ประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis israelensis* และ *Lysinibacillus sphaericus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัตถุดิบในครัวเรือนต่อการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ระดับห้องปฏิบัติการและจำลองธรรมชาติ

นันทพร ผลสุวรรณ์[1*] , นิตยา เมธาวณิชพงศ์[1] , พรชัย วิริยะศรานนท์[1] , พรธิดา เพชรสุวรรณ[1], ดนาพร สารพฤกษ์[1] และ อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

*nuntaporn.p@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* เป็นยุงกลางคืนที่พบมากและเป็นพาหะนำโรคร้าย การใช้สารเคมีฉีดพ่นตัวยุงเป็นเวลานานทำให้สารพิษตกค้างสู่สิ่งแวดล้อมและเกิดปัญหายุงดื้อต่อสารเคมี แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง ได้แก่ *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) และ *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและปลอดภัยสูง การศึกษานี้เป็นวิจัยเชิงทดลอง มีการเพาะเลี้ยง Bti และ Ls ด้วยวัตถุดิบในครัวเรือน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าวแก่ น้ำกากถั่วเหลือง น้ำซาวข้าว และน้ำซุปจากซุปก้อนสำเร็จรูป ทดสอบประสิทธิภาพทางชีววิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและทดสอบฤทธิ์ตกค้างแบบจำลองธรรมชาติกับลูกน้ำยุงรำคาญวัย 4 ต้น พบว่าอาหารที่เพาะเลี้ยง Bti ได้ดีที่สุดคือน้ำกากถั่วเหลือง รองลงมาคือน้ำซาวข้าว น้ำมะพร้าวแก่ และน้ำซุปจากซุปก้อนสำเร็จรูป โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.94, 17.39, 18.21 และ 25.17 ppm ตามลำดับ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง Ls ได้ดีที่สุดคือน้ำซุปจากซุปก้อนสำเร็จรูป รองลงมาคือน้ำกากถั่วเหลือง น้ำมะพร้าวแก่ และน้ำซาวข้าว ตามลำดับ ได้ค่า LC_{50} เท่ากับ 0.19, 0.42, 0.96 และ 8.21 ppm ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากต้นทุนของชีวภัณฑ์จึงได้คัดเลือกน้ำกากถั่วเหลืองใช้เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง Bti และ Ls การทดสอบฤทธิ์ตกค้างพบว่า Ls มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือ Bti ผสมกับ Ls และ Bti โดยวัดจากอัตราการใช้งานที่สามารถควบคุมลูกน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่ 0.30, 0.60 และ 3.03 ลิตร/ตารางเมตร ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า Ls ที่เพาะเลี้ยงด้วยกากถั่วเหลืองใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี และเป็นการนำสิ่งเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

คำสำคัญ : ยุงรำคาญ กากถั่วเหลือง แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำ

Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* cultured with raw material in the kitchen against *Culex quinquefasciatus* larvae in Laboratory and simulated field trial

Nuntaporn Phonsuwan[1*], Nittaya Methawanitpong[1], Pornchai Wiriyasaranont[1], Porntida Petchsuwan[1], Danaporn Sarapruek[1] and Archawin Rotchanawiwat[1]

[1]National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health
*nuntaporn.p@dmsc.mail.go.th

Abstract

Culex, a large group of mosquitoes, can be the vectors of many diseases in humans. The long term of Chemical insecticide application can cause residual effect in environment and also has insecticide resistance problem. The bio- agents that widely used for controlling mosquito larvae are *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), and *Lysinibacillus sphaericus* (Ls), and they are a safe alternative agent. This study was experimental research, Bti and Ls were cultured with four types of raw materials in the kitchen, i.e. mature coconut water, soy pulp water, rice washing water, and soup from instant cubes. Cultured media were tested for larvicidal activity in the laboratory (LC_{50}) and residual effect in simulated field trial against early 4^{th} instar larvae. The results showed the most effective medium for Bti was soy pulp water followed rice washing water, mature coconut water and soup from instant cubes, with LC_{50} values of 3.94, 17.39, 18.21 and 25.17 ppm, respectively. The most effective medium for Ls was soup from instant cubes followed by soy pulp water, mature coconut water and rice washing water, with LC_{50} values of 0.19, 0.42, 0.96 and 8.21 ppm, respectively. However, considering of cost of bio-agent, soy pulp water was selected for culturing both of Bti and Ls. The results of simulated field trial indicated Ls bio-agent was highest efficacy followed by Bti mixed with Ls and Bti bio-agent, measured by the application rate for control of *Culex* larvae within two weeks, at 0.30, 0.60 and 3.03 L/m^2, respectively. Therefore, Ls cultured with soy pulp medium was effective at controlling Culex larvae and it was an example of waste material utilization.

Keywords: *Culex* mosquito, soy pulp, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Lysinibacillus sphaericus*

1. บทนำ

หลังจากประเทศไทยเข้าสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเข้ามามากขึ้น ส่งผลให้คนไทยมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคติดต่อข้ามพรมแดนมากขึ้นด้วย ทั้งโรคติดต่อจากคนสู่คนโดยตรงและโรคติดต่อนำโดยยุงรำคาญ เช่น โรคเท้าช้าง ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้รายงานว่าประชากร 863 ล้านคนใน 47 ประเทศยังคงมีอาการจากโรคเท้าช้าง[1] และได้จัดให้โรคเท้าช้างเป็นโรคอันดับสองที่ก่อให้เกิดความพิการถาวรทั่วโลก โดยพบการ

