

บทที่ 3

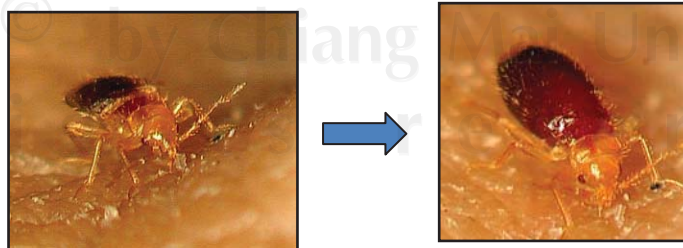
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การสำรวจเรือดในแหล่งที่อยู่อาศัย เพื่อจำแนกชนิดและศึกษาวงจรชีวิต

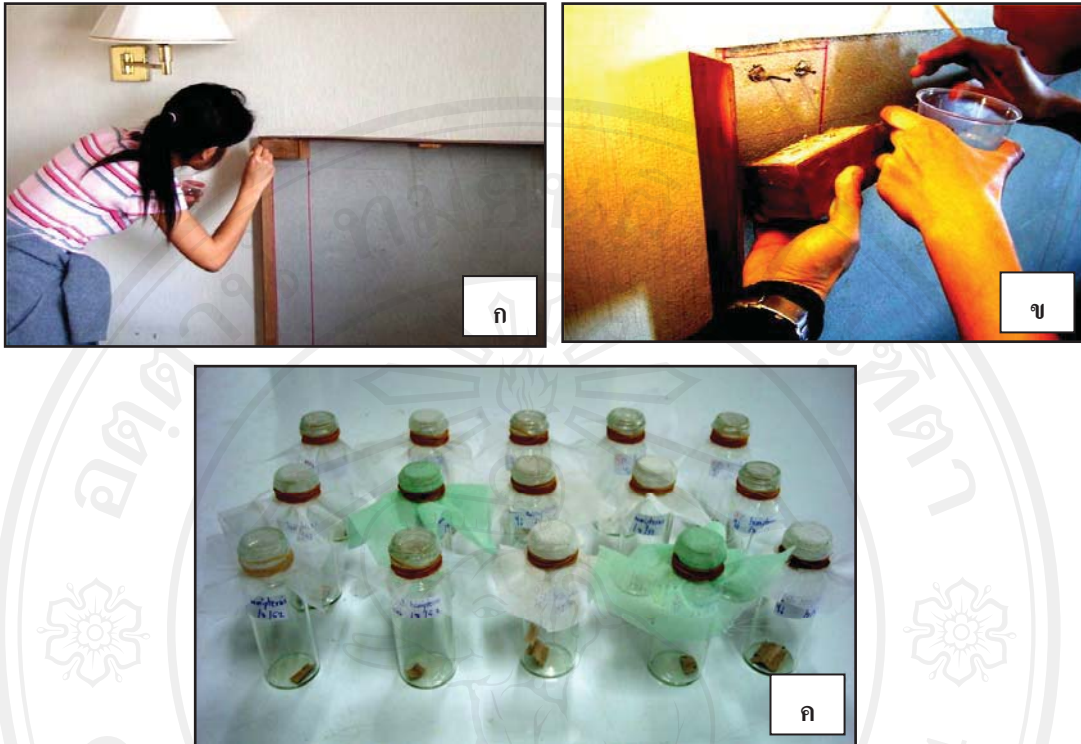
ทำการสำรวจเรือดในแหล่งที่อยู่อาศัยตามที่ต่าง ๆ เช่น โรงแรม เกสต์เฮ้าส์ หอพัก เป็นต้น โดยวิธีการสำรวจนั้นสามารถหาเรือดได้ตามบริเวณที่มีชอกหลืบ มุมอับของพื้นที่บริเวณนั้น ๆ เพราะเรือดมักหลบซ่อนในใกล้ ๆ บริเวณที่มีคนหรือสัตว์เลี้ยงเฝ้าดูนอนอาศัยอยู่ เช่น เติง โตะ ผ้าม่าน เป็นต้น จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเรือดโดยใช้ฟู่กันเขี่ยตัวเรือดใส่ลงในแก้วพลาสติก ที่ภายในแก้วบรรจุด้วยกระดาษที่พับเป็นรอยหยัก เพื่อให้เหมาะกับพฤติกรรมของเรือดที่มักหลบซ่อนตามร่อง หรือรอยแตก จากนั้นปิดปากแก้วพลาสติกด้วยผ้าขาวบางเพื่อให้อากาศถ่ายเทสะดวก

