีความสัมพันธ์ทางเดียวกันกับอัตราการตายของลูกน้ำระยะที่ 2 ที่ 96 ชั่วโมงและลูกน้ำระยะที่ 4 ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Igonoffo, Garcia, Kroha, Fukuda, and Couch (1981) และการศึกษาของ Lacey, Mulla, and Dulmage (1978) พบว่า อัตราการตายของลูกน้ำมีความสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับค่า pH และประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำของ Bti จะลดลงในสภาวะที่น้ำเป็นกรด ดังนั้น ในการทดลองนี้ค่า pH ต่ำที่สุดคือ 6.1 ซึ่งไม่มีผลต่อการทดลองในครั้งนี้เช่นเดียวกัน ส่วน DO จากการทดลองอยู่ระหว่าง 3.5-6.5 พบว่ามีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับอัตราการตายของลูกน้ำหรือแปรผกผันกัน ซึ่งจากการศึกษาในภาคสนามของ Car (1984) พบว่า ประสิทธิภาพของ Bti จะยิ่งลดลงในน้ำเสียที่มีค่า DO ต่ำ น้ำที่มีของเสียปะปนอยู่และน้ำที่มีส่วนประกอบ chloride สูงซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองนี้ อาจเนื่องมาจาก DO ขณะทดลองอยู่ระหว่าง 3.5-6.5 ซึ่งอยู่ในระดับที่ยังไม่ต่ำจนทำให้ประสิทธิภาพของ Bti ลดลง และจากการทดลองของนิภา เบญจพงศ์ , สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา และเพ็ญสุข เต่าทอง (2528) ได้ศึกษาความเป็นพิษของ Bti กับลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญในน้ำ 3 ชนิด คือน้ำกลั่น น้ำประปา และน้ำเสีย พบว่าใน 1 สัปดาห์แรกของการทดลองประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญไม่แตกต่างกันในน้ำทั้ง 3 ชนิด แต่สัปดาห์ต่อมาจะต้องใช้ระยะเวลามากขึ้นในการที่จะทำให้ลูกน้ำตายเท่าเดิมโดยใช้ความเข้มข้นของ Bti เท่าเดิม นั่นคือความคงทนของพิษในน้ำกลั่นจะดีกว่าในน้ำเสียหรือน้ำประปาแต่ความเป็นพิษในสัปดาห์แรกไม่แตกต่างกัน จากการทดลองครั้งนี้ที่ DO ลดลงอาจมีผลทำให้ลูกน้ำที่อ่อนแอตายเร็วขึ้น

บทที่ 5
บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การทดสอบความเป็นพิษของ Bti ต่อลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ระยะที่ 2 และ 4 ในภาชนะแก้ว พลาสติก ซีเมนต์ ดินเผา และอลูมิเนียม ที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 ของลูกน้ำยุงลายที่ใช้ทดลองทั้งหมด (LC_{50}) ภายใน 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมงในอาคาร นอกอาคาร และในห้องปฏิบัติการ ในสภาพจำลองปล่อยให้น้ำระเหยไปตามธรรมชาติ

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ในเวลา 72 ชั่วโมง ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันคือ ในอาคารภาชนะแก้วเท่ากับ $1.68x10^8$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $2.25x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $1.70x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $1.87x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.87x10^8$ cells/ml นอกอาคาร ภาชนะแก้วเท่ากับ $1.19x10^9$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $1.16x10^9$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $9.06x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $7.53x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.03x10^9$ cells/ml และในห้องปฏิบัติการภาชนะแก้วเท่ากับ $1.67x10^8$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $2.17x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $1.93x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $2.28x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.72x10^8$ cells/ml ในห้องปฏิบัติการทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับในอาคาร

ค่าความเข้มข้นของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมง ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันคือ ในอาคารภาชนะแก้วเท่ากับ $1.57x10^8$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $3.84x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $2.36\ x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $2.70x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $2.47x10^8$ cells/ml นอกอาคาร ภาชนะแก้วเท่ากับ $1.22x10^9$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $9.77x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $9.59x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $1.08x10^9$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ $1.24x10^9$ cells/ml และในห้องปฏิบัติการภาชนะแก้วเท่ากับ $2.68x10^8$ cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ $2.70x10^8$ cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ $2.42x10^8$ cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ $2.30x10^8$ cells/ml ภาชนะอลูมิเนียม

เท่ากับ 1.93x10 ^{8} cells/ml ในห้องปฏิบัติการทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับในอาคาร

จากการศึกษาค่าความเป็นพิษของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงระยะที่ 2 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันคือ ในอาคารภาชนะแก้วเท่ากับ 9.29x10^{7} cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ 1.45x10^{8} cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ 1.18x10^{8} cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ 1.08x10^{8} cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ 1.22x10^{8} cells/ml นอกอาคาร ภาชนะแก้วเท่ากับ 8.99x10^{8} cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ 8.07x10^{9} cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ 6.21x10^{8} cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ 5.28x10^{8} cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ 8.05x10^{8} cells/ml และในห้องปฏิบัติการภาชนะแก้วเท่ากับ 1.56x10^{8} cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ 1.41x10^{8} cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ 1.01x10 ^{8} cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ 1.71x10^{8} cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ 1.61x10 ^{8} cells/ml ในห้องปฏิบัติการทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับในอาคาร

ความเป็นพิษของ Bti ที่ทำให้ลูกน้ำยุงระยะที่ 4 ในเวลา 96 ชั่วโมง ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) ทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันคือ ในอาคารภาชนะแก้วเท่ากับ 9.01x10^{8} cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ 2.00x10^{8} cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ 1.96x10^{8} cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ 2.32x10^{8} cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ 2.10x10^{8} cells/ml นอกอาคาร ภาชนะแก้ว เท่ากับ 9.62x10^{8} cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ 7.88x10^{8} cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ 8.23x10^{8} cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ 8.06x10^{8} cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ 9.19x10^{8} cells/ml และในห้องปฏิบัติการภาชนะแก้วเท่ากับ 1.79x10 ^{8} cells/ml ภาชนะพลาสติกเท่ากับ 1.99x10 ^{8} cells/ml ภาชนะซีเมนต์เท่ากับ 1.68x10 ^{8} cells/ml ภาชนะดินเผาเท่ากับ 1.88x10 ^{8}cells/ml ภาชนะอลูมิเนียมเท่ากับ 1.71x10 ^{8} cells/ml ในห้องปฏิบัติการทุกชนิดภาชนะมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับในอาคาร

2. การทดสอบความแตกต่างอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายแต่ละภาชนะ

สรุปจากผลการทดสอบความแปรปรวนของอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายต่อภาชนะพบว่าอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในทุกชนิดภาชนะในเวลาเดียวกันและในสิ่งแวดล้อมเดียวกันไม่แตกต่างกัน

3. การทดสอบความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำแต่ละสิ่งแวดล้อม

สรุปได้ว่าสิ่งแวดล้อมที่มีอัตราการตายของลูกน้ำแตกต่างกันคือที่ระดับความเข้มข้น 7x10^{7} cells/ml ความเข้มข้น 2x10^{8} cells/ml และความเข้มข้น 7x10^{8} cells/ml ส่วนที่ระดับความเข้มข้น

$7x10^6$ cells/ml และ ความเข้มข้น $2x10^7$ cells/ml ไม่แตกต่าง โดยสิ่งแวดล้อมที่แตกต่าง 2 คู่ คือ สิ่งแวดล้อมในอาคารกับนอกอาคาร และ สิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการกับนอกอาคาร

4. ทดสอบค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสัมพันธ์ของอัตราการตายของลูกน้ำกับปัจจัยทางกายภาพ

ทดสอบค่าความสัมพันธ์ของอัตราการตายของลูกน้ำระยะที่ 2 และลูกน้ำระยะที่ 4 ในเวลา 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมงพบว่า ระดับความเข้มข้นของ Bti และค่า pH มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในแนวทางเดียวกัน แต่ค่า DO และ อุณหภูมิน้ำมีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในทางตรงข้ามที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นั่นคือเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงขึ้นอัตราการตายของลูกน้ำจะลดลง เมื่อค่า DO ต่ำลงอัตราการตายของลูกน้ำจะเพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของ Bti และค่า pH เพิ่มขึ้นอัตราการตายของลูกน้ำจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

5.2 การประยุกต์ผลการวิจัย

การศึกษานี้นำไปประยุกต์ในทางปฏิบัติได้ เช่น มีภาชนะกักเก็บน้ำที่ไม่มีการใช้น้ำที่อยู่ในอาคารใส่สารละลาย Bti ขนาด $9.01x10^7$ cells/ml ภาชนะกักเก็บน้ำที่ไม่มีการใช้น้ำที่อยู่กลางแจ้งใส่สารละลาย Bti ขนาด $5.28x10^8$ cells/ml จะให้ผลฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ครึ่งหนึ่งภายในเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งการใช้ Bti ที่เพาะเลี้ยงได้เองอาจจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ Bti จากต่างประเทศ หรือจากหน่วยงานองค์กรอื่นๆ ที่จำหน่ายในราคาสูงกว่า