ระบาดสูงในประเทศเขตร้อน ปัจจุบันโรคเท้าช้างยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศเมียนมาร์และพบอุบัติการณ์สูง สำหรับประเทศไทยมีแรงงานต่างด้าวนับล้านคน ซึ่งร้อยละ 90 เป็นแรงงานชาวเมียนมาร์ [2] จากรายงานแผนปฏิบัติการกำจัดโรคเท้าช้าง ปี พ.ศ. 2564 พบว่ากลุ่มคนต่างด้าวที่มาจากประเทศเมียนมาร์นั้น ยังพบผู้มีพยาธิ/แอนติเจนโรคเท้าช้างอย่างต่อเนื่อง และประเทศไทยมีผู้พิการถาวรจากโรคเท้าช้างจำนวนถึง 98 ราย [3] ปัจจุบันพบว่าเชื้อโรคเท้าช้างชนิด *Wuchereria bancrofti* สายพันธุ์ที่เข้าสู่ประเทศไทยโดยผู้อพยพจากชายแดนไทย-เมียนมาร์ มียุงหลายชนิดเป็นพาหะนำโรค รวมทั้งยุงรำคาญ (*Culex* spp.) ซึ่งเป็นยุงบ้านที่พบได้ทั่วไป [4] นอกจากนี้ยุงรำคาญยังเป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบเจอี ซึ่งองค์การอนามัยโลกรายงานว่าพบผู้ป่วยใน 24 ประเทศของภูมิภาคเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จำนวน 68,000 รายต่อปี ส่งผลให้ประชาชนมากกว่า 3,000 ล้านคนมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อดังกล่าว[5] โรคไข้สมองอักเสบเจอี ส่วนมากพบในเด็กอายุ 5–10 ปี มีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 10-30 ของกลุ่มที่มีอาการไข้สมองอักเสบรุนแรง และประมาณร้อยละ 33-50 ของผู้รอดชีวิตจะยังมีอาการทางระบบประสาทหลงเหลืออยู่ภายในระยะเวลา 1 ปี [6] สถานการณ์โรคไข้สมองอักเสบในประเทศไทย พบว่ามีอัตราป่วย-ตายสูงที่สุดในปี พ.ศ. 2563 ถึงร้อยละ 1.02 โดยยังคงพบผู้ป่วยสูงสุดในภาคเหนือ รองลงมา คือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และ ภาคกลางตามลำดับ [7]

นอกจากเป็นพาหะนำโรคมาสู่มนุษย์แล้ว ยุงรำคาญ ยังเป็นพาหะนำโรคในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ โรคพยาธิหนอนหัวใจในสุนัขได้อีกด้วย [8] และโรคจากเชื้อไวรัส Tembusu ในฟาร์มเป็ดและไก่ทำให้เป็ดไก่ผลิตไข่ลดลงร่วมกับมีอาการทางระบบประสาท [9] การกำจัดยุงนิยมใช้สารเคมีกำจัดในระยะที่เป็นลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัย สารเคมีเหล่านี้มีอันตรายต่อสุขภาพและเมื่อใช้เป็นเวลานานจะทำให้ยุงที่รอดชีวิตเกิดการกลายพันธุ์และดื้อต่อสารเคมี ส่งผลให้การกำจัดยุงยุ่งยากซับซ้อนขึ้น ตลอดจนเกิดปัญหาสารเคมีตกค้างเป็นพิษต่อระบบนิเวศ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติก่อโรคในแมลงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) และ *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการกำจัดลูกน้ำยุงชนิดต่างๆ รวมทั้งลูกน้ำยุงรำคาญ โดยการฉีดพ่นลงไปในแหล่งน้ำเน่าเสียซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงรำคาญ เมื่อลูกน้ำยุงรำคาญกินผลึกสารพิษที่สร้างจากเชื้อ Bti และ Ls เข้าไปก็จะตาย โดยผลึกสารพิษดังกล่าวไม่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ต่างๆ [10]

เนื่องจากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์กำจัดแมลงที่จำหน่ายในประเทศไทยมีราคาแพง หาซื้อได้ยาก เราจึงควรคิดค้นวิธีการผลิตชีวภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงจากจุลินทรีย์ที่ใช้ต้นทุนน้อยและมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก สามารถทำได้ในระดับครัวเรือน เพื่อนำไปสู่การลดประชากรยุงรำคาญเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคติดต่อที่นำโดยยุงพาหะ รวมทั้งยังช่วยให้ประชาชนลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีกำจัดแมลง ตลอดจนลดอันตรายจากผลข้างเคียงของสารเคมีเหล่านี้ด้วย การศึกษาครั้งนี้จึงได้คิดค้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก หาได้ง่ายในท้องถิ่นและมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่ยุ่งยากแต่มีประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี อาหารเลี้ยงเชื้อที่ศึกษาควรเป็นสิ่งเหลือทิ้งหรือวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่น ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกน้ำมะพร้าวแก่ กากถั่วเหลืองจากการทำน้ำนมถั่วเหลือง น้ำซาวข้าว และน้ำซุปจากซุปก้อนรสหมู มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

จากรายงานพบว่าน้ำมะพร้าวแก่มีองค์ประกอบหลักคือน้ำ ประมาณร้อยละ 94 รองลงมาเป็นคาร์โบไฮเดรต เถ้า โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุ [11] นอกจากนี้ยังมีสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ที่ผ่านมามีรายงานการนำน้ำมะพร้าวแก่ไปใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น Ls [12] และ *E.coli* [13] ส่วนกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำน้ำนมถั่วเหลือง ประกอบด้วยโปรตีนสูงถึง ร้อยละ 25 ไขมัน ร้อยละ 10 และยังมีเส้นใย วิตะมินและแร่ธาตุต่างๆ [14] มีการนำกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ ในการหมักกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำให้ได้กรดอมิโนและ กรดไขมันเพิ่มขึ้น [15] สำหรับน้ำซาวข้าว มีส่วนประกอบหลักคือคาร์โบไฮเดรท และมีวิตามินหลายชนิด ได้แก่ บี1 บี2 บี3 [16] มีนักวิจัยของประเทศเวียดนามนำน้ำซาวข้าวมาใช้ในการเพาะเลี้ยง *Streptococcus thermophilus* เพื่อผลิต Hyaluronic acid [17] พบว่าได้ผลดี วัตถุดิบตัวสุดท้ายคือน้ำซุปรสหมูมีส่วนประกอบของโปรตีนจากเนื้อหมูและไขมัน ผงถั่วเหลืองหมัก เกลือ น้ำตาล และอื่นๆ (ข้อมูลจากฉลากผลิตภัณฑ์) แต่ยังไม่พบรายงานการนำน้ำซุปรสหมูที่ทำจากก้อนซุปสำเร็จรูปมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อใดๆ

