



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
.....
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
.....

ปริญญา

..... ชีววิทยา	 สัตววิทยา
..... สาขา	 ภาควิชา

เรื่อง การใช้เชื้อราควบคุมยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* Say 1823

Using of Fungi in Controlling *Culex quinquefasciatus* Say 1823

นามผู้วิจัย นางสาวอชิรญา เกษรคุปต์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์มณจันท์ เมฆธน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมาน แก้วไวยุทธ, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ออลงกรณ์ อำนวยกาญจน์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์มณจันท์ เมฆธน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)
.....

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เชื้อราควบคุมยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* Say 1823

Using of Fungi in Controlling *Culex quinquefasciatus* Say 1823

โดย

นางสาวอชิรญา เกษรคุปต์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

พ.ศ. 2556

อชิรญา เกษรกุลปต์ 2556: การใช้เชื้อราควบคุมยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* Say
1823 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาชีววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มณจันทร์ เมฆธน, Ph.D. 140 หน้า

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราก่อโรคราในแมลง 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^6
 1×10^7 และ 1×10^8 conidia/ml. เพื่อใช้ควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ในการทดลอง
กับลูกน้ำยุงรำคาญได้ทดสอบโดยเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis israelensis*
(Bti) ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข ผลการทดลองกับลูกน้ำยุงรำคาญระยะ
3 และ 4 พบว่าเชื้อรา *Penicillium citrinum* CM-010 มีประสิทธิภาพควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ดี
ที่สุดมีอัตราการตาย 100 % ในเวลา 2 ชั่วโมง ($p < 0.05$) $LC_{50} = 3 \times 10^5$ conidia/ml. $LT_{50} = 1.06$
ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia/ml. ส่วน Bti ใช้ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และผลการทดสอบ
ภาคสนามพบว่า *P. citrinum* CM-010 มีประสิทธิภาพควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีที่สุด โดยลูกน้ำ
ยุงรำคาญระยะ 1-2 และระยะ 3-4 มีอัตราการรอดตายเพียง 1.66 และ 8.66% ตามลำดับใน 1
สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการตายของลูกน้ำยุงจากเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ด้วยกล้อง
จุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าบริเวณทางเดินอาหารมี
สปอร์ของเชื้อราอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งบ่งชี้ว่าสารพิษในเชื้อรามีผลทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย

สำหรับยุงรำคาญตัวเต็มวัยพบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* 001 ที่ความเข้มข้น
 1×10^9 conidia/ml. มีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยได้ดีที่สุดมีอัตราการตาย 36 % ในเวลา 1
สัปดาห์

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Achirayar Kaysorngup 2013: Using of Fungi in Controlling *Culex quinquefasciatus* Say 1823. Master of Science (Biology), Major Field: Biology, Department of Zoology.
Thesis Advisor: Associate Professor Monchan Maketon, Ph.D. 140 pages.

The objective of this research is to find the best entomopathogenic fungus from twenty isolates for controlling the larvae and adult of *Culex quinquefasciatus* Say 1823. The final concentration of each fungus used was 1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 conidia/ml respectively. Results showed that *Penicillium citrinum* CM-010 exhibited 100 percent mortality on the 3rd and 4th instars larvae within only 2 hrs with highly significant difference from others fungi ($p < 0.05$). Its LC_{50} was 3×10^5 conidia/ml and LT_{50} was 1.06 hrs with 1×10^6 conidia/ml. The *P. citrinum* CM-010 was further compared with *Bacillus thuringiensis israelensis*, a bacterium obtained from the Department of Medical Science, Ministry of Health for controlling the 3rd and 4th instars larvae of *C. quinquefasciatus*. *P. citrinum* CM-010 could be able to kill all mosquito larvae within 2 hrs while *B. thuringiensis israelensis* needed 24 hrs. The field test of *P. citrinum* CM-010 in controlling the larvae showed that only 1.66 and 8.66 percent survival of the 1-2nd and 3-4th instars larvae left within 1 week. In addition, the mode of action of the fungus was studied under light microscope and transmission electron microscope exhibited a large number of the fungal conidia adhere on the digestive tract tissue.

These was only 36 percent mortality of adult mosquito resulted from *Aspergillus flavus* 001 from the concentration of 1×10^9 conidia/ml. within 1 week.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มณจันทร์ เหมชน อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมาน แก้วไวยุทธ และ ดร. อลงกรณ์ อำนวยกาญจน
สินอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาในการวางแผนการวิจัย รวมถึงตรวจ
แก้ไขจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ถูกต้องสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. เลาจนา เชาวนาคิษฐ์ กรมวิทยาการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข ที่
ได้กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่าง *Bacillus thuringiensis israelensis* และบริษัท แอปพลายเคมี (ประเทศ
ไทยจำกัด) ที่ได้อนุเคราะห์เชื้อราชนิดต่างๆ

ขอขอบคุณคุณดารารัตน์ โฮตาค้า และคุณเกสินี สุทธิชาติ ที่ได้อนุเคราะห์คำแนะนำด้าน
การวิเคราะห์ HPLC ตลอดจนอำนวยความสะดวกอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

อชิรญา เกษรคุปต์

มีนาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	40
ผล	40
วิจารณ์	62
สรุป	65
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	67
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์	78
ภาคผนวก ข การคำนวณความเข้มข้นเชื้อรา	83
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการทดลอง	85
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	140

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของลูกน้ำยุงรำคาญที่ความเข้มข้นต่างๆ	40
2 แสดงอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของยุงรำคาญตัวเต็มวัยที่ความเข้มข้นต่างๆ	44
3 แสดงอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เปรียบเทียบประสิทธิภาพเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti)	47
4 ตารางแสดงอัตราการรอดตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ในภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์	49
5 แสดงความสามารถของเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน	57
ตารางผนวกที่	
ค1 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา ชนิดต่างๆ ใน 1 สัปดาห์	86
ค2 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อราชนิดต่างๆ ใน 1 สัปดาห์	106
ค3 แสดงอัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญจำนวน 100 ตัว ที่ทดสอบเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลอง	126
ค4 แสดงอัตราการรอดตายลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ในภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์	127
ค5 แสดงอัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญ 50 ตัว ทดสอบด้วยน้ำกลั่น, methanol และ patulin	128

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค6 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^6 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	129
ค7 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	129
ค8 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	130
ค9 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	130
ค10 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	131
ค11 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^9 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	131
ค12 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 กับลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลองที่เวลา 2 ชั่วโมง	132
ค13 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 กับลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลองที่เวลา 6 ชั่วโมง	132

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค14 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 กับลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลองที่เวลา 12 ชั่วโมง	133
ค15 แสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 กับลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง	133
ค16 แสดง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 1 วัน	134
ค17 แสดง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 2 วัน	135
ค18 แสดง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 5 วัน	136
ค19 แสดง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 7 วัน	137
ค20 แสดงตาราง One way ANOVA อัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น, methanol และ patulin ที่ความเข้มข้น 1 ppm.	138
ค21 แสดงตาราง One way ANOVA อัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น, methanol และ patulin ที่ความเข้มข้น 10 ppm.	138
ค22 แสดงตาราง One way ANOVA อัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น, methanol และ patulin ที่ความเข้มข้น 100 ppm.	139

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	ไข่ของยุงรำคาญ	5
2	ระยะลูกน้ำ (Larval stage) ของยุงรำคาญ	6
3	ระยะตัวโม่่ง (Pupa stage) ของยุงรำคาญ	6
4	ลักษณะภายนอกของยุงรำคาญในระยะตัวเต็มวัย (Adult stage)	8
5	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา <i>B. bassiana</i>	17
6	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i>	19
7	ลักษณะการเจริญโคโคนีของเชื้อรา <i>I. fumosorosea</i> (<i>P. fumosoroseus</i>)	21
8	ลักษณะการเจริญโคโคนีของเชื้อรา <i>L. muscarium</i>	23
9	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา <i>G. virens</i>	26
10	แสดงกับดักลูกน้ำยุงรำคาญ และการฉีดพ่นเชื้อราลงในบ่อทดลอง	34
11	แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia/ml.	42
12	แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญใน 1 สัปดาห์ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^7 conidia/ml.	42
13	แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญใน 1 สัปดาห์ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^8 conidia/ml.	43
14	แสดงอัตราการตายของยุงรำคาญตัวเต็มวัยใน 1 สัปดาห์ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^7 conidia/ml.	45
15	แสดงอัตราการตายของยุงรำคาญตัวเต็มวัยใน 1 สัปดาห์ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^8 conidia/ml.	46
16	แสดงอัตราการตายของยุงรำคาญตัวเต็มวัยใน 1 สัปดาห์ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^9 conidia/ml.	46
17	ยุงรำคาญกลุ่มควบคุม และยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>A. flavus</i> ใน 1 สัปดาห์ เมื่อส่องภายใต้กล้อง stereomicroscope 400x	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญระยะเวลาต่างๆ ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^4 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลอง	48
19 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ในภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์	50
20 ลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา และลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่เวลา 2 ชั่วโมงส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 400x	51
21 ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา และทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ส่องภายใต้กล้อง Light microscope ที่กำลังขยาย 600x	52
22 cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา และทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 หลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 200x	53
23 cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา และทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 หลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 400x	53
24 cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญกลุ่มควบคุม และ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 หลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านหรือ TEM ที่กำลังขยาย 5000x	54
25 แสดงอัตราการตาย (50 % mortality) Median lethal concentrations (LC ₅₀) ลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 แสดงอัตราการตาย (50 % mortality) Median lethal concentrations (LC ₅₀) ของลูกน้ำ ยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย เท่ากับ 3×10^5 conidia/ml.	55
27 แสดงอัตราการตาย (50 % mortality) Lethal time (LT ₅₀) ระยะเวลาที่ทำให้ลูกน้ำ ยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย เท่ากับ 1.06 ชั่วโมง	56
28 ความสามารถของเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส, เอนไซม์ไคติเอส, เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส	57
29 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญเมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น และทดสอบด้วย น้ำกลั่น+methanol และ patulin+methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ	58
30 โครมาโตแกรม standard patulin ที่เวลา 4.943 นาที	59
31 โครมาโตแกรมสารพิษ patulin ที่เวลา 4.734 นาที เป็น patulin เกิดจากเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 7 วัน	60
32 โครมาโตแกรมสารพิษ patulin ที่เวลา 4.778 นาที เป็น patulin เกิดจากเชื้อรา <i>P. citrinum</i> CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 10 วัน	60
33 แสดงสมการเส้นตรง patulin caribration curve	61
34 แสดงผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุม ลูกน้ำยุงรำคาญ <i>C. quinquefasciatus</i> โดยเทคนิค PCR	61

การใช้เชื้อราควบคุมยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* Say 1823

Using of Fungi in Controlling *Culex quinquefasciatus* Say 1823

คำนำ

ปัจจุบันนอกจากมีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์กำจัดแมลงที่ก่อปัญหาทางด้านเกษตรกรรมแล้วยังมีการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในการกำจัดแมลงที่มีควมสำคัญทางการแพทย์ด้วยเช่น ยุง(กรมควบคุมโรค, 2544) เนื่องจากยุงเป็นแมลงที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุข สร้างความรำคาญ และก่อให้เกิดปัญหาทั้งในคนและสัตว์ในหลายพื้นที่ทั่วโลก (เผด็จ และอุยวดี, 2549) โดยเป็นพาหะนำโรคมะเร็ง โรคเท้าช้าง ไข้เลือดออก ไข้สมองอักเสบหรือไข้เหลืองได้ (สุทัศน์, 2547) ซึ่งไข้สมองอักเสบเป็นโรคติดต่อชนิดหนึ่งที่มียุงรำคาญ (*Culex*) เป็นพาหะ อัตราความชุกของผู้ป่วยโรคนี้พบมากในภาคเหนือ รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และต่ำสุดคือ ภาคกลาง และต่ำสุดในภาคใต้ (กรมควบคุมโรค, 2544) ยุงรำคาญที่สำคัญๆ และพบได้บ่อยๆ ในประเทศไทยคือ *Culex quinquefasciatus* Say 1823 ยุงรำคาญชนิดนี้ชอบอาศัยอยู่ใกล้ๆ แหล่งที่พักอาศัยของ คน โดยเฉพาะในเมืองที่มีประชาชนอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น หรือแหล่งชุมชนแออัด ซึ่งมีระบบการกำจัดหรือระบายน้ำที่ไม่ดีพอ สำหรับยุงรำคาญที่พบได้ตามแถบชนบทคือ *C. tritaeniorrhynchus* และ *C. fuscocephala*

หลายปีที่ผ่านมาพบว่ามีการใช้สารเคมีควบคุม ยุงเป็นเวลานานทำให้ยุงดื้อทานต่อสารเคมี นักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศจึงมีความสนใจที่จะคิดค้น วิธีการควบคุมยุง พาหะนำโรคในลักษณะชีววิธีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการควบคุมด้วยสารเคมีฆ่าแมลงนั้นได้ก่อให้เกิดปัญหาพิษเฉียบพลันต่อผู้ใช้และยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ (พาลาก, 2540) ซึ่งการใช้สารเคมีฆ่าแมลงอย่างต่อเนื่องจะมีผลให้แมลงเกิดการดื้อทานต่อสารฆ่าแมลง และสารเคมีที่สังเคราะห์ต่างๆ ที่มีการพัฒนาขึ้นมาและใช้ในพื้นที่ย่างยิ่งเป็นจำนวนมาก โดยปัญหาหลักจากการใช้สารฆ่าแมลงนั้นได้ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ (Harwood, 1979) ปัจจุบันได้มีการควบคุมแมลงโดยชีววิธี คือการนำสิ่งมีชีวิตหนึ่งชนิดมาใช้ควบคุมกำจัดสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของการนำศัตรูทางธรรมชาติมาใช้ ได้แก่ ตัวห้ำ ตัวเบียนจะกินลูกน้ำยุงและตัวอ่อนในน้ำเป็นอาหาร เช่นเดียวกับการใช้ปลากินลูกน้ำก็เป็นวิธีที่ให้ผลดี (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ , 2546) นอกจากนี้การใช้ ศัตรู

ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อโรค อาทิ เช่น โปรโตซัว (Protozoa) แบคทีเรีย (Bacteria) ไวรัส (Virus) เชื้อรา (Fungi) ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแบคทีเรีย เช่นการนำแบคทีเรียชนิดที่มีผลต่อโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นพิษ และมีฤทธิ์ในการทำลายหรือฆ่าตัวอ่อนแมลง ได้แก่ *Bacillus thuringiensis israelensis* โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในน้ำ ดิน และตัวอ่อนของแมลง ปัจจุบันพบทั่วโลกประมาณ 70 สายพันธุ์ แต่ในประเทศไทยพบ 17 สายพันธุ์ รวมถึงมีการนำจุลินทรีย์บางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อก่อโรคต่อแมลงมาใช้ในการควบคุมกำจัดแมลง เช่น การนำโปรโตซัวบางชนิดเช่น *Ascogregarina culicis* Ross 1895 เป็นปรสิตของลูกน้ำยุงโดยก่อให้เกิดการติดเชื้อ และมีผลต่อการรอดชีวิตของลูกน้ำและย่นระยะเวลาการเจริญเติบโตของลูกน้ำ (WHO, 1975) นอกจากนี้ได้มีการนำเชื้อราหลายชนิดสามารถใช้ควบคุมลูกน้ำยุงได้ เช่น *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff, 1879 ; Sorokin, 1883สามารถควบคุมยุงในระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัยได้ (Kannan *et al.*, 2008) จะผลิต secondary metabolite มีชื่อว่า decapeptidase destruxin B และ desmethyl destruxin B ฆ่าลูกน้ำยุง และ *Toxopneustes cylindrosporum* (Gams) มีกลไกในการก่อโรคโดยเชื้อราจะเข้าไปอยู่ในตัวของลูกน้ำ (กรมควบคุมโรค, 2544) นอกจากนี้ยังมีเชื้อรา *Coelomomyces* ที่ใช้กำจัดลูกน้ำยุงโดยเมื่อลูกน้ำยุงกินสปอร์ของเชื้อรานี้เข้าไป เชื้อราจะเจริญเติบโตและทำให้ลูกน้ำยุงตายโดยตามผนังลำตัวจะมีเชื้อราเจริญอยู่ และจะแพร่ไปเมื่อมีลูกน้ำยุงมากขึ้น (Burge, 1971) จะเห็นได้ว่าวิธีการควบคุมกำจัดยุงโดยชีววิธีนี้เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติที่มนุษย์ได้เรียนรู้จากการสังเกตสิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ แล้วนำสิ่งที่ค้นพบมาทดลองปรับปรุงเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถนำมาใช้ได้อย่างเห็นผลและมีประสิทธิภาพในการควบคุมกำจัดเพื่อป้องกันและลดการระบาดของโรคที่เกิดจากยุงเป็นพาหะโดยไม่กระทบต่อสิ่งมีชีวิต (non-target organisms) และสิ่งแวดล้อม

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบศักยภาพของเชื้อราในการป้องกันกำจัดยุงรำคาญ ระยะลูกน้ำและระยะตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti โดยทำการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการ และภาคสนามเพื่อเป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีฆ่าแมลง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงรำคาญทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย
2. เพื่อทดสอบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญในห้องปฏิบัติการ และ Green house รวมทั้งทดสอบภาคสนาม เพื่อศึกษากลไกการทำงานของเชื้อราชนิดที่มีศักยภาพสูงสุดต่อยุงรำคาญ
3. เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของลูกน้ำที่ได้รับเชื้อราแต่รอดตาย เมื่อมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย
4. เพื่อศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ และการวางไข่ของยุงตัวเต็มวัยหลังจากได้รับเชื้อรา
5. เพื่อหาค่า LC_{50} และ LT_{50} ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ
6. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ และสารพิษของเชื้อราที่มีศักยภาพสูงสุดต่อยุงรำคาญ

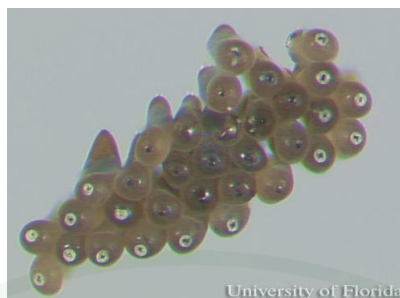
การตรวจเอกสาร

ยุงรำคาญ *Culex* sp. จัดอยู่ใน Subfamily Culicinae พบอยู่ทั่วโลก ซึ่งจัดเป็นแมลงที่มี complete metamorphosis เช่นเดียวกับหมีด และแมลงวัน ยุงรำคาญจัดอยู่ใน Order Diptera Suborder Nematocerca ทั้งนี้เพราะมีหนวดขาและแบ่งออกเป็นปล้องๆ แต่ละปล้องมีรูปร่างเหมือนกันและขนาดไล่เลี่ยกัน ความยาวของหนวดจะยาวกว่าส่วนอกและส่วนท้อง และอยู่ใน Family Culicidae เพราะเหตุว่าตัวยาวเรียว เส้นปีกจะมีรูปแบบโดยเฉพาะ คือเส้นปีกเส้นที่ 3 ตรงปลายจะมีเส้นเดียว แต่เส้นที่ 2 และ 4 ตรงปลายจะแยกเป็นสองแฉก ตามส่วนปาก หัว อก ท้อง ปีก ขาจะมีเกล็ด (scale) ปกคลุม และขอบปีกด้านหลัง (posterior margin) จะมีเกล็ดเรียงเป็นแถวเดียว ตลอดขอบปีก (fringe of scales) ยุงมีอยู่ 3,450 กว่าชนิด (species) ซึ่งถ้ารวมเป็นกลุ่มใหญ่ๆจะมีอยู่ 3 subfamilies คือ Subfamily Toxorhynchitinae (ยุงยักษ์) Subfamily Culicinae (ยุง Culicine) และ Subfamily Anophelinae (ยุง Anopheline) หนึ่งในสกุลนี้ทางการแพทย์ได้ให้ความสนใจ คือ *Culex* เรียกทั่วไปว่า ยุงรำคาญสามารถพบได้ทั่วโลกที่สำคัญในประเทศไทยคือ ยุง *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 *C. tritaeniorhynchus* *C. fuscocephala* และ *C. gelideus* เป็นพาหะหลักสำคัญในการแพร่เชื้อไข้สมองอักเสบ (กรมควบคุมโรค, 2544)

ในวงจรชีวิตของยุงนั้นมีอยู่ 4 ระยะ (stage) คือระยะไข่ (egg) ลูกน้ำ (larva) ตัวโม่่ง หรือ ดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult)

ระยะไข่ (Egg stage)

ไข่ของยุงรำคาญแต่ละใบจะมีรูปร่างยาวๆรีๆ คล้ายบุหรี่ซิกการ์ ขั้วของไข่ด้านหนึ่งจะมีลักษณะหนาเป็นวงรอบขั้วเรียกว่า collar เมื่อไข่ออกมาจากตัวเมียใหม่ๆจะมีสีขาวครีม ต่อมาสีจะคล้ำออกน้ำตาล ไข่ของยุงรำคาญนี้จะเกาะกันลอยเป็นแพ โดยทุกใบจะตั้งตรงเรียงเป็นแถวอยู่หลายๆแถว (ภาพที่ 1) แต่ละแพจะมีไข่อยู่ประมาณ 300 ฟอง ไข่แต่ละฟอง จะเกาะกันลอยเป็นแพได้เนื่องจากแรงตึงผิว (surface tension) ของไข่แต่ละฟอง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ไข่ของยุงรำคาญ

ที่มา: University of Florida (2009)

ระยะลูกน้ำ (Larval stage)

ระยะลูกน้ำของยุงจะต้องอาศัยอยู่ในน้ำ และมีรูปร่างแตกต่างกันไป ระยะลูกน้ำของยุงไม่มีขา ตัวยาวๆ ส่วนอกจะอ้วนป้อมกว่าส่วนท้องและส่วนหัว (ภาพที่ 2) มีขนที่มีทั้งลักษณะเป็นเส้นเดี่ยวๆ (simple) หรือแตกออกเป็นกิ่งก้านเล็กและยาว ปกติจะลอกคราบ 3 ครั้งหรือมี 4 larval instars ในเขตร้อนระยะลูกน้ำ (larva) จะฟักออกมาจากไข่ใน 2-3 วัน (ในเขตหนาวจะใช้เวลาเป็นอาทิตย์) ระยะลูกน้ำจะใช้เวลาประมาณ 7 วัน ในเขตร้อน (ในเขตหนาวเป็นเดือน) ก็จะเจริญเติบโตกลายเป็นระยะตัวมด (pupa) ลูกน้ำของยุงทุกสกุลจะมีส่วนหัวซึ่งมีหนวด 1 คู่ มีตา 1 คู่ ส่วนปากจะมีขนที่เรียงตัวกันคล้ายแปรง (mouth brushes) ซึ่งจะช่วยกวาดพวกอาหารที่อยู่ในน้ำเข้าสู่ปาก ซึ่งลักษณะของลูกน้ำยุงรำคาญตรงด้าน dorsal ของปล้องที่ 8 จะมีท่ออากาศ (siphon) ยาวเรียวบางที่อาจจะสั้นและอ้วน ส่วนปลายสุดของท่อนี้จะมี spiracles อยู่ 1 คู่ตามด้าน ventral ของ siphon จะมีหนามเล็กๆ แข็งเรียกว่า pecten เรียงเป็นแถวและมีกระจุกขนเรียกว่า subventral tufts และด้านข้างของปล้องที่ 8 จะมีหนามเล็กๆ แข็งเรียงเป็นแถวเดี่ยวหรือมากกว่าเรียกว่า comb ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างกัน ทางด้าน subventral ของท่ออากาศจะมีกระจุกขน (hair tufts) มากกว่า 1 คู่ ซึ่งจะอยู่บริเวณกลางๆ หรือปลายๆ ของท่ออากาศ ดังรูป (ภาพที่ 2) ส่วนท้องของลูกน้ำจะแยกออกเป็นปล้องๆ อย่างชัดเจน ซึ่งจะเห็นชัดเจนเพียง 9 ปล้อง เกือบทุกปล้องจะมีขนเป็นเส้นเดี่ยวๆ หรือแตกออกเป็นกิ่งก้านเล็กๆ ปล้องสุดท้ายของท้อง (anal segment) จะมีขนยาวๆ ยื่นออกไป 2 กลุ่ม ซึ่งจะ เป็น caudal brush or setae และอีกกลุ่มจะเป็น ventral brush บนปล้องสุดท้ายยังมีแผ่นแข็งแรงๆ หุ้มเรียกว่า saddle pecten และมี anal gills รูปร่างคล้ายใบพายเรือเล็กๆ ยื่นยาวออกไปทางส่วนหาง 2 คู่ ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ osmoregulator



ภาพที่ 2 ระยะลูกน้ำ (Larval stage) ของยุงรำคาญ

ที่มา: University of Florida (2009)

ตัวโม่ (Pupa stage)

มีรูปร่างคล้ายกับเลขหนึ่งของไทยหรือ comma-shaped (ภาพที่ 3) ส่วนหัวและอกจะรวมกันเรียก cephalothorax ด้าน dorsal จะมี respiratory trumpet ที่มีลักษณะคล้ายส่วนปากของแตงเป่าจำนวน 1 คู่ ยุงรำคาญจะมี air trumpet รูปร่างอ้วนและสั้น ตรงปลายแคบปากแตง ซึ่งจะทำให้หน้าเกี่ยวกับการหายใจ ส่วนของท้องจะมีปล้องที่เห็นชัดเพียง 8 ปล้อง แต่ละปล้องไม่มีขนแข็ง ปกติระยะตัวโม่นี้จะลอยอยู่ระดับผิวน้ำ ถ้าถูกรบกวนมันจะจมลงใต้น้ำอย่างรวดเร็วโดยการยี้ ดกดของส่วนท้อง ระยะ pupa นี้ใช้เวลาประมาณ 2-3 วันก็จะเจริญเติบโตเป็นระยะ adult โดยที่ผนังของ cephalothorax จะแยกออกแล้ว adult จะออกมาเกาะอยู่บนผิวน้ำหรือตามพืชที่ขึ้นอยู่เหนือผิวน้ำ รอจนกระทั่งปีกแข็งแรงคือประมาณชั่วโมงกว่าๆมันก็จะบินขึ้นจากที่เกาะพัก



ภาพที่ 3 ระยะตัวโม่ (Pupa stage) ของยุงรำคาญ

ที่มา: University of Florida (2009)

ระยะตัวเต็มวัย (Adult stage)

ยุงรำคาญเป็นยุงที่มีขนาดเล็กจนถึงกลาง ซึ่งลักษณะของการเกาะพัก (resting stage) ของยุงชนิดนี้ (ภาพที่ 4) จะเป็นไปในลักษณะที่ปากจะหักทำมุมกับอกและท้อง และมักจะวางส่วนอกและท้องขนานกับพื้นผิวที่เกาะ ส่วนของลำตัว ปีก และขาของยุงรำคาญจะมีเกล็ดเล็กๆยาวที่สมมาตร (plumae scales) ปกคลุม ในยุงรำคาญบางชนิดที่ปกคลุมทุกเกล็ดจะมีสีเดียวกันตลอดทั้งตัว คือสีน้ำตาลหรือ สีเทา แต่ในบางชนิดอาจจะมีกลุ่มเกล็ดสีขาว แทรกพื้นสีน้ำตาลหรือสีเทา ลำตัวของยุงยาวเรียว ยาวประมาณ 4-6 มม. สามารถแยกออกเป็นส่วนหัว (head) อก (thorax) และท้อง (abdomen) ได้อย่างชัดเจน

หัว : ส่วนหัวของยุงจะมีลักษณะกลมๆมีตาอยู่ 1 คู่ ระหว่างตาทั้งสองจะมีหนวด (antenna) เรียวยาวยื่นออกไปทางส่วนหน้า (anterior) หนวดจะมีอยู่หลายปล้องความยาวของหนวดจะยาวกว่าส่วนอกและท้อง ซึ่งในยุงตัวเมียตามข้อต่อของแต่ละปล้องของ หนวดจะมีขนสั้นๆขึ้นอยู่ประปราย เรียกว่า แบบ pilose แต่ในยุงตัวผู้ตามข้อต่อของแต่ละปล้องของหนวดจะมีขนสั้นๆขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น เรียกว่า แบบ plumose ซึ่งการแยกเพศยุงจะสังเกต ได้ที่หนวด ด้านล่างของหนวดจะเป็น maxillary palps (ซึ่งมักนิยมเรียกสั้นๆว่า palps) ยื่นออกไป 1 คู่ ปกติ palp จะมีอยู่ 4 ปล้อง ในยุงตัวผู้ความยาวของ palp จะมีขนาดยาวกว่า proboscis เล็กน้อยและเรียว ในยุงตัวเมีย palp จะมีขนาดสั้นๆประมาณ 1 ใน 5 ของความยาวของ proboscis ตรงกึ่งกลางระหว่าง palp ทั้งสองคือปาก ซึ่งจะมีลักษณะเป็นท่อยื่นยาวออกไปตรงๆ ทางด้านหน้า ซึ่งส่วนปากนี้เรียกว่า proboscis โดยที่ proboscis ของยุงตัวเมียนั้นจะเป็นแบบทิ่มแทง เจาะและดูดเลือดจากโฮสต์สำหรับ proboscis ของยุงตัวผู้นั้นไม่สามารถทิ่มแทงโฮสต์ได้ ส่วนปากของยุงตัวเมีย ซึ่งจะประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ คือ labium มีอยู่ 1 อัน ซึ่งเป็นส่วนล่างของปาก ขอบด้านล่างของ labium จะยกสูงขึ้น ทำให้เกิดเป็นร่องตรงกลาง ส่วนต่างๆของปากจะวางอยู่ในร่องนี้ ปลายสุดของ labium จะแยกเป็นสองกลีบ คือ labella ส่วนบนสุดของปากคือ labrum มีอยู่ 1 อัน จะยื่นยาวและปลายสุดจะแหลม ด้านในของ labrum จะเป็นร่องยาวๆตลอดความยาวของ labrum น้ำลายของยุงนั้นจะถูกสร้างจากต่อมน้ำลายซึ่งมีอยู่ 3 กลีบอยู่ตรงบริเวณด้าน ventral ของด้านหน้าของส่วนอก จากต่อมน้ำลายแต่ละกลีบจะมีท่อน้ำลายยื่นออกไปทางส่วนหัว และท่อน้ำลายทั้งสามจะรวมเป็นท่อขนาดใหญ่ ท่อเดียว ซึ่งจะเปิดออกที่ฐานของ hypopharynx ในน้ำลายของยุงตัวเมียมีย สารที่ป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว (anticoagulant) ซึ่งจะช่วยให้เลือดของโฮสต์ไม่แข็งตัว

อก : ทางด้าน dorsal จะโค้งนูนเล็กน้อยและมีเกล็ดปกคลุม ในยุงบางสกุลเกล็ดเหล่านี้จะมีสีทึบๆสีเดียวตลอดทั้งหมด แต่ในบางสกุลจะมีกลุ่มเกล็ดสีขาวหรือสีอื่นๆ แทรกสลับกลุ่มเกล็ดที่เป็นพื้นสีทึบๆ แผ่นที่ปกคลุมด้าน dorsal ของ mesothorax (mesonotum) จะมีขนาดใหญ่กว่าปล้องแรกและปล้องที่สาม ซึ่ง Mesonotum สามารถแยกออกเป็นส่วนๆ ส่วนที่อยู่เกือบปลายสุด เรียก scutellum โดยที่ขอบปลายสุดของ scutellum จะแบ่งเป็น 3 กลีบ แต่ละกลีบจะมีกระดูกขนแข็งยาว ปีกของยุงที่มองเห็นได้ชัดเจนเป็นปีกที่ขึงไบบินนั้นมีอยู่เพียงคู่เดียว คือ ปีกคู่หน้าสำหรับปีกคู่หลังจะหดสั้นเหลือเป็นค้อนเล็กๆเรียกว่า halteres ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการทรงตัวเท่านั้น ในปีกคู่หน้าที่มองเห็นได้ชัดเจนนั้นตามเส้นปีกจะมีเกล็ดปกคลุมทั่วทั้งปีก เกล็ดปีกอาจมีรูปร่างที่สมมาตรและมีขนาดเล็กๆ เรียกว่า plumae จะมีสีเดียวคือ สีเทา หรือสีน้ำตาลทั่วทั้งปีก (Belding, 1965) ขาของยุงจะมีลักษณะเรียวยาว ประกอบด้วยปล้องต่างๆ 5 ปล้อง (coxa, trochanter, femur, tibia and tarsus) สำหรับปลายสุดของ tarsus หรือปลายขาจะมีตะขอ (claws) 1 คู่ ระหว่างตะขอทั้งสองจะมีขนยาวๆยื่นออกไป 1 อันตรงกลางเรียก empodium ระหว่างตะขอทั้งสองจะมีแผ่นหนาๆยาวๆ ยื่นออกมา 1 คู่เรียกว่า pulvilli ขาจะปกคลุมด้วยเกล็ดเช่นเดียวกันกับส่วนปาก อกและปีก

ท้อง : จะมีอยู่ 10 ปล้อง แต่มองเห็นชัดเจนเพียง 8 ปล้องแรกเท่านั้น ส่วนท้องก็จะถูกปกคลุมด้วยเกล็ดเช่นกันซึ่งเกล็ดที่ปกคลุมท้องในแต่ละสกุลนั้นจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เกล็ดจะมีสีเทาหรือสีน้ำตาลตลอด โดยทั่วไปปล้องปลายสุดของท้องจะมี cerci อยู่ 1 คู่ ในตัวเมีย Cerci จะหดยู่ภายในปล้องสุดท้ายของท้องหรือมองเห็นลักษณะก้นป้าน ซึ่งลักษณะที่แตกต่างกันของ Cerci ที่หดย่นหรือยื่นสามารถใช้จำแนกยุงรำคาญแต่ละชนิดได้ (สุภัทร, 2531)



ภาพที่ 4 ลักษณะภายนอกของยุงรำคาญในระยะตัวเต็มวัย (Adult stage)

ที่มา: University of Florida (2009)

ชีววิทยาและอุปนิสัย (Biology and Behavior)

ยุงรำคาญตัวเมียจะวางไข่ลงในน้ำหลังจากผสมพันธุ์กับตัวผู้และกัดดูดเลือดโฮสต์แล้ว ไข่จะลอยเกาะกันเป็นแพในน้ำ ซึ่งปกติแล้วแหล่งน้ำที่ยุงรำคาญชอบวางไข่นั้นก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ยุงรำคาญจะชอบอาศัยอยู่ใกล้ๆ แหล่งที่พักอาศัยของคน โดยเฉพาะในเมืองที่มีประชาชนอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น แหล่งสลัมหรือชุมชนแออัด ซึ่งมีระบบการกำจัดหรือระบายน้ำที่ไม่ดีพอ ยุงตัวเมียชอบวางไข่ในแหล่งน้ำได้เกือบทุกชนิด เช่นน้ำที่ขังในภาชนะต่างๆ และตามแหล่งน้ำโสโครกที่เน่าเสียมีพวกอินทรีย์สารเน่าเปื่อย เช่นน้ำที่ขังตามบริเวณบ้านหรือแหล่งสลัม ยุงรำคาญชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วมาก มีอุปนิสัยชอบออกหากินเวลากลางคืน ชอบดูดกินเลือดคนมากกว่าสัตว์ เเกาะพักอาศัยได้ทั้งนอกและในบ้ านเนื่องจากอุปนิสัยของยุงชนิดนี้มักจะก่อความรำคาญให้กับคนที่ประกอบกิจการงานตอนค่ำๆ จึงนำมาเรียกชื่อว่า ยุงรำคาญ

ความสำคัญทางการแพทย์ (Medical important)

1. ระบาดและสูญเสียเลือด การสูญเสียเลือดเนื่องจากยุงกัด คนนั้น มักจะไม่มีอันตรายมากนัก ยุงรำคาญโดยเฉพาะ *C. quinquefasciatus* ซึ่งเป็นยุงที่ชอบอาศัยอยู่ตามบริเวณบ้านเรือน หรือที่พักอาศัย ชอบดูดเลือดคนและออกหากินในเวลากลางคืน ฉะนั้นจึงทำความรบกวนหรือรำคาญให้ผู้ที่พักอาศัยอยู่ตามบ้านเรือน โดยเฉพาะในที่ที่มียุงนี้อยู่จำนวนมากๆ ทั้งนี้ยุง *C. quinquefasciatus* จัดว่าเป็นยุงรำคาญที่แท้จริง ผู้ที่ถูกยุงนี้ดูดเลือดในบางรายบริเวณผิวหนังที่ถูกกัดอาจจะเป็นตุ่มบวมแดงหรืออักเสบ และคันเมื่อเกาหลายๆ อาจจะทำให้เกิดเป็นแผล

2. ตัวนำเชื้อโรค ยุงรำคาญบางชนิดสามารถเป็นตัวนำเชื้อโรคมานำสู่คน ที่พบในประเทศไทยมีดังนี้ ฟิลาเรียที่ทำให้เกิดโรคเท้าช้าง : ยุงรำคาญบางชนิดสามารถเป็นตัวนำหนอนพยาธิตัวกลม คือ *Wucherelia bancrofti* nocturnal Periodic ซึ่งพบในเขตร้อนนั้น *C. quinquefasciatus* สามารถเป็นตัวนำโรคเท้าช้างได้เช่นเดียวกับยุงก้นปล่อง แต่เป็นแบบ urban type ทั้งนี้เพราะยุงรำคาญชนิดนี้ชอบออกหากินเวลากลางคืน และวางไข่ได้ในแหล่งน้ำแทบทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำขังที่เน่าและสกปรก ในเขตตัวเมืองที่มีประชากรอยู่อย่างหนาแน่น สำหรับเมืองไทยพบผู้ป่วย *W. bancrofti* urban and nocturnal type อยู่ตามเขตชายแดน ไทยและพม่า ตั้งแต่จังหวัดระนองไปจนถึง เชียงราย ปัจจุบันโรคนี้มีปัญหามากโดยเกรงว่าแรงงานชาวพม่าที่อยู่ในแหล่งระบาดของโรคนี้แล้วเข้ามาเป็นกรรมกรรับจ้างในประเทศไทยตามเมืองใหญ่ๆ จะมาแพร่โรคนี้

3. ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคสมองอักเสบโดยมียุงรำคาญในประเทศไทยเป็นตัวนำโรค ได้แก่ ยุงรำคาญชนิด *C. tritaeniorhynchus* Giles 1901 *C. fuscocephala* และ *C. gelideus* เป็นตัวนำเชื้อไวรัส Japanese Encephalitis virus (JE) or Japanese B Encephalitis virus ซึ่งทำให้เกิดโรค Encephalitis (สมองอักเสบ) ในคน โดยเฉพาะในเด็กอายุ 5-14 ปี อัตราความชุกของผู้ป่วยโรคนี้นับมากในภาคเหนือ รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และต่ำสุดในภาคใต้ JE virus นี้เป็นโรค zoonosis โดยมีนกกระสา นกกระยาง สุกรเป็น reservoir host นอกจากนี้ยุงรำคาญบางชนิดยังเป็นตัวนำเชื้อมาลาเรียที่เกิดในหนู และนกด้วย

วิธีการควบคุมยุงรำคาญ แบ่งออกเป็นหลายประเภท ดังนี้

1. การควบคุมทางเคมี (Chemical Control)

การควบคุมยุง รำคาญมีการใช้ยาฆ่าแมลงฉีดพ่นตามบ้านเรือน และที่พักอาศัย พบว่ายุงรำคาญในบางพื้นที่จะดื้อต่อยาฆ่าแมลง มีการใช้สารอินทรีย์ เช่น paris green และพวกน้ำมันจี้ไล่ไล่ลงไปในแหล่งน้ำที่มีลูกน้ำยุงรำคาญ ทั้งนี้เพราะ paris green จะฆ่าลูกน้ำยุงและน้ำมันจี้ไล่ที่ลาดลงไปจะลอยเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวน้ำ ทำให้ลูกน้ำยุงไม่สามารถหายใจเอาอากาศที่อยู่เหนือผิวน้ำได้

2. การควบคุมทางกายภาพ (Physiological Control)

การควบคุมยุง รำคาญ ซึ่งจะขอ บวกไขตามแหล่งน้ำเน่าและสกปรกภายในเมืองสามารถกระทำได้โดยทำลายแหล่งน้ำเหล่านั้นและจัดระบบการระบายน้ำให้ดี

3. การควบคุมโดยชีววิธี (Biological Control)

การควบคุมยุงรำคาญในแหล่งเพาะพันธุ์ของลูกน้ำยุงมีการใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมลูกน้ำยุงจะช่วยลดอัตราของโรคที่มียุงรำคาญเป็นตัวนำ ให้ลดลงได้ในพื้นที่นั้นๆ (Burge, 1971) นอกจากนี้มีศัตรูธรรมชาติหลายชนิดด้วยกันที่สามารถนำมาใช้ควบคุมลูกน้ำยุงได้ เช่น

1.1 ตัวห้ำ (Predators) ที่นิยมใช้คือพวกปลา *Gambusia affinis* Baird and Girard 1853 และปลาหางนกยูง ตัวห้ำอีกชนิดหนึ่งคือตัวอ่อนของ *Toxorhynchites* sp. (ยุงยักษ์) โดยพวกตัวห้ำเหล่านี้จะกินลูกน้ำยุง

3.2 ตัวเชื้อโรค (Pathogens) ซึ่งมักจะใช้กำจัดลูกน้ำยุง

Virus : Indescent and Cytoplasmic polyhedrosis viruses

Bacteria: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*

Fungi : *Coelomomyces*, *Lagenidium*

3. ตัวเบียน (Parasites) ได้แก่

Protozoa : *Nosema*, *Thelohania*

Nematode : *Romanomermis culicivorax*

4. การควบคุมโดยวิธีทางพันธุกรรม (Genetic method)

วิธีนี้ส่วนมากมักมุ่งไปในการทำให้ยุงเป็นหมันโดยใช้สารเคมีหรือใช้รังสีไปทำให้ยุงระบบสืบพันธุ์ในยุงตัวผู้มีการเปลี่ยนแปลงทำให้เป็นหมัน แล้วผลิตยุงตัวผู้ที่เป็นหมันออกมาหลายๆ เพื่อไปแข่งยุงตัวผู้ที่มีอยู่ในธรรมชาติผสมพันธุ์กับตัวเมีย ทำให้ยุงตัวเมียที่ถูกผสมพันธุ์โดยยุงตัวผู้ที่เป็นหมันวางไข่ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ รวมไปถึงวิธีการทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ (mechanical or environmental) วิธีนี้มักจะมุ่งไปในการทำลายแหล่งเพาะพันธุ์หรือแหล่งวางไข่ของยุง เช่น แหล่งน้ำขนาดเล็กจะใช้ดินหรือทรายกลบ ตามโครงไม้ก็ใช้ดินน้ำมันหรือดินเหนียวอุดไว้ หรือตามแหล่งชุมชนควรจัดทำทางระบายน้ำที่มีประสิทธิภาพ ทำลายแหล่งน้ำเน่าเสียเหล่านั้น พวกภาชนะที่ใส่น้ำไว้ควรหาฝาปิดให้มิดชิด และวิธีใช้สารเคมีหรือยาฆ่าแมลง (chemical methods) ในการควบคุมยุง สมองอักษะในปัจจุบันมักจะใช้ยาฆ่าแมลงทำลายระยะตัวเต็มวัยของยุงโดยนำ chlorinated hydrocarbon มาละลายน้ำแล้วฉีดพ่นตามที่ พักอาศัยมักจะฉีดพ่นทุกๆ 3 หรือ 6 เดือนซึ่งในพื้นที่ที่ไม่มียุงรำคาญที่คื้อยา สามารถลดอัตราผู้ป่วยใช้สมองอักษะได้ในบางพื้นที่อาจจะใช้สารเคมีกลุ่มไพริทรอยด์สังเคราะห์ (synthetic pyrethroid compounds) สารเคมีในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ค่อนข้างดีในการกำจัดยุงพาหะ แต่มีพิษต่อคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถ้ายุงคื้อยามักจะใช้ malathion หรือ sevin แต่ต้องฉีดพ่นบ่อยๆ ครั้งและมีราคาแพง การฉีดพ่นยาฆ่าแมลงติดตามฝารือเพดานที่พักอาศัยจะสามารถทำลายยุงได้เฉพาะชนิดที่ชอบเกาะพักภายในบ้านเท่านั้น

การใช้แบคทีเรียควบคุมยุงรำคาญทางชีววิธี

Bacillus thuringiensis israelensis เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุง โดยแบคทีเรียชนิดนี้มีสารพิษที่เรียกว่า δ endotoxin โดยจะถูกสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่แบคทีเรียกำลังจะเปลี่ยนจาก vegetative form ไปสู่ spore form ผลัดกันที่นำไปใส่ในแหล่งน้ำ จะต้องมี toxin จำนวนมากจึงจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ดี เมื่อลูกน้ำยุงที่อยู่ในน้ำจะกินแบคทีเรียและสารอินทรีย์เล็กๆต่างๆโดยอาศัยการกระพือของ mouth brush ปิดเอาแบคทีเรียเข้าปากเข้าสู่ทางเดินอาหาร โดย toxin ของแบคทีเรียจะถูกละลายในสภาพต่างใน ทางเดินอาหารของลูกน้ำยุงแล้วไปจับกับ เซลล์ตัวรับที่อยู่บริเวณกระเพาะอาหารบวมพองขึ้นและแตก มีผลทำให้กระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงเกิดรอยร้าวและตายในที่สุด ผลัดกันแบคทีเรียของแต่ละหน่วยงานมีประสิทธิภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสูตรของผลัดกันนั้นๆ ในประเทศไทยมีการผลิตผลัดกันแบคทีเรียกำจัดลูกน้ำหลายชนิด เช่น Bacillet , Culicide , Mostab

Bacillus thuringiensis israelensis เรียกย่อว่า Bti เป็นแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (bacillus) ย้อมสีแกรมได้แกรมบวก (Misch, 1986) เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตามธรรมชาติและไม่ก่อโรค (non – pathogenic bacteria) สามารถสร้างเอนโดสปอร์ขนาดใหญ่รูปกลมรี ภายในเซลล์มีส่วนที่เป็นสารพิษมีฤทธิ์ต่อแมลง คือ protein inclusion ซึ่งได้แก่ delta – endotoxin (Walker, 2002) เมื่อลูกน้ำกินแบคทีเรียเข้าไปสารพิษนี้จะไปทำปฏิกิริยาเกิดพิษในกระเพาะอาหารทำให้ลูกน้ำตายภายในเวลาไม่ถึงชั่วโมงจนกระทั่งถึง 48 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ ถ้าตัวของลูกน้ำที่ตายจะมีสีต่างจากการตายของสารเคมีซึ่งตัวมีสีขาว ผลัดกันสารพิษนี้สามารถย่อยสลายเองในธรรมชาติ แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในธรรมชาติได้ จึงอาจเรียกว่า “biopesticide” มีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมและสิ่งแวดล้อม (อุดม, 2548)

Bacillus thuringiensis israelensis หรือ Bti ได้รับการผลิตออกจำหน่ายตามท้องตลาดมีชื่อทางการค้าแตกต่างกันไป และมีหลายสูตรให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมกับชนิดของแหล่งน้ำและชนิดของลูกน้ำยุง เช่น

1. สูตรเคลือบเม็ดทราย ใช้ได้กับภาชนะกักเก็บน้ำต่างๆ เพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลาย เนื่องจากลูกน้ำยุงลายกินที่ก้นภาชนะ เป็น bottom feeder แบคทีเรียสูตรเคลือบเม็ดทรายจะจมลงสู่ก้นภาชนะ ลูกน้ำยุงก็จะกิน แบคทีเรียเข้าไป เมื่อแบคทีเรียผ่านเข้าไปสู่ กระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงที่มีสภาพเป็นด่าง ผลัดกันสารพิษของแบคทีเรียจะแตกตัวทำให้ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงเป็นอัมพาต เย็น

กระเพาะอาหารถูกทำลายทำให้ลูกน้ำตายภายใน 24 ชั่วโมง แบคทีเรียสูตรเคลื่อนเม็ดทรายไม่เหมาะที่จะใช้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากทรายจะจมลงไป อยู่ใต้น้ำอยู่ในรูปของตะกอนจึง ทำให้ประสิทธิภาพลดลง

2. สูตรเม็ด สามารถใช้ได้กับภาชนะกักเก็บน้ำต่างๆ สำหรับสูตร เม็ดมีอัตราการใช้คือ 1 เม็ด / น้ำ 200 ลิตร อย่างไรก็ตามการใช้กับภาชนะที่มีขนาดบรรจุให้น้อยกว่า 200 ลิตร จะต้องมีการลดขนาดของแบคทีเรียลงไปตามส่วน เช่น $\frac{1}{2}$ เม็ด หรือ $\frac{1}{4}$ เม็ด เป็นต้น

3. สูตรเคลื่อนซังข้าวโพด สำหรับใช้กำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องในแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากลูกน้ำยุงก้นปล่องมักหากินบริเวณผิวน้ำเป็น surface feeder ซังข้าวโพดก็ลอยน้ำทำให้แบคทีเรียกระจายตัวอยู่บริเวณใกล้ผิวน้ำ ลูกน้ำยุงก้นปล่องจึงมี โอกาสกินแบคทีเรียเข้าไปได้มากกว่าสูตรอื่นๆ

ตั้งแต่ปี พ.ศ.2533 มีรายงานการใช้ *Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti ในการควบคุมลูกน้ำยุงพบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายลูกน้ำยุงลาย และยุงรำคาญ *C. pipiens* และ *C. quinquefasciatus* (ศุภยงค์ และคณะ, 2533)

ในปี ค.ศ. 2004 มีรายงานการประเมินในห้องทดลองและภาคสนาม ในการใช้ Bti ในการควบคุมลูกน้ำยุง *A. stephensi*, *C. quinquefasciatus* และ *A. aegypti* ในแหล่งเพาะพันธุ์ในส้วมและน้ำทิ้ง โดยให้ปริมาณสาร 3 ขนาด คือ 1, 1.5 และ 2 ลิตร / เฮกตา โดยทำการเลือกแหล่งเพาะ พันธุ์ 5 แห่งสำหรับแต่ละขนาดโดยมี 1 แห่งเป็นกลุ่มควบคุม พบว่า *A. stephensi* มีความไวต่อพิษของ Bti มาก และในส้วมพบว่า การลดลงของลูกน้ำมีมากกว่าร้อยละ 80 หลังจาก 6 วันที่ทำการทดลอง ทั้ง 3 ขนาด และในการใช้ Teknar HP-D ที่ 1 ลิตร / เฮกตา 1 ครั้งภายใน 3 สัปดาห์สำหรับการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* ในน้ำทิ้ง พบว่า การลดลงของลูกน้ำมีมากกว่าร้อยละ 80 ภายใน 3 วัน (Gunasekaran et al., 2004)

การใช้เชื้อราควบคุมยุงรำคาญทางชีววิธี

เชื้อราส่วนใหญ่ สามารถเข้าทำลาย แมลงส่งผลให้ มีการติดเชื้อเข้าทางผิวหนังตัวมา กที่สุด รongลงมาคือ เข้าทำลายผ่านทางระบบทางเดินหายใจ และทำลายระบบ ทางเดินอาหาร โดยจะเข้า ทำลายเมื่อแมลงกินสปอร์ของเชื้อราเข้าไป ในปี ค.ศ. 1971 ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Coelomomyces* โดยเมื่อลูกน้ำยุงกินสปอร์ของเชื้อรานี้เข้าไป เชื้อราจะเจริญเติบโตและทำ ให้ลูกน้ำ ยุงตายโดยตามผนังลำตัวจะมีเชื้อราเจริญอยู่ และจะแพร่ไปเมื่อมีลูกน้ำยุงมากขึ้น (Burge, 1971) ซึ่ง เชื้อราจะมีวิธีการเข้าทำลาย แมลงที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อ รา และสภาพความเป็นอยู่ของ แมลงอีกทั้งเชื้อราในการควบคุมแมลงนี้ได้มีการทดลองใช้มานานแล้ว ส่วนใหญ่ใช้วิธี introduction และ colonization คือการนำเชื้อรามาล่อยในพื้นที่ที่แมลงอาศัย หรือนำเชื้อรามาล่อยเพื่อเพิ่ม ระดับเชื้อราซึ่งควบคุมแมลงอยู่แล้วแต่อยู่ในระดับต่ำ

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าเชื้อราหลายชนิดที่สามารถ ผลิตสารพิษ สามารถนำมาใช้ ควบคุมลูกน้ำ ยุงได้ เช่นเชื้อรา *M. anisopliae* ผลิตสารพิษ decapeptidase destruxin B และ desmethyl destruxin B ทำลายลูกน้ำยุง (Kannan *et al.*, 2008) และในปี ค.ศ. 2001 ได้มีการศึกษาพบว่า เชื้อรา *Chrysosporium tropicum* Carmichael 1962 สามารถสร้างสารพิษ และมีผลต่อลูกยุงก้นปล่อง *A. stephensi* (Priyanka *et al.*, 2001)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคอันเกิดจากเชื้อรา

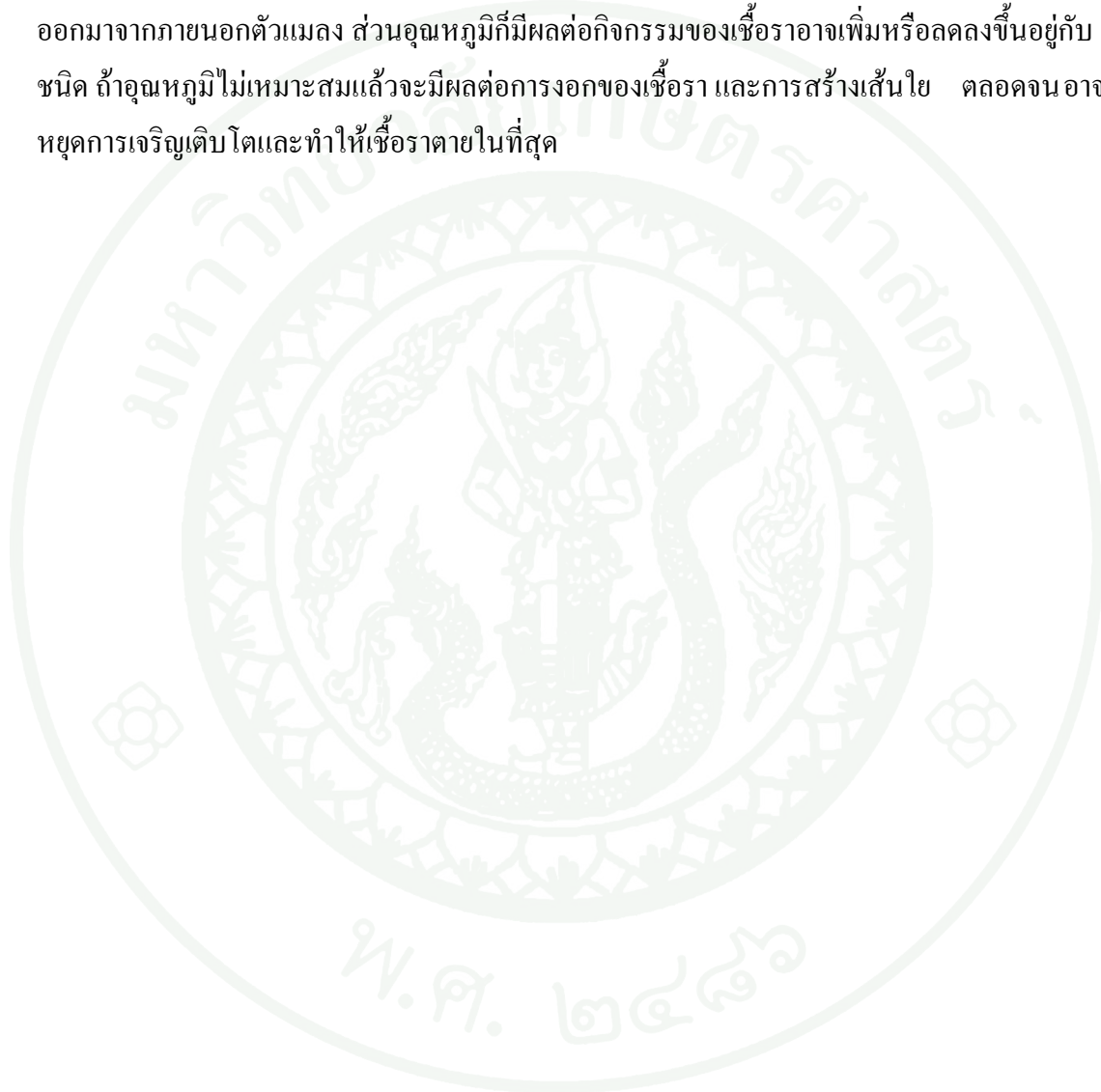
การนำเชื้อรามาใช้ในการควบคุมยุงรำคาญให้มีประสิทธิภาพสูงสุดนั้นจะต้องพิจารณา ปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. เชื้อราก่อโรค เชื้อราที่จะนำมาใช้ควบคุมยุงรำคาญนั้นจะต้องมีประสิทธิภาพและมี มีความรุนแรงเพียงพอที่จะทำให้ยุงหรือแมลงนั้นตายได้ ไม่ว่าจะเป็นการสร้างเอนไซม์หรือสารพิษ บางชนิด โดยความรุนแรงของเชื้อราจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสายพันธุ์ เชื้อราส่วนใหญ่มีชีวิต อยู่ได้นานในรูปสปอร์ ซึ่งมีความสำคัญในการนำไปใช้ เก็บรักษา และทำผลิตภัณฑ์ต่อไป

2. ตำแหน่งและวิธีการเข้าสู่ตัวแมลง เชื้อราชนิดต่างๆ จะสามารถเข้าสู่ตัวแมลงทาง ผิวหนัง โดยการทะลุผ่านผนังลำตัวแมลง แล้วเข้าทำลายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆอย่าง บางชนิด มีความเฉพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อเฉพาะอย่างและทำให้เกิดโรคได้โดยเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้น เชื้อ

ราบางชนิดมีความสามารถสร้าง เส้นใยที่ออกจากสปอร์แทงผ่านเข้าไป ในลำตัวของแมลง ได้ นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถเข้าสู่ตัวแมลงได้ทางท่อหายใจ และทางบาดแผลของแมลง

3. สภาพแวดล้อม เช่น แสงสว่าง สามารถชักนำหรือยับยั้งการสร้างโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อรานอกจากนี้ยังมี ความชื้น เพราะน้ำเป็น สิ่งจำเป็นในการงอกของเชื้อรา และโครงสร้างสืบพันธุ์ ออกมาจากภายนอกตัวแมลง ส่วนอุณหภูมิก็มีผลต่อกิจกรรมของเชื้อราอาจเพิ่มหรือลดลงขึ้นอยู่กับ ชนิด ถ้าอุณหภูมิไม่เหมาะสมแล้วจะมีผลต่อการงอกของเชื้อรา และการสร้างเส้นใย ตลอดจนอาจหยุดการเจริญเติบโตและทำให้เชื้อราตายในที่สุด



ประเภทของเชื้อราก่อโรคในแมลงชนิดต่างๆ

1. *Beauveria bassiana*

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *B. bassiana*

Kingdom : Fungi (Myceteae)

Division : Eumycota

Sub-division : Deuteromycotina

Class : Deuteromycetes (Hyphomycetes)

Order : Moniliales

Family : Moniliaceae

Genus : *Beauveria*

Species : *Beauveria bassiana* Balsamo and Vuillemin

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *B. bassiana*

เชื้อรานี้ค้นพบครั้งแรกในประเทศฝรั่งเศสและอิตาลี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตไหมที่สำคัญ ในช่วงศตวรรษที่ 16-17 จากการตายของตัวไหม (*Bombyx mori* (Linn.)) จำนวนมาก พบว่ามีสาเหตุมาจาก “white muscardine” ในปี 1835 Agostino Bassi de Lodi (บิดาแห่งพยาธิวิทยาแมลง) พบว่าสาเหตุที่ทำให้ตัวไหมตายมาจากเชื้อราในตัวไหม ต่อมาเชื้อราที่พบนี้ได้ถูกตั้งชื่อว่า *Beauveria bassiana* จากการเข้าทำลายของมันสามารถเห็นได้จากลักษณะที่คล้ายมัมมีสีขาว และขนมหวานชนิดหนึ่ง คือ น้ำตาลละเอียดที่ใช้แต่งหน้าเค้ก (Sugar Icing Fungus) (Mahr, 1997)

B. bassiana เป็นเชื้อราในกลุ่ม Deuteromycetes ที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังการเพาะเชื้อ 3-7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะพบโคโคนีที่มีลักษณะสีขาว ละเอียดคล้ายผงชอล์ก เชื้อราชนิดนี้ มีการสร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนงสั้นๆ conidiophores มีลักษณะเรียบไม่มีสี ก่อนข้างยาว และสร้าง conidia ที่มีลักษณะกลมรี เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5 ไมโครเมตรบน sterigma ที่มีลักษณะ zigzag

ความสำคัญของเชื้อรา *B. bassiana*

เชื้อราสามารถพบได้ในดินตามธรรมชาติทั่วโลก สามารถทำลายแมลงทั้งระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย นอกจากหนอนไหมแล้วยังมีแมลงอีกหลายชนิดที่เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ เช่น ตั๊กแตน ปลวก มอด มดคันไฟ และแมลงปีกแข็งต่างๆ และเชื้อรานี้บางสายพันธุ์ยังสามารถเข้าทำลายปอดของสัตว์ป่าฟันแทะ (Sakchoowong, 1998)

นอกจากนี้ *B. bassiana* ยังถูกนำมาผลิตเป็นการค้าเพื่อใช้ในการป้องกัน และกำจัดแมลง เพราะสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก หรือเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถพัฒนาให้สปอร์มีความทนกับแสงอัลตราไวโอเลต อุณหภูมิ และความชื้นสูงๆ ได้ การเข้าทำลายมักจะใช้เวลา 3-7 วัน ฟันให้ ทัวบริเวณจะช่วยให้สปอร์ของเชื้อรามีโอกาสสัมผัสกับแมลง และเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงเพื่อลดจำนวนประชากรของแมลงในที่นี้รวมไปถึงประชากรยุงรำคาญด้วย



ภาพที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana*

2. *Metarhizium* spp.

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *M. anisopliae*

Kingdom : Fungi (Myceteae)

Division : Eumycota

Sub-division : Deuteromycotina

Class : Deuteromycetes (Hyphomycetes)

Order : Moniliales

Family : Moniliaceae

Genus : *Metarhizium*

Species : *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff 1879

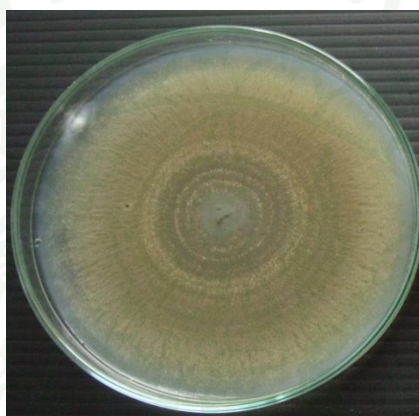
ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *M. anisopliae*

มีการค้นพบเชื้อรา *M. anisopliae* หรือ (Green muscardine) ครั้งแรกในปี 1879 โดย Metchnikoff ในชื่อ *Entomophthora anisopliae* ซึ่งพบในแมลงปีกแข็ง *Anisopliae austriaca* Herbst ในประเทศรัสเซีย ต่อมาในปี 1883 Sorokin ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *M. anisopliae* ซึ่งเชื้อราชนิดนี้มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidia ซึ่งมีผนังบางขนาดเล็ก conidiospores เดี่ยวหรือเป็นกลุ่มๆบนผนังลำตัวแมลง conidia สามารถแพร่กระจายไปได้ไกลและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในแมลง

M. anisopliae มีรูปร่างสั้น ขนาดของ conidia 3.5 – 9.0 ไมโครเมตร เจริญในช่วง pH6 สปอร์ของ *M. anisopliae* มีลักษณะเป็นทรงกระบอก โดยทั่วไปนั้นจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 15 – 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของแสงนั้นไม่มีผลต่อการเจริญของโคโลนี ลักษณะของโคโลนีเมื่อแรกเริ่มจะมีสีขาวและเมื่อเจริญเต็มที่จะเห็นสีเขียว conidia กระจายอยู่รอบๆ แต่ถ้าบ่ม เราได้แสงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อวันจะทำให้ conidia มีสีเขียวมากขึ้น ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90% เหมาะสมในการเจริญและสร้างสปอร์ของ *M. anisopliae*

ความสำคัญของเชื้อรา *M. anisopliae*

Metarhizium spp. มีความสามารถในการเข้าทำลายแมลงอาศัย ได้หลากหลายชนิด จึงมีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงในวงศ์ต่างๆ ดังนี้คือ Lepidoptera, Isoptera, Orthoptera, Homoptera และ Coleoptera เป็นต้น นอกจากนี้เชื้อ *M. anisopliae* ใช้ในการควบคุมไข่ของ spider mite (*Tetranychus cinnabarinus*)(Wei-bing และ Ming-Guang, 2004) และมีประสิทธิภาพในการควบคุมด้กแตน และแมลง cockchafer ได้อีกด้วย



ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *M. anisopliae*

3. *Paecilomyces* spp.

3.1 *Paecilomyces lilacinus*

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *P. lilacinus*

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Class : Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Trichocomaceae

Genus : *Paecilomyces*

Species : *Paecilomyces lilacinus* Thom 1910

3.2 *Isaria fumosorosea* (*P. fumosoroseus*)

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *I. fumosoroseus* (*P. fumosoroseus*)

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Class : Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Trichocomaceae

Genus : *Isaria*

Species : *Isaria fumosoroseus*

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *P. lilacinus* และ *I. fumosoroseus* (*P. fumosoroseus*)

เชื้อราในสกุล *Paecilomyces* ในช่วงแรกมีการศึกษาทางอนุกรมวิธานน้อย การเจริญของเชื้อ *P. lilacinus* บน malt agar ที่ 25 องศาเซลเซียส จะมีการสร้างเส้นใยที่มีผนังกัน (septate) มีผนังเรียบเป็นส่วนใหญ่ ไม่มีสี หรือสีเหลืองอ่อน โคลนเป็นสีขาวอมส้ม ลักษณะฟูหนา (ภาพที่ 7) เป็นราที่มี verticillate conidiospore แตกเป็นกิ่งก้าน และมี phialide มีปลายยาวและให้กำเนิด conidium ที่มีเซลล์เดียว ผนังเรียบไม่มีสี และต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว (Samson, 1974) ลักษณะคล้ายกับ *Penicillium*, *Gliocladium* และ *Scopulariopsis* เชื้อราในสกุลนี้มีทั้งหมด 23 ชนิดด้วยกัน โดยมีความแตกต่างในส่วน of conidiogenous structure

ความสำคัญของเชื้อรา *P. lilacinus* และ *I. fumosoroseus* (*P. fumosoroseus*)

เชื้อรา *P. lilacinus* มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายระยะไข่และตัวแก่ของไส้เดือนฝอยรากปม *Moloidogyne spp.* โดยเชื้อรา *P. lilacinus* นี้สามารถทำลายไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยภายใน 10 – 12 วัน มีการเจริญและทำลายคัพภะ (embryo) ในไข่ของไส้เดือนฝอยได้ถึง 80 -90% นอกจากนี้เชื้อรานี้ยังใช้ในการควบคุมและกำจัดหอยเชอรี่ในระยะไข่ (Maketon *et al.*, 2009) และตั้งแต่ระยะฟักจนถึงตัวอ่อนอายุ 5 วัน



ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญโคโลนีของเชื้อรา *I. fumosoroseus* (*P. fumosoroseus*)

4. *Lecanicillium muscarium*

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Lecanicillium muscarium*

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Class : Sordariomycetes

Order : Hypocreaceae

Family : Hypocreales

Genus : *Lecanicillium*

Species : *Lecanicillium muscarium* Zare and Gams 2001

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *L. muscarium*

เชื้อราที่สำคัญในสกุลนี้ได้แก่ *L. muscarium* ซึ่งมีการแพร่กระจายทั่วไปและใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เชื้อราชนิดนี้มีการผลิตเป็นการค้าและทำงานได้ดีใน *greenhouse* ของประเทศเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในปี 1893 Corda ได้จัดเชื้อราพวกที่สร้างสปอร์เป็นเซลล์เดี่ยวและอยู่บนยอดของ conidiospore ที่ไม่แตกแขนงไว้ใน Genus *Cephalosporium* ต่อมาในปี 1971 Gams จำแนกหมวดหมู่ใหม่ โดยเชื้อราในกลุ่มนี้อยู่ใน Genus *Verticillium* sect. *Prostrata* โดยบรรยายลักษณะของเชื้อราในกลุ่มนี้ว่ามีลักษณะที่สำคัญคือ สร้างเส้นใยซึ่งรวมตัวกันอยู่หนาแน่นคล้ายกำมะหยี่ ซึ่งเส้นใยเหล่านี้จะสร้าง phialides รูปทรงปลายแหลมคล้ายไขควงขนาดต่างๆ กัน phialides จะงอกออกเป็นกลุ่มๆ หรือเดี่ยวๆ รอบๆ conidiospore แล้วจะสร้าง conidia บนยอด โดยสร้างต่อกันออกไป สปอร์ที่ใกล้ยอด phialides มากที่สุดคือ ที่มีอายุอ่อนที่สุดเรียกการสร้างสปอร์แบบนี้ ว่า basipetal succession of conidia สปอร์มีขนาดต่างกัน รูปไข่มีปลายมน 2 ข้างเท่าๆ กัน ไม่มีการสร้าง chlamydospores

ความสำคัญของเชื้อรา *L. muscarium* (*Verticillium lecanii*)

เชื้อ *L. muscarium* เป็นจุลินทรีย์ที่ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการกำจัดเพลี้ย ย่อมนปัจจุบันได้มีกา รผลิตเป็นการค้าจำหน่ายเพื่อปราบ เพลี้ยอ่อน และศัตรูพืช อื่นอีกบางชนิด ในธรรมชาติเชื้อรานี้จะทำลายด้วงบางชนิด เช่น *Tetrobium* spp. และ *Polygraphus* spp.



ภาพที่ 8 ลักษณะการเจริญโคโลนีของเชื้อรา *L. muscarium*

5. *Nomuraea rileyi*

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *N. rileyi*

Kingdom : Fungi (Myceteae)

Division : Eumycota

Sub-division : Deuteromycotina

Class : Deuteromycetes (Hyphomycetes)

Order : Moniliales

Family : Moniliaceae

Genus : *Nomuraea*

Species : *Nomuraea rileyi* Samson 1975

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Nomuraea rileyi*

มีการศึกษาและรายงานเกี่ยวกับเชื้อ *N. rileyi* มาตั้งแต่ปี 1883 แต่เริ่มมีการนำมาใช้กำจัดแมลงเมื่อปี 1995 การจำแนกและเรียกชื่อเชื้อราตัวนี้ค่อนข้างสับสน Farlow เป็นผู้รายงานเชื้อราตัวนี้เป็นคนแรกโดยเรียกว่า *Botrytis rileyi* ต่อมาในปี 1936 Charles เปลี่ยนชื่อเป็น *Spiracia* อย่างไรก็ตามในระบายนั้นนักวิทยาศาสตร์ก็ยังคง เรียกว่า *Spiracia* จนกระทั่งในปี 1974 Kish แก่ชื่อสกุลใหม่เป็น *Nomuraea* และใช้ชื่อ *Spiracia prasina* เป็น synonym กับ *N. rileyi*

ความสำคัญของเชื้อรา *N. rileyi*

เชื้อรานี้ทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่กับหนอนผีเสื้อใน Order Lepidoptera เช่น *Heliothis spp.*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera litura* เป็นต้น แต่ก็พบในหนอนด้วง 2 species (*Hypera punctata* และ *Leptinotarsa decemlineata*) การแพร่ระบาดของโรคอย่างรุนแรงมักพบกับหนอนผีเสื้อ เช่น หนอนผีเสื้อในแปลง clover และ alfalfa

6. *Gliocladium virens*

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *G. virens*

Kingdom : Fungi (Myceteae)

Division : Eumycota

Sub-division : Deuteromycotina

Class : Deuteromycetes (Hyphomycetes)

Order : Moniliales

Family : Moniliaceae

Genus : *Gliocladium*

Species : *Gliocladium virens* Miller *et al.*

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *G. virens*

G. virens เป็นเชื้อราที่อาศัยในดินและเศษซากอินทรีย์วัตถุสร้างเส้นใยสีขาวและสปอร์สีเขียว ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. เชื้อรา *G. virens* เจริญอย่างรวดเร็วจนอาหาร potato dextrose agar (PDA) การสร้างโคโลนีส่วนใหญ่เจริญปกคลุมผิวหน้าของอาหารในจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมด จะมีความหนาแน่นบริเวณขอบของจานเลี้ยงเชื้อหรือมีความหนาแน่นเท่ากันหมดทั้งจานเลี้ยงเชื้อ สปอร์เปลี่ยนเป็นสีเขียวอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 7) โดยใช้เวลา 3 – 5 วัน conidiospore ในบริเวณที่มีการสร้างสปอร์ตั้งตรงมีการแตกแขนงของ conidiospore ไม่สม่ำเสมอ บริเวณปลายสุดของ conidiospore พบมีการสร้าง phialide 3 – 6 อัน conidiospore ยาวประมาณ 20 ไมโครเมตร กว้าง 2.5 – 3 ไมโครเมตร phialide มีลักษณะเป็น lageniform ถึง ampulliform ส่วนใหญ่มีขนาดยาว 4.5 – 10 ไมโครเมตร กว้าง 2.8 – 5.5 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่ตั้งตรงและรวมกันเป็นกลุ่มชิดกันของแขนง conidiospore 2 – 5 อัน บริเวณปลายสุดของ phialide สร้างสปอร์ รูปร่างกลมรีถึงรูปไข่ ส่วนใหญ่มีขนาด 3.5 – 6.0 x 2.8 – 4.1 ไมโครเมตร ผิวเรียบมีสีเข้ม (Kubicek and Harman, 1998 ; Rifai, 1969)

ความสำคัญของเชื้อรา *G. virens*

เชื้อรา *G. virens* ที่นำไปใช้ในการควบคุมโรคต่างๆ นั้นส่วนใหญ่แล้วมักจะอยู่ในรูปของ conidia และ chlamydospore แต่ Lewis and Papavizas, 1995 ได้เตรียมเส้นใยของเชื้อรา *G. virens* ที่เพิ่งงอกจาก conidia โดยเลี้ยงบนรำข้าวไปใช้ป้องกันโรคเน่าในดินของฝ้าย radish และ sugar beet

Lewis and Larkin (1997) ใช้เชื้อรา *G. virens* สายพันธุ์ GI-3 GI-21 GI-32 ในรูปเม็ดโดยใช้ rice flour, gluten, Pyrex vermiculite และ canola oil เพื่อใช้ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* และประสิทธิภาพของเชื้อรา *G. virens* จะเป็นแง่ในการลดการเจริญของเชื้อ *R. solani* และในปี 1996 มีการใช้เชื้อรา *G. virens* และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในรูป alginate pill โดยใช้รำข้าวสาลี ใ้ข้าวโพด เปลือกถั่วเหลือง เปลือกโกโก้ และโคดินเป็นอาหารในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* และเชื้อรา *P. ultimum* พบว่าเชื้อรา *G. virens* (GI-21) ที่ใช้เปลือกโกโก้เป็นอาหารสามารถลดโรคเน่าระดับดิน (damping-off) ของ ziana ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *R. solani* และเชื้อรา *P. ultimum* ได้



ภาพที่ 9 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *G. virens*

7. *Penicillium* spp.

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Penicillium* spp.

Kingdom : Fungi (Myceteae)

Division : Ascomycota

Sub-division : Deuteromycotina

Class : Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Trichocomaceae

Genus : *Penicillium* sp.

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Penicillium* sp.

เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหาร PDA ขนาด 1-1.5 ซม. ประกอบด้วยโคนดิโอฟอร์มหนาแน่น บางครั้งมีลักษณะคล้ายหนัง สีเขียวอมน้ำเงิน ด้านใต้มีสีเหลืองถึงสีส้ม โคนดิโอฟอร์มมีขนาด 2-3 x 50-200 ไมโครเมตร ผงเรียบ มีเพียไลต์ 6-10 อัน เพียไลต์เป็นรูปพลาสติก มีขนาด 2-2.5 x 8-10 ไมโครเมตร โคนดิโอมีลักษณะเป็นคอลัมน์ รูปร่างกลมถึงค่อนข้างกลม ผงเรียบหรือขรุขระเล็กน้อยสีไม่มีสีถึงสีเขียว มีขนาด 2.5-3.0 ไมโครเมตร

ความสำคัญของเชื้อรา *Penicillium* sp.

เชื้อราในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ (สารพิษ) หลากหลายชนิด เช่น เพนิซิลิน เป็นสาร antibiotic นำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหารอย่างหลากหลาย นอกจากนี้เชื้อราหลายชนิดในกลุ่มนี้ยังก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิตอื่นได้ โดยพบว่าบางชนิดก่อโรคในผลไม้และโคนต้นพืช เช่น *P. expansum* ก่อโรคใน แอปเปิลและลูกแพร์ *P. digitatum*, citrus fruits (Balgrie, 2003) และ *P. allii* ก่อโรคในกระเทียม (Valdez *et al.*, 2006) เชื้อราเพนิซิลินบางชนิดก่อโรคใน สัตว์ เช่น *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. viridicatum* และ *P. waksmanii* มีแนวโน้มก่อโรคในยาง (Da Costa, 1998) และ *P. marneffeii* มีฤทธิ์ฆ่าหนู Vietnamese bamboo อีกทั้งยังมีผลการวิจัยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นยารักษาโรคเอดส์ (Ustianowski *et al.*, 2008)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงยุงและเชื้อรา

1. น้ำกลั่น
2. chlorox 10%
3. Heamocytometer
4. เข็มเย็บเชื้อ (needle)
5. ปิเปต ขนาด 5, 10 ml.
6. กล้องจุลทรรศน์ Stereomicroscope
7. ตู้อบ (incubator)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato dextrose agar (PDA)
9. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย Nutrient agar (NA)
10. ขวดแก้วขนาด 300 ml.
11. จานแก้วเพาะเลี้ยงเชื้อรา
12. Flask ขนาด 200 ml.
13. ถ้วยขนาด 100 มิลลิลิตร
14. ยุงรำคาญระยะลูกน้ำ และตัวเต็มวัย
15. ขวดแก้วสำหรับเก็บเชื้อรา
16. สำลี
17. กระดาษกรอง
18. กรงเลี้ยงแมลง 30x30 cm.
19. หนูแฮมสเตอร์สำหรับให้ยุงกินเลือด
20. เชื้อราชนิดต่างๆ เช่น *B. bassiana*, *M. flavoviride*, *M. anisopliae*, , *I. fumosorosea*

P. lilacinus, *N. rileyi*, *L. muscarium*, *G.virens* , *A.flavus* 001, *Penicillium* sp. และ *P. citrinum*

CM-010

อุปกรณ์ในเรือนทดลอง และภาคสนาม

1. ถังพลาสติกขนาด 50 ลิตร 20 ถัง
2. ก๊อบดักฝ้ายขาวบาง
3. ลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 3 และ 4 จำนวน 2,000 ตัว
4. เชื้อราที่ใช้ทดสอบ (เชื้อราที่มีประสิทธิภาพควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญที่ดีที่สุด)
5. *Bacillus thuringiensis israelensis* จากกรมวิทย์ วิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข ความเข้มข้น 1,000 ITU/mg. ต่อเม็ด

อุปกรณ์และสารเคมีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ และสารพิษของเชื้อรา

1. Flask 250 ml.
2. สำลี
3. Shaker รุ่น Orbital shaker SO1
4. Spectrophotometer รุ่น Spectronic 20 Genesys

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

1. Trybutyrin
2. Peptone
3. Yeast extract
4. Agar

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

1. Soluble starch
2. Yeast extract
3. Peptone
4. Agar

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนส

1. Chitin
2. Yeast extract
3. NaNO_3
4. K_2HPO_4
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
6. KCL
7. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
8. Agar

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส

1. Skimmilk agar
2. Glucose
3. K_2HPO_4
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
6. Agar

อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับ HPLC วิเคราะห์สารพิษในเชื้อรา

1. Flask 250 ml.
2. Evaporator
3. Microfilter
4. Ethyl acetate
5. Methanol
6. Gacial acetate

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ

1.1 ทำการเลี้ยงเชื้อรา 20 ชนิดในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ได้แก่ *G. virens*, *I. fumosorosea*, *A. flavus* 001, *L. muscarium*, *H. citrifomis*, *N. rileyi*, *P. lilacinus* 076, *P. lilacinus* 053, *P. lilacinus* 021, *P. lilacinus* 036, *M. anisopliae* 048, *M. anisopliae* 080, *M. anisopliae* 006, *B. bassiana* 048, *B. bassiana* 095, *B. bassiana* 055, *B. bassiana* 553, *B. bassiana* 2662, *Penicillium* sp., *P. citrinum* CM-010 เป็นเวลา 10 – 14 โดยเลี้ยงเชื้อเป็นสต็อก (Stock) ได้ความเข้มข้น 1×10^9 conidia/ml.

1.2 นำลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 3 และ 4 ใส่ถ้วย แต่ละถ้วยใส่ลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัวต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อราชนิดต่างๆ เจือจางด้วยน้ำกลั่น (Dilution) แล้วนำมาใส่แต่ละถ้วย โดยแต่ละถ้วยมีความเข้มข้น 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 conidia/ml. ตามลำดับ โดยที่กลุ่มควบคุมไม่ใส่เชื้อรา ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design (CRD))

1.3 ในการทดลองจะให้อาหารลูกน้ำยุงรำคาญโดยใช้อาหารหนูปดใส่ลงในน้ำทุกวันทั้งกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม ทำการ สังเกตและตรวจนับจำนวนลูกน้ำยุง รำคาญที่ตาย แล้วบันทึกผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์

สำหรับลูกน้ำยุงที่รอดตายจากเชื้อราที่ทดสอบดังกล่าวจะทำการศึกษาวัฏจักรชีวิตเมื่อมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยแล้วจะมี ความผิดปกติไปจากเดิมหรือไม่ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ และการวางไข่ของยุงตัวเต็มวัย

1.4 นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญไปทดสอบเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงลายและยุงก้นปล่องด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน

1.5 ทำการตรวจสอบยืนยันผลการทดลอง โดยนำลูกน้ำยุงที่ตายไปแช่ใน 10% Sodium hypochloride เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเชื้อราที่อยู่ภายนอกตัวออก พักไว้สักครู่รอให้แห้ง จึงนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) สังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนี เชื้อรา

จากนั้นนำไปถ่ายภาพศึกษากลไกการเข้าทำลายของเชื้อราในลูกน้ำยุงที่ตายด้วยกล้องจุลทรรศน์ Light Microscope และ Stereomicroscope และนำไปคำนวณด้วยวิธีการทางสถิติ

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่มีผลต่อยุงรำคาญระยะตัวเต็มวัย

2.1 ทำการทดสอบยุงรำคาญระยะตัวเต็มวัยตัวผู้ 50 ตัว และตัวเมีย 50 ตัวในกรงเลี้ยงแมลง ขนาด 30x30 เซนติเมตร

2.2 วันที่ 1 ให้อาหารยุงตัวผู้และตัวเมีย โดยใช้กระดาษกรอง เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 เซนติเมตรชุบกลูโคส 10% วางไว้บน plate และใช้หนูแฮมสเตอร์ให้ยุงตัวเมียดูดกินเลือด

2.3 วันที่ 2 นำเชื้อราชนิดต่างๆ 20 ชนิดจากสต็อก (Stock) ใส่กลูโคส 10 % แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1×10^7 , 1×10^8 และ 1×10^9 conidia/ml. เพื่อนำมาทดสอบกับยุงรำคาญ ระยะตัวเต็มวัย โดยใช้กระดาษกรองชุบเชื้อรากลูโคส ส่วนกลุ่มควบคุมชุบกลูโคส 10% ที่ไม่มีเชื้อรา ทำการทดลองทรีเมนต์ละ 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design (CRD)) เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

2.3 เปลี่ยนกระดาษกรองทุกวันทั้งในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยในกลุ่มที่ทดสอบเชื้อราจะชุบกลูโคสที่มีเชื้อรา ความเข้มข้น 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 conidia/ml. เหมือนเดิมทุกครั้ง และกลุ่มควบคุมชุบกลูโคส 10%

2.4 สังเกตและตรวจนับจำนวนยุงรำคาญทั้งตัวผู้และตัวเมียที่ตาย แล้วบันทึกผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 ทดสอบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ และเปรียบกับ *Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti.

3.1 นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญที่ดีที่สุดมาเลี้ยงเชื้อเป็นสต็อก (stock) ให้มีความเข้มข้น 1×10^9 conidia/ml.

3.2 ใช้น้ำสะอาดเตรียมเชื้อรา 1×10^4 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. ปริมาตร 10 ลิตร แล้วใส่ในแต่ละถัง (ใช้ 4 ถังต่อ 1 ความเข้มข้น) แล้วนำลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 3 และ 4 จำนวน 100 ตัวใส่ลงในแต่ละถัง และกลุ่มที่ทดสอบด้วย Bti. (อัตราการใช้น้ำขนาด 1 เม็ดต่อน้ำ 200 ลิตร) ส่วนกลุ่มควบคุมไม่ใส่เชื้อรา ทำการทดลอง ทริทเมนต์ละ 4 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design(CRD) ทุกการทดลองให้ปิดภาชนะด้วยผ้าขาวบาง

3.3 นับจำนวนลูกน้ำที่ตายทุก 1 ชั่วโมงในกลุ่มทดสอบด้วยเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ สูงสุด กับกลุ่มที่ทดสอบด้วย Bti และกลุ่มควบคุม

3.4 หาอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญ (% mortality) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดกับ Bti

การทดลองที่ 4 ทดสอบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญในภาคสนาม

4.1 ทำการทดลองแบบ student pair t-test โดยสำรวจบ่อน้ำในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 2 บ่อ ขนาดกว้าง 1 เมตร ยาว 4 เมตร และลึก 1 เมตร โดยก่อนทำการทดลองสุ่มตัวอย่างน้ำทั้ง 2 บ่อ เพื่อนับจำนวนประชากรลูกน้ำยุงรำคาญในแหล่งน้ำ

4.2 นำกับดักผ้าขาวบางขนาด 30x30 เซนติเมตร ไปลอยเหนือน้ำบริเวณที่มีลูกน้ำยุงรำคาญ ทั้งในบ่อทดลอง และบ่อควบคุม (ภาพที่ 10)โดยวางกับดัก 3 ชุดในแต่ละบ่อการทดลอง

4.3 พ่นเชื้อราในกับดักลูกน้ำยุงรำคาญกลุ่มทดลองในอัตราความเข้มข้น 1×10^{11} conidia / m^2 และในบ่อควบคุมพ่นน้ำเปล่า (ภาพที่10)



ภาพที่ 10 ภาพกับดักลูกน้ำยุงรำคาญ (ซ้าย) และการทดลองฉีดพ่นเชื้อราลงในกับดักลูกน้ำยุงรำคาญในบ่อทดลอง (ขวา)

4.4 สุ่มตัวอย่างน้ำในแต่ละกับดัก 10 จุด นับจำนวนลูกน้ำยุงรำคาญที่รอดตายทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดตายของลูกน้ำยุงรำคาญทั้ง 2 ช่วงอายุคือ larva 1-2 และ larva 3-4

4.5 นำลูกน้ำยุงรำคาญที่รอดตายมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการศึกษาวัยจักรชีวิตเมื่อมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยแล้วจะมี ความผิดปกติไปจากเดิมหรือไม่ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ และการวางไข่ของยุงตัวเต็มวัยหลังจากได้รับเชื้อรา

การทดลองที่ 5 ศึกษากลไกการทำงานของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ

ศึกษากลไกการทำงานของเชื้อราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Light Microscope และทำการตัดเนื้อเยื่อลูกน้ำยุงรำคาญ (microtome section) เพื่อศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราในลูกน้ำยุงรำคาญ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) หรือ TEM

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดย การวิเคราะห์ความแปรปรวน (One - way ANOVA) และเปรียบเทียบ ความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยวิธี LSD โดยวิเคราะห์ค่า Median lethal concentration (LC_{50}) และ Median lethal time (LT_{50}) ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญ

การทดลองที่ 6 ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อรา

6.1 ทดสอบเอนไซม์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญ

นำเชื้อราประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ประเภทต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส อะไมเลส โปรติเอส และไคติเนส ด้วยวิธีการดังนี้

6.1.1 ศึกษาความสามารถของ เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร tributyrin agar ที่ pH5 โดยวิธี point inoculation จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ทำการตรวจโดยสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อรา ความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจะประเมินค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) ซึ่งหาได้โดยวัดอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

6.1.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร starch agar ที่ pH5 โดยวิธี point inoculation จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ทำการตรวจผลโดยย้อมสีอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายไอโอดีน แล้วสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อรา ความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะประเมินค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) ซึ่งหาได้โดยวัดอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

6.1.3 ศึกษาความสามารถของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร skim milk agar ที่ pH5 โดยวิธี point inoculation จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ทำการตรวจโดยสังเกตบริเวณใสรอบ

โคโลนีของเชื้อรา ความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะประเมินค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) ซึ่งหาได้โดยวัดอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

6.1.4 ศึกษาความสามารถของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

นำเชื้อรามาล้างบนอาหาร chitin medium โดยวิธี point inoculation จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ทำการตรวจโดยสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อรา ความสามารถของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสจะประเมินค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) ซึ่งหาได้โดยวัดอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

6.2 วิเคราะห์เอนไซม์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญ

6.2.1 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสมาเลี้ยงใน liquid skim milk medium ที่ pH5 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บส่วนใสเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่อไป

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสดัดแปลงจากวิธีการ Fuwan (1938) นำสับสเตรท 3 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายไอโอดีน 0.2 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น M 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 60 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที) ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตรเก็บไว้ในที่มืด เติมเอนไซม์ลงแต่ละหลอด 0.1 มิลลิลิตรลงในสับสเตรท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสับสเตรทที่ผสมกับเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตรใส่ลงในสารละลายไอโอดีนแล้ว นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

6.2.2 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสมาเลี้ยงใน liquid chitin medium ที่ pH5 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บส่วนใสเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสต่อไป

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสตัดแปล จากวิธีการของ Miller (1959) โดยผสมสับสเตรท (1% w/v colloidal chitin)ใน 50 mM citrate-phosphate buffer, pH 5 0.125 มิลลิลิตร กับเอนไซม์ 0.125 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 1% DNS reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

6.2.3 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมาเลี้ยงใน liquid tributyrin medium ที่ pH5 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บส่วนใสเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อไป

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย (Biotec)

6.2.4 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมาเลี้ยงใน starch casein broth ที่ pH5 นำไปบ่มที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็น

เวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บส่วนใสเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสดัดแปลงจากวิธีการ Wang and Hesseltine (1965) โดยผสมสับสเตรท (1% w/v casein) ใน 0.2 M citrate-phosphate buffer pH5 1 มิลลิลิตร กับ เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย 5% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที คูณสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มี 0.4 M sodium carbonate (NaCO_3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 1 N folin-Ciocalteu reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การทดลองที่ 7 วิเคราะห์สารพิษของเชื้อรา (mycotoxin) ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์สารพิษ (mycotoxin) ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Okeke *et al.*, 1993 เพื่อวิเคราะห์หาสารพิษของเชื้อราที่มีผลในการเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญดังนี้

7.1 เลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบใน liquid malt extract แล้วนำไปบ่มที่เครื่องเขย่า อุณหภูมิห้องความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

7.1 เก็บตัวอย่างเชื้อราโดยนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วเทส่วนใสลงใน Separatory funnel ขนาด 250 ml.

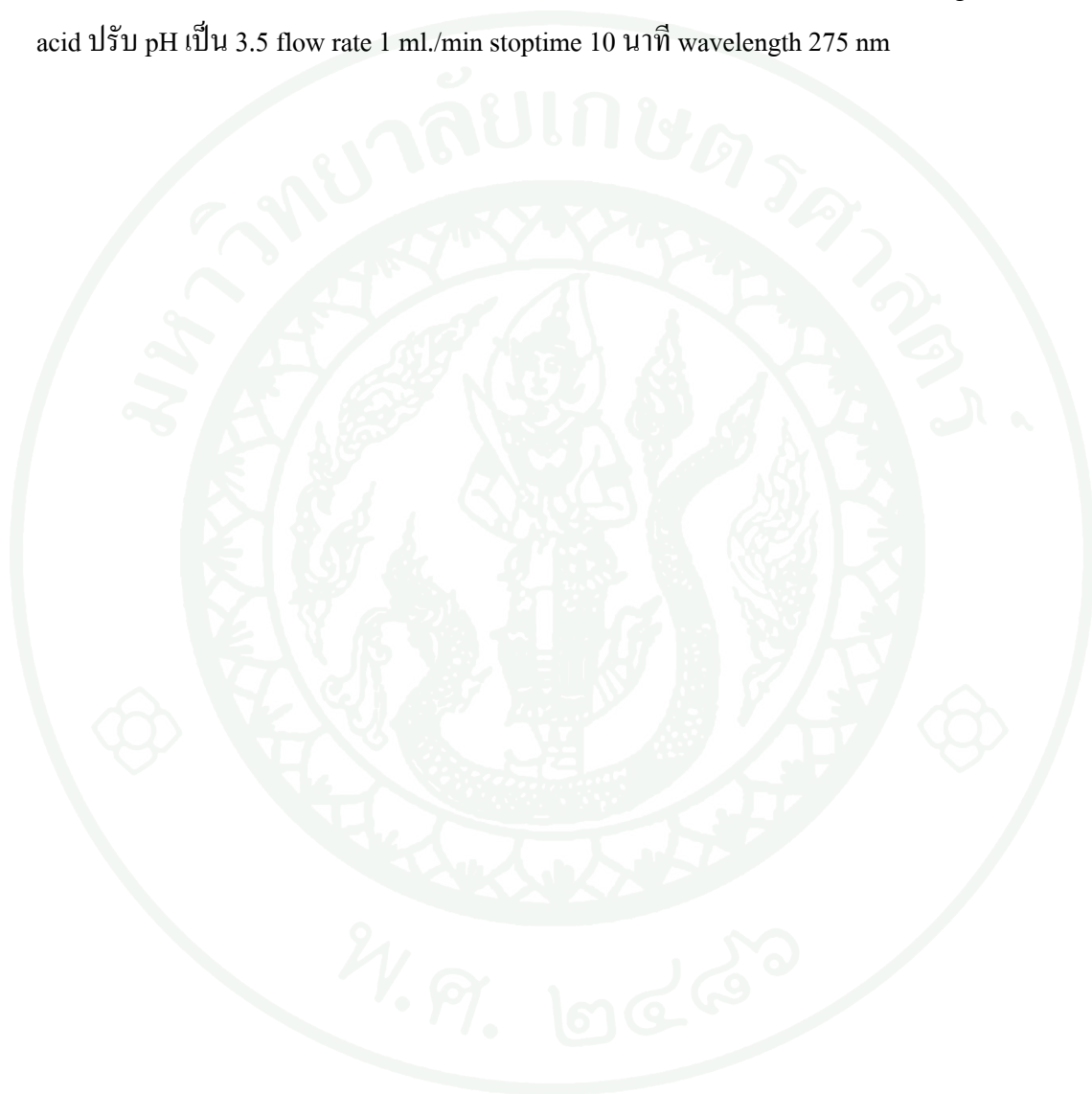
7.2 เติม ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 จากนั้นทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

7.3 แยกส่วนใส (supernatant) ด้วย separated funnel แล้วนำส่วนใสที่ได้ไประเหยด้วย vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 85 รอบต่อนาที

7.4 เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วย microfilter 0.2 ไมครอน

7.5 การวิเคราะห์ HPLC ใช้เครื่อง HPLC ของ Agilent Technologies model LC 1200 version B.04.02 ประกอบด้วย automatic injector model G1329 A, UV detector model G1315D, Pump model G1311A, C₁₈ column reverse phase Model G1316A

Elution solvent ใช้ methanol : distilled water อัตราส่วน 10:90 และใช้ glacial acetic acid ปรับ pH เป็น 3.5 flow rate 1 ml./min stoptime 10 นาที wavelength 275 nm



ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ

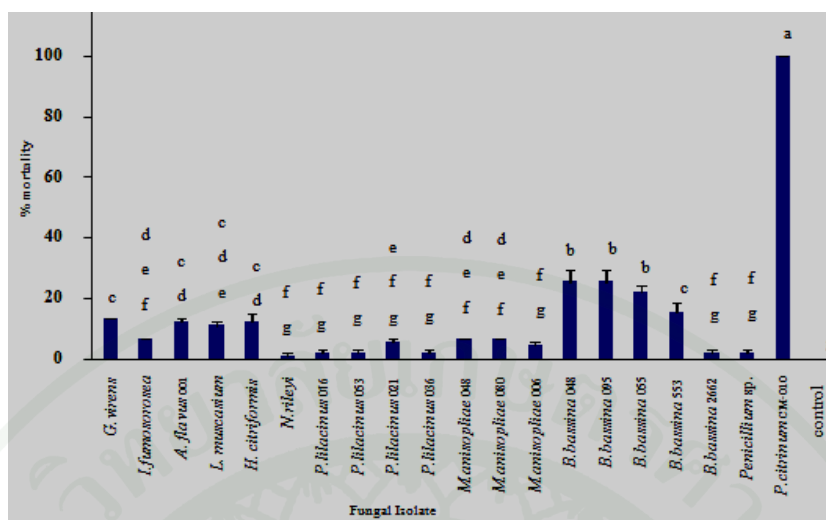
การทดสอบเชื้อราทั้ง 20 ชนิดได้แก่ *G. virens*, *I. fumosorosea*, *A. flavus* 001, *V. lecanii*, *H. citriformis*, *N. rileyi*, *P. lilacinus* 076, *P. lilacinus* 053, *P. lilacinus* 021, *P. lilacinus* 036, *M. anisopliae* 048, *M. anisopliae* 080, *M. anisopliae* 006, *B. bassiana* 048, *B. bassiana* 095, *B. bassiana* 055, *B. bassiana* 553, *B. bassiana* 2662, *Penicillium* sp. และ *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 conidia/ml. พบว่าอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของลูกน้ำยุงรำคาญที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia/ml. (ภาพที่ 11), 1×10^7 conidia/ml. (ภาพที่ 12) และ 1×10^8 conidia/ml. (ภาพที่ 13)

Fungal Isolate	Concentration 1×10^6 conidia/ml.	Concentration 1×10^7 conidia/ml.	Concentration 1×10^8 conidia/ml.
	Mortality rate $\pm$ S.D.		
<i>G. virens</i>	13.33 $\pm$ 0.00	15.55 $\pm$ 1.11	16.66 $\pm$ 0.00
<i>I. fumosorosea</i>	6.66 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 0.00
<i>A. flavus</i> 001	12.22 $\pm$ 1.11	18.88 $\pm$ 1.11	98.88 $\pm$ 1.11
<i>L. muscarium</i>	11.11 $\pm$ 1.11	15.55 $\pm$ 4.84	26.66 $\pm$ 3.85
<i>H. citriformis</i>	12.21 $\pm$ 2.94	17.77 $\pm$ 2.22	21.11 $\pm$ 1.11
<i>N. rileyi</i>	1.11 $\pm$ 1.11	2.22 $\pm$ 1.11	4.44 $\pm$ 1.11
<i>P. lilacinus</i> 076	2.22 $\pm$ 1.11	7.77 $\pm$ 1.11	17.77 $\pm$ 2.22
<i>P. lilacinus</i> 053	2.22 $\pm$ 1.11	18.88 $\pm$ 6.18	98.88 $\pm$ 1.11
<i>P. lilacinus</i> 021	5.55 $\pm$ 1.11	10.00 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 0.00
<i>P. lilacinus</i> 036	2.22 $\pm$ 1.11	4.44 $\pm$ 2.22	10.00 $\pm$ 0.00

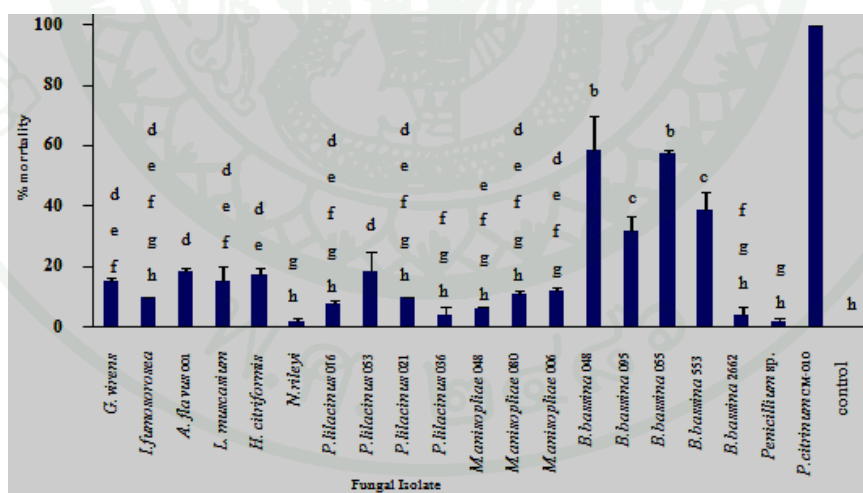
ตารางที่ 1 (ต่อ)

Fungal Isolate	Concentration	Concentration	Concentration
	1×10^6 conidia/ml.	1×10^7 conidia/ml.	1×10^8 conidia/ml.
Mortality rate $\pm$ S.D.			
<i>M. anisopliae</i> 048	6.66 $\pm$ 0.00	6.66 $\pm$ 0.00	57.77 $\pm$ 1.11
<i>M. anisopliae</i> 080	6.66 $\pm$ 0.00	11.11 $\pm$ 1.11	21.10 $\pm$ 2.93
<i>M. anisopliae</i> 006	4.44 $\pm$ 1.11	12.22 $\pm$ 1.11	19.99 $\pm$ 1.92
<i>B. bassiana</i> 048	25.55 $\pm$ 4.00	58.88 $\pm$ 11.27	75.55 $\pm$ 1.11
<i>B. bassiana</i> 095	25.55 $\pm$ 4.00	32.22 $\pm$ 4.84	36.66 $\pm$ 6.94
<i>B. bassiana</i> 055	22.22 $\pm$ 2.22	57.77 $\pm$ 1.11	63.33 $\pm$ 3.85
<i>B. bassiana</i> 553	15.55 $\pm$ 2.94	38.88 $\pm$ 5.88	37.77 $\pm$ 0.00
<i>B. bassiana</i> 2662	2.22 $\pm$ 1.11	4.44 $\pm$ 2.22	3.33 $\pm$ 0.00
<i>Penicillium</i> sp.	2.22 $\pm$ 1.11	2.22 $\pm$ 1.11	5.55 $\pm$ 1.11
<i>P. citrinum</i> CM-010	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00
control	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00



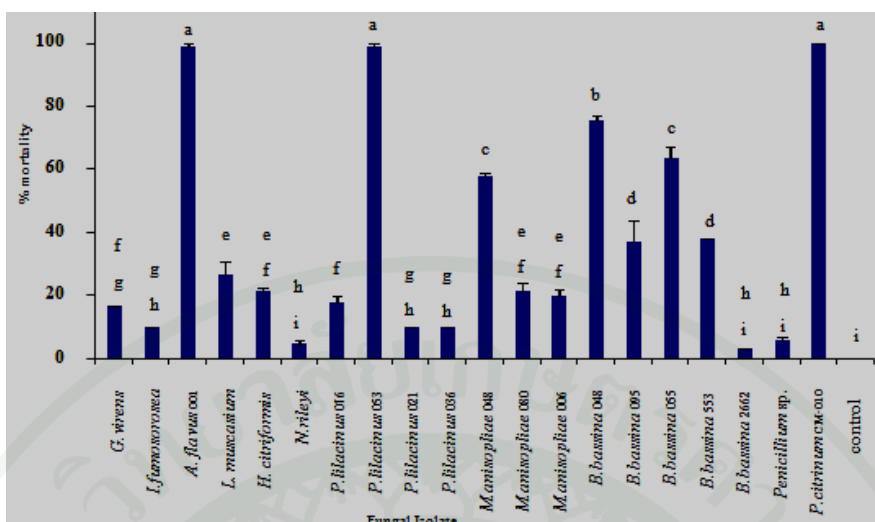
ภาพที่ 11 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia/ml. ($F_{(20,42)} = 143.73, p < 0.05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด



ภาพที่ 12 ตารางแสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^7 conidia/ml. ($F_{(20,42)} = 46.56, p < 0.05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด



ภาพที่ 13 ตารางแสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^8 conidia/ml. ($F_{(20,42)} = 228.61$, $p < 0.05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด

และจากการทดลองพบว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญตายได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 conidia/ml. ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราชนิดอื่นๆไม่สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญได้ โดยลูกน้ำยุงรำคาญที่รอดตายสามารถเจริญได้อย่างปกติและเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยได้อย่างสมบูรณ์รวมทั้งสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ นอกจากนี้ยังได้นำเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ไปทดสอบกับลูกน้ำยุงลายและลูกน้ำยุงก้นปล่องด้วยวิธีการเช่นเดียวกันแล้วพบว่าไม่สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุง 2 ชนิดนี้ได้

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่มีผลต่อยุงรำคาญระยะตัวเต็มวัย

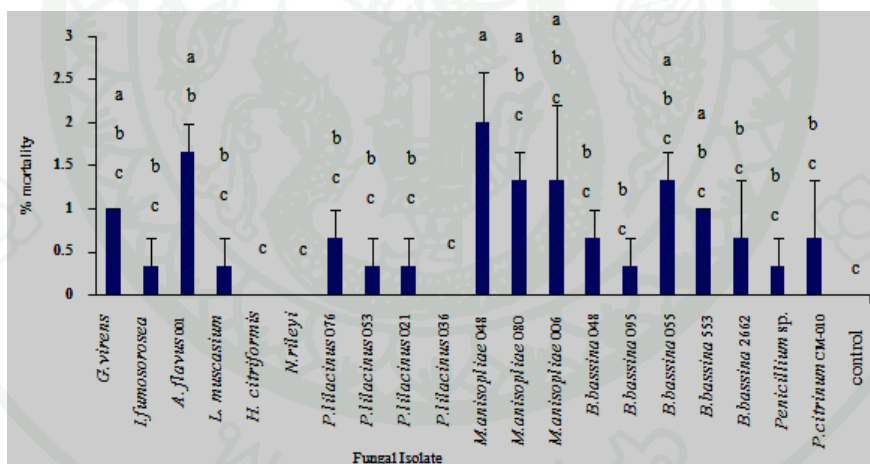
การทดสอบเชื้อราทั้ง 20 ชนิดได้แก่ *G. virens*, *I. fumosorosea*, *A. flavus* 001, *V. lecanii*, *H. citrifomis*, *N. rileyi*, *P. lilacinus* 076, *P. lilacinus* 053, *P. lilacinus* 021, *P. lilacinus* 036, *M. anisopliae* 048, *M. anisopliae* 080, *M. anisopliae* 006, *B. bassiana* 048, *B. bassiana* 095, *B. bassiana* 055, *B. bassiana* 553, *B. bassiana* 2662, *Penicillium* sp. และ *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^7 , 1×10^8 และ 1×10^9 conidia/ml. พบว่าอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของยุงรำคาญ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของยุงรำคาญตัวเต็มวัยที่ความเข้มข้น 1×10^7 conidia/ml. (ภาพที่ 14), 1×10^8 conidia/ml. (ภาพที่ 15) และ 1×10^9 conidia/ml. (ภาพที่ 16)

Fungal Isolate	Concentration 1×10^7 conidia/ml.	Concentration 1×10^8 conidia/ml.	Concentration 1×10^9 conidia/ ml.
	Mortality rate $\pm$ S.D.		
<i>G. virens</i>	1.00 ± 0.00	1.33 ± 0.33	1.33 ± 0.33
<i>I. fumosorosea</i>	0.33 ± 0.33	1.00 ± 0.57	1.66 ± 0.33
<i>A. flavus</i> 001	1.66 ± 0.33	19.00 ± 0.57	36.00 ± 1.15
<i>L. muscarium</i>	0.33 ± 0.33	0.66 ± 0.66	0.66 ± 0.33
<i>H. citrifomis</i>	0.00 ± 0.00	0.66 ± 0.33	1.00 ± 0.57
<i>N. rileyi</i>	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.33	0.33 ± 0.33
<i>P. lilacinus</i> 076	0.66 ± 0.33	2.00 ± 0.00	2.33 ± 0.33
<i>P. lilacinus</i> 053	0.33 ± 0.33	1.00 ± 0.57	3.33 ± 0.66
<i>P. lilacinus</i> 021	0.33 ± 0.33	2.00 ± 0.57	3.00 ± 0.57
<i>P. lilacinus</i> 036	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.33	1.66 ± 0.33
<i>M. anisopliae</i> 048	2.00 ± 0.57	10.00 ± 1.73	26.3 ± 1.85
<i>M. anisopliae</i> 080	1.33 ± 0.33	3.33 ± 1.20	8.00 ± 0.57
<i>M. anisopliae</i> 006	1.33 ± 0.88	2.33 ± 0.88	7.33 ± 0.88
<i>B. bassiana</i> 048	0.66 ± 0.33	2.66 ± 0.33	2.66 ± 0.66

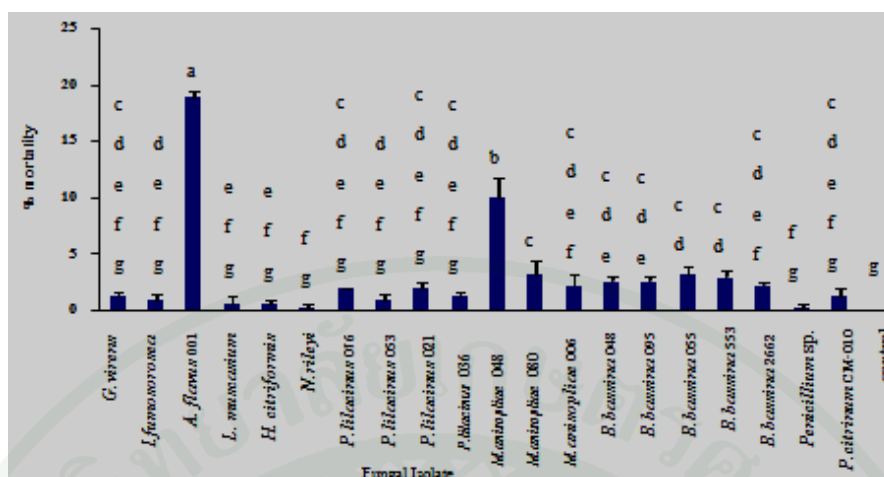
ตารางที่ 2 (ต่อ)

Fungal Isolate	Concentration		
	Concentration 1×10^6 conidia/ml.	Concentration 1×10^7 conidia/ml.	Concentration 1×10^8 conidia/ ml.
Mortality rate $\pm$ S.D.			
<i>B. bassiana</i> 095	0.33 ± 0.33	2.66 ± 0.33	7.00 ± 0.57
<i>B. bassiana</i> 055	1.33 ± 0.33	3.33 ± 0.57	6.33 ± 0.88
<i>B. bassiana</i> 553	1.00 ± 0.00	3.33 ± 0.57	5.33 ± 0.33
<i>B. bassiana</i> 2662	0.66 ± 0.66	2.33 ± 0.33	4.00 ± 0.57
<i>Penicillium</i> sp.	0.33 ± 0.33	0.33 ± 0.33	2.00 ± 0.57
<i>P. citrinum</i> CM-010	0.66 ± 0.66	1.33 ± 0.66	1.33 ± 0.33
control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00



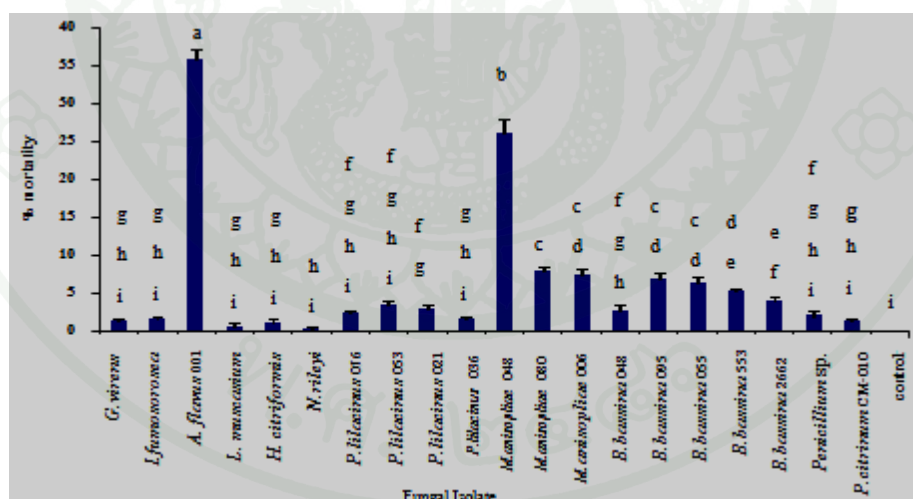
ภาพที่ 14 ตารางแสดงอัตราการตายของยุงรำคาญตัวเต็มวัยใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^7 conidia/ml. ($F_{(20,42)} = 2.207, p < 0.05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด



ภาพที่ 15 ตารางแสดงอัตราการตายของยุงรำคาญตัวเต็มวัยใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^8 conidia/ml. ($F_{(20,42)} = 41.805, p < 0.05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด



ภาพที่ 16 ตารางแสดงอัตราการตายของยุงรำคาญตัวเต็มวัยใน 1 สัปดาห์ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1×10^9 conidia/ml. ($F_{(20,42)} = 165.021, p < 0.05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด



ภาพที่ 17 แสดงยุงรำคาญกลุ่มควบคุมไม่พบเชื้อราเจริญบนลำตัวของยุงรำคาญส่องภายใต้กล้อง stereomicroscope 400x (ซ้าย) และยุงรำคาญทดสอบด้วยเชื้อรา *A. flavus* 001 1 ตัวพบเชื้อราเจริญอยู่บนลำตัวของยุงรำคาญเมื่อส่องภายใต้กล้อง stereo microscope 400x (ขวา)

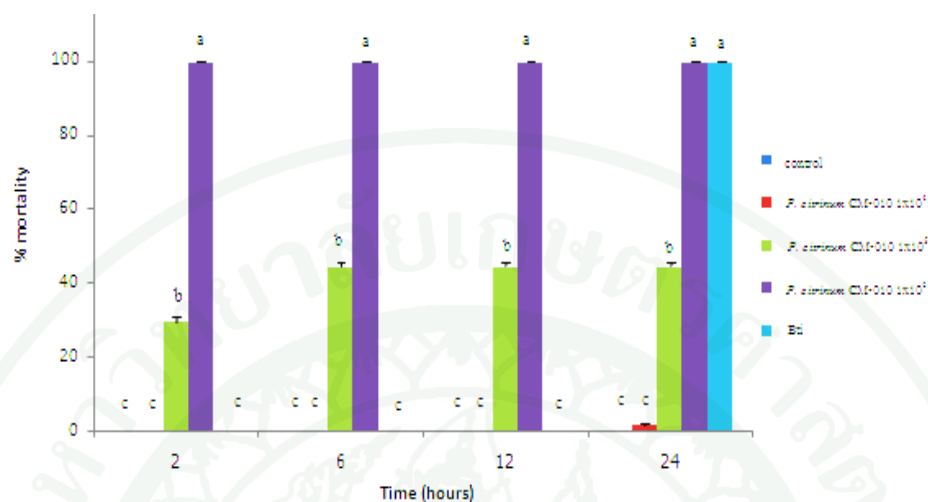
3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญในเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^4 , 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับ เชื้อ *Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti ที่เวลา 2 ชั่วโมง ($F_{(4,15)} = 3.89, p < 0.05$), 6 ชั่วโมง ($F_{(4,15)} = 9.00, p < 0.05$), 12 ชั่วโมง ($F_{(4,15)} = 9.00, p < 0.05$) และ 24 ชั่วโมง ($F_{(4,15)} = 8.23, p < 0.05$) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ประสิทธิภาพเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^4 , 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. ในช่วงเวลาต่างๆเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อ *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)

Time (hrs.)	<i>P. citrinum</i> CM-010 1×10^4 conidia/ml.	<i>P. citrinum</i> CM-010 1×10^5 conidia/ml.	<i>P. citrinum</i> CM-010 1×10^6 conidia/ml.	Bti.	control
	Mortality rate $\pm$ S.D.				
2	0.00 $\pm$ 0.00	29.5 $\pm$ 1.55	100 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
6	0.00 $\pm$ 0.00	44.5 $\pm$ 2.08	100 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
12	0.00 $\pm$ 0.00	44.5 $\pm$ 2.08	100 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
24	1.50 $\pm$ 1.29	44.5 $\pm$ 2.08	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

จะเห็นว่าประสิทธิภาพเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญได้เร็วกว่า *Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti ที่ระยะเวลาเดียวกัน (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญระยะเวลาดังๆ ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^4 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. เปรียบเทียบกับ Bti.

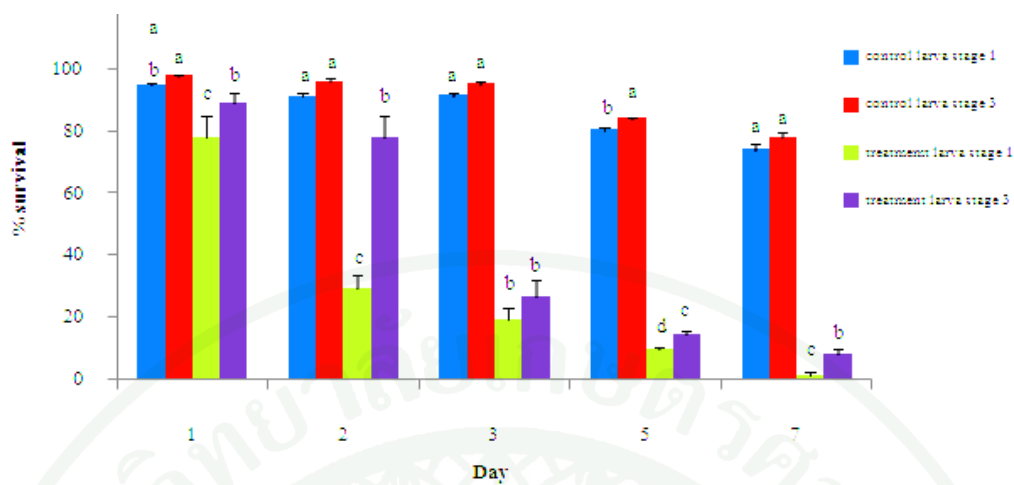
หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพดีที่สุด

4. ผลการศึกษาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญในภาคสนาม

ผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญระยะวัย 1 และลูกน้ำยุงรำคาญระยะวัย 3 ในภาคสนาม (ภาพที่ 19) พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของลูกน้ำยุงรำคาญในวันที่ 1 ($F_{(1,4)} = 21.08, p < 0.05$), วันที่ 2 ($F_{(1,4)} = 435.72, p < 0.05$), วันที่ 3 ($F_{(1,4)} = 265.20, p < 0.05$), วันที่ 5 ($F_{(1,4)} = 6.85, p < 0.05$) และวันที่ 7 ($F_{(1,4)} = 1.457, p < 0.05$) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางแสดงอัตราการรอดตายและค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ในภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์

Larva stage	1 day	2 day	3 day	5 day	7 day
Control larva stage 1	94.66 $\pm$ 0.57	91.00 $\pm$ 1.0	91.33 $\pm$ 1.52	80.33 $\pm$ 1.53	74.00 $\pm$ 3.60
Control larva stage 3	97.66 $\pm$ 0.57	96.00 $\pm$ 1.0	95.00 $\pm$ 1.73	84.00 $\pm$ 1.0	78.00 $\pm$ 2.64
Treatment larva stage 1	78.00 $\pm$ 7.00	29.66 $\pm$ 4.16	19.66 $\pm$ 6.50	10.00 $\pm$ 1.0	1.66 $\pm$ 1.52
Treatment larva stage 3	89.00 $\pm$ 3.00	78.00 $\pm$ 7.0	27.00 $\pm$ 8.71	14.66 $\pm$ 1.53	8.66 $\pm$ 2.51

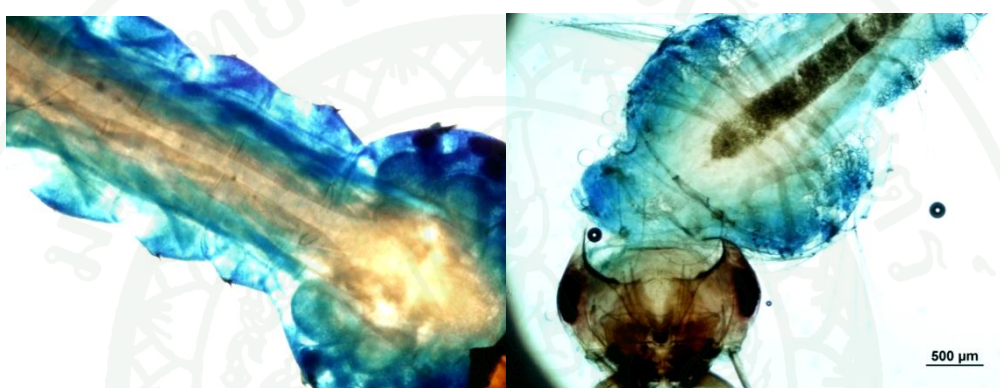


ภาพที่ 19 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ในภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์

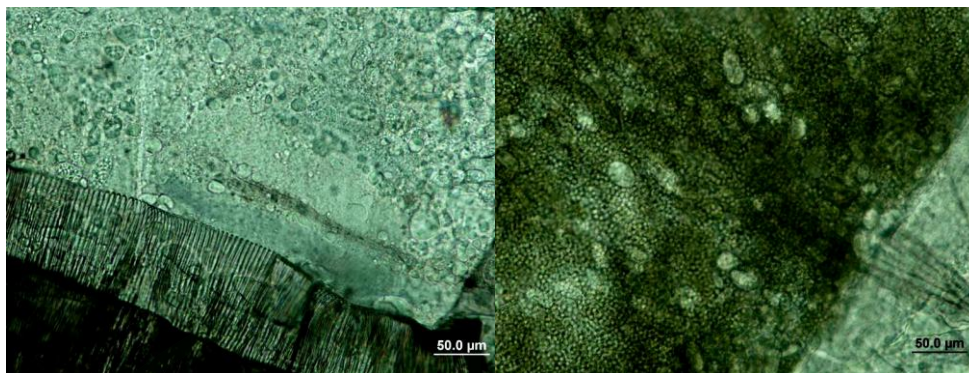
หมายเหตุ ตัวอักษร a,b,c แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยอักษร a หมายถึงมีประสิทธิภาพอัตราการรอดตายที่ดีที่สุด

5. ผลการศึกษากลไกการทำงานของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ

จากการศึกษากลไกการทำงานของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ เมื่อนำลูกน้ำยุงรำคาญที่ถูกเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 เข้าทำลายมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope โดยเปรียบเทียบกับ บกลุ่มควบคุม พบว่าลูกน้ำยุงรำคาญที่ถูกเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 เข้าทำลายมีสปอร์ของเชื้อราอยู่บริเวณทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 20)

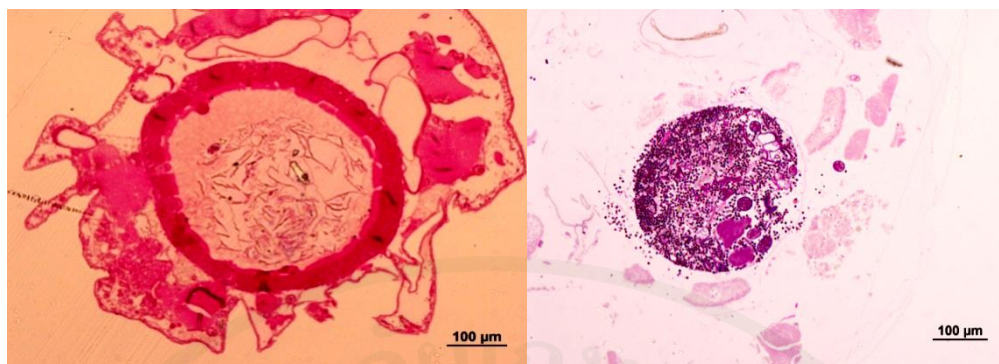


ภาพที่ 20 ลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา ไม่พบสปอร์เชื้อราภายในทางเดินอาหารเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 400x (ซ้าย) และลูกน้ำยุงรำคาญ ที่ตายเมื่อทดสอบด้วยเชื้อรา *Penicillium citrinum* CM-010 ที่เวลา 2 ชั่วโมงพบสปอร์เชื้อราภายในทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 400x (ขวา)

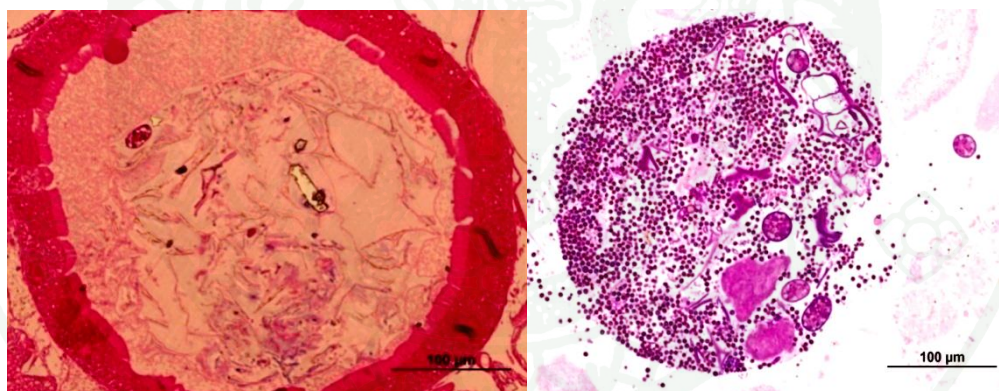


ภาพที่ 21 ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา ไม่พบสปอร์เชื้อราภายในทางเดินอาหารเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 600x (ซ้าย) และทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 พบสปอร์เชื้อราเป็นจำนวนมาก เมื่อส่องภายใต้กล้อง Light microscope ที่กำลังขยาย 600x (ขวา)

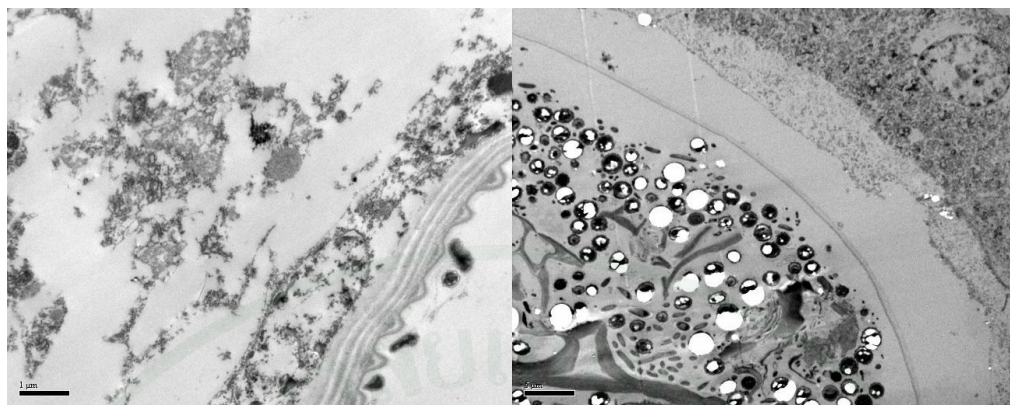
และเมื่อศึกษาโดยการตัดเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของลูกน้ำยุงรำคาญ (cross section) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope (ภาพที่ 22 และ 23) และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) หรือ TEM ที่กำลังขยาย 10000x (ภาพที่ 24) ภายหลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง พบว่าทางเดินอาหารลูกน้ำยุงเต็มไปด้วยสปอร์เชื้อรา *P. citrinum* CM-010 และผนังท่อทางเดินอาหารมีลักษณะถูกย่อยสลาย



ภาพที่ 22 ภาพ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา ไม่พบสปอร์ เชื้อราเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 200x (ซ้าย) และ ภาพ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 พบสปอร์เชื้อราเป็นจำนวนมาก และผนังลำไส้ลูกน้ำยุงถูกย่อยสลาย เมื่อส่องภายใต้กล้อง Light microscope ที่กำลังขยาย 200x หลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง (ขวา)



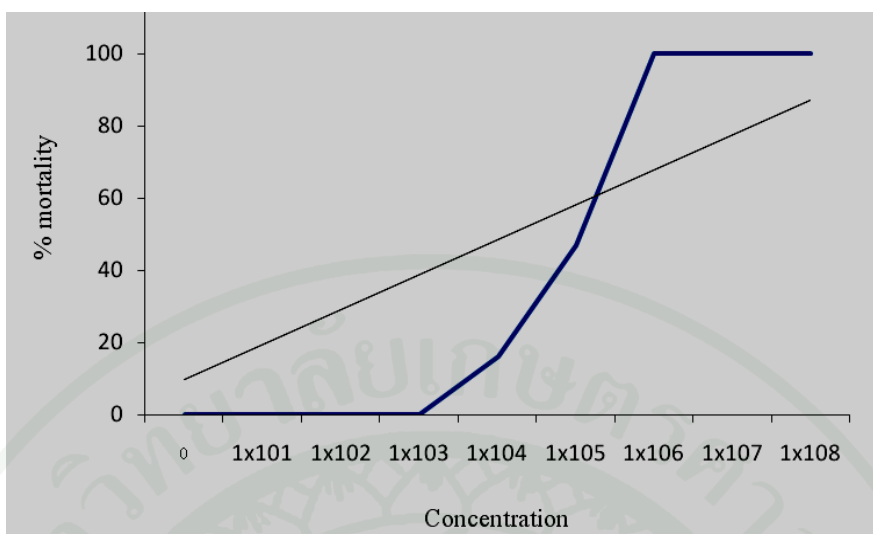
ภาพที่ 23 ภาพ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา ไม่พบสปอร์ เชื้อราเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope ที่กำลังขยาย 400x (ซ้าย) ภาพ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 พบสปอร์เชื้อราเป็นจำนวนมาก และผนังลำไส้ลูกน้ำยุงถูกย่อยสลาย เมื่อส่องภายใต้กล้อง Light microscope ที่กำลังขยาย 400x หลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง (ขวา)



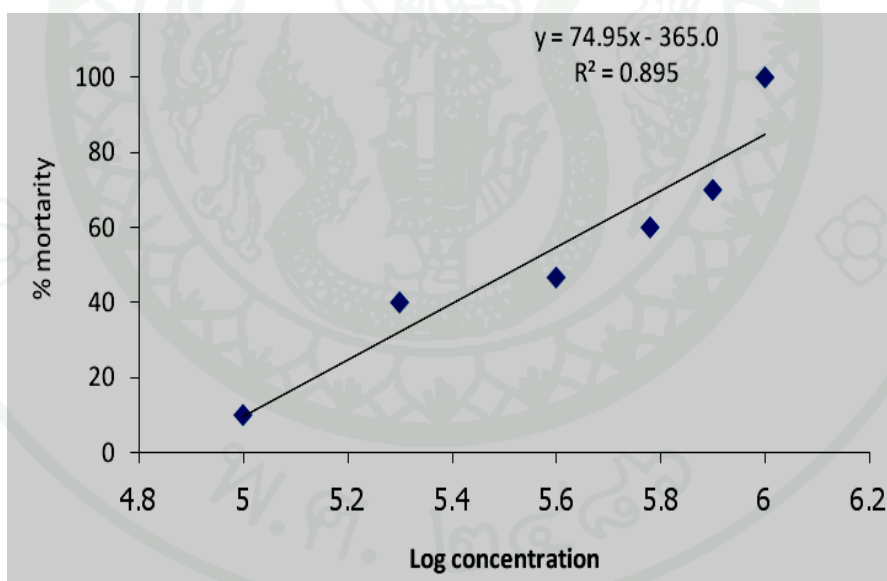
ภาพที่ 24 ภาพ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญกลุ่มควบคุม ไม่พบสปอร์ของเชื้อรา เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) หรือ TEM ที่กำลังขยาย 5000x (ซ้าย) และภาพ cross section ทางเดินอาหารลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 พบสปอร์เชื้อราเป็นจำนวนมาก และแสดงให้เห็นลักษณะการรุกรานของท่อทางเดินอาหาร เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) หรือ TEM ที่กำลังขยาย 5000x หลังจากเชื้อราเข้าทำลาย 2 ชั่วโมง (ขวา)

6. ผลการวิเคราะห์ค่า Median lethal concentration (LC_{50})

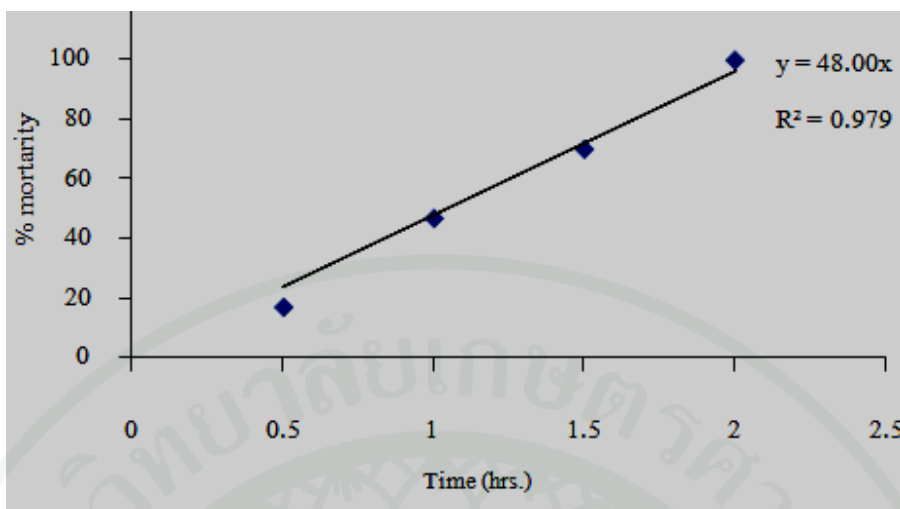
การวิเคราะห์หาค่า Median lethal concentration (LC_{50}) ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ในทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 conidia/ml. ตามลำดับ (ภาพที่ 25) พบว่าความเข้มข้นของเชื้อราที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย 50% นั้นอยู่ระหว่างที่ความเข้มข้น 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. จึงได้ทำการหาค่า LC_{50} จากความเข้มข้น 1×10^5 จนถึง 1×10^6 conidia/ml. โดยแสดงค่าดังกราฟ (ภาพที่ 26) และการวิเคราะห์หาค่า Lethal time (LT_{50}) ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 พบว่าระยะเวลาที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย 50% เท่ากับ 1.06 ชั่วโมง (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 25 กราฟแสดงอัตราการตาย (50 % mortality) Median lethal concentrations (LC_{50}) ลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 26 กราฟแสดงอัตราการตาย (50 % mortality) Median lethal concentrations (LC_{50}) ลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายเท่ากับ 3×10^5 conidia/ml.



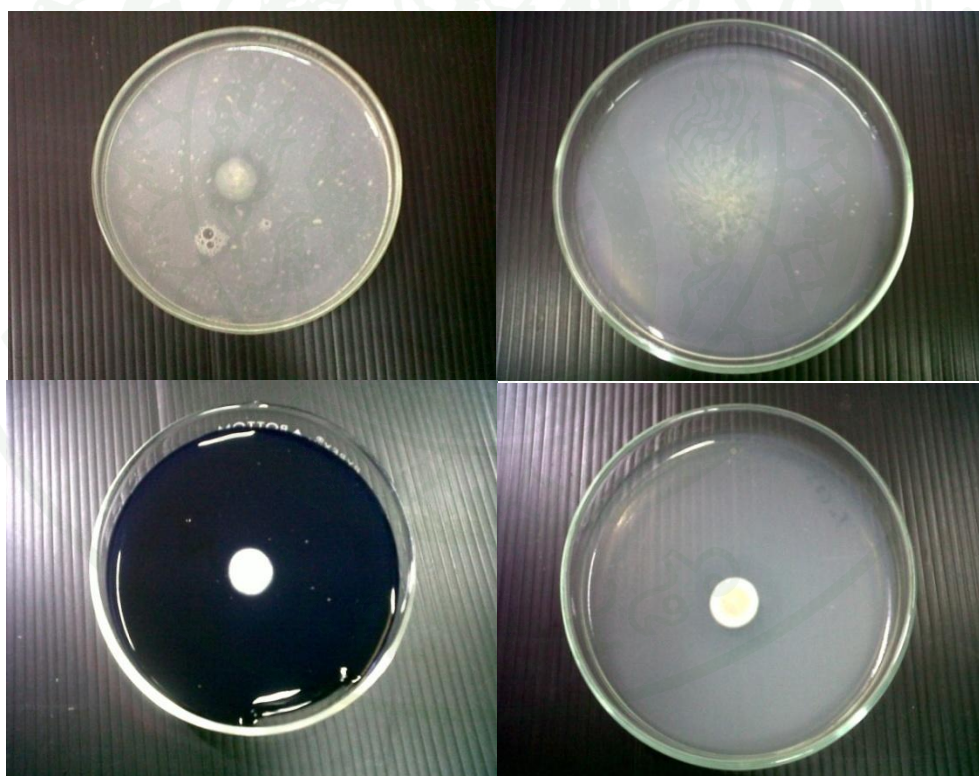
ภาพที่ 27 กราฟแสดงอัตราการตาย (50 % mortality) Lethal time (LT_{50}) ระยะเวลาที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายเท่ากับ 1.06 ชั่วโมง

7. ผลการทดสอบเอนไซม์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญ

เมื่อนำเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส โปรติเอส โคดีเนส และอะไมเลส เมื่อตรวจผลโดยสังเกตบริเวณไฮรอปโคโลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเห็นบริเวณไฮรอปโคโลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โคดีเนสและอะไมเลสได้ ซึ่งไม่เกิดบริเวณไฮรอปโคโลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 28) และเมื่อได้ทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมโปรติเอสในเวลาต่อมาพบว่า ไม่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเท่ากับ 0.08 ใน 2 วันแรก ซึ่งในวันต่อมาไม่พบค่ากิจกรรมเอนไซม์

ตารางที่ 4 ตารางแสดงความสามารถของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส โปรติเอส ไคติเนส และอะไมเลส เมื่อตรวจผลโดยสังเกตบริเวณ ใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดของเอนไซม์	เส้นศูนย์กลาง บริเวณใสรอบโคโลนี	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี	กิจกรรมเอนไซม์ (Unit / ml.)
โปรติเอส	3 ซม.	2 ซม.	0.08
ไคติเอส	-	-	-
อะไมเลส	-	-	-
ไลเปส	-	-	-

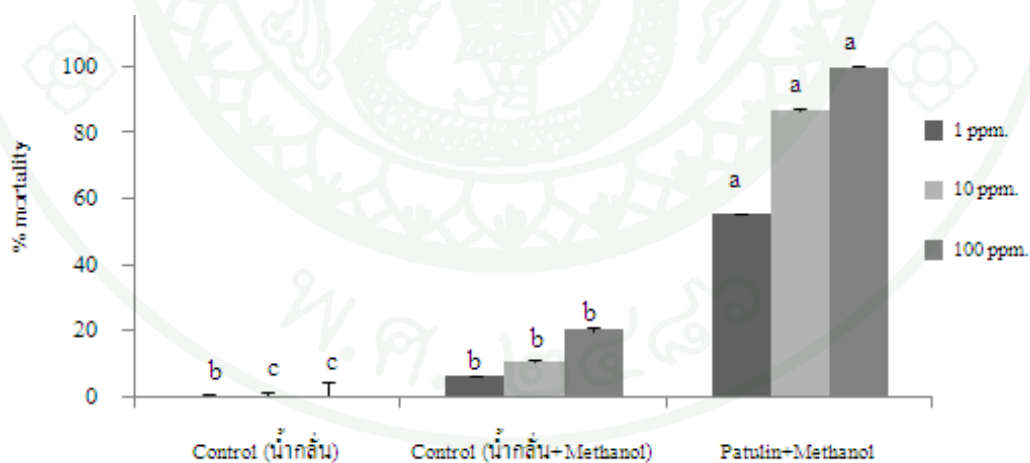


ภาพที่ 28 แสดงความสามารถของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (บนซ้าย), เอนไซม์ไคติเอส (บนขวา), เอนไซม์อะไมเลส (ล่างซ้าย) และ เอนไซม์ไลเปส (ล่างขวา)

8. ผลการวิเคราะห์สารพิษ เชื้อรา (mycotoxin) เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

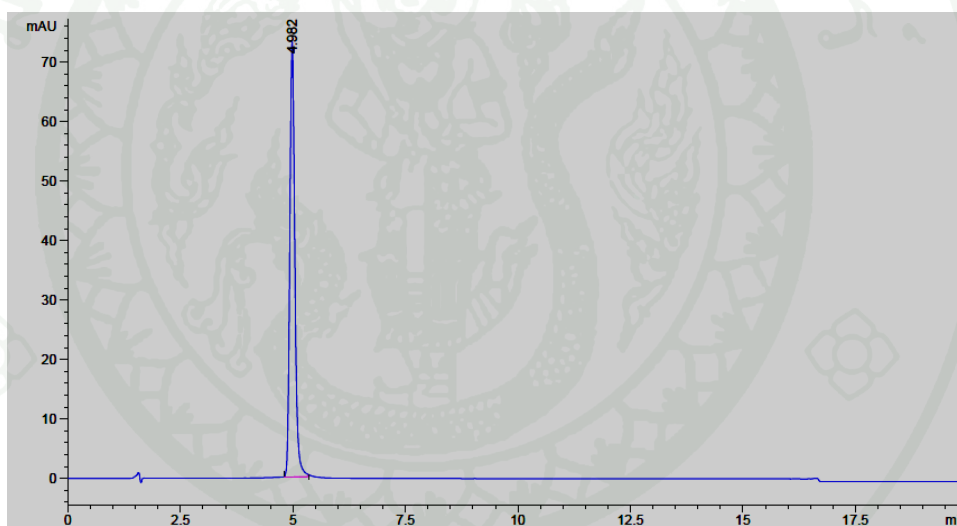
จากการทดลองนำ standard patulin มาวิเคราะห์ HPLC หาสารพิษในเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า patulin + methanol ที่ความเข้มข้น 1 ppm. ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $55\% \pm 4.40$ และกลุ่ม control (น้ำกลั่น+ methanol) ที่ความเข้มข้น 1 ppm. ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $6\% \pm 1.45$ และกลุ่ม control (น้ำกลั่น) ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $0\% \pm 0.57$ ตามลำดับ ($F_{(2,6)} = 282.86, p < 0.05$)

จากนั้นทดสอบ patulin + methanol ที่ความเข้มข้น 10 ppm. ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $87\% \pm 1.20$ และกลุ่ม control (น้ำกลั่น+ Methanol) ที่ความเข้มข้น 10 ppm. ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $11\% \pm 0.33$ และกลุ่ม Control (น้ำกลั่น) ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $0\% \pm 0$ ตามลำดับ ($F_{(2,6)} = 1.07, p < 0.05$) และเมื่อทดสอบ patulin + methanol ที่ความเข้มข้น 100 ppm. ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $100\% \pm 0$ และกลุ่ม control (น้ำกลั่น+ methanol) ที่ความเข้มข้น 100 ppm. ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $11\% \pm 0.57$ และกลุ่ม control (น้ำกลั่น) ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย $0\% \pm 0$ ตามลำดับ ($F_{(2,6)} = 6.30, p < 0.05$) (ภาพที่ 29)

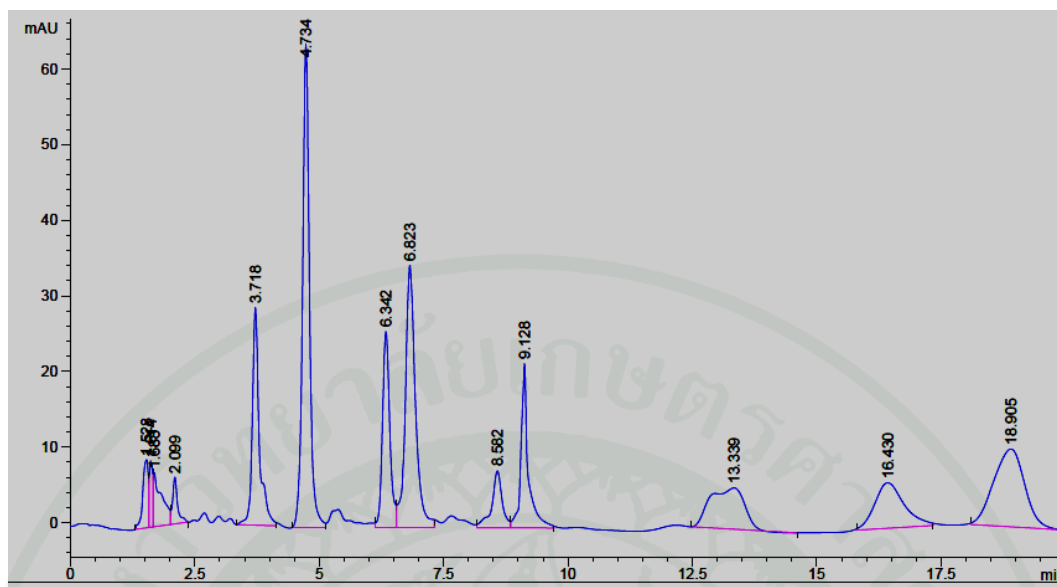


ภาพที่ 29 แสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญเมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น และทดสอบด้วยน้ำกลั่น+methanol และ patulin+methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

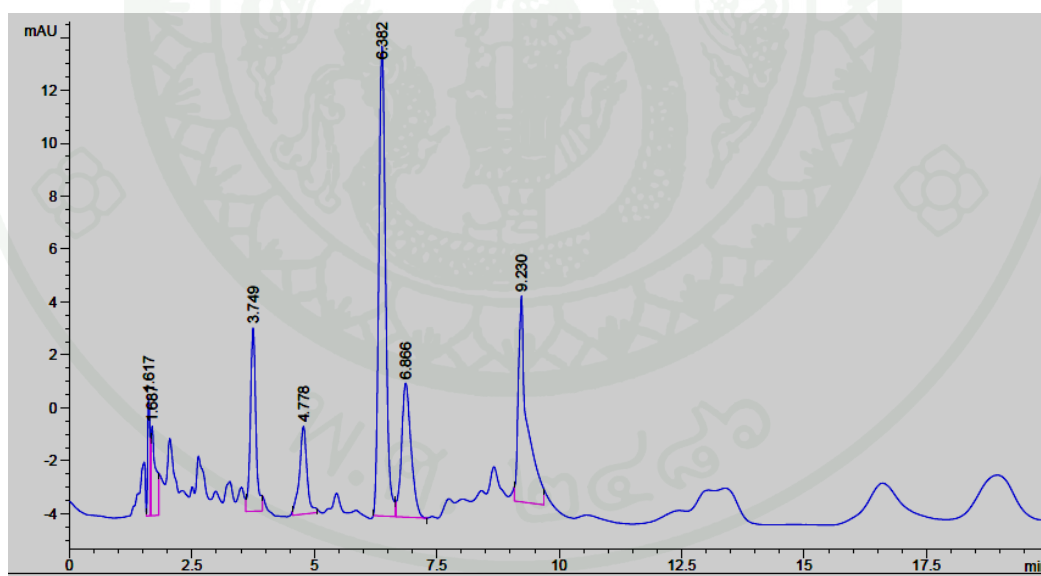
จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบ sample chromatogram ของเชื้อ *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 7 วัน (ภาพที่ 31) และ sample chromatogram ของเชื้อ *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 10 วัน (ภาพที่ 32) เมื่อเปรียบเทียบกับ standard patulin (ภาพที่ 30) พบว่า peak ของเชื้อ *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 7 วัน มีค่าใกล้เคียงกับ retention time (RT) ของ patulin คือ peak ที่มีค่า RT = 4.734 min. และมีพื้นที่ใต้กราฟ (area) เท่ากับ 613.66 เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้น (ppm) ของปริมาณตัวอย่างจากสมการเส้นตรงของ patulin caribration (ภาพที่ 33) พบว่าปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 12.20 ppm. และ sample chromatogram ของเชื้อ *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 10 วัน มีค่าใกล้เคียงกับ retention time (RT) ของ patulin คือ peak ที่มีค่า RT = 4.778 min. และมีพื้นที่ใต้กราฟ (area) เท่ากับ 35.54 เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้น (ppm) ของปริมาณตัวอย่างจากสมการเส้นตรงของ patulin caribration พบว่าปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 0.80 ppm.



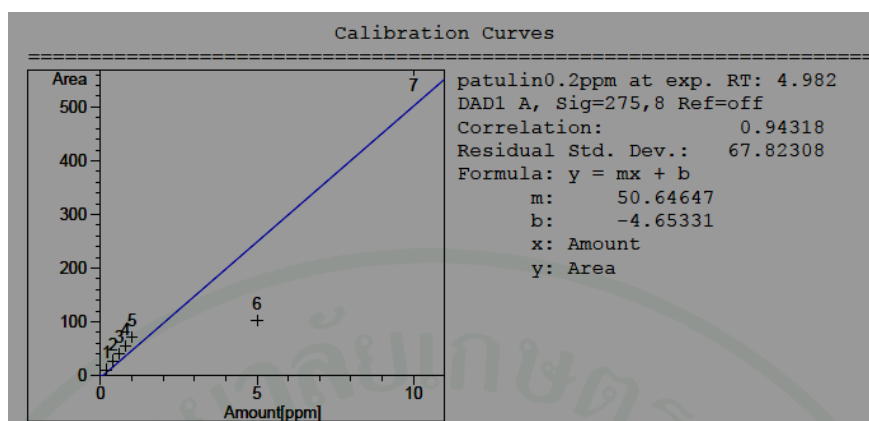
ภาพที่ 30 กราฟโครมาโตแกรม standard patulin ที่เวลา 4.943 นาที



ภาพที่ 31 แสดงกราฟโครมาโตแกรมสารพิษ patulin ที่เวลา 4.734 นาที เป็น patulin เกิดจากเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 7 วัน



ภาพที่ 32 แสดงกราฟโครมาโตแกรมสารพิษ patulin ที่เวลา 4.778 นาที เป็น patulin เกิดจากเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงใน PDB 10 วัน



ภาพที่ 33 กราฟแสดงสมการเส้นตรง patulin caribration curve และผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* โดยเทคนิค PCR ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร. อลงกรณ์ อำนวยกาญจนสิน ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย (Biotec) พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *P. citrinum* (ภาพที่ 34)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU377267.1	Penicillium citrinum strain CR-2 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
JQ082503.1	Penicillium citrinum isolate TBG1-1 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
JN802257.1	Penicillium citrinum strain US13 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
F1765031.1	Penicillium citrinum isolate CNLH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN252117.1	Penicillium sp. F19 internal transcribed spacer 1, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN252111.1	Penicillium sp. F10 internal transcribed spacer 1, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN252110.1	Penicillium sp. F9 internal transcribed spacer 1, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN851046.1	Penicillium citrinum strain SCSGAF0167 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN851040.1	Penicillium citrinum strain SCSGAF0141 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN851027.1	Penicillium citrinum strain SCSGAF0103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN851020.1	Penicillium citrinum strain SCSGAF0092 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN851003.1	Penicillium citrinum strain SCSGAF0052 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN850977.1	Penicillium citrinum strain SCSGAF0003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HQ696034.1	Penicillium sp. B19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN942858.1	Penicillium citrinum strain DAOM 221147 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
HE608805.1	Penicillium sp. MS-2011-F40 genomic DNA containing ITS1, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JN601441.1	Penicillium citrinum isolate UASWS0790 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
JN226972.1	Penicillium citrinum isolate J8M-35 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
JN226951.1	Penicillium citrinum isolate W8M-47 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
JN226917.1	Penicillium citrinum isolate SZ8M-16 internal transcribed spacer 1	802	802	100%	0.0	100%
JF266706.1	Penicillium citrinum strain S36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
FJ004283.1	Penicillium citrinum strain ATHUM 3038 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
FJ004284.1	Penicillium citrinum strain ATHUM 5050 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HQ443239.1	Penicillium sp. TFL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
JF793520.1	Penicillium citrinum strain T134 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HQ596918.1	Penicillium citrinum internal transcribed spacer 1, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HM469428.1	Penicillium citrinum strain KUC3084 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HQ889713.1	Penicillium citrinum strain W3-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HQ013140.1	Penicillium sp. QY013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
HQ316567.1	Penicillium sp. 4-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
GU944575.1	Penicillium citrinum strain DTO 58A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
GU944574.1	Penicillium citrinum strain CBS 122396 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%
GU944573.1	Penicillium citrinum strain CBS 122419 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	802	802	100%	0.0	100%

ภาพที่ 34 ผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* โดยเทคนิค PCR

วิจารณ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia / ml. กับลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* ระยะที่ 3 สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญมีอัตราการตาย 100 % ในเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Bisht *et al.*, (1996) ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus clavatus* ที่ความเข้มข้น 2.1×10^8 conidia /ml. มาทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* พบว่าสามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญมีอัตราการตาย 68 % และสามารถทำให้ลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* มีอัตราการตาย 100 % ที่เวลา 24 -72 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* สูงกว่าเชื้อรา *A. clavatus* โดยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* โดยใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า และใช้เวลาในการเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญ น้อยกว่าเชื้อรา *A. clavatus*

ผลการทดสอบยุงรำคาญระยะตัวเต็มวัย กับเชื้อรา *A. flavus* 001 ที่ความเข้มข้น 1×10^9 conidia / ml. สามารถทำให้ยุงรำคาญมีอัตราการตาย 36 % ในเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ E.J. scholte *et al.*, (2007) พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเข้าทำลายยุงลายระยะตัวเต็มวัย *A. aegypti* และ *A. albopitus* ผลการทดสอบพบว่ามียุงลายทั้ง 2 ชนิดนี้มีอัตราการตายสูงกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเชื้อรา เช่นเดียวกับ Doast *et al.*, (1982) และ Mohanti *et al.*, (2008) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *M. anisopliae* หลายพันธุ์ต่างๆพบว่าสามารถควบคุมลูกน้ำยุงได้หลายชนิด ได้แก่ *C. pipens* , *C. quinquefasciatus* , *A. stephensi* , *A. aegypti* แต่จากผลการทดลองลูกน้ำยุงรำคาญระยะตัวเต็มวัยพบว่าประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่นำมาใช้ในการควบคุมยุงตัวเต็มวัยนั้นมีความเป็นไปได้น้อย เนื่องจากในการทดลองต้องใช้เชื้อราความเข้มข้นสูงมาก นอกจากนี้เชื้อรา *A. flavus* 001 แม้จะสามารถควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญทั้งในระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัยได้ แต่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ประโยชน์

และผลจากการทดลองภาคสนามยืนยันผลจากห้องปฏิบัติการพบว่าอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญในภาคสนามมีอัตราการตายโดยใช้เวลาดายช้ากว่าในห้องปฏิบัติการอันเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติเช่น สภาพภูมิอากาศ แสงแดด ปฏิกิริยาเหล่านี้ส่งผลต่อประสิทธิภาพเชื้อราที่จะเข้าทำลายลูกน้ำยุงได้ (Scholte *et al.*, 2004)

และเมื่อนำลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* ที่ตายหลังจากทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope (LM) และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน Transmission electron microscope (TEM) พบว่าภายในลำไส้ของลูกน้ำยุงรำคาญเต็มไปด้วยสปอร์ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 และพบว่าผนังลำไส้ของลูกน้ำยุงรำคาญมีรอยร้าว เมื่อเปรียบเทียบกับลูกน้ำยุงรำคาญในกลุ่มควบคุมนั้น ไม่พบสปอร์ของเชื้อราดังกล่าว และผนังลำไส้ไม่มีรอยร้าวหรือการถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อรา ซึ่งสาเหตุการตายของลูกน้ำยุงรำคาญเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 โดยใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง เกิดจากสารพิษของ เชื้อราที่ลูกน้ำยุงรำคาญกินเชื้อราเข้าไปแล้วส่งผลให้ลูกน้ำตายในที่สุดโดยไม่ต้องรอให้เชื้อราเจริญเติบโตในตัวลูกน้ำยุงเหมือนกับเชื้อราบางชนิดที่ต้องใช้เวลา 3-7 วัน เชื้อราจึงจะสามารถเข้าทำลายได้ ในการทดลองของ Brett *et al.*, (2004) ได้ทำการทดลองโดยใช้ *A. clavatus* ทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้อง Light microscope (LM) และ Transmission electron microscope (TEM) พบว่าสปอร์เชื้อรา *A. clavatus* สามารถแทงผ่านผนังลำตัวเจริญอยู่ภายในตัวลูกน้ำยุงแล้วสร้างเส้นใยเชื้อราเป็นสปอร์ส่งผลให้ลูกน้ำตายในที่สุด ซึ่งกระบวนการนี้ต้องใช้เวลามากกว่าหนึ่งวันจึงจะสามารถทำให้ลูกน้ำยุงตาย อย่างไรก็ตาม Al-Aldroos *et al.*, (1978) พบว่าการเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญของเชื้อราไม่ใช่เพียงแค่การแทงเส้นใยผ่านผนังลำตัวเท่านั้น แต่ยังสามารถแทงเส้นใยเข้าไปในส่วนของการหายใจ siphon หรือส่วนของ alimentary canal ของลูกน้ำยุงก็ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสปอร์ของเชื้อราในลำไส้มีส่วนทำให้สปอร์เชื้อราหลังสารพิษออกมา (Lacey *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับการทดลองของ Riba *et al.* (1986) ได้ศึกษาผลของ *Penicillium corylophilum* และ *Penicillium janthinellum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* ได้ดีที่สุด พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีสาร secondary metabolite ที่ส่งผลต่อพัฒนาการของลูกน้ำยุงลาย โดยสอดคล้องกับ Robert (1981) รายงานว่าเชื้อรา *Penicillium* sp. มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของลูกน้ำยุงลาย โดย secondary metabolite ที่พบใน *Penicillium* sp. จะก่อให้เกิดโรคในลูกน้ำยุงลายระยะที่ 2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาการก่อโรคนั้นขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเชื้อราที่มีต่อลูกน้ำยุงแต่ละชนิด

และเมื่อนำ supernatant ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 มาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ protease, lipase, amylase และ chitinase พบว่ามีเพียงค่ากิจกรรมของกิจกรรมเอนไซม์ protease เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์ lipase, amylase และ chitinase ไม่พบในการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการสมมติฐานที่ว่าลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* ตายเนื่องจากได้รับสารพิษ (toxin) จากเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 โดยเมื่อนำ supernatant ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) วิเคราะห์หาสารพิษ (toxin) ด้วยวิธี HPLC และเปรียบเทียบ

โครมาโตแกรมของ patulin โดยสารพิษชนิดนี้พบได้ในเชื้อรา *Penicillium* sp. และมีรายงานว่ามิผลทำให้ลูกน้ำยุงตาย (Scholte *et al.*, 2004)

จากผลการวิเคราะห์อัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญอันเนื่องมาจาก patulin และ methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญเมื่อทดสอบด้วย patulin + methanol ให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบด้วย น้ำกลั่น + methanol ซึ่งชี้ให้เห็นว่า patulin นั้นเป็นตัวแปรหลักที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย และมีประสิทธิภาพสูงกว่าในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญเมื่อเปรียบเทียบกับ methanol และ น้ำกลั่น Dailey *et al.*, (1977) ได้กล่าวว่า metabolite จาก patulin นั้นมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหาร และมีความเป็นพิษสูง สอดคล้องกับ Puel *et al.*, (2010) ได้ทำการศึกษาพบว่าสารพิษชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม sulfhydryl ซึ่งสารในกลุ่มนี้ยับยั้งเอนไซม์หลายชนิด อย่างไรก็ตามสารชนิดนี้เมื่อแปรสภาพเป็น cysteine จะมีความเป็นพิษน้อยกว่าในขณะที่เป็นสารประกอบจะมีพิษรุนแรงเฉียบพลัน

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 สามารถผลิตสารพิษ patulin สูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งความเป็นพิษจะมากกว่ากลุ่มเชื้อราที่ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 10 วัน ถึง 15.25 เท่า (ภาพที่ 31 และ 32) แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวถือเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บเกี่ยว (harvest) patulin เพื่อใช้ควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ

สรุป

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia/ml. สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญ *C. quinquefasciatus* ระยะที่ 3 โดยสามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญมีอัตราการตาย 100 % ในเวลา 1 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อราชนิดอื่นๆไม่สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญได้ โดยลูกน้ำยุงรำคาญที่รอดตายสามารถเจริญได้อย่างปกติและเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยได้อย่างสมบูรณ์รวมทั้งสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ นอกจากนี้ยังได้นำเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* และลูกน้ำยุงก้นปล่อง *A. stephensi* ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน พบว่าไม่สามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุง 2 ชนิดนี้ได้ และจากการทดลองยุงรำคาญระยะตัวเต็มวัยพบว่าเชื้อรา *A. flavus* 001 ทำให้ยุงรำคาญมีอัตราการตาย 36% ที่เวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่เชื้อราอื่นๆไม่สามารถเข้าทำลายได้ จากนั้นทำการทดลองในเรือนทดลองเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^4 , 1×10^5 และ 1×10^6 conidia/ml. เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อ *Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^6 conidia/ml. มีผลทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย 100 % ที่เวลา 2 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. มีผลทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญระยะวัย 1 มีอัตราการรอดตาย 1.66% และลูกน้ำยุงรำคาญระยะวัย 3 มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 8.66% แสดงให้เห็นว่าระยะวัยของลูกน้ำยุงรำคาญมีผลต่ออัตราการรอดตายเมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลาย

ผลจากการศึกษาพฤติกรรมการทำงานของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 เข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope พบสปอร์ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 อยู่บริเวณทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าการที่เชื้อราสามารถเข้าทำลายลูกน้ำยุงรำคาญได้นั้นเนื่องจากลูกน้ำยุงรำคาญกินสปอร์ของเชื้อราเข้าไปจึงมีผลทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายในที่สุด นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาค่า Median lethal concentration (LC_{50}) ของเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย 50% มีค่าเท่ากับ 3×10^5 conidia/ml. และ Lethal time (LT_{50}) ระยะเวลาที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายมีค่าเท่ากับ 1.06 ชั่วโมง

จากการทดสอบเอนไซม์ ชนิดต่างๆ ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงรำคาญพบว่าเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเห็นบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ไคตินเนสและอะไมเลสได้ และจากการที่ลูกน้ำยุงรำคาญมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว จึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์สารพิษ (Toxin) จาก

เชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าในเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 7 วันสามารถผลิตสารพิษ patulin ที่เวลา 4.734 นาที นอกจากนี้พบว่า *P. citrinum* CM-010 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 7 วัน มีความเป็นพิษมากกว่ากลุ่มที่ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 10 วัน และผลจากการวิเคราะห์อัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญอันเนื่องมาจาก patulin พบว่าอัตราการตาย ของกลุ่มลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วย patulin + methanol ให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ พบว่ากลุ่มลูกน้ำยุงรำคาญที่ทดสอบด้วย patulin + methanol มีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยน้ำกลั่น + methanol ซึ่งชี้ให้เห็นว่า patulin นั้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตาย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 2544. การประเมินผลโครงการประชาร่วมใจ
ป้องกัน และควบคุมโรคไข้สมองอักเสบ. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์การรับส่งสินค้าและพัสดุ
ภัณฑ์, กรุงเทพฯ ฯ.
- กระทรวงสาธารณสุข. 2542. แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคไข้สมองอักเสบ. พิมพ์ครั้งที่ 1.
กรุงเทพฯ.
- กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ. 2540. การควบคุมแมลงโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย.
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, เชียงใหม่. 40 น.
- จิตติมา คมหอม. 2545. ศักยภาพของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ในการควบคุมกำจัดหอยเชอ
รีในระยะไข่. ปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เผด็จ สิริยะเสถียร และ อุษาวดี ถาวระ. 2549. ยุ้งดัดแปลงพันธุ์กรรม : กลยุทธ์ใหม่ในการควบคุม
โรคที่นำโดยยุง. วารสารสัตวแพทย์ 36 (4): 9-19.
- พาลาภ สิงหเสนี. 2540. การประเมินความเสี่ยงจากพิษของวัตถุอันตราย : หลักการและการ
ประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ ฯ.
- ศุภยางค์ วรวิมลคุณชัย, วิมลชยา วิเศษรัตน์, วิวิทย์ สมสานต์ และ ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2533.
การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายลูกน้ำของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์
มาตรฐาน. วารสารสงขลานครินทร์ 12 (2): 145-149.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2546.
สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทดีไซร์, กรุงเทพฯ ฯ.
- สุทัศน์ ยกส้าน. 2547. ยุงพาหะนำโรค. สารคดี 20 (234): 113-115.

สุภัทร สุจริต. 2531. **กีฏวิทยาทางการแพทย์**. พิษณุการพิมพ์, กรุงเทพฯ ฯ.

_____, 2532. **กีฏวิทยาทางการแพทย์**. พิษณุการพิมพ์, กรุงเทพฯ ฯ.

อุดม ปรีชาปัญญา. 2548. **อนามัยสิ่งแวดล้อม**. แผนกเอกสารและการพิมพ์ศูนย์เทคโนโลยีการศึกษา. มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, สมุทรปราการ.

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J Econ Entomol.** 18: 265–267.

Al-Aidroos, K. and D.W. Roberts. 1978. Mutants of *Metrhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** 20: 211-219.

Alves, S.B., L.F.A. Alves, R.B. Lopes, R.M. Pereira and S.A. Vieira. 2002. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). **Journal of Applied Entomology.** 126: 504-509.

Balaraman, K., U.S. Bheema and P.K. Rajagopalan. 1979. Isolation of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria tenella*, and *Fusarium oxysporum* (Deuteromycetes) and their pathogenicity to *Culex fatigans* and *Anopheles stephensi*. **Indian J Med Res.** 70: 718-722.

Balgrie, B. 2003. **Taints and Off-flavours in Food**. CRC Press. 134 p.

Barjac, D.H. and D. J. Sutherland. 1990. **Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies**. Unwin. Hyman Ltd., London. 349 pp.

Belding, D.L. 1965. **Textbook of Parasitology**. 3rd edition. Appleton-Century-Crofts, New York.

Bennett, J.W. and R. Bentley. 1989. What's in a name? Microbial secondary metabolism.

Advances in Applied Microbiology. 34: 1–28.

Bisht, G.S., C. Joshi and R.D. Khulbe. 1996. Watermolds: Potential biological control agents of malaria vector *Anopheles culicifacies*. **Current Science.** 70: 393-395.

Burge, H.D. and N.W. Hussey. 1971. **Microbial Control of Insects and Mites.** Academic Press, London, New York.

Costa, D., G.L.D. Moraes., A.M.L. and P.C.D. Oliveira. 1998. Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases. **J Basic Microbiol.** 38: 337-341.

Clark, T.B., W.R. Kellen., T. Fukuda and Lindegren, J.E. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. **J Invertebr Pathol.** 11: 1-7.

Crisan, A.V. 1971. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium* spores in mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology.** 17: 260-264.

Dailey, R.E., A.M. Blaschita and E.A.J. Brouwer. 1977. Taxicol. Environ. **Health.** 3: 479

Daoust, R.A., M.G. Ward and D.W. Roberts. 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisoplaie* conidia against mosquito larvae. **J Invertebr Pathol.** 40: 228-236.

DMS. 2008. **Principal characters for identifying the three genera of medical importance.**

Available Source : <http://www.med.cmu.ac.th>, April 28, 2009.

- Federici, B.A. 1981. Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, *Lagenidium* and *Coelomomyces*. In: H.D. Burges, eds. **Microbial control of pests and plant diseases**. Academic, New York, 555-572 p.
- Finney, D.J. 1971. **Probit analysis**. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 333 p.
- Fuwan, P. 1938. Enzyme of starch degradation and synthesis. **Adv. In Enzymol.** 12: 380-424.
- Gunasekaran, K., P.S.D. Boopathi and K. Vaidyanathan. 2004. Laboratory and field evaluation of Teknar HP-D a bio-larvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis* spp. *Israelensis* against mosquito vectors. **Acta Tropica**. 92 (5): 109-118.
- Hajek, A. and R.J.S. Leger. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**. 39: 293-322.
- Harwood, R.F. and M.T. James. 1979. **Entomology in human and animal health**. 7th edition. Macmillan Publishing Co. Inc, New York.
- Hawksworth, D.L. 1977. **Mycologist's Handbook**. 2nd ed. CAB Press Kew Surrey England. 231 p.
- Jimenez, M., Mateo, R., Mateo, J.J., Huerta, T. and E. Hernandez. 1991. Effect of the incubation conditions on the production of patulin by *Penicillium griseofulvum* isolated from wheat. **Mycopathologia**. 115: 163-168.
- Kannan, S.K., K. Murugan, A.N. Kumar, N. Ramasubramanian and P. Mathiyazhagan. 2008. Adulticidal effect of fungal pathogen *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi*. **African Journal of Biotechnology**. 7 (6): 838 – 841 p.

- Khan, A., K. Williams, M.P. Molloy and H. Nevalainen. 2003. Purification and characterization of a serine protease and chitinase activity on 2D gels. **Protein Expression and Purification**. 32: 210–220.
- Kirschbaum, J.B. 1985. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. **Annual Review of Entomology**. 30: 51– 70.
- Krutmuang, P. 1996. **Laboratory studies on Green Muscardine Fungus, *Metarhizium anisopliae* for Control of Termites (Isoptera)**. M.S. thesis, Kasetsart University.
- Kubicek, C.P. and G.E. Harman. 1998. ***Trichoderma and Gliocladium* Volume 2**. Salibury, UK, 393 p.
- Lacey, C.M., L.A. Lacey and D.R. Roberts. 1988. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 52: 108-118.
- Lewis, J.A., R.D. Lumsden and J.C. Locke. 1996. Biocontrol of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with Alginate Prilla of *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum* and Various Food Bases. **Biological Control**. 6: 163-173.
- Li, J.K., R.N. Wu, Q.H. Hu. and J.H. Wang. 2007. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. **Food Control**. 18: 530–534.
- Lord, J.C. and T. Fukuda. 1988. An ultrastructural study of the invasion of *Culex quinquefasciatus* larvae by *Leptolegna chapmanii* (Oomycetes: Saprolegnales). **Mycopathologia**. 104: 67-73.

- Mahr, S. 1997. **Know Your Friends: The Entomopathogen *Beauveria bassiana*. Midwest Biological Control News.** Available Source : [http:// www. Entomology. wisc.edu /mben/kyf 410. html](http://www.Entomology.wisc.edu/mben/kyf410.html). April 30, 2008.
- Maketon, M., P.O. Coghlan and J. Sinprasert. 2008. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) for control of broad mite *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) in mulberry. **Exp Appl Acarol.** 46: 157-167.
- Maketon, M., K. Suttichart and J. Domhom. 2009. Effective control of invasive apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck) using *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. **Malacologia.** 51: 181-190.
- Maketon, M., P.O. Coghlan and D. Hotaga. 2009. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* for controlling Mulberry whitefly *Pealius mori* Takahashi (Homoptera: Aleyrodidae) in mulberry (*Morus alba* Linn). **J Pest Sci.** 82: 251-259.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry.** 31: 420-428.
- Ministry of Public Health. 2008. **Principal characters for identifying the three genera of medical importance.** Available Source: [http://pirun.ku.ac.th/~b4806261 /yong docmed.cmu.ac.th](http://pirun.ku.ac.th/~b4806261/yongdocmed.cmu.ac.th), April 28, 2009.
- Misch, D.W. 1986. Biological control of mosquitoes. **Songklanakarin J.Sci.Technol.** 8: 359-367.
- Mishra, S.K., J.E. Keller, J.R. Miller, R.M. Heisey, M.G. Nair and A.R. Putnerm. 1987. Insecticidal properties of microbial metabolites. **Indian Industrial Microbiology** 2:267.

- Mohanty, S.S. and S. Prakash. 2007. Laboratory and field evaluation of the fungus *Chrysosporium lobatum* against the larvae of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Parasitol Res.** 102: 881-886.
- Mohanty, S.S., K. Raghavendra, U. Rai and A.P. Dash. 2008. Efficacy of female *Culex quinquefasciatus* with entomopathogenic fungus *Fusarium pallidoroseum*. **Parasitol Res.** 103: 171-174.
- Mohanty, S.S., K. Raghavendra and A.P. Dash. 2008. Induction of chymoelastase (Pr1) of *Metarhizium anisoplaie* and its role in causing mortality to mosquito larvae. **World J Microbiol & Biotechnol.** 24: 2283-2288.
- Mohanty, S.S., K. Raghavendra, P.K. Mittal and A.P. Dash. 2008. Efficacies of culture filtrates of *Metarhizium anisoplaie* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **J Industrial Microbiol & Biotechnol.** 35: 1199-1202.
- Okeke, B., F.S. Murandi, R. Steiman, J.L.B. Guyod and M. Kaouadji. 1993. Identification of Mycotoxin-Producing Fungal Strains: A Step in the Isolation of Compounds Active against Rice Fungal Diseases. **J Agric Food Chem.** 41: 1731-1735.
- Park, H.W., D.K. Bideshi, M.C. Wirth, J.J. Johnson, W.E. Walton and B.A. Rederici. 2005. Recombinant larvicidal bacterial with markedly improved efficacy against *Culex* vectors of West Nile virus. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 72: 732-738.
- Poopathai, S., K.A. Kumar, N. Arunachalam, B.K. Tyagi and V. Sekar. 2003. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* spp. *Israelensis* produced on a new potato extract culture medium. **Bioscience.** 13: 743-748.

- Priest, J.W. and R.J. Light. 1990. Application of high-performance liquid chromatography to quantification of metabolites and enzymes of the patulin pathway from *Penicillium patulum*. **J Chromatogr.** 513: 237-246.
- Priyanka, J., N. Srivastava and S. Prakash. 2001. *Chrysosporium tripicum* efficacy against *Anopheles stephensi* larvae in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association.** 17 (2): 127-130
- Puel, O., P. Galtier and I.P. Oswald. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins.** 2: 613-631.
- Riba, G., A. Keita, G.G.J. Soares and P. Ferron. 1986. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. **Journal of American Mosquito Control Association.** 2: 469-473.
- Sakchoowong, W. 1998. **Effects of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Balsoma) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) sorskin on tacak Defoliator (*Hyblaea puera* Cramer)(Lepidoptera :Noctudae).** M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.
- Scholte, E.J., B.N. Njiru, R.C. Smallegance, W. Takken. and B.G.J. Knols. 2003. Infection of adult malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malar J.** 2: 29.
- Scholte, E.J., B.G.J. Knols, R.A. Samson and W. Takken. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **J Insect Sci.** 4: 19-51.
- Scholte, E.J., K. Nghabi, J. Kihonda, W. Takken, K. Paaijmans, S. Abdulla, G.F. Killeen and B.G.J. Knols. 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. **Science.** 308: 1641-1642.

- Scholte, E.J., W. Takken and B.G.J. Knols. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Trop.** 102: 151-158.
- Seleena, P. and H.L. Lee. 1994. Insecticidal activity of a Malaysian isolate of *Aspergillus niger*. **ASEAN Journal of Science, Technology and Development.** 11 (2): 47–53.
- Silva R.O., H.H.G. Silva and C. Luz. 2004. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolates originating from soil samples of the Central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. **Revistade Patologia Tropical.** 33: 207-216.
- Soares, G.G. Jr. 1982. Pathogenesis of infection by hyphomycetous fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Dip. Culicidae). **Entomophaga.** 27: 283-300.
- Strasser, H., A. Vey and T.M. Butt. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium*, and *Beauveria* species. **Biocontrol Sci Techn.** 10: 717-735.
- Sweeney, AW. 1978. The effects of temperature on the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces*. **Australian Journal of Zoology.** 26: 47-53.
- Sweeney, A.W. 1981. Preliminary field tests of the fungus *Culicinomyces* against mosquito larvae in Australia. **Mosquito News.** 41: 470-476.
- University of Florida. 2009. **Featured Creatures.** Southern House mosquito.
Available Source: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern house mosquito.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern%20house%20mosquito.htm), March 8, 2013.
- Ustianowski, A.P., T.P. Sieu, J.N. Day. 2008. *Penicillium marneffe* infection in HIV. **Current Opinion in Infectious Diseases.** 21 (1): 31–3

- Valdez, J.G., M.A. Makuch, A.F. Ordovini, R.W. Masuelli, D.P. Overy, R.J. Piccolo. 2006. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). **Plant Pathology**. 55 (4): 583.
- Vijayan, V. and K. Balaraman. 1991. Metabolites of fungi and actinomycetes active against mosquito larvae. **Indian Journal of Medical Research**. 93: 115–117.
- Vyas, N., K. Dua, and S. Prakash. 2007. Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms. **Parasitol Res**. 101: 385-390.
- Walker, K. 2002. **A review of control methods for African malaria vectors**. In Activity Report 108 of environment Health Project. April 2002, Washington, DC.
- Wei, B.S. and F.G. Ming. 2004. **Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari; Tetranychidae) with a description of mite egg bioassay system**. Available Source : <http://www.scidirect.com>, April 30, 2008.
- Weiser, J. and V. Matha. 1988. Tolypin, a new insecticidal metabolite of fungi of the genus *Tolypocladium*. **J Invertebr Pathol**. 51: 94-96.
- WHO. 1975. **Manual on Practical Entomology in malaria II. Method and Techniques**. WHO Offset Publ, Geneva, 84-99 p.





ภาคผนวก ก
อาหารสำหรับพะวงเลี้ยงจุลินทรีย์

Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Tributyrin agar

Tributyrin	10.0	มิลลิลิตร
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Starch agar

Soluble starch	2.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Chitin Medium

Colloidal chitin	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaNO ₃	2.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	trace	
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Liquid tributyrin medium

Tributyrin	10.0	มิลลิลิตร
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Skimmed milk agar

Skimmed milk	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	trace	
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Liquid starch medium

Soluble starch	10.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	กรัม
Tryptone	2.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
CaCl_2	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Starch casein broth

Soluble starch	10.0	กรัม
Casein	3.0	กรัม
KNO_3	2.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
CaCl_2	0.02	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Liquid chitin Medium

Colloidal chitin	10.0	กรัม
K_2HPO_4	0.87	กรัม
KH_2PO_4	0.68	กรัม
NH_4NO_3	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร



การคำนวณความเข้มข้นเชื้อราเป็นไปตามสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

M1 คือ ความเข้มข้นเชื้อราเป็นสต็อก(Stock) ความเข้มข้น 1×10^9 conidia/ml.

V1 คือ ปริมาตรเชื้อรา (ml.) ที่ต้องการทดสอบ

M2 คือ ความเข้มข้นที่ต้องการ เช่น 1×10^6 conidia/ml.

V2 คือ ปริมาตรน้ำเริ่มต้น dilution ความเข้มข้น (ml.)

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

$$(1 \times 10^9 \text{ conidia/ml.}) \times V_1 = (1 \times 10^6 \text{ conidia/ml.}) \times 50 \text{ ml.}$$

$$V_1 = (1 \times 10^6 \text{ conidia/ml.}) \times 50 \text{ ml.}$$

$$= 5 \times 10^7 / 1 \times 10^9$$

$$\text{ปริมาตรของเชื้อราในน้ำ 1 มิลลิลิตร} = 5 \times 10^{-2}$$

$$\text{ดังนั้นปริมาตรเชื้อราที่นำมาใส่แต่ละถ้วยเท่ากับ} = 0.05 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$\text{และใส่น้ำเท่ากับ (50 มิลลิลิตร - 0.05 มิลลิลิตร)} = 49.95 \text{ มิลลิลิตร}$$



ภาคผนวก ค
ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ๑1 ตารางแสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อราชนิดต่างๆ ใน 1 สัปดาห์

<i>G. virens</i>	control (น้ำกลั่น)			ความเข้มข้น 1×10^6 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3
วันที่ 4	0	0	0	1	2	2	1	1	2	1	2	2
วันที่ 5	0	0	0	1	0	2	1	2	2	2	1	0
วันที่ 6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	4	4	4	4	5	5	5	5	5
% การตาย	0	0	0	13.33	13.33	13.33	13.33	16.66	16.66	16.66	16.66	16.66
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			13.33			15.55			16.66	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

<i>I. fumosorosea</i>	control (น้ำกลั่น)			ความเข้มข้น 1×10^6 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
วันที่ 5	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1
วันที่ 6	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
วันที่ 7	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	2	2	2	3	3	3	3	3	3
% การตาย	0	0	0	6.66	6.66	6.66	10	10	10	10	10	10
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			6.66			10			10	

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

<i>A. flavus</i> 001	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	2
วันที่ 3	0	0	0	0	1	1	1	1	3	11	11	9
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	2	3	2	10	15	11
วันที่ 5	0	0	0	0	1	2	1	0	0	5	3	8
วันที่ 6	0	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	3	4	4	5	6	6	29	30	30
% การตาย	0	0	0	10	13.33	13.33	16.66	20	20	96.66	100	100
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			12.22			18.88			98.88		

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>L. muscarium</i>	control (น้ำกลั่น)			ความเข้มข้น 1×10^6 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
วันที่ 3	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	2	2	1	2	1	2
วันที่ 5	0	0	0	1	0	3	1	0	1	0	0	2
วันที่ 6	0	0	0	1	3	0	1	3	3	1	1	1
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	3	2
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	3	4	3	5	5	7	10	6	8
% การตาย	0	0	0	10	13.33	10	6.66	16.66	23.33	33.33	20	26.66
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			11.11			15.55			26.66	

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

<i>H. citrifomis</i>	control (น้ำกลั่น)			ความเข้มข้น 1×10^6 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.)			ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
วันที่ 3	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	0	2
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	2	1
วันที่ 5	0	0	0	1	0	2	0	2	1	0	0	3
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	2	0
วันที่ 7	0	0	0	3	3	2	0	0	2	0	1	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	5	4	5	5	6	6	6	6	7
% การตาย	0	0	0	6.66	13.33	16.66	13.33	20	20	20	20	23.33
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			12.21			17.77			21.11	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>N. rileyi</i>	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/mL)			(conidia/mL)			(conidia/mL)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	1	1
% การตาย	0	0	0	0	3.33	0	3.33	0	3.33	6.66	3.33	3.33
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			1.11			2.22			4.44	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 076	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	3
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	4	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	2	3	2	5	6	6
% การตาย	0	0	0	3.33	3.33	0	6.66	10	6.66	13.33	20	20
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			2.22			7.77			17.77	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 053	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	5	4
วันที่ 4	0	0	0	0	1	0	3	2	1	9	13	13
วันที่ 5	0	0	0	1	0	0	1	2	1	4	5	4
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	3	3	3	12	6	8
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	8	7	8	30	30	29
% การตาย	0	0	0	3.33	3.33	0	6.66	23.33	26.66	100	100	96.66
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			2.22			18.88			98.88	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 021	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2	1
วันที่ 5	0	0	0	1	2	2	1	0	1	1	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ดูจน้ตายทั้งหมด	0	0	0	1	2	2	3	3	3	3	3	3
% การตาย	0	0	0	3.33	6.66	6.66	10	10	10	10	10	10
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			5.55			10			10	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 036	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
วันที่ 5	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ดูจน้ตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	0	2	2	3	3	3
% การตาย	0	0	0	3.33	3.33	0	0	6.66	6.66	10	10	10
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			2.22			4.44			10	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>M. anisopliae</i> 048	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	3
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	1	3	3	3	2	3
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	2
วันที่ 6	0	0	0	0	1	2	0	0	0	5	4	3
วันที่ 7	0	0	0	2	1	0	2	0	0	3	3	3
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	2	2	2	2	2	2	17	17	18
% การตาย	0	0	0	6.66	6.66	6.66	6.66	6.66	6.66	56.66	56.66	60
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			6.66			6.66			57.77	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>M. anisopliae</i> 080	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
วันที่ 3	0	0	0	0	1	1	1	2	2	1	1	0
วันที่ 4	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2
วันที่ 5	0	0	0	0	1	0	2	0	1	5	2	2
วันที่ 6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
ดูจน้ตายทั้งหมด	0	0	0	2	2	2	3	3	4	8	5	6
% การตาย	0	0	0	6.66	6.66	6.66	10	10	13.33	26.66	16.66	20
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			6.66			11.11			21.1	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>M. anisopliae</i> 006	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	2	1
วันที่ 4	0	0	0	2	1	1	0	1	1	3	2	2
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	3
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	2	1	1	4	4	3	7	5	6
% การตาย	0	0	0	6.66	3.33	3.33	13.33	13.33	10	23.33	16.66	20
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			4.44			12.22			19.99	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 021	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
วันที่ 3	0	0	0	1	2	2	0	0	3	1	4	2
วันที่ 4	0	0	0	2	1	2	6	4	3	5	3	8
วันที่ 5	0	0	0	0	1	0	5	4	2	0	0	2
วันที่ 6	0	0	0	3	2	4	4	5	5	7	8	6
วันที่ 7	0	0	0	1	0	2	6	7	7	9	8	4
ดูน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	7	6	10	22	11	20	22	23	23
% การตาย	0	0	0	23.33	20	33.33	73.33	36.66	66.66	73.33	76.66	76.66
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			25.55			58.88			75.55	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 095	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
วันที่ 3	0	0	0	1	2	2	0	0	2	0	0	0
วันที่ 4	0	0	0	2	1	2	3	8	5	5	10	7
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	1	1
วันที่ 6	0	0	0	3	3	4	0	0	1	0	0	1
วันที่ 7	0	0	0	1	0	2	0	0	3	0	0	4
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	7	6	10	7	10	12	7	12	14
% การตาย	0	0	0	23.33	20	33.33	23.33	33.33	40	23.33	40	46.66
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			25.55			32.22			36.66	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 055	control			ความเข้มข้น 1×10^6			ความเข้มข้น 1×10^7			ความเข้มข้น 1×10^8		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2	1
วันที่ 3	0	0	0	1	1	0	1	0	4	3	1	5
วันที่ 4	0	0	0	0	1	6	12	8	7	6	11	10
วันที่ 5	0	0	0	2	3	1	2	0	7	1	1	0
วันที่ 6	0	0	0	3	1	1	2	2	0	4	3	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	7	1	1
ดูน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	6	6	8	17	17	18	21	19	17
% การตาย	0	0	0	20	20	26.66	56.66	56.66	60	70	63.33	56.66
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			22.22			57.77			63.33	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 553	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	1	0	1	0	2	2	3	4	2
วันที่ 4	0	0	0	0	1	0	1	3	2	3	3	3
วันที่ 5	0	0	0	0	2	3	2	4	4	6	5	5
วันที่ 6	0	0	0	2	2	1	3	2	5	3	4	6
วันที่ 7	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	3	6	5	9	11	15	16	16	16
% การตาย	0	0	0	10	20	16.66	30	36.66	50	37.77	37.77	37.77
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			15.55			38.88			37.77	

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 2662	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	0
ดูนก้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	1	1	2	0	2	1	1	1
% การตาย	0	0	0	0	3.33	3.33	6.66	0	6.66	3.33	3.33	3.33
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			2.22			4.44			3.33	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>Penicillium</i> sp.	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
ดูน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	1
% การตาย	0	0	0	3.33	3.33	0	3.33	3.33	0	6.66	6.66	3.33
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			2.22			2.22			5.55	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

<i>P. citrinum</i> CM-010	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	29	30	30	30	30	30	30	30	30
วันที่ 2	0	0	0	1	—	—	—	—	—	—	—	—
วันที่ 3	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
วันที่ 4	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
วันที่ 5	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
วันที่ 6	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
วันที่ 7	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	30	30	30	30	30	30	30	30	30
% การตาย	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			100			100			100		

ตารางผนวกที่ ๒2 ตารางแสดงอัตราการตายของลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อราชนิดต่างๆ ใน 1 สัปดาห์

<i>G. virens</i>	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
วันที่ 4	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	1	1	2	1	2	1	1
% การตาย	0	0	0	1	1	1	1	2	1	2	1	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			1			1.33			1.33	

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>I. fumosorosea</i>	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
วันที่ 5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	1	0	1	0	2	2	2	1
% การตาย	0	0	0	0	1	0	1	0	2	2	2	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0.33			1			1.66	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>A. flavus</i> 001	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	5
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	3	2	1	7	5	3
วันที่ 3	0	0	0	0	1	1	3	4	4	5	9	8
วันที่ 4	0	0	0	0	0	1	2	3	3	6	4	6
วันที่ 5	0	0	0	1	1	0	5	7	5	13	10	9
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	5	2	2	3	3	5
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	2	2	19	20	18	36	34	38
% การตาย	0	0	0	1	2	2	19	20	18	36	34	38
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			1.66			19			36	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>L. muscarium</i>	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0
% การตาย	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			0.33			0.66			0.66		

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>H. citrifomis</i>	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% การตาย	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0			2			1	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>N. rileyi</i>	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% การตาย	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0			0.33			0.33	

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 076	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0
วันที่ 5	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	2	2	2	2	2	3
% การตาย	0	0	0	1	1	0	2	2	2	2	2	3
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0.66			2			2.33	

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 053	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
วันที่ 4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	3	0
% การตาย	0	0	0	0	1	0	0	2	1	3	3	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0.33			1			3.33	

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 021	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	0	1	2	1	3	3	4	2
% การตาย	0	0	0	0	0	1	2	1	3	3	4	2
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0.33			2			3	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>P. lilacinus</i> 036	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	1
% การตาย	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0			1.33			1.66	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>M. anisopliae</i> 048	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	5	3	4
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4	6	3
วันที่ 3	0	0	0	0	1	0	0	2	3	5	4	3
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	2	3	1	6	5	6
วันที่ 5	0	0	0	0	0	1	3	0	2	3	9	7
วันที่ 6	0	0	0	1	1	0	1	2	4	2	3	1
วันที่ 7	0	0	0	0	1	0	2	3	3	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	2	3	1	10	13	17	25	30	24
% การตาย	0	0	0	2	3	1	10	13	17	25	30	24
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			2			10			26.3	

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>M. anisopliae</i> 080	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	2	1
วันที่ 3	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	0	2	0	2	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	3
วันที่ 6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	1	2
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	2	1	5	4	1	8	7	9
% การตาย	0	0	0	1	2	1	5	4	1	8	7	9
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			1.33			3.33			8		

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>M. anisopliae</i> 006	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2
วันที่ 3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	3	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2	2
วันที่ 6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	1
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	3	1	4	2	1	9	7	6
% การตาย	0	0	0	0	3	1	4	2	1	9	7	6
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			1.33			2.33			7.3		

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 021	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1
วันที่ 3	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	2	0
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	3
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	2	3	3	2	2	4
% การตาย	0	0	0	1	1	0	2	3	3	2	2	4
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0.66			2.66			2.66	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 095	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	1
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	1
วันที่ 4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1	3
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	0	0	2	3	3	6	8	7
% การตาย	0	0	0	1	0	0	2	3	3	6	8	7
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			0.33			2.66			7		

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 055	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	1
วันที่ 3	0	0	0	1	0	0	1	2	0	2	1	1
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
วันที่ 5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	1
วันที่ 6	0	0	0	1	0	1	1	1	0	2	1	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	2	1	1	2	3	4	8	6	5
% การตาย	0	0	0	2	1	1	2	3	4	8	6	5
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			1.33			3.33			6.3		

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 553	control			ความเข้มข้น 1×10^6			ความเข้มข้น 1×10^7			ความเข้มข้น 1×10^8		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
วันที่ทดสอบ	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	2
วันที่ 3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	1	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
วันที่ 5	0	0	0	0	0	1	2	2	0	1	1	1
วันที่ 6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	1	3	4	2	6	5	5
% การตาย	0	0	0	1	1	1	3	4	2	6	5	5
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			1			3			5.3	

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>B. bassiana</i> 2662	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
วันที่ 3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	1
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	0	2	3	2	2	5	3	4
% การตาย	0	0	0	0	0	2	3	2	2	5	3	4
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			0.66			2.3			4		

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

<i>Penicillium</i> sp.	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
วันที่ 3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	2	0
วันที่ 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2	3	1
% การตาย	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2	3	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย		0			0.33			0.33			2	

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

<i>P. citrinum</i> CM-010	control			ความเข้มข้น 1x10 ⁶			ความเข้มข้น 1x10 ⁷			ความเข้มข้น 1x10 ⁸		
	(น้ำกลั่น)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)			(conidia/ml.)		
วันที่ทดสอบ	จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ			จำนวนซ้ำ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	1	1
วันที่ 4	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
วันที่ 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
วันที่ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 สัปดาห์	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	2	0	2	0	2	2	1	1
% การตาย	0	0	0	0	2	0	2	0	2	2	1	1
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0			0.66			1.33			1.33		

ตารางผนวกที่ 3 ตารางแสดงอัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญจำนวน 100 ตัว ที่ทดสอบเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 เปรียบเทียบกับ Bti. ในเรือนทดลอง

ระยะเวลาที่ทดสอบ	control (น้ำกลั่น)				ความเข้มข้น 1x10 ⁴ conidia/ml.				ความเข้มข้น 1x10 ⁵ conidia/ml.				ความเข้มข้น 1x10 ⁶ conidia/ml.				Bti.			
	จำนวนซ้ำ				จำนวนซ้ำ				จำนวนซ้ำ				จำนวนซ้ำ				จำนวนซ้ำ			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2 ชั่วโมง	0	0	0	0	0	0	0	0	28	31	33	26	100	100	100	100	0	0	0	0
6 ชั่วโมง	0	0	0	0	0	0	0	0	14	16	11	19	0	0	0	0	0	0	0	0
12 ชั่วโมง	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 ชั่วโมง	0	0	0	0	2	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100
จำนวนลูกน้ำตายทั้งหมด	0	0	0	0	2	0	3	1	42	47	44	45	100	100	100	100	100	100	100	100
% การตาย	0	0	0	0	2	0	3	1	42	47	44	45	100	100	100	100	100	100	100	100
ค่าเฉลี่ย% การตาย	0				1.5				44.5				100				100			

ตารางผนวกที่ ๑๔ ตารางแสดงอัตราการรอดตายลูกน้ำขุ่นรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ในภาคสนามเป็นเวลา 1 สัปดาห์

วันที่ ทดสอบ	control larva stage 1				ทดสอบเชื้อรา larva stage 1				control larva stage 3				ทดสอบเชื้อรา larva stage 3			
	ซ้ำ				ซ้ำ				ซ้ำ				ซ้ำ			
	1	2	3	% รอดตาย	1	2	3	% รอดตาย	1	2	3	% รอดตาย	1	2	3	% รอดตาย
วันที่ 1	94	95	95	94.66	81	83	70	78	98	97	98	97.66	92	89	86	89
วันที่ 2	92	90	91	91	33	25	31	29.66	95	96	97	96	81	83	70	78
วันที่ 3	93	91	90	91.33	26	13	20	19.66	93	96	96	95	37	21	23	27
วันที่ 5	80	79	82	80.33	10	11	9	10	84	86	85	84	15	16	13	14.66
1 สัปดาห์	77	70	75	74	3	0	2	1.66	81	76	77	78	6	9	11	8.66

ตารางผนวกที่ ๕ ตารางแสดงอัตราการตายลูกน้ำยุงรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น , methanol และ patulin

sample	ความเข้มข้น	จำนวนซ้ำ			ค่าเฉลี่ย % mortality
		1	2	3	
control (น้ำกลั่น)	-	0	0	0	0
control (น้ำกลั่น + methanol)	1 ppm.	2	4	3	6
	10 ppm	6	5	5	11
	100 ppm	11	10	9	20
patulin + methanol	1 ppm.	30	28	25	55
	10 ppm	45	41	44	87
	100 ppm	50	50	50	100

ตารางผนวกที่ ๑๖ ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^6 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27357.267	20	1367.863	143.729	.000
Within Groups	399.711	42	9.517		
Total	27756.978	62			

ตารางผนวกที่ ๑๗ ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36133.053	20	1806.653	46.557	.000
Within Groups	1629.815	42	38.805		
Total	37762.868	62			

ตารางผนวกที่ ๘ ตาราง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญ 30 ตัว ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	67745.151	20	3387.258	228.615	.000
Within Groups	622.289	42	14.816		
Total	68367.440	62			

ตารางผนวกที่ ๙ ตาราง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^7 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.317	20	1.016	2.207	.015
Within Groups	19.333	42	.460		
Total	39.651	62			

ตารางผนวกที่ ค10 ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^8 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1074.984	20	53.749	41.805	.000
Within Groups	54.000	42	1.286		
Total	1128.984	62			

ตารางผนวกที่ ค11 ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา 20 ชนิดที่ความเข้มข้น 1×10^9 (conidia/ml.) กับลูกน้ำยุงรำคาญตัวเต็มวัย 100 ตัว ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4767.270	20	238.363	165.021	.000
Within Groups	60.667	42	1.444		
Total	4827.937	62			

ตารางผนวกที่ ค12 ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 กับลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti.
ในเรือนทดลองที่เวลา 2 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30064.800	4	7516.200	3.888E3	.000
Within Groups	29.000	15	1.933		
Total	30093.800	19			

ตารางผนวกที่ ค13 ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 กับลูกน้ำยุงรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti.
ในเรือนทดลองที่เวลา 6 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31216.800	4	7804.200	9.005E3	.000
Within Groups	13.000	15	.867		
Total	31229.800	19			

ตารางผนวกที่ ค14 ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 กับลูกน้ำขุ่ยรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti.
ในเรือนทดลองที่เวลา 12 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31216.800	4	7804.200	9.005E3	.000
Within Groups	13.000	15	.867		
Total	31229.800	19			

ตารางผนวกที่ ค15 ตารางแสดง One way ANOVA เมื่อทดสอบเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 กับลูกน้ำขุ่ยรำคาญ 100 ตัวที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ Bti.
ในเรือนทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39517.200	4	9879.300	8.233E3	.000
Within Groups	18.000	15	1.200		
Total	39535.200	19			

ตารางผนวกที่ 16 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำขุ่นรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM-010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 1 วัน

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
trt	Hypothesis	481.333	1	481.333	21.080	.010
	Error	91.333	4	22.833 ^a		
age	Hypothesis	147.000	1	147.000	22.615	.009
	Error	26.000	4	6.500 ^b		
trt * age	Hypothesis	48.000	1	48.000	7.385	.053
	Error	26.000	4	6.500 ^b		
rep(trt)	Hypothesis	91.333	4	22.833	3.513	.126
	Error	26.000	4	6.500 ^b		
age * rep(trt)	Hypothesis	26.000	4	6.500		
	Error	.000	0			

ตารางผนวกที่ ๑17 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำขุ่ยรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM- 010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 2 วัน

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
trt	Hypothesis	4720.333	1	4720.333	435.723	.000
	Error	43.333	4	10.833 ^a		
age	Hypothesis	2133.333	1	2133.333	91.429	.001
	Error	93.333	4	23.333 ^b		
trt * age	Hypothesis	1408.333	1	1408.333	60.357	.001
	Error	93.333	4	23.333 ^b		
rep(trt)	Hypothesis	43.333	4	10.833	.464	.762
	Error	93.333	4	23.333 ^b		
age * rep(trt)	Hypothesis	93.333	4	23.333		
	Error	.000	0			

ตารางผนวกที่ 18 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำขุ่ยรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM- 010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 5 วัน

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
trt	Hypothesis	14840.333	1	14840.333	6.849E3	.000
	Error	8.667	4	2.167 ^a		
age	Hypothesis	65.333	1	65.333	56.000	.002
	Error	4.667	4	1.167 ^b		
trt * age	Hypothesis	.000	1	.000	.000	1.000
	Error	4.667	4	1.167 ^b		
rep(trt)	Hypothesis	8.667	4	2.167	1.857	.282
	Error	4.667	4	1.167 ^b		
age * rep(trt)	Hypothesis	4.667	4	1.167		
	Error	.000	0			

ตารางผนวกที่ 19 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการรอดตาย (% survival) ลูกน้ำขุ่ยรำคาญ 100 ตัว ที่ทดสอบด้วยเชื้อรา *P. citrinum* CM- 010 ที่ความเข้มข้น 1×10^{11} conidia/ml. ที่เวลา 7 วัน

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
trt	Hypothesis	15052.083	1	15052.083	1.457E3	.000
	Error	41.333	4	10.333 ^a		
age	Hypothesis	90.750	1	90.750	22.688	.009
	Error	16.000	4	4.000 ^b		
trt * age	Hypothesis	6.750	1	6.750	1.687	.264
	Error	16.000	4	4.000 ^b		
rep(trt)	Hypothesis	41.333	4	10.333	2.583	.190
	Error	16.000	4	4.000 ^b		
age * rep(trt)	Hypothesis	16.000	4	4.000		
	Error	.000	0			

ตารางผนวกที่ ค20 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการตายลูกน้ำขุ้งรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น , methanol และ patulin ที่ความเข้มข้น 1 ppm.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1382.889	2	691.444	282.864	.000
Within Groups	14.667	6	2.444		
Total	1397.556	8			

ตารางผนวกที่ ค21 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการตายลูกน้ำขุ้งรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น, methanol และ patulin ที่ความเข้มข้น 10 ppm.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3350.222	2	1675.111	1.077E3	.000
Within Groups	9.333	6	1.556		
Total	3359.556	8			

ตารางผนวกที่ ค22 ตาราง One way ANOVA แสดงอัตราการตายลูกน้ำขุ้่งรำคาญ 50 ตัว เมื่อทดสอบด้วยน้ำกลั่น, methanol และ patulin ที่ความเข้มข้น 100 ppm.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4200.000	2	2100.000	6.300E3	.000
Within Groups	2.000	6	.333		
Total	4202.000	8			

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวอชิรญา เกษรคุปต์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	20 ธันวาคม 2527
สถานที่เกิด	พิจิตร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-