5.3 ข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป

1. ควรทำการศึกษาความเป็นพิษของ Bti โดยประยุกต์เป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ ที่ต้นทุนการผลิตต่ำและนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวกในภาชนะต่างๆ ทั้งที่มีการใช้น้ำและไม่มีการใช้น้ำที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงในภาคสนาม เพื่อประเมินค่าใช้จ่ายและทัศนคติการยอมรับของประชาชนเพื่อนำไปประเมินความคุ้มค่าในการนำมาใช้ในแผนงานโครงการแก้ปัญหาทางสาธารณสุขในการควบคุมและป้องกันปัญหาโรคไข้เลือดออก

2. ควรทำการศึกษาความเป็นพิษของ Bti ในรูปผลึกโปรตีน (protein crystals) เปรียบเทียบกับความเป็นพิษของ Bti ในรูปของเซลล์ เพื่อจะทราบถึงประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Bti แต่ละรูปแบบเพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด ในการวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง และได้ทำการแยกผลึกโปรตีนด้สยวิธีต่าง ๆ แต่ไม่สามารถแยกผลึกโปรตีนได้เนื่องจากการแยกผลึกโปรตีนควรใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อนานขึ้นเป็น 24-48 ชั่วโมง จะเกิดการ autolysis ของ sporangium ผลึกโปรตีนจะแยกตัวออกจาก sporangium (De Barjac and Sutherland, 1990) หรือใช้ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อนานขึ้นเป็น 3-4 วัน ทั้งนี้ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (นิภา เบญจพงศ์, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา และเพ็ญสุข เต่าทอง, 2528) แล้วจึงนำไปทำแยกผลึกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (purification)โดยใช้ buoyant density-gradient centrifugation techniques (De Barjac and Sutherland, 1990)

3. ควรทำการศึกษาความคงอยู่ของ Bti โดยประยุกต์เป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ ที่ต้นทุนการผลิตต่ำและนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวก

รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2539). **การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. (2537). **รูปแบบผลิตภัณฑ์หัตถกรรม**. กรุงเทพ: ด่านสุทธาการพิมพ์.

กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดระทรวงสาธารณสุข. (2536). **รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์**. (24): 297-306.

กัญจนา ธีระกุล และ จริยา จันทร์ไพแสง. (2542). **การใช้เทคนิค DNA probe และ PCR** [On-lines]. ได้จาก : http:// www.ku.ac.th/ED/book/001/ganjana.html.

กัลยา วานิชย์บัญชา. (2540). **หลักสถิติ**. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิตติ จันทร์แสง, อุรุญากร จันทร์แสง, อุษาวดี ถาวระ และ ประคอง พันธุ์อุไร. (2536). การแพร่กระจายของยุงลายในชนบท พ.ศ. 2532-2534. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 35 (2):91-106.

จริยา จันทร์ไพแสง, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สมศักดิ์ ศิวิชัย. (2541). **จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืช**. เอกสารประกอบนิทรรศการงานเกษตรแฟร์ ระหว่างวันที่ 31 มกราคม 2541- 7 กุมภาพันธ์ 2541 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชวลิต ทัศนสว่าง. (2532). ไข้เลือดออก. **โรคติดต่อ**. 449-50. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชัยสิทธิ์ เฉลิมมีประเสริฐ. (2537). **สถิติเพื่อการวิเคราะห์ข้อมูล**. กรุงเทพฯ: ธนพร.

ดวงทิพย์ จารุพัฒน์. (2538). **การโคลนและการศึกษาคุณสมบัติของยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน cry I จาก *Bacillus thuringiensis* H-serotype ใหม่ที่แยกได้ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกจุลชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทรงยศ พิสิษฐ์กุล. (2530). **กีฏวิทยาเบื้องต้น**. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทรงยศ พิสิษฐ์กุล. (2530). **ลักษณะสำคัญของแมลงในวงศ์ต่างๆ**. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทัศนีย์ ชีวเทศ และ สมภพ ถาวรยิ่ง. (2537). **การวิเคราะห์การถดถอยและสหสัมพันธ์**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (ม.ป.ท.).

ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2535). **โรควิทยาของแมลง.** ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2527). **บทปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง.** ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

นิตยาจาร กิตติเดชา. (2540). **ประสิทธิภาพและความคงอยู่ของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ที่มีผลต่อลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* (Linnaeus) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ คณะ สาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นิภา ชินะพงศ์ไพศาล. (2524). การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดลูกน้ำยุง. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 23 (1): 21-31.

นิภา เบญจพงศ์, เลาจนา เชาวนาดิศัย, บุญล้วน พันธุมจินดา, สมเกียรติ บุญญะบัญชา และ เพ็ญสุข เต่าทอง. (2530). การสำรวจแยกเชื้อและทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายลูกน้ำยุงของเชื้อบัคเตรีที่พบในประเทศไทย. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 29 (4): 187-195.