นอกจากนี้มีการศึกษาการเติมน้ำตาลทรายลงในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอน เนื่องจากวัตถุดิบบางชนิดอาจมีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอ ซึ่งแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและสร้างผลึกสารพิษของ Bti และ Ls [18, 19] งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Bti และ Ls ที่มีราคาถูกจากวัตถุดิบในครัวเรือนและนำชีวภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ตกค้างในสภาพจำลองธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียที่มีต้นทุนต่ำและมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

วิธีวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่ทำจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

1.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

การศึกษานี้ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ค้นพบโดยฝ่ายวิจัยและทดสอบแมลงทางชีววิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดย *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) ได้จากจังหวัดแพร่ และ *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) ได้จากจังหวัดอยุธยา

1.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter)

เพาะเลี้ยง Bti และ Ls ด้วย Nutrient broth นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดความขุ่นให้มีค่า OD_{600} = 1 จะได้เชื้อที่อยู่ในช่วง log phase ที่มีความแข็งแรงว่องไว (active)

1.3 วัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัตถุดิบที่ใช้มี 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าวแก่ กากถั่วเหลือง ซุปก้อนรสหมู และน้ำซาวข้าว จำนวน 12 สูตร ประกอบด้วยสูตรปกติที่ไม่มีการเติมสารใดเพิ่มเติม และสูตรที่แปรผันปริมาณน้ำตาลทรายและปริมาณวัตถุดิบ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. น้ำมะพร้าวแก่ ประกอบด้วย 3 สูตร ได้แก่
    1) น้ำมะพร้าวแก่ ไม่เติมน้ำตาลทราย
    2) น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5
    3) น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5
2. น้ำกากถั่วเหลือง โดยนำถั่วเหลือง 50 กรัมผสมน้ำ 1 ลิตร นำไปทำน้ำนมถั่วเหลือง นำกากที่บีบน้ำออก 10 กรัมมาเติมน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร ได้เป็นน้ำกากถั่วเหลือง ประกอบด้วย 3 สูตร ได้แก่
    1) น้ำกากถั่วเหลือง ไม่เติมน้ำตาลทราย
    2) น้ำกากถั่วเหลือง เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5
    3) น้ำกากถั่วเหลือง เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5
3. น้ำซุปรสหมูจากซุปก้อนสำเร็จรูป ประกอบด้วย 3 สูตร ได้แก่
    1) น้ำซุปรสหมู 5 กรัม/ลิตร
    2) น้ำซุปรสหมู 10 กรัม/ลิตร
    3) น้ำซุปรสหมู 20 กรัม/ลิตร

    หมายเหตุ: ในก้อนซุปรสหมูมีน้ำตาลเป็นส่วนผสมร้อยละ 8 จึงไม่ได้ศึกษาการเติมน้ำตาล แต่ศึกษาการแปรผันปริมาณก้อนซุป
4. น้ำซาวข้าว ที่ซาวจากข้าว 500 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย 3 สูตร ได้แก่
    1) น้ำซาวข้าว ไม่เติมน้ำตาลทราย

2) น้ำซาวข้าว เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5
3) น้ำซาวข้าว เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5

1.4 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในวัตถุดิบแต่ละชนิด

นำเชื้อตั้งต้น Bti หรือ Ls ที่มีค่า OD_{600} = 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละสูตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ

2.1 ลูกน้ำยุงรำคาญ

ลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* วัย 4 ตอนต้น (early fourth instar larvae) ได้รับจากห้องเลี้ยงแมลง กลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีความสมบูรณ์แข็งแรง เคลื่อนที่ได้คล่องแคล่วว่องไว มีอายุประมาณ 4-6 วัน ลำตัวยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพ

ทดสอบประสิทธิภาพโดยหาค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 50 (LC_{50}) หากค่า LC_{50} ต่ำแสดงว่าจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี เริ่มต้นด้วยการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายในช่วงร้อยละ 1-99 จากนั้นทดสอบแบบละเอียด โดยนำอาหารเหลวที่มี Bti หรือ Ls มาเจือจางครั้งละ 2 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 4 - 6 ระดับ ทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ และชุดควบคุมอีก 4 ซ้ำ โดยใช้ปริมาณสารผสมถ้วยละ 100 มิลลิลิตร ใส่ลูกน้ำยุงรำคาญวัย 4 ตอนต้น ในถ้วยทดสอบๆ ละ 10 ตัว แล้วอ่านผลการตายของลูกน้ำยุงรำคาญหลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง โดยนับจำนวนลูกน้ำเป็นที่ยังแข็งแรงและมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการเคาะถ้วยทดสอบและว่ายน้ำตามปรกติเมื่อถูกสัมผัสด้วยปลายไม้ จากนั้นคำนวณค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม Probit analysis [20] หลังจากนั้นคัดเลือกสูตรอาหารจากแต่ละวัตถุดิบที่เพาะเลี้ยงได้จุลินทรีย์ Bti และ Ls ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญเพื่อนำไปใช้ทดสอบในระดับจำลองธรรมชาติ