นำเรือดที่รวบรวมได้จากที่พักอาศัยในจังหวัดชลบุรี และจังหวัดเชียงใหม่นำมาจำแนกชนิด วิธีการนั้นจะใช้หลักเกณฑ์การจำแนกตามวิธีการของ Pratt and Stojanovich (1962) รวมถึงการใช้กล้อง ocular micrometer อัตรากำลังขยาย 4 เท่า เพื่อทำการวัดอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของสันหลังอกปล้องแรก (pronotum)

เมื่อจำแนกชนิดเรือดได้แล้ว คัดเรือดตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียแต่ละชนิด ซึ่งพบในแต่ละพื้นที่ใส่ลงในแก้วพลาสติกใสที่มีกระดาษพับซ้อนกันไปมาเป็นรอยพับหยัก (เพื่อให้แมลงมีพื้นที่หลบซ่อนตัว) ปิดปากแก้วด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ 2-5 วัน เพื่อให้เรือดมีการผสมพันธุ์และวางไข่ จากนั้นทำการนำไข่เรือดที่ติดอยู่บนกระดาษใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 5.8 เซนติเมตร หลอดละ 1 ฟอง ปิดปากหลอดด้วยผ้าขาวบาง เก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่ควบคุมความชื้นประมาณ 75% RH ทำชนิดละ 10 ซ้ำ เพื่อบันทึกการเจริญเติบโตของเรือดแต่ละระยะ (ภาพที่ 3.1-3.2)



ภาพที่ 3.1 เรือดกำลังดูดเลือดจากสัตว์อาศัย (host)



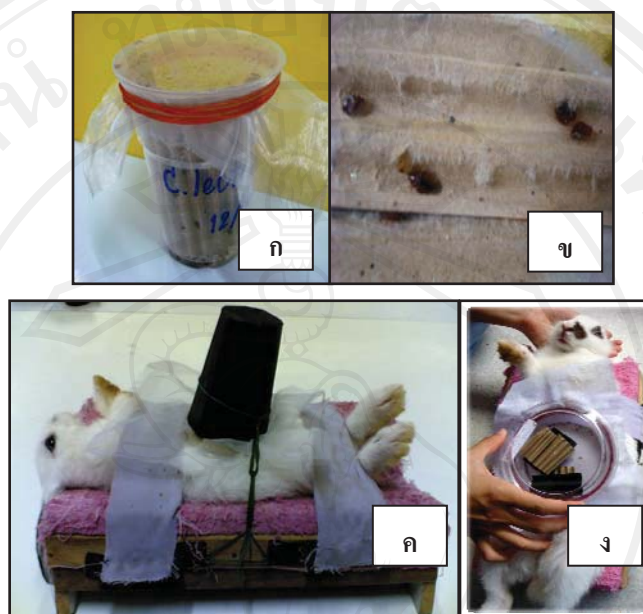
ภาพที่ 3.2 แสดงการออกสำรวจเพื่อเก็บตัวอย่างเรือดในสภาพแหล่งที่อยู่อาศัย (ก, ข) หลอดแก้วขนาดเล็กซึ่งแต่ละหลอดบรรจุไข่เรือด 1 ฟอง เพื่อนำมาศึกษาวงจรชีวิต (ค)

3.2 การเพาะเลี้ยงเรือด

ตัวอย่างเรือดเก็บรวบรวมจากพื้นที่ที่ได้รับรายงานว่ามีการระบาดในแหล่งที่อยู่อาศัยต่าง ๆ นำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณภายในห้องปฏิบัติการของสาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการทดลองจะต้องใช้เลือดของกระต่ายเป็นอาหารของตัวเรือด ซึ่งได้รับการพิจารณาด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองสำหรับการทำวิทยานิพนธ์แล้ว (ภาคผนวก ค)

