

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

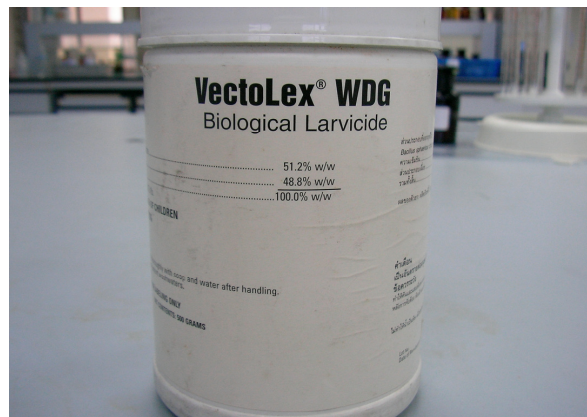
2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 วัสดุ

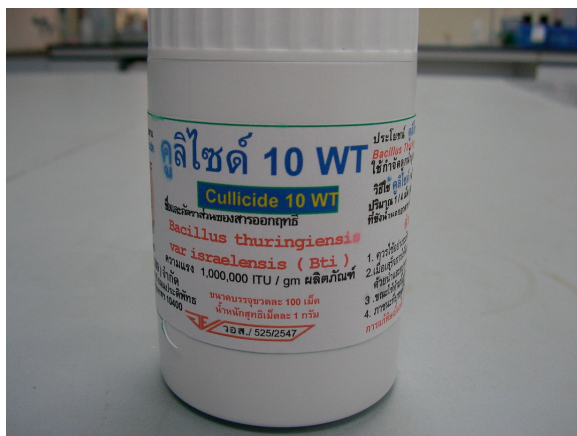
วัสดุที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วย แบคทีเรียสูตรสำเร็จสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม

2.1.1.1 แบคทีเรียสูตรสำเร็จ

- *Bti* สูตรสำเร็จ (Cullicide 10 WT) (ภาพประกอบ 7)
- *Bs* สูตรสำเร็จ (Vectolex® WDG) (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 7 *Bs* สูตรสำเร็จ ((Vectolex® WDG)



ภาพประกอบ 8 Bti สูตรสำเร็จ (Cullicide 10 WT)

2.1.1.2 สารเคมี

- Alkali iodide azide reagent (AIA)
- conc. H_2SO_4
- $MnSO_4$
- Potassium iodide (KI)
- 0.025 M $Na_2S_2O_3$
- Potassium bi-iodate [$KH(IO_3)_2$]
- น้ำแข็ง
- Phosphate buffer solution
- Magnesium sulfate solution
- Calcium chloride solution
- Ferric chloride solution
- 1+9 H_2SO_4

2.1.2 อุปกรณ์

เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำ และอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางด้านกายภาพและเคมี ดังนี้

2.1.2.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างน้ำ

- ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร
- กล้องโฟมมีน้ำแข็งสำหรับรักษาอุณหภูมิตัวอย่างน้ำ

- ขวดน้ำกลั่น

- ทิชชู

- ปากกาเคมี

2.1.2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์ทางด้านกายภาพและเคมี

- pH meter ของ Russel รุ่น RL 150

- Thermometer

- กล้องจุลทรรศน์ ของ Nikon รุ่น Alphaplot-2

- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ของ Mettler รุ่น AB 204

- โถดูดความชื้น (desiccator)

- จานกระเบื้อง

- กระจกบอควง (cylinder) ขนาด 20,100,1000 ml

- อ่างไอน้ำ (steam bath) ของ Memmert รุ่น W 760

- เตาอบ (drying oven) ของ Memmert รุ่น ULM 500

- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250 ml

- ปิเปต (pipette) ขนาด 5,10 ml

- ขวดรูปกรวย (volumetric flask) ขนาด 250,500 ml

- บิวเรตต์ (buret) ขนาด 25,50 ml

- Air incubator (อุณหภูมิ 20 ± 1 องศาเซลเซียส)

- เครื่องเติมอากาศ และ หัวลูกฟู้

- ลูกสูบยาง (pipette bulb)

