การเพิ่มจำนวนสปอร์ของราเขียว *Metarhizium anisopliae* บนวัสดุทดแทน เพื่อการกำจัดแมลงวันบ้าน

Mass spore production of *Metarhizium anisopliae* on substitute materials for house fly elimination.

นิภัชราพร สภาพพร[1*] ภาวิณี มาน้อย[1]
[1]โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร
69 หมู่ 1 ต.นครชุม อ.เมือง จ.กำแพงเพชร 62000 โทรศัพท์ 0897039007 E-mail nipat_719@hotmail.co.th

บทคัดย่อ

การเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราเขียว (*Metarhizium anisopliae*) เพื่อการกำจัดแมลงวัน เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนสูตรอาหารสังเคราะห์ Czapek Dox Agar (CDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วถ่ายเชื้อลงบนอาหารทดแทน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุทดแทนได้แก่ กากถั่วเหลือง กากมะพร้าว ขุยมะพร้าว มันสำปะหลัง และรำข้าว ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่าง พบว่ากากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำข้าว อัตราส่วน 7:2:1 ให้ปริมาณสปอร์เท่ากับ 6.95 x 10^8 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร หรือ 3.47 x 10^9 สปอร์ต่อกรัมวัสดุเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ลดลง 100 เท่า แล้วฉีดพ่นลงไปโดยตรง พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* Linnaeus) ในระยะหนอนแมลงวันเท่ากับ 75 % ระยะดักแด้เท่ากับ 55 % และระยะตัวเต็มวัยเท่ากับ 50 % ดังนั้นประสิทธิภาพของเชื้อราขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของแมลงวัน โดยระยะหนอนจะเป็นระยะที่อ่อนแอเหมาะแก่การเข้าทำลายของเชื้อรา

คำสำคัญ: เชื้อราเขียวเมตตาไรเซียม แอนนิโซพี การเพิ่มจำนวนสปอร์ วัสดุทดแทน

Abstract

Mass spore production of *Metarhizium anisopliae* for fly's elimination was carried out by culturing the pure culture of fungal mycelium on Czapek Dox Agar media at 25 °C. Then, they were inoculated on the mixture medium of various different ratios of substitute materials: such as soybean meal, coconut meal ,coir-dust, cassava, and bran. The highest spore concentration was observed on the mixture medium supplemented with soybean meal, coir-dust, and bran at the ratio of 7:2:1, which gave rise up to 6.95 x10^8 conidia/ml or 3.47 x 10^9 spore per gram substrate when cultured at 25 °C for 14 days. Then, spores at concentration of 6.95 x10^8 conidia/ml were diluted with sterile distilled water at the concentration of 10^{-2}, and directly sprayed on the house fly (*Musca domestica* Linnaeus) at various growth stages. The efficiency of mortality rate was found at 75% (larvae stage), 55% (pupae stage), and 50% (mature stage). Therefore, the elimination efficiency of fly by this fungus depends on the growth stages of fly, and the larvae stage was the most susceptible to fungal infection than others.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, mass spore production, substitute materials

1. บทนำ

แมลงวันจัดเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์อย่างมาก โดยเป็นพาหะนำพาเชื้อโรคมาสู่มนุษย์และสัตว์เลี้ยงได้มากมายหลายโรค เนื่องจากแมลงวันมักมีนิสัยชอบกินอาหารตามสิ่งสกปรก เชื้อโรคต่างๆ จึงติดตามขาและลำตัวของแมลงวัน เมื่อแมลงวันบินไปตอมอาหาร เชื้อโรคเหล่านั้นจึงตกลงไปอยู่ในอาหาร นอกจากนี้แมลงวันมีนิสัยชอบถ่ายและสำรอกของเหลวออกมาเวลากินอาหาร เชื้อโรคที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของแมลงวันจึงถูกถ่ายทอดลงสู่อาหาร [1] โดยที่เชื้อนั้นเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเช่น โรคบิด โรคไข้ไทฟอยด์ โรคอหิวาห์ตกโรค โรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวชนิดต่างๆ เช่น โรคบิดมีตัวและโรคผิวหนัง เช่น โรคคุดทะราดและโรคเรื้อน เป็นต้น แมลงวันจำนวนมากส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์ ทำให้เกิดความรำคาญและความหวาดกลัว ซึ่งในพื้นที่ที่แมลงวันชุกชุมส่งผลกระทบทางลบต่อการท่องเที่ยว ในปัจจุบันพบการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงตามแหล่งน้ำบนผิวดิน เข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร ซึ่งส่งผลกระทบอย่างกว้างขวางต่อสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยาฆ่าแมลงก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของสัตว์เลี้ยงและผู้ใช้อีกด้วย การยอมรับของผู้บริโภคทั่วโลกมีความต้องการลดการใช้สารเคมีในทางการเกษตร เชื้อราหลายสปีชีร์ถูกนำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับกำจัดแมลงที่ก่อกวนพืชเศรษฐกิจ มนุษย์ และสัตว์ เช่น *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* และ