2.3 การควบคุมคุณภาพและการหาค่าทางสถิติ

2.3.1 กำหนดให้อุณหภูมิห้องทดสอบอยู่ที่ 25 ± 2 °C
2.3.2 น้ำสะอาดที่ใช้ทดสอบมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 6.8-7.2
2.3.3 ทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง
2.3.4 กำหนดให้ค่า correlation coefficient (R) ไม่ต่ำกว่า 0.96
2.3.5 กรณีที่พบลูกน้ำตายในชุดควบคุมร้อยละ 5-10 ให้ปรับค่าอัตราตายแท้จริงด้วย Abbott's formula [21]

3. การผลิตชีวภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญในระดับขยายส่วน

3.1 การผลิตผงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตชีวภัณฑ์

เพาะเลี้ยง Bti และ Ls ในอาหาร PGSM และ NBSY ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm 32°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน ที่ความเร็ว 3,000 rpm นำตะกอนเชื้อที่แยกได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น นำเชื้อแห้งที่ได้มาบดเป็นผงละเอียด ใส่ในขวดสุญญากาศและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3.2 การผลิตชีวภัณฑ์ในถังพลาสติก

นำผงเชื้อ Bti หรือ Ls 1 กรัม ใส่ในถังพลาสติก ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ลิตร คนให้เข้ากัน นำหัวทรายพ่นอากาศจำนวน 2 หัวใส่ลงในถัง เพื่อให้ Bti และ Ls ได้รับออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ปิดฝาถังเพื่อป้องกันการปนเปื้อน บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำชีวภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในสภาพจำลองธรรมชาติ

4. การทดสอบฤทธิ์ตกค้างในสภาพจำลองธรรมชาติ

ทดสอบโดยใช้น้ำเสียที่ตักมาจากคลองระบายน้ำภายในเขตเทศบาลนนทบุรี ลักษณะน้ำมีสีค่อนข้างดำ มีอินทรียสารปริมาณมากและมีกลิ่นเหม็น มีวิธีการทดสอบดังนี้

4.1 นำน้ำเสียใส่ในภาชนะพลาสติกขนาด 30x45x40 เซนติเมตร ให้มีระดับน้ำสูง 25 เซนติเมตร บันทึกพื้นที่ผิวของน้ำ แบ่งการทดสอบตามชนิดของชีวภัณฑ์เป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มทำ 4 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Bti ในน้ำกากถั่วเหลือง ที่อัตรา 120, 150, 200 มิลลิลิตร/ภาชนะ

กลุ่มที่ 2 Ls ทดสอบ 2 สูตร ดังนี้

1) Ls ในน้ำซุปรสหมู 20 กรัม/ลิตร ที่อัตรา 160, 320, 640 มิลลิลิตร/ภาชนะ

2) Ls ในน้ำกากถั่วเหลือง ที่อัตรา 160, 320, 640 มิลลิลิตร/ภาชนะ

กลุ่มที่ 3 Bti ผสม Ls ในน้ำกากถั่วเหลือง ที่อัตรา 20:20, 30:30, 50:50 มิลลิลิตร/ภาชนะ

และมีกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่ใส่สารใดๆ จำนวน 4 ซ้ำ

4.2 นำชีวภัณฑ์ที่อัตราการใช้งานต่างๆ ใส่ในภาชนะทดสอบ ใส่ลูกน้ำภาชนะละ 25 ตัว

4.3 อ่านผลทดสอบโดยนับจำนวนลูกน้ำตายหลังทดสอบครบ 48 ชั่วโมง

4.4 ใส่ลูกน้ำและอ่านผลทดสอบทุก 5 วัน จนกว่าชีวภัณฑ์ไม่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำหรือทดสอบจนครบ 20 วัน

4.5 วัด pH และอุณหภูมิของน้ำในภาชนะแต่ละกลุ่มสัปดาห์ละครั้ง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยอาหารจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ Bti และ Ls ในอาหารจากวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด รวม 12 สูตร และทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในระดับห้องปฏิบัติการ ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 LC_{50} ของ Bti และ Ls ในอาหารจำนวน 12 สูตร

ลำดับ	สูตรอาหาร	pH	LC_{50} ± SE. (ppm)*	
			Bti	Ls
Control	Nutrient broth	6.97	4.56 ± 0.17 a	0.55 ± 0.02 a
	สูตรน้ำมะพร้าวแก่			
1	น้ำมะพร้าวแก่ ไม่เติมน้ำตาลทราย	5.40	18.21 ± 0.37 b	1.24 ± 0.07 a
2	น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5	5.43	20.28 ± 0.50 b	1.22 ± 0.01 a
3	น้ำมะพร้าวแก่ เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5	5.42	21.42 ± 0.08 bc	0.96 ± 0.09 a
	สูตรน้ำกากถั่วเหลือง			
4	น้ำกากถั่วเหลือง ไม่เติมน้ำตาลทราย	6.95	3.94 ± 0.11 a	0.42 ± 0.03 a
5	น้ำกากถั่วเหลือง เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5	6.93	5.04 ± 0.22 a	0.46 ± 0.02 a
6	น้ำกากถั่วเหลือง เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5	6.97	4.72 ± 0.03 a	0.51 ± 0.01 a

ตารางที่ 1 LC_{50} ของ Bti และ Ls ในอาหารจำนวน 12 สูตร (ต่อ)