- แท่งแก้ว

- Stand and clamp

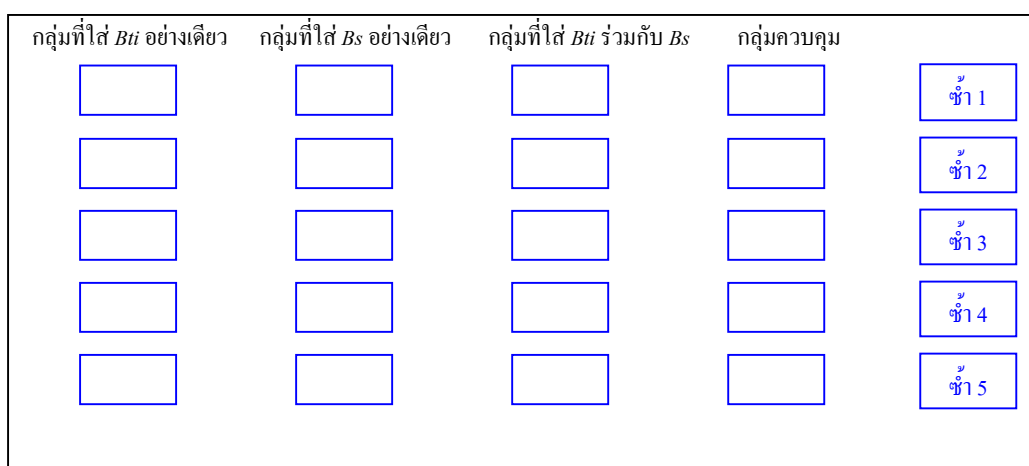
- ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมจุกแก้วที่เป็น ground joint

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาคุณภาพน้ำจากแหล่งน้ำ 3 แหล่งที่มีคุณภาพน้ำแตกต่างกันก่อนนำมาทำการทดลองในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญระหว่างกลุ่มที่ใส่ *Bti* ร่วมกับ *Bs* ในอัตราส่วน 1 : 1 กับกลุ่มที่ใส่ *Bs* อย่างเดียว และกลุ่มที่ใส่ *Bti* อย่างเดียว และในขั้นตอนที่ 3 เป็นการศึกษาคุณภาพน้ำหลังจากทดลองเสร็จแล้วเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของคุณภาพน้ำก่อนทดลองและหลังทดลอง โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้

2.2.1 เลือกน้ำจากแหล่งน้ำ 3 แหล่งที่มีคุณภาพน้ำแตกต่างกัน เช่น จากท่อระบายน้ำและแอ่งน้ำขัง โดยเลือกน้ำสกปรกมาก (BOD 80-100 mg/L) น้ำสกปรกปานกลาง (BOD 40-60 มก./ลิตร) และน้ำสกปรกน้อย (BOD 0-20 มก./ลิตร) (ภาคผนวก ก) โดยตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำที่ 1 เป็นน้ำสกปรกน้อย (BOD 0-20 มก./ลิตร) นำน้ำมาปริมาณทั้งหมด 800 ลิตร

2.2.2 นำน้ำจากแหล่งน้ำที่ 1 มาใส่ในตู้ปลาขนาด 30 x 62 x 30 ซม. จำนวน 4 ตู้ๆ ละ 40 ลิตร ซึ่งให้ตู้ 3 ตู้ เป็นกลุ่มทดลอง (ได้แก่ กลุ่มที่ใส่ *Bti* อย่างเดียว, กลุ่มที่ใส่ *Bs* อย่างเดียว และ กลุ่มที่ใส่ *Bti* ผสมกับ *Bs* ในอัตราส่วน 1 : 1) และ อีก 1 ตู้ เป็นกลุ่มควบคุม ทำ 5 ซ้ำ (ใช้ตู้ปลาทั้งหมด 20 ตู้) (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 แสดงรูปแบบการวางตู้ปลาที่ใช้ในการทดลองกับตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำใด ๆ

2.2.3 ศึกษาคุณภาพของน้ำในแต่ละตู้ โดยการหาค่า BOD, DO, pH, Total Solids, conductivity และ อุณหภูมิของน้ำ ตาม Standard Method for Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 1998)

2.2.4 นำลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 3-4 จากแหล่งเพาะพันธุ์ธรรมชาติแหล่งเดียวกันใส่ในตู้ทั้ง 4 ตู้ๆ ละ 50 ตัว (รวมทั้งหมด 1,000 ตัว) พร้อมๆ กัน (โดยนำลูกน้ำยุงรำคาญมาทำการแยกกระยะโดยเลือกลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 3-4 นำไปแยกใส่ถาดอะลูมิเนียมไว้ต่างหาก แล้วนำไปแยกใส่ บีกเกอร์ 20 บีกเกอร์ๆ ละ 50 ตัว พร้อมทั้งจะนำไปใส่ในแต่ละตู้)

2.2.5 เตรียมสารละลายของ *Bti* ร่วมกับ *Bs*, *Bs* อย่างเดียว และ *Bti* อย่างเดียว โดยใช้ *Bti* สูตรสำเร็จ (Cullicide 10 WT) ซึ่งมีความแรง 1,000,000 ITU/กรัม ในปริมาณ 5 มิลลิกรัม/ลิตร (1,075.27 มิลลิกรัม/ตารางเมตร) และ *Bs* สูตรสำเร็จ ((Vectolex® WDG) ซึ่งมีความแรง 650 *Bs* ITU/มิลลิกรัม

ในปริมาณ 1.5 ปอนด์/เอเคอร์ (หรือ 170.25 มิลลิกรัม/ตารางเมตร) โดยในการใช้ *Bti* ผสมกับ *Bs* นั้น จะใช้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