Beauveria bassiana [2] ดังนั้นผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงประโยชน์ของเชื้อราเขียวที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง จึงนำมาศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนสปอร์บนวัสดุทดแทน จากนั้นนำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการกำจัดแมลงวันบ้าน ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เชื้อราที่สามารถเกิดขึ้นได้จริงในชีวิตประจำวัน

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวัสดุทดแทนและอัตราส่วนของวัสดุทดแทนที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราเขียว และศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันบ้านของเชื้อราเขียว

3. ทฤษฎี กรอบแนวคิดการวิจัยและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราเขียว (*M. anisopliae*) บนวัสดุเหลือทิ้ง เพื่อใช้ในการกำจัดแมลงวัน โดยคัดเลือกวัสดุเหลือทิ้งที่ให้ปริมาณสปอร์ของเชื้อราเขียวมากที่สุด โดยศึกษาอัตราส่วนของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสม จากนั้นนำสปอร์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* Linnaeus) ในแต่ละระยะการเจริญ ได้แก่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย

4. วิธีดำเนินงาน

4.1 การศึกษาศักยภาพของวัสดุทดแทน

4.1.1 การขยายเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

นำหัวเชื้อราเขียว (*M. anisopliae*) นำมาจากศูนย์บริหารศัตรูพืช จังหวัด พิษณุโลก มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox Agar (CDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่อาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นตัดส่วนปลายเส้นใยเชื้อราเขียวลงบนวัสดุทดแทนที่เตรียมไว้

4.1.2 การเปรียบเทียบศักยภาพของวัสดุทดแทน

นำวัสดุทดแทนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง, กากมะพร้าว, มันสำปะหลัง, ขุยมะพร้าว และ รำข้าว ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมวัสดุทดแทนชนิดต่างๆ

สูตรที่	ส่วนผสม	อัตราส่วน
1	กากมะพร้าวผสมรำ	9:1
2	มันสำปะหลังผสมขุยมะพร้าว	9:1
3	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าว	9:1
4	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	8:1:1
5	มันสำปะหลังผสมขุยมะพร้าวและรำ	8:1:1

ผสมวัสดุแต่ละสูตรให้เข้ากันและบรรจุใส่ลงในขวดแก้วแบนในปริมาตร 50 กรัมต่อขวด ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษ และรัดหนังยางให้เรียบร้อยอีกชั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นตัดเส้นใยเชื้อราเขียวที่เลี้ยงจากขั้นตอนที่ 4.1.1 ขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร ถ่ายเชื้อลงบนวัสดุทดแทนทั้ง 5 สูตร ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน หรือจนกว่าจะสร้างสปอร์สีเขียวโดยไม่เขย่าเชื้อ ทำการนับจำนวนสปอร์ในแต่ละสูตรโดย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และหาน้ำหนักแห้งของเชื้อราโดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์และปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใย

4.1.3 การหาอัตราส่วนของวัสดุทดแทนที่เหมาะสม

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณสปอร์บนวัสดุทดแทนทั้ง 5 สูตร ในขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าวัสดุทดแทนสูตร กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ ให้ปริมาณจำนวนสปอร์มากที่สุด ดังนั้นเราจึงทำการทดสอบอัตราส่วนของวัสดุทดแทนสูตรดังกล่าว ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันดังแสดงตารางที่ 2 ผสมส่วนผสมและบรรจุวัสดุทดแทนแต่ละสูตรลงในถุงพลาสติกปริมาณ 250 กรัมต่อถุง ใส่คอขวด ปิดปากถุงด้วยสำลี ปิดทับด้วยกระดาษรัดหนังยางให้เรียบร้อย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นตัดเส้นใยที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนในขั้นตอนที่ 1 ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในวัสดุทดแทนทั้ง 7 สูตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษรัดหนังยางให้เรียบร้อย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเชื้อทุกวัน ตั้งแต่วันแรกที่ใส่เชื้อลงไป

ตารางที่ 2 อัตราส่วนต่างๆ ของวัสดุทดแทนผสมชนิดกากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ

สูตรที่	ส่วนผสม	อัตราส่วน
1	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	8:1:1
2	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	7:1:2
3	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	6:1:3
4	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	5:1:4
5	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	7:2:1
6	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	6:3:1
7	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	5:4:1

ทำการนับจำนวนสปอร์ตั้งแต่วันที่ 4 หลังจากการถ่ายเชื้อ นับปริมาณสปอร์จนกว่าสปอร์ของเชื้อจะลดลงติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน นับสปอร์ทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณความเข้มข้นปริมาณ

สปอร์ของเชื้อราในวัสดุทดแทนทั้ง 7 สูตร โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของเชื้อรา (โคนิเดียต่อมิลลิลิตร) = ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่นับได้ x ค่าคงที่ (2.5×10^5) x ค่าระดับความเจือจางของสปอร์ที่ตรวจนับ

4.2 การกำจัดแมลงวันบ้านโดยใช้เชื้อราเขียว

การเลี้ยงแมลงวันบ้านเพื่อใช้สำหรับทดสอบ เริ่มจากการดักจับแมลงวันบ้านตัวเต็มวัยจากแหล่งตลาดสด โรงฆ่าสัตว์ และกองขยะ โดยการใช้เหยื่อล่อคือ เศษเนื้อวางในภาชนะ แมลงวันที่บินมาเกาะจะทำการวางไข่ จากนั้นนำไข่แมลงวันมาเลี้ยงในขวดที่บุด้วยผ้าขาวบาง ทิ้งไว้ 1 คืน หรือ 24 ชั่วโมง ไข่จะฟักออกเป็นหนอนระยะที่ 1 ย้ายหนอนลงไปไว้อีกกระปุกที่มีเศษเนื้อหั่นเป็นชิ้นบาง 3 - 5 ชิ้น เพื่อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงหนอน ปิดปากกระปุกด้วยผ้าขาวบาง และปิดทับด้วยฝากระปุกอีกชั้น เพื่อป้องกันหนอนแมลงวันหลุดรอดออกมาข้างนอก วิธีการทดสอบความสามารถในการฆ่าแมลงวันของเชื้อรา โดยนำหนอนแมลงวันที่มีอายุ 2 วัน ที่อยู่ภายในขวดเลี้ยงเชื้อโดย 1 ขวดใส่หนอนลงไปจำนวน 20 ตัว จากนั้นนำเชื้อราที่เตรียมไว้ที่ระดับความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ 6.58×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางที่ 10^{-2} เท่า นำเชื้อราเขียวใส่ในกระบอกฉีดน้ำแล้วนำไปฉีดพ่นลงบนตัวหนอน, ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย โดยใช้วิธีฉีดพ่นขวดละ 5 ครั้งต่อขวด บันทึกการตายของแมลงวันบ้านระยะต่างๆ ทุกวัน นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตาย และนำหนอนที่ตายมาตรวจสอบดูเส้นใยและโคนิเดียเชื้อราที่ขึ้นปกคลุม

