

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฝอยทองและแบคทีเรีย ต่อการควบคุมไรไข่ปลา

Acaricidal Properties of *Cuscuta* spp. Crude Extracts and Bacteria against *Luciaphorus perniciosus*

กิริติ ตันเรือน¹ สุภัก คณดารา¹ เรืองวุฒิ ชุตินา¹ ทิหวัด นพารุณ² และ พิสิทธิ์ พูลประเสริฐ^{1*}

Keerati Tanruean¹, Suphak Kondara¹, Ruangwut Chutima¹, Tiwtawat Napiroun² and Pisit Poolprasert^{1*}

Received: 21 April 2020, Revised: 10 June 2020, Accepted: 22 June 2020

บทคัดย่อ

ไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack, 1983) เป็นศัตรูสำคัญของการผลิตเห็ดในประเทศไทยทำให้การผลิตเห็ดลดลงได้ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. และ *C. chinensis* Lam. และแบคทีเรียเพื่อการควบคุมไรไข่ปลาในเห็ดหูหนู เตรียมสารสกัดหยาบจากฝอยทองที่ระดับความเข้มข้นที่ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v และการเตรียมสารละลายของแบคทีเรียที่แยกได้จากเห็ด ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/mL ในการทดสอบสารด้วยการสัมผัส ใช้ไรไข่ปลาในระยะท้องจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว/ความเข้มข้น/สารสกัด โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดเป็นอาหาร และทดสอบอัตราการตายที่ระยะ 3, 5, 7 และ 9 วัน พบว่า สารสกัดหยาบจากต้นฝอยทองชนิด *C. reflexa* มีค่า LC_{50} ต่อไข่ของไร ที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน เท่ากับ 22.86, 12.25, 5.87 และ 2.01% w/v ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดหยาบจากต้นฝอยทองชนิด *C. chinensis* มีค่า LC_{50} ต่อไข่ของไร เท่ากับ 16.59, 7.34, 2.18 และ 1.78% w/v ตามลำดับ ทั้งนี้ความเข้มข้นที่ 5% w/v ฝอยทองชนิด *C. chinensis* มีผลทำให้ไรตายร้อยละ 100 ภายหลังการทดสอบที่ 7 วัน สำหรับฝอยทองชนิด *C. chinensis* และที่ 9 วัน สำหรับฝอยทองชนิด *C. reflexa* ในทางตรงกันข้ามสารละลายของแบคทีเรียในการทดสอบครั้งนี้ไม่สามารถยับยั้งไรไข่ปลาระยะท้องได้ แม้กระนั้นก็ตามผลการวิจัยนี้ มีข้อเสนอแนะว่าสารสกัดจากฝอยทองทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อป้องกัน และกำจัดไรไข่ปลา และไรชนิดอื่นๆ ที่เข้าทำลายฟาร์มเห็ด

คำสำคัญ: สารสกัดฝอยทอง, ไรไข่ปลา, แบคทีเรีย, เห็ดหูหนู

¹ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

¹ Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand.

² สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี 12120

² Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand.

* ผู้เขียนที่ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): poolprasert_p@psru.ac.th

ABSTRACT

The pyemotid mite (*Luciaphorus perniciosus* Rack, 1983) associated with several commercial mushrooms in Thailand that could result in the decline of mushroom cultivation. Therefore, the bioefficacies of *Cuscuta reflexa* and *C. chinensis* crude extracts and bacteria isolated from mushroom for controlling *L. perniciosus* infesting Jew's ear mushroom (*Auricularia auricular* (Hook.) Underw.) were assessed in this study. Different concentrations of *Cuscuta* spp. crude extracts (0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5% w/v) and the solution of each bacterium (1×10^8 CFU/mL) were prepared. The contact bioassay was designed in a completely randomized triplicate. A total of ten pregnant females of *L. perniciosus* were tested in each replication and concentration containing a sorghum seed inoculated with mycelia as food. After 3-, 5-, 7- and 9-day exposure, it was found that *C. reflexa* stem ethanolic extract exhibited median lethal concentrations to kill 50% (LC_{50}) of the treated mites in 3, 5, 7 and 9 days of 22.86, 12.25, 5.87 and 2.01% w/v, respectively. Meanwhile, *C. chinensis* stem ethanolic extract displayed LC_{50} of 16.59, 7.34, 2.18 and 1.78% w/v, respectively. In terms of the mortality rate, the concentration at 5% w/v in both crude plant extracts showed effectiveness in killing pregnant mites with 100% mortality after exposure for 7 days (*C. chinensis*) and 9 days (*C. reflexa*). Conversely, the solution of all isolated bacteria could not kill pyemotid at this time. Nevertheless, these results suggested that both plant extracts are likely to be further applied as a biopesticide in preventing *L. perniciosus* and other mite pests of mushroom devastating the mushroom farm.

Key words: *Cuscuta* spp. extract, *Luciaphorus perniciosus*, Bacteria, *Auricularia auricular*

บทนำ

ปัจจุบันการเพาะเห็ดของเกษตรกรยังคงประสบกับปัญหาการเข้าทำลายเส้นใยเห็ดของไรศัตรูเห็ด ซึ่งปัญหาไรศัตรูเห็ดจะมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นเมื่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเห็ดนำถุงก้อนเชื้อเห็ดที่ถูกไรศัตรูเห็ดทำลายทิ้งไว้ใกล้บริเวณหรือภายในโรงเพาะเห็ดจะกลายเป็นแหล่งขยายพันธุ์ไรศัตรูเห็ดการลงทำลายของไรศัตรูเห็ดทำให้เส้นใยเห็ดขาด ไม่สามารถออกดอกและตายในที่สุด นอกจากนั้นยังเป็นสัตว์พาหะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราโรคเห็ด เมื่อเกิดการระบาดจะทำให้ผลผลิตเห็ดลดลง โดยไรศัตรูเห็ดที่พบการระบาดสร้างความเสียหายให้กับฟาร์มเพาะเห็ดในประเทศไทยที่พบรายงานโดย