นิภา เบญจพงศ์, สมศักดิ์ พันธุวัฒนา และ เพ็ญสุข เต่าทอง. (2528). ความคงทนพิษของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ที่มีต่อลูกน้ำยุงในน้ำ 3 ชนิด. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 27 (4): 343-348.

บุญล้วน พันธุมจินดา. (2515). ยุงลาย. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 14 (1): 47-54.

บุญล้วน พันธุมจินดา. (2517). อเบทยาทำลายลูกน้ำยุง. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 16 (3): 133-139.

ประคอง พันธุ์อุไร. (2514). การสำรวจลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* ในภาชนะธรรมชาติ และการอยู่รอดของลูกน้ำยุงนี้ในน้ำตัวอย่าง. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 13(4): 28-35.

ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์. (2541). **การศึกษาการเติบโต การสร้างสปอร์และกิจกรรมเอ็นไซม์ของ Bt**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พงษ์ศรี ใบอดุลย์. (ม.ป.ป.) . **การศึกษาวิจัยวัตถุมีพิษตกค้างในดินเกษตรกรรม**. กรุงเทพฯ: กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พรทิพย์ โกวิชัย. (2532). **ผลของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูปต่อการอยู่รอดของลูกน้ำยุง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พวงเพชร วารีย์. (2539). **การศึกษา biting density และ parous rate ของยุง *Culex quinquefasciatus* (Say) และยุง *Aedes aegypti* (Linnaeus) ในอำเภอเมืองจังหวัดขอนแก่น**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์. (2536). **พลาสติก**. พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ: สัมพันธ์พาณิชย์.

มัลลิกา บุนนาค, กัลยา ครองแก้ว, วัชราภรณ์ สุริยาภิวัฒน์ และ นพรัตน์ รุ่งอุทัยศิริ. (2536). **สถิติ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เยาวภา ดุลยไพรี และไพฑูรย์ วงษ์สกุล. (2533). ผลการสำรวจความหนาแน่นของยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออกในชุมชนชิดชายแดนไทย-มาเลเซีย ปี 2531. **วารสารโรคติดต่อ**. 16 (1):27-39.

รุ่งทิวา ประสานทอง. (2532**). การศึกษาประสิทธิภาพของผงซักฟอกในการป้องกันและกำจัดลูกน้ำยุงลาย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาการระบาด คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

รุ่งโรจน์ พิมพ์ใจพงศ์, สุคต พานิชการ และ เกษตร ยะสาธะโร. (2533). ผู้ป่วยไข้เลือดออกที่เสียชีวิตในโรงพยาบาลอุดรธานีจากการระบาดเมื่อปี พ.ศ.2530. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 32 (15):90-4.

รำไพ สุขสวัสดิ์ ณ อยุธยา. (2533). **สถิติการวิจัย**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ

เลาจนา ธีรภัทรสกุล, บุญล้วน พันธุมจินดา และ เพ็ญสุข เต่าทอง. (2523). อิทธิพลของน้ำต่อการดำรงชีวิตของลูกน้ำยุงลาย (*Ae. aegypti* L.) . **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 22 (4): 209-219.

เลาจนา เชาวนาดิศัย และ เพ็ญสุข เต่าทอง. (2524). ยุงลายวางไข่ในน้ำสกปรกได้จริงหรือ. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 23 (4): 251-254.

เลาจนา เชาวนาดิศัย และ สราญจิต ไกรฤกษ์. (2529). ผลกระทบของบัคเตรีกำจัดยุงต่อศัตรูธรรมชาติชนิดต่าง ๆ. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 28 (4): 367-377.

เลาจนา เชาวนาดิศัย และ สุวิทย์ ธนศรีภักดีกุล. (2538). การวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์กำจัดยุงลายชนิดแกรนูลาร์. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 37 (2): 137-144.

เลาจนา เชาวนาดิศัย, สุวิทย์ ธนศรีภักดีกุล, ศิริพรรณ วงศ์วานิช และ สุนันทา รามศิริ. (2538). แบคทีเรียจากจังหวัดพระนครศรีอยุธยามีประสิทธิภาพฆ่าลูกน้ำยุง. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 37 (3): 187-195.

เลาจนา เชาวนาดิศัย, สุวิทย์ ธนศรีภักดีกุล และ บุญล้วน พันธุมจินดา. (2530). การควบคุมยุงด้วยบัคเตรี *Bacillus thuringiensis* H-14. **วารสารโรคติดต่อ.** 13 (3): 193-201.