5. ผลการทดลอง

5.1 การเปรียบเทียบศักยภาพของวัสดุทดแทน

การเจริญของเชื้อราเขียวบนอาหารสังเคราะห์ Czapek Dox Agar (CDA) ในระยะเวลา 14 วัน ให้การเดินของเส้นใยเชื้อราเขียวดีกว่าสูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ออกสีเหลืองปนเขียว มีเส้นใยเป็นสีขาวแผ่กระจายเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนอาหารสูตร PDA จะใช้ระยะเวลาการเดินของเส้นใยเชื้อราเขียวนานกว่าอาหาร CDA ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารสังเคราะห์ CDA สำหรับการเลี้ยงเชื้อราเขียวในการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับวิจัย P. Soundarapandian and R. Chandra (2007) [3] ได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* บนสูตรอาหารเหลวทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ PDA , SDA, SMA, SAME, MEA, CDA บ่มที่ 10, 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางและนับจำนวนสปอร์ พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* เจริญได้ดีใน Czapek Dox Agar (CDA) ให้ปริมาณสปอร์เท่ากับ 3.3×10^7 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสูตรอาหาร PDA ให้ปริมาณสปอร์เท่ากับ 2.8×10^7 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร เจริญดีในอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุทดแทนที่นำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราเขียว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน นำส่วนผสมวัสดุทดแทนทั้งหมด 5 สูตร มาทำการตรวจสอบจำนวนปริมาณสปอร์และปริมาณน้ำหนักแห้ง แสดงตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณสปอร์และน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงในแต่ละสูตรอาหาร

สูตรที่	ส่วนผสม	ปริมาณสปอร์ (conidia/ml)	น้ำหนักแห้ง (g/ml)
1	กากมะพร้าวผสมรำ	5.22×10^7	0.0105
2	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ	1.90×10^8	0.0132
3	กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าว	1.07×10^8	0.0180
4	มันสำปะหลังผสมขุยมะพร้าวและรำ	4.62×10^7	0.049
5	มันสำปะหลังผสมขุยมะพร้าว	1.87×10^7	0.020

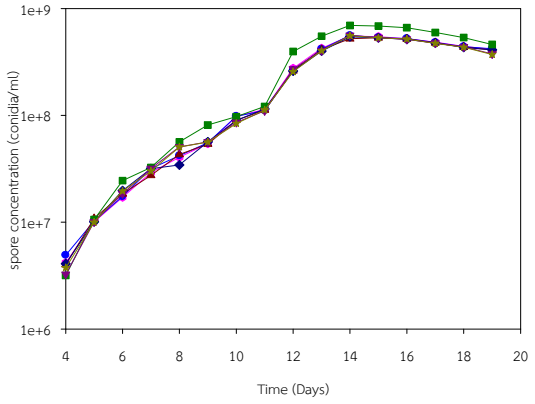
ตารางที่ 3 แสดงศักยภาพของวัสดุทดแทนที่นำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราเขียว พบว่าสูตร กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ มีจำนวนปริมาณสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 1.9×10^8 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหารสูตร กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวให้ปริมาณสปอร์เท่ากับ 1.07×10^8 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้งสอง พบว่ามีส่วนผสมเหมือนกัน แต่ต่างกันที่การเติมรำข้าว แสดงถึงผลของการเติมรำข้าวทำให้เป็นสูตรอาหารที่สมบูรณ์กว่าสูตรอื่นๆ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีในรำข้าวมีสารอาหารต่างๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและกรดอะมิโน ไขมัน แร่ธาตุ วิตามิน [4] ส่วนศักยภาพของวัสดุทดแทนที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณน้ำหนักแห้งของเชื้อราเขียว พบว่าสูตร มันสำปะหลังผสมขุยมะพร้าวและรำ มีจำนวนปริมาณน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 0.049 กรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหารสูตร มันสำปะหลังผสมขุยมะพร้าวให้ค่ารองลงมาเท่ากับ 0.020 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่าการเพิ่มปริมาณรำข้าวเป็นผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความสมบูรณ์มากขึ้น อย่างไรก็ตามส่วนผสมหลักที่อยู่ในอาหารแต่ละสูตรจะเป็นตัวกำหนดการเพิ่มปริมาณสปอร์หรือน้ำหนักแห้งของเส้นใย

5.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุทดแทน

นำส่วนผสมของ กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ ทั้งหมด 7 สูตร (ดังตารางที่ 2) ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ทำ

การนับจำนวนสปอร์ทุกวัน หลังวันที่ 4 ของการเพาะเชื้อ แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 1