วิธีการให้อาหารแก่ตัวเรือดนั้นจะต้องจับกระต่ายนอนหงายลงบนเตียงขนาดพอเหมาะกับความยาวของกระต่าย จากนั้นโกนขนบริเวณใต้ท้องให้มีพื้นที่เพียงพอสำหรับการวางแก้วเลี้ยงตัวเรือด โดยตัวเรือดจะอาศัยอยู่ในแก้วพลาสติกใสที่มีกระดาษพับซ้อนกัน ไปมาเป็นรอยพับหยัก (เพื่อให้แมลงมีพื้นที่หลบซ่อนตัวและวางไข่) ปิดปากแก้วด้วยผ้าขาวบาง คั่วแก้วด้านที่มีผ้าขาวบางลงบนท้องของกระต่าย ตัวเรือดจะดูดเลือดกระต่ายผ่านผ้าขาวบางนี้เป็นเวลา 15-20 นาที ให้อาหารแก่ตัวเรือดทุก ๆ 2 วัน หลังจากนั้นแก้วเลี้ยงแมลงจะถูกเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่ควบคุม

ความชื้นประมาณ 75% RH เช่นเดียวกันกับข้อ 3.1 ซึ่งควบคุมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว บรรจุที่ก้นกล่องพลาสติก ภายใต้ห้องปฏิบัติการอุณหภูมิประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Peterson (1964) (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 แก้วพลาสติกที่บรรจุด้วยกระดาศ์พับซ้อนไปมาเพื่อใช้เป็นที่เพาะเลี้ยงเห็ด (ก) ลักษณะการอยู่อาศัยของเห็ดภายในกระดาศ์ (ข) วิธีเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณประชากรเห็ดโดยใช้เลือดของกระดาศ์ทุกๆ 2 วัน (ค, ง)

การทำกล่องความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์

วัตถุประสงค์ของการทำกล่องความชื้นเพื่อปรับสภาพบรรยากาศให้แมลงอยู่ในสภาพอุณหภูมิและความชื้นที่ค่อนข้างคงที่และมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแมลง โดยปกติแล้วความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของเห็ดนั้นจะอยู่ที่ประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส (Armed Forces Pest Management Board, 2010) วิธีการเตรียมสารละลายทำได้โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 279 กรัมผสมน้ำ 725 มิลลิลิตร (Greenspan, 1977) ต้มจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ให้เย็นจะได้สารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว จากนั้นเทลงบริเวณก้นกล่องประมาณ 2-2.5 ลิตร หาววัสดุที่มีความแห้งปอร่องไว้เพื่อนำภาชนะ (แก้วเลี้ยงเห็ด) วางได้โดยสะดวก ดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 กล่องพลาสติกบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ระดับสารละลายสูงประมาณ 5 เซนติเมตร จากพื้นกล่องที่ทำการปรับความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ (ก) นำแผ่นพลาสติกปูรองเพื่อสำหรับบรรจุแก้วเลี้ยงแมลง (ข) นำแก้วเลี้ยงแมลงวางไว้ด้านบนสุด (ค) ปิดฝากล่องและตั้งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (ง)

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงบางชนิดในการควบคุมเรือด (*Cimex* sp.) ในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบสารเคมีฆ่าแมลงโดยให้ได้รับพิษทางสัมผัส (contact poison) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูในบ้านเรือนเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก โดยแมลงศัตรูจะได้รับสารเคมีทางผนังลำตัวโดยตรง โดยในการทดลองใช้เครื่องฉีดพ่น potter spray tower ซึ่งเป็นเครื่องพ่นชนิดฝอยละเอียด สามารถพ่นถูกตัวแมลงและพื้นผิววัตถุที่แมลงสัมผัสโดยตรง (ภาพที่ 3.5)