ลำดับ	สูตรอาหาร	pH	LC_{50} ± SE. (ppm)*	
			Bti	Ls
	สูตรน้ำซุปรสหมูจากซุปก้อนสำเร็จรูป			
7	น้ำซุปรสหมู 5 กรัม/ลิตร	6.93	41.40 ± 2.30 d	1.24 ± 0.03 a
8	น้ำซุปรสหมู 10 กรัม/ลิตร	6.82	31.64 ± 0.46 d	0.77 ± 0.02 a
9	น้ำซุปรสหมู 20 กรัม/ลิตร	7.20	25.17 ± 0.63 c	0.19 ± 0.01 a
	สูตรน้ำซาวข้าว			
10	น้ำซาวข้าว ไม่เติมน้ำตาลทราย	6.32	23.65 ± 1.19 c	25.04 ± 1.58 c
11	น้ำซาวข้าว เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5	6.29	23.59 ± 2.36 c	8.21 ± 0.14 b
12	น้ำซาวข้าว เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5	6.27	17.39 ± 1.98 b	44.31 ± 0.18 d

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบด้วย Duncan's New Multiple Range test * ค่าเฉลี่ยของ LC_{50} ได้จากการทดลองอย่างน้อย 4 ซ้ำ

จากตารางที่ 1 พบว่าอาหารสูตรที่เพาะเลี้ยงได้ Bti ที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีที่สุดคือน้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทราย การเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5 และร้อยละ 5 ให้ค่าประสิทธิภาพ (LC_{50}) ที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่เติมน้ำตาลทราย ส่วนอาหารสูตรที่เพาะเลี้ยงได้ Ls ที่สามารถกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีที่สุดคือน้ำซุปรสหมู 20 กรัม/ลิตร การแปรผันปริมาณก้อนซุปเป็น 5 และ 10 กรัม/ลิตร ให้ค่าประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ก้อนซุป 20 กรัม/ลิตร นอกจากนี้อาหารทุกสูตรยกเว้นน้ำซาวข้าวสามารถเพาะเลี้ยง Ls ที่มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตรน้ำซุปรสหมู

เมื่อพิจารณาในแต่ละวัตถุดิบสามารถคัดเลือกอาหารสูตรที่เพาะเลี้ยงได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อันดับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ Bti และ Ls ดีที่สุดในแต่ละวัตถุดิบ

อันดับ	Bti		Ls	
	สูตรอาหาร	LC_{50} ± SE. (ppm)	สูตรอาหาร	LC_{50} ± SE. (ppm)
1	น้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทราย	3.94 ± 0.11 a	น้ำซุปรสหมู 20 g/L	0.19 ± 0.01 a
2	น้ำซาวข้าวเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5	17.39 ± 1.98 b	น้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทราย	0.42 ± 0.03 b
3	น้ำมะพร้าวแก่ไม่เติมน้ำตาลทราย	18.21 ± 0.37 b	น้ำมะพร้าวแก่เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5	0.96 ± 0.09 c
4	น้ำซุปรสหมู 20 g/L	25.17 ± 0.63 b	น้ำซาวข้าวเติมน้ำตาลทรายร้อยละ 2.5	8.21 ± 0.14 d

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบด้วย Duncan's New Multiple Range test * ค่าเฉลี่ยของ LC_{50} ได้จากการทดลองอย่างน้อย 4 ซ้ำ

จากตารางที่ 2 สรุปได้ว่า Bti เพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารสูตรน้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทราย Ls เพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารสูตรน้ำซุปรสหมู 20 g/L นอกจากนี้สังเกตพบว่าค่า LC_{50} ของ Ls ต่ำกว่า Bti มาก แสดงว่า Ls ใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีกว่า Bti ทั้งนี้เนื่องจาก Ls มีการสร้างผลึกโปรตีนที่มีความเป็นพิษจำเพาะเจาะจงกับลูกน้ำยุงรำคาญ ส่วน Bti เป็นแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำได้หลากหลายชนิด [20]

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ากากถั่วเหลืองมีสารอาหารเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ ไม่จำเป็นต้องเติมน้ำตาลทรายที่เป็นแหล่งคาร์บอนลงไปเพิ่มเติม เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีแหล่งคาร์บอนเพียงพอแล้ว ส่วนน้ำซาวข้าวมีส่วนประกอบหลักคือคาร์โบไฮเดรทซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และมีวิตามินหลายชนิด [22] แต่สารอาหารเหล่านี้อาจไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมกับการเติบโตของ Bti และ Ls จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้จึงเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร สำหรับน้ำมะพร้าวแก่

มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ น้ำตาล sucrose, glucose และ fructose [23] เมื่อเก็บเป็นเวลานานขึ้น น้ำตาลจะเกิดขบวนการหมัก จนอาหารมีสภาพเป็นกรด ทำให้ pH ของน้ำมะพร้าวต่ำลงจนทำลายเซลล์ Bti และ Ls ดังนั้นน้ำมะพร้าวจึงไม่เหมาะสมกับการใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าว ในกรณีของน้ำซุปรสหมูนั้นพบว่ามีส่วนประกอบหลักคือโปรตีนจากเนื้อหมูและไขมัน มีความเหมาะสมกับการเติบโตของ Ls แต่ไม่เหมาะกับ Bti

การเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับขยายส่วนและการทดสอบฤทธิ์ตกค้างแบบจำลองธรรมชาติ

การทดสอบในสภาพจำลองธรรมชาติใช้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ดีที่สุดตามตารางที่ 2 คือ Bti เพาะเลี้ยงในน้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทราย และ Ls ในน้ำซุปรสหมู 20 กรัม/ลิตร โดยใช้ผงเชื้อ Bti หรือ Ls จำนวน 1 กรัมเป็นหัวเชื้อ เพาะเลี้ยงภาชนะละ 5 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาทดสอบฤทธิ์ตกค้างที่อัตราการใช้งานต่างๆ เกณฑ์การทดสอบ คือ ชีวภัณฑ์ต้องทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Bti

ผลทดสอบฤทธิ์ตกค้างของ Bti ในน้ำกากถั่วเหลือง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อัตราการใช้งาน Bti ในน้ำกากถั่วเหลืองที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงรำคาญในการทดสอบแบบจำลองธรรมชาติ

ปริมาณ Bti (มล./ภาชนะ)	อัตราการใช้งาน (ลิตร/ตร.ม.)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ร้อยละการตายของลูกน้ำ*			
				วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20
120	1.82	31	7.28	100	100	43	12
150	2.27	30	6.28	100	100	64	19
200	3.03	30	7.09	100	100	92	37
Control	-	29	7.17	6	5	2	4

หมายเหตุ : 1. * ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบอัตราละ 4 ภาชนะ ใส่ลูกน้ำภาชนะละ 25 ตัว
2. ภาชนะทดสอบบรรจุน้ำ 16 ลิตร มีพื้นที่ผิวน้ำ 0.066 ตารางเมตร ลึก 25 เซนติเมตร

จากตารางที่ 3 พบว่าอัตราการใช้ Bti ที่ 200 มิลลิลิตร/ภาชนะ (3.03 ลิตร/ตารางเมตร) สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้

กลุ่มที่ 2 Ls

ผลทดสอบฤทธิ์ตกค้างของ Ls ในน้ำซุปรสหมู 20 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4) และน้ำกากถั่วเหลือง (ตารางที่ 5) ดังนี้

ตารางที่ 4 อัตราการใช้งาน Ls ในน้ำซุปรสหมูที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงรำคาญในการทดสอบแบบจำลองธรรมชาติ

ปริมาณ Ls (มล./ภาชนะ)	อัตราการใช้งาน (ลิตร/ตร.ม.)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ร้อยละการตายของลูกน้ำ*			
				วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20
160	2.42	30	6.34	100	76	40	24
320	4.84	29	7.67	100	100	100	100
640	9.70	31	7.23	100	100	100	100
Control	-	31	7.21	10	8	0	2

หมายเหตุ : 1. * ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบอัตราละ 4 ภาชนะ ใส่ลูกน้ำภาชนะละ 25 ตัว
2. ภาชนะทดสอบบรรจุน้ำ 16 ลิตร มีพื้นที่ผิวน้ำ 0.066 ตารางเมตร ลึก 25 เซนติเมตร

จากตารางที่ 4 พบว่าการใช้ Ls ในน้ำซุปรสหมูที่อัตรา 320 – 640 มิลลิลิตร/ภาชนะ สามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยการใช้ Ls ที่อัตรา 320 มิลลิลิตร/ภาชนะ (4.84 ลิตร/ตารางเมตร) เป็นอัตราการใช้งานที่น้อยที่สุดที่สามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ตามเกณฑ์ จึงนำอัตราการใช้งานนี้ไปคำนวณเพื่อการทดสอบภาคสนามในแหล่งเพาะพันธุ์ตามธรรมชาติต่อไป

เนื่องจากน้ำซุปรสหมูผลิตจากซุปก้อนซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ต้องหาซื้อจึงมีค่าใช้จ่ายในการผลิต หากใช้ในอัตรา 4.84 ลิตร/ตารางเมตร คิดเป็นค่าใช้จ่าย 24 บาท/ตารางเมตร ซึ่งถือว่าสูงมาก ส่วนน้ำกากถั่วเหลืองไม่เติมน้ำตาลทรายเป็นอาหารสูตรที่ให้ผลผลิต Ls ที่มีประสิทธิภาพรองจากน้ำซุปรสหมู (ตามตารางที่ 2) แต่กากถั่วเหลืองเป็นสิ่งเหลือทิ้งจึงไม่มีค่าใช้จ่ายในด้านวัตถุดิบและ Ls ที่ได้มีประสิทธิภาพน้อยกว่าเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงได้นำน้ำกากถั่วเหลืองมาใช้ในการทดสอบแบบจำลองธรรมชาติในครั้งนี้ด้วย ผลการทดสอบ Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อัตราการใช้งาน Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงรำคาญในการทดสอบแบบจำลองธรรมชาติ

ปริมาณ Ls (มล./ภาชนะ)	อัตราการใช้งาน (ลิตร/ตร.ม.)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ร้อยละการตายของลูกน้ำ*			
				วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20
20	0.30	27	6.84	100	100	100	100
30	0.45	26	6.58	100	100	100	100
60	0.91	29	6.47	100	100	100	100
Control	-	28	6.81	3	2	2	1

หมายเหตุ : 1. * ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบอัตราละ 4 ภาชนะ ใส่ลูกน้ำภาชนะละ 25 ตัว
2. ภาชนะทดสอบบรรจุน้ำ 16 ลิตร มีพื้นที่ผิวน้ำ 0.066 ตารางเมตร ลึก 25 เซนติเมตร

จากตารางที่ 5 พบว่าการใช้ Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองที่อัตรา 20–60 มิลลิลิตร/ภาชนะ สามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด โดยการใช้ Ls ที่อัตรา 20 มิลลิลิตร/ภาชนะ (0.3 ลิตร/ตารางเมตร) เป็นอัตราการใช้งานที่น้อยที่สุดที่สามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ตามเกณฑ์ นอกจากนี้ยังพบว่า Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองมีอัตราการใช้งานที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับ Ls ในน้ำซุปรสหมู (4.84 ลิตร/ตารางเมตร) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะการเพาะเลี้ยง Ls ในน้ำซุปรสหมูในระดับขยายส่วนมีปัจจัยบางประการที่ส่งผลทำให้ได้ผลผลิต Ls ที่มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาดเล็ก ส่วนการเพาะเลี้ยงในระดับขยายส่วนของน้ำกากถั่วเหลืองมีปัญหาน้อยกว่า จึงทำให้ Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองยังคงมีประสิทธิภาพที่ดีในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองแทน Ls ในน้ำซุปรสหมู

กลุ่มที่ 3 Bti ผสม Ls

นำ Bti และ Ls ที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำกากถั่วเหลืองมาผสมในอัตราต่างๆ ได้ผลทดสอบดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อัตราการใช้ Bti ผสม Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงรำคาญในการทดสอบแบบจำลองธรรมชาติ

ปริมาณ Bti : Ls (มล./ภาชนะ)	อัตราการใช้งาน (ลิตร/ตร.ม.)	อุณหภูมิ (°C)	pH	ร้อยละการตายของลูกน้ำ*			
				วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20
20:20	0.6	28	8.05	100	100	100	100
30:30	0.9	27	7.84	100	100	100	100
50:50	1.51	29	8.56	100	100	100	100
Control	-	28	7.88	2	6	2	0

หมายเหตุ : 1. * ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบอัตราละ 4 ภาชนะ ใส่ลูกน้ำภาชนะละ 25 ตัว
2. ภาชนะทดสอบบรรจุน้ำ 16 ลิตร มีพื้นที่ผิวน้ำ 0.066 ตารางเมตร ลึก 25 เซนติเมตร

จากตารางที่ 6 พบว่าการใช้ Bti ผสม Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองทุกอัตราที่ทดสอบสามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ โดยการใช้ Bti ผสม Ls ที่อัตรา 20:20 มิลลิลิตร/ภาชนะ (0.6 ลิตร/ตารางเมตร) เป็นอัตราการใช้งานที่น้อยที่สุดที่สามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ตามเกณฑ์

ตารางที่ 7 สรุปอัตราการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดต่างๆ ที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายอย่างน้อยร้อยละ 90 ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อทดสอบในสภาพจำลองธรรมชาติ

ชีวภัณฑ์	ปริมาณต่อภาชนะ*	อัตราการใช้งาน (ต่อตารางเมตร)	pH	อุณหภูมิ (°C)	ร้อยละการตายของลูกน้ำ (15 วัน)
Bti ในน้ำกากถั่วเหลือง	200 มล.	3.03 ลิตร	6.28-7.28	29-31	92
Ls ในน้ำซุปรสหมู	320 มล.	4.84 ลิตร	6.20-7.67	29-31	100
Ls ในน้ำกากถั่วเหลือง	20 มล.	0.30 ลิตร	6.47-6.84	26-29	100
Bti ผสม Ls ในน้ำกากถั่วเหลือง	40 มล.	0.60 ลิตร	7.84-8.56	27-29	100

* ภาชนะทดสอบบรรจุน้ำ 16 ลิตร มีพื้นที่ผิวน้ำ 0.066 ตารางเมตร ลึก 25 เซนติเมตร

จากการทดสอบฤทธิ์ตกค้างแบบจำลองธรรมชาติของชีวภัณฑ์ 4 กลุ่ม พบว่า Ls ในน้ำกากถั่วเหลืองมีอัตราการใช้งานที่น้อยที่สุด เพียง 0.3 ลิตร/ตารางเมตร รองลงมาคือ Bti ผสม Ls และ Bti ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าผลการทดสอบในสภาพจำลองธรรมชาติมีความสอดคล้องกับผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการกล่าวคือ การใช้ Ls เพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือ Bti ผสม Ls และ Bti ตามลำดับเช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตามนักวิจัยหลายท่านรายงานว่าลูกน้ำยุงรำคาญสามารถสร้างความต้านทาน (ดื้อ) ต่อ Ls ได้ [24, 25] ส่วน Bti ยังไม่พบการรายงานถึงการสร้างความต้านทานอย่างมีนัยสำคัญในลูกน้ำยุงรำคาญทั้งที่ Bti ถูกนำมาใช้ในการควบคุมลูกน้ำชนิดต่างๆ มาเป็นเวลาหลายทศวรรษ [26] เนื่องจาก Bti มีการสร้างผลึกโปรตีนซึ่งเป็นส่วนที่เกิดพิษต่อลูกน้ำจำนวน 4 ชนิด ซึ่งผลึกโปรตีนแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกันและมีการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน [27] ส่วน Ls สร้างผลึกโปรตีนเพียง 2 ชนิดที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างจาก Bti [28] จึงมีความเป็นไปได้ว่าลูกน้ำยุงรำคาญสร้างความต้านทานต่อ Bti ได้ยากกว่า Ls เป็นเพราะความแตกต่างของผลึกโปรตีนและกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าว

สรุปผล

การพัฒนาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Bti และ Ls ที่มีราคาถูกจากวัตถุดิบในครัวเรือนเมื่อเปรียบเทียบวัตถุดิบในครัวเรือนทั้ง 4 ชนิดพบว่ากากถั่วเหลืองมีสารอาหารที่เหมาะสมกับการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง Bti และ Ls ทำให้ได้จุลินทรีย์กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อได้โดยที่ไม่ต้องเติมน้ำตาลทรายเพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอน เป็นการนำสิ่งเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเมื่อนำชีวภัณฑ์ที่ผลิตจาก Bti และ Ls มาทดสอบฤทธิ์ตกค้างในสภาพจำลองธรรมชาติโดยวัดผลจากอัตราการใช้งานชีวภัณฑ์ที่สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ พบว่า Ls มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือ Bti ผสมกับ Ls และ Bti ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า Ls ที่เพาะเลี้ยงด้วยกากถั่วเหลืองใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี แต่เนื่องจากลูกน้ำยุงรำคาญดื้อต่อ Ls ได้ง่ายกว่า Bti ดังนั้นหากใช้ Ls มาเป็นระยะเวลาหนึ่ง ควรสลับไปใช้ Bti เพื่อให้การควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญมีประสิทธิภาพมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

[1] WHO. (2022, March 16). Lymphatic filariasis. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis

[2] Mgronline. (2019, 25 July). Ph. D. student developed Microfluidics device for lymphatic filariasis screening in Myanmar workers. https://mgronline.com/qol/detail/9620000070952. (In Thai)

[3] Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health. (1998). Action plan for filariasis elimination. http: //law.disaster.go.th/site5/download-src.php?did=30604. (In Thai)

[4] Department of Disease Control, Ministry of Public Health. (2022). Filariasis. https://ddc.moph.go.th/ disease_detail.php?d=(In Thai)

[5] WHO. (2022, March 16). Japanese encephalitis. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis

[6] Apinpen Wasantiwong. (2021). Japanese encephalitis. https://chulalongkornhospital.go.th/kcmh/line/ Japanese encephalitis. (In Thai)

[7] Chalermporn Thephusdin Na Ayudhya. (2021). Annual report for Surveillance of disease situation 2021: Encephalitis. http://odpc9.ddc.moph.go.th/EOC/Content/2564.pdf (In Thai)

[8] Tilladit Rungruengkitkrai, & Chatwaree Boontham. (2021). Heartworm disease in dogs. https://curadio.chula.ac.th/Program-Detail.php?id=11422 (In Thai)

[9] Zhang, Y., Li, X., Chen, H., Ti, J., Yang, G., Zhang, L., Lu, Y., & Diao, Y. (2015). Evidence of possible vertical transmission of Tembusu virus in ducks. *Veterinary Microbiology,* 179(3-4), 149-154.

[10] Su, T. (2017). Microbial Control of Pest and Vector Mosquitoes in North America North of Mexico. In Lacey L. (Eds.), Microbial Control of Insect and Mite Pests (1st ed., pp.393-407). Elsevier.

[11] Choladda Teangpuk. (2015). Coconut juice : great natural food. *Food journal*, 45(2), 37-42. (In Thai)

[12] Yadav, K., Dhiman, S., Baruah, I., & Singh, L. (2011). Development of Cost Effective Medium for Production of *Bacillus sphaericus* Strain Isolated from Assam, Indian. *Microbiology Journal*, 1(2), 65-70.

[13] Prayekti, E., Suliati, S., & Wulandari, D. A. (2021). Comparation Between Mac conkey and Coconut Water Medium as a Growth Medium for *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology,* 3(1),19-25.

[14] Aunchalee Aussanasuwannakul & Kanwara Tongkrajang. (2021). Utilization of okara meal from soymilk production. Food Journal, 52(1):24-36. (In Thai)

[15] Mok, W. K., Tan, Y. X., Lee, J., Kim, J., & Chen, W. N. (2019). A metabolomic approach to understand the solid-state fermentation of okara using *Bacillus subtilis* WX-17 for enhanced nutritional profile. *AMB Express*, 9(1):60. https://doi: 10.1186/s13568-019-0786-5

[16] Marto, J., Neves, Â., Gonçalves, L. M, Pinto, P., Almeida, C., & Simões, S. (2018). Rice Water: A traditional ingredient with anti-aging efficacy. *Cosmetics*, 5(26). https://doi.org/10.3390/cosmetics5020026

[17] Tu, N. H. K., & Trang, P. T. T. (2013). Effects of rice-washing water on the hyaluronic acid production of *Streptococcus thermophilus*, in IFMBE Proceedings 4th International Conference on Biomedical Engineering in Vietnam 2012, pp. 168-170.

[18] Khedher, S. B., Jaoua, S., & Zouari, N. (2014). Overcome of carbon catabolite repression of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* through adequate fermentation technology. *Biotechnology research international*, 698587. https://doi.org/10.1155/2014/698587

[19] Rahmaninezhad, S. A., Farnam, Y. A., Schauer, C. L., Najafi, A. R., Sales, C. M. (2022). Evaluation of different strategies for efficient sporulation and germination of the MICP bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain MB284 (ATCC 13805). bioRxiv 2022.09.15.508202, https://doi.org/10.1101/2022.09.15.508202

[20] Finney, D. J. (1971). Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.

[21] Abbott, W. S. (1925). A method of computing effectiveness of insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.

[22] Youngjin P., Jin, K. J., & Yonggyun, K. (2016). A mixture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Xenorhabdus nematophila* -cultured broth enhances toxicity against mosquitoes *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* pallens (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1086-1093.

[23] Thorburn, D. B., Johnston, E. L., & Michael, J. W. (2020). Authenticity and the potability of coconut water – a critical review. *Journal of AOAC international*, 103(3), 800-806.

[24] Maria, H. N. L., Tatiany, P. R., Tatiana, M. T. R., Karine, S. C., Heverly, S. G. M., Nathaly, A. N., Mario, S., & Alejandra, B. (2021). Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance, *Toxins*, 13(8), 523. https://doi: 10.3390/toxins13080523

[25] Menezes, H. S., Chalegre, K. D., Romão, T. P., Oliveira, C. M., de-Melo-Neto, O. P., & Silva-Filha, M. H. (2016). A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in Culex quinquefasciatus field populations. Parasites & Vectors, 9, 698587. https://doi:10.1186/s13071-016-1347-2

[26] Vereecken S., Vanslembrouck A., Kramer, I. M., & Müller, R. (2022). Phenotypic insecticide resistance status of the *Culex pipiens* complex: a European perspective. *Parasites & Vectors*, 15(1), 423. https://doi: 10.1186/s13071-022-05542-x

[27] Fernández, C. D., Ramírez, V. J., & Galán, W. L. (2019). Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. *IntechOpen*. https://doi: 10.5772/intechopen.85756

[28] Kanokporn Srisucharitpanit. (2018). Mosquito Larvicidal Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus*: Structure and Application. Burapha Science Journal, 23(3), 1696-1704. (In Thai)