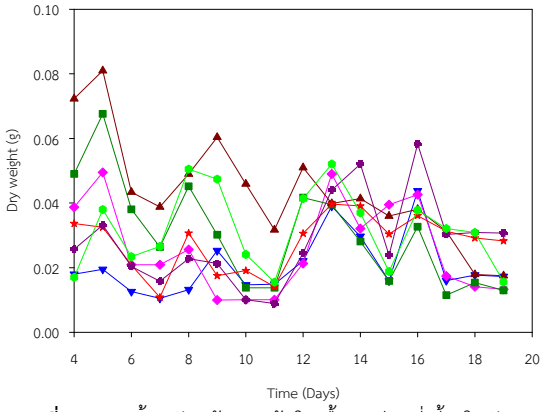
จากภาพที่ 1 แสดงการเพิ่มปริมาณสปอร์บนวัสดุทดแทน กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำทั้ง 7 สูตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยเขย่าเชื้อทุกวันตั้งแต่วันแรกที่ทำการถ่ายเชื้อ พบว่าอัตราส่วนของวัสดุทดแทนกากถั่วเหลือง 7 ส่วน ผสมขุยมะพร้าว 2 ส่วน และรำ 1 ส่วน ให้ปริมาณสปอร์สูงที่สุดในวันที่ 14 เท่ากับ 6.95×10^8 โคนีเดีย/มิลลิลิตร และปริมาณสปอร์ลดลงอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 15 – 19 คือ 6.88×10^8 , 6.63×10^8 , 5.98×10^8 , 5.35×10^8 และ 4.62×10^8 โคนีเดีย/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นอัตราส่วน 7:2:1 ให้ปริมาณสปอร์สูงกว่าอาหารสูตรอื่นภายใน 14 วัน เนื่องจากอัตราส่วนของปริมาณสารอาหารและช่องว่างของการถ่ายเทอากาศที่เหมาะสม ทำให้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราเขียว



ภาพที่ 1 จำนวนปริมาณสปอร์ของเชื้อราเขียวบนวัสดุทดแทน กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ ที่มีอัตราส่วนที่แตกต่างกัน จำนวน 7 สูตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 วัน สัญลักษณ์แทน สูตรที่ 1 สูตรที่ 2 สูตรที่ 3 สูตรที่ 4 สูตรที่ 5 สูตรที่ 6 สูตรที่ 7

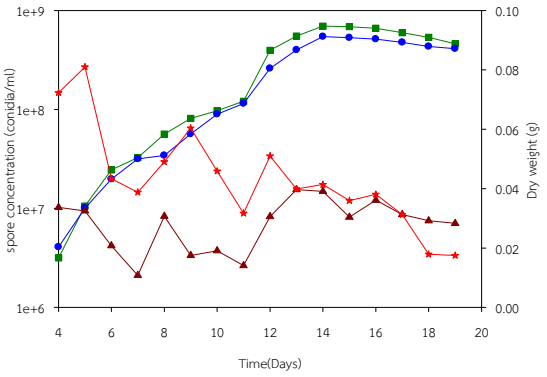
จากภาพปริมาณสปอร์ในระยะเวลา 7 วัน ให้ค่าเท่ากับ 3.25×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิวัฒน์ เสือสะอาด และคณะ (2551) [5] ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเขียว *M. anisopliae* โดยใช้วัสดุอาหารที่เป็นเมล็ดธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวพันธุ์เสาไห้ ข้าวเปลือก รำข้าว ปลายข้าว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง พบว่าเชื้อราเขียวสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และสร้างสปอร์ได้มากที่สุดในข้าวพันธุ์เสาไห้ได้ค่าเฉลี่ยสปอร์เท่ากับ 1.41×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 7 วัน เท่ากัน นอกจากนี้งานวิจัยนี้พบว่าจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 14 ถ้านานกว่านี้จำนวนสปอร์ของเชื้อราจะลดลงอย่างต่อเนื่อง สอดคล้องกับงานวิจัยของ P. Soundarapandian and R. Chandra (2007) [3] ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อรา *M. anisopliae* บนเมล็ดธัญพืช โดยทำการบดเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี และ ข้าวฟ่าง ใส่เมล็ดธัญพืชที่บดแล้ว 25 กรัม ลงในจานเพาะเชื้อ ล้างให้สะอาด เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อ ถ่ายสารละลายสปอร์เชื้อรา ที่มีสปอร์ 1x10 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียล นาน 2 สัปดาห์ ทำการนับจำนวนสปอร์และคำนวณในหน่วย (สปอร์ต่อกรัม ของเมล็ดธัญพืช) พบว่าข้าวสาลีให้ปริมาณสปอร์สูงสุดเท่ากับ 8.3×10^7 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำปริมาณน้ำหนักแห้งเชื้อราเขียวที่เจริญในอาหารทั้ง 7 สูตร ที่ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันมาวิเคราะห์ได้ผลแสดงดังภาพที่ 2 พบว่าอัตราส่วน 5:1:4 ของกากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำให้ปริมาณหนักแห้งของเส้นใยสูงที่สุด ส่วนอัตราส่วน 7:2:1 ซึ่งให้ปริมาณของสปอร์สูงที่สุด แต่กับมีปริมาณน้ำหนักแห้งต่ำกว่าอัตราส่วน 5:1:4 หมายความว่าในอาหารแต่ละอัตราส่วนมีความจำเพาะหรือมีลักษณะเด่นที่แตกต่าง



