วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 30 ฉบับเพิ่มเติม 1 พฤษภาคม - มิถุนายน 2564

Journal of Health Science
Vol. 30 Supplement 1, May - June 2021

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original article*

การพัฒนาหัวเชื้อ B-Soy powder จากกากถั่วเหลือง เพื่อใช้ผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

นิตยา เมธาวณิชพงศ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
นันทพร ผลสุวรรณ์ วท.บ. (จุลชีววิทยา)
พรชัย วิริยะศรานนท์ วท.บ. (จุลชีววิทยา)
อุรุญากร จันทร์แสง ปร.ด. (ชีววิทยา)
สุนัยนา สท้านไตรภพ ปร.ด. (กีฏวิทยา)
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี

วันรับ: 16 ก.ย. 2563
วันแก้ไข: 2 เม.ย. 2564
วันตอบรับ: 12 เม.ย. 2564

บทคัดย่อ จุลินทรีย์ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* หรือ Bti เป็นแบคทีเรียที่ได้จากแหล่งดินธรรมชาติ สามารถสร้างผลึกโปรตีนที่ออกฤทธิ์ทำให้ลูกน้ำยุงตายได้ Bti ถูกนำไปใช้ในการควบคุมกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus* Say) พาหะนำโรคเท้าช้าง แต่กระบวนการผลิตแบคทีเรียชนิดนี้มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีราคาแพง การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาหัวเชื้อ Bti สำหรับใช้ผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญโดยใช้กากถั่วเหลืองที่เหลือทิ้งจากการทำน้ำเต้าหู้เป็นอาหารเพาะเลี้ยง นำตะกอนเชื้อ Bti ที่เพาะเลี้ยงไปผ่านการทดสอบการอบแห้งที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าตะกอนเชื้ออบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้หัวเชื้อ Bti หรือ B-Soy powder มีคุณภาพดีที่สุด นำ B-Soy powder มาทดสอบการเก็บรักษาในถุงอลูมิเนียมฟอยด์โดยเปรียบเทียบการปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศและแบบไม่สุญญากาศ หลังการเก็บ 3 เดือน นำ B-Soy powder ไปทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญพบว่าได้ค่า LC_{50} เท่ากับ 0.914 และ 1.012 mg/l ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าเริ่มต้นเล็กน้อย (LC_{50}=0.879 mg/l) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการปิดผนึกทั้งสองแบบนี้ในระยะเวลา 3 เดือนสามารถรักษาคุณภาพของหัวเชื้อ B-Soy powder ได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนการเก็บเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า B-Soy powder มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำลดลง 3-5 เท่า จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำ สำหรับการผลิตสารชีวภาพควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญในถังพลาสติกปริมาณ 5 ลิตร โดยเปรียบเทียบการใช้หัวเชื้อ B-Soy powder ที่ปริมาณ 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัม พบว่าการใช้ B-Soy powder อย่างน้อย 10 กรัม ให้สารชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญ และการคำนวณต้นทุนพบว่าสารชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อ B-Soy powder มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าสารชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อ Bti บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐานถึง 29 เท่า ดังนั้น B-Soy powder จึงมีต้นทุนต่ำและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยควบคุมและกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ นอกจากนี้ได้มีการถ่ายทอดวิธีการผลิตสารชีวภาพให้กับอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านเพื่อให้ชุมชนร่วมกันกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญด้วยตนเอง

คำสำคัญ: **จุลินทรีย์ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; ยุงรำคาญ; กากถั่วเหลือง; สารชีวภาพกำจัดลูกน้ำ**

บทนำ

ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* Say สามารถพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะประเทศในเขตร้อนชื้น เนื่องจากมีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการแพร่ขยายพันธุ์ของยุงชนิดนี้ รวมถึงประเทศไทยที่สามารถพบได้ทั้งในเขตเมือง โดยเฉพาะชุมชนแออัดและชนบท ยุง *Cx. quinquefasciatus* มักสร้างความรำคาญให้กับคนและสัตว์เลี้ยงโดยเฉพาะในเวลากลางคืน ชอบวางไข่ในน้ำเน่าเสีย หรือในท่อระบายน้ำเสีย ยุงรำคาญเป็นพาหะนำโรคเท้าช้างในคน โรคมาลาเรียในนก และหนอนพยาธิหัวใจในสุนัข ชอบกินเลือดคนและสัตว์ เช่น สุนัข ไก่ และแมว ตามลำดับ[1] นอกจากนี้มีรายงานการระบาดของเชื้อไวรัส Tembusu (TMUV) ในฟาร์มเป็ดและไก่ทำให้เป็ดไก่ผลิตไข่ลดลงร่วมกับมีอาการทางระบบประสาท เชื้อชนิดนี้มียุงรำคาญ (*Culex* spp.) เป็นพาหะ[2] ในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อ TMUV จากยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ที่จับได้จากบริเวณใกล้ ๆ กับฟาร์มไก่ในอำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี[3] และพบเชื้อ TMUV ในยุงรำคาญ *Cx. tritaeniorynchus* จากจังหวัดเชียงใหม่[4] เชื้อไวรัสชนิดนี้มีโอกาสแพร่กระจายจากเป็ดไก่ไปสู่คนโดยผ่านการกัดของยุงรำคาญตัวเมียที่มีเชื้อ[3,5]