2.2.6 จากนั้น นำบีกเกอร์ที่ใส่สารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้เทลงในตู้พร้อมๆ กัน ในแต่ละซ้ำ

2.2.7 หลังจากนั้น 24 ชม. ทำการติดตามประเมินผลโดยการนับจำนวนลูกน้ำยุงรำคาญทั้ง 20 ตู้ โดยเริ่มจากซ้ำ 1 ไปจนถึงซ้ำ 5

2.2.8 ทำการติดตามประเมินผลทุก 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งลูกน้ำยุงรำคาญในกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่มตายทั้งหมด

2.2.9 หา % การลดลงของจำนวนลูกน้ำยุงรำคาญ (% reduction) (Mulla *et al.*, 1971) และ % ลูกน้ำที่สามารถเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ในกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่มเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อดูประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญระหว่างกลุ่มที่ใส่ *Bti* ร่วมกับ *Bs* ในอัตราส่วน 1 : 1 กับกลุ่มที่ใส่ *Bs* อย่างเดียว และกลุ่มที่ใส่ *Bti* อย่างเดียว

2.2.10 จากนั้นทุก ๆ 7 วัน ทำการใส่ลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 3-4 จากแหล่งเพาะพันธุ์ธรรมชาติ แหล่งเดิมใส่ในทั้ง 4 กลุ่ม ที่เป็นกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม ตู้ละ 50 ตัว (ทั้งหมด 1,000 ตัว) และติดตามประเมินผลเหมือนครั้งแรกที่ใส่ลูกน้ำยุงรำคาญ

2.2.11 ทำซ้ำข้อ 2.2.10 จนครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อครบ 8 สัปดาห์ ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญระหว่างกลุ่มทดลองที่ใส่ *Bti* ร่วมกับ *Bs* ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 กับกลุ่มทดลองที่ใส่ *Bs* อย่างเดียว และกลุ่มทดลองที่ใส่ *Bti* อย่างเดียว โดยเปรียบเทียบระยะเวลาในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญว่าแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร

2.2.12 วิเคราะห์คุณภาพของน้ำในแต่ละถังอีกครั้ง โดยการหาค่า BOD, DO, pH, Total Solids, conductivity และ อุณหภูมิของน้ำ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของคุณภาพน้ำก่อนทดลองและหลังทดลอง

2.2.13 เริ่มตั้งแต่ข้อ 2.2.2 – 2.2.12 โดยเปลี่ยนตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำที่ 1 เป็นแหล่งน้ำที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

2.3 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

พารามิเตอร์	วิธีการวิเคราะห์
ความเป็นกรดค่า	pH meter
DO (Dissolved Oxygen)	Azide modification
BOD (Biochemical Oxygen Demand)	5 Days BOD test
Total Solids	Dried at 103-105 °C
conductivity	Conductivity meter
อุณหภูมิ	Thermometer

ที่มา : APHA, AWWA and WEF, 1998

หมายเหตุ รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในภาคผนวก จ

2.4 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

2.4.1 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ค่าเฉลี่ย, % การลดลงของจำนวนลูกน้ำยุงรำคาญ และ % ลูกน้ำที่สามารถเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้

$$\% \text{ การลดลงของจำนวนลูกน้ำยุงรำคาญ} = 100 - \left[\frac{C_1 \times T_2}{T_1 \times C_2} \right] \times 100$$

(Mulla *et al.*, 1971)

C_1 = จำนวนลูกน้ำ, ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยในกลุ่มควบคุมก่อนทดลอง

C_2 = จำนวนลูกน้ำ, ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยในกลุ่มควบคุมหลังทดลอง

T_1 = จำนวนลูกน้ำ, ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยในกลุ่มทดลองก่อนทดลอง

T_2 = จำนวนลูกน้ำ, ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยในกลุ่มทดลองหลังทดลอง

$$\% \text{ ลูกน้ำที่สามารถเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้} = (A/B) \times 100$$

A = จำนวนลูกน้ำที่สามารถเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ในกลุ่มทดลอง

B = จำนวนลูกน้ำที่สามารถเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ในกลุ่มควบคุม

2.4.2 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงวิเคราะห์ (analytical statistics) โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ analysis of variance โดยใช้ Tukey HSD test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง % การลดลงของจำนวนลูกน้ำ และ % ลูกน้ำที่สามารถเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ของกลุ่มทดลองที่ใช้ B_{ti} ร่วมกับ B_s กับกลุ่มทดลองที่ใช้ B_s อย่างเดียว และกลุ่มทดลองที่ใช้ B_{ti} อย่างเดียวทั้ง 3 ตัวอย่างน้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของคุณภาพน้ำก่อนทดลองและหลังทดลองของแต่ละตัวอย่างน้ำทั้ง 3 แหล่งน้ำ