ภาพที่ 2 แสดงน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อราเขียวที่เลี้ยงในวัสดุผสมที่มีอัตราส่วนของกากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ ทั้ง 7 สูตร บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 วัน สัญญลักษณ์แทน ( ) สูตรที่ 1 (8:1:1) ( ) สูตรที่ 2 (7:1:2) ( ) สูตรที่ 3 (6:1:3) ( ) สูตรที่ 4 (5:1:4) ( ) สูตรที่ 5 (7:2:1) ( ) สูตรที่ 6 (6:3:1) ( ) สูตรที่ 7 (5:4:1)

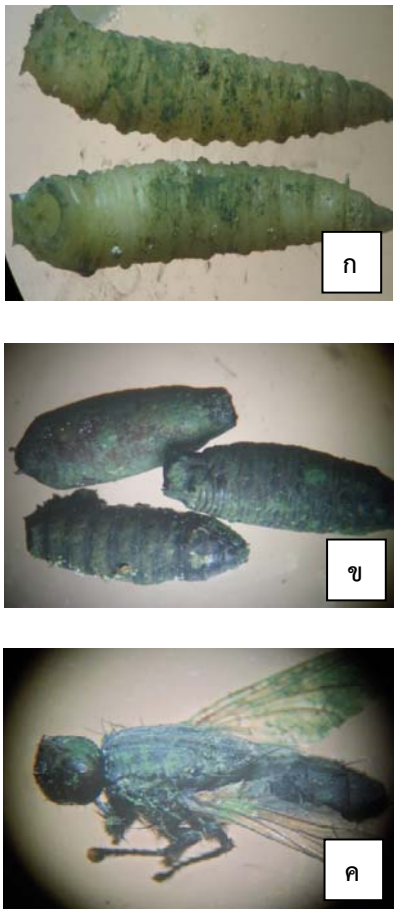
จากนั้นนำปริมาณสปอร์และปริมาณน้ำหนักแห้งเส้นใยของเชื้อราเขียวบนอาหารกากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ สูตรอัตราส่วน 5:1:4 กับสูตรอัตราส่วน 7:2:1 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบแสดงดังภาพที่ 3 พบว่าในอาหารกากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำอัตราส่วน 5:1:4 มีช่องว่างของการถ่ายเทอากาศสูงกว่าอัตราส่วน 7:2:1 ทำให้ได้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูง



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบการสร้างสปอร์และเส้นใยของเชื้อราเขียวเมื่อเลี้ยงบนวัสดุผสมกากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำที่แตกต่างกัน สูตรที่ 4 (5:1:4) กับสูตรที่ 5 (7:2:1) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน สัญลักษณ์แทน (—■—) ปริมาณสปอร์สูตรที่ 5 (—●—) ปริมาณสปอร์สูตรที่ 4 (—★—) ปริมาณเส้นใยสูตรที่ 5 (—▲—) ปริมาณเส้นใยสูตรที่ 4