Kulpiyawat (2003) มีหลายชนิด อาทิ ไรลูกโป่ง (*Dolichocybe indica* Mahunka, 1970) ไรขาวใหญ่ (*Histiostoma bakeri* Hughes & Jackson, 1958) ไรคืด (*Formicomotes heteromorphus* Magowski, 1988) และไรไข่ปลา (*Luciaphorus perniciosus* Rack, 1983) เป็นต้น โดยเฉพาะไรไข่ปลาที่พบเป็นไรศัตรูเห็ดที่สำคัญเนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ไรไข่ปลามีการเจริญเป็น 2 ระยะ คือ (1) การเจริญระยะเอ็มบริโอ (Embryonic stage) ตั้งแต่เซลล์ไข่จนถึงตัวอ่อน โดยระยะไข่ มีลักษณะเป็นเม็ดกลมใสเล็กน้อยเท่าหัวเข็มหมุดขึ้นเบียดเสียดกันแน่นเป็นกระจุกคล้ายไข่ปลาเป็นระยะแพร่ขยายพันธุ์ ในระยะไข่สามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะย่อยได้แก่ ระยะ

ที่ 1 และ ระยะที่ 2 จัดเป็นระยะต้น (Early stage) เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงภายในไข่มองเห็นไข่มีลักษณะใสและยังไม่ปรากฏให้เห็นรยางค์ ส่วนระยะที่ 3-5 จัดเป็นระยะปลาย (Later stage) เป็นระยะที่เริ่มมีรยางค์เกิดขึ้นจนสามารถมองเห็นรยางค์ได้ชัดเจน และ (2) การเจริญระยะหลังเอ็มบริโอ (Postembryonic stage) หลังจากตัวอ่อนระยะสุดท้ายจนถึงตัวเต็มวัย ทั้งนี้ทุกระยะของไข่เจริญอยู่ภายในเปลือกไข่ในลำตัวของตัวแม่ตลอดเวลา เมื่อโตเต็มที่ก็จะฟักออกจากไข่เป็นเต็มวัยทันที โดยตัวเต็มวัยส่วนมากจะฟักออกจากไข่ตั้งแต่ไข่ยังอยู่ภายในท้องของตัวแม่ แต่มีบางครั้งที่ตัวเต็มวัยฟักออกจากไข่ภายหลังที่ลำตัวของตัวแม่แตกออกแล้ว โดยระยะนี้ไรสามารถเคลื่อนที่ได้และจะทำให้เกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว (Pumnuan *et al.*, 2009; Bussaman *et al.*, 2017) ทั้งนี้เมื่อพบปัญหาไรเห็ดเกษตรกรมักจะใช้สารเคมีเนื่องจากเป็นวิธีการควบคุมไรศัตรูเห็ดที่ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพและสามารถควบคุมการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วโดยสารเคมีที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น carbaryl, tebufenpyred, pyridaben, abamectin เป็นต้น โดย Babar *et al.* (2005) ได้ศึกษาการควบคุมไรเห็ดด้วยสารเคมี dicofol, abamectin และ hexythiazox ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับพบว่าสารที่ใช้ทั้งหมดสามารถลดจำนวนประชากรของไรเห็ดได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการควบคุมไรศัตรูเห็ดมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถใช้ควบคุมการแพร่ระบาดในช่วงการเปิดดอกเห็ดเพราะสารเคมีจะตกค้างในเห็ดซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เกษตรกรและสิ่งแวดล้อม รวมถึงส่งผลต่อคุณภาพของดอกเห็ด ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและพัฒนาการใช้วิธีทางชีวภาพทั้งการใช้สารสกัดจากพืชและการใช้จุลินทรีย์เพื่อเป็นทางเลือกแก่เกษตรกรในการควบคุมไรเห็ด แทนการใช้สารเคมี ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรกลายเป็นที่นิยมอย่าง

มาก เนื่องจากสารสกัดจากพืชไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงมีการแนะนำให้ใช้สารสกัดจากพืชเป็นทางเลือกในการควบคุมไรศัตรูเห็ด (Bussaman *et al.*, 2012)

จากที่มีการประกาศพิษสมุนไพรอันตรายหลายชนิด เป็นวัตถุอันตรายประเภทที่ 1 ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2552 ทำให้เกษตรกรที่เพาะเห็ดในฟาร์มเห็ดอินทรีย์ไม่สามารถใช้พืชสมุนไพรที่ถูกขึ้นทะเบียนเป็นวัตถุอันตรายดังกล่าวได้จึงต้องหาพืชที่ทำลายไรเห็ดแต่ไม่ทำลายเส้นใยเห็ด โดยฝอยทอง (*Cuscuta* sp.) เป็นพืชจำพวกกาฝากขึ้นเกาะและดูดน้ำเลี้ยงจากพืชชนิดอื่นทั้งไม้ยืนต้น ไม้ล้มลุก รวมถึงวัชพืช ในประเทศไทยสามารถพบฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. และ *C. chinensis* Lam. ได้มากที่สุด โดยชนิด *C. reflexa* มีลักษณะลำต้นเป็นสีเหลืองหรือสีเขียว หรือสีทองแกมเขียว อวบน้ำ และมีลักษณะคล้ายเส้นหนวดแข็งแรง (ภาพที่ 1ก) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2.5 มิลลิเมตร และมีความยาวได้ประมาณ 1-3 เมตร ไม่มีใบ ดอกเล็กค่อนข้างกลม ออกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มไม่มีก้านดอก กลีบเลี้ยงรูปถ้วยกลีบดอกสีขาว เชื่อมติดกันเป็นรูปประฆัง ปลายแยกเป็น 5 กลีบ งอรั้ง ส่วนชนิด *C. chinensis* มีลักษณะเป็นเส้นกลม มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเหลืองทอง (ภาพที่ 1ข) แต่มีขนาดเล็กกว่าชนิด *C. reflexa* ใบมีขนาดเล็กรูปสามเหลี่ยม ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกมีขนาดเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร เชื่อมติดกันเป็นรูปถ้วย ส่วนปลายกลีบจะมน แยกออกเป็น 5 แฉก กลางดอกมีเกสรตัวผู้ 5 อัน ตัวเมีย 2 อัน ผลมีลักษณะกลมแบนมีขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร และมีเมล็ด 2 ถึง 4 เมล็ด ลักษณะค่อนข้างกลมรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร สีเหลืองอมเทา



ภาพที่ 1 ลักษณะของฝอยทอง (ก) ฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. และ (ข) ฝอยทองชนิด *Cuscuta chinensis* Lam.