วลัยรัตน์ ตัณฑประศาสตร์. (2539). **การศึกษาประสิทธิภาพ ประสิทธิผล และความคงทนของสารสกัดจากใบและเมล็ดมันแกวในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหา บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริรัตน์ สาโพธิ์สิงห์. (17 มิถุนายน 2544). ยุงลายแมลงช้างดึกดำบรรพ์. **เดลินิวส์**: 5.

สมศักดิ์ บุตราช และคณะ. (2530). ลูกน้ำยุงลายในชนบทของประเทศไทย. **วารสารโรคติดต่อ**. 13 (4): 362-373.

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา. (2524). การควบคุมและกำจัดยุง. **วารสารสมาคมปาราสิตวิทยาและอายุรศาสตร์เขตร้อนแห่งประเทศไทย**. 4 (1): 35-48.

สัมฤทธิ์ สิงห์อาสา. (2532). **กีฏวิทยา-อะคาโรวิทยา การแพทยและสัตวแพทย์**. หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุชาติ อุปถัมภ์, สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา, วนิดา นาควัชระ, เนาวรัตน์ สุขะพันธุ์, ปัทมาภรณ์ กิติยารักษ์ และชูศักดิ์ ประสิทธิสุข. (2526). **กีฏวิทยาทางการแพทย์**. กรุงเทพฯ :บารมีการพิมพ์.

สุภัทร สุจริต. (2531). **กีฏวิทยาการแพทย์**. กรุงเทพฯ: พิศิษฐ์การพิมพ์.

สุรินทร์ พินิจพงศ์. (2520). Bio-environmental methods in malaria control. **วารสารมาลาเรีย**. 12 (6):3-13.

สุรีลักษณ์ รอดทอง, หนึ่ง เตียอำรุง, ทัศนีย์ สุโกศล, สิทธิโชค แสงโสดา และ เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์. (2542). **ปฏิบัติการจุลชีววิทยา.** สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุทธิ เกษมสุข. (2543). **ประสิทธิภาพของ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* ในโอ่งมังกรต่อลูกน้ำยุงลาย *AEDES AEGYPTI* (LINNAEUS) ระยะที่ 1-4**. ภาคนิพนธ์ปริญญาสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. (2524). **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปูนซีเมนต์ผสม.** พิมพ์ครั้งที่ 4. (ม.ป.ท.).

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. (ม.ป.ป.). **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมถังพลาสติก. กรุงเทพฯ**. มิตรเจริญการพิมพ์.

สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา. (2542). **รายงานระบาดวิทยาโรคไข้เลือดออกประจำปี 2542**. ฝ่ายระบาดวิทยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา.

สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา. (2545). **รายงานระบาดวิทยาโรคไข้เลือดออกประจำปี 2544**. ฝ่ายระบาดวิทยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา.

องอาจ เจริญสุข. (2520). รายงานการพบลูกน้ำยุงลายในท่อระบายน้ำโสโครก. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 19(4):233-34.

องอาจ เจริญสุข . (2538). **ระบาดวิทยาของไข้เลือดออกในประเทศไทย**. สำนักงานปลัดกระทรวงกระทรวงสาธารณสุข.กรุงเทพฯ. อ้างถึงใน วลัยรัตน์ ตัณฑประศาสตร์. (2539). **การศึกษาประสิทธิภาพประสิทธิผลและความคงทนของสารสกัดจากใบและเมล็ดมันแกวในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร มหาวิทยาลัยมหิดล.

องอาจ เจริญสุข, สัจจะ เสถบุตร, กิตตินันท์ สิงห์กลาง, แตงไทย เยาวะ, สำเริง ภู่ระหงษ์ และ ปรียา สุวรรณคีรี. (2533). ความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายในโอ่งซีเมนต์ขนาดใหญ่และถังคอนกรีตเก็บน้ำฝน. **วารสารโรคติดต่อ**. 11(3): 247-262.

อัจฉรา ตันติโชดก. (ม.ป.ป.). **การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย เล่มที่ 1**. กลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

อาคม สังข์วรานนท์. (2538). **กีฏวิทยาทางสัตวแพทย์**. หมวดวิชาปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 4. นนทบุรี: สหมิตรพริ้นติ้ง.

อารีย์รัตน์ ศรีจักรวาลวงษ์, สำลี โพธิปัญญา,สุนทรี โรจน์สุพจน์, ไพรจิตร วราชิต. (2536). การตรวจยืนยังการติดเชื้อเดงกิวในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก พ.ศ.2529-2532. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 35(1): 13-24.

อุษาวดี ถาวระ. (2533). การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของยุงลาย. **การประชุมสัมมนาหลักสูตรการควบคุมยุงลาย 2-4 เมษายน 2534 ณ ศูนย์ฝึกอบรมสาธารณสุขมูลฐาน จังหวัดนครศรีธรรมราช**: 12-16. กรุงเทพฯ.