5.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันบ้าน

นำหนอนแมลงวันบ้านที่มีอายุ 2 - 3 วัน ซึ่งใส่ไว้ในขวดเพาะเลี้ยงโดย 1 ขวดเพาะเลี้ยงจะใส่หนอนลงไปจำนวน 20 ตัว จากนั้นนำเชื้อราเขียวที่เตรียมไว้ที่ระดับความเข้มข้นสปอร์ที่ 6.58 x 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำ (10^{-2}) ฉีดพ่นลงบนตัวหนอนแมลงวันอายุ 2 – 3 โดยทำการฉีดพ่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อขวดเพาะเลี้ยง หลังจากทำการฉีดพ่นเชื้อราพบว่าเมื่อหนอนแมลงวันสัมผัสกับโคนิเดียของเชื้อราเป็นระยะเวลา 2 วัน หนอนแมลงวันหัวเขียวจะเริ่มตาย โดยซากหนอนที่ตายจะมีลักษณะแห้งและแข็ง โดยเมื่อให้ความชื้นแก่ซากหนอนที่ตาย พบว่าในระยะแรกบริเวณข้อปล้องจะเกิดลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวบางๆ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นโคนิเดียสีเขียวปกคลุมตัวหนอนแมลงวัน (ภาพที่ 4) ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวระยะดักแด้ใช้คีมคีบ (Forceps) ดักแด้ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร 1 จานเพาะเลี้ยงจะใส่ดักแด้ลงไปจำนวน 20 ตัว จากนั้นนำสารละลายเชื้อราเขียวฉีดพ่น 5 ครั้งต่อจานเพาะเลี้ยง บันทึกการฟักของแมลงวันทุกวันจนดักแด้ไม่มีการฟักระยะตัวเต็มวัย และจับแมลงวันระยะตัวเต็มวัยจำนวน 20 ตัว จากนั้นนำเชื้อราเขียวที่เตรียมไว้ที่ระดับความเข้มข้นสปอร์ที่ 6.58 x 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ที่ค่าเจือจาง (10^{-2}) มาฉีดพ่น 5 ครั้งต่อขวดเพาะเลี้ยงลงบนอาหารในขวดเพาะเลี้ยงตัวเต็มวัย นับจำนวนแมลงวันระยะตัวเต็มวัยที่ตายหลังการฉีดพ่นเชื้อรา และนำจำนวนแมลงวันระยะตัวเต็มวัยที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุมไปคำนวณร้อยละการตายของแมลงวันตัวเต็มวัย



ภาพที่ 4 ลักษณะหนอน (ก) ดักแด้ (ข) และตัวเต็มวัย (ค) ของแมลงวันบ้านหลังทำการฉีดพ่นเชื้อราเขียวเป็นระยะเวลา 8 วัน

จากภาพที่ 4 พบว่าเชื้อราเขียวมีประสิทธิภาพให้ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันบ้านอยู่ที่ร้อยละ 75 ซึ่งมีมากกว่างานวิจัยของ Siriporn Youngchaitrakul [7] ที่ได้ทำการหาค่าร้อยละการตายของหนอนแมลงวัน โดยการจุ่มหนอนแมลงวันลงในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา 2 สายพันธุ์ เป็นเวลา 1 วินาที ได้แก่ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ var. *majus* ให้ค่าเท่ากับร้อยละ 65.36 และ 43.92 ตามลำดับ ส่วนระยะดักแด้เท่ากับร้อยละ 55 ซึ่งระยะดักแด้ของแมลงวันต้องใช้ระยะเวลาถึง 10 วัน หลังจากที่ไม่ฟักเป็นระยะตัวเต็มวัยจึงจะเห็นเป็นเส้นใยสีขาวต่อมาจึงเห็นเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเขียวและสร้างโคนิเดียขึ้น และระยะตัวเต็มวัยเท่ากับร้อยละ 50 สอดคล้องกับ ภัทรินทร์ ขัดเรือง (2555) [6] ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 มีอัตราการตายของหนอนแมลงวันเท่ากับร้อยละ 86.67 ในการทำให้ระยะดักแด้ของแมลงวันหัวเขียวตายร้อยละ 50 โดยเชื้อราที่มีความรุนแรงสูงได้แก่ เชื้อราไอโซเลท Ma.6171 เท่ากับ 1.73 x 10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ส่วนการตายของระยะตัวเต็มวัย เชื้อราเขียวที่ไอโซเลท Ma.6171 ใช้ระยะเวลาในการทำให้