การควบคุมลูกน้ำยุงโดยการใช้สารชีวภาพ (bioinsecticide) ที่มีแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) เป็นที่นิยมในหลายประเทศ[6] แบคทีเรีย Bti สามารถผลิตผลึกโปรตีนสำคัญ 4 ชนิด คือ Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa และ Cyt1Aa ที่มีความจำเพาะในการเกิดพิษต่อยุง แมลงริ้นดำ และริ้นน้ำจืด[7] เมื่อลูกน้ำแมลงกินแบคทีเรียเข้าไป ผลึกโปรตีนจะถูกย่อยภายในกระเพาะอาหารของลูกน้ำทำให้เกิดเป็นพิษต่อกระเพาะของลูกน้ำและทำให้ลูกน้ำตายในที่สุด แต่แบคทีเรียชนิดนี้ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[8] สารชีวภาพ Bti จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้เพื่อควบคุมลูกน้ำยุงชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น ยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออกและไข้ซิกา ยุงก้นปล่องพาหะนำโรคมาลาเรีย และยุงรำคาญพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบ และโรคเท้าช้าง[9] นอกจากนี้การใช้สารชีวภาพ Bti ยังเป็นการช่วยลดการใช้สารเคมีในการกำจัดยุง และมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาของ Da Silca Carvalho K และคณะ[10] และ Tetreau G และคณะ[11] ถึงการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อ Bti ในยุงชนิดต่าง ๆ พบว่ายุงในพื้นที่ที่มีการใช้ Bti ในการควบคุมลูกน้ำมาเป็นระยะเวลาหลายปี ลูกน้ำยุงยังไม่มีการสร้างความต้านทานต่อ Bti ในขณะที่การใช้สารเคมีในการควบคุมยุงทั้งในระยะลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัย พบมีรายงานยุงในหลายพื้นที่ของประเทศไทยมีการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุม เช่น ยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จากชุมชนบ้านสวน จังหวัดนนทบุรีมีความต้านทานในระดับสูงต่อสาร deltamethrin, permethrin, fenitrothion และ propoxur และยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) มีความต้านทานต่อสาร permethrin และต้านทานในระดับปานกลางต่อสาร deltamethrin[12] Sirisopa P และคณะ[13] พบว่ายุงลายจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร พระนครศรีอยุธยา อุตรดิตถ์ มุกดาหาร สกลนคร พัทลุง และชุมพรมีความต้านทานสูงต่อสาร bifenthrin, permethrin และ deltamethrin สำหรับทรายเคลือบสารเคมี temephos ที่นิยมใช้ควบคุมลูกน้ำยุงลาย พบว่าลูกน้ำยุงลายในหลายพื้นที่มีความต้านทานต่อสารเคมีชนิดนี้เช่นกัน[14] ดังนั้น การเปลี่ยนมาใช้สารชีวภาพ Bti จึงเป็นการช่วยลดการสร้างความต้านทานของยุงต่อสารเคมี ช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีในการกำจัดยุง และช่วยลดปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุง Bti ที่วางจำหน่ายในประเทศไทยมีราคาค่อนข้างสูงและหากต้องการผลิตสารชีวภาพขึ้นใช้เอง หัวเชื้อ Bti ที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศและมีราคาแพง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาหัวเชื้อ Bti จากวัตถุดิบเหลือทิ้ง เช่น กากถั่วเหลืองที่เหลือทิ้งจากการทำน้ำเต้าหู้ กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนและมีสารอาหารที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ไปใช้ในการผลิตสารชีวภาพเพื่อกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญต่อไป

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) ในการใช้กากถั่วเหลืองเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Bti เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ

1. การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder

- สายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่นจากจังหวัดแพร่[15] ที่ค้นพบโดยฝ่ายศึกษาควบคุมแมลงทางชีววิธี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญและยุงชนิดอื่น ๆ รวมทั้งได้ผ่านการทดสอบด้วยวิธี subchronic toxicity test จากห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ว่ามีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลอง[16]

- กล้าเชื้อ Bti

เตรียมกล้าเชื้อ Bti ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูปที่มีสารอาหารครบถ้วน เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทุกชนิด นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 32°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดความขุ่นให้มีค่า OD600=1 จะได้เชื้อที่อยู่ในช่วง log phase ที่มีความแข็งแรงว่องไว (active) เหมาะสำหรับใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่นเพื่อให้มีการสร้างสปอร์และผลึกโปรตีน (toxin protein) ที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง

2. การคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder

2.1 สูตรอาหารที่เปรียบเทียบระหว่างการใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านและไม่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ

กากถั่วเหลืองที่ได้รับมาได้ผ่านการต้มในขั้นตอนการทำน้ำเต้าหู้แล้วแต่ความร้อนที่ใช้อาจจะไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อทุกชนิด เมื่อนำมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Bti อาจมีเชื้ออื่น ๆ เจริญเติบโตขึ้นแข่งขันกับเชื้อ Bti ทำให้เชื้อ Bti เจริญเติบโตได้น้อย จึงมีการนำมาต้มอีกครั้งหนึ่ง โดยนำกากถั่วเหลือง 500 กรัม เติมน้ำสะอาด 700 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นคั้นน้ำออกและนำกากมาใช้งาน โดยเปรียบเทียบอาหาร 2 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 กากถั่วเหลืองไม่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 กากถั่วเหลืองผ่านการต้มฆ่าเชื้อ 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร

2.2 สูตรอาหารที่เปรียบเทียบปริมาณกากถั่วเหลือง (ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้ว)

- สูตรที่ 1 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 2 กากถั่วเหลือง 20 กรัม น้ำสะอาด 80 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 3 กากถั่วเหลือง 30 กรัม น้ำสะอาด 70 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร

2.3 สูตรอาหารที่เปรียบเทียบปริมาณกล้าเชื้อ Bti

- สูตรที่ 1 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 2 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 5 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 3 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 10 มิลลิลิตร

2.4 สูตรอาหารที่เปรียบเทียบประเภทของน้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร

น้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญ น้ำแต่ละประเภทมีแร่ธาตุและสารอาหารไม่เท่ากัน น้ำมะพร้าวแก่มีส่วนประกอบหลักคือ น้ำตาลชนิดละลายน้ำได้ (soluble sugar) โปรตีน เกลือแร่ และวิตามิน[17] ส่วนน้ำเกลือประกอบด้วย sodium และ chloride จึงมีการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้น้ำประเภทต่าง ๆ ดังนี้

- สูตรที่ 1 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำสะอาด 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร

- สูตรที่ 2 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำมะพร้าวแก่ 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 3 กากถั่วเหลือง 10 กรัม น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 90 มิลลิลิตร กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร

นำอาหารแต่ละสูตรไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์ Bti ด้วยวิธี spread plate method[18] นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สรุปค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ Bti (หน่วย cfu/ml) ในอาหารแต่ละสูตร และคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder

3. การผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder

เพาะเลี้ยงเชื้อ Bti ในสูตรอาหารที่ผ่านการคัดเลือก นำอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบความเร็วต่ำ (low speed centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเชื้อไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60°C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อ B-Soy powder วัดความชื้นด้วยเครื่องวัดความชื้นยี่ห้อ Sartorius รุ่น MA40 หากมีความชื้นสูงกว่าร้อยละ 15.0 ให้นำไปอบอีกครั้งจนกว่าความชื้นจะต่ำกว่าร้อยละ 15.0 บดตะกอนแห้งให้เป็นผง และนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับลูกน้ำยุงรำคาญ

4. การเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาหัวเชื้อ B-Soy powder

นำหัวเชื้อ B-Soy powder บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ ขนาด 3 x 4 นิ้ว และปิดผนึก 2 แบบ คือ แบบสุญญากาศและไม่สุญญากาศ (ภาพที่ 1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (23-28°C) และนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับลูกน้ำยุงรำคาญ หลังการเก็บรักษาหัวเชื้อ B-Soy powder ในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ครบ 3 เดือน และ 6 เดือน

ภาพที่ 1 การเก็บหัวเชื้อในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่มีการปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศและไม่สุญญากาศ

5. การศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

เตรียมถังพลาสติกขนาด 7 ลิตร จำนวน 5 ถัง ใส่กากถั่วเหลืองถังละ 500 กรัม ใส่หัวเชื้อ B-Soy powder ใน 5 อัตรา คือ 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัม/ถัง (ภาพที่ 2) เติมน้ำสะอาด 5 ลิตร คนให้เข้ากัน ใส่หัวทรายขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว จำนวน 2 หัว/ถัง เปิดเครื่องปั๊มลมเพื่อเติมอากาศให้กับเชื้อ (ภาพที่ 3) ปิดฝาถัง บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสารชีวภาพมาทดสอบประสิทธิภาพกับลูกน้ำยุงรำคาญ ดำเนินการทดสอบ 4 ซ้ำ พร้อมชุดควบคุม (control)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของหัวเชื้อ B-Soy powder และสารชีวภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

6.1 ลูกน้ำทดสอบ

ลูกน้ำยุงรำคาญ (Culex quinquefasciatus) สายพันธุ์มาตรฐานที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากฝ่ายพิพิธภัณฑ์แมลงและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข คัดเลือกลูกน้ำยุงรำคาญระยะ 4 ตอนต้น ที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง เคลื่อนที่ได้คล่องแคล่วว่องไวมาใช้ในการทดสอบ

6.2 วิธีการทดสอบ

ทดสอบตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก[19] ขั้นแรกนำหัวเชื้อ B-Soy powder มาเตรียมเป็นสารแขวนลอย (stock suspension) โดยใช้หัวเชื้อ 1 กรัมต่อน้ำกรองฆ่าเชื้อ 99 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสารชีวภาพให้นำมาทดสอบได้เลย ในเบื้องต้นเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วงกว้าง (ครั้งละ 5-10 เท่า) ที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 1.0-99.0 จากนั้นเจือจางความเข้มข้นในช่วงที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นครั้งละ 2 เท่าโดยให้มีลูกน้ำตายร้อยละ 10.0-95.0 เตรียมความเข้มข้นจำนวน 4-6 ระดับ ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ และเตรียมชุดควบคุม (control) ที่เป็นน้ำกรองอีก 4 ซ้ำ ได้ตัวอย่างสารผสมถ้วยละ 100 มิลลิลิตร ใส่

ภาพที่ 2 ปริมาณหัวเชื้อ B-Soy powder ที่ใช้ผลิตสารชีวภาพในถังพลาสติก

ภาพที่ 3 สารชีวภาพในถังพลาสติกที่มีการให้อากาศในระหว่างผลิต

ลูกน้ำยุงรำคาญในถ้วยทดสอบถ้วยละ 10 ตัว แล้วอ่านผลการตายของลูกน้ำยุงรำคาญหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง โดยนับจำนวนลูกน้ำเป็นที่ยังแข็งแรงและมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการเคาะถ้วยทดสอบและว่ายน้ำได้ตามปกติเมื่อถูกสัมผัสด้วยปลายไม้ นำค่าการตายไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำตายร้อยละ 50 (median lethal concentration) หรือ LC_{50} โดยวิธี Probit analysis[20] โดย LC_{50} ที่มีค่ายิ่งน้อยหมายถึงหัวเชื้อยิ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำได้ดี ทั้งนี้ WHO ไม่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานของค่า LC_{50} แต่ระบุว่าให้เปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มตัวอย่าง[19] แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ค่า LC_{50} ของสารชีวภาพไม่ควรเกินร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร (%v/v) จึงจะได้สารชีวภาพที่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (unpublished data) ดังนั้นผู้วิจัยจึงกำหนดเกณฑ์การตัดสินประสิทธิภาพของสารชีวภาพที่ค่าดังกล่าว

7. การคำนวณต้นทุนการผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder และสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

คำนวณต้นทุนการผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder เฉพาะส่วนของค่าอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับต้นทุนการผลิตหัวเชื้อ Bti บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน (peptone glucose salt medium - PGSM) และต้นทุนของสารชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อทั้งสองชนิด

8. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

กรณีเปรียบเทียบกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม ให้วิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างทางสถิติด้วย Student's T-test และกรณีเปรียบเทียบมากกว่า 2 กลุ่ม ให้วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วย Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)

ผลการศึกษา

การคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder โดยมีการเปรียบเทียบและแปรผันปริมาณส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 1) พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อได้ปริมาณเซลล์ Bti มากกว่ากากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ การเปรียบเทียบปริมาณกากถั่วเหลืองที่ 10, 20 และ 30 กรัม พบว่าทั้ง 3 สูตรได้ปริมาณเซลล์ Bti ไม่แตกต่าง การเปรียบเทียบปริมาณกล้าเชื้อ Bti ที่ 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร พบว่าทั้ง 3 ปริมาณได้ปริมาณเซลล์ Bti ไม่แตกต่างกัน การเปรียบ-

ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ Bti ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ที่มีการแปรผันประเภทและปริมาณของส่วนผสม

คุณสมบัติและปริมาณของส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ		ปริมาณเซลล์ Bti (cfu/ml)
1. กากถั่วเหลือง	ไม่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ	$5.820 \times 10^{6\ a}$
	ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ	$7.230 \times 10^{8\ b}$
2. ปริมาณกากถั่วเหลือง (กรัม)	10	$1.440 \times 10^{8\ a}$
	20	$5.430 \times 10^{8\ a}$
	30	$2.620 \times 10^{8\ a}$
3. ปริมาณกล้าเชื้อ Bti (มิลลิลิตร)	2	$4.110 \times 10^{8\ a}$
	5	$8.130 \times 10^{8\ a}$
	10	$8.620 \times 10^{8\ a}$
4. ประเภทของน้ำ	น้ำสะอาด	$6.700 \times 10^{8\ b}$
	น้ำมะพร้าวแก่	$7.320 \times 10^{6\ a}$
	น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85	$2.430 \times 10^{9\ c}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแต่ละหัวข้อ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เทียบประเภทของน้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารพบว่าการใช้น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ปริมาณเซลล์ Bti มากกว่าน้ำประเภทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อ Bti ด้วยสูตรอาหารที่ผ่านการคัดเลือกให้ได้ปริมาณมากขึ้น นำตะกอนหัวเชื้อที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ (40, 50 และ 60 °C) พบว่าที่ 40°C ได้ค่า LC_{50} ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอบแห้งที่ 50°C และ 60°C (ตารางที่ 2) เมื่อนำหัวเชื้อ B-Soy powder เก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศและไม่สุญญากาศ พบว่าหลังเก็บ 3 เดือน ค่า LC_{50} ของการปิดผนึกทั้งสองแบบเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนเก็บรักษา แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับการเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์เป็นเวลา 6 เดือนพบว่าค่า LC_{50} ของการปิดผนึกทั้งสองแบบเพิ่มขึ้น 3-5 เท่า (หัวเชื้อมีประสิทธิภาพภาพลดลง) โดยการเก็บแบบสุญญากาศมีค่า LC_{50} ต่ำกว่าแบบไม่สุญญากาศ ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ โดยใส่หัวเชื้อ B-Soy powder ในอัตรา 5-25 กรัม/ถัง พบว่า การใส่หัวเชื้อ 10-25 กรัม/ถัง มีค่า LC_{50} อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ส่วนการใส่หัวเชื้อ 5 กรัม/ถัง ได้ค่า LC_{50} เกินเกณฑ์ตัดสิน

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญของหัวเชื้อ B-Soy powder หลังอบแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง (°C)	$LC_{50} \pm SE$ (mg/l)
40	0.879 ± 0.033^{a}
50	161.233 ± 5.687^{b}
60	$>1{,}000^{c}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญของหัวเชื้อ B-Soy powder ที่เก็บเป็นเวลา 3 และ 6 เดือน ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่มีการปิดผนึกแบบสุญญากาศและไม่สุญญากาศ

LC_{50}±SE (mg/l)				
ก่อนเก็บ	หลังเก็บ 3 เดือน		หลังเก็บ 6 เดือน	
	สุญญากาศ	ไม่สุญญากาศ	สุญญากาศ	ไม่สุญญากาศ
0.879±0.033[a]	0.914±0.042[a]	1.012±0.020[a]	3.159±0.180[b]	4.318±0.163[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการคำนวณต้นทุนการผลิต พบว่าหัวเชื้อ B-Soy powder จากกากถั่วเหลืองที่มีการผสมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 มีค่าใช้จ่ายเฉพาะในส่วนของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl ยี่ห้อ Ajax) ส่วนกากถั่วเหลืองเป็นสิ่งเหลือทิ้งที่ไม่มีค่าใช้จ่าย B-Soy powder จึงมีต้นทุนเพียง 0.184 บาท/กรัม และเมื่อนำไปผลิตสารชีวภาพในถังพลาสติก 5 ลิตร พบว่ามีต้นทุนเพียง 1.840 บาท/ถัง ซึ่งต่ำกว่าสารชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อ Bti บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐานถึง 29 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 5

นอกจากนี้ได้มีการอบรมเผยแพร่ความรู้และสาธิตวิธีผลิตสารชีวภาพให้กับอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) ในจังหวัดนนทบุรี นครปฐม และสมุทรสาคร เพื่อให้เจ้าหน้าที่ดังกล่าวสามารถผลิตสารชีวภาพเพื่อใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญได้ด้วยตนเองและถ่ายทอดวิธีการให้กับประชาชนในชุมชนต่อไป

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญของสารชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อ B-Soy powder ที่ปริมาณต่าง ๆ

ปริมาณหัวเชื้อ B-Soy powder (กรัม/ถัง)	LC_{50}±SE (% v/v)
5	0.075±0.003 [d]
10	0.033±0.002 [c]
15	0.020±0.001 [b]
20	0.017±0.001 [b]
25	0.007±0.001 [a]

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ตารางที่ 5 ต้นทุนการผลิตหัวเชื้อแต่ละชนิดและต้นทุนสารชีวภาพในถัง 5 ลิตร

หัวเชื้อ	ต้นทุนอาหาร (บาท/ลิตร)	ปริมาณผลผลิต (กรัม/ลิตร)	ต้นทุนหัวเชื้อ (บาท/กรัม)	ต้นทุนสารชีวภาพในถัง 5 ลิตร (บาท/ถัง)
B-Soy powder*	1.840	10.000	0.184	1.840 (ใช้หัวเชื้อ 10 กรัม/ถัง)
Bti บริสุทธิ์**	58.930	1.100	53.573	53.573 (ใช้หัวเชื้อ 1 กรัม/ถัง)

หมายเหตุ: * เพาะเลี้ยงด้วยกากถั่วเหลืองผสมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85

** เพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐาน คือ Peptone Glucose Salt medium (PGSM)

วิจารณ์

การคัดเลือกสูตรอาหารเพื่อผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder จากผลการศึกษาพบว่าการใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อจะได้ปริมาณเซลล์ Bti มากกว่า เนื่องจากกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อจะมีเชื้อชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่ทำให้เกิดการแย่งอาหารกัน จึงทำให้เซลล์ Bti เจริญเติบโตได้น้อยกว่า และการเปรียบเทียบปริมาณกากถั่วเหลืองที่ใช้ทั้ง 3 สูตร พบว่า แต่ละสูตรได้ปริมาณเซลล์ Bti ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นควรเลือกใช้กากถั่วเหลืองที่ 10 กรัมซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยที่สุดก็เพียงพอต่อการผลิตเชื้อ Bti ส่วนการเปรียบเทียบปริมาณกล้าเชื้อ Bti พบว่าควรเลือกใช้กล้าเชื้อ 2 มิลลิลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณที่น้อยที่สุดและให้ปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างจากการใช้กล้าเชื้อที่มากขึ้น สำหรับการเปรียบเทียบน้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร พบว่า การใช้น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ปริมาณเซลล์ Bti มากกว่าน้ำประเภทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ กากถั่วเหลือง (ผ่านการต้มฆ่าเชื้อ) 10 กรัม + น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 90 มิลลิลิตร + กล้าเชื้อ Bti 2 มิลลิลิตร

การที่เลือกใช้กากถั่วเหลืองมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Bti เนื่องจากกากถั่วเหลืองประกอบด้วยสารอาหารซึ่งเป็นแหล่งโปรตีน ไนโตรเจน และคาร์บอนจึงสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย Bti ได้ดี[21] อย่างไรก็ตามควรใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณที่เหมาะสม หากใช้มากเกินไปไม่ช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้มากขึ้น การใช้กากถั่วเหลืองหรือผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาเช่นกัน เช่น Melo AI และคณะ[22] ใช้กากถั่วเหลืองผิวขาว (white soybean meal) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sphaericus* พบว่า เชื้อที่ได้สามารถทำให้ลูกน้ำยุงรำคาญตายร้อยละ 100 Devidas PC และคณะ[23] พบว่าถั่วนกพิราบ (pigeon pea) และแป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งสารอาหารที่เหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย Bti ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน และยังสามารถช่วยลดต้นทุนลง 23 เท่าเมื่อเทียบกับอาหารมาตรฐาน

การใช้น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ได้ปริมาณเซลล์ Bti มากกว่าน้ำสะอาดและน้ำมะพร้าวแก่ ทั้งที่น้ำมะพร้าวแก่มีสารอาหารมากกว่าน้ำประเภทอื่น ๆ เนื่องมาจากน้ำมะพร้าวแก่มีความเป็นกรด (pH 5.4) จึงไม่เหมาะสมกับ Bti ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี pH เป็นกลางประมาณ 7.2[24] นอกจากนี้การใช้น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นการเพิ่มแร่ธาตุที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ Bti ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของนักวิจัยท่านอื่น ๆ ได้แก่ Ghribi D และคณะ[25] และ Khedher BS และคณะ[26] ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม *Bacillus thuringiensis* ในอาหารที่มีการเติมน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.7 และ 0.9 ตามลำดับ พบว่า ได้ปริมาณเซลล์และสารพิษ (delta-endotoxin) ส่วนที่ออกฤทธิ์กำจัดแมลงเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ Ghribi D และคณะ[27] ได้ศึกษาการใช้น้ำทะเลที่มีการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 ผสมในอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้ง (starch) และถั่วเหลืองเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม *Bacillus thuringiensis* พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความเป็นพิษต่อแมลงมากขึ้นเช่นกัน สำหรับปริมาณกล้าเชื้อ Bti พบว่าควรใช้ที่ 2 มิลลิลิตร เป็นเพราะปริมาณอาหารมีจำกัดทำให้ Bti เจริญเติบโตเต็มที่ได้เพียงเท่านี้ ไม่จำเป็นต้องใส่กล้าเชื้อมากขึ้น

อุณหภูมิสำหรับอบเชื้อที่เหมาะสม คือ 40°C จะได้หัวเชื้อที่มีคุณภาพดีในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ เมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ Bti บางส่วนตายไป การเก็บรักษาหัวเชื้อในถุงอลูมิเนียมฟอยล์พบว่าการปิดผนึกทั้งแบบสุญญากาศและไม่สุญญากาศในระยะเวลา 3 เดือน สามารถรักษาคุณภาพของหัวเชื้อได้ดีไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเก็บนาน 6 เดือนพบว่าหัวเชื้อมีประสิทธิภาพลดลง 3-5 เท่าและการเก็บแบบสุญญากาศช่วยรักษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อได้ดีกว่าการเก็บแบบไม่สุญญากาศ แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากค่า LC_{50} ที่ได้ สรุปได้ว่าควรเก็บหัวเชื้อเป็นเวลาไม่เกิน 3 เดือนในถุงอลู-

มิเนียมฟอยล์ที่ปิดผนึกแบบใดก็ได้ โดยหัวเชื้อยังคงมีประสิทธิภาพเพียงพอในการใช้ผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ

การใช้หัวเชื้อ B-Soy powder เพื่อผลิตสารชีวภาพ พบว่าการใช้หัวเชื้อ 10-25 กรัม/ถัง มีค่า LC_{50} อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้น ควรใช้หัวเชื้ออย่างน้อย 10 กรัม/ถัง จึงจะได้สารชีวภาพที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ หากใส่หัวเชื้อน้อยเกินไปทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้จำกัด อาหารบางส่วนไม่ถูกใช้ประโยชน์ ทำให้ได้สารชีวภาพที่ไม่มีประสิทธิภาพดีเพียงพอ สำหรับต้นทุนของหัวเชื้อ B-Soy powder เมื่อคำนวณเฉพาะค่าอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีต้นทุนเพียง 0.184 บาท/กรัม เนื่องจากใช้กากถั่วเหลืองซึ่งเป็นสิ่งเหลือทิ้งมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำหัวเชื้อ B-Soy powder มาผลิตเป็นสารชีวภาพพบว่าได้สารชีวภาพที่มีต้นทุนต่ำกว่าสารชีวภาพที่ผลิตจากหัวเชื้อ Bti บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารมาตรฐานถึง 29 เท่า ดังนั้น B-Soy powder จึงเป็นหัวเชื้อต้นทุนต่ำที่มีประสิทธิภาพดีและสามารถใช้ทดแทนหัวเชื้อ Bti ที่มีราคาแพงได้ อย่างไรก็ตาม การผลิตสารชีวภาพต้องใช้หัวเชื้อ B-Soy powder สูงถึง 10 กรัม/ถัง ในขณะที่หัวเชื้อ Bti บริสุทธิ์ใช้เพียง 1 กรัม/ถัง ซึ่งการผลิตหัวเชื้อ B-Soy powder ต้องใช้ระยะเวลามากพอสมควรโดยเฉพาะในขั้นตอนการอบเชื้อให้แห้ง ดังนั้นหากสามารถพัฒนาหัวเชื้อให้ออกฤทธิ์ได้มากขึ้นโดยการพัฒนาสูตรอาหาร จะช่วยลดปริมาณการใช้หัวเชื้อต่อถังให้เหลือน้อยลงซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาการผลิตหัวเชื้อได้ นอกจากนี้หากต้องการผลิตในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อแจกจ่ายให้กับประชาชนนำไปผลิตสารชีวภาพ ต้องมีการผลิตหัวเชื้อในปริมาณมากขึ้น จำเป็นต้องใช้ถังหมักเชื้อและเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยขนาดใหญ่ซึ่งจะได้มีการพัฒนาต่อไป

การใช้สารชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย Bti ในการกำจัดลูกน้ำยุงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัยต่อคน สัตว์เลี้ยง สิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงควรส่งเสริมให้มีการใช้สารชีวภาพในการควบคุมยุงมากขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้หัวเชื้อ B-Soy powder ต้นทุนต่ำที่สามารถนำไปใช้ผลิตสารชีวภาพกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญด้วยวิธีการที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ประชาชนทั่วไปสามารถเรียนรู้ได้ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสามารถหาซื้อได้ทั่วไปและราคาไม่แพง การผลิตสารชีวภาพใช้เวลาเพียงสองวันก็สามารถนำไปใช้งานได้ โดยนำไปรดให้กระจายทั่วแหล่งเพาะพันธุ์ของลูกน้ำยุงรำคาญ เช่น คูระบายน้ำ พื้นที่ที่มีน้ำขัง หรือในภาชนะรอบบ้านที่มีน้ำขัง ซึ่งข้อดีของการกำจัดลูกน้ำด้วยวิธีนี้คือสามารถกำจัดลูกน้ำได้เป็นกลุ่มก้อนคราวละมาก ๆ เป็นการลดปริมาณยุงรำคาญได้ดี หากใช้สารเคมีประเภทสเปรย์กำจัดยุงจะสามารถกำจัดได้ครั้งละไม่มาก เนื่องจากยุงหลบตามจุดต่าง ๆ ภายในบ้าน ไม่ได้รวมตัวกันเช่นเดียวกับลูกน้ำ ดังนั้นการใช้สารชีวภาพเป็นการช่วยลดการใช้สารเคมี จึงช่วยลดความเสี่ยงที่ประชาชนจะได้รับอันตรายจากสารเคมีและลดการเกิดโรคจากยุงพาหะ นอกจากนี้ยังได้มีการขยายผลโดยถ่ายทอดความรู้และสาธิตวิธีการผลิตสารชีวภาพให้กับอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) เพื่อให้สามารถผลิตสารชีวภาพได้ด้วยตนเองและนำไปใช้กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญในชุมชนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้การสนับสนุนสิ่งอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ตลอดจนสถานที่ที่ใช้ในการทดสอบ และขอขอบคุณฝ่ายพิพิธภัณฑ์แมลงและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยาที่สนับสนุนลูกน้ำยุงรำคาญสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Janssen N, Fernandez-Salas I, Díaz González EE, Gaytan-Burns A, Medina-de la Garz CE, Sanchez-Casas RM, et al. Mammalophilic feeding behaviour of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes collected in the cities of Chetumal and Cancun, Yucatán Peninsula, Mexico. Trop

Med Int Health 2015;20(11):1488-91.

2. Zhang Y, Li X, Chen H, Ti J, Yang G, Zhang L, et al. Evidence of possible vertical transmission of Tembusu virus in ducks. Vet Microbiol 2015;179(3-4):149-54.
3. Tang Y, Gao X, Diao Y, Feng Q, Chen H, Liu X, et al. Tembusu virus in human, China. Transbound Emerg Dis 2013;60:193-6.
4. Pandey BD, Karabatsos N, Cropp B, Tagaki M, Tsuda Y, Ichinose A, et al. Identification of a flavivirus isolated from mosquitos in Chiang Mai Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999;30(1):161-5.
5. Nitatpattana N, Apiwatanason C, Nakgoi K, Sungvornyothin S, Pumchompol J, Wanlayaporn D, et al. Isolation of Tembusu virus from *Culex quinquefasciatus* in Kanchanaburi Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2017;48(3):546-51.
6. Land M, Bundschuh M, Hopkins RJ, Poulin B, McKie BG. What are the effects of control of mosquitoes and other nematoceran Diptera using the microbial agent Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) on aquatic and terrestrial ecosystems? A systematic review protocol. Environ Evid [Internet]. 2019 [cited 2020 Jan 13];8:32. Available from: https://doi.org/10.1186/s13750-019-0175-1
7. Ben-Dov E. Bacillus thuringiensis subsp. israelensis and its dipteran-specific toxins. Toxins 2014;6(4):1222-43.
8. Teixeira Corrêa RF, Ardisson-Araújo DM, Monnerat RG, Ribeiro BM. Cytotoxicity analysis of three Bacillus thuringiensis subsp. israelensis δ-endotoxins towards insect and mammalian cells. PLoS One [Internet]. 2012 [cited 2020 Jan 14];7(9):e46121. Available from: https://pubmed. ncbi.nlm.nih.gov/23029407
9. Patil CD, Patil SV, Salunke BK, Salunkhe RB. Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. Parasitol Res 2012;110(5):1841-7.
10. Da Silca Carvalho K, Crespo MM, Araujo AP, Da Silva RS, Melo-Santos MAV, Oliveira CM, et al. Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis var. israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. Parasit Vectors 2018;11(1):673.
11. Tetreau G, Stalinski R, David JP, Després L. Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108(7):894-900.
12. Sathantriphop S, Paeporn P, Supaphathom K. Detection of insecticides resistance status in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* to four major groups of insecticides. Trop Biomed 2006;23(1):97-101.
13. Sirisopa P, Thanispong K, Chareonviriyaphap T, Juntarajumnong W. Resistance to synthetic pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. Kasetsart J (Nat Sci) 2014;48(4):577-86.
14. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, et al. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. J Econ Entomol 2007;100(2):545-50.
15. Chowanadisai L, Methawanitphong N and U-mai N. Effectiveness of Bacterial Larvicide Products from Thai Strain Bacillus thuringiensis subsp.israelensis. Hanoi: Science and Technic Publishing House 2005;5(1):365-82.

16. ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ชวลิตธำรง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, เลาจนา เชาวนาดิศัย. พิษเรื้อรังของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง Bacillus thuringiensis สายพันธุ์แพร่. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2544;43(1):21-31.
17. Prades A, Dornier M, Diop N, Pain JP. Coconut water uses, composition and properties: a review. Fruits 2012;67(2):87-107.
18. Herbert RA. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. Methods in Microbiology 1990;22(8):1-39.
19. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides [Internet]. 2005 [cited 2020 Jan 14]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?sequence=1&isAllowed=y
20. Finney DJ. Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
21. Fernando HV and Andre HC. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. Entomol 2008;37(6):519-27.
22. Melo Al, Soccol VT, Soccol CR, Nogueira Junior M. Evaluation of *Bacillus sphaericus* bioinsecticide produced with white soybean meal as culture medium for the control of *Culex* (Culex) *quinquefasciatus*. Cad Saude Publica 2009;25(3):563-9.
23. Devidas PC, Pandit BH, Vitthalrao PS. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. Sci World J [Internet]. 2014 [cited 2020 Jan 15];2014:273030. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926252
24. Amnah MH. Development of a Cheap Media for Bacillus thuringiensis Growth. Int J Biotech & Bioeng 2017;6(3):216-23.
25. Ghribi D, Zouari N, Jaoua S. Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. J Appl Microbiol 2005;98(4):823-31.
26. Khedher BS, Jaoua S, Zouari N. Application of statistical experimental design for optimization of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. Braz J Microbiol 2013;44(3):927-33.
27. Ghribi D, Zouari N, Trigui W, Jaoua S. Use of sea water as salts source in starch and soya bean based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. Process Biochem 2007;42(3):374-8.

Abstract: Development of B-Soy Powder Produced with Soybean Meal for the Production of Biolarvicide Against *Culex quinquefasciatus* Larvae

Nittaya Methawanitpong, M.Sc. (Biotechnology), Nuntaporn Phonsuwan, B.Sc. (Microbiology), Phonchai Wiriyasaranont, B.Sc. (Microbiology); Uruyakorn Chansang, Ph.D. (Biology); Sunaiyana Sathantriphop, Ph.D. (Entomology)

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand

Journal of Health Science 2021;30(Suppl 1):S183-S194.

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) is a microbe found in natural soil that can produce insecticidal crystal proteins that causing death of mosquito larvae, thus Bti can be used to control *Culex quinquefasciatus*, a lymphatic filariasis vector. But the production of Bti is expensive because of the high cost of the culture medium. The objective of this study was to develop the Bti powder as a culture starter for the production of biolarvicide against *Cx. quinquefasciatus* larvae by using soybean meal as a bacterial culture medium. The obtained Bti cell pellets were dried at different test temperatures at 40°C, 50°C and 60°C. It was found that the optimal drying temperature was 40°C, because Bti powder or B-Soy powder produced highly effective mosquito larvicide with the lowest LC_{50} value. Two storage tests of B-Soy powder were conducted in vacuum bag and non-vacuum bag for three months. After 3 months storage, B-Soy powders were tested against *Cx. quinquefasciatus* larvae, the LC_{50} results obtained were 0.914 and 1.012 mg/l, respectively. The LC_{50} values were slightly higher than the original LC_{50} value of 0.879 mg/l, but not statistically significant. Thus, the 3-month storage of B-Soy powder in both vacuum and non-vacuum bags, they still maintain quality of B-Soy powder. However, after longer-term storage up to 6 months, B-Soy powder lost 3 to 5 times of its efficacy against *Cx. quinquefasciatus,* unsuitable for producing larvicide. The production of biolarvicide in 5 litre plastic containers was conducted to compare the effect of B-Soy powder at five levels (5, 10, 15, 20 and 25 g). The result indicated that at least 10 g of B-Soy powder provided the effective mosquito larvicide for the control of *Cx. quinquefasciatus* larvae. For cost calculation, it showed that biolarvicide produced from B-Soy powder was 29 times lower than the cost of biolarvicide produced from pure Bti cultured on standard media. Therefore, the B-Soy powder from a low-cost culture medium with soybean meal could be used as an effective alternative for the production of biological agent for the control of *Culex* mosquitoes. Furthermore, this knowledge production of biolarvicide was already transferred to village health volunteers in order to control *Culex* mosquito larvae in their own communities..

***Keywords*: *Bacillus thuringiensis var. israelensis*; *Culex quinquefasciatus*; soybean meal; biolarvicide**