ภาพที่ 3.5 เครื่องฉีดพ่น potter spray tower

ทดสอบกับตัวเรือดด้วยสารเคมีฆ่าแมลง ซึ่งเตรียมผสมสารเคมีในความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยการผสมกับน้ำกลั่นอย่างน้อย 5 ชุดความเข้มข้น จากนั้นนำตัวเรือดตัวเต็มวัยละเพศ 4 ตัว/ช้ำ (เนื่องจากแมลงมีการเคลื่อนไหวรวดเร็วจึงใช้จำนวนแมลงเพียง 4 ตัว/จานแก้ว) บรรจุลงในกล่องพลาสติกขนาดเล็ก นำกล่องพลาสติกที่บรรจุตัวเรือดอยู่ แช่ในน้ำแข็งที่มีภาชนะปิดเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ตัวเรือดหมดความรู้สึกหรือเคลื่อนไหวช้าลง หลังจากนั้นเทตัวเรือดใส่ลงใน Petri dish ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ก่อนที่ตัวเรือดจะฟื้นขึ้นมาภายใน 30 วินาที โดยวิธีการพ่นด้วยเครื่อง potter spray tower ในอัตรา 40 ml/m^2 ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงให้ทั่วพื้นผิว Petri dish และลำตัวของแมลง

ตรวจนับเรือดที่ตายภายใน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำทั้งหมด 4 ช้ำในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธีการกำหนดอัตราความเข้มข้นในขั้นเริ่มต้นของการทดสอบนั้นจะใช้อัตราที่นิยมใช้กับแมลงศัตรูในบ้านเรือนเป็นตัวกำหนดขั้นพื้นฐาน (ตารางที่ 3.1) ส่วนในชุดควบคุม (control) ใช้น้ำกลั่นเท่านั้น นับจำนวนตัวเรือดที่ตาย บันทึกผล เพื่อนำมาคำนวณหา LC_{50} (median lethal concentration) โดยใช้โปรแกรม Logit PC สารฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบ มีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม Insect Growth Regulator: pyriproxyfen 10% EW (emulsion, oil in water)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 และ 1:320 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในจานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 78.57, 157.13, 314.27, 628.54 และ 1,257.00 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 2: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoid: acetamiprid 20% SP (water soluble powder)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยกรัม) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:0.125, 1:0.25, 1: 0.5, 1:1 และ 1:2 (L:g) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในจานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 0.98, 1.96, 3.93, 7.86 และ 15.71 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 3: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphate: pirimiphos-methyl 50% EC (emulsifiable concentrate)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:4, 1:8, 1: 16, 1:32 และ 1:64 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในจานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 7.86, 15.71, 31.43, 62.85 และ 125.70 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 4: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphate: propetamphos 20% CS (capsule suspension)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:1.25, 1:2.5, 1: 5, 1:10 และ 1:20 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในจานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 7.86, 15.71, 31.43, 62.85 และ 125.70 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 5: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid: cyfluthrin 5% EW (emulsion, oil in water)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 และ 1:360 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในจานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 58.93, 117.85, 235.70, 471.40 และ 707.10 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 6: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid: bifenthrin 25% WP (wetable powder)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 และ 1:360 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในงานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 294.63, 589.25, 1,178.50, 1,767.76 และ 2,357.01 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 7: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid: alpha-cypermethrin 5% SC (suspension concentrate)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:20, 1:40, 1:60, 1:180 และ 1:360 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในงานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 39.28, 78.57, 117.85, 353.55 และ 707.10 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 8: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid: lambda-cyhalothrin 10% CS (capsule suspension)

เตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:20, 1:40, 1:60, 1:180 และ 1:360 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในงานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 78.57, 157.13, 235.70, 707.10 และ 1,414.20 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 9: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid: permethrin 10%+ tetramethrin 1% EC (emulsifiable concentrate)

สารผสมที่ทำการทดสอบอยู่ในสภาพผสมสำเร็จแล้ว จึงเตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 และ 1:320 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในงานแก้ว จะได้ความเข้มข้นในอัตรา 78.57+ 0.99, 157.13+1.98, 314.27+3.95, 628.54+ 7.90 และ 1,257.00+15.8 mg/m² ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 10: สารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid ผสมกับสารเคมีฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphate: bifenthrin 2.0% + malathion 40% EC (emulsifiable concentrate)

สารผสมที่ทำการทดสอบอยู่ในสภาพผสมสำเร็จแล้ว จึงเตรียมสารฆ่าแมลงโดยใช้น้ำกลั่น (หน่วยลิตร) ผสมกับสารฆ่าแมลง (หน่วยมิลลิลิตร) ทั้งหมด 5 ชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 และ 1:320 (L:ml) ตามลำดับ เมื่อนีดพ่นสารละลายในงานแก้ว จะได้ความเข้มข้น

ในอัตรา 314.27+ 15.72, 628.5 +31.44, 1,257.08+ 62.88, 2,514.15+ 125.75 และ 5,028.30+ 251.50 mg/m² ตามลำดับ

3.4 การทดสอบความคงฤทธิ์ของสารเคมีบางชนิดในการควบคุมเรือด

ทำการคัดเลือกสารเคมีในการทดลอง ข้อ 3.3 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 3 ชนิดใช้วิธีฉีดพ่นให้มีฤทธิ์ตกค้าง (residual spray) สารเคมีลงบนจานแก้ว ในอัตราที่หาได้จากทดสอบกับเรือดหลังจากฉีดพ่น เปรียบเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นสารเป็นระยะเวลา 0 (หลังฉีดพ่น), 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จานแก้วที่ถูกพ่นสารฆ่าแมลงจะถูกเก็บไว้ในกล่องควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ทุกครั้งทั้งก่อนและหลังพ่นสารฆ่าแมลง จากนั้นทดสอบกับเรือดระยะตัวเต็มวัย 10 ตัว ทำ 4 ซ้ำ เตรียมแมลงในแต่ละชุดที่นำมาปล่อยในชุดการทดลองที่เวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตาย ในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากแมลงสัมผัสกับพื้นผิวจานแก้ว จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ตารางที่ 3.1 อัตราความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ที่นิยมใช้กับแมลงศัตรูในบ้านเรือน

สารฆ่าแมลง	ชนิดแมลงศัตรูในบ้านเรือน	อัตราความเข้มข้นที่นิยมใช้กับแมลงศัตรูในบ้านเรือน	ที่มา
pyriproxyfen	ยุง <i>Aedes aegypti</i>	300 mg/m ²	Sihuincha <i>et al.</i> (2005)
metoprene	เรือด <i>C. lectularius</i>	8-16 mg/m ²	Naylor <i>et al.</i> (2008)
acetamiprid	เรือด (bed bug)	0.025-0.05% ai หรือ 12.21 mg/m ²	WIPO (2010)
pirimiphos-methyl	แมลงศัตรูในบ้านเรือนทั่วไป	1000-2000 mg/m ²	Najera and Zaim (2003)
propetamphos	เรือด (bed bug)	0.5-1.0% ai หรือ 200mg/m ²	Rozendaal (1997)
cyfluthrin	แมลงศัตรูในบ้านเรือนทั่วไป	20-50 mg/m ²	Najera and Zaim (2003)
bifenthrin	แมลงศัตรูในบ้านเรือนทั่วไป	25-50 mg/m ²	Najera and Zaim (2003)
alpha-cypermethrin	แมลงศัตรูในบ้านเรือนทั่วไป	20-30 mg/m ²	Najera and Zaim (2003)
lambda-cyhalothrin	แมลงศัตรูในบ้านเรือนทั่วไป	20-30 mg/m ²	Najera and Zaim (2003)
permethrin	เรือด (bed bug)	0.5% ai หรือ 100 mg/m ²	Rozendaal (1997)
Tetramethrin	แมลงวันบ้าน (<i>Musca domestica</i>)	70 mg/m ²	Cakir <i>et al.</i> (2008)
malathion	แมลงศัตรูในบ้านเรือนทั่วไป	200 mg/m ²	Najera and Zaim (2003)