อุษาวดี ถาวระ. (2533). การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของยุงลายในประเทศไทย. **โครงการทบทวนเทคโนโลยีและรูปแบบการควบคุมยุงลายพาหะนำไข้เลือดออกในประเทศไทย พ.ศ. 2501-2532**. กองกีฏวิทยาการแพทย์ : 5-16. กรุงเทพฯ.

Agriculture Canada, Food Production and Inspection Branch. (1982). **Report of new regristration: *Bacillus thuringiensis* serotype H14 . Ottawa, Ontario, Canada. Q**uoted in **Cornell University ithaca New York.** (1998). *Bacillus thuringiensis* var.*israelensis.*[On-lines].Available:http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect_mite /abamecti

Alameda County Mosquito Abatement District. (1998). **Mosquito prevention considerations for fish ponds.** [On-Lines]. Available:http://mosquito.landminds.com/ pulicinfo/ fpconst. Html

Ali A. (1981). ***Bacillus thuringien* serotype *israelensis* (ABG-6108) against chironomids and some non-target aquatic invertebrates**. **J. Invertebr. Pathol**. (38): 264-73

Becker, N., Zgomba, M., Ludwig, M., Petric, D., and Rettich, F. (1992) .Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. **J. Am. Mosq. Control Assoc**. (8): 285-9. อ้างถึงใน นิตยาจาร กิตติเดชา. (2540). **ประสิทธิภาพและความเป็นอยู่ของ *Bacillus thuringiensis* var.*israelensis* ที่มีผลต่อลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* (Linnaeus) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Boonlaun Panthumchinda, Somsak Phan U-rai, Wongsiri Samuthrapong, Ongoarg Charoensook and Poonyos Rielrangboonya. (2523). Surveillance and control of the vectors of dengue and Chikungunya in Thailand 1973-1978. **Bull. Dept. Med. Sci.** 22(3):151-8.

Bulla, L.A., G.S/ Julian, R.A. Rhodes, and C.W. Hesseltine. (1970). Physiology of spore forming bacteria associated with insects. I. Glucose catabolism in vegetative cell. **Can. J. Microbiol**. (16): 223-248.

Bulla, L.A., Kramer, K.J. Jr, and Devidson, L.T. (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. **J. Bact.** (130): 375-383.

Burges, H.D., and N.W. Hussey. (1971). **Microbial control of insects and mites**. London.: Academic Press.

Car, M. (1984). Laboratory and field trials with two *Bacillus thuringiensis* var.*israelensis* products for S*imulium* (Diptera: Nematocera) control in a small polluted river in South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res**. (51): 155-160.

Chanan Angsuthanasombat. (1996). Structures of *Bacillus thuringiensis* larvicidal - endotoxin . ใน สมคิด ดิสถาพร. **การประชุมสัมมนาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช** (หน้า 78-85). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

Chapman, H.C. (1985). **Biological control of mosquitoes**. 6th (ed.). Print in the United State of America.

Clements. (1963). ม.ป.ท. อ้างถึงใน สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ. (2526). **กีฏวิทยาทางการแพทย์**. กรุงเทพฯ: บารมีการพิมพ์.

Clements, A.N. (1992). **The biology of mosquitoes**. London: Chapman and Hall.

Cornell University ,Ithaca ,New York. (1998). ***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. [On-Lines]. Available: http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect_mite/abamecti

Couch TL, Ross DA. (1980). Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotech. Bioeng**. 22:1297-304

De Barjac H. (1979). Note on the preparation of a *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. **WHO/VBC/79.741.**

De Barjac ,H., and Coz, J. (1979). Sensibilite compary de six especes differentes de moustiques a *Bacillus thuringiensis* var .*israelensis* . **Bull. WHO.** (57): 139-141.

De Barjac ,H., and Sutherland, D.J. (1990). **Bacterial control of mosquitoes & black files**. USA: Rutgens University Press.

Ejiofor, A.O., and N. Okafor. (1989). Production of mosquito larvicidal *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on row material media from Nigeria. **J. App. Bacterio**. (67): 5-9.

Entwistle, P.E., J.S. Cory, M.J. Bailey, and S.Higgs. (1993). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons. 311p.

Finney, P.G. (1964). **Probit analysis.** 2 nd ed. London:Cambridge University Press.

Fisher R., and Rosner L. (1959). Toxicology of the microbial insecticide thuricide. **Ariculture Food Chem**. (7): 686-8.

Floore Tom. (1994). **Mosquito Information** .[On-Lines]. Available:http://mosquito.org/ mosquito. html.