เนื่องจากต้นฝอยทองสามารถเจริญเติบโตได้ง่ายจะใช้เวลาไม่นานในการขึ้นปกคลุมพืชถูกอาศัยและทำให้พืชถูกอาศัยตาย จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการรายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีของฝอยทองว่าประกอบด้วยสารเคมีหลายกลุ่ม อาทิ Flavonoids, Phenolic acids, Sterols, Hydroquinone, Terpenes, Lignans, Polysaccharides, Resin glycosides and Fatty acids (Patel *et al.*, 2012; Bais and Kakkar, 2013) และมีรายงานถึงการนำต้นฝอยทองมาใช้ประโยชน์ในด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ (Functional food) และฝอยทองนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Mateen *et al.*, 2011) และมีฤทธิ์ต้านไวรัสฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ (Vijikumar *et al.*, 2011; Perveen *et al.*, 2013; Tanruean *et al.*, 2017) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดส (Tanruean *et al.*, 2019a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากฝอยทองมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ (Tanruean *et al.*, 2019b) อีกทั้งยังสามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายและสามารถเจริญเติบโตได้ทุกพื้นที่ของประเทศไทย สำหรับการควบคุมไรศัตรูเห็ดด้วยจุลินทรีย์สามารถใช้ได้ทั้งเชื้อรา โดยกลุ่มของเชื้อราที่มีการนำมาใช้คือ เชื้อราบิวเวอเรีย บาสเซียนา (*Beauveria bassiana*) เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (Bugti *et al.*, 2018; Alali *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามจากข้อแนะนำให้ใช้ในการฉีดพ่นทั่วโรงเรือนเพื่อควบคุมการระบาดของไรศัตรูเห็ดของ

เชื้อราบิวเวอเรียต้องใช้เวลาในการเข้าทำลายไรศัตรูเห็ด ส่วนการใช้แบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากดอกเห็ด กำลังได้รับความนิยมนอกจากไม่ทำลายเส้นใยเห็ด (Yenjit and Intana, 2016) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากต้นฝอยทองและแบคทีเรียต่อการควบคุมไรไข่ปลา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างฝอยทอง

สำรวจและเก็บตัวอย่าง โดยเก็บฝอยทองชนิด *Cuscuta chinensis* Lam. ในพื้นที่จังหวัดสุโขทัย อำเภอศรีสัชนาลัย (17°23'20.0394"N 99°48'1.0794"E) และ อำเภอศรีสำโรง (17°12'46.08"N 99°29'36.5994"E, 17°12' 52.92"N 99°29'28.32"E และ 17°13'29.2794"N 99°29'9.6"E) และฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. จากอำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง (18°8'9.8556"N 99°37'29.6904"E) ช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562 ซึ่งจากการสำรวจพบว่าฝอยทองจากทั้งสองแหล่งนี้มีปริมาณมากพอที่จะนำมาใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงและเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบต่างๆ โดยนำตัวอย่างมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำทุกส่วนของฝอยทองมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้สกัดต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดจากฝอยทอง

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดพืชตัดแปลงจากงานวิจัยของ Bussaman *et al.* (2012) โดยมีการนำตัวอย่างฝอยทองทั้ง 2 ชนิด (*C. chinensis* และ *C. reflexa*) ที่เตรียมไว้ 200 กรัม มาแยกสกัดด้วย 80 เปอร์เซ็นต์เอทานอล (80% v/v) ปริมาตร 1 ลิตร (1:5 น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วยเครื่อง Ultrasonicator (Daihan scientific WUC-DZZH, Korea) 60 นาที หลังจากนั้นนำสารสกัดมากรองด้วยผ้าขาวบางและกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.1) จากนั้นระเห็ดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปใช้ในการทดสอบจะใช้น้ำกลั่นในการละลายสารตัวอย่างและใช้เป็นชุดควบคุม

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากเห็ดหูหนู

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เรียดัดแปลงจากงานวิจัยของ Yenjit and Intana (2016) โดยนำดอกเห็ดหูหนูสด (*Auricularia auricular* (Hook.) Underw.) จากห้างหุ้นส่วนสามัญ วิสาหกิจชุมชน กลุ่มเพาะเห็ดบ้านท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ผสมส่วนใสเพื่อทำการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-3} เท่า คูลสารแขวนลอยปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่แตกต่างกันมา Steak plate บนอาหาร NA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบลักษณะโคโลนี การดัดสีแกรม รูปร่าง และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme) ให้รหัสตัวอย่างแบคทีเรียเป็น PSRU-ABXX และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การทดสอบผลของสารสกัดจากฝอยทองและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด

1. การทดสอบผลของสารสกัดจากพืชตัดแปลงจากงานวิจัยของ Koohakan *et al.* (2014) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ด้วยวิธี Paper disc diffusion

การทดสอบผลของสารสกัดจากฝอยทองต่อการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนู ด้วยวิธี Paper disc diffusion ระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2562 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อขณะร้อนมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อจาน ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (Linnaeus) Moench) ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่วางบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อปล่อยให้เชื้อเจริญโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5 เซนติเมตร แล้วหยดสารสกัดจากฝอยทอง (ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v) ลงบน Paper disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางทางมุมบนและล่างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเส้นใยเห็ดโดยดูจากการเกิดวงใส (Clear zone) ของ Paper disc ที่วางทางมุมบนและล่างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชุดการทดลอง

1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ด้วยวิธี Poison media

การทดสอบผลของสารสกัดจากฝอยทองต่อการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนูด้วยวิธี Poison media ระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2562 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บรรจุลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่ง

ฆ่าเชื้อทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจาะส่วนปลายเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วเย็บใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PDB จำนวนขวดละ 3 ขัน หยดสารสกัดจากฝอยทองที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ถ่ายเชื้อเห็ดแล้ว นำไปเขย่าแบบหมุนเหวี่ยง (Rotary Shaker) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปกรองเอาเฉพาะเส้นใยเห็ดด้วยกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันจึงนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดจนน้ำหนักคงที่ในแต่ละชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2. เชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบผลของเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อเห็ดทำได้โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วตัดชิ้นส่วนของเชื้อเห็ด ด้วย Cork borer (5 มิลลิเมตร) มาวางตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย โดยให้ห่างจากปลายเส้นใยของเชื้อเห็ด 3 เซนติเมตร จำนวน 4 จุดในแนวกากบาท บ่มจานอาหารเพาะเลี้ยงทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดบริเวณยับยั้งเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝอยทองและแบคทีเรียต่อไรโซปลาในระยะท้อง

1. การทำหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างด้วยน้ำสะอาด คัดเมล็ดลึบออกให้หมด และแช่น้ำไว้ 1 คืน เพื่อให้เมล็ดนึ่ม จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำเปล่าอีก 3 ครั้ง นำไปนึ่งจนกระทั่งเมล็ดข้าวฟ่างบานหรือสุก จากนั้นล้างน้ำเปล่าอีก 1 ครั้งนำไปผึ่งลม พอให้เมล็ดข้าวฟ่าง

แห้งหมาดๆ ให้มีความชื้นประมาณ 60% กรอกใส่ขวดแก้วที่สะอาด ประมาณ 1/2 - 2/3 ของขวดแล้วปิดปากขวดด้วยสำลี หุ้มกระดาษเพื่อป้องกันไอน้ำและรัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเย็บหัวเชื้อเห็ดหนูลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง เก็บขวดเมล็ดข้าวฟ่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เส้นใยเจริญ (Koohakan *et al.*, 2014)

2. การเพิ่มปริมาณไรโซปลา

การเพิ่มปริมาณไรโซปลาเพื่อใช้ในการทดลอง ใส่เมล็ดข้าวฟ่างสูง 0.5 เซนติเมตรจากก้นขวด ปากกว้าง 5 เซนติเมตร สูง 8.5 เซนติเมตร (Saringkaphaibu *et al.*, 2000) เย็บไรโซปลา ระยะท้องจากห้างหุ้นส่วนสามัญ วิสาหกิจชุมชน กลุ่มเพาะเห็ดบ้านท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก ลงไปเลี้ยงไว้ และนำไรโซปลา ระยะไข่ในระยะต้น (Early stage) รุ่นที่สองไปใช้ในการทดลอง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝอยทองและแบคทีเรียต่อไรโซปลาในระยะท้อง

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝอยทองต่อไรโซปลา โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Chaowattanawong *et al.* (2011) ทำการทดสอบในระหว่างเดือนสิงหาคม-กันยายน พ.ศ. 2562 ซึ่งทำการทดสอบกับไรโซปลา ระยะท้อง โดยในระยะนี้จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมใสขนาดเท่าหัวเข็มหมุด ทำการหยดสารสกัดจากฝอยทองที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v) และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงบนเมล็ดข้าวฟ่างหัวเชื้อเห็ดหนูที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ โดยให้สารสกัดจากฝอยทองและน้ำกลั่นเคลือบเมล็ดข้าวฟ่างและจานเพาะเชื้อให้ทั่ว หลังจากนั้นเย็บไรโซปลา ระยะท้องจำนวน 10 ตัว/ความเข้มข้น/สารสกัด/จำนวน 3 ซ้ำ ลงบนเมล็ดข้าวฟ่างหัวเชื้อเห็ดหนูแล้วปิดฝาจนแก้วให้สนิท

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของไรโซปลาในระย Early stage (Stages 1-2) ระย Later stage (Stages 3-5) การฟักและการตายสะสมของไรโซปลาในระยะทอเป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบจำนวนตาย (ค่าเฉลี่ยจำนวนตาย) ของไรโซปลาหลังจากที่ได้รับสารสกัดจากฝอยทองทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อไรโซปลาทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NA เป็นเวลา 5 วัน และชุบเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท (1×10^8 CFU/mL) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเมล็ดข้าวฟ่างหั่วเชื้อเห็ดหูหนูที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ โดยให้สารละลายแบคทีเรียและน้ำกลั่นเคลือบเมล็ดข้าวฟ่างและจานเพาะเชื้อให้ทั่วถึงหลังจากนั้นเชื้อไรโซปลาตัวเต็มวัยเพศเมียระยะทอจำนวน 10 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ ลงบนเมล็ดข้าวฟ่างหั่วเชื้อเห็ดหูหนูแล้วปิดฝาจานแล้วให้สนิท บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของไรโซปลาในระย Early stage (Stages 1-2) ระย Later stage (Stages 3-5) การฟักและการตายสะสมของไรโซปลาในระยะทอเป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบจำนวนตาย (ค่าเฉลี่ยจำนวนตาย) ของไรโซปลาหลังจากที่ได้รับสารละลายแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

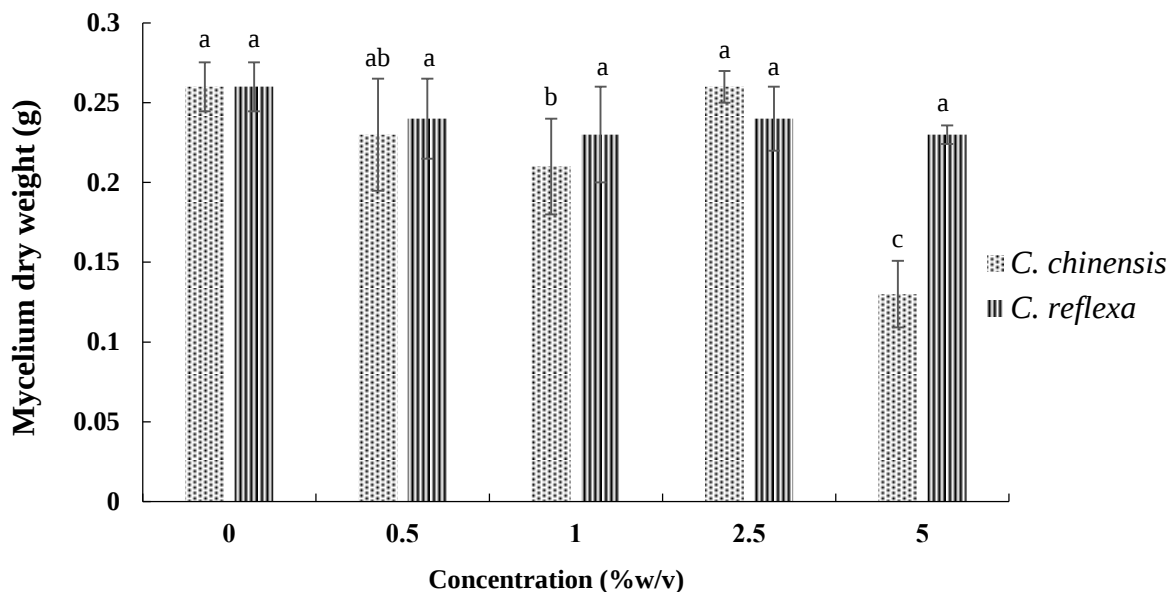
วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ด้วย F-test พร้อมทั้งการเปรียบเทียบข้อมูลภายหลังวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการตายด้วย t-test และค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่ทำให้ไรโซปลาในการทดลองตายไปเป็นจำนวนครั้งหนึ่ง (Median lethal concentration, LC_{50}) โดยวิธี Probit analysis โดยกำหนดให้ไรโซปลาที่ถูกทดสอบ ไม่ตอบสนองการเคลื่อนไหวต่อสิ่งเร้าหรือไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ให้ถือว่ามีการตายเกิดขึ้น วิเคราะห์ข้อมูล

ทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 25.0 สำหรับโปรแกรม Windows (IBM Corp, 2017)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลการทดสอบสารสกัดจากฝอยทองและแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหูหนู

ผลการศึกษาของสารสกัดจากฝอยทองต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหูหนู โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น (0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v) และบันทึกผลการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดของฝอยทองทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหูหนู โดยขนาดของโคโลนีและลักษณะของเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และจากการทดสอบผลของสารสกัดจากฝอยทองต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหูหนู โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Poison media ที่ระดับความเข้มข้น (0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v) หลังจากนำไปเขย่าแบบหมุนเหวี่ยง (Rotary Shaker) เป็นเวลา 7 วัน แล้วหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหูหนู พบว่า น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหูหนูที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบฝอยทองชนิด *C. reflexa* เท่ากับ 0.24, 0.23, 0.24 และ 0.23 กรัม ตามลำดับ และฝอยทองชนิด *C. chinensis* เท่ากับ 0.23, 0.21, 0.26 และ 0.13 กรัม ตามลำดับ ขณะที่น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหูหนูในชุดควบคุมเท่ากับ 0.26 กรัม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากฝอยทองชนิด *C. reflexa* ทุกความเข้มข้น และชนิด *C. chinensis* ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.5% w/v ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหูหนูยกเว้นสารสกัดหยาบฝอยทองชนิด *C. chinensis* ที่ระดับความเข้มข้น 5.0% w/v มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหูหนูถึงร้อยละ 50 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหูหนูในอาหารเหลวที่เติมสารสกัดจากฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* และ *Cuscuta chinensis* ตัวอักษรที่แตกต่างในแต่ละชุดข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่าการทดสอบผลของสารสกัดหยาบโดยอาศัยการระเหยของสารออกฤทธิ์ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อเห็ดหูหนูแม้จะใส่สารสกัดจากฝอยทองที่มีความเข้มข้นสูง ขณะที่การให้เชื้อเห็ดสัมผัสกับสารสกัดจากฝอยทองโดยตรง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงจะมีผลทำให้เส้นใยเห็ดหูหนูเจริญได้ช้าลง หลักการนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการเจริญของเชื้อเห็ด โดย Koohakan *et al.* (2014) พบว่าผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (Dc. ex Nees)) และตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* Rendle.) มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont), เห็ดแป้อ (Pleurotus abalonus Han), เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.), เห็ดบด (*Lentinus polychrous* Lev.), เห็ดตีนแรด (*Tricholoma crissum* (Berk.) Sacc), เห็ดหูหนู

(*Auricularia auricular* (Hook.) Underw.) และเห็ดฮังการี (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer) มากกว่า 50% ขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลท (PSRU-AB 01-PSRU-AB 08) โดยมีลักษณะโคโลนีที่พบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่แตกต่างกัน ซึ่งพบทั้งโคโลนีลักษณะขอบเรียบสีเหลืองอ่อน ขอบเรียบสีขาว โคโลนีลักษณะนูน โคโลนีลักษณะเยิ้ม รวมถึงโคโลนีลักษณะเหมือนกำมะหยี่ นอกจากนี้เมื่อทำการย้อมสีแกรมและตรวจลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยรูปร่างได้กล้องจุลทรรศน์ที่พบมีสองแบบ ได้แก่ แบบกลม (Coccus) และแบบท่อนสั้น (Short rod) ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท มาทดสอบผลของเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนูพบว่าแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท (PSRU-AB02, PSRU-AB03, PSRU-AB04, PSRU-AB05 และ PSRU-

AB06) ที่ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหูหนู ส่วนการเจริญของแบคทีเรียอีก 3 ไอโซเลท (PSRU-AB01, PSRU-AB07 และ PSRU-AB08) มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูอย่างชัดเจน จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาการ

กำจัดไรโซปลา ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท (PSRU-AB02, PSRU-AB03, PSRU-AB04, PSRU-AB05 และ PSRU-AB06) ที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนูไปทดสอบหาประสิทธิภาพในการกำจัดไรโซปลา

ตารางที่ 1 ลักษณะของแบคทีเรียและผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนู

แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี	สีแกรม/รูปร่าง	การทดสอบเอนไซม์ อะเลส	การยับยั้งการ เจริญของเห็ด
PSRU-AB01	ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน	+ / Coccus	+	ยับยั้ง
PSRU-AB02	ขอบเรียบ สีขาว	- / Coccus	+	ไม่ยับยั้ง
PSRU-AB03	ขอบเรียบ สีขาว	- / Short rod	+	ไม่ยับยั้ง
PSRU-AB04	ขอบเรียบ สีขาว ตรงกลางโคโลนี ลักษณะนูน	+ / Short rod	+	ไม่ยับยั้ง
PSRU-AB05	ขอบหยัก สีขาว ผิวโคโลนีเยิ้ม	+ / Short rod	+	ไม่ยับยั้ง
PSRU-AB06	ขอบเรียบ สีขาว	- / Coccus	-	ไม่ยับยั้ง
PSRU-AB07	ขอบเรียบ สีขาว โคโลนีเยิ้ม	+ / Short rod	+	ยับยั้ง
PSRU-AB08	ขอบหยัก สีขาว ผิวโคโลนีลักษณะ เหมือนกำมะหยี่	- / Coccus	+	ยับยั้ง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝอยทองและแบคทีเรียต่อไรโซปลา ระยะท้อง

ผลการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากฝอยทองทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น (0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0% w/v) และแบคทีเรีย (1×10^8 CFU/mL) ต่อไรโซปลา ระยะท้อง โดยทดสอบอัตราการตายสะสม ณ เวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน พบว่าสารสกัดหยาบจากฝอยทองทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักร่วมต่อปริมาตร ไม่สามารถยับยั้งไรโซปลาภายใต้สภาวะทดสอบได้ ขณะที่สารสกัดฝอยทองชนิด *C. reflexa* ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0% w/v มีฤทธิ์ฆ่าไรโซปลาโดยความเข้มข้น 2.5% w/v มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 10.00, 16.67, 26.67 และ 83.33% ของวันที่ 3, 5, 7

และ 9 วัน ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 5.0% w/v มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 13.33, 23.33, 36.67 และ 100.00% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ และสารสกัดฝอยทองชนิด *C. chinensis* ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0% w/v เท่านั้นที่มีฤทธิ์ฆ่าไรโซปลาโดยความเข้มข้น 2.5% w/v มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 10.00, 16.67, 73.33 และ 93.33% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 5.0% w/v มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 16.67, 30.00, 100.00 และ 100.00% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายเฉลี่ยพร้อมทั้งการเปรียบเทียบข้อมูลด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้อัตราการตายแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการให้สารสกัดจากฝอยทอง 3, 5, 7 และ 9 วัน ($p < 0.05$) โดยสารสกัดหยาบจากฝอยทองชนิด *C. reflexa* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 22.86, 12.25, 5.87 และ 2.01% w/v ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากฝอยทองชนิด *C. chinensis* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 16.59, 7.34, 2.18 และ 1.78% w/v ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฝอยทองทั้ง 2 ชนิดต่อไรโซปลาในระยะท้องพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 5.0% w/v มีผลทำให้ไรโซปลา ระยะท้องตาย 100% โดยฝอยทองชนิด *C. reflexa* ใช้เวลา 9 วันและชนิด *C. chinensis* ใช้เวลา 7 วัน แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากฝอยทองต่อแมลงจะยังไม่มีรายงานมาก่อนแต่จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดฝอยทองที่พบสารเคมีโดยเฉพาะสารกลุ่ม terpene ที่ทราบกันดีว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์ของจุลินทรีย์อีกทั้งยังเป็นกลุ่มสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ของแมลง (Dambolena *et al.*, 2016; Sieniawska *et al.*, 2017) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากฝอยทองสามารถใช้กำจัดไรโซปลาในระยะท้องได้และใช้เวลาในการออกฤทธิ์สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Chaowattanawong *et al.* (2011) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากพืช 8 ชนิดในการป้องกันกำจัดไรโซปลาในระยะท้อง และระยะท้องในเห็ดหูหนู โดยระยะท้องพบว่าหลังจาก 24 ชั่วโมงพบจำนวนไรโซปลาตัวเต็มวัยระยะท้องตายเฉลี่ย 32.00-48.25 ตัว จาก 50 ตัว ยกเว้นสารสกัดจากสะเดาที่พบเฉลี่ย 32 ตัว โดยในตัวเต็มวัยระยะท้อง หลังจากหยดสาร 10 วัน พบว่าสารสกัดจากพืชทุกชนิดพบจำนวนไรโซปลาตัวเต็มวัยระยะท้องตายเฉลี่ย 20 ตัว อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดพืชจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้ในการควบคุมตัวเต็มวัยของไรโซปลาในระยะท้องโดย Bussaman *et al.* (2012) ได้รายงานถึงผลการศึกษา

ความเป็นพิษสารสกัดจากพืช 23 ชนิดต่อไรโซปลา ซึ่งพบว่าหลังการทดสอบ 3 วัน สารสกัดจากเหง้าของว่านชักมดลูก และโพลีมีประสิทธิภาพที่ทำให้อัตราการตายของไรโซปลาสูงสุดถึงร้อยละ 100.00 ตามด้วย ขมิ้น (ร้อยละ 98.89) กระเทียม (ร้อยละ 97.78) กระชายดำ (ร้อยละ 88.89) และขิง (ร้อยละ 84.44) และสารสกัดจากใบของกะเพรา และสะระแหน่มีประสิทธิภาพถึงร้อยละ 100 นอกจากนี้พบว่าการใช้สารสกัดจากพืชในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกำจัดไรโซปลา จากงานวิจัยของ Pumnuan *et al.* (2009) ที่ทำการทดสอบการรมควันด้วยน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู, ตะไคร้หอม, ตะไคร้บ้าน และขมิ้นต่อไรโซปลาในระยะท้องพบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน และตะไคร้หอมมีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดส่งผลให้มีอัตราการตายร้อยละ 97.3 และ 95.8 ตามลำดับ และงานวิจัยของ Pumnuan *et al.* (2010) ที่ทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น หมีบัง และ เสม็ดขาว กับไรโซปลาโดยวิธีการสัมผัสและการรมควัน โดยทำการรมควันในภาชนะทดสอบขนาด $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ ตะไคร้ต้นเป็นพืชต่อไรโซปลามากที่สุดโดยวิธีการสัมผัสและการรมควันด้วยค่า LD_{50} (50% Lethal dose) เพียง 0.932 และ 0.166 $\mu\text{g} / \text{cm}^3$ ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยของ หมีบัง มีค่า LD_{50} เท่ากับ 2.793 และ 0.410 $\mu\text{g} / \text{cm}^3$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากฝอยทองทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการฆ่าไรโซปลาในระยะท้องซึ่งถือเป็นพืชทางเลือกอีกชนิดแก่เกษตรกรผู้เพาะพันธุ์เห็ดเนื่องจากฝอยทองเป็นวัชพืชที่พบได้ทั่วไป เจริญได้ง่ายและรวดเร็ว ในเบื้องต้นนั้นในการควบคุมไรศัตรูเห็ดด้วยสารสกัดหยาบฝอยทองมีข้อที่ต้องคำนึงถึงโดยชนิด *C. reflexa* ต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5% w/v นาน 9 วัน ส่วนสารสกัดฝอยทองชนิด *C. chinensis* ต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5% w/v นาน

7 วัน จึงจะสามารถกำจัดไรไข่ปลาระยะท้องไข่ ร้อยละ 100 อย่างไรก็ตามหากต้องใช้สารสกัดฝอยทองชนิด *C. chinensis* ในช่วงที่เส้นใยเจริญจนถึงการเปิดดอกเห็ดควรใช้ที่ความเข้มข้น 2.5% w/v นาน 9 วัน ซึ่งแม้ว่าจะกำจัดไรไข่ปลาได้ประมาณร้อยละ 93 แต่

ที่ความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเห็ดหนูหนูจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากฝอยทองสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการกำจัดไรไข่ปลาศัตรูเห็ด

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการฆ่าไรไข่ปลาของสารสกัดจากฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* และ *C. chinensis* ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สารสกัด	ความเข้มข้น (% w/v)	ร้อยละอัตราการตาย ($\bar{x} \pm S.D$)			
		3 วัน	5 วัน	7 วัน	100.00 $\pm$ 0.00c
<i>Cuscuta</i>	5.0	13.33 $\pm$ 5.77b	23.33 $\pm$ 5.77c	36.67 $\pm$ 5.77b	83.33 $\pm$ 15.27b
<i>reflexa</i>	2.5	10.00 $\pm$ 0.00b	16.67 $\pm$ 5.77b	26.67 $\pm$ 5.77b	0.00 $\pm$ 0.00a
	1.0	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a
	0.5	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a
	Control	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	2.01
	LC ₅₀ (% w/v)	22.86	12.25	5.87	100.00 $\pm$ 0.00c
<i>Cuscuta</i>	5.0	16.67 $\pm$ 5.77c	30.00 $\pm$ 0.00c	100.00 $\pm$ 0.00 c	93.33 $\pm$ 5.77b
<i>chinensis</i>	2.5	10.00 $\pm$ 0.00b	16.67 $\pm$ 5.77b	73.33 $\pm$ 5.77b	0.00 $\pm$ 0.00a
	1.0	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a
	0.5	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a
	Control	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	0.00 $\pm$ 0.00a	1.78
	LC ₅₀ (%w/v)	16.59	7.34	2.18	100.00 $\pm$ 0.00c

สำหรับการใช้แบคทีเรียในการกำจัดศัตรูเห็ดเป็นวิธีการทางชีวภาพอีกวิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยแบคทีเรียมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อศัตรูได้หลายวิธีทั้งการแข่งขัน (Competition) การทำลายชีวิต (Antibiosis) การเป็นปรสิต (Parasitism) เป็นต้น Yenjit and Intana (2016) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสในการควบคุมโรคราดำของเห็ดนางฟ้าภูฐานและพบว่าการใช้เชื้อบาซิลลัสสามารถควบคุมการเกิดโรคราดำได้ ขณะที่ Sobanbou *et al.* (2009) ศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายไรไข่ปลาของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp.

ที่อาศัยร่วมกับไส้เดือนฝอยวงศ์ Steinemematidae พบว่า *X. nematophila* มีประสิทธิภาพในการกำจัดไรไข่ปลาได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *X. nematophila* ที่มีอายุ 2 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิตร พบการตายของไรไข่ปลาเพศเมียคิดเป็นร้อยละ 88.34 อย่างไรก็ตามพบว่าการทดลองนี้แบคทีเรียที่แยกได้จากเห็ดหนูหนูจำนวน 5 ไอโซเลท (PSRU-AB02, PSRU-AB03, PSRU-AB04, PSRU-AB05 และ PSRU-AB06) ไม่สามารถฆ่าไรไข่ปลาระยะท้องไข่ได้สภาวะทดสอบได้และไรไข่ปลายังสามารถพัฒนาออกมาเป็นตัวเต็ม

วัยได้เมื่อเวลาผ่านไป 7 วันของการทดสอบเท่านั้น
ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแบคทีเรียอยู่ใน
ในระดับต่ำและสถานะที่นำไปใช้ยังไม่เหมาะสม

สรุป

สารสกัดฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. และ *C. chinensis* Lam. และแบคทีเรียต่อไรโซป
ปลาระยะท้อง ที่ระดับความเข้มข้น 5.0% w/v ของ
สารสกัดจากฝอยทองทั้งสองชนิดมีผลทำให้ไรโซปปลา
ระยะท้องตายร้อยละ 100 โดยฝอยทองชนิด *C.*
reflexa ใช้เวลา 9 วัน มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.01 %w/v
สารสกัดจากฝอยทองชนิด *C. chinensis* มีค่า LC_{50}
เท่ากับ 2.18 % w/v ใช้เวลา 7 วัน และ มีค่า LC_{50}
เท่ากับ 1.78 % w/v ใช้เวลา 9 วัน ขณะที่แบคทีเรียที่
ใช้ทดสอบไม่สามารถฆ่าไรโซปปลาระยะท้องได้และ
เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ไรโซปปลาสามารถพัฒนา
ออกเป็นตัวเต็มวัยได้ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้เป็น
การทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการจึงมีความ
จำเป็นต้องศึกษาในระดับพื้นที่หรือฟาร์มเพื่อให้
ทราบข้อมูลรวมทั้งสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อ
ประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝอยทองในการ
ควบคุมกำจัดไรโซปปลาและเป็นประโยชน์ต่อ
เกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟาร์มอินทรีย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราช
ภัฏภูเก็ตสงคราม จังหวัดภูเก็ต สำหรับการ
เอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย และ
กองทุนพัฒนาการวิจัยและบริหารจัดการงานวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ตสงคราม พ.ศ. 2562 ที่ให้ทุน
สนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Alali, S., Mereghetti, V., Faoro, F., Bocchi, S., Al
Azme, F. and Montagna, M. 2019.
Thermotolerant isolates of *Beauveria*
bassiana as potential control agent of
insect pest in subtropical climates. **PLoS**
ONE 14(2): 1-13. e0211457.
- Babar, M.H., Afzal, M., Bashir, M.H. and Asif, M.
2005. Chemical control of mushroom mite
(Tarsonimidae) at different time intervals
and concentrations of dicofol, abamectin
and hexythiazox. **Pakistan Journal of**
Agricultural Sciences 42(3-4): 42-44.
- Bais, N. and Kakkar, A. 2013. Comparative
phytochemical analysis of *Cuscuta reflexa*
parasite grown on *Cassia fistula* and *Ficus*
benghlensis by GC-MS. **International**
Journal of Pharmacy and Pharmaceutical
Sciences 5(4): 350-355.
- Bugti, G.A., Bin, W., Lin, H.F., Na, C. and Feng
L.H. 2018. Pathogenicity of *Beauveria*
bassiana strain 202 against sap-sucking
insect pests. **Plant Protection Science**
54(1): 111-117.
- Bussaman, P., Sa-uth, C., Chandrapatya, A.,
Atlihan, R., Gökçe, A., Saska, P. and Chi,
H. 2017. Fast population growth in
physogastry reproduction of *Luciaphorus*
perniciosus (Acari: Pygmephoridae) at
different temperatures. **Journal of**
Economic Entomology 110(4): 1397-
1403. <https://doi.org/10.1093/jee/tox102>.
- Bussaman, P., Sa-uth, C., Rattanasena, P. and
Chandrapatya, A. 2012. Effect of crude

- Plant plant extracts on mushroom mite, *Luciaphorus* sp. (Acari: pygmephoridae). **Psyche A Journal of Entomology** 2012 (ID 150958): 1-5. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/150958>.
- Chaowattanawong, P., Prasotphon, A. and Kongchuensin, M. 2011. **Plant extract for controlling *Luciaphorus perniciosus* Rack in Jew's Ear Mushroom**, pp. 413-147. Annual report 2011. Published documents, Plant protection research and development office, Department of Agriculture. (in Thai)
- Dambolena, J.S., Zunino, M.P., Herrera, J.M., Pizzolitto, R.P., Areco, V.A. and Zygadlo, J.A. 2016. Terpenes: natural products for controlling insects of importance to human health-A structure-activity relationship study. **Psyche: A Journal of Entomology** 2016(ID 4595823): 1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/4595823>.
- IBM Corp. 2017. **IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0**. Armonk, IBM Corp, NY.
- Kulpiyawat, T. 2003. **Mite pests of mushroom, Handout entitled "Insect-animal pests and their control". 12th training**, 24-28. March 2003, at His Majesty the Kings 6th Cycle Birthday Anniversary Building. Published documents, Division of Entomology and Zoology, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. (in Thai)
- Koohakan, P., Pumnuan, J., Insung, A., Lorcharoen, N. and Boonplain, A. 2014. Effect of essential oils from black pepper (*Piper nigrum* Linn.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* (Dc. ex Nees)) and citronella grass (*Cymbopogon nardus* Rendle.) against the growth of some mushroom cultures. **Khon Kaen Agriculture Journal** 42(1): 7-16. (in Thai)
- Mateen, A., Suresh, P.V.K. and Ahmed, P. 2011. Evaluation of antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* and abutilon *Abutilon indicum*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 2(4): 355-361.
- Patel, S., Sharma, V., Chauhan, N.S. and Dixit, V.K. 2012. An updated review on the parasitic herb of *Cuscuta reflexa* Roxb. **Journal of Chinese Integrative Medicine** 10(3): 249-255.
- Perveen, S., Bukhari, I.H., Ain, Q.U., Kousar, S. and Rehman, J. 2013. Antimicrobial, antioxidant and minerals evaluation of *Cuscuta europea* and *Cuscuta reflexa* collected from difference hosts and exploring their role as functional attribute. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences** 3(5): 43-49.
- Pumnuan, J., Chandrapatya, A. and Insung, A. 2010. Acaricidal activities of plant essential oils from three plants on the mushroom mite, *Luciaphorus perniciosus* Rack (Acari: Pygmephoridae). **Pakistan Journal of Zoology** 42(3): 247-252.

- Pumnuan, J., Insung, A. and Rongpol, P. 2009. Effectiveness of medical plant essential oils on pregnant female of *Luciaphorus perniciosus* Rack (Acari: Pygmephoridae). **Asian Journal of Food and Agro-Industry** 2(Special Issue): S410-S414.
- Saringkaphaibu, C., Chiengkul, A. and Jaronnasri, W. 2000. **Mushroom mite**, p. 23-42. Handout entitled "Insect-animal pests and their control", 12th training, Division of Entomology and Zoology. Published documents, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. (in Thai)
- Sieniawska, E., Swatko-Ossor, M., Sawicki, R., Skalicka-Woźniak, K. and Ginalska, G. 2017. Natural terpenes influence the activity of antibiotics against isolated *Mycobacterium tuberculosis*. **Medical Principles and Practice** 26(2): 108-112. <https://doi.org/10.1159/000454680>.
- Sobanbou, S., Bussaman, P and Chandrapatya, A. 2009. The efficacy of *Xenorhabdus spp.* against mushroom mite (*Luciaphorus spp.*). **Journal of Science and Technology Mahasarakham University** 28(1): 1-7. (in Thai)
- Tanruean, K., Kaewnarin, K., Suwannarach, N. and Lumyong, S. 2017. Comparative evaluation of phytochemicals, and antidiabetic and antioxidant activities of *Cuscuta reflexa* grown on different hosts in northern Thailand. **Natural Product Communications** 12(1): 51-54.
- Tanruean, K., Poolprasert, P., Kumla, J., Suwannarach, N. and Lumyong, S. 2019a. Bioactive compounds content and their biological properties of acetone extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. grown on various host plants. **Natural Product Research** 33(4): 544-547.
- Tanruean, K., Napiroon, T., Phusing, S., Torres, J. R.D., Villanueva, P.M. and Poolprasert, P. 2019b. Larvicidal effects of *Paederia pilifera* Hook.f. leaf and *Cuscuta reflexa* Roxb. stem extracts against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* Linn. **The Journal of Applied Science** 18(1): 31-38.
- Vijikumar, S., Ramanathan, K. and Devi, B.P. 2011. *Cuscuta reflexa* Roxb. A wonderful miracle plant in ethnomedicine. **Indian Journal of Natural Sciences** 11(9): 676-683.
- Yenjit, P. and Intana, W. 2016. Study on efficacy of *Bacillus* powder and its application to control black mold disease of grey oyster mushroom. **Agricultural Science Journal** 47(3): 405-406. (in Thai)