แมลงวันหัวเขียวระยะตัวเต็มวัยตายได้รวดเร็วที่ร้อยละ 50 เพียง 3.55 วัน

6. สรุป

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนของวัสดุทดแทนต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราเขียว พบว่าเชื้อราเขียวสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้ดีที่สุด โดยใช้กากถั่วเหลืองผสมขุยมะพร้าวและรำ ในอัตราส่วน 7:2:1 ให้ปริมาณสปอร์เท่ากับ 6.95 x 10^8 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร ภายใน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตเชื้อราเขียวเพื่อกำจัดแมลง เนื่องจากใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ วัตถุดิบสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงถือเป็นชีวเทคโนโลยีที่ยั่งยืน ในขณะเดียวกันอัตราส่วนที่ให้ปริมาณเส้นใยมากที่สุด คือ อัตราส่วน 5:1:4 ส่วนผลการกำจัดแมลงวันบ้าน พบว่าเชื้อราเขียวที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงวันบ้าน โดยสามารถฆ่าระยะหนอนของแมลงวันลงได้ร้อยละ 75 รองลงมาระยะดักแด้ร้อยละ 55 และระยะตัวเต็มวัยร้อยละ 50 ตามลำดับ พบแมลงวันบ้านตายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ระยะตัวเต็มวัยจะมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรามากที่สุด รองลงมาได้แก่ ระยะดักแด้ และระยะหนอน ซึ่งเป็นระยะที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 การใช้ประโยชน์จากสารละลายสปอร์ให้ได้ผลดีคือ ต้องฉีดสปอร์ของเชื้อราให้สัมผัสกับแมลงวันบ้านโดยตรง

7.2 ควรมีการวิจัยเพิ่มเติม เพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงชนิดอื่นรวมถึงแมลงพาหะนำโรคชนิดอื่นๆ เช่น มด และ แมลงสาบ เป็นต้น

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์บริหารศัตรูพืช จ.พิษณุโลก ในการสนับสนุนหัวเชื้อราเมตาไรเซียมในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชรที่สนับสนุนการนำผลงานวิจัยสู่ผู้ใช้ประโยชน์

9. เอกสารอ้างอิง

[1] จักรวาล ชมพูศรี. ชีววิทยาและการควบคุมแมลงที่เป็นปัญหาสาธารณสุข. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553.

[2] Y. Tanada and H.K. Kaya. Insect Pathology. Academic, San Diego, CA. 1993.

[3] P. Soundarapandian and R. Chandra, “Mass Production of Endomopathogenic Fungus Metarhizium anisopliae (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the Laboratory”, Research Journal of Microbiology 2, 9, 690-695, 2007.

[4] United Nation, The storage of rice bran. In “Rice Bran : an under utilized raw material,” Vienna, United Nation Industrial Development Organization, pp. 2 16-25, 1985.

[5] วิวัฒน์ เสือสะอาด, พิมพรรณ สมมาตย์, ปวีณา บูชาเทียน , อาภรณ์ ปั้นทองคำ และรัตติรส เชียงสิน. ประสิทธิภาพเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในการเข้าทำลายหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *Dorysthenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycediae) ในห้องปฏิบัติการ, ใน: เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 46: สาขาพืช, หน้า 115-160. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2551.

[6] ภัทรินทร์ ขัดเรือง. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อการควบคุมแมลงวัน หัวเขียว Blow fly, *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, สถาบันเทคโนโลยีเกษตร, 2555.

[7] Siriporn Youngchaitrakul. An investigation on the effect of using the fungus, *Metarhizium anisopliae* for the control of the House fly, *Musca domestica* L., Thesis master of Science, Department of Entomology, 1999.