Focks, D.A., Dame, D.A., Comeron, A.L., and Boston, M.D. (1980). Predator-prey interaction between insular populations of *Toxorhynchites rutilus* and *Ae. aegypti*. **Environ. Entomol**. (9): 37-42.

Foo, E.S., Annie, and Yap, H.H. (1982). Comparative bioassay of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations against four species of mosquito in Malaysia. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth**. (13): 206-210.

Frankenhuyzen Van, Nystrom, K., and Nystrom, C. (1998). **The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database.** [On-Lines]. Available: http://www.glfc.forestry.ca/english/res/ Bt_Hompage/netintro.htm

Gillett, J.O. (1972). **The mosquitoes**. Garden city. New York: Doubleday & Company.

Gillett, P.,and Escaffre, H. (1979). Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. part 2, Efficacite′ comparee′ de trois formulations experimentales**. WHO/VBC/79.735. Mimeo**

Goldberg, L.I., and Magalit, J. (1977). A Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. **Mosq. News**. (37): 355-358.

Hayes, W.J. (1982). **Pesticide studied in man.** Baltimore, MD: Wiliams and Wikins. Quoted in **basic Manufacturer-Abbott Labs**. (1993). [On-Lines]. Available: http://pmep.cce. cornell.edu/profiles/extoxnet/24d_captan/bt_ext.html

Ignoffo, C.M., Garcia, C., Kroha, M.J., Fukuda,T., and Couth,T.L. (1981). Laboratory test to evaluate the potencial efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use againtst mosquitoes. **Mosq. News.** (41): 85-93.

Ignoffo, C.M. (1981). Nonsusceptibility of lizards exposed to the entomopathogen *Bacillus sphaericus*. **Appl. Environ. Microbiol**. (42): 638-640.

Jariya Chanpaisang. (1995). Strain diversity of *Bacillus thuringiensis* in Thailand. **Workshop on Application of Microbial in Plant Pest Management**. 20-23 November. Rama Garden Hotel, Bangkok. 8 p.

Kang, B.C., S.Y. Lee, and H.N. Chang. (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* spore in total cell retention culture and two-stage continuous culture using an internal ceramic filter system. **Biotech. Bioeng**. (42): 1107-1112.

Khawaled, K., Cohen,T., and Zaritsky, A .(1992) . **Digestion of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores by larvae of *Aedes aegypti*** . [On-Lines]. Available: http://www.ncbi.nih.gov

Knepper R.G, Wagner S.A, Walker E.D. (1991). Aerially applied, liquid *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) for control of spring *Aedes* mosquitoes in Michigan. **J. Am. Mosq. Control Assoc**. (7) :307-9.

Lacey, L.A., Mulla,M.S., and Dulmage, H.T.(1978) . Some factors affecting the pathoginicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner agains blackflies. **Environ. Entomol**. (7) :583-588.

Nathawut Thanee. (1980). **Effects of toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Aedes aegypti* larvae in field trials.** M.Sc.Thesis. Faculty of Graduate Studies. Mahidol University.

Natrella, M.G. (1963). **Experimental statistics.** National Bureau of standard hand book 91. U.S. Government Printing Office. Washington, D.C.

Nickerson, K.W., and L.A. Bulla. (1974). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements of growth sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. **App. Microbiol**. (28) :124-128.

Novak R.J., Gubler D.J., and Underwood D. (1985). Evaluation of slow release formulation of Temephos (Abate®) and *Bacillus thuringiensis* var.*israelensis* for the control of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. **J. Am. Mosq. Control Assoc**. (1) :449-53.

Obeta, J.A . (1996). **Effect of inactivation by sunlight on the lavicidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from Nigerian soils**. [On-Lines]. Available: http://www.ncbi.nih.gov

Obeta, L.A.N., and N. Okafor. (1984). Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **App. Environ. Mcrobiol**. 47(4): 863-867.

Olejnicek, J. (1986). The use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the biological control of blackflies in Czechoslovakia. **Wiad. Parazytol.** (32): 539-542.

Pant, C.P., Jatanasen, S., Yasuno, M. (1973). Prevalence of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* and observations on the ecology of DHF in several areas of Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth**. (4):113-21.

Potter, M.F., and Knapp, F.W . (1994). **Kentucky mosquitoes and their control**. Department of Entomology University of Kentucky. [On-Lines]. Available: http://www.uky.edu/ Agriculture/Entomology/entfacts/misc/ef005.html

Roe, R.M., and Motoyama , N. (1991). **Vertebrate toxicology of the solubilized parasporal crystalline protiens of *Bacillus thuringiensis* susp. *israelensis* in Hodgson**. Reviews in pesticide toxicology 1: Pesticide and future**:** Toxicological studies of risks and benefits. North Carolina State Univ., Raleigh, N.C. Quoted in **basic Manu facturer-Abbott Labs**. (1993). [On- Lines]. Available: http://pmep.cce.cornell. edu/profiles/extoxnet/24d_captan/bt_ext.html

Salamon, Mardihusodo, S.J., Romas, M.A. (1994). Residual toxicity of *Bacillus thuringiensis* H-14 (VCRC B-17) in some of breeding piaces of *Aedes aegypti*. **Bulletin Penelitian Kesehatan.** (22): 63-68.

Sample, J.R., Bruettner, H. (1983). Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). **Am. J. Ophthalmol**. (95): 258-260.

Scalon, J.E. (1965). The distribution of *Aedes aegypti* in Thailand. **Mosq. news**. (25):199-203

Service, M.W. (1983). Biological control of mosquitoes has it a future. **Mosq. News**. (43): 113-120.

Shadduck, J.A. (1980). *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 maximum challenge and eyes irritation safety tests in mammals. **WHO/VBC**. (763):1-12.

Sinegre, G., Gaven, B., and Jullien, J.L. (1979). Safety of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 for non-target organisms in mosquito breeding sites of the French Mediterranean coast. **WHO/VBC/97.742.**

STAT 2002 SPSS 10.0.7 for Windows. [Computer program]. (2002). 1996 lac.

Sun, C.N., Geoghiou, G.P., and Weiss, K. (1981). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to mosquito larvae variously resistant to conventional insecticides. **Mosq. News.** (40): 614-618.

Susa, M., Kurihara, T., Dhanvanij, O., and Harinasuta, C. (1964). Observation a mosquito eating fish (*Lebister reticulatus*) breeding in polluted water in Bangkok. **WHO, Vector Control**. (99): 64.22.

Thiery, l., Fouque, F., Gaven, B., and Lagneau, C. (1999). **Residual activity of *Bacillus thuringiensis* serovars *medillin* and *jagathesan* on *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* larvae**. [On-Lines]. Available: http://www.ncbi.nih.gov

Thiery, l., and Hamon, S. (1998). **Bacteria control of mosquito larvae: investigation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* standard powders** . [On-Lines]. Available: http://www.ncbi.nih.gov

Tyrell, D.J., Devidson, L.I., Bulla, L.A.Jr., and Ramoska, W.A. (1979). **Toxicity of parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* susp. *israelensis* to mosquito**. (38):656-658.

Tyrell, D.J., Bulla, L.A.J.R., Andrew, J.R. Jr., Kramer, K.J., Devidson, L.I., and Nordin, P. (1981). Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals selected of *Bacillus thuringiensis* strains. **J. Bact**. (145):1052-1062.

U.S. Enviromental Protection Agency. (1986). **Pesticide fact sheet for *Bacillus thuringiensis***. Fact sheet no.3 Office of Pesticide Programs. Washington, DC. Quoted in **Basic manufacturer-abbott labs**. (1993). [On-Lines]. Available: http://pmep.cce. cornell.edu/ profiles/extoxnet/24d_captan/bt_ext.html

Vanessen, F.W., and Hembree, S.C. (1982). Simulated field studies with four formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes. **Mosq. News.** (42): 66-72.

WHO. (1979). Data sheet on the biological control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. (De Barjac 1978). **WHO/VBC/79**. (750): 1-13. อ้างถึงใน นิตยาจาร กิตติเดชา. (2540). **ประสิทธิภาพและความเป็นอยู่ของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ที่มีผลต่อลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* (Linnaeus) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และ ดินเผา**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

WHO. (1979). Report of a meeting on standarddization and industrial development of microbial control agents. **WHO/TDR/BCV/79**.01. อ้างถึงใน นิตยาจาร กิตติเดชา. (2540). **ประสิทธิภาพและความเป็นอยู่ของ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ที่มีผลต่อลูกน้ำ**

ยุงลาย *Aedes aegypti* (Linnaeus) ในภาชนะพลาสติก ซีเมนต์ และดินเผา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Wongsiri Siriwat. (1976). Biological control of mosquitoes. **Thai J. Agr. Sci**. (9): 119-125.

ประวัติผู้เขียน

นางสุทารัตน์ พรจรรยา เกิดเมื่อวันที่ 4 พฤศจิกายน พ.ศ.2512 สำเร็จการศึกษาระดับ ประถมศึกษาที่โรงเรียนพิบูลย์อุปถัมภ์ กรุงเทพมหานคร ระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสตรีวิทยา 2 กรุงเทพมหานคร ระดับปริญญาตรีที่คณะพยาบาลศาสตร์ วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ.2534 ปัจจุบันรับราชการที่กลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภคและเภสัชสาธารณสุข สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา