เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2552;7(1):7-17.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ต่อเห็บโค (*Boophilus microplus*)

มาลี ตั้งระเบียบ [1], กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์ [2]

[1] *สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ต.พิชัย อ.เมือง จ.ลำปาง 52000*

[2] *สาขาวิชาพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ. เชียงใหม่ 50100*

บทคัดย่อ การศึกษา การนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิด *Metarhizium anisopliae* มาทดสอบต่อ เห็บโค (*Boophilus microplus*) ทำการทดลอง 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำการทดสอบความสามารถของเชื้อราในการทำให้เห็บโคเกิดโรคตาย โดยใช้เชื้อรา จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 x10^8 โคนิเดีย ต่อมล. ด้วยวิธีพ่นสารแขวนลอยเชื้อราลงบนตัวเห็บเพศเมียระยะกินเลือดจนอิ่มตัว (engorge) ลงในสารแขวนลอยของเชื้อรา นับจำนวนเห็บที่ตายและมีเชื้อราขึ้นปกคลุม นำมาหาเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง โดยใช้ Abbot's formula ผลการทดลองพบว่า เชื้อรา จำนวน 4 สายพันธุ์ มีความสามารถในการทำให้เห็บโคเกิดโรคตาย โดยที่เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* (Ma.) 6079 และ Ma. 7965 มีอัตราการตายร้อยละ 100 ในขณะที่สายพันธุ์ Ma. 7527 พบว่าไม่สามารถทำให้เห็บตายได้ ขั้นตอนที่ 2 เป็นการนำเชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้เห็บโคเกิดโรคตายสูง มาทดสอบหาความรุนแรงของเชื้อรา ที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 1x10^4, 1x10^6, 1x10^8 และ 1x10^{10} โคนิเดียต่อมล. นำจำนวนเห็บที่ตายและมีเชื้อราขึ้นปกคลุมไปคำนวณหาค่า median lethal concentration (LC_{50}) และ median lethal time (LT_{50}) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ M stat C ซึ่งใช้ หลักการ Probit analysis พบว่าเชื้อรา สายพันธุ์ Ma. 6079 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.4 ×10^4 โคนิเดียต่อมล. มีค่า LT_{50} เท่ากับ 11.9 วัน สายพันธุ์ Ma. 6171 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 5.00 × 10^5 โคนิเดียต่อมม. ค่า LT_{50} เท่ากับ 6.31 วัน สายพันธุ์ 7965 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.4 × 10^4 โคนิเดียต่อมล. มีค่า LT_{50} เท่ากับ 5.53 วัน ซึ่งจากค่า LC_{50} และค่า LT_{50} แสดงให้เห็นว่า เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณเห็บโคได้ดีคือ เชื้อรา สายพันธุ์ Ma. 7965 ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาผลที่มีต่อผิวหนังและร่างกายโค พบว่าเชื้อราไม่สามารถก่อให้เกิดโรคกับโคได้
เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2552;7(1):7-17.

คำสำคัญ : เห็บโค เชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

คำนำ

เห็บ (tick) เป็นพยาธิภายนอกที่สำคัญในสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด อันตรายจากเห็บที่มีต่อสัตว์เลี้ยงคือ กินเลือด และเป็นพาหะนำโรคติดเชื้อในกระแสเลือดที่เป็นอันตรายมาสู่สัตว์ ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) สร้างความรำคาญ ทำให้เกิดการแพ้ (allergy) นอกจากนี้เห็บในสัตว์เลี้ยงบางชนิดยังสามารถเกาะดูดเลือดคนที่อาศัยอยู่ใกล้เคียง ซึ่งก่อให้เกิดอาการแพ้ในบางคน การควบคุมกำจัดเห็บตั้งแต่อดีตเป็นต้นมาจนถึงในปัจจุบันทำได้โดยการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการกำจัดเพื่อลดปริมาณเห็บบนตัวสัตว์ หรือในแหล่งที่อยู่อาศัยของเห็บ แต่การใช้สารเคมีบ่อยครั้งทำให้เกิดผลเสียตามมาคือ

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, สาขาวิชาพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ. เชียงใหม่ 50100; E-mail: korakot@chiangmai.ac.th
ได้รับบทความวันที่ 5 สิงหาคม 2551

เห็บมีความสามารถในการต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ ทำให้ต้องมีการนำเข้าสารออกฤทธิ์ใหม่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งสารเคมีดังกล่าวมีราคาแพงเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้ในแต่ละปีประเทศไทยสูญเสียเงินเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ สารเคมีทำให้ เกิดการตกค้างในเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อผู้บริโภค รวมทั้งสารเคมีดังกล่าวยังสามารถตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อม ได้เป็นเวลานาน ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการตกค้างของสารเคมีเหล่านี้ในน้ำนม จากการศึกษาปริมาณสารเคมีทางการเกษตรที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มในประเทศไทยในปี พ.ศ 2527, 2532 และ 2533 โดยกองวัตถุมีพิษการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ รวม 356 ตัวอย่าง พบว่ามีการตกค้างของสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์แกโนคลอรีน 340 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 95.5 [1] โดยที่สารฆ่าแมลงส่วนใหญ่คือ ดีดีที (DDT; dichlorodiphenyl-trichloroethane) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) นาน 3-10 ปี [2] สามารถตกค้างอยู่ในธรรมชาติได้เป็นเวลานาน จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีความพยายามศึกษาหาวิธีการควบคุมเห็บโดยอาศัยวิธีการทางชีวภาพ (biological control) โดยการนำศัตรูเห็บที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น ไวรัส (virus) แบคทีเรีย (bacteria) เชื้อรา (fungi) โปรโตซัว (protozoa) ไส้เดือนฝอย (nematode) หรือแมลงตัวห้ำ (predator insect) มาควบคุมปริมาณเห็บ [3] รวมทั้งการพยายามสร้างโคสายพันธุ์ที่ทนต่อเห็บ [4] หรือวัคซีนต่อต้านเห็บ [5,6]

เชื้อ *M. anisopliae* เป็นเชื้อราเขียวที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวาง [7] และมีการรายงานว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้นานกว่า 3 ปี [8] สำหรับในประเทศไทย ได้มีการนำไปควบคุมด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros*) ตลอดจนมีการส่งเสริมให้มีการใช้และให้มีการผลิตขึ้นอย่างแพร่หลายมานานแล้ว [9] หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเชื้อรา *M. anisopliae* เพิ่มมากขึ้นทั้งในด้านการกำจัดแมลงในบ้านเรือน เช่น ปลวก [10] นอกจากนี้จากการสำรวจและวิจัยเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติของหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *Dorysthenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycidae) ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถเข้าทำลายด้วงได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะไข่จนถึง ระยะตัวเต็มวัย[11]และสามารถทำลายหนอนได้มากกว่าร้อยละ 90 งานวิจัยดังกล่าวได้ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดีและได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวสู่เกษตรกรผู้ปลูกอ้อย การใช้เชื้อราเขียวควบคุมแมลงเป็นวิธีการทางชีววิธีที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งในต่างประเทศนั้นมีการศึกษาเชื้อราชนิดนี้มาเป็นเวลานานมากกว่า 70 ปี โดยทำการศึกษาถึงศักยภาพในการป้องกันแมลงศัตรูพืชและสัตว์ [12-15]

ในประเทศไทยการควบคุมเห็บโคทำโดยการใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นหลัก ดังนั้นการทดลองใช้เชื้อราสำหรับป้องกันและกำจัดเห็บ จึงจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าให้ความสนใจเป็นอย่างยิ่งเพราะจะเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตสัตว์ซึ่งส่งผลทำให้เกษตรกรมีรายได้สูงขึ้นและมีกำไรมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นได้อีกด้วย ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาแนวทางใหม่ในการควบคุมเห็บโดยเทคนิคการควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งใช้ต้นทุนต่ำ เกิดความเป็นพิษต่อคนและสัตว์น้อย รวมทั้งไม่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมในระยะยาว โดยใช้เชื้อราที่สามารถพบได้ในประเทศไทยสำหรับต่อต้านเห็บโค

วิธีการทดลอง

การออกแบบการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้แบ่งเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย 1. การศึกษาหาสายพันธุ์ ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมเห็บโค 2.การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อรา *M. anisopliae* สำหรับใช้ควบคุมเห็บโค และ 3. การศึกษาผลของเชื้อราที่มีต่อร่างกายของโค

การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อรา

เชื้อรา *M. anisopliaee* จากสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ.ลำปาง จำนวน 5 สายพันธุ์ (Ma. 6071, 6079, 6171, 7527 และ 7965) เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract peptone agar (MEA) ในจานเลี้ยงเชื้อแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 วัน จากนั้นนำเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ มาทำโคนิดีนแขวนลอย (conidia suspension) ใน 0.05% Tween-80 โดยใช้แท่งแก้วงอขูดสปอร์ของเชื้อราบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ กรองโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อราด้วยผ้าขาวบางนำสปอร์แขวนลอยที่กรองได้ไปตรวจนับปริมาณโคนิเดียต่อปริมาตรด้วย 0.05% Tween-80 ให้ได้ความเข้มข้น 1 x 10^8 โคนิเดียต่อมล. [16-18]

การทดสอบความสามารถในการทำให้เห็บตาย

ในการศึกษาความสามารถในการทำให้เห็บตายได้ทำการศึกษานอกตัวสัตว์ (*in vitro*) โดยศึกษาผลของเชื้อราที่มีต่อเห็บเพศเมียระยะกินเลือดอิ่มตัว (engorge) วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completly Randomized Design; CRD) ซึ่งมีทั้งหมด 5 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ ใช้เห็บจำนวน 30 ตัว โดยเห็บที่ใช้ทดลองเป็นเห็บระยะกินเลือดอิ่มตัว ที่เก็บมาจากเห็บที่อาศัยบนตัวโคตามธรรมชาติ

ในแต่ละซ้ำนำเห็บมาวางไว้บนกระดาษกรองที่วางอยู่บนจานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. จากนั้นพ่นสารแขวนลอยเชื้อราปริมาตร 5 มล.ลงบนตัวเห็บ นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางไว้ในที่มืดและชื้น ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจหาการตายของเห็บในแต่ละวัน เห็บที่ตายจะนำไปวางไว้บนกระดาษกรองที่ชื้นเพื่อให้เชื้อราเจริญ แล้วนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เพื่อเป็นการยืนยันว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่ใช้ศึกษา

นำจำนวนเห็บที่ตายที่มีเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่ฉีดพ่นมาคำนวณหาอัตราการตายที่แท้จริง โดยใช้ Abbot's formula [19] ซึ่งมีรูปแบบของสูตรคือ อัตราการตายที่แท้จริง = (A-B)/(100-B) เมื่อ A = อัตราการตายที่ได้จากการทดลองเชื้อ และ B = อัตราการตายจากวิธีควบคุม แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้เห็บตายสูงสุด (Ma. 6079, Ma. 6171 และ Ma. 7969) มาทดสอบหาความรุนแรงของเชื้อรา วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้เห็บ 30 ตัว ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ดังนี้ 1 x 10^4, 1 x 10^6, 1 x 10^8 และ 1 x 10^{10} โคนิเดียต่อมล. บันทึกการตายทุกวัน เหมือนกับการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค นำข้อมูลการตายที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละวันมาคำนวณหาค่า median lethal concentration (LC_{50}) และ median lethal time (LT_{50}) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ M stat C ซึ่งใช้ หลักการ Probit analysis ของ Finney (1971)

การศึกษาผลของเชื้อราต่อโค

เลือกเชื้อรา สายพันธุ์ที่ให้ผลดีที่สุดในการทำให้เกิดโรค มาศึกษาถึงผลที่มีต่อโค โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าเคมีเลือด (blood chemistry) จำนวนเม็ดเลือด (blood count) และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลพยาธิ (Histopathology) ของผิวหนัง โดยในการศึกษานี้จะใช้โคทั้งสิ้น 3 ตัว โดยโคทั้งหมดถูกเลี้ยงในโรงเรือนเดียวกัน

การพ่นสารแขวนลอยเชื้อรา

ตัดขนบริเวณสวาบด้านซ้ายเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1 x 1 ฟุต จากนั้นจึงทำการพ่นสารแขวนลอยเชื้อราลงไปเป็นจุดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว จำนวน 3 จุด โดยจุดสุดท้ายพ่นเฉพาะสารที่ใช้เป็นตัวทำละลายที่ปราศจากเชื้อราเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 10 มล. ต่อตัว ก่อนทำการพ่นสารแขวนลอยเชื้อรา จากนั้นจึงเก็บต่อไปสัปดาห์ละครั้งติดต่อกันอีก 3 ครั้ง โดยตัวอย่างเลือดที่เก็บจะใช้ศึกษาค่าเคมีเลือด และนับจำนวนเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ตัวอย่างเลือดโคปริมาณ 10 มล.ต่อตัว แบ่งเป็นออกสองส่วน ส่วนที่หนึ่ง เลือดปริมาณ 2 มล. เก็บในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) โดยในการศึกษานี้ใช้ heparin ขนาด 100 ยูนิต ต่อมล.ของเลือด และ เลือดปริมาณ 8 มล. เก็บในหลอดที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว เลือดที่เก็บในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว ถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา (complete blood count) สำหรับเลือดที่เก็บโดยไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว นำไปปั่นแยกเอาซีรั่มสำหรับตรวจค่าเคมี ณ ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การเก็บตัวอย่างผิวหนัง

ทำการเก็บตัวอย่างผิวหนังด้วย shave biopsy ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร สัปดาห์ละครั้งเริ่มเก็บ 7 วันหลังจากการพ่นเชื้อราลงบนผิวหนัง จากนั้นเก็บสัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน เป็นเวลาทั้งสิ้น 3 สัปดาห์ โดยในสัปดาห์สุดท้ายจะเก็บตำแหน่งที่เป็นกลุ่มควบคุมด้วย (คือพ่นเฉพาะสารแขวนลอยเชื้อรา) เพื่อมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของผิวหนังโดยการย้อมสี Hematoxylin and Eosin (H&E) เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อราบนผิวหนัง โดยก่อนทำการเก็บตัวอย่างจะฉีดยาชาเฉพาะที่ (lidocaine hydrochloride, L.B.S. laboratory, ประเทศไทย) บริเวณผิวหนังที่ทำการเก็บและการเก็บในแต่ละสัปดาห์จะไม่เก็บซ้ำในตำแหน่งเดิม หลังจากเก็บเสร็จในแต่ละครั้ง ทายาฆ่าเชื้อและปิดแผลไว้เพื่อป้องกันการติดเชื้อ

ผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการทำให้เห็บโคตาย

จากการศึกษาความสามารถของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการทำให้เห็บโคตาย พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีความสามารถในการทำให้เห็บโคตายได้ (รูปที่ 1) ในจำนวน 5 สายพันธุ์มีเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการทำให้เห็บโคตาย โดยเปอร์เซ็นต์การตายของเห็บโคจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรานั้น ๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ร้อยละการตายของเห็บโคเพศเมียระยะกินเลือดอิ่มตัว ด้วยเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	ร้อยละการตาย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Ma. 6071	70.00 ±11.00 [b]
Ma. 6079	100.00 ± 0.00 [a]
Ma.6171	95.00 ± 3.00 [a]
Ma. 7527	0.00 ± 0.00 [c]
Ma. 7965	100.00 ± 0.00 [a]

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน ([a, b, c])ในคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

รูปที่ 1 แสดงลักษณะเห็บปกติ เปรียบเทียบกับเห็บที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย

เห็บปกติ เห็บถูกเชื้อราเข้าทำลาย

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ

จากผลการศึกษาการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่ามีเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Ma. 6079, Ma. 6171 และ Ma. 7965 ที่มีความสามารถในการทำให้เห็บเกิดโรคตายได้มากกว่า 90% จึงได้นำมาศึกษาหาความรุนแรงของเชื้อรา ซึ่งความรุนแรงของเชื้อนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เห็บตายได้ 50 % (LC_{50}) และความช้าเร็วของการตาย ผลการทดลองพบว่า ค่า LC_{50} มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 2) เชื้อราที่มีความรุนแรงสูงจะมีค่า LC_{50} ต่ำ ซึ่งได้แก่ เชื้อ Ma. 6079 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.4 x 10^4 โคนิเดียต่อมล. และ Ma. 7965 เท่ากับ 3.4 x 10^4 โคนิเดียต่อมล. แต่เมื่อมาพิจารณาค่า LT_{50} (ตารางที่ 3) จะเห็นได้ว่า ค่า LT_{50} ของเชื้อ Ma. 6079 และ Ma. 7965 มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเชื้อราที่มีค่า LT_{50} ต่ำจะเป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงในการทำให้เห็บโคเกิดโรคสูง จากผลการทดลองเชื้อรา Ma. 7965 ใช้ระยะเวลาในการทำให้เห็บโคตาย 50 % 5.53 วัน ในขณะที่เชื้อ Ma.6079 ต้องใช้ระยะเวลาถึง 11.90 วัน

ตารางที่ 2 ระดับความรุนแรงของเชื้อรา (ค่า LC_{50}) ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ทำให้เห็บโคตาย

Isolate	LC_{50} ± SE (conidia/ml)	Slope ± SE	Intercept	X^2
Ma. 6079	$2.4 \pm 0.19 \times 10^{4\,a}$	$0.46 \pm 0.0412^{**}$	2.97	24.21
Ma. 6171	$5.0 \pm 2.28 \times 10^{5\,b}$	$0.50 \pm 0.0315^{***}$	2.12	40.39
Ma. 7965	$3.4 \pm 0.45 \times 10^{4\,a}$	-0.18 ± 0.0367^{ns}	5.66	58.89

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง *** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ตัวอักษรที่แตกต่างกัน ($^{a, b,}$)ในคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ระยะเวลาที่ทำให้เห็บโคตาย 50% (ค่า LT_{50}) ของเชื้อรา *M. Anisopliae*

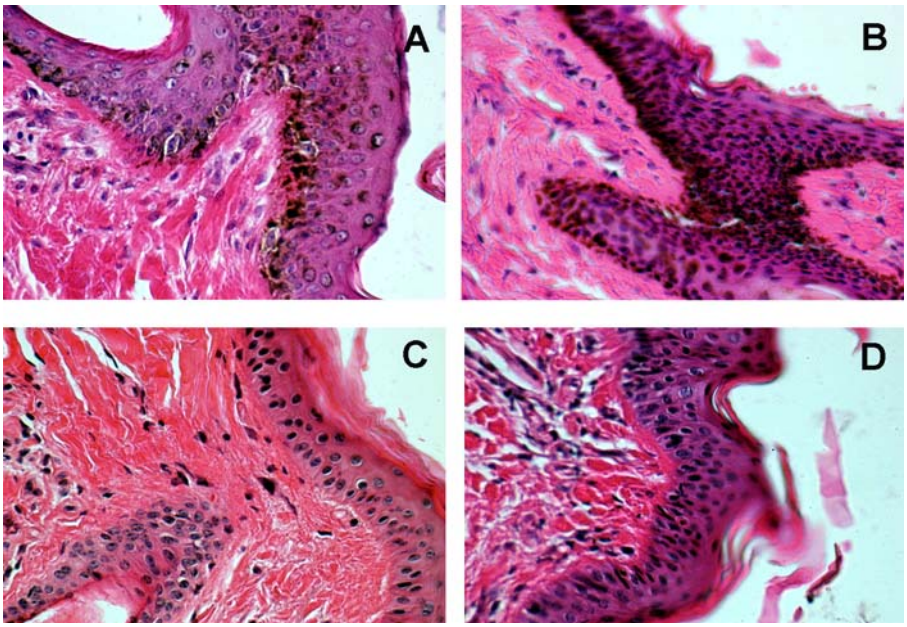
Isolate	LT_{50} ± SE (day)	Slope ± SE	Intercept	X^2
Ma. 6079	11.90 ± 2.90^{a}	$0.6743 \pm 05^{**}$	1.95	6.61
Ma. 6171	6.31 ± 1.94^{b}	$0.76 \pm 15^{**}$	0.63	4.52
Ma. 7965	5.53 ± 0.09^{b}	$11.37 \pm 2.6896^{**}$	3.42	21.53

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีเลือดของโคในสัปดาห์ต่างๆ

	ค่าปกติ	สัปดาห์ที่			
		0	1	2	3
Hematocrit (%)	22.5-57.5	28±1.2	29±2.0	29±1.5	30±2.1
Hemoglobin (g/dl)	7.7-20.6	8.5±0.9	8.7±0.4	8.6±0.7	8.7±1
WBC count (cell/µl)	6,000-33,700	11,400±96	11,600±102	11,300±120	10,900±85
Neutrophil (cell/µl)	2,900-12,000	2,166±89	2,088±49	1,469±103	1,786±134
Lymphocyte (cell/µl)	400-2,900	7,980±71	8,120±87	8,362±61	8,250±90
Monocyte (cell/µl)	100-1,400	114±5	116±7	226±15	195±10
Eosinophil (cell/µl)	0-1,300	1,140±12	1,276±19	1,243±14	1,150±24
Basophil (cell/µl)	0-140	-	-	-	-
AST (IU/L)	13-131	36±1	52±3	50±2	48±2
ALT (IU/L)	1-150	17±1	18±3	20±2	18±1
BUN (mg/dl)	3-41	5.5±0.2	5.4±0.9	5.5±1.1	5.5±0.7
Creatinine (mg/dl)	0.18-2.76	1.8±0.2	1.9±0.1	1.7±0.3	1.8±0.1

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 2 ภาพถ่ายทางจุลกายวิภาคของผิวหนังที่กำลังขยาย 100 เท่า ในกลุ่มควบคุม (A) เปรียบเทียบกับ สัปดาห์ที่ 1 (B), 2 (C) และ 3 (D) หลังจากการพ่นเชื้อบนผิวหนัง

การศึกษาผลของเชื้อราต่อโค

จากการศึกษาไม่พบความเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีเลือดหลังจากการพ่นเชื้อรา (ตารางที่ 4) และเมื่อศึกษาผลที่มีต่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังก็ไม่พบการงอกของเชื้อราแต่อย่างใด (รูปที่ 2)

วิจารณ์และสรุปผล

เห็บและโรคที่มีเห็บเป็นพาหะนับว่าเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการพัฒนาปศุสัตว์ในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ปัจจุบันการกำจัดเห็บมีวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา แต่ส่วนใหญ่แล้วยังไม่ประสบความสำเร็จมากพอที่จะทำให้จำนวนเห็บลดลงในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ เนื่องจากปัจจัยหลายอย่างเช่น ความเข้าใจถึงชีพจักรของเห็บ ชนิดของวิธีที่ใช้ในการควบคุมกำจัดเห็บ และความสม่ำเสมอของการจัดการ ทั้งนี้ในการควบคุมปริมาณเห็บมีความแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ การควบคุมเห็บโดยการใช้สารเคมียังเป็นที่นิยมอยู่เนื่องจากให้ผลที่แน่นอน ถึงแม้ผลเสียที่เกิดตามมาจากการใช้สารเคมีก็มากเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบว่าเห็บมีความสามารถในการดื้อสารเคมีค่อนข้างมาก ดังนั้นการใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพจึงเข้ามีบทบาทมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า เชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดเห็บโค รวมทั้งเชื้อราเหล่านี้ไม่ก่อให้เกิดโรคกับโค

ผลจากการศึกษาความสามารถของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการทำให้เกิดโรคกับเห็บโค พบว่ามีเชื้อรา 4 สายพันธุ์ คือ Ma. 6071, Ma. 6079, Ma. 6171 และ Ma. 7965 มีความสามารถในการทำให้เห็บโคเกิดโรคและตายร้อยละ 70, 100, 95 และ 100 ตามลำดับ

ในขณะที่ สายพันธุ์ Ma. 7527 ไม่มีความสามารถในการทำให้เห็บตายได้เลย เปอร์เซ็นต์การตายของเห็บโคสอดคล้องกับการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมาที่พบว่า มีเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแมลงได้หลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับเห็บ อาทิเช่น *Aspergillus* 11 สายพันธุ์ *Beauveria* 3 สายพันธุ์ *Fusarium* 3 สายพันธุ์ *Paecilomyces* 1 สายพันธุ์ และ *Verticillium* 3 สายพันธุ์ [20-25] ได้มีการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อราที่นิยมใช้เพื่อควบคุมแมลง (entomopathogenic fungi) โดยเฉพาะในเห็บเป็นเชื้อราในสกุล *B. bassiana* และ *M. anisopliae* เนื่องจากเชื้อราทั้งสองกลุ่มนี้สามารถแพร่กระจายได้ในหลายภูมิประเทศแม้แต่ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ มีผลต่อเห็บหลายชนิด รวมทั้งสามารถทำลายไข่ของเห็บได้ [16,17,20,22,26,27]

จากการศึกษาที่ทำการจุ่มไข่เห็บในเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความเข้มข้น 1 X 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและจุ่มเห็บเพศเมียที่กินเลือดจนอิ่มตัวในเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความเข้มข้น 2.7 X 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรพบว่ามีอัตราการตายร้อยละ 96 ถึง 100 [20 28-30] หรือการศึกษาที่ทำการพ่นเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ความเข้มข้น 1 X 10^{10} โคนิเดียต่อมล. บริเวณใบหูโคที่มีเห็บชนิด *Rhipicephalus appendiculatus* เกาะอยู่ พบว่ามีอัตราการตายของเห็บร้อยละ 76 และ 85 อัตราการฟักเป็นตัวอ่อนลดเหลือร้อยละ 48 และ 17.5 ตามลำดับ [18]

โรคเชื้อราผิวหนังในโคส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา *Trichophyton verrucosum, T. mentagrophytes* และ *T. megnini* โดยพบว่าเชื้อ *T. verrucosum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคมากที่สุด ติดต่อกันโดยการสัมผัสกับโคที่เป็นโรค และโรคนี้สามารถติดต่อถึงคนได้ ผิวหนังบริเวณที่เป็นโรค จะมีลักษณะเป็นวงกลมมีขอบสูงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 ซม. มีแผ่นสะเก็ดจำนวนมากสีเทาขาว บนสะเก็ดอาจมีขนที่หักเหลือเป็นตอลักษณะตั้งตรงเรียงตัวไม่สม่ำเสมอติดอยู่ แต่บางครั้งอาจพบว่าบริเวณที่เป็นโรคนั้นขนจะร่วงหลุดหมด ถ้าอาการของโรคยังคงเป็นอยู่ต่อไปสะเก็ดจะหนาขึ้นมีลักษณะเป็นขุย สีเหลืองน้ำตาล ใต้สะเก็ดมีของเหลว และเมื่อแกะสะเก็ดออกจะมีเลือดสดๆ ไหลซึมออกมา โรคกลากโคมักจะไม่มีอาการคัน พบบ่อยบริเวณ หัว คอ รอบๆ ตา ตามลำตัว บางครั้งอาจลุกลามไปตามไหล่ส่วนท้ายของร่างกายและขา อย่างไรก็ตาม ผลจากการศึกษาผลของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีต่อร่างกายโค พบว่าเชื้อราดังกล่าวไม่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีเลือดของโค นอกจากนั้นจากการศึกษานี้ยังไม่พบว่ามีการงอกของเชื้อราชนิดนี้บนผิวหนังโค ซึ่งนับว่าเป็นสิ่งที่ดี

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงแนวทางทางการใช้เชื้อราสายพันธุ์ที่พบได้ในประเทศไทยเพื่อนำมาใช้ควบคุมปริมาณเห็บโค รวมถึงการประยุกต์ใช้ในสัตว์ชนิดอื่นๆ อันจะเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมี

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2550 และโครงการนี้ได้รับความเห็นชอบการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองและการใช้อาคารสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามหนังสือเลขที่ ศธ 0515(26).14/034 ลงวันที่ 4 กรกฎาคม 2550

เอกสารอ้างอิง

1. จันทร์ทิพย์ ธำรงศรีสกุล. สถานการณ์สารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทย. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 2538;22: 26-31.
2. Menzie CM. Fates of pesticides in the environment. Ann Rev Entomol 1972;17: 199.
3. Samish M, Rehacek J. Pathogens and predators of ticks and therie potential in biological control. Annu Rev Entomol 1999; 44: 159-182.
4. Wharton RH, Norris KR. Control of parasitic arthropods. Vet Parasitol 1980; 6: 135-164.
5. Rodriguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesions R, Cremata J, Falcon V, Sanchez G, Breingas R, Cordoves C, Valdes M, Llecnart R, Herrera L, de-la-Fuente J. 1994. High level of expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast P. pastoris forming highly immunogenic particles for cattle. J Biotechnol 1994; 33: 135-146.
6. Rodriguez M, Penchet S, Labarta VM, Lorenzo L, Luaces R, Rubiera C, Cordoves C, Sanchez PA, Ramos E, Soto A, Camales M, Palenzuela D, Triguero A, Llecnart R, Herrera L, de-la-Fuente J. Control of Boophilus microplus populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm 86 antigen preparation. Vet Parasitol 1995; 57: 339-349.
7. Zimmermann G. Metarhizium anisopliae an entomopathogenic fungus. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer 1992; 45: 113-128.
8. Milner RJ, Peter S, Richard M. Persistence of Conidia of Metarhizium aniospliae in Sugarcane Field: Effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years. Biocontrol Science and Technology 2003; 13: 507-516.
9. มลิวัลย์ ปันยารชุน. การผลิตและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา Metarhizium anisopliae var. rhinoceros แมลงและสัตว์ศัตรูพืช. รายงานการประชุมวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยาครั้งที่2 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ : กอง , 2523 : 423 -31.
10. Krutmuang P. Laboratory studies on green muscardine fungus, Metarhizium anisopliae for control of termites (Isoptera). Bangkok : Master degree. Kasetsart University, 1996
11. วิวัฒน์ เสือสะอาด , พิมพรรณ สมมาตย์ , ศิติภา นักขัตระ , วิมลมาศ โอสถเสน , อาภรณ์ ปั้นทองคำ. การเพิ่มปริมาณเชื้อรา Metarhizium anisopliae และการนำไปใช้ควบคุมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย Dorysthenes buqueti Guerin (Coleoptera: Cerambycediae) ในสภาพไร่. การประชุมวิชาการประจำปี 2548 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ. กรุงเทพ : ศูนย์ , 2548 : 1 -13.
12. Ansari MA, Vestergaard S, Tirry L, Moens M. Selection of a highly virulent fungal isolate, Metarhizium anisopliae CLO 53, for controlling Hoplia philanthus. J Invertebr Pathol 2004; 85: 89-96.
13. Hashim N, Ibrahim YB. Efficacy of entomopathogenic fungi, Paecilomyces fumosoroseus, Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae var. majus against Crocidolomia binotalis (Lepidoptera: Pyralidae). Pertanika. J Trop Agric Sci 2003; 26
14. Ibrahim YB, Liu F. Comparative pathogenicity of several isolates of Metarhizium anisopliae on Plutella xylostella (Lepidoptera: Yponomeutidae). J Biosci 2001;12: 45-50.
15. Scholte EJ, Knols BG, Takken W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae amongst adults of the malaria vector Anopheles gambiae s.s. Malar J 2004;28: 45.
16. Campos RA, Arruda W, Boldo JT, daSilva MV, deBarros NM, deAzevedo JL, Schrank A, Vainstein M.H.. Boophilus microplus infection by Beauveria amorpha and Beauveria Bassiana: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. Current Micro 2005;50: 257-261.
17. Garcia MV, Monteiro AC, Szabo MJP, Prette N, Bechara GH. Mechanism of infection and colonization of Rhipicephalus sanguineus eggs by Mertarhizium anisopliae as revealed by

scanning electron microscopy and hitopathology. Brazil. J Micro 2005;36: 368-372.
18. Kaaya GP, Mwangi EN, Ouna EA. Prospects for biological control of livestock ticks, Rhipicephalus appendiculatus and Amblyomma variegatum, using the entomogenous fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae. J Invertebr Pathol 1996;67: 15-20.
19. Sengonca C, Thungrabeab M, Blaeser P. Potential of the different isolates of entomopathogenic fungi from Thailand as biological control agents against western flower thrips, Frankliniella occidentalis (PERGANDE) (Thys., Thripidae). J Plant Dis Protect 2006;113: 74-80.
20. Barci LAG. Biological control of the cattle tick Boophilus microplus (Acari, Ixodidae) in Brazil. Arq Inst Biol1997; 64: 95-101.
21. Cherepanova NP. Fungi which are found on ticks. Bot Z Mosk 1964; 49: 696 - 9.
22. Hall RA, Papierok B. Fungi as biological control and medical importance. Parasitology 1982; 84
23. Kalsbeek V, Frandsen F, Steenberg T. Entomopathogenic fungi associated with Ixodes ricinus ticks. Exp Appl Acarol 1995;19: 45-51.
24. Samsinakova A, Kalalova S, Daniel M, Dusbabek F, Honzakova E, Cerny V. Entomogenous fungi associated with the tick Ixodes ricinus. Folia Prarasitol Prague 1974;21: 39-48.
25. Tanada Y, Kaya HK. Insect pathology. San Diego Academic 1993; 666 p.
26. Castineiras A, Jimeno G, Lopez M, Sosa LM. Effect of Beauveria bassiana, Metarhizium anisophiae (Fungi, Imperfecti) and Pheidole megacephala (Hymenoptera, Formicidae) on eggs of Boophilus microplus (Acarina: Ixodidae). Rev Salud Anim 1987;9: 288-93.
27. Correia ACB, Monterio AC, Fiorin C.The effect of Metarhizium anisoptiae concentrations on Boophilus microplus under laboratory conditions. Sim Control Biol Gramado RS Anais 1994;4: 98.
28. Bittencourt VREP, Massard CL, Lima AF. The action of Metarhizium anisopliae at free living stages of Boophilus microplus. Rev Univ Rural Ser Cienc Vida 1994;16: 49-55.
29. Bittencourt VREP, Massard CL, Lima AF. The action of Metarhizium anisopliae, at eggs and larvae of tick Boophilus microplus. Rev Univ Rural Ser Cienc Vida 1994; 16: 41-7.
30. Zhioua E, Browning M, Johnson PW, Ginsberg HS, Lebrun RA. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus Metarhizum anisopliae (Deuteromycetes) to Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). J Parasitol 1997